

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Eckhard Wolf  
Angefertigt am Klinikum rechts der Isar, II. Medizinische Klinik  
(Prof. Dr. Dieter Saur)

# **Analyse des PI3K-Signalwegs bei der Entstehung des duktalen Pankreaskarzinoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Melanie Dobler  
aus Nürnberg

München 2014

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) .....	1
1.1.1 Prädisposition und Risikofaktoren .....	2
1.1.2 Klinische Symptome und Diagnose .....	2
1.1.3 Therapiemöglichkeiten .....	3
1.1.4 Frühdiagnose und Prognose .....	3
1.2 Die Karzinogenese des PDAC .....	4
1.2.1 Pankreatische intraepitheliale Neoplasien .....	4
1.2.2 Genetische Ereignisse und PDAC-Progression .....	5
1.2.3 Weitere Merkmale des PDAC .....	7
1.3 V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) und der MAPK-Signalweg .....	7
1.3.1 Struktur und Aktivierung .....	7
1.3.2 KRAS als Angriffspunkt für Therapeutika .....	8
1.3.3 KRAS-Effektor-Signalwege .....	9
1.4 Der Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Signalweg .....	10
1.4.1 Bedeutung der Phosphoinositid-3-Kinasen .....	10
1.4.1.1 Einteilung und Struktur .....	10
1.4.1.2 Pathogene Funktion der PI3Ks .....	10
1.4.1.3 <i>PIK3CA</i> -Mutationen .....	11
1.4.2 Aktivierung und Regulation .....	11
1.4.2.1 Signalwirkung von PI3K .....	12
1.4.2.2 <i>Phosphatase and tensin homolog</i> (PTEN) .....	12
1.4.2.3 AKT-Signalwirkung .....	13
1.4.3 Inhibitoren .....	14
1.5 Mausmodelle für das pankreatische Adenokarzinom .....	15
1.5.1 <i>KRAS</i> <sup>G12D/+</sup> -Mausmodell .....	15
1.5.2 PI3K-Mausmodelle .....	16
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit .....	16
<b>2 Material.....</b>	<b>18</b>
2.1 Technische Ausstattung und Geräte .....	18
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	20
2.3 Reagenzien und Enzyme .....	21
2.4 Antikörper .....	22
2.5 Puffer und Lösungen für Molekularbiologie .....	23

2.6	PCR-Primer und Sequenzen .....	24
2.7	Zellkultur .....	25
2.8	Histologische Reagenzien und Puffer .....	25
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1	Tierexperimente .....	27
3.1.1	Verwendete Mauslinien .....	27
3.1.2	Sektion .....	28
3.2	Histologie .....	29
3.2.1	Fixierung der Organe .....	29
3.2.1.1	Paraffinfixierung .....	29
3.2.1.2	Kryofixierung .....	29
3.2.2	Histologische Färbungen .....	29
3.2.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	29
3.2.2.2	Alzianblau-Färbung .....	29
3.2.2.3	Immunhistologische Färbungen .....	30
3.2.3	Dokumentation .....	30
3.3	Zellkultur .....	31
3.3.1	Kultivierung pankreatischer Tumorzellen und Kryopräservierung .....	31
3.3.2	Inhibitionsversuche .....	31
3.4	Molekularbiologische Methoden .....	31
3.4.1	Genotypisierung und Regentypisierung .....	31
3.4.1.1	DNA-Extraktion und Amplifizierung .....	32
3.4.1.2	Gelelektrophorese .....	32
3.4.1.3	Regentypisierung .....	32
3.4.2	Western Blot .....	33
3.4.2.1	Proteinisolation .....	33
3.4.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	33
3.4.2.3	Gelelektrophorese und Blotten .....	33
3.4.2.4	Proteinnachweis .....	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
4.1	Die pankreasspezifische Expression von onkogenem PI3K-p110 $\alpha^{H1047R}$ führt zur Entstehung von azinär-duktalem Metaplasien (ADMs) und pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) .....	35
4.2	Die pankreasspezifische Expression von onkogenem PI3K-p110 $\alpha^{H1047R}$ führt zur Entstehung von metastasierenden PDACs .....	37
4.3	Die pankreasspezifische Expression von onkogenem PI3K-p110 $\alpha^{H1047R}$ führt zur konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs in ADMs, PanINs und PDAC ...	39
4.4	Die pankreasspezifische Expression von onkogenem PI3K-p110 $\alpha^{H1047R}$ führt zur konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalwegs in ADMs, PanINs und PDAC	42

4.5	Die <i>in-vitro</i> -Inhibition des PI3K-Signalwegs und des PI3K-Effektors AKT blockiert im <i>Pik3ca</i> *-Modell die konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, nicht aber die MAPK-Signalweg-Aktivierung .....	44
4.5.1	PI3K-Signalweg-Inhibition .....	44
4.5.2	MAPK-Signalweg-Inhibition .....	46
4.6	Onkogene Aktivierung des PI3K-Signalwegs aktiviert ein Seneszenzprogramm im Pankreas, das durch den Verlust von <i>CDKN2A</i> umgangen wird.....	47
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
5.1	Das <i>Pik3ca</i> *-Mausmodell rekapituliert das <i>Kras</i> *-Mausmodell .....	51
5.1.1	<i>Pik3ca</i> *-Mäuse entwickeln analog zu <i>Kras</i> *-Mäusen PanINs und metastasierenden PDAC .....	51
5.1.2	Der PI3K- und der MAPK-Signalweg sind in PanINs und PDAC der <i>Pik3ca</i> *-Mäuse unabhängig von <i>Kras</i> aktiviert .....	52
5.1.3	PI3K ist essenziell für die <i>Kras</i> -abhängige PDAC-Entstehung .....	54
5.1.4	Pharmakologische PI3K- und AKT-Inhibitoren stellen eine Therapiemöglichkeit für das PDAC dar .....	54
5.1.5	Expression von onkogenem <i>Pik3ca</i> * aktiviert ein Seneszenzprogramm, das durch <i>CDKN2A</i> -Verluste umgangen wird .....	55
5.2	Fazit .....	56
5.3	Ausblick .....	57
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>68</b>

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Technische Ausstattung und Geräte. ....	18
Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien.....	20
Tabelle 2-3: Reagenzien und Enzyme. ....	21
Tabelle 2-4: Antikörper für Immunhistologie. ....	22
Tabelle 2-5: Antikörper für Western Blot.....	22
Tabelle 2-6: Puffer und Lösungen für Molekularbiologie. ....	23
Tabelle 2-7: PCR-Primer und Sequenzen. ....	24
Tabelle 2-8: Reagenzien für Zellkultur.....	25
Tabelle 2-9: Medien für Zellkultur. ....	25
Tabelle 2-10: Reagenzien und Kits für histologische Analysen. ....	25
Tabelle 2-11: Puffer und Lösungen für histologische Analysen.....	26
Tabelle 3-1: Immunhistologie-Antikörper und Konzentrationen. ....	30
Tabelle 3-2: Polymerase-Kettenreaktion. ....	32
Tabelle 3-3: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele. ....	33
Tabelle 3-4: Western-Blot-Antikörper. ....	34

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Progressionsmodell für das Pankreaskarzinom. ....	4
Abbildung 3-1: Gezieltes Einbringen einer LoxP-Stop-LoxP stillgelegten <i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup> - Kassette in den murinen <i>Rosa26</i> -Lokus. ....	27
Abbildung 4-1: <i>Pik3ca</i> *-Mäuse entwickeln PanINs. ....	36
Abbildung 4-2: <i>Pik3ca</i> *-Mäuse entwickeln metastasierenden PDAC .....	38
Abbildung 4-3: In <i>Pik3ca</i> *-Mäusen wird der PI3K-Signalweg Kras-unabhängig aktiviert .....	41
Abbildung 4-4: In <i>Pik3ca</i> *-Mäusen wird der MAPK-Signalweg aktiviert. ....	43
Abbildung 4-5: Die <i>in-vitro</i> -Inhibition von mTOR/PI3K und AKT blockiert im <i>Pik3ca</i> *- Mausmodell die Aktivierung des PI3K-Signalwegs. Die <i>in-vitro</i> -Inhibition von MEK hemmt im <i>Pik3ca</i> *-Modell den MAPK-Signalweg.....	45
Abbildung 4-6: In <i>Pik3ca</i> *-Mäusen wird ein Seneszenzprogramm aktiviert, das durch <i>CDKN2A</i> -Verlust umgangen wird.....	49

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol/mikromolar
A	Adenin
A.	Arteria
ADM	Azinär-duktale Metaplasie
AKT/PKB	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRCA2	<i>Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein</i>
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CDK	Cyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cm	Zentimeter
ddH <sub>2</sub> O	Zweifach destilliertes Wasser
D-MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DPC4	<i>Deleted in pancreatic cancer locus 4</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	et alii
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FOXO	Forkhead Box Protein O
FTIs	Farnesyltransferase-Inhibitoren



g	Gramm
G	Guanin
GAPs	GTPase-aktivierende Proteine
GDP, GTP	Guanosindiphosphat, Guanosintriophosphat
GEFs	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren
GSK3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase3 $\beta$
h	Stunde(n) ( <i>hour</i> )
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Kras	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
l	Liter
LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LSL	LoxP-Stop-LoxP
m	Monat(e)
M	Mol/molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEF	Murine embryonische Fibroblasten ( <i>mouse embryonic fibroblast</i> )
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol/millimolar
MMF	Metamizol-Midazolam-Fentanyl
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mut	Mutiert
n	Anzahl ( <i>number</i> )
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1 (NF<math>\kappa</math>B1)</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol/nanomolar
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom ( <i>non small cell lung cancer</i> )
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
p-	Phospho-
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom ( <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> )
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
Pdx1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-Disphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-Trisphosphat
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Ptf1a	<i>Pancreas specific transcription factor, 1a</i>
R26	<i>Rosa26</i>
RAF	<i>Rat fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
Rb	Retinoblastom-Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde(n)
SOS	<i>Son of sevenless</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCF	<i>T-cell specific transcription factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TP53 / Trp53	<i>Transformation related protein 53</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSC1	Hamartin
U	Einheiten
UV	Ultraviolett
V	Volt
Wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)

Tumoren der Bauchspeicheldrüse gehören zu den bösartigsten Krebserkrankungen. Insbesondere das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC), der mit Abstand häufigste Tumor des exokrinen Pankreas, zeichnet sich durch eine äußerst ungünstige Prognose aus (Bardeesy & DePinho, 2002; Hezel *et al.*, 2006; Hidalgo, 2010). So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei max. 6% (Siegel *et al.*, 2013). Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet hat sich die Prognose in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert (Hidalgo, 2010).

Mit ca. 44.000 erwarteten Erkrankungsfällen im Jahr 2012 liegt die Inzidenz für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms in den USA zwar lediglich bei 3% und steht damit auf Platz 10 der häufigsten Krebserkrankungen, jedoch stellt es die vierthäufigste Todesursache für krebssassoziierten Tod dar (ca. 38.000 erwartete Todesfälle, entspricht 6–7% aller Krebstodesfälle; Siegel *et al.*, 2013). Damit hat das Pankreaskarzinom die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen (Adler *et al.*, 2007). Ähnlich verhält es sich in Deutschland, wo im Jahr 2012 mehr als 15.000 Erkrankungsfälle und annähernd so viele Pankreaskarzinom-bedingte Todesfälle erwartet werden (Adler *et al.*, 2007).

Verantwortlich für die hohe Letalität sind einige Charakteristika des Pankreaskarzinoms, die sowohl eine frühe Diagnose als auch eine komplette Heilung meist verhindern (Schneider *et al.*, 2005). Bis heute gibt es keinen Tumormarker, der bei Routineuntersuchungen (Screenings) im Rahmen der Gesundheitsvorsorge zuverlässig auf eine beginnende Krebserkrankung der Bauchspeicheldrüse hindeutet (Bardeesy & DePinho, 2002; Herreros-Villanueva *et al.*, 2013). Die klinische Symptomatik ist i.d.R. unspezifisch, ernsthafte Beschwerden treten meist erst auf, wenn der Tumor eine Größe von mehreren Zentimetern erreicht hat. Hinzu kommt, dass das Pankreaskarzinom stark invasiv wächst und schnell metastasiert (Hezel *et al.*, 2006). All diese Aspekte führen dazu, dass das Pankreaskarzinom meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird.

Auch die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt. Die einzige potenziell kurative Behandlung ist eine Resektion des Tumors, diese ist aber nur bei 15–20% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung überhaupt noch gegeben (Bardeesy & DePinho, 2002). Aber selbst nach erfolgter Operation kommt es häufig zu Rezidiven und nur etwa ein Fünftel der operierten Patienten überlebt fünf Jahre oder länger (Hamacher *et al.*, 2008; Hidalgo, 2010). Weiterhin spricht das Pankreaskarzinom nur in geringem Maße auf Radio- und Chemotherapie an. So bleiben bei Patienten mit nicht operablem Tumor nur palliative

Therapieformen mit einer mittleren Überlebenszeit von 6–12 Monaten (Bardeesy & DePinho, 2002; Hezel *et al.*, 2006; Hidalgo, 2010).

### 1.1.1 Prädisposition und Risikofaktoren

Die Hintergründe der Entstehung eines Pankreaskarzinoms sind derzeit noch unvollständig geklärt. Etwa 5–10% der PDACs schreibt man einem familiären Hintergrund zu (Hezel *et al.*, 2006). Personen, in deren Familien bei mindestens vier erstgradig Verwandten ein PDAC auftritt, haben ein bis zu 57-fach erhöhtes Risiko, an PDAC zu erkranken (Hidalgo, 2010). Die vererbten Gendefekte sind teilweise noch unbekannt, oft handelt es sich jedoch um Keimbahnmutationen von „klassischen“ Tumorsuppressorgenen wie *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*, das für p16<sup>INK4A</sup> und p14<sup>ARF</sup> kodiert) oder *breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2)*; Bardeesy & DePinho, 2002; Hezel *et al.*, 2006).

Ansonsten sind einige Risikofaktoren bekannt. So tritt das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehäuft in fortgeschrittenem Alter auf. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2008 in Deutschland für Männer bei 70, für Frauen bei 76 Jahren (Adler *et al.*, 2007). Als prädisponierende Faktoren gelten Tabakkonsum, Adipositas, Diabetes mellitus und Pankreatitis. Diskutiert werden auch der Konsum von Alkohol, Kaffee oder Aspirin (Hidalgo, 2010). Weiterhin zeigten Studien einen Zusammenhang mit fett- bzw. cholesterinreicher Ernährung, Leberzirrhose und vorhergehender Cholezystektomie (Hezel *et al.*, 2006).

### 1.1.2 Klinische Symptome und Diagnose

Die meisten PDACs entwickeln sich im Pankreaskopf und verursachen durch die Obstruktion des Gallengangs einen Gallenstau. Ikterus und Bauchschmerzen sind daher die ersten und prägnantesten Beschwerden, mit denen sich Pankreaskarzinom-Patienten beim Arzt vorstellen. Betroffene leiden außerdem unter Gewichtsverlust, allgemeiner Schwäche, Anorexie, Übelkeit und diffusem Unwohlbefinden (Hidalgo, 2010).

PDAC infiltriert das umgebende Gewebe einschließlich Lymphgewebe, Milz und Peritonealhöhle und metastasiert in entfernte Organe wie Leber und Lunge (Hidalgo, 2010). Um das weitere Behandlungsvorgehen festzulegen, wird zunächst bestimmt, in welchem Umfang sich Primärtumor und Metastasen in Lymphsystem und Organen ausgebreitet haben. Die diagnostischen Möglichkeiten für das „Staging“ des Pankreaskarzinoms umfassen Computertomografie, Kernspintomografie, endoskopische Ultraschalldiagnostik (EUS) und endoskopische retrograde Cholangiopankreatografie (ERCP), möglich ist auch eine Positions-Emissions-Tomografie (PET, Hidalgo, 2010). Metastasierte Tumoren und Tumoren, die mit der A. mesenterica superior oder der A. coeliaca verwachsen sind, gelten als nicht operabel (Hidalgo, 2010).

### 1.1.3 Therapiemöglichkeiten

Bei den Patienten, bei denen der Tumor noch operabel ist, wird – wenn möglich – eine pankreaserhaltende Tumorresektion wie z.B. die klassische Pankreaskopfresektion mit Duodenektomie nach Whipple durchgeführt (Bardeesy & DePinho, 2002; Hidalgo, 2010; Shrikhande & Barreto, 2012). Klinische Studien zeigten, dass eine postoperative Chemotherapie sowohl die progressionsfreie, als auch die gesamte Überlebensdauer erhöhte (Hidalgo, 2010). Die auf diese Weise behandelten Patienten erreichten eine mediane Überlebenszeit von 20–22 Monaten (Hidalgo, 2010). Relativ neu ist die präoperative neoadjuvante Behandlung. Phase-2-Studien zeigten hier vergleichbare Ergebnisse wie bei einer postoperativen Chemotherapie (Hidalgo, 2010).

Bei den meisten Patienten, bei denen der Tumor zum Zeitpunkt der Vorstellung bereits zu weit fortgeschritten ist, um eine Operation möglich oder sinnvoll zu machen, bleiben nur noch palliative Maßnahmen wie die Chemotherapie, Radiotherapie oder eine Kombination der beiden, die Radiochemotherapie (Hidalgo, 2010).

Die Strahlentherapie ist umstritten, da das Pankreaskarzinom in der Regel schlecht darauf anspricht und die Nebenwirkungen der Therapie höher als der Nutzen sind (Hidalgo, 2010). Meist wird daher eine Chemotherapie durchgeführt. Gemcitabin, ein Cytidin-Nukleosid-Analogon, ist aufgrund seiner vergleichsweise geringen Toxizität das Mittel der Wahl (Adler *et al.*, 2007; Hezel & Bardeesy, 2008). Aber auch Kombinationen von Gemcitabin mit Oxaliplatin, Cisplatin, Capecitabin oder Erlotinib sind gängig (Hidalgo, 2010). Aktuelle Studien empfehlen FOLFIRINOX, ein Kombinationspräparat aus Oxaliplatin, Folinsäure, Irinotecan und 5-Fluorouracil bei metastasiertem Pankreaskarzinom. In einer Vergleichsstudie von Gemcitabin und FOLFIRINOX an Patienten mit bestätigtem metastasiertem Adenokarzinom ohne chemotherapeutische Vorbehandlung wurde eine signifikante Erhöhung der medianen Überlebenszeit von 6,8 (Gemcitabin) auf 11,1 Monate (FOLFIRINOX) beobachtet. Allerdings traten bei FOLFIRINOX signifikant häufiger toxische Effekte auf als bei Gemcitabin, sodass diese Therapie nur bei Patienten mit sehr gutem Allgemeinzustand (ECOGO-1) empfohlen wird (Vaccaro *et al.*, 2011).

### 1.1.4 Frühdiagnose und Prognose

Aktuell gibt es kaum eine Möglichkeit, PDAC in frühen Stadien zu diagnostizieren. Tumormarker scheitern entweder an ihrer geringen Sensitivität, Spezifität oder an der schlechten Praktikabilität (Hezel & Bardeesy, 2008; Herreros-Villanueva *et al.*, 2013). Einziger Biomarker, der ansatzweise eine Aussagekraft hat, ist das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA19-9). Dieser dient allerdings eher als prognostischer Faktor bei bereits diagnostiziertem Pankreaskarzinom, kann aber bei etwa 10% aller PDAC-Patienten selbst in fortgeschrittenem Stadium

nicht nachgewiesen werden (Herrerros-Villanueva *et al.*, 2013). Des Weiteren wird Pim-1 aktuell als Biomarker für den Erfolg einer PDAC-Operation diskutiert (Herrerros-Villanueva *et al.*, 2013). Reiser-Erkan *et al.* entwickelten hierfür ein „Grading“-System, wonach Patienten mit niedriger Pim-1-Expression eine signifikant verkürzte Überlebenszeit aufweisen (13,8 Monate gegen 24,4 Monate; Reiser-Erkan *et al.*, 2008).

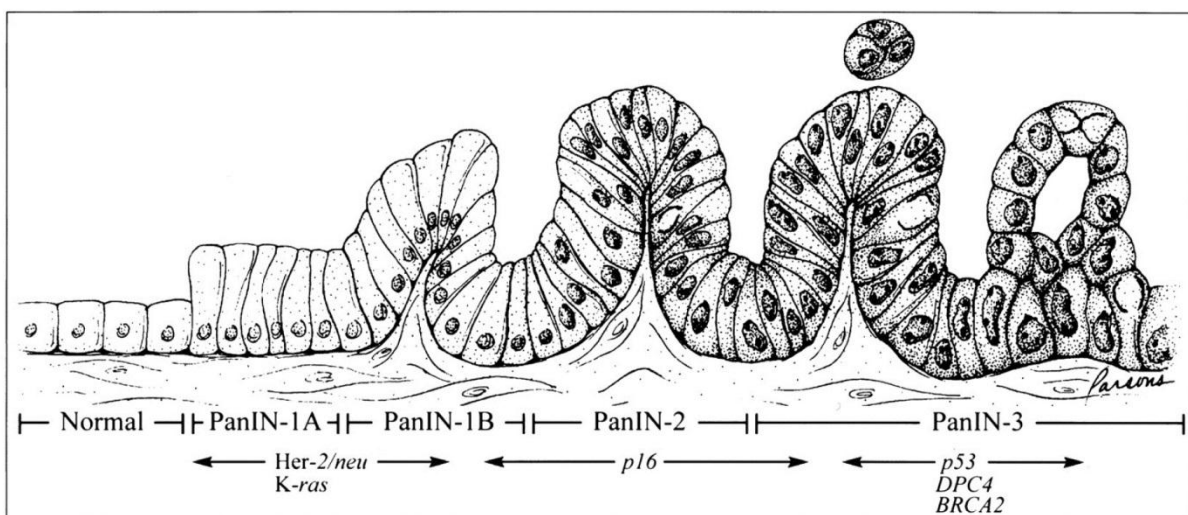
Trotz intensivster Forschung auf diesem Gebiet hat sich die Prognose für das duktales Pankreaskarzinom in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert. Der entscheidende Durchbruch in der Etablierung erfolgreicher Therapiemodelle steht noch aus. Um gezielt Therapeutika entwickeln zu können, müssen zunächst die molekularen Mechanismen bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms vollständig aufgeklärt werden.

## 1.2 Die Karzinogenese des PDAC

### 1.2.1 Pankreatische intraepitheliale Neoplasien

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas entwickelt sich höchstwahrscheinlich aus azinären Zellen (Rooman & Real, 2012). Die nicht-invasiven Vorläuferläsionen des invasiven Pankreaskarzinoms werden azinär-duktales Metaplasien (ADMs) und pankreatische intraepitheliale Neoplasien genannt (PanINs; De La O *et al.*, 2008; Perera & Bardeesy, 2012).

Anhand ihrer morphologischen Merkmale werden PanINs in einem Progressionsmodell in die Grade 1A, 1B, 2 und 3 eingeteilt (► Abbildung 1-1; Hruban *et al.*, 2001; Hezel *et al.*, 2006). In normalen Pankreasgängen besitzen die Epithelzellen typischerweise eine kubische Form.



**Abbildung 1-1: Progressionsmodell für das Pankreaskarzinom.**

Normales Gangepithel entwickelt sich über eine Reihe von histologisch definierten Vorläuferläsionen (PanINs) zu infiltrierendem Karzinom (von links nach rechts). Die Überexpression von *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2/neu; ERBB2) und Punktmutationen im *KRAS*-Gen treten in frühen, die Inaktivierung von  $p16^{\text{INK4A}}$  in mittleren und die Inaktivierung von TP53, DPC4, und BRCA2 in späten Progressionsstadien auf. Abgedruckt mit freundlicher Genehmigung der *American Association for Cancer Research* (Hruban *et al.*, 2000).

PanINs des Grades 1A stellen sich als flache Läsionen mit hochprismatischen Epithelzellen mit reichlicher Muzinabsonderung und basal orientierten Zellkernen dar. PanIN-1B zeigen dazu zusätzlich eine papilläre bzw. mikropapilläre Form (Hruban *et al.*, 2001).

PanIN-2 sind meist papillär, können aber auch flach sein. Sie weisen nukleäre Anomalien auf: Die Kernpolarität nimmt ab und es sind vergrößerte, pseudostratifizierte und hyperchromatische Zellkerne zu finden, die sich an einer Stelle anhäufen („*nuclear crowding*“). Gelegentlich können auch nicht-apikale Mitosen vorkommen (Hruban *et al.*, 2001).

PanIN-3 sind ebenfalls papillär oder mikropapillär und von siebartiger Struktur. Luminal treten nekrotische Zellen auf und abgelöste Zellhaufen ragen ins Lumen („*Budding off*“). Die nukleäre Polarität geht verloren und es liegen dystrophische Becherzellen und oft atypische Mitosen vor. Weiterhin sieht man prominente Kernkörperchen (Nukleoli; Hruban *et al.*, 2000). PanIN-3-Läsionen ähneln auf zytonukleärem Level bereits Karzinomen, im Gegensatz zu diesen ist die Basalmembran aber noch erhalten, daher werden sie auch „*Carcinoma in situ*“ genannt (Hruban *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Genetische Ereignisse und PDAC-Progression

Parallel zum zunehmenden Differenzierungsgrad der PanINs treten charakteristische Mutationen auf (► Kapitel 1.2.2; Aguirre *et al.*, 2003; Bardeesy *et al.*, 2006). Das Pankreaskarzinom entsteht durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen, die in einem komplexen Prozess akkumulieren. Diese Genmutationen begleiten die Progression der PanINs zum voll invasiven Karzinom und treten zu charakteristischen Zeitpunkten auf (Hidalgo, 2010). Eine Untersuchung an humanen PDACs ergab, dass jeder Tumor durchschnittlich 63 genetische Anomalien aufweist (Bardeesy & DePinho, 2002; Hidalgo, 2010; Morris *et al.*, 2010). Die häufigsten Mutationen finden im *KRAS*-Protoonkogen und in den Tumorsuppressorgenen *CDKN2A*, *TP53* und *DPC4/SMAD4* statt (Hidalgo, 2010).

In pathologischen Studien wurde nachgewiesen, dass *KRAS*-Mutation eines der frühesten genetischen Ereignisse ist, die man in humaner PanIN-Progression sieht. *KRAS* ist in mehr als 90% der niedriggradigen PanINs und nahezu allen PDACs mutiert, sporadisch tritt sie auch in physiologischem Pankreasgewebe auf (Hezel *et al.*, 2006; Hidalgo, 2010; Morris *et al.*, 2010). Da *KRAS* zahlreiche Effektor-Signalwege stimuliert, kann sich eine Mutation im *KRAS*-Gen auf zahlreiche zelluläre Funktionen wie Proliferation, Zellzyklus und Überleben der Zellen auswirken (Tuveson *et al.*, 2004; Castellano & Downward, 2011).

*CDKN2A*-Deletion tritt v.a. in höhergradigen PanINs auf (Bardeesy & DePinho, 2002) und ist in 95% aller PDACs vorhanden (Hidalgo, 2010). *CDKN2A* kodiert zwei Tumorsuppressoren,

p16<sup>INK4A</sup> und p14<sup>ARF</sup> (in der Maus p19<sup>ARF</sup>). p16<sup>INK4A</sup> verhindert die Bindung von CDK4 und CDK6 an D-Typ-Zykline, erleichtert die CDK4- und CDK6-Cyclin-D-medierte Phosphorylierung und Inaktivierung des Retinoblastom(RB)-Tumorsuppressorgens und damit den Eintritt der Zellen in die S-Phase (Bardeesy *et al.*, 2006). Aus dem Verlust von p16<sup>INK4A</sup> resultiert also eine erhöhte Zellproliferation (Hidalgo, 2010) und p16<sup>INK4A</sup>-Keimbahnmutationen gehen mit erhöhtem PDAC-Risiko einher (Hezel *et al.*, 2006). Deletiertes p16<sup>INK4A</sup> kann PDAC nicht alleine hervorrufen, akzeleriert im Mausmodell aber Progression und Metastasierung des PDAC nach vorausgehender *KRAS*-Mutation (Aguirre *et al.*, 2003).

p14<sup>ARF</sup> stabilisiert den Tumorsuppressor TP53 durch Hemmung des MDM2-vermittelten Abbaus von TP53. Durch die verringerte Expression von p14<sup>ARF</sup> werden also TP53-regulierte Signalwege unterdrückt (Bardeesy & DePinho, 2002). p14<sup>ARF</sup> hat aber vermutlich auch TP53-unabhängige Funktionen inklusive der Hemmung von rRNA-Prozessierung. Alleinige p14<sup>ARF</sup>-Mutationen wurden im PDAC nicht beobachtet (Bardeesy & DePinho, 2002).

In 50–75% der humanen PDACs findet man mutiertes *TP53*, meistens Missense-Mutationen der DNA-bindenden Domäne (Hezel *et al.*, 2006). Sie treten eher in höhergradigen PanINs auf, nachdem bereits *KRAS*-Mutation und p16<sup>INK4A</sup>-Verluste stattgefunden haben und sind gekoppelt mit dem Verlust des verbleibenden Wildtyp-Allels, (*Loss of Heterozygosity*, LOH, Bardeesy *et al.*, 2006). TP53 reguliert zahlreiche tumorsuppressive Mechanismen und verhindert so die Krebsentstehung im Pankreas (Bardeesy *et al.*, 2006).

Auch *SMAD4/DPC4*-Verluste finden vorwiegend in höhergradigen PanINs statt. In etwa der Hälfte aller humanen PDACs treten *DPC4*-Verluste auf. Der Transkriptionsfaktor *SMAD4/DPC4* ist eine Schlüsselkomponente in der TGF- $\beta$ -Signalkaskade (Bardeesy & DePinho, 2002). TGF- $\beta$  wiederum hemmt das Wachstum von Epithelzellen durch Blockierung des Übergangs von der G1- zur S-Phase im Zellzyklus oder durch Einleitung der Apoptose. *SMAD4*-Verlust führt also zu TGF- $\beta$ -mediierter Wachstumsinhibition. Außerdem scheint *SMAD4* auch im Rahmen der Tumorstroma-Interaktionen an der PDAC-Progression mitzuwirken (Bardeesy & DePinho, 2002; Hezel *et al.*, 2006).

Neben den genannten Genmutationen tragen weitere genetische Veränderungen zur PDAC-Karzinogenese bei. In 17% aller PDACs kommen *BRCA2*-Mutationen v.a. in höhergradigen Läsionen vor (Bardeesy & DePinho, 2002). Auch häufig sind embryonale Signalwege wie Hedgehog, Notch oder Wnt- $\beta$ -Catenin reaktiviert (Bardeesy & DePinho, 2002; Morris *et al.*, 2010). Die Überexpression von Wachstumsfaktoren und ihrer entsprechenden Rezeptoren wie EGFR und ERBB3, die Dysfunktion von Telomeren und strukturelle Chromosomenaberrationen spielen ebenfalls eine Rolle (Bardeesy & DePinho, 2002; Hidalgo, 2010; Morris *et al.*, 2010).



### 1.2.3 Weitere Merkmale des PDAC

Typischerweise befindet sich in der Mikroumgebung des PDAC ein dichtes Stroma aus extrazellulärer Matrix, Fibroblasten und Entzündungszellen, genannt Desmoplasie (Hidalgo, 2010). Eine große Rolle spielen die fibroblastenartigen pankreatischen Sternzellen (Jaster, 2004; Hezel *et al.*, 2006), sie sind wahrscheinlich auch für die geringe Blutgefäßversorgung verantwortlich, die für das Pankreaskarzinom charakteristisch ist (Hidalgo, 2010).

Weiterhin wurde eine Untergruppe von Krebszellen mit Stammzell-Eigenschaften identifiziert, die 1–5 % des Tumors stellen. Sie sind fähig zu unbegrenzter Selbsterneuerung und führen zu weiter ausdifferenzierten Zellen. Pankreaskarzinom-Stammzellen sind resistent gegen Chemo- und Radiotherapie und könnten daher ein Grund sein, warum diese Therapieformen das Pankreaskarzinom nicht heilen können (Hidalgo, 2010).

## 1.3 V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) und der MAPK-Signalweg

RAS-Mutationen spielen eine große Rolle in der Entstehung verschiedener Krebsarten. Insgesamt findet man sie etwa bei einem Drittel aller Krebsarten, und nahezu alle PDACs haben Mutationen am *KRAS*-Gen (Morris *et al.*, 2010; Karreth, 2012).

### 1.3.1 Struktur und Aktivierung

Das Protein KRAS gehört genau wie NRAS und HRAS zur Superfamilie der Ras-Proteine, einer Familie von kleinen G-Proteinen (GTP-bindende-Proteine oder GTPasen). Kleine GTPasen können zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen-Form und einer aktiven, GTP-gebundenen Form an der Plasmamembran wechseln. KRAS interagiert nur in der aktiven Form mit seinen Effektoren, die dann durch Rezeptor- und *second messenger*-Systeme die Signalweiterleitung vermitteln. Die intrinsische GTP-Hydrolyse (GTPase-Aktivität) sowie der intrinsische Nukleotidaustausch und damit der Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Zustand von KRAS wird durch die Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und die GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigt (Castellano & Downward, 2011; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). GEFs stimulieren die Loslösung von GDP, damit GTP gebunden werden kann. Ihre Gegenspieler, die GAPs, stimulieren die GTPase-Aktivität und beenden damit Downstream-Signale (Hezel *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2010).

In Tumoren ist RAS entweder mutiert und konstitutiv aktiv oder es wird rezeptorvermittelt aktiviert: Ein Wachstumsfaktor bindet an den extrazellulären membranständigen Rezeptor einer Rezeptortyrosinkinase (RTK), dadurch dimerisieren die zwei Untereinheiten der RTK. Rezeptortyrosinkinasen haben je eine enzymatisch aktive Kinasedomäne an der Innenseite der Zellmembran, die die Phosphorylierung der eigenen und der anderen Untereinheit

katalysiert. Daran kann Growth-Factor-Receptor-Bound 2 (GRB2) binden, woran wiederum Son of Sevenless (SOS) bindet. SOS kann dann an membranständiges KRAS binden und katalysiert den Austausch von GDP mit GTP, wodurch KRAS aktiviert wird und an seine Effektorproteine binden kann (Castellano & Downward, 2011).

### 1.3.2 KRAS als Angriffspunkt für Therapeutika

RAS-Gene sind die am häufigsten mutierten Onkogene. Da sie in ca. 30% aller humanen Krebsarten zu finden sind (Karreth, 2012), stellen sie ein attraktives therapeutisches Ziel dar. Aktuell existieren keine einsetzbaren Inhibitoren.

Erstmals zeigten Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs) inhibierende Wirkung gegen KRAS (Castellano & Downward, 2011). Die Farnesyltransferase (FTase) ist ein Enzym, das KRAS posttranslational modifiziert und dadurch die Verankerung von KRAS an der Zellmembran ermöglicht, welche notwendig ist, damit KRAS die rezeptorvermittelten Signale ins Zellinnere weiterleiten kann. Die präklinischen Erfolge der FTIs konnten allerdings in klinischen Studien nicht rekapituliert werden aufgrund von kompensatorischen Mechanismen der Geranylgeranyltransferase (GGTase-I), die bei Blockierung der FTase ebenfalls in der Lage ist, KRAS zu aktivieren (Zimmermann *et al.*, 2013).

Aktuell werden auch niedermolekulare KRAS-Inhibitoren wie z.B. Deltarasin in onkogenen KRAS-abhängigen PDAC-Zellen und *in vivo* getestet. Die Bindung des Inhibitors an PDE $\delta$  verhindert die PDE $\delta$ -KRAS-Bindung und damit den Transport von KRAS an die Zellmembran. Auf diese Weise werden onkogene Funktionen von KRAS wie z.B. Proliferation von pankreatischen Krebszellen und die Aktivierung von KRAS-Effektor-Signalwegen inhibiert. In einem Mausmodell mit xenografierten Mäusen mit subkutanen PDAC-Tumoren konnte eine dosisabhängige Reduktion des Tumorwachstums beobachtet werden. Die Unterbrechung der PDE $\delta$ -KRAS-Bindung könnte also zukünftig eine therapeutische Option darstellen. Allerdings gibt es auch hier Anhaltspunkte für Kompensationsmechanismen, ebenso sind noch die toxischen Effekte näher zu untersuchen (Zimmermann *et al.*, 2013).

Ein Agenz, das mit aktivem RAS konkurriert, ist das Farnesyl-Analogen Salirasib. Dieses verhindert die Bindung von RAS an Galectin, wodurch RAS im Zytoplasma abgebaut wird. Salirasib zeigte bereits erfolgversprechende Testergebnisse in klinischen Studien (Baker & Der, 2013).

Weitere potenzielle KRAS-Inhibitoren, die Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren, können nur bei Patienten angewendet werden, die keine RAS-Mutationen, sondern lediglich eine RAS-Aktivierung aufgrund einer onkogenen RTK-Aktivierung aufweisen (Castellano & Downward, 2011).

### 1.3.3 KRAS-Effektor-Signalwege

RAS vermittelt seine Wirkung über verschiedene Signalwege. Der MAPK-(RAS/Raf/MEK/ERK-)Signalweg ist einer der wichtigsten Effektor-Signalwege für die RAS-induzierte Onkogenese (Mendoza *et al.*, 2011). Die Aktivierung von KRAS führt zur Aktivierung der RAF-Kinase, die MEK phosphoryliert und damit aktiviert, woraufhin MEK wiederum die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK) phosphoryliert und aktiviert (Bardeesy & DePinho, 2002).

Die Bedeutung von RAF für die Krebsentstehung wurde anhand aktivierender BRAF-Mutationen gezeigt, die in vielen malignen Tumorarten (u.a. Melanome, kolorektales Karzinom) auftreten. In PDAC ist BRAF allerdings selten mutiert (Hezel *et al.*, 2006). CRAF dagegen ist für die Entstehung von KRAS-ausgelöstem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) essenziell (Blasco *et al.*, 2011).

Aktiviertes ERK reguliert über p90-ribosomal-S6-Kinase (RSK) diverse Transkriptionsfaktoren (Mendoza *et al.*, 2011). Auch für das Zellüberleben, die Zellteilung und die Zellbeweglichkeit ist aktiviertes ERK aufgrund seiner Effektoren c-Fos und c-Myc sehr wichtig. Die ERK-Signalkaskade führt je nach zellulärem Kontext zur Proliferation oder Seneszenz. Eine unphysiologische Hyperaktivierung des RAS-ERK-Signalwegs bewirkt Expression von *cyclin dependent kinase* (CDK)-Inhibitoren, die einen Zellzyklusarrest auslösen (Mendoza *et al.*, 2011).

Der NFκB-Transkriptionsfaktor ist ein weiterer wichtiger Downstream-Mediator des KRAS-abhängigen Signalwegs (Hezel *et al.*, 2006), der beispielsweise Prozesse wie Immunantwort oder Apoptose reguliert (Bader *et al.*, 2005). Konstitutive NFκB-Aktivität wird in einigen Krebsarten beobachtet, wo es für Angiogenese, Zellüberleben und Invasion verantwortlich gemacht wird. Die Mehrzahl primärer PDACs, nicht aber normales Pankreasgewebe zeigen konstitutive NFκB-Aktivität (Hezel *et al.*, 2006).

Da KRAS bis heute nicht erfolgreich inhibiert werden kann, zielen alternative Therapien auf die KRAS-Effektor-Signalwege (Hezel *et al.*, 2006). Mittlerweise existiert eine Reihe von selektiven Inhibitoren des MAPK-Signalwegs. Die Inhibition von MAPK führte beispielsweise zu einer verringerten Proliferation von PDAC-Zelllinien und Zellzyklus-Arrest. Pharmakologische Inhibition sowohl von MEK als auch von PI3K/TOR in einem KRAS-mutierten Mausmodell mit frühem Lungenkrebs führte zu einem Rückgang des Tumors (Engelman *et al.*, 2008). Die simultane Inhibition dieser beiden Signalwege könnte also eine klinisch vielversprechende Möglichkeit sein (Karreth, 2012).

## 1.4 Der Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Signalweg

### 1.4.1 Bedeutung der Phosphoinositid-3-Kinasen

Einer der wichtigsten KRAS-Effektor-Signalwege ist der PI3K-Signalweg. Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) sind eine Familie von Lipidkinasen, die an vielen zellulären Prozessen wie Proliferation, Zellwachstum, Apoptose, Motilität und Differenzierung maßgeblich beteiligt sind (Vanhaesebroeck *et al.*, 2010).

Seit den 1980ern werden die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) sowie ihre Substrate, die Phosphatidylinositole intensiv beforscht (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Erstmals wurde 1988 ein Zusammenhang zwischen Phosphoinositid-Kinase-Aktivität und dem Polyomavirus-T-Onkoprotein („*Polyoma Virus Middle T Oncoprotein*“) demonstriert (Whitman *et al.*, 1988; Vogt *et al.*, 2012; Vanhaesebroeck *et al.*, 2012).

#### 1.4.1.1 Einteilung und Struktur

Es existieren acht Isoformen der PI3Ks, sie werden in drei funktionelle Klassen eingeteilt (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Fruman *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2009). Klasse 1 umfasst die drei Klasse-1A-Isoformen PI3K-p110 $\alpha$ , PI3K-p110 $\beta$ , PI3K-p110 $\delta$  sowie die Klasse-1B-Isoform PI3K-p110 $\gamma$ , die Phosphatidylinositol-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) bilden (Zhao & Vogt, 2008). Klasse-1A-PI3Ks bilden je einen dimeren Komplex aus einer katalytischen p110- und einer regulatorischen p85-Untereinheit, die konstitutiv aneinander binden. Es gibt fünf Isoformen der p85-Untereinheit: p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\gamma$ , p55 $\alpha$ , p50 $\gamma$  (Geering *et al.*, 2007). Sie alle besitzen eine SRC-Homology-(SH2-)Domäne, an die ihre Lipidsubstrate binden können. Nur p110 $\gamma$  bindet nicht an p85, sondern an p101 oder p87 (Katso *et al.*, 2001; Castellano & Downward, 2011). Klasse-2-PI3Ks umfassen die drei Isoformen PI3K-C2 $\alpha$ , PI3K-C2 $\beta$  und PI3K-C2 $\gamma$ , die eine zusätzliche C-terminale C2-Domäne besitzen. Ihnen wird die Produktion von PIP und PIP<sub>2</sub> in Zellen zugeschrieben (Zhao & Vogt, 2008). Sie assoziieren nicht konstitutiv mit ihren regulatorischen Untereinheiten, sondern durch ihre Amino- und Carboxyl-Termini. Klasse 3 besteht allein aus dem PtdINs-spezifischen Enzym „*Vacuolar Protein Sorting*“ 34 (Vps34), dessen Rolle unklar ist (Castellano & Downward, 2011).

#### 1.4.1.2 Pathogene Funktion der PI3Ks

Phosphoinositid-3-Kinasen spielen eine tragende Rolle in Metabolismus, Immunsystem und bei der Herzfunktion (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen und Effektoren gibt es zahlreiche PI3K-assoziierte Erkrankungen. Inaktivierende Mutationen des PI3K-Signalwegs treten bei Myopathien, Neuropathien und Ziliopathien auf, aktivierende Mutationen bei Tumoren (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Insbesondere Klasse-1-PI3Ks bzw.

deren Substrat  $PIP_3$  werden mit der Krebsentstehung in Verbindung gebracht (Zhao & Vogt, 2008, 2010; Vogt *et al.*, 2012). Häufige PI3K-Signalweg-Mutationen in Krebs sind „*loss-of-function*“(Funktionsverlust)-Mutationen in dem Tumorsuppressor *PTEN* und aktivierende Mutationen von *PIK3CA*, das für die katalytische Untereinheit p110 $\alpha$  kodiert (Samuels *et al.*, 2004), aber auch in den Genen von p85- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  wurden Mutationen gefunden (Hezel *et al.*, 2006; Vanhaesebroeck *et al.*, 2012).

In ca. einem Drittel aller Tumorarten treten *PIK3CA*-Mutationen auf (Zhao & Vogt, 2008). Tumorarten mit vergleichsweise hohen *PIK3CA*-Mutationsraten sind beispielweise Brustkarzinome, endometriales Karzinom, Blasenkarzinome und kolorektale Karzinome, bei denen der Anteil an *PIK3CA*-Mutationen 26%, 22%, 21% und 12% beträgt (Castellano & Downward, 2011). Dabei handelt es sich oft um Missense-Punktmutationen (Bader & Vogt, 2005). Bei Ovarial- oder Magentumoren dagegen ist das *PIK3CA*-Gen hauptsächlich amplifiziert und nur zu geringem Anteil mutiert (Bader & Vogt, 2005).

#### 1.4.1.3 *PIK3CA*-Mutationen

Die häufigsten Mutationsstellen von *PIK3CA* (zu 80%) treten in den Kodons E542 und E545 der helikalen Domäne und in H1047R der Kinase-Domäne der Klasse-1-PI3Ks auf (Zhao & Vogt, 2008). Sie führen zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs und damit zu einem Funktionsgewinn („*gain-of-function*“) der enzymatischen Wirkung, der die onkogene Aktivität *in vitro* und *in vivo* bewirkt (Bader & Vogt, 2005). Der Funktionsgewinn geschieht über zwei unabhängige molekulare Mechanismen (Zhao & Vogt, 2008). Mutationen an der helikalen Domäne (E542- und E545-Mutationen) sind abhängig von der Interaktion mit RAS-GTP, aber p85-unabhängig. Dagegen ist die Kinase-Domäne-Mutation (H1047R-Mutation) p85-abhängig und simuliert die RAS-GTP-Bindung (Zhao & Vogt, 2010; Castellano & Downward, 2011).

Die H1047R-Mutation liegt nahe der Aktivierungsregion von p110 $\alpha$  und verändert deren Konformation, wodurch die Affinität von p110 $\alpha$  zum Substrat beeinflusst wird (Bader & Vogt, 2005; Zhao & Vogt, 2008). Auch RAS kann an die Kinasedomäne binden und eine Veränderung bewirken, die ähnlich der H1047R-Mutation ist. Die onkogene Wirkung ist  $PIP_3$ -abhängig, daher verursachen nur die Klasse-1-PI3Ks eine maligne Entartung (Zhao & Vogt, 2008).

#### 1.4.2 Aktivierung und Regulation

P110 $\alpha$  ist konstitutiv an p85 $\alpha$  gebunden und liegt in der Zelle als heterodimerer Komplex vor. In der ruhenden Zelle stabilisiert p85 $\alpha$  p110 $\alpha$  und inaktiviert die PI3K-Aktivität (Zhao & Vogt, 2008). Aktiviert werden können Klasse 1-Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks) über drei

unabhängige Wege. Alle drei beginnen mit der Bindung eines Wachstumsfaktors, diese Stimulation führt zur Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und schafft eine Bindungsstelle für Src-Homology2-(SH2)-Domäne enthaltende Proteine (Castellano & Downward, 2011). Im ersten Fall können die regulatorischen Untereinheiten p85 mit ihrer SH2-Domäne direkt an diese Bindungsstellen der RTK binden, wodurch p110-Aktivierung getriggert wird (Castellano & Downward, 2011). Die zweite Möglichkeit geht indirekt über die Bindung des Adaptorproteins *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* (GRB2) mit seiner SH2-Domäne an die RTK, GRB2 bindet dann an das Gerüstprotein *GRB-associated Binding Protein* (GAB), welches wiederum p85 bindet. Der dritte Weg der Aktivierung geschieht unabhängig von p85, indem GRB2 ebenfalls an die RTK bindet, GRB2 bindet an *Son of Sevenless* (SOS) und dieses aktiviert RAS. In der Folge kann an das aktivierte RAS die enzymatische Untereinheit p110 gebunden werden (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996; Hezel *et al.*, 2006; Castellano & Downward, 2011). P100 $\beta$  kann auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Castellano & Downward, 2011).

#### 1.4.2.1 Signalwirkung von PI3K

Aktivierte Klasse-1-PI3-Kinasen wandern an die Innenseite der Zellmembran, binden mit hoher Substrat-Spezifität an das Membraninositollipid PIP(4,5)<sub>2</sub> und phosphorylieren es an der 3-Hydroxyl(OH)-Gruppe seines Inositolrings. Das dabei entstehende Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) aktiviert die PI3K-Effektoren (Manning & Cantley, 2007; Vanhaesebroeck *et al.*, 2012).

Es finden sich schätzungsweise 50–100 Downstream-Effektoren von PI3K in jeder Zelle des menschlichen Organismus. Die Forschung fokussierte sich bisher allerdings auf einige wenige Zielproteine wie AKT und andere Pleckstrin-Homology-(PH)-Domäne-Effektoren (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012).

#### 1.4.2.2 Phosphatase and tensin homolog (PTEN)

Der Tumorsuppressor PTEN ist eine PIP<sub>3</sub>-Phosphatase und dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> (Vanhaesebroeck *et al.*, 2010). Damit ist er ein Gegenspieler der PI3-Kinasen. Die Inaktivierung von PTEN führt zur konstitutiven Aktivierung des Klasse-1-PI3K-Signalwegs (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die PTEN-Deletion die KRAS-vermittelte PDAC-Entstehung akzeleriert (Ying *et al.*, 2011). PTEN ist einer der am häufigsten inaktivierten Tumorsuppressoren in vielen Tumorarten, auch in PDAC wurde verringerte PTEN-Expression beobachtet (Asano *et al.*, 2004; Hezel *et al.*, 2006). Pten-Knockout-Studien in Mausmodellen konnten zudem die Entstehung spontaner maligner Tumoren reproduzieren (Bader & Vogt, 2005).

### 1.4.2.3 AKT-Signalwirkung

**AKT-Aktivierung.** AKT oder Proteinkinase B, eine Serin-/Threonin-Kinase, ein Proto-Onkogen, das in den 90er Jahren entdeckt wurde, spielt eine große Rolle in der Regulation der Zellfunktion. AKT hat mehr als 100 Substrate, aus diesen ergeben sich seine vielfältigen Funktionen (Bader *et al.*, 2005; Pearce *et al.*, 2010). AKT wird durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) an T308 phosphoryliert, was nur in Anwesenheit von PIP<sub>3</sub> möglich ist (Castellano & Downward, 2011). PIP<sub>3</sub> bringt PDK1 und AKT an die Membran und phosphoryliert die PH-Domäne von AKT. Die resultierende Konformationsänderung ermöglicht PDK1 Zugang zur Phosphorylierungsstelle T308 (Toker, 2000). Um AKT vollständig zu aktivieren, ist die Phosphorylierung an einer zweiten Phosphorylierungsstelle, S473, nötig, die durch den *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) erfolgt (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012).

**P-AKT hemmt Apoptose.** Aktiviertes AKT hat viele Effekte auf Zellfunktionen. Ein Effekt ist die Blockierung der Apoptose: AKT bindet an BAX und verhindert, dass BAX Lücken an der Außenmembran der Mitochondrien verursacht. Diese Lücken führen in Abwesenheit von AKT zu Apoptose (Castellano & Downward, 2011). Außerdem reguliert AKT den Transkriptionsfaktor NFκB negativ, was zur erhöhten Transkription von antiapoptotischen und pro-Überlebens-Genen führt (Castellano & Downward, 2011).

**P-AKT aktiviert Proteinsynthese.** Eine weitere AKT-Wirkung ist die Aktivierung der Proteinsynthese über eine mehrstufige Proteinkaskade: AKT aktiviert TSC2, dadurch wird die Rheb-GTPase-Aktivität des TSC1/TSC2-Dimers gehemmt. Das aktivierte Rheb stimuliert mTOR, das den mTOR-Komplex (mTORC) enthält. Dadurch kommt es zur erhöhten p70S6-Kinase-Aktivität. Der aktivierte mTORC führt durch die Phosphorylierung von 4E und S6 zur erhöhten Proteinsynthese. Außerdem wird durch die Aktivierung des mTORC1-Effektors S6-Kinase als Translationsfaktor aktiviert, der direkt an die 40s-Untereinheit der Ribosomen bindet und das Ablesen der mRNA und Translation bewirkt. S6-Kinase senkt die PI3K-Aktivierung durch negatives Feedback (Castellano & Downward, 2011).

**P-AKT bewirkt Hemmung des Zellzyklus-Arrests durch FOXOs.** Eine andere Funktion von AKT ist die Phosphorylierung der FOXOs. FOXO-Proteine kontrollieren die Geschwindigkeit des Zellzyklus, außerdem Apoptose, DNA-Reparatur und Schutz vor oxidativem Schaden (Bader *et al.*, 2005). Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren sind FOXO1, FOXO3A, FOXO4 und FOXO6. Sie sind im Nukleus lokalisiert und induzieren Transkriptionsprogramme, die zu einem Zellzyklusarrest (G1-Arrest) durch erhöhte Expression von p27kip1 und p21cip1 und die verminderte Expression von CyclinD1 und CyclinD2 führen (Bader 2005). AKT phosphoryliert die FOXOs an drei Stellen. Dadurch werden die FOXOs aus dem Nukleus abtransportiert und im Proteasom abgebaut. Zellen mit

aktiviertem PI3K- bzw. AKT-Signalweg zeigen eine radikale Elimination der FOXOs. In diesen Zellen ist die Fähigkeit der FOXO-Proteine, Proliferation negativ zu regulieren, aufgehoben (Bader *et al.*, 2005).

**AKT und Insulin-Signalweg – GSK-CyclinD1.** Die Glykogen-Synthase-Kinase3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )-Phosphorylierung durch AKT bewirkt die Inhibition der GSK3 $\beta$ -Wirkung (Bader *et al.*, 2005). Hierdurch wird wiederum die Phosphorylierung des zytoplasmatischen Signalmoleküls  $\beta$ -Catenin verhindert. Dadurch wird der  $\beta$ -Catenin-Abbau blockiert und es wird zum Nukleus befördert, wo es mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie TCF/LEF-1 die Expression verschiedener Gene wie Cyclin D1 induziert (Fresno Vara *et al.*, 2004). Cyclin D1 wiederum induziert Zellzyklus-Progression über die Hyperphosphorylierung und Inaktivierung des Retinoblastom-Tumorsuppressors (RB). Auch die Unterdrückung der TP53-Aktivität oder die Erhöhung der Aktivitäten von AP1 oder c-Myc werden von GSK3 $\beta$  negativ reguliert (Bader *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Inhibitoren

Der erste entdeckte PI3K-Inhibitor war Wortmannin, ein aus *Penicillium wortmannii* gewonnenes Mykotoxin. Neben den bekannten immunsuppressiven und antiinflammatorischen Eigenschaften wurde 1993/94 entdeckt, dass er hochpotente zellpermeable PI3K-Inhibitionswirkung besitzt (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Wortmannin bindet über kovalente Modifikationen einer Lysin-Stelle irreversibel an PI3K. Hierdurch wird die katalytische Aktivität blockiert (Liu *et al.*, 2009). Im selben Zeitraum wurde auch der erste synthetische PI3K-Inhibitor, LY294002, generiert (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Beide Inhibitoren sind nicht isoform-spezifisch. Inzwischen existieren einige isoform-spezifische PI3K-Inhibitoren, die ATP-kompetitiv wirken (Maira *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Carnero, 2009; Schmidt-Kittler *et al.*, 2010; Courtney *et al.*, 2010).

p100 $\alpha$ -Mutationen sind potenzielle Angriffsziele für niedermolekulare Inhibitoren, die in mikromolekularen Konzentrationen auf PI3K-Familienmitglieder wirken können (Castellano & Downward, 2011; Karreth, 2012). Aktuell sind zahlreiche PI3K-Inhibitoren auf dem Markt verfügbar wie z.B. NVP-BEZ 235 (seit 2006), ein kombinierter PI3K/mTOR-Inhibitor (Maira *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2008; Marone *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2009). Inhibitoren wie CAL101, PX-866 oder IPI-145 werden bereits in klinischen Phase-II-Studien verwendet. Der aktuell einzige Phase III-Inhibitor ist Perifosin, der bei kolorektalem Krebs und multiplem Myelom eingesetzt wird (Steelman *et al.*, 2011). Auch zahlreiche Inhibitoren für die PI3K-Effektoren wie z.B. AKT wurden generiert und werden aktuell getestet (Feldman *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Rhodes *et al.*, 2008; Engelman *et al.*, 2008; Levy *et al.*, 2009; Carnero, 2009; Carol *et al.*, 2010; Aoyagi *et al.*, 2012).



## 1.5 Mausmodelle für das pankreatische Adenokarzinom

Die Möglichkeiten, an menschlichem Pankreasgewebe zu forschen, beschränken sich auf Untersuchungen an resezierten Tumoren, (endoskopisch entnommenen) Biopsaten und postmortal gewonnenem Gewebe. Aus diesem Grunde hat sich der Einsatz von Mausmodellen, die die humane Erkrankung akkurat rekapitulieren, bewährt (Hruban *et al.*, 2006a,b; Ijichi, 2011; Herreros-Villanueva *et al.*, 2012; Pérez-Mancera *et al.*, 2012). Zu beachten ist, dass humane und murine Zellen durchaus Unterschiede aufweisen und Mäuse auf chemische Substanzen anders als Menschen reagieren können (Rangarajan & Weinberg, 2003; Leach, 2004). Daher müssen die durch das Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse stets am Menschen verifiziert werden.

### 1.5.1 *KRAS*<sup>G12D/+</sup>-Mausmodell

Bereits seit den 1980ern wird intensiv an der Entwicklung von Mauslinien gearbeitet, die das humane PDAC möglichst realitätsgetreu nachbilden.

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas entsteht durch die Akkumulation von Genmutationen (► Kapitel 1.2.2). Eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des PDAC wird *KRAS* zugeschrieben, da dies in nahezu allen PDACs mutiert ist. Daher stützen sich aktuelle PDAC-Mausmodelle auf das endogene *Kras*-Expressionsmodell von Hingorani.

Hingorani und Kollegen entwickelten eine Mauslinie, in der *Kras* im Pankreas konstitutiv aktiviert ist (Hingorani *et al.*, 2003). Hierbei wurde in den endogenen *Kras*-Genlocus eine onkogene G12D-Mutation eingefügt (Jackson *et al.*, 2001). Eine LoxP-Stop-LoxP (LSL)-Sequenz im ersten Intron 5' der *Kras*<sup>G12D</sup>-Mutation verhindert die Transkription und Translation von onkogenem *Kras*. Durch Cre-Rekombinasen kann die LoxP-flankierte Stop-Kassette herausgeschnitten und onkogenes *Kras*<sup>G12D</sup> spezifisch exprimiert werden. Die Expression der Cre-Rekombinasen unter der Kontrolle der Promotoren *pancreatic and duodenal homeobox-1* (Pdx-1) oder *pancreas transcription factor 1 subunit alpha* (Ptf1a) ermöglicht die pankreasspezifische Exzision der Stop-Kassette (Jackson *et al.*, 2001; Hingorani *et al.*, 2003; Seidler *et al.*, 2008).

Pdx-1 und Ptf1a sind Transkriptionsfaktoren, die für die Pankreasentwicklung und -differenzierung essenziell benötigt und ab dem embryonalen Tag 8,5 bzw. 9,5 in Pankreas-Vorläuferzellen exprimiert werden (Hingorani *et al.*, 2003; Ijichi, 2011). In adulten Mäusen wird Pdx-1 in pankreatischen Inselzellen und Duodenalepithel und Ptf1a in den azinären Zellen des Pankreas exprimiert (Ohlsson *et al.*, 1993; Guz *et al.*, 1995; Offield *et al.*, 1996).

Die oben genannte *Kras*<sup>G12D/+</sup>-Mutation entsteht durch den Austausch von Glycin mit Aspartat in Kodon 12. Diese sog. G- zu D-Transition vermindert die intrinsische GTPase-Aktivität. *Kras*<sup>G12D</sup> bleibt somit in seiner aktivierten Form (*Kras*-GTP) bestehen, was zur konstitutiven

Aktivierung der Kras-Effektor-Signalwege führt (Jackson *et al.*, 2001; Hingorani *et al.*, 2003).

Dies führte im Hingorani-Mausmodell innerhalb weniger Monate zu pankreatischen intraepithelialen Läsionen (PanINs) der Grade 1–3, die den humanen PanINs ähnelten. Weiterhin entwickelten zwei Mäuse ein metastasierendes PDAC (Hingorani *et al.*, 2003).

Inzwischen wurden basierend auf diesem Modell weitere PDAC-Mausmodelle konstruiert, die die humane Karzinogenese des PDAC imitieren. Dafür wurden in oben beschriebenem *Kras*<sup>G12D/+</sup>-Mausmodell zusätzlich verschiedene Tumorsuppressoren inaktiviert, die im humanen PDAC bekanntermaßen deletiert bzw. mutiert sind (Aguirre *et al.*, 2003; Hingorani *et al.*, 2005). So akzeleriert die Inaktivierung von p16<sup>INK4A</sup>, TP53, DPC4 oder BRCA2 die PDAC-Progression in erheblichem Maße (Hingorani *et al.*, 2003; Ijichi, 2011). Die Kombination von *Kras*<sup>G12D/+</sup> und p16<sup>INK4A</sup>/p14<sup>ARF</sup>-Deletion reduzierte in einem Mausmodell beispielsweise die mediane Überlebenszeit auf 8 Wochen (Aguirre *et al.*, 2003).

### 1.5.2 PI3K-Mausmodelle

In den vergangenen Jahren wurden diverse Mausmodelle entwickelt, mit deren Hilfe der PI3K-Signalweg aktiviert werden kann. Adams und Kollegen kreierten beispielsweise eine *Pik3ca*<sup>H1047R</sup>-Knockin-Mauslinie, die im Brustepithel mutiertes p110 $\alpha$  exprimiert (Adams *et al.*, 2011). Weibliche Mäuse entwickelten ab dem Alter von 5 Monaten Mammatumoren. Eine Kombination mit *Trp53*-Deletion ergab interessanterweise neben einer akzelerierten Entwicklung von Brusttumoren zusätzlich ein anderes Spektrum an Brustkrebsarten als die alleinige *Pik3ca*-Mutante (Adams *et al.*, 2011). Der genaue Mechanismus, der über *Pik3ca*-Mutation zur Entwicklung von Mammatumoren führt, ist allerdings noch nicht ergründet.

Leystra und Kollegen entwickelten eine Mauslinie, die dominant aktives p110 $\alpha$  in Epithelzellen des distalen Dünndarms und im proximalen Kolon exprimierten (Leystra *et al.*, 2012). Dies gelang durch die Expression eines chimären Proteins mit seiner iSH2-Domäne der p85-regulatorischen-Untereinheit an den N-Terminus der p110-katalytischen-Untereinheit. Diese Mäuse waren innerhalb von 40–60 Tagen moribund und die meisten dieser Mäuse entwickelten Obstruktionen des distalen Kolon mit invasivem muzinösem Adenokarzinom im proximalen Kolon, zum Teil auch zäkale Tumoren. Histologisch ähnelten sie invasiven muzinösen Kolonkarzinomen des Menschen (Leystra *et al.*, 2012).

### 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Bereits hinreichend gezeigt wurde eine Schlüsselrolle von KRAS bei der Entstehung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (Bardeesy & DePinho, 2002; Hingorani *et al.*, 2003; Hezel *et al.*, 2006; Hidalgo, 2010; Morris *et al.*, 2010; Caldwell *et al.*, 2012). Jedoch existiert auch trotz intensivster Forschungsanstrengungen aktuell immer noch kein KRAS-Inhibitor, der

klinisch einsetzbar ist (Zimmermann *et al.*, 2013). Auch bekannt ist, dass KRAS über diverse Effektor-Signalwege wie PI3K, MAPK und Ral-GEFs agiert. Unklar ist aber, wie der genaue Mechanismus in PDAC funktioniert, d.h. welche Signalkaskaden bzw. Effektoren im Einzelnen verantwortlich sind für die Karzinogenese – im Gegensatz beispielsweise zur Entstehung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) in der Lunge (Blasco *et al.*, 2011; Karreth, 2012).

Daher wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saur von Marlena Messer (Klinikum rechts der Isar der TU München) eine onkogene *Pik3ca*<sup>H1047R/+</sup>-Mauslinie generiert, die mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems eine konstitutive Aktivierung des PI3K-Signalwegs im Pankreas ermöglicht (Seidler *et al.*, 2008; Eser *et al.*, 2013).

Die vorliegende Arbeit hat es sich zum Ziel gesetzt, die Auswirkungen dieser konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs im Pankreas zu untersuchen und mit dem *Kras*<sup>G12D/+</sup>-PDAC-Mausmodell zu vergleichen. Von Interesse war insbesondere die Rolle von PI3K bei der Karzinogenese und Metastasierung des PDAC, aber auch die Untersuchung zellulärer Mechanismen wie Proliferation und Seneszenz, die in Tumoren dysreguliert sind. Des Weiteren sollte analysiert werden, welche PI3K-Effektoren essenziell für die PDAC-Entstehung sind, da deren Inhibitoren somit potenzielle PDAC-Therapeutika darstellen.

## 2 Material

### 2.1 Technische Ausstattung und Geräte

Tabelle 2-1: Technische Ausstattung und Geräte.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Analysenwaage A 120 S	Sartorius AG, Göttingen
Analysenwaage BP 610	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav 2540	Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL
AxioCam Hrc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Brutschrank Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcCell®	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-5AC 17AI	Panasonic Healthcare Co., Hamburg
Cryostat Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Dewar Transport-Gefäße, Typ B	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Einbettssystem EG1150H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Eisflockenbereiter AF 20	Scotsman Ice Systems, Mailand, IT
Elektrophorese Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Folienschweißgerät Folio FS 3602	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
Gefrierschrank Kendro, -86°C	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Geldokumentationssystem Doc <sup>TM</sup> XR+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Glaswaren, Schott Duran®	Schott AG, Mainz
Homogenisator Silent Crusher M mit Zubehör 6F	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Beheizte Paraffinausgießstation Leica EG1150 H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Horizontalschüttler	Titertek Instruments, Inc., Huntsville, AL, USA
Kryobehälter ARPEGE 170	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Kryobehälter Typ Apollo	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Magnetrührer Ikamag® RCT	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroplattenphotometer Anthos 2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Mikroskop Axio Imager.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop DM LB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom Microm HM 355 S	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Mikrowelle	Siemens, München

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Minizentrifuge Galaxy Mini	Merck KGaA, Darmstadt
Minizentrifuge MCF-2360	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal
Multipette® Stream	Eppendorf AG, Hamburg
Odyssey® Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA
Operationsbesteck	MSG Medizinische Geräte GmbH, Wuppertal
pH-Meter 521	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Paraffin-Streckbad Microm SB80	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Pipetten Reference®, Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Power Supplies E844, E822, EV243	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stereomikroskop Stemi SV11	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Thermocycler T1	Biometra GmbH, Göttingen
Thermostat Plus	Eppendorf AG, Hamburg
UNO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Vakuumpumpe Zellkultur	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortexer Heidolph REAX 2000	Labfish, Inh. Martin Forster e.K., Aumühle
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wasserbad Microm SB80	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Western-Blot-System SE 260 Mighty Small II	Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA
Wippschüttler WT 17	Biometra GmbH, Göttingen
Zählkammer Neubauer (verbessert)	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Avanti® J25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Rotina 46R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien.**

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Argentrix® Einmal-Höllenstein-Ätztift	Ryma-Pharm GmbH, Körle
Chromatographie-Papier 3 mm	GE Healthcare Europe GmbH, München
Combitips BioPur®	Eppendorf AG, Hamburg
Cryo Pure Röhren, 1,6 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläser	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Einbettkassetten	Bio Optica Milano S.p.A., Mailand, IT
Einmalkanülen Sterican® 26G, 27G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Omnifix®-F, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Konische Röhren, 13 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konische Röhren, 15 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Mikrotiterplatte 96-Well µclear®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikrotom-Klingen S35 und C35	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Objektträger	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Objektträger SuperFrost®	Gerhard appliCo. KG, Braunschweig
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PCR-Reaktionsgefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim; Eppendorf AG, Hamburg
Petrischalen	BD Biosciences, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen Safe Seal Tips® Professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße Multi SafeSeal™ Tubes®	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Transfermembran Immobilon-P	Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus
Zellkultur-Flaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

## 2.3 Reagenzien und Enzyme

**Tabelle 2-3: Reagenzien und Enzyme.**

Reagenz	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
5-Bromo-2'-deoxyuridine BioChemica (BrdU)	AppliChem GmbH & Co, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aluminiumsulfat, Pulver	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua destillata	Braun Melsungen AG, Melsungen
Bovine Serum Albumin – Fraction V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bradford-Reagenz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DNA-Marker Gene Ruler™ 100 bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Pulver)	Biochrom AG, Berlin
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol (100%)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom AG, Berlin
Forene® Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Odyssey Blocking Buffer®	Mandel Scientific Company Inc., Ontario, Canada
Phosphatase Inhibitor Mix I	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Protease-Inhibitor, Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Proteinase K, recombinant, PCR grade	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
REDTaq® Ready Mix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande

Reagenz	Bezugsquelle
TRIS Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS-Hydrochlorid	J.T.Baker® Chemicals, Phillipsburg, NJ, USA
Triton® X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 2-4: Antikörper für Immunhistologie.**

Antikörper (Immunhistologie)	Bezugsquelle
<b>Primärantikörper</b>	
Phospho-GSK3β (Ser9), #9323	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP®, #4370	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-AKT (Thr308) (C31E5E), #2965	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XPTM, #4060	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9), #9154	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
p53 (CM5), Novocastra™	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
p16 (F-12), sc-1661	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
p21 (C-19), sc-397	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
BrdU, MCA 2060	Abd Serotec, Düsseldorf
<b>Sekundärantikörper</b>	
Biotinylated anti-goat IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Biotinylated anti-mouse IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

**Tabelle 2-5: Antikörper für Western Blot.**

Antikörper (Western Blot)	Bezugsquelle
<b>Primärantikörper</b>	
AKT (C67E7), #4691	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
MEK1/2 (L38C12), #4694	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
β-Aktin, #A5316	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
p44/42 MAPK (Erk1/2) (L34F12), #4696	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP®, #4060	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA



Antikörper (Western Blot)	Bezugsquelle
Phospho-AKT (Thr308) (C31E5E), #2965	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
GSK3β (pan), #9315	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-GSK3β (Ser9), #9323	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9), #9154	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP®, #4370	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Sekundärintikörper	
AlexaFluor® 680 goat anti-mouse IgG, A21058	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
AlexaFluor® 750 goat anti-mouse IgG, A21037	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-rabbit IgG (H+L) (DyLightR 680 Conjugate), #5366	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti-rabbit IgG (H+L) (DyLightR 800 Conjugate), #5151	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA

## 2.5 Puffer und Lösungen für Molekularbiologie

Alle Puffer wurden mit zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O vorbereitet.

**Tabelle 2-6: Puffer und Lösungen für Molekularbiologie.**

Puffer	Zusammensetzung
10x Gitschier's Puffer	670 mM Tris, pH 8,8 166 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 67 mM MgCl <sub>2</sub>
50% TAE-Puffer, pH 8,5	2 M Tris 100 mM EDTA 5,71% (v/v) Essigsäure (100%)
5x Laemmli-puffer pH 6,8 (Western Blot)	10% SDS 50% Glycerol 228 mM Trishydrochlorid 0,75 mM Bromphenolblau 5% 2-Mercaptoethanol
IP-Puffer, pH 7,9	50 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% Nonidet P40 10% Glycerol Phosphatase-Inhibitor (Zugabe direkt vor Gebrauch) Protease-Inhibitor (Zugabe direkt vor Gebrauch)
Laufpuffer	25 mM Tris

Puffer	Zusammensetzung
PCR-Lysepuffer (Soriano)	192 mM Glycin 0,1% SDS 0,5% Triton® X-100 1% 2-Mercaptoethanol 1x Gitschier's Puffer 400 µg/ml Proteinase K (Zugabe direkt vor Gebrauch)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
Transferpuffer (Wet-Blot)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, mit HCl auf pH 8,8 eingestellt

## 2.6 PCR-Primer und Sequenzen

Tabelle 2-7: PCR-Primer und Sequenzen.

PCR-Name	Primer	Sequenz (5' 3')
Ptf1a <sup>Cre</sup>	Ptf1a-Cre-GT-LP-URP Ptf1a-Cre-GT-wt-UP Ptf1a-Cre-GT-mut-UP-neu	CCTCGAAGGCGTCGTTGATGGACTGCA CCACGGATCACTCACAAAGCGT GCCACCAGCCAGCTATCAA
LSL-Kras <sup>G12D</sup>	Kras-WT-UP1 Kras-URP-LP1 KrasG12D-mut-UP	CACCAGCTTCGGCTTCCTATT AGCTAATGGCTCTCAAAGGAATGTA CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC
LSL-Rosa26 <sup>Tva-LacZ</sup>	R26-Tva-GT-UP R26-Tva-GT-SA-mut-LP R26-Tva-GT-WT-LP	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT GCGAAGAGTTTGTCTCAACC GGAGCGGGAGAAATGGATATG
R26-Pik3ca <sup>H1047R</sup>	PI3K-genotype-RevPr	TGAATAGTTAATTGGAGCGGCCGCAATA
R26-Pik3ca <sup>H1047R</sup> deletiertes Stop	PI3K-genotype-RevPr R26-Tva-GT-UP	AAATAGCCGCAGGTCACAAAGTCTCCG AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
LSL-Trp53 <sup>R172H</sup>	Trp53R172H-WT-UP2 Trp53R172H-URP-LP Trp53R172H-mut-UP4	AGCCTTAGACATAACACACGAACT CTTGGAGACATAGCCACACTG GCCACCATGGCTTGAGTAA

## 2.7 Zellkultur

**Tabelle 2-8: Reagenzien für Zellkultur.**

Reagenz	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) mit L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
GSK-690693, #S1113	Selleckchem, Houston, Texas, USA
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
NVP-BEZ 235, N-4288	LC Laboratories, MA, USA
PD 325901, P-9688	LC Laboratories, MA, USA
Penicillin(10.000 U/ml)-Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin 0,05%	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

**Tabelle 2-9: Medien für Zellkultur.**

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Tumorzell-Medium	D-MEM 10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin
Freezing-Medium	70% D-MEM 20% FCS 10% DMSO

## 2.8 Histologische Reagenzien und Puffer

**Tabelle 2-10: Reagenzien und Kits für histologische Analysen.**

Histologisches Reagenz	Bezugsquelle
Alzianblau 8GX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Certistain® Kernechtrot (Pulver)	Merck KGaA, Darmstadt
Antigen- <i>Unmasking</i> -Lösung, auf Zitronensäure-Basis	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
DAB Peroxidase Substrat-Kit, 3,3'-Diaminobenzidin	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt

Histologisches Reagenz	Bezugsquelle
Eosin	Waldeck GmbH, Münster
Goat Serum G9023	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
Pertex®	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Rabbit serum R9133	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Roti® Histofix 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti® Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Seneszenz $\beta$ -Galaktosidase Färbekit #9860	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Sucrose (Saccarose)	Merck KGaA, Darmstadt
Vectastain® Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt
X-Gal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 2-11: Puffer und Lösungen für histologische Analysen.

Puffer/Lösung	Bestandteile
LacZ-Waschpuffer	2 mM MgCl <sub>2</sub> 0,01% (w/v) Natrium deoxycholate (C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub> ) 0,02% (w/v) Nonidet P-40 PBS
LacZ-Färbepuffer	5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(II) [K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ] 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III) [K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ] 0,1% X-Gal LacZ-Waschpuffer
Alzianblau-Lösung, pH 2,5	1% Alzianblau 3% Ethansäure
Kernechtrot-Lösung 0,1%	0,1% Kernechtrot 2,5% Aluminiumsulfat

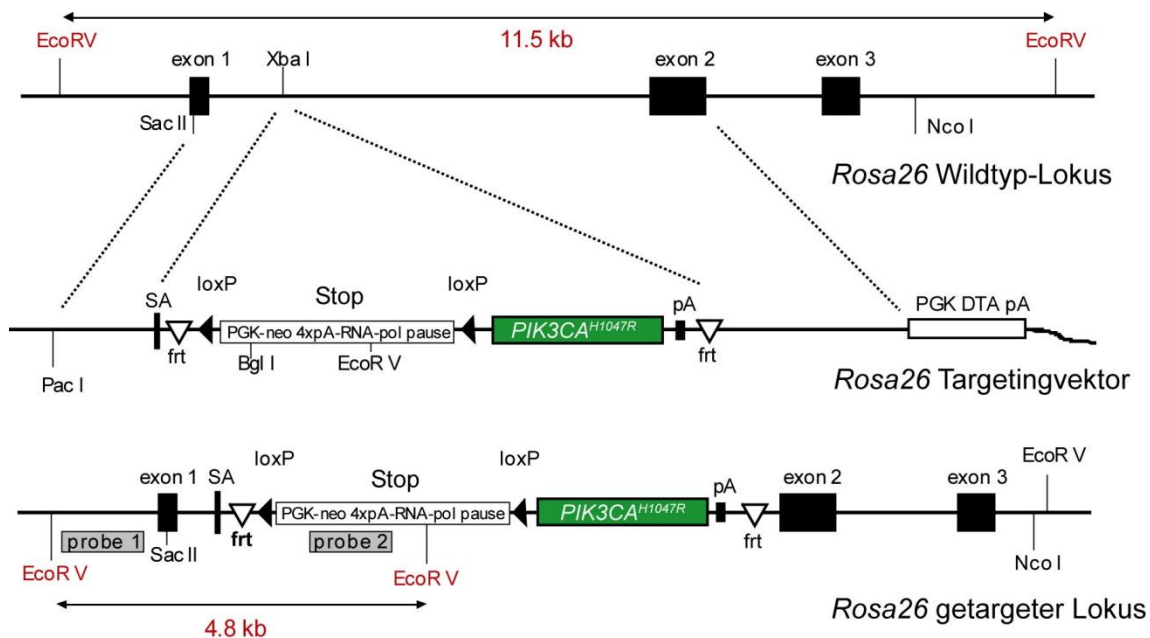
### 3 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Versuchsprotokolle nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 3.1 Tierexperimente

##### 3.1.1 Verwendete Mauslinien

Für die vorliegende Studie wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saur von Marlena Messer ein onkogenes *PIK3CA*<sup>H1047R</sup>-Knockin-Allel (welches für PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R</sup> kodiert) generiert, das in murine embryonale Stammzellen in den *Rosa26*-Lokus eingebracht wurde (Eser *et al.*, 2013). Eine LoxP-flankierte transkriptionelle Stop-Kassette (LoxP-Stop-LoxP; LSL) verhindert in dieser Mauslinie die ubiquitäre Expression von onkogenem *Pik3ca*<sup>H1047R</sup>. Diese Mäuse wurden mit Tieren gekreuzt, welche Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des pankreasspezifischen *Ptf1a*-Promotor exprimieren. Auf diese Weise wurden *Ptf1a*<sup>Cre/+</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R/+</sup>-Mäuse generiert, die onkogenes PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R/+</sup> spezifisch im Pankreas exprimieren (►Abbildung 3-1; ►Kapitel 1.5.1; Nakhai *et al.*, 2007; Seidler *et al.*, 2008).



**Abbildung 3-1: Gezieltes Einbringen einer LoxP-Stop-LoxP-stillgelegten *PIK3CA*<sup>H1047R</sup>-Kassette in den murinen *Rosa26*-Lokus.**

Generierung einer konditionalen *Rosa26*-PI3K-Knockin-Mauslinie mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen. Oben: *Rosa26*-Wildtyp-Lokus. Mitte: *Rosa26*-Targetingvektor mit der LoxP-Stop-LoxP (LSL)-stillgelegten p110<sup>H1047R</sup> (*PIK3CA*<sup>H1047R</sup>)-Expressionskassette. Unten: Getargeteter *Rosa26*-Lokus. Restriktionsstellen, Größe der DNA-Fragmente und die Lokalisierung der 5' („probe 1“) und neo („probe 2“) sind angegeben. Targetingvektor und Mauslinie wurden von Marlena Messer (AG Saur) generiert. (Eser *et al.*, Cancer Cell 2013 18;23:406-20).

Als Vergleichsmodell wurde das bereits etablierte *Ptf1a<sup>Cre</sup>;LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>*-PDAC-Mausmodell verwendet, in der onkogenes *Kras<sup>G12D/+</sup>* ebenfalls pankreasspezifisch exprimiert wird (Hingorani *et al.*, 2003; ► Kapitel 1.5.1).

Die Versuche an Tieren wurden unter Einhaltung der tierschutzrechtlichen Vorgaben durchgeführt und von den zuständigen Behörden genehmigt. Aufgezogen wurden die Versuchsmäuse der Mauslinien *Ptf1a<sup>Cre/+</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>* und *Ptf1a<sup>Cre</sup>;LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>* im Mauszuchtraum des Klinikums rechts der Isar in IVC-Käfigen unter standardisierten Bedingungen.

### 3.1.2 Sektion

Vor der Tötung mittels Genickbruch wurden alle Mäuse mittels Metamizol-Midazolam-Fentanyl(MMF)-Injektionsnarkose betäubt. Das Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes gesichert. Die Mäuse wurden in Rückenlage fixiert und die äußere Haut mit 70%igem Ethanol entfettet und desinfiziert. Nach Eröffnung der Bauchdecke an der Linea alba wurde das Peritoneum unter möglichst sterilen Konditionen eröffnet.

Mäuse, die zu bestimmten Zeitpunkten (im Alter von 1, 3, 6 und 9 Monaten) unabhängig von Zeichen einer Erkrankung getötet wurden, um standardisierte Versuchsbedingungen zu schaffen, werden im Folgenden „Zeitpunktsmäuse“ genannt. Mäuse, die so lange aufgezogen wurden, bis sie definierte Abbruchkriterien wie Kachexie oder Aszites des Abdomens zeigten, werden im Folgenden „Tumormäuse“ genannt. Ersteren wurde 4 Stunden vor Tötung 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) in einer Konzentration von 5mg/kg verabreicht, letzteren 2 Stunden zuvor.

Tumormäuse wurden auf Vorhandensein von Primärtumor oder Metastasen, besonders in Lymphknoten, Lunge und Leber, gescreent. Primärtumoren und Metastasen wurden ausgemessen und Proben entnommen für die Analyse von DNA, Proteinen, Paraffin- und Kryohistologie, außerdem Zellen für Zellkultur gewonnen.

Zur Regentypisierung wurde sowohl bei Tumor- als auch bei Zeitpunktsmäusen Pankreastumorgewebe in ca. 1 mm<sup>3</sup> Größe entnommen und in Stickstoff schockgefroren. Für die Proteinisolierung wurde etwa die doppelte Menge Gewebe in 600 µl gekühltem, mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren angereichertem IP-Puffer, geschreddert und ebenfalls schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

Um verschiedene Parameter wie z.B. die Entwicklung von pankreatischen Läsionen zu untersuchen und für weiterführende (immun-)histologische Analysen, wurde das übrige Pankreasgewebe für Paraffin- und Kryoschnitte fixiert.

## **3.2 Histologie**

### **3.2.1 Fixierung der Organe**

#### **3.2.1.1 Paraffinfixierung**

Die bei der Sektion entnommenen Organe wurden 16 h in 4%igem Roti®-Histofix fixiert und anschließend im Gewebeeinfiltrationsautomaten ASP300 S entwässert. Nach dem Einbetten in Paraffin wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Es wurden serielle Paraffinschnitte in 3 µm Dicke am Mikrotom Microm HM355s angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und konnten nach 24-stündiger Trocknung für weitere histologische Untersuchungen verwendet werden.

#### **3.2.1.2 Kryofixierung**

Vor Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die Gewebeproben 2 h in 4%igem Roti®-Histofix inkubiert, dann 4 h in 15%iger Sucrose und über Nacht in 30%iger Sucrose entwässert. Im Anschluss wurden die Gewebeproben in Tissue-Tek® O.C.T™ eingebettet und bei -80°C tiefgefroren. Gefrierschnitte in 6 µm Dicke wurden am Cryostat Microm HM 560 angefertigt und diese bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

### **3.2.2 Histologische Färbungen**

#### **3.2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Gewebsschnitte wurden je zweimal 5 Minuten in Roti® Histol entparaffinisiert und dann je 2 x 2 min in absteigender Alkoholreihe rehydriert (99,6%, 96%, 80% Ethanol). Dann wurden sie 5 sec in Hämatoxylin und 20 sec in Eosin gefärbt. Dehydratation erfolgte durch je 2 x 30 sec Inkubation in aufsteigender Alkoholreihe (80%, 96%, 99,6% Ethanol) und anschließend 2 x 5 min in HistoClear. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden sie mit Pertex-Eindeckmedium eingedeckelt.

#### **3.2.2.2 Alzianblau-Färbung**

Die Schnitte wurden wie in ► Kapitel 3.2.2.1 angegeben entparaffinisiert und rehydriert, dann 5 min in Alzianblau-Lösung angefärbt, in destilliertem Wasser gewaschen und 5 min in Kernechtrot-Lösung gegengefärbt. Dehydratation und Eindeckeln erfolgten ebenfalls wie oben angegeben ► Kapitel 3.2.2.1.

### 3.2.2.3 Immunhistologische Färbungen

Die Paraffinschnitte wurden wie bereits beschrieben entparaffinisiert und rehydriert (► Kapitel 3.2.2.1). Die Antigene wurden freigelegt durch 10-minütiges Aufkochen bei 720 W in der Mikrowelle in zitratbasierter Antigen-*Unmasking*-Lösung. Dann wurden die Schnitte 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt, gewaschen und die endogene Peroxidase durch Inkubation in 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (10 min bei RT) geblockt. Unspezifische Bindungen wurden durch 1-stündige Inkubation mit 5%igem entsprechendem Serum geblockt (► Tabelle 3-1). Über Nacht wurden die Schnitte mit dem Erstantikörper bei 2–8°C inkubiert. Die Konzentrationen der Erstantikörper lagen zwischen 1:50 und 1:500 je nach Antikörper (► Tabelle 3-1). In der Regel wurde auch das *Avidin/Biotin-Blocking Kit* verwendet. Nach Abwaschen des Erstantikörpers wurde der Sekundärantikörper 1:500 verdünnt auf die Schnitte gegeben und unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Abwaschen des Sekundärantikörpers wurde Vectastain® Elite ABC-Lösung für 30 min auf die Schnitte gegeben. Die Detektion erfolgte schließlich durch 3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid(DAB)-Lösung unter Sichtkontrolle im Lichtmikroskop. Abschließend wurden die Schnitte 1 sec mit Hämatoxylin gegengefärbt, dehydriert, mit HistoClear inkubiert und eingedeckelt, wie in ► Kapitel 3.2.2.1 angegeben.

**Tabelle 3-1: Immunhistologie-Antikörper und Konzentrationen.**

Immunhistologie	Blocking-Serum	1. AK	2. AK	1.AK-Konz
BrdU	goat	MCA 2060	goat anti-rat	1:250
p-GSK3β-S9	goat	#9323	goat anti-rabbit	1:100
p-AKT-T308	goat	#2965	goat anti-rabbit	1:50
p-AKT-S473	goat	#4060	goat anti-rabbit	1:50
p-MEK	goat	#9154	goat anti-rabbit	1:100
p-ERK	goat	#4370	goat anti-rabbit	1:400
p16	goat	sc-1661	goat anti-mouse	1:100
p21	rabbit	sc-397-G	rabbit anti-goat	1:100
p53	goat	CM5	goat anti-rabbit	1:100

### 3.2.3 Dokumentation

Die gefärbten Schnitte wurden am Axio Imager.A1-Mikroskop mit der AxioCam HRc-Kamera dokumentiert. Die verwendete Software war AxioVision 4.8.



### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Kultivierung pankreatischer Tumorzellen und Kryopräservation

Für die Kultivierung der Tumorzellen wurde in der Sektion unter möglichst sterilen Bedingungen eine etwa reiskorngroße Menge des Pankreastumors entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in sterilem PBS aufbewahrt. Die Gewebeprobe wurde unter der Sicherheitswerkbank mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und zur Lösung der Zellverbände 24–48 h bei 37°C in Kollagenase-Lösung (7,8 mg in 10 ml Zellkulturmedium) gelöst. Nach dem Verdau wurde die Lösung 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert für die weitere Kultivierung.

Die so gewonnenen Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und regelmäßig mit frischem Tumorzellmedium versorgt. Zum Splitten der Zellen wurden sie mit PBS gewaschen, bei 37°C in Trypsin gelöst, in frischem Tumorzellmedium aufgenommen und in ein neues Behältnis mit ebenfalls frischem Medium gegeben. Gewöhnlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet.

Zum langfristigen Aufbewahren der Tumorzellen wurden die in Trypsin gelösten Zellen 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit eiskalt vorgekühltem *Freezing*-Medium resuspendiert, in *CryoPure*-Röhrchen abgefüllt, für 24 h bei -80°C tiefgefroren und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert.

#### 3.3.2 Inhibitionsversuche

Die Inhibitionsversuche wurden an PDAC-Zellen durchgeführt. Zum Auszählen dieser Tumorzellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet, je Zelllinie und verwendetem Inhibitor wurden 1 Mio. Zellen verwendet.

Mit den Inhibitoren wurde zunächst eine Stammlösung in DMSO erstellt und diese im Tumorzellmedium auf die benötigte Konzentration herunterverdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit von 1–48 h wurden die Ganzzellextrakte gewonnen (► Kapitel 3.4.2.1).

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Genotypisierung und Regentypisierung

Die Bestimmung des Genotyps erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dazu wurde den Mäusen im Alter von 3 Wochen nach vorhergehender Betäubung ein Stück der Schwanzspitze entfernt (ca. 1 mm) und die Wunde anschließend mit einem Silbernitrat-Applikator desinfiziert.

### 3.4.1.1 DNA-Extraktion und Amplifizierung

Die Gewebeproben oder Zellpellets wurden nach Zugabe von PCR-Lyse-Puffer (Soriano) im Thermocycler für 90 min bei 55°C lysiert und die Proteinase K anschließend 15 min bei 95°C inaktiviert. Nach kurzem Vortexen (ca. 10 sec) wurde das Lysat 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit der lysierten DNA wurde in PCR-Reaktionsgefäß umpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Für die PCR wurde der REDTaq® Ready Mix™ verwendet unter Zugabe von 1,5 µl DNA. Die verwendeten Primer sind in ► Tabelle 2-7, die Temperaturen in ► Tabelle 3-2 dargestellt. Alle PCRs liefen jeweils 40 Zyklen.

**Tabelle 3-2: Polymerase-Kettenreaktion.**

PCR-Name	Denaturierung	Annealing	Elongation	Bande
Ptf1a <sup>Cre</sup>	95°C 45 sec	60°C 60 sec	72°C 90 sec	400 bp (mut) 600 bp (WT)
LSL-Kras <sup>G12D</sup>	95°C 45 sec	55°C 60 sec	72°C 90 sec	170 bp (mut) 270 bp (WT)
LSL-Rosa26 <sup>Tva-LacZ</sup>	95°C 45 sec	62°C 60 sec	72°C 90 sec	310 bp (mut) 600 bp (WT)
Rosa26-Pik3ca <sup>H1047R</sup>	95°C 45 sec	64°C 45 sec	72°C 90 sec	630 bp (mut)
Rosa26-Pik3ca <sup>H1047R</sup> , deletierte Stop-Kassette	95°C 45 sec	55°C 60 sec	72°C 90 sec	900 (mut)
LSL-Trp53 <sup>R172H</sup>	95°C 30 sec	60°C 30 sec	72°C 1 min	270 bp (mut) 570 bp (WT)

### 3.4.1.2 Gelelektrophorese

Nach der Amplifizierung des genetischen Materials erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts unter Verwendung von 1–2%igem Agarose-Gel, je nach Größe der zu erwartenden Banden. Sowohl für die Herstellung der Gele (► Tabelle 3-3) als auch für den Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet. Je Gel wurden 24 µl Ethidiumbromid zugegeben, in die Geltaschen wurden jeweils 20 µl des PCR-Produkts geladen. Die Auftrennung der Banden erfolgte am Power Supply bei einer Spannung von 110 V für ca. 90 min. Als Marker zur Bestimmung der Bandenhöhe wurde *Gene Ruler* verwendet. Die Bandengrößen konnten per UV-Transillumination analysiert und anhand des GelDocXR-System abgelesen werden.

### 3.4.1.3 Regentypisierung

Bei jeder Maus erfolgte nach der Sektion eine Regentypisierung, um die Ergebnisse der Genotypisierung zu verifizieren. Die dafür benötigte Gewebeprobe wurde postmortal aus dem Schwanz gewonnen (► Kapitel 3.1.2).

### 3.4.2 Western Blot

#### 3.4.2.1 Proteinisolation

Die Tumorzellen wurden in Petrischalen von 10 cm Durchmesser ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70–80% wurden das Tumorzellmedium abgesaugt und die Zellen nach Waschen mit PBS mit 200 µl vorgekühltem Protease- und Phosphataseinhibitoren-enthaltenden IP-Puffer versetzt. Die dadurch lysierten Proteine wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorf-Behältnis pipettiert, 20 min bei 4°C bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei –80°C aufbewahrt.

#### 3.4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen der zu blottenden Proteine wurden mittels Bradford-Assay bestimmt (Bradford 1976). Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden je Well 300 µl dieser Lösung vorgelegt und je 1 µl der zu bestimmenden Proben zugegeben. Diese wurden jeweils in Triplets gemessen. Die Standardkurve wurde durch aufsteigende definierte BSA-Konzentrationen festgelegt. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Proben bei 600 nm im Photometer gemessen.

Die Konzentrationen der einzelnen Proben wurden nun anhand der Standardkurve berechnet und mittels IP-Puffer und Protein-Ladepuffer angeglichen (Laemmli, 1970). Zur Denaturierung wurden die Proteine 5 min in 5x Laemmli-Puffer bei 95°C aufgeköcht und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

#### 3.4.2.3 Gelelektrophorese und Blotten

Die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Molekülgröße fand mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) statt (Laemmli, 1970). Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden Gele der Konzentration 7,5%, 10% oder 12% (► Tabelle 3-3) gegossen.

**Tabelle 3-3: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.**

Mengenangaben beziehen sich auf Gele der Größe 5,5cm x 8,5cm x 0,15 cm.

Reagenz	Sammelgel	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Trenngel 12%
ddH <sub>2</sub> O	3000 µl	4900 µl	4100 µl	3400 µl
Sammelgelpuffer	1300 µl	—	—	—
Trenngelpuffer	—	2600 µl	2600 µl	2600 µl
Acrylamid 30%	750 µl	2500 µl	3300 µl	4000 µl
SDS 10%	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS 10%	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Zuerst wurden jeweils für Trenn- bzw. Sammelgel alle Reagenzien außer TEMED in ein Falcon gegeben. Nach Zugabe von TEMED wurde zunächst das Trenngel in eine Gel-Gießvorrichtung einpipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde TEMED zur Sammelgel-Mischung gegeben, in die Gießvorrichtung pipettiert und der Probenkamm zur Bildung der Taschen eingesteckt.

Nach der Polymerisation wurden die Proteinextrakte auf das Gel geladen, mit Laufpuffer überschichtet und die Moleküle mittels Power Supply bei einer Spannung von ca. 100–140 V unter stetiger Kühlung nach Molekulargewicht aufgetrennt.

Die Proteine wurden anschließend auf eine Transfermembran geblottet, die zuvor in Methanol aktiviert wurde. Das Blotten erfolgte in der Wet Blot-Vorrichtung in Transferpuffer und unter stetiger Kühlung und dauerte 2 h bei 100 V (Towbin *et al.*, 1979).

#### 3.4.2.4 Proteinnachweis

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst 30 min in 1:1-verdünntem Odyssey-Blotting-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Dann wurde der jeweilige Erstantikörper in der vom Hersteller angegebenen Konzentration (in Odyssey-Blotting-Puffer, ► Tabelle 3-4), auf die Membran gegeben und über Nacht auf dem Wippschüttler bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen (à 10 min) mit PBS-Tween (0,1%) wurde der fluoreszierende Sekundärintikörper 1 h bei Raumtemperatur (RT) und unter Lichtausschluss inkubiert. Nach weiterem dreimaligen (lichtgeschützten) Waschen konnten die Antikörper im *Odyssey infrared imaging system* bei 700 oder 800 nm (je nach Sekundärintikörper) detektiert werden. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

**Tabelle 3-4: Western-Blot-Antikörper.**

WB	Erstantikörper	Zweitantikörper	Konzentration Erstantikörper	Bandenhöhe
ERK	#4696	mouse	1:2000	44/42
p-ERK	#4370	rabbit	1:2000	44/42
MEK	#4694	mouse	1:1000	45
p-MEK	#9154	rabbit	1:1000	45
pan AKT	#4691	rabbit	1:1000	60
pAKT-T308	#2965	rabbit	1:1000	60
pAKT-Ser473	#4060	rabbit	1:2000	60
GSK3 $\beta$	#9315	rabbit	1:1000	46
p-GSK3 $\beta$	#9336	rabbit	1:1000	46
$\beta$ -Aktin	#A5316	mouse	1:2000	42

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wird die Rolle des PI3K-Signalwegs bei der Entstehung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas untersucht. Dafür wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saur *Ptf1a<sup>Cre/+</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>*-Mäuse (► Kapitel 3.1.1; in der Folge *Pik3ca\** genannt) generiert, die PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R/+</sup> (► Kapitel 1.4; in der Folge PI3K\* genannt) im Pankreas exprimieren. Diese Tiere erwiesen sich als lebensfähig, fruchtbar und phänotypisch unauffällig (Eser *et al.*, 2013).

Als Vergleichsmodell wurde die *Ptf1a<sup>Cre/+</sup>;LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>*-Mauslinie (in der Folge *Kras\** genannt) verwendet. Diese Mäuse exprimieren im Pankreas *Kras<sup>G12D</sup>* (in der Folge *Kras\** genannt) und rekapitulieren das vollständige Spektrum der pankreatischen Karzinogenese (Hingorani *et al.*, 2003).

Die in der vorliegenden Studie beschriebenen Ergebnisse wurden im Rahmen einer umfangreicheren Abhandlung zum Teil bereits vorab veröffentlicht in Eser *et al.*, 2013.

### 4.1 Die pankreasspezifische Expression von onkogenem PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R</sup> führt zur Entstehung von azinär-duktales Metaplasien (ADMs) und pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs)

Um die Effekte der pankreasspezifischen PI3K\*-Expression *in vivo* zu analysieren, wurde das Pankreasgewebe auf morphologische Veränderungen untersucht. Hierzu wurden paraffinfixierte Pankreasgewebeschnitte von *Pik3ca\**- und *Kras\**-Mäusen sowohl mit Hämatoxylin-Eosin (H&E), als auch mit Alzianblau (AB) zum Nachweis der Muzinproduktion von PanIN-Läsionen angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Entnahme des Pankreasgewebes der *Pik3ca\**- und der *Kras\**-Mäuse erfolgte im Alter von 1, 3, 6 und 9 Monaten (mind. n = 3 je Zeitpunkt). Histologisch waren bei allen untersuchten Tieren sowohl in der H&E- als auch in der AB-Färbung Strukturen zu erkennen, welche den azinär-duktales-Metaplasien (ADMs) und den pankreatischen intraepithelialen Läsionen (PanINs) gleichen (► Abbildung 4-1A/B), die aus dem *Kras\**-Mausmodell als präkanzeröse Strukturen bekannt sind (► Kapitel 1.5.1; Hruban *et al.*, 2001, 2006b; Hingorani *et al.*, 2003; Pinho *et al.*, 2011).

Um die PanIN-Progression der *Pik3ca\**-Mäuse mit der der *Kras\**-Tiere *in vivo* zu vergleichen, wurden in den Pankreata beider Mauslinien die PanIN-Grade zu den genannten Zeitpunkten (1, 3, 6 und 9 Monate) bestimmt und quantifiziert. Im Alter von 1 Monat wurden bei den Tieren beider Genotypen bereits mehrere ADMs und wenige PanINs Grad 1A gefunden, im Alter von 3 Monaten nahm insbesondere die Anzahl der PanIN-1A zu und vereinzelt traten auch PanIN-1B auf. Bei 6-Monats-Mäusen zeigte sich eine etwa gleichbleibende Anzahl von

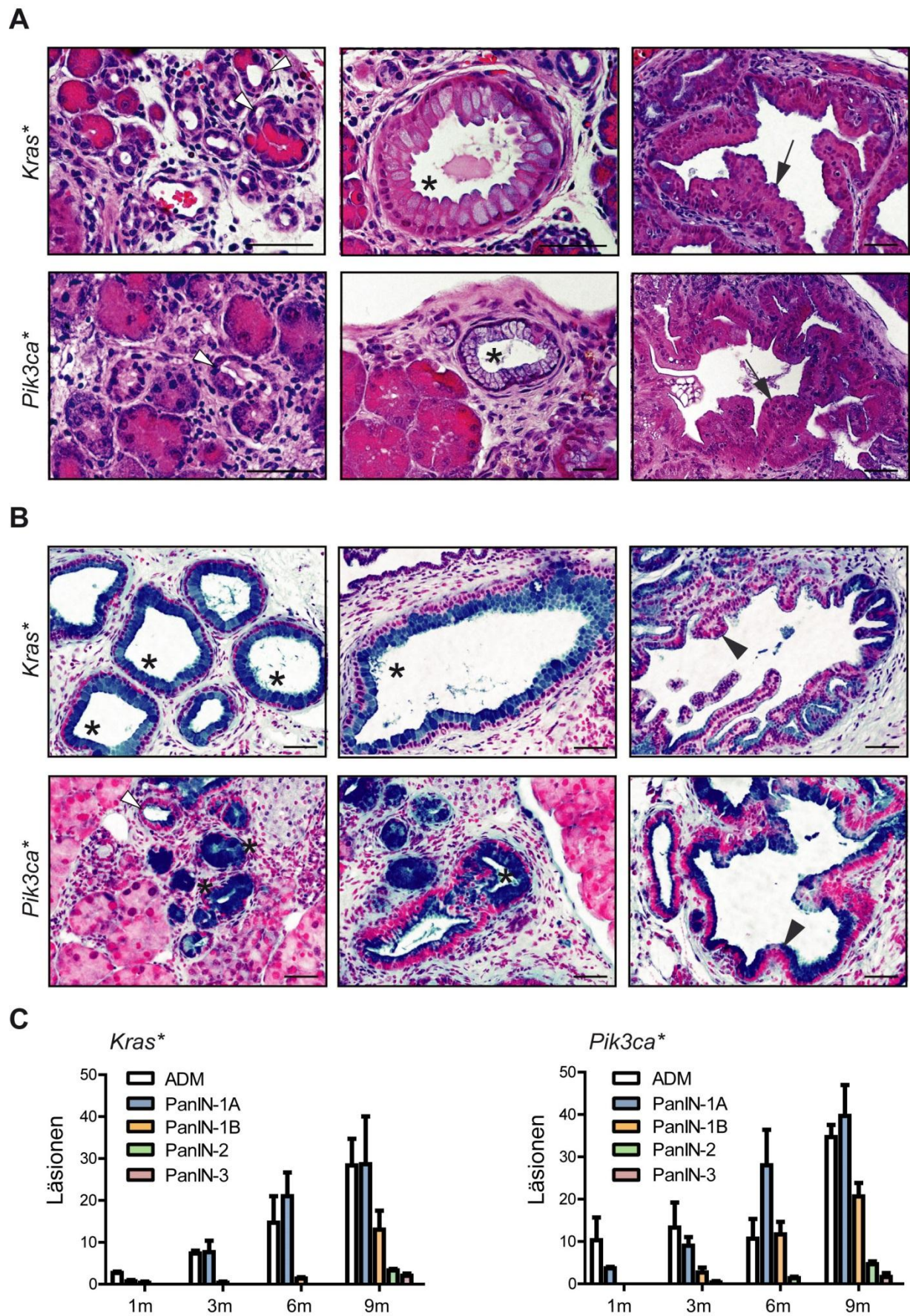


Abbildung 4-1: *Pik3ca\**-Mäuse entwickeln PanINs (Detailbeschreibung nächste Seite).

ADMs, zahlreiche PanIN-1A, einige PanIN-1B und bereits vereinzelt PanINs Grad 2. Die Anzahl und Grade der Läsionen nahmen mit steigendem Alter zu, sodass bei 9 Monate alten Mäusen schließlich zahlreiche ADMs und PanIN-1A, viele PanIN-1B, wenige PanIN-2 und vereinzelte PanIN-3, die ein „*Carcinoma in situ*“ darstellen, zu finden waren (►Abbildung 4-1C). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die PanIN-Progression in *Pik3ca*\*-Mäusen die der *Kras*\*-Mäuse rekapituliert.

#### 4.2 Die pankreasspezifische Expression von onkogenem PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R</sup> führt zur Entstehung von metastasierenden PDACs

Um herauszufinden, ob die PanIN-Progression in den *Pik3ca*\*-Tieren wie bei den *Kras*\*-Mäusen zur Entstehung von Karzinomen im Pankreas führt (Hingorani *et al.*, 2003), wurden Tiere beider Genotypen unter identischen Bedingungen so lange aufgezogen, bis sie deutliche Anzeichen einer Tumorerkrankung zeigten. Die Mäuse wurden euthanasiert, wenn sie einen schlechten Allgemeinzustand oder definierte Abbruchkriterien wie Kachexie oder Aszites aufwiesen. Alle untersuchten Tiere entwickelten innerhalb von 800 Tagen Pankreastumoren und z.T. Metastasen in Lymphknoten, Leber und Lunge.

Die Primärtumoren in der Bauchspeicheldrüse der *Pik3ca*\*-Mäuse stellten sich in der Sektion meist als kugelförmige solide Masse dar (►Abbildung 4-2A), frühe Tumorstadien waren zystischer Struktur. Diese waren in der Regel im Pankreaskopf lokalisiert, der bereits als Entstehungsort des pankreatischen Adenokarzinoms des Pankreas beschrieben wurde (Hezel *et al.*, 2006). Die Pankreastumoren wuchsen invasiv, d.h. sie waren häufig mit anliegendem Lymphgewebe, Darm bzw. Mesenterium, Gallengang und/oder Peritoneum verwachsen.

Um die Art des Tumors zu bestimmen, wurden die Pankreastumoren histologisch untersucht. In der H&E-Färbung waren duktale Strukturen, dichtes Fibroblastenstroma und zelluläre Atypien als typische Merkmale des PDAC zu erkennen (►Kapitel 1.2.3; Hezel *et al.*, 2006). Der Differenzierungsgrad der Tumoren reichte von gut differenzierten bis hin zu

---

#### Abbildung 4-1: *Pik3ca*\*-Mäuse entwickeln PanINs.

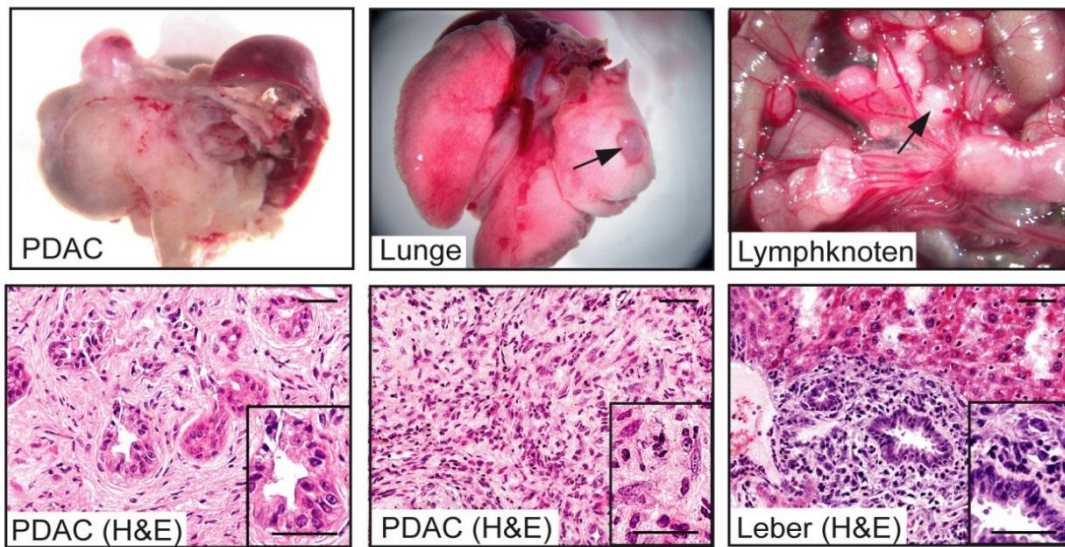
A) Repräsentative mit Hämatoxylin-Eosin(H&E) gefärbte Schnitte von azinär-duktalem Metaplasien (ADMs) und pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) unterschiedlicher Grade in *Kras*\*- (obere Reihe) und *Pik3ca*\*-Tieren (untere Reihe). Weiße Pfeilspitzen markieren ADMs, Sterne PanIN-1A, Pfeile PanIN-2/3. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m.

B) Repräsentative mit Alzianblau gefärbte Schnitte von azinär-duktalem Metaplasien (ADMs) und pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) unterschiedlicher Grade in *Kras*\*- (obere Reihe) und *Pik3ca*\*-Tieren (untere Reihe). Weiße Pfeilspitzen markieren ADMs, Sterne PanIN-1A, schwarze Pfeilspitzen PanIN-1B. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m.

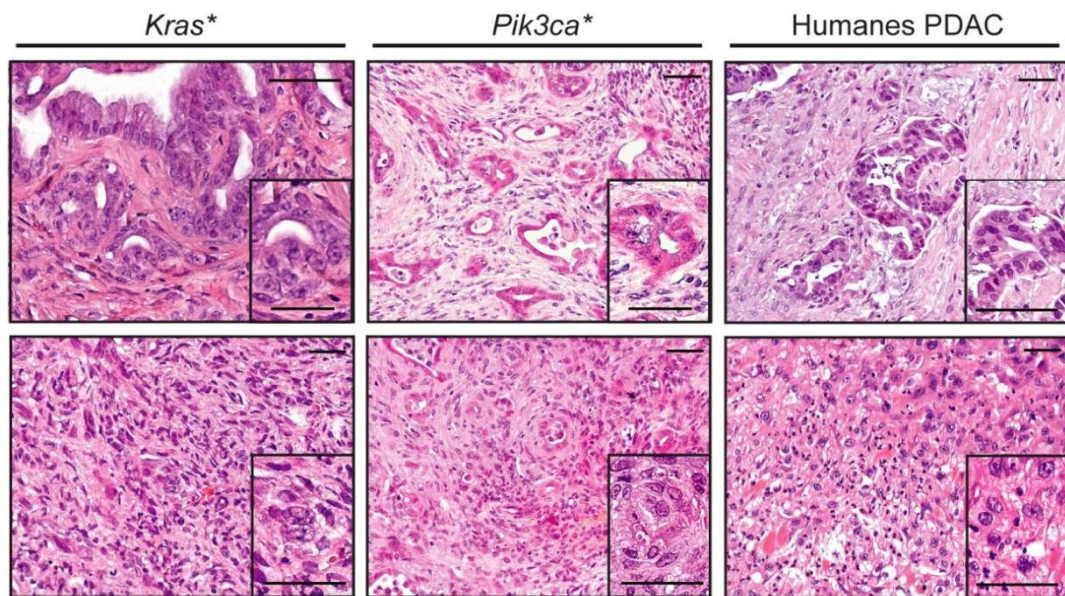
C) Quantifizierung der ADMs und PanINs in *Kras*\*- und *Pik3ca*\*-Mäusen (n = 3 je Zeitpunkt und Genotyp). Je Maus wurden 3 repräsentative Schnitte ausgezählt. PanIN-Anzahl wurde in Gemeinschaftsarbeit mit Mitgliedern der AG Saur bestimmt.

(Eigene Abbildungen sind in A und B wiedergegeben; C: vorab veröffentlicht in Eser *et al.*, Cancer Cell 2013 18;23:406-20).

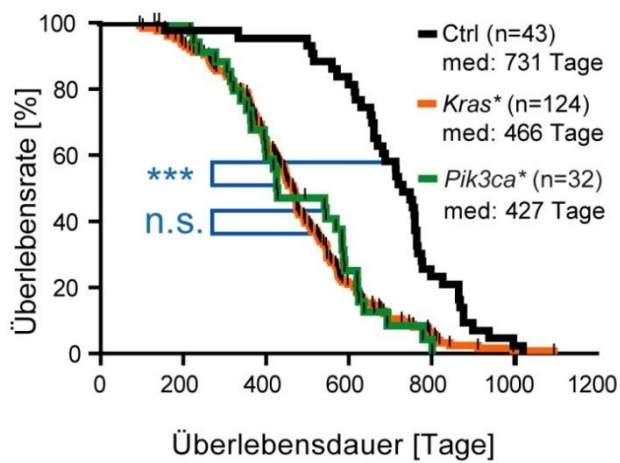
**A**



**B**



**C**



**D**

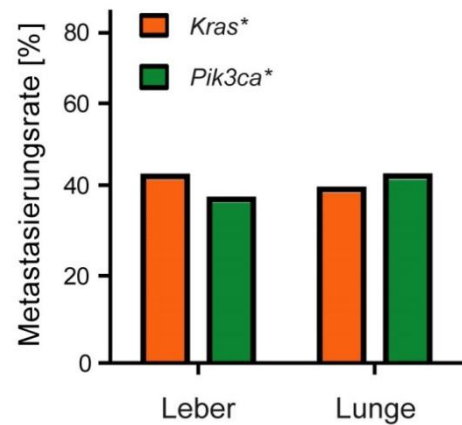


Abbildung 4-2: *Pik3ca\**-Mäuse entwickeln metastasierenden PDAC (Detailbeschreibung nächste Seite).



undifferenzierten Tumoren, die histologisch nicht von denen der *Kras*\*-Mäuse zu unterscheiden waren (► Abbildung 4-2B).

Während Kontrolltiere ohne Onkogenexpression im Mittel 731 Tage überlebten, betrug die Überlebenszeit von *Pik3ca*\*-Mäusen 427 Tage und die der *Kras*\*-Tiere 466 Tage. Der Unterschied der Überlebenszeit der *Pik3ca*\*-Mäuse versus Kontrollmäuse war statistisch signifikant ( $p$ -Value < 0,001), wogegen der Vergleich der *Pik3ca*\*- mit den *Kras*\*-Mäusen keinen statistisch signifikanten Unterschied erbrachte (► Abbildung 4-2C).

Ein großer Teil der Tumoren hatte auch bereits in Lymphknoten, Lunge oder Leber metastasiert oder zeigte blutigen Aszites als mögliches Anzeichen einer Peritonealkarzinose. Die soliden Metastasen stellten sich i.d.R. als runde und glasige Läsionen dar (► Abbildung 4-2A). Die Metastasierungsraten der *Pik3ca*\*-Mäuse in Leber und Lunge entsprach mit 40% bei beiden Organen in etwa der der *Kras*\*-Mäuse (► Abbildung 4-2D).

#### 4.3 Die pankreasspezifische Expression von onkogenem PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R</sup> führt zur konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs in ADMs, PanINs und PDAC

Für zahlreiche Tumorarten wie Brust-, Dickdarm- oder Blasenkrebs wurde eine Beteiligung der konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs an der Tumorentstehung bereits publiziert (Zhao & Vogt, 2008). Auch im duktalem Pankreaskarzinom treten aktivierende Mutationen des PI3K-Signalwegs auf (Zhao & Vogt, 2010). Noch unklar ist allerdings, welche Rolle genau der PI3K-Signalweg in präkanzerösen Läsionen und in PDAC spielt bzw. welche PI3K-Effektoren für die onkogenen Prozesse verantwortlich sind.

Um die Aktivierung des PI3K-Signalwegs zu untersuchen, wurden Pankreasgewebeschnitte von 1, 3, 6 und 9 Monate alten *Pik3ca*\*-Mäusen, die ADMs und PanINs aller Grade aufwiesen, immunhistochemisch angefärbt. Die getesteten PI3K-Signalweg-Effektoren waren die Proteinkinase B (PKB oder AKT) an ihren Phosphorylierungsstellen Threonin 308 (T308)

#### Abbildung 4-2: *Pik3ca*\*-Mäuse entwickeln metastasierenden PDAC.

A) Makroskopische (obere Reihe) und mikroskopische (untere Reihe) Darstellung von PDAC sowie typischer Metastasen in *Pik3ca*\*-Mäusen. Pfeile markieren die Metastasen. H&E = Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Einsätze zeigen repräsentative Läsionen in hoher Auflösung. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m für mikroskopische Fotos, 20  $\mu$ m für die Einsätze.

B) Repräsentative H&E-Färbung von gut bis mäßig differenziertem (obere Reihe) und undifferenziertem PDAC (untere Reihe) muriner *Kras*\*- und *Pik3ca*\*-Pankreata sowie resezierter humaner PDAC-Proben. Einsätze zeigen repräsentative Läsionen in hoher Auflösung. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m für mikroskopische Fotos, 20  $\mu$ m für die Einsätze.

C) Kaplan-Meier-Überlebenskurven der angegebenen Genotypen (n. s. = nicht signifikant). *Kras*\* versus *Pik3ca*\*: nicht signifikant. Kontrolltiere (Ctrl) vs. *Pik3ca*\*: \*\*\* $p$  < 0,001, Log-Rank-Test. med = mediane Überlebensdauer.

D) Quantifizierung von Leber- und Lungenmetastasen in *Kras*\*- und *Pik3ca*\*-Mäusen (n = 20 Mäuse je Genotyp). Säulendiagramm gibt den Prozentsatz der Mäuse mit Leber- und Lungenmetastasen an.

(A–D: vorab veröffentlicht in Eser *et al.*, Cancer Cell 2013 18;23:406–20; eigene Abbildungen sind in A wiedergegeben; B–D: Diese Daten wurden von Mitgliedern der AG Saur in Gemeinschaftsarbeit erhoben).

und Serin 473 (S473) und die Glykogen-Synthase-Kinase3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) an Serin 9 (S9; Toker, 2000). Um AKT vollständig zu aktivieren, muss es an seinen beiden Phosphorylierungsstellen, T308 und S473, phosphoryliert werden. An T308 geschieht das durch die *3-phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1), an S473 durch *mammalian target of rapamycin* (mTOR), das die Proteinsynthese stimuliert (Castellano & Downward, 2011). AKT ist ein Proto-Onkoprotein, das über seine diversen Substrate verschiedene Signalwege aktivieren kann. Daher hat AKT viele zelluläre Funktionen einschließlich der Aktivierung von Apoptose und Proteinsynthese oder Hemmung des Zellzyklus-Arrests.

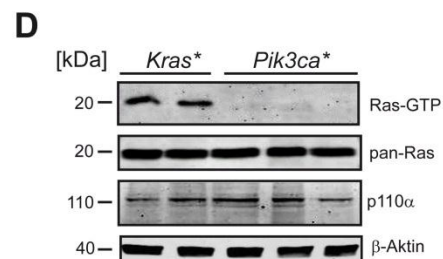
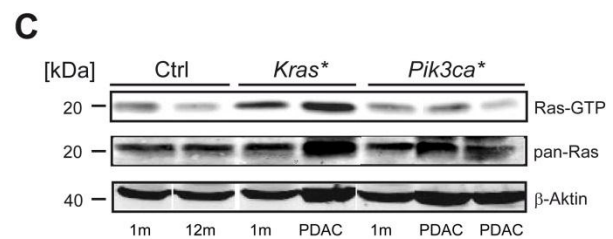
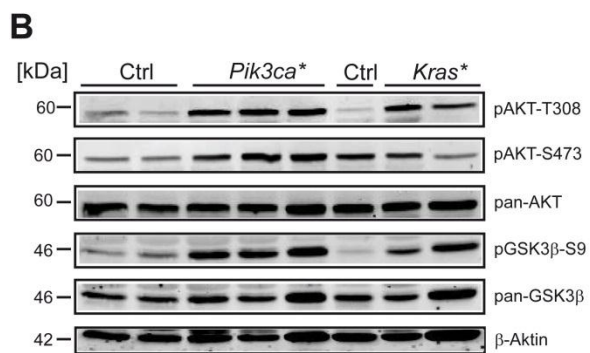
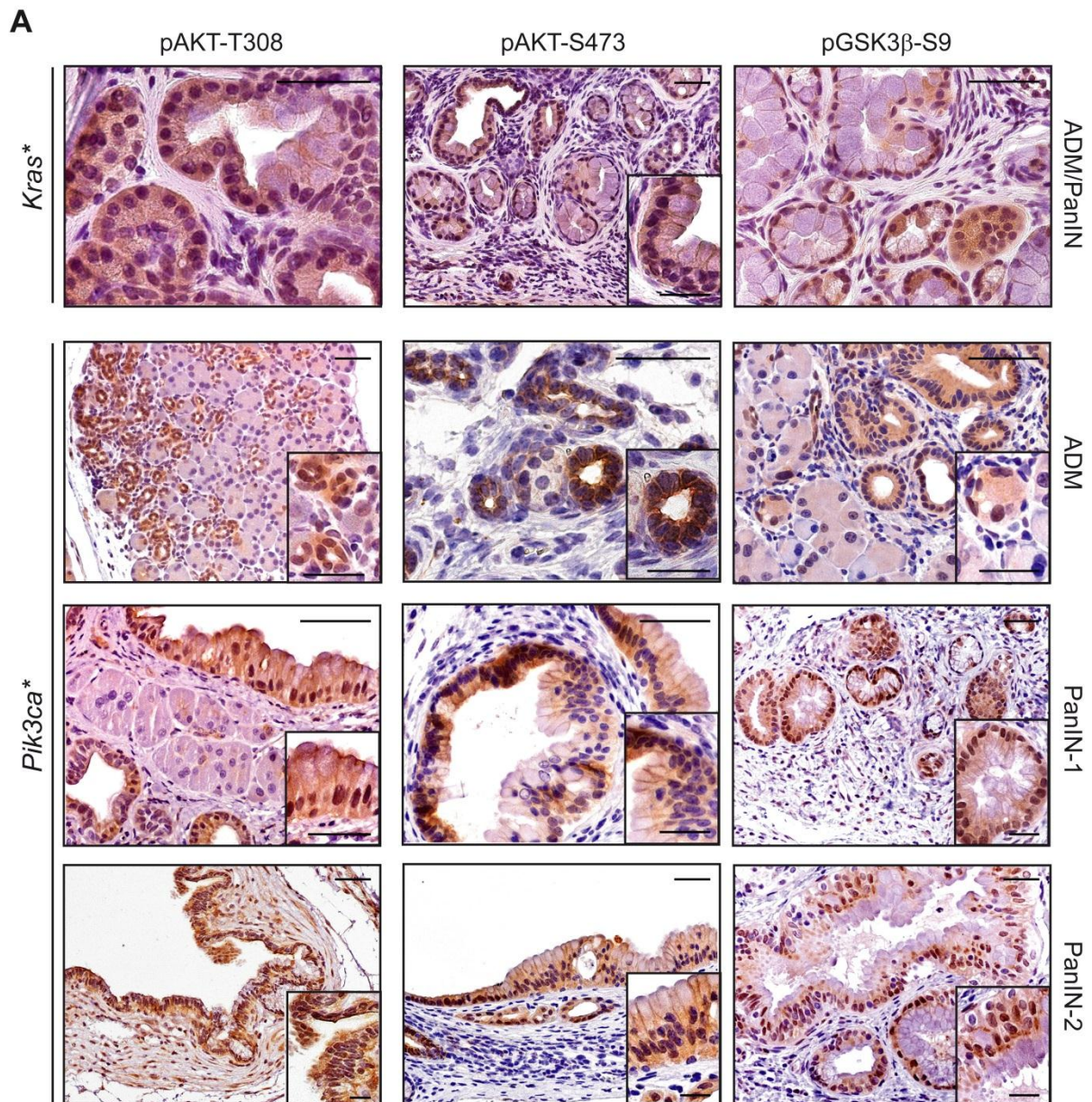
Ein Effektorprotein von AKT ist GSK3 $\beta$ . Aktiviertes AKT kann GSK3 $\beta$  an S9 phosphorylieren und somit inhibieren (Bader & Vogt, 2005). Die immunhistochemische Untersuchung der *Pik3ca*<sup>\*</sup>-Pankreasgewebeschnitte zeigte eine Phosphorylierung von AKT an seinen Phosphorylierungsstellen T308 und S473 sowie von GSK3 $\beta$ -S9 in ADMs, niedrig- und hochgradigen PanIN-Läsionen (►Abbildung 4-3A).

Diese Ergebnisse wurden per Immunoblotanalyse verifiziert. Dafür wurde die Phosphorylierung der genannten PI3K-Effektoren im Pankreasgewebe von 6 Monate alten Mäusen getestet (►Abbildung 4-3B). Es zeigte sich in *Pik3ca*<sup>\*</sup>- wie in *Kras*<sup>\*</sup>-Mäusen eine Phosphorylierung der genannten PI3K-Effektoren und damit eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs.

Um sicherzustellen, dass diese Effekte durch die konstitutive Aktivierung des PI3K-Signalwegs selbst und nicht durch eine PI3K<sup>\*</sup>-vermittelte Aktivierung von Ras als Feedback-Mechanismus verursacht wurden, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saur ein Ras-Aktivitätsassay durchgeführt. Untersuchungsmaterial war Pankreasgewebe von *Pik3ca*<sup>\*</sup>- und *Kras*<sup>\*</sup>-Mäusen im Alter von 1 Monat und 12 Monaten und PDAC-Gewebe (Eser *et al.*, 2013).

Dieser Aktivitätsassay zeigte im Immunoblot nur in den Pankreata der *Kras*<sup>\*</sup>-Mäuse eine Ras-Aktivierung (Ras-GTP), nicht aber in denen der *Pik3ca*<sup>\*</sup>-Mäuse (►Abbildung 4-3C).

Mittels Immunoblot wurde die Aktivierung des PI3K-Signalwegs in PDAC-Zellen, die aus *Pik3ca*<sup>\*</sup>- und *Kras*<sup>\*</sup>-Mäusen isoliert wurden, verifiziert. Die PI3K-Aktivierung wurde bei beiden Mauslinien durch p110 $\alpha$ -Expression nachgewiesen, die Ras-Aktivierung mittels Ras-Aktivitätsassay dagegen nur in den *Kras*<sup>\*</sup>-Tumorzellen (►Abbildung 4-3D). Die PanIN- und PDAC-Entstehung in den *Pik3ca*<sup>\*</sup>-Mäusen wird somit nicht durch Ras-Aktivierung, sondern durch einen unabhängig davon aktivierten PI3K-Signalweg vermittelt.



**Abbildung 4-3: In *Pik3ca*\*-Mäusen wird der PI3K-Signalweg *Kras*-unabhängig aktiviert (Detailbeschreibung nächste Seite).**

#### 4.4 Die pankreasspezifische Expression von onkogenem PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R</sup> führt zur konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalwegs in ADMs, PanINs und PDAC

Der MAPK-Signalweg wird wie der PI3K-Signalweg durch Ras aktiviert (► Kapitel 1.3.3) und nimmt damit eine bedeutende Rolle in der RAS-vermittelten Onkogenese ein (Bardeesy & DePinho, 2002; Mendoza *et al.*, 2011). Aktiviertes RAS bindet die RAF-Serin-/Threoninkinase, die die Kinasen MEK1 und MEK2 phosphoryliert, diese wiederum phosphorylieren ERK1 und ERK2. Diese Signalkaskade führt zur Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, Zykline und Zytokine und vermittelt proliferative Effekte. Kommt es zur Hyperaktivierung des RAS-ERK-Signals, kann dies aber auch einen Zellzyklusarrest auslösen (Mendoza *et al.*, 2011).

In dieser Studie wurde die MAPK-Signalweg-Aktivierung anhand von Pankreasgewebeschnitten immunhistochemisch analysiert. Es zeigte sich, dass in den Pankreata von Mäusen, die *Pik3ca*\* bzw. *Kras*\* exprimierten, in PanINs aller Grade sowohl MEK1/2 als auch ERK1/2 partiell phosphoryliert waren (► Abbildung 4-4A/B). In aus PDAC isolierten *Pik3ca*\*-bzw. *Kras*\*-Tumorzellen wurde mittels Immunoblot ebenfalls eine Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 festgestellt (► Abbildung 4-4C).

Da bereits in ► Kapitel 4.3 gezeigt werden konnte, dass die Expression von onkogenem *Pik3ca*\* keine Ras-Aktivierung bewirkt (► Abbildung 4-3C/D), muss auch die in dieser Studie gezeigte MAPK-Signalweg-Aktivierung unabhängig von aktiviertem Ras erfolgen.

---

#### Abbildung 4-3: In *Pik3ca*\*-Mäusen wird der PI3K-Signalweg Kras-unabhängig aktiviert.

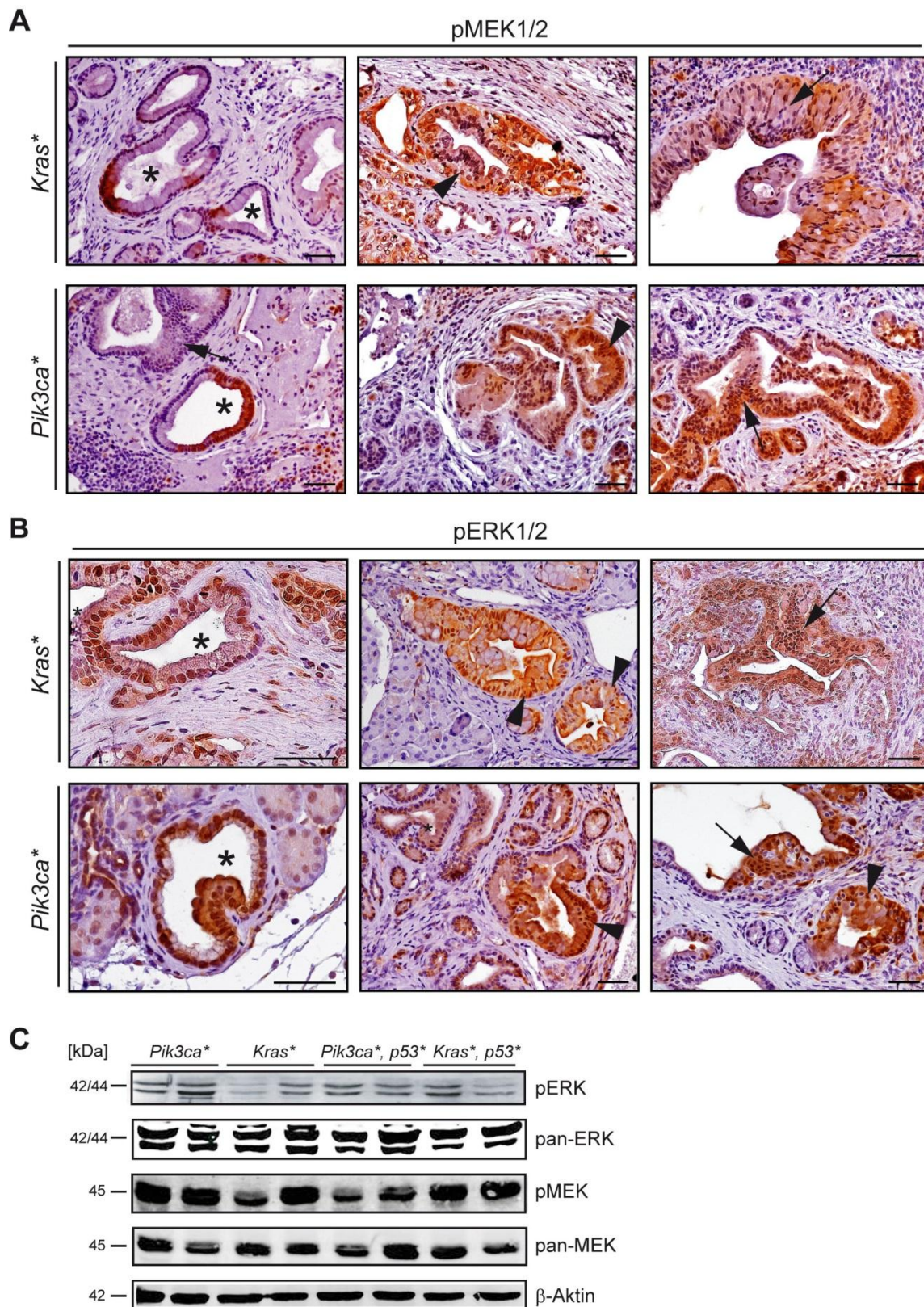
A) Immunhistochemische Analyse der PI3K/AKT-Signalweg-Aktivierung in ADMs und PanINs in 6 Monate alten *Kras*\*- und *Pik3ca*\*-Mäusen. Einsätze zeigen repräsentative Läsionen in hoher Auflösung. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m für mikroskopische Fotos, 20  $\mu$ m für die Einsätze.

B) Immunoblotanalyse der PI3K/AKT-Signalweg-Aktivierung in Kontrollmäusen, *Pik3ca*\*- und *Kras*\*-Pankreata von 6 Monate alten Mäusen.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Ctrl = Kontrolltiere.

C) Analyse von aktiviertem Ras (Ras-GTP) im Pankreas von *Pik3ca*\*- und *Kras*\*-Mäusen. m = Monat. Ctrl = Kontrolltiere. Versuch wurde in Gemeinschaftsarbeit mit Mitgliedern der AG Saur durchgeführt.

D) Analyse von aktiviertem Ras (Ras-GTP) und des p110 $\alpha$ -Expressionsniveaus in Tumorzellen, die aus PDAC der *Kras*\*- und *Pik3ca*\*-Mäuse isoliert wurden. Ctrl = Kontrolltiere. Versuch wurde in Gemeinschaftsarbeit mit Mitgliedern der AG Saur durchgeführt.

(A–D: vorab veröffentlicht in Eser *et al.*, Cancer Cell 2013 18;23:406–20).



**Abbildung 4-4: In *Pik3ca*<sup>\*</sup>-Mäusen wird der MAPK-Signalweg aktiviert.**

A und B) Immunhistochemische Analyse der MAPK-Signalweg-Aktivierung in ADMs und PanINs in *Pik3ca*<sup>\*</sup>- und *Kras*<sup>\*</sup>- Mäusen. Maßstabsbalken 50 µm. Sterne markieren PanIN-1A, Pfeilspitzen PanIN-1B, schwarze Pfeile PanIN-2/3.

C) Immunoblotanalyse der MAPK-Signalweg-Aktivierung in PDAC-Tumorzellen, die aus *Pik3ca*<sup>\*</sup>- bzw. *Pik3ca*<sup>\*</sup>; *p53*<sup>\*</sup>- und *Kras*<sup>\*</sup>-Mäusen isoliert wurden. β-Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet.

## 4.5 Die *in-vitro*-Inhibition des PI3K-Signalwegs und des PI3K-Effektors AKT blockiert im *Pik3ca*\*-Modell die konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, nicht aber die MAPK-Signalweg-Aktivierung

### 4.5.1 PI3K-Signalweg-Inhibition

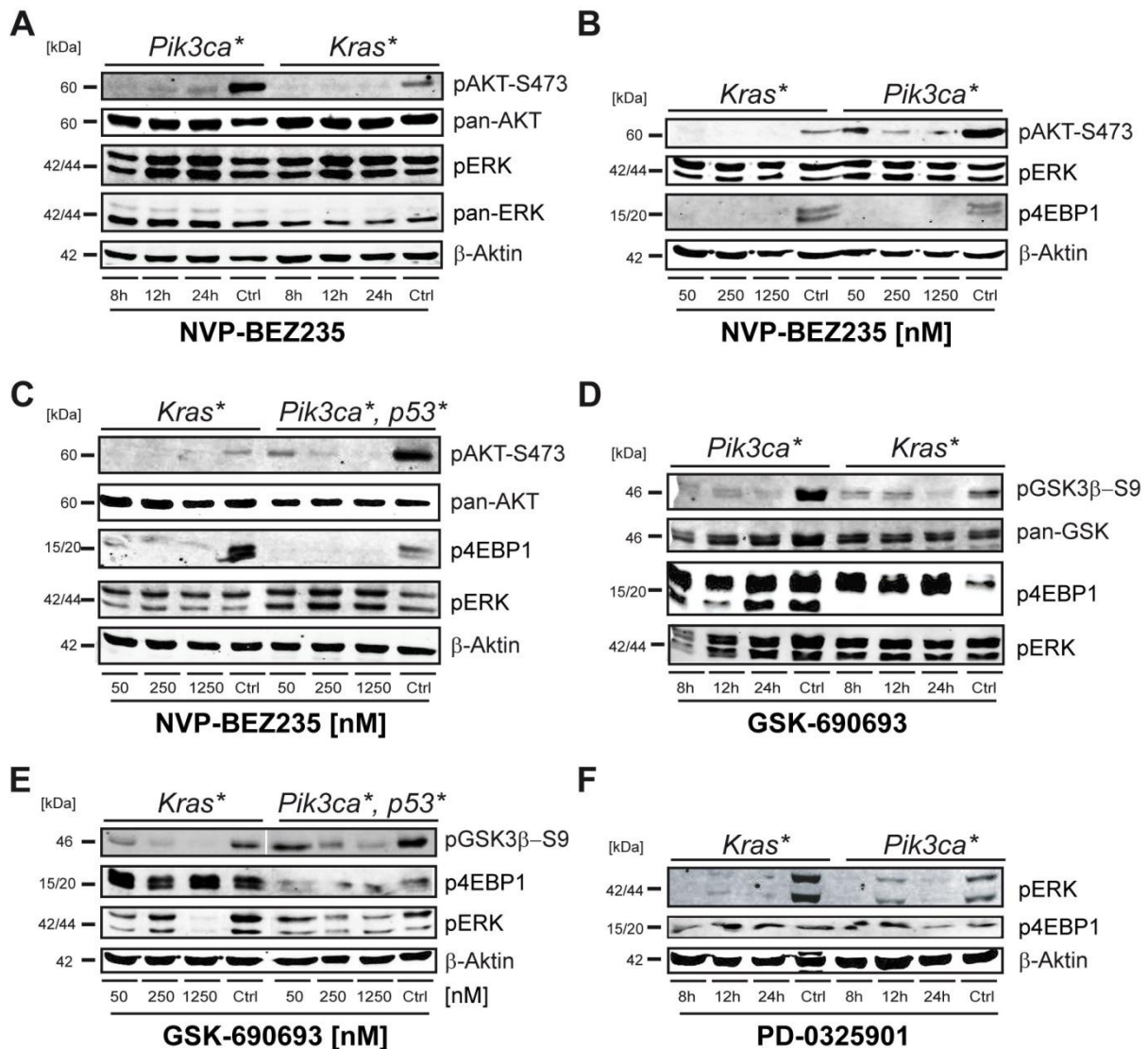
Um zu analysieren, welche molekularen Konsequenzen die Inhibition des PI3K-AKT-Signalwegs in *Pik3ca*\*- und *Kras*\*-Tumorzellen hat, wurden PDAC-Zellen beider Genotypen mit je einem PI3K- und einem AKT-Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten behandelt (► Abbildung 4-5). Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, als Kontrollproben (Ctrl) wurden Tumorzellen mit DMSO ohne Inhibitor versetzt. Die Auswertung erfolgte mittels phosphorylierungsspezifischer Immunoblotanalyse.

PI3K wird durch NVP-BEZ 235 inhibiert, einen dualen mTOR- und PI3K-Inhibitor (Serra 2008). NVP-BEZ 235 ist ein Imidazoquinolinderivat, das durch Bindung an die ATP-Bindungsstelle von PI3K und mTOR (Maira *et al.*, 2008) beide Kinasen blockiert. In humanen Tumorzelllinien konnte NVP-BEZ 235 den PI3K-Signalweg hemmen und dadurch G1-Zellzyklusarrest bewirken (Maira *et al.*, 2008). NVP-BEZ 235 befindet sich im Augenblick in klinischen Phase-1–2-Studien (Mukherjee *et al.*, 2012).

Nach 8-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit NVP-BEZ 235 in einer Konzentration von 250 nM zeigte sich zu allen drei Inkubationszeiten eine verminderte AKT-Phosphorylierung an S473, während die ERK-Phosphorylierung unverändert blieb (► Abbildung 4-5A). Die 1-stündige Inkubation mit 50 nM bewirkte eine unvollständige Hemmung des Phosphorylierungssignals von AKT und auch des PI3K-Effektorproteins 4EBP1 in murinen *Kras*\*-Tumorzellen, wohingegen die 1-stündige Inkubation mit 250 nM und 1250 nM NVP-BEZ 235 eine komplette Hemmung verursachten. In *Pik3ca*\*-Zellen nahm die Phosphorylierung von AKT mit zunehmender Konzentration von NVP-BEZ 235 ab, die 4EBP1-Phosphorylierung war bei allen Konzentrationen deutlich gehemmt. Auch hier blieb die ERK-Phosphorylierung unverändert (► Abbildung 4-5B).

Pankreatische Tumorzellen, die aus *Pik3ca*\*-Mäusen mit einer zusätzlichen „*gain-of-function*“-Mutation des Tumorsuppressors *Trp53* (*LSL-Trp53*<sup>R172H</sup>, nachfolgend *p53*\* genannt) (Hingorani *et al.*, 2005) isoliert wurden, zeigten Reduktion der Phosphorylierung von AKT und ebenso von 4EBP1. Die ERK-Phosphorylierung blieb auch hier unverändert (► Abbildung 4-5C).

Bei GSK-690693 handelt es sich um einen niedermolekularen pan-AKT-Inhibitor, der ATP-kompetitiv wirkt. Er wirkt selektiv auf die AKT-Isokinasen, hemmt aber auch einige AGC-Kinasen (Proteinkinasen der Familien A, G und C). Er inhibiert dosis- und zeitabhängig die Phosphorylierung von AKT-Downstream-Effektoren wie Glykogen-Synthase-Kinase3β



**Abbildung 4-5: Die *in-vitro*-Inhibition von mTOR/PI3K und AKT blockiert im *Pik3ca*\*-Mausmodell die Aktivierung des PI3K-Signalwegs. Die *in-vitro*-Inhibition von MEK hemmt im *Pik3ca*\*-Modell den MAPK-Signalweg.**

A) Immunoblotanalyse der NVP-BEZ235-vermittelten dualen mTOR/PI3K-Inhibition in PDAC Zellen, die aus *Pik3ca*\*- (links) und *Kras*\*-Mäusen (rechts) isoliert wurden. Inkubationszeit von links nach rechts: 8, 12, 24 h. Konzentration [NVP-BEZ235]: 250 nM.

B) Immunoblotanalyse der NVP-BEZ235-vermittelten dualen mTOR/PI3K-Inhibition in PDAC Zellen, die aus *Kras*\*- (links) und *Pik3ca*\*-Mäusen (rechts) isoliert wurden. Konzentration [NVP-BEZ235] von links nach rechts: 50 nM, 250 nM, 1250 nM, Ctrl. Inkubationszeit: 1 h.

C) Immunoblotanalyse der NVP-BEZ235-vermittelten dualen mTOR/PI3K-Inhibition in PDAC Zellen, die aus *Kras*\*- (links) und *Pik3ca*\*, *p53*\*-Mäusen (rechts) isoliert wurden. Konzentration [NVP-BEZ235] von links nach rechts: 50 nM, 250 nM, 1250 nM, Ctrl. Inkubationszeit: 1 h.

D) Immunoblotanalyse der GSK-690693-vermittelten AKT-Inhibition in PDAC Zellen, die aus *Pik3ca*\*- (links) und *Kras*\*-Mäusen (rechts) isoliert wurden. Inkubationszeit von links nach rechts: 8, 12, 24 h. Konzentration [GSK-690693]: 1250 nM.

E) Immunoblotanalyse der GSK-690693-vermittelten AKT-Inhibition in PDAC Zellen, die aus *Kras*\*- (links) und *Pik3ca*\*, *p53*\*-Mäusen (rechts) isoliert wurden. Konzentration [GSK-690693] von links nach rechts: 50 nM, 250 nM, 1250 nM, Ctrl. Inkubationszeit: 6 h.

F) Immunoblotanalyse der PD-0325901-vermittelten MEK1/2-Inhibition in PDAC Zellen, die aus *Kras*\*- (links) und *Pik3ca*\*-Mäusen (rechts) isoliert wurden. Inkubationszeit von links nach rechts: 8, 12, 24 h. Konzentration [PD-0325901]: 50 nM.

β-Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Ctrl = vehikelbehandelte Kontrolle.

(GSK3 $\beta$ ) oder Forkhead Box Protein O1 (FOXO1). In einigen Tumoren wie z.B. akuten lymphoblastischen Leukämie(ALL)-Zelllinien bewirkt GSK-690693 die Hemmung der Proliferation und induziert Apoptose (Rhodes *et al.*, 2008; Levy *et al.*, 2009). Aktuell wird GSK-690693 in klinischen Phase-1-Studien getestet (Carol *et al.*, 2010).

Die Inhibition mit GSK-690693 in der Dauer von 8, 12 und 24 h bei einer Konzentration von 1250 nM ergab bei den *Pik3ca*\*- und *Kras*\*-Zellen eine Hemmung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung, während Phosphorylierung von 4EBP1 nicht gehemmt wurde. Auch die ERK-Phosphorylierung wurde nicht herunterreguliert (►Abbildung 4-5D). Die 6-stündige AKT-Inhibition von *Pik3ca*\*/*p53*\*-Tumorzellen mit 50 nM, 250 nM und 1250 nM GSK-690693 zeigte eine sukzessive Hemmung des Phosphorylierungssignals von GSK3 $\beta$  (Levy *et al.*, 2009, ►Abbildung 4-5E).

#### 4.5.2 MAPK-Signalweg-Inhibition

Da die ERK-Phosphorylierung durch den PI3K- bzw. AKT-Inhibitor nicht herunterreguliert werden konnte, wurden die oben genannten Tumorzellen mit einem MEK-Signalweg-Inhibitor versetzt. Dabei handelte es sich um den nicht-kompetitiv wirkenden Inhibitor von MEK1 und MEK2, PD-0325901, ein Benzhydroxamatester (Barrett *et al.*, 2008; Pratilas *et al.*, 2009; Akinleye *et al.*, 2013). In Melanomen und Schilddrüsentumoren inhibiert PD-0325901 Zelllinien mit *Braf*-Mutation. Außerdem wurde PD-0325901 bereits in Phase-2-Studien beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) getestet, allerdings mit mäßigem Erfolg (Akinleye *et al.*, 2013).

Für diese Studie wurden *Pik3ca*\*- und *Kras*\*-mutierte Tumorzellen 8, 12 oder 24 h mit PD-0325901 in einer Konzentration von 50 nM inkubiert. Die Immunoblot-Auswertung ergab eine Hemmung des Phosphorylierungssignals von ERK1/2 sowohl in den *Pik3ca*\*- als auch in den *Kras*\*-Tumorzellen (►Abbildung 4-5F).

Die Immunoblots zeigen also, dass durch PI3K- und AKT-Inhibitoren der PI3K-Signalweg sowohl in *Pik3ca*\* als auch in *Kras*\*-Tumorzellen, die aus PDAC isoliert wurden, gehemmt werden konnte. Für die Hemmung der Phosphorylierung der PI3K-Effektoren in den *Pik3ca*\*-Zellen war allerdings jeweils eine höhere Konzentration von NVP-BEZ 235 und von GSK-690693 nötig. Auch der MAPK-Signalweg konnte durch den MEK-Inhibitor PD-0325901 gehemmt werden. Um hier eine zuverlässige Aussage treffen zu können bzw. auch die Auswirkung der MAPK-Inhibition auf die PI3K-Signalweg-Aktivierung zu analysieren, sind allerdings noch eingehendere Untersuchungen notwendig.



#### 4.6 Onkogene Aktivierung des PI3K-Signalwegs aktiviert ein Seneszenzprogramm im Pankreas, das durch den Verlust von *CDKN2A* umgangen wird

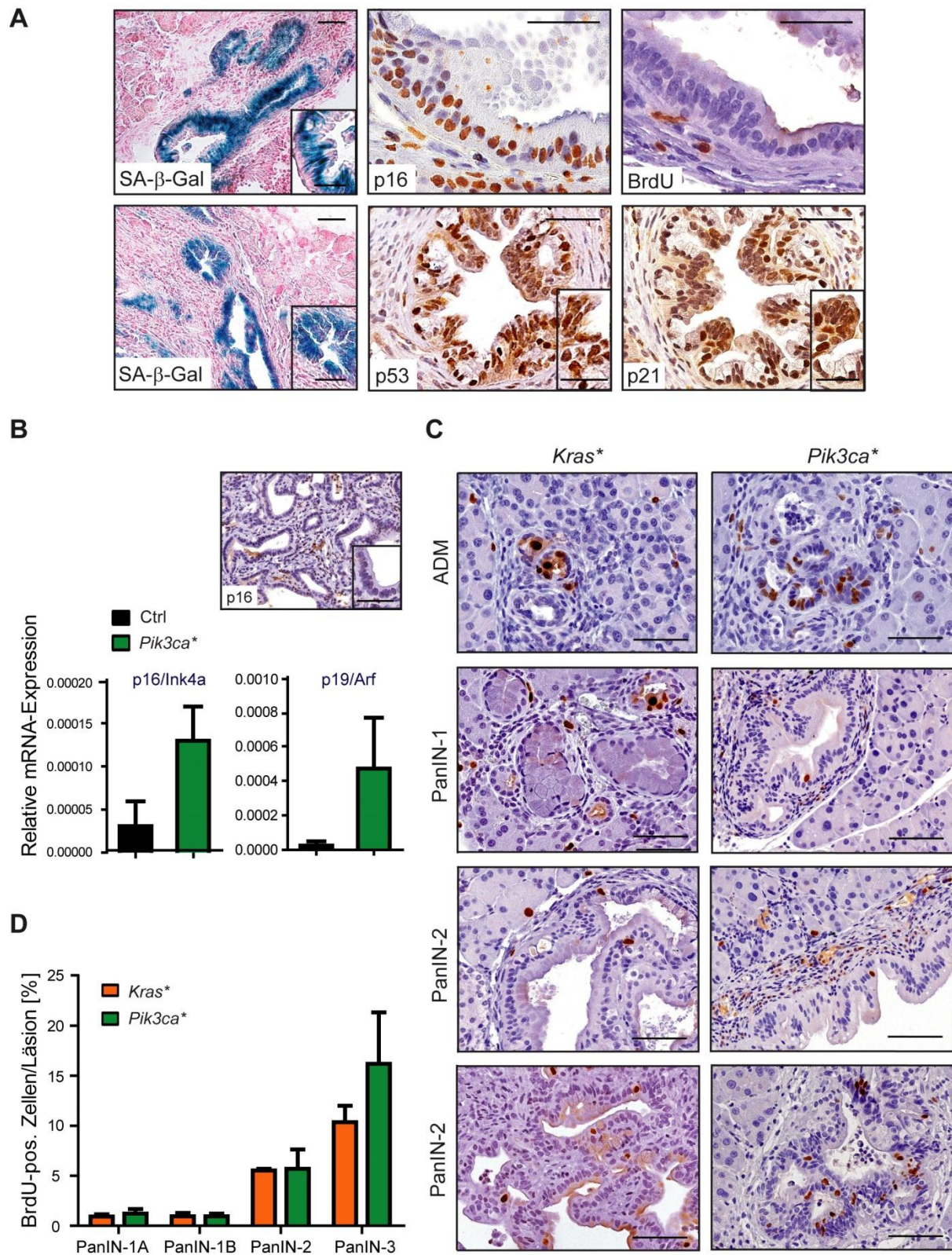
Die Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) ist eine Reaktion auf zellulären Stress und bewirkt einen dauerhaften Zellzyklusarrest, um die Tumorentstehung zu verhindern (Collado & Serrano, 2010). Die OIS wirkt damit der Proliferation der Tumorzellen entgegen.

Senescente Zellen verharren in der G1-Phase des Zellzyklus und zeigen als typische Morphologie ein flaches und langgezogenes Erscheinungsbild (Serrano *et al.*, 1997). In dieser Studie wurde Pankreasgewebe mit dem Seneszenz-Biomarker Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) angefärbt und histologisch ausgewertet (Caldwell *et al.*, 2012). Besonders niedriggradige PanIN-Läsionen (PanIN-1A und -1B) waren SA- $\beta$ -Gal-positiv (►Abbildung 4-6A) entsprechend den für *Kras*\*-Mäuse beschriebenen Ergebnissen (Serrano *et al.*, 1997; Morton *et al.*, 2010).

Bei onkogenem Stress werden die Tumorsuppressoren p16<sup>INK4A</sup>, p19<sup>ARF</sup>, TP53 und p21 hochreguliert (Serrano *et al.*, 1997; Rufini *et al.*, 2013), denen die Induktion der OIS zugeschrieben wird (Collado & Serrano, 2010). Die Immunhistochemie mit p16-, p21- und p53-Antikörpern ergab ebenfalls ein positives Signal sowohl in ADMs als auch in niedriggradigen PanINs von 6 Monate alten Mäusen als Zeichen der Aktivierung von seneszenten Mechanismen (►Abbildung 4-6A). Quantitativ wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saur die Hochregulation der *CDKN2A*-Genprodukte p16<sup>INK4A</sup> und p19<sup>ARF</sup> für *Pik3ca*\*-Mäuse im Alter von 4 Wochen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time(RT)-PCR gezeigt (►Abbildung 4-6B, Eser *et al.*, 2013).

Für eine onkogene Transformation der Zelle ist die Umgehung der Seneszenz notwendig. Im *Kras*\*-Mausmodell geschieht dies durch sukzessive Deletion von Tumorsuppressoren (Serrano *et al.*, 1997; Collado & Serrano, 2010).

Da nur Zellen proliferieren können, die die Seneszenz umgangen haben, wurden die pankreatischen Läsionen auf Proliferation untersucht. Die (Hyper-)Proliferation von Zellen ist eines der Hauptkennzeichen von Tumoren (Hanahan *et al.*, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011) und wird beispielsweise durch KRAS- oder PI3K-Mutation ausgelöst (Serrano *et al.*, 1997; Bardeesy & Sharpless, 2006). Unzureichend geklärt ist, in welchen Phasen der Karzinogenese die Zellen stark proliferieren. Um zu untersuchen, in welchen PanIN-Graden dies in den *Pik3ca*\*-Mäusen der Fall ist, wurde der Proliferationsmarker Bromdesoxyuridin (BrdU) eingesetzt, der bei Zellteilung in die DNA eingebaut wird und immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. In der vorliegenden Studie wurden die Pankreata von 1-, 3-, 6- und 9-Monate-alten Mäusen (n = 3 je Zeitpunkt und Genotyp) analysiert. BrdU-positive Zellen waren in ADMs und PanINs aller Gradierungen nachzuweisen (►Abbildung 4-6C).



**Abbildung 4-6:** In *Pik3ca*\*-Mäusen wird ein Seneszenzprogramm aktiviert, das durch *CDKN2A*-Verlust umgangen wird (Detailbeschreibung nächste Seite).

Die Proliferationsrate wurde berechnet als Proliferationsindex, also als Quotient aus Anzahl der BrdU-positiven-Zellkerne und Gesamtanzahl der Zellkerne (BrdU+-Zellkerne/Gesamtanzahl Zellkerne). Dieser wurde für jeden Läsionsgrad separat bestimmt. In den PanIN-1A und -1B war dieser in etwa gleichbleibend auf niedrigem Niveau, stieg dann aber in den PanIN-2- und -3-Läsionen sprunghaft an. Analog verhielt es sich in den *Kras*\*-Mäusen (► Abbildung 4-6D).

---

**Abbildung 4-6: In *Pik3ca*\*-Mäusen wird ein Seneszenzprogramm aktiviert, das durch *CDKN2A*-Verlust umgangen wird.**

A) Serielle Färbung von Seneszenz-assoziiierter- $\beta$ -Galaktosidase(SA- $\beta$ -Gal)-Expression und p16, BrdU, Trp53 und p21 Immunhistochemie von PanINs von 6-Monate-alten *Pik3ca*\*-Mäusen. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m für mikroskopische Fotos, 20  $\mu$ m für die Einsätze.

B) qRT-PCR-Analyse der p16<sup>INK4A</sup>- und p19<sup>Arf</sup>-mRNA-Expression in Pankreata von 4 Wochen alten Kontrollmäusen und *Pik3ca*\*-Mäusen (Grafik links und rechts). Repräsentative Immunhistochemie von p16<sup>INK4A</sup>-Expression im PDAC von *Pik3ca*\*-Mäusen (Fotografie). Versuchsdurchführung: Stefan Eser, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar der TU München.

C) Repräsentative mikroskopische Bilder von BrdU-gefärbten ADMs und progressiver PanINs von *Kras*\*- (linke Reihe) versus *Pik3ca*\*- (rechte Reihe) Mäusen (Alter von oben nach unten: 1 Monat, 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate). Maßstabsbalken 50  $\mu$ m.

D) Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen in den angegebenen PanIN-Läsionen von *Pik3ca*\*- und *Kras*\*-Mäusen. (Ausgezählt wurden Pankreasschnitte von je 3 Mäusen pro Zeitpunkt, je Maus 3 repräsentative Schnitte.) Mittelwerte  $\pm$  SEM.

(A–D: vorab veröffentlicht in Eser *et al.*, Cancer Cell 2013 18;23:406–20).

## 5 Diskussion

Die Überlebenschancen für Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas sind heutzutage noch immer sehr gering. Trotz intensivster Forschung existiert derzeit weder ein geeigneter Tumormarker für die PDAC-Frühdagnostik, noch gibt es Therapiemöglichkeiten, die den schwerwiegenden Verlauf dieser Krebserkrankung dauerhaft aufhalten könnten (Hezel *et al.*, 2006; Hezel & Bardeesy, 2008). Während die gesamte krebsbedingte Sterblichkeit zwischen 1991 und 2009 um etwa 20% zurückging und auch die Letalität für die am häufigsten vorkommenden Krebsarten wie Lungen-, Mamma-, Prostata- und kolorektales Karzinom durch neu etablierte therapeutische und diagnostische Maßnahmen immer weiter sinkt, hat sich für Patienten mit Pankreaskarzinom die Prognose in den vergangenen Jahrzehnten kaum verbessert (Hidalgo, 2010; Siegel *et al.*, 2013).

Um Fortschritte bei der Diagnostik und Therapie von PDAC zu erzielen, ist es notwendig, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die der Entstehung und Progression dieses lebensbedrohlichen Tumors zugrunde liegen. Eine geeignete Methode zur Untersuchung dieser Mechanismen ist der Einsatz von Mausmodellen, durch die auch das pankreatische Adenokarzinom rekapituliert werden kann (Ijichi, 2011; Herreros-Villanueva *et al.*, 2012). Durch diese können genetische Ereignisse wie Mutationen, die während der Tumorentstehung spontan auftreten, gezielt hervorgerufen werden und ihre onkogenen Effekte auf Zellen und Gewebe analysiert werden (Hruban *et al.*, 2000, 2006a).

In etwa einem Drittel aller Tumorentitäten und in nahezu 100% der fortgeschrittenen PDACs ist *KRAS* mutiert und dadurch konstitutiv aktiv (Castellano & Downward, 2011). Da die *KRAS*-Mutation PDAC-Initiation bewirken kann und damit eine Schlüsselrolle in der Tumorentstehung einnimmt, besteht ein Ziel der Forschung darin, adäquate *KRAS*-Inhibitoren zu entwickeln (Morris *et al.*, 2010; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). Jedoch konnte bis heute noch kein Therapeutikum gefunden werden, das mutiertes *KRAS* erfolgreich inhibiert und klinisch einsetzbar ist. *KRAS*-Inhibitoren wie Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs) oder niedermolekulare *KRAS*-Inhibitoren zeigten zwar Erfolge in präklinischen Versuchen, diese konnten allerdings in klinischen Studien nicht rekapituliert werden (Lebowitz *et al.*, 1995; Lerner *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2013).

Aus diesem Grund zielt die Forschung auf die Entwicklung von Therapiemodellen ab, welche die onkogene Wirkung von *KRAS* indirekt hemmen sollen. Da *KRAS* seine Effekte über die Aktivierung verschiedener Effektor-Signalwege wie den MEK-ERK-, den PI3K-AKT- oder den RAL-GEF-Signalweg mit vielfältigen Funktionen in Zellwachstum, Zellüberleben, Proliferation und Apoptose vermittelt, ist es nötig, den oder die Knotenpunkte der *KRAS*-Effektor-Signalwege zu ermitteln, die für die PDAC-Karzinogenese essenziell sind (Castellano &

Downward, 2011; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011).

In 60% aller PDACs ist der PI3K-Signalweg konstitutiv aktiviert (Schlieman *et al.*, 2003). Auch in anderen Tumorarten wie Brust-, Endometrium-, Nieren-, Blasen-, Kolonkrebs und Gehirn-, Leber- Magen- und Ovarialtumoren wurde eine Dysregulation des PI3K-Signalwegs beschrieben (Zhao & Vogt, 2008; Castellano & Downward, 2011; Adams *et al.*, 2011; Leystra *et al.*, 2012; Vogt *et al.*, 2012; Rosty *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013; Yothaisong *et al.*, 2013). Häufige Veränderungen sind aktivierende Mutationen im *PIK3CA*-Gen, das für PI3K-p110 $\alpha$  kodiert, aber auch Verluste des Tumorsuppressors und PI3K-Antagonisten *PTEN* oder Amplifikationen von *PIK3CA* können den PI3K-Signalweg konstitutiv aktivieren.

Um die molekulare Rolle von PI3K in Entstehung und Progression des duktales Pankreaskarzinoms zu untersuchen, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saur (Klinikum rechts der Isar, TU München) eine Mauslinie generiert, die im Pankreas onkogenes PI3K\* exprimiert. Verglichen wurde diese mit dem bereits etablierten *Kras\**-abhängigen Mausmodell, das das vollständige Spektrum der humanen pankreatischen Karzinogenese rekapituliert (Hingorani *et al.*, 2003).

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie demonstrieren, dass das *Pik3ca\**-Mausmodell das etablierte *Kras\**-Mausmodell in weiten Teilen rekapituliert. Insbesondere die PanIN- und PDAC-Progression, die Überlebensdauer der Mäuse, die Aktivierung des PI3K- und des MAPK-Signalwegs sowie ihre Inhibition, die Seneszenz und ihre Blockade weisen in *Pik3ca\**- und im *Kras\**-Mausmodell starke Parallelen auf.

## **5.1 Das *Pik3ca\**-Mausmodell rekapituliert das *Kras\**-Mausmodell**

### **5.1.1 *Pik3ca\**-Mäuse entwickeln analog zu *Kras\**-Mäusen PanINs und metastasierenden PDAC**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die transgene Expression von PI3K\* im Pankreas zur Bildung von präneoplastischen Läsionen wie ADMs und PanINs führt, deren Aussehen und Struktur den humanen PanINs stark ähneln. Darüber hinaus entspricht ihr zeitliches Auftreten und die Progression zu höhergradigen PanIN-Läsionen dem Muster des *Kras\**-abhängigen Mausmodells. Die PanINs gehen in beiden Mauslinien in invasiven metastasierenden PDAC über. Die Tumorerkrankung führte zu einer stark reduzierten Überlebensdauer im Vergleich zu Kontrollmäusen ohne Onkogenexpression, wobei die Überlebensdauer der *Pik3ca\**- und der *Kras\**-Mäuse keinen signifikanten Unterschied aufweist. Ebenso ist die Metastasierungsrate in Lunge und Leber nahezu identisch. Diese Ähnlichkeiten deuten darauf hin, dass die *Kras\**- und die PI3K\*-vermittelten Effekte im Pankreaskarzinom in ursächlichem Zusammenhang stehen.

Überraschenderweise konnte von Dr. Collisson und Kollegen in einem transgenen Mausmodell, in dem die PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R</sup>-Expression im Pankreas in der Pdx1-Linie (*Pdx1-CreER<sup>TM</sup>*-Mauslinie) induziert wurde, 6 Monate nach Cre-Induktion durch Tamoxifen keine PanIN-Entwicklung oder sonstige Anomalien des Pankreas festgestellt werden (Collisson *et al.*, 2012). Ein möglicher Grund dafür könnte die Verwendung einer anderen Cre-Rekombinase und damit die Expression in teilweise unterschiedlichen Zielzellen sein. Weitere Möglichkeiten sind, dass die abweichenden Ergebnisse auf die unterschiedlichen Mutationsstellen, eine unterschiedliche Anzahl an *Pik3ca*\*-Kopien oder auf unterschiedlich hohe Expressionsstärke und damit Signalwirkung von p110 $\alpha$  in den beiden Modellen zurückzuführen sind (Eser *et al.*, 2013).

### **5.1.2 Der PI3K- und der MAPK-Signalweg sind in PanINs und PDAC der *Pik3ca*\*-Mäuse unabhängig von *Kras* aktiviert**

Die Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs ist ein klassisches Kennzeichen des humanen PDAC (Reichert *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2011; Ying *et al.*, 2011). Bereits hinreichend belegt ist, dass aktiviertes KRAS neben weiteren Signalwegen den PI3K-Signalweg aktivieren kann (Morris *et al.*, 2010; Castellano & Downward, 2011). In der vorliegenden Studie wurde in Pankreasgewebe, in PDAC und in PDAC-Zellen, die aus *Kras*\*-Mäusen gewonnen wurden, mittels Ras-Aktivitätsassay aktiviertes Ras (Ras-GTP) nachgewiesen. Ebenfalls per Immunoblot wurde in *Kras*\*-Mäusen die Aktivierung des PI3K-Signalwegs in isolierten PDAC-Zellen durch die Phosphorylierung der PI3K-Effektoren AKT an der Position T308 und S473 und GSK3 $\beta$  an S9 gezeigt. Auch in den PanINs wurden die genannten Effektoren phosphoryliert, was mittels Immunhistochemie nachgewiesen wurde. Daher ist davon auszugehen, dass, wie bereits in anderen Studien gezeigt, die Aktivierung des PI3K-Signalwegs in den *Kras*\*-Mäusen durch die Expression des onkogenen *Kras*\* vermittelt wird (Castellano & Downward, 2011).

In den *Pik3ca*\*-Mäusen wurde der PI3K-Signalweg ebenfalls in PanINs und PDAC aktiviert, was ebenfalls durch die oben genannten Versuche gezeigt wurde. Wie bereits beschrieben, kann der PI3K-Signalweg durch aktivierende Mutationen wie die H1047R-Mutation in der Kinasedomäne des *PIK3CA*-Gens, aktiviert werden (Vogt *et al.*, 2012). Es muss jedoch ausgeschlossen werden, dass die PI3K-Aktivierung durch eine Feedback-Aktivierung von *Kras* zustande kommt. In den *Pik3ca*\*-Mäusen wurde weder im Pankreas- und PDAC-Gewebe, noch in PDAC-Zellen Ras-Aktivierung (RAS-GTP) nachgewiesen. Folglich werden die PanINs und PDACs in den *Pik3ca*\*-Mäusen nicht durch eine Kreuzaktivierung von *Kras*, sondern durch die Stimulation des PI3K Signalwegs vermittelt.

Da der MAPK-Signalweg ebenfalls ein wichtiger KRAS-Effektor-Signalweg ist, war eine

Aktivierung des MAPK-Signalwegs in den Pankreata von *Kras*\*-mutierten Mäusen zu erwarten (Rhim & Stanger, 2010; Morris *et al.*, 2010; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). Die Aktivierung der MAPK-Effektoren MEK1/2 und ERK1/2 wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls anhand von Phosphorylierungssignalen untersucht. Dies wurde in PanIN-Läsionen immunhistologisch, in PDAC und PDAC-Zelllinien durch Immunoblotanalyse untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der MAPK-Signalweg in *Kras*\*-Mäusen aktiviert ist.

Interessanterweise wurden auch MEK1/2 und ERK1/2 in PanINs und PDAC der *Pik3ca*\*-Mäuse phosphoryliert und aktiviert. Da für diese Mäuse eine Feedback-Aktivierung von *Kras* durch das onkogene PI3K\* bereits ausgeschlossen wurde, muss die Aktivierung des MAPK-Signalwegs in den *Pik3ca*\*-Mäusen ebenfalls unabhängig von aktivem *Kras* erfolgen.

Folglich wird der MAPK-Signalweg im *Pik3ca*\*-Mausmodell durch eine bisher unbekannte Interaktion des PI3K- mit dem MAPK-Signalweg aktiviert. Der genaue molekulare Mechanismus dieser Interaktion konnte in der vorliegenden Arbeit nicht entschlüsselt werden und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. In der Literatur sind Wechselwirkungen zwischen PI3K- und MAPK-Signalweg-Effektoren beschrieben (Mendoza *et al.*, 2011). Eine Möglichkeit ist die Aktivierung des MAPK-Signalwegs über Rezeptortyrosinkinasen (RTK; Ebi *et al.*, 2011; Navas *et al.*, 2012; Ardito *et al.*, 2012; Perera & Bardeesy, 2012b).

Allerdings kommt es hierbei zur Aktivierung von Ras, sodass diese Befunde unsere Beobachtung einer Ras-unabhängigen MEK- und ERK-Aktivierung durch den PI3K-Signalweg nicht erklären können. Die Inhibitionsversuche der vorliegenden Studie zeigen, dass die pharmakologische Hemmung von PI3K und AKT die Phosphorylierung von ERK1/2 und damit die Aktivierung des MAPK-Signalwegs nicht hemmt. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Aktivierung des MAPK-Signalwegs unmittelbar durch onkogenes p110 $\alpha$  erfolgt, dass diese Aktivierung aber durch konventionelle PI3K-Inhibitoren nicht gehemmt werden kann.

Im Gegensatz zu dem *Pik3ca*\*-Mausmodell wurde in einem Kolonkarzinom-Mausmodell trotz der Aktivierung des PI3K-Signalwegs der MAPK-Signalweg nicht aktiviert (Leystra *et al.*, 2012). Dieses spricht für eine starke Gewebs- und Kontextspezifität des PI3K-Signalwegs hinsichtlich seiner Aktivierung von verschiedenen Effektoren. Das Zusammenspiel („*crosstalk*“) von Tumoren und Tumormikromilieu ist beispielsweise ein wichtiger Faktor, der je nach Gewebe unterschiedlich ist und die Signalwirkung und damit die Tumorprogression stark beeinflussen kann (Korc, 2007).

### 5.1.3 PI3K ist essenziell für die Kras-abhängige PDAC-Entstehung

Zur Analyse, ob PI3K essenziell ist für die Karzinogenese der *Kras*\*-abhängigen PDAC, wurde in das *Kras*\*-Mausmodell zusätzlich ein *Pdk1*-Knockout eingekreuzt und analysiert (Eser *et al.*, 2013). PDK1 ist ein bedeutender Knotenpunkt im PI3K-Signalweg (Alessi *et al.*, 1997; Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). In Mäusen mit pankreasspezifischer *Pdk1*-Deletion wurde die neoplastische Transformation komplett blockiert. Diese Mäuse zeigten weder eine Tumorentwicklung noch Veränderungen in der Überlebensdauer im Vergleich zu Kontrollmäusen ohne Onkogenexpression (Eser *et al.*, 2013). Demzufolge scheint PDK1 ein essenzieller Knotenpunkt für die *Kras*-vermittelte PDAC-Entstehung zu sein.

Auch in einem Mausmodell des KRAS-abhängigen Adenokarzinoms der Lunge wurde die PI3K-Aktivität als essenziell für die Tumorgenese gezeigt (Gupta *et al.*, 2007). Hier wurde die Bindung von *Kras* an PI3K durch eine in den *Pik3ca*-Genlocus eingebrachte Punktmutation in allen Körperzellen unterbunden. Durch diese Mutation wurde Threonin 208 mit Aspartat sowie Lysin 227 mit Alanin getauscht. Dieses führte zu einer nahezu kompletten Blockade der *Kras*-induzierten Entwicklung von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC; Gupta *et al.*, 2007). Allerdings scheint der PI3K-Signalweg in diesem Modell vorwiegend im Tumormikromilieu wichtig zu sein. Therapieveruche mit dem PI3K/AKT-Inhibitor NVP-BEZ235 konnten keinen signifikanten Tumorrückgang von *Kras*\*-vermittelten NSCLCs *in vivo* bewirken (Engelman *et al.*, 2008). Auch der Tumorzell-autonome Knockout von *Pdk1* im NSCLC-Modell konnte die Tumorentstehung nicht hemmen (Eser *et al.*, 2013). Essenziell ist hier stattdessen der Ras-Effektor *Craf* (Blasco *et al.*, 2011; Karreth, 2012). Die Deletion von *Craf* im *Kras*\*-Mausmodell des PDAC hatte dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Tumorentwicklung, Progression oder Überlebensdauer (Eser *et al.*, 2013). Diese Daten sprechen dafür, dass der PI3K-Signalweg bei der NSCLC-Bildung keine zellautonome, sondern eher eine Funktion in der Tumor-Mikroumgebung hat. Im PDAC wurde dagegen eine zellautonome Funktion des PI3K-Signalwegs nachgewiesen.

### 5.1.4 Pharmakologische PI3K- und AKT-Inhibitoren stellen eine Therapiemöglichkeit für das PDAC dar

Eine Ursache für das schlechte Ansprechen des PDAC auf Chemotherapeutika ist die Entwicklung von Chemoresistenzen der Tumorzellen gegen die eingesetzten pharmakologischen Inhibitoren (Olive *et al.*, 2010). Nach mehreren Behandlungszyklen mit dem etablierten PDAC-Chemotherapeutikum Gemcitabin beispielsweise spricht das PDAC häufig nicht mehr darauf an. Der PI3K-Signalweg scheint ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Chemoresistenzen zu sein. Studien zeigen, dass PI3K-Inhibitoren eine Blockade der Chemoresistenz unterstützen können.



Eine Vielzahl von pharmakologischen Inhibitoren, die den PI3K-Signalweg hemmen, ist aktuell für klinische Studien erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden an murinen Tumorzellen der *Pik3ca*\*- und der *Kras*\*-Mäuse ein PI3K-, ein AKT- und ein MEK-Inhibitor eingesetzt und deren Effekte analysiert.

Einer dieser Inhibitoren ist der duale PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ 235. In der vorliegenden Arbeit konnte die AKT-Phosphorylierung an S473 sowohl in *Pik3ca*\*- als auch in *Kras*\*-Tumorzellen dosisabhängig vollständig gehemmt werden, wobei in den *Pik3ca*\*-Zellen eine höhere BEZ-Konzentration nötig war, um das Phosphorylierungssignal zu blockieren. Passend dazu konnten Engelman und Kollegen in einem *Kras*\*-induzierten Lungentumor-Mausmodell zeigen, dass durch NVP-BEZ235 die Phosphorylierung von AKT an T308 und S473 gehemmt wurde (Engelman *et al.*, 2008).

Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit NVP-BEZ 235 die Phosphorylierung von ERK in *Kras*\* und in *Pik3ca*\*-Mäusen nicht inhibieren. Dass die Inhibition sowohl des PI3K- als auch des MAPK-Signalwegs nötig ist, um beispielsweise Adenokarzinome der Lunge erfolgreich zu therapieren, wurde bereits gezeigt (Engelman *et al.*, 2008). Für PDAC dagegen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Inhibition von PI3K durch GDC9041 in *Kras*\*-vermittelten murinen Pankreastumoren *in vivo* die Tumorprogression von PDAC effektiv blockiert (Eser *et al.*, 2013).

Die Phosphorylierung von ERK konnte in der vorliegenden Studie durch den MEK-Inhibitor PD-325901 blockiert werden, der bereits in einer *in-vivo*-Studie eingesetzt wurde. Collisson und Kollegen zeigten durch immunhistochemischen Nachweis, dass in *Ptf1<sup>Cre+</sup>;LSL-Kras<sup>G12D</sup>;LSL-Trp53<sup>R270H</sup>*-Mäusen mit PDAC, welche zweimal täglich mit PD-325901 behandelt wurden, die Phosphorylierung von ERK in PDAC stark zurückging (Collisson *et al.*, 2012). PDAC ist aufgrund seiner schlechten Vaskularisation schwer zugänglich für pharmakologische Agenzien (Olive *et al.*, 2010; Provenzano *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass PD-325901 im PDAC-Tumorgewebe in pharmakologisch verträglichen Dosen bioverfügbar ist und damit ein potenzielles PDAC-Therapeutikum darstellt (Collisson *et al.*, 2012).

### **5.1.5 Expression von onkogenem *Pik3ca*\* aktiviert ein Seneszenzprogramm, das durch *CDKN2A*-Verluste umgangen wird**

Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) kann in prämaligen Läsionen des Pankreas sowie anderen Organen nachgewiesen werden. OIS ist eine Reaktion auf onkogenen Zellstress wie z.B. übermäßig erhöhte Signalwirkung durch Onkogene wie RAS, MYC oder RAF und wirkt tumorfördernden Mechanismen wie z.B. Proliferation entgegen (Serrano *et al.*, 1997; Collado & Serrano, 2010). Senescente Zellen proliferieren nicht weiter, bleiben aber

überlebensfähig. Durch Deletion von Tumorsuppressoren wie p16<sup>Ink4A</sup> und p19<sup>ARF</sup> kann der Zustand der Seneszenz umgangen werden (Bardeesy & Sharpless, 2006; Hanahan & Weinberg, 2011).

In der vorliegenden Studie wurde in 4 Wochen alten *Pik3ca*\*-Mäusen quantitativ eine Hochregulation von OIS-assoziierten Tumorsuppressoren gezeigt. Außerdem wurde in diesen Tieren in niedriggradigen PanINs mittels Seneszenzmarker SA-β-Gal und immunhistochemisch eine Aktivierung der Seneszenz gezeigt (Caldwell *et al.*, 2012). Folglich ist in *Pik3ca*\*-Mäusen ein Seneszenz-Mechanismus aktiv, der auch bereits für *Kras*\*-Mäuse beschrieben wurde (Serrano *et al.*, 1997).

Die Umgehung der Seneszenz und die daraus resultierende Hyperproliferation sind ein Kennzeichen von Krebserkrankungen (Hanahan & Weinberg, 2011). Proliferative Effekte durch die Aktivierung von KRAS wurden bereits umfangreich in Publikationen dargelegt (Jackson *et al.*, 2001; Tuveson *et al.*, 2004). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ist die Proliferationsrate in den niedriggradigen PanINs der *Pik3ca*\*- wie auch in den *Kras*\*-Tieren gering, in hochgradigen PanINs dagegen stark erhöht. Folglich scheint die für das etablierte *Kras*\*-abhängige PDAC-Mausmodell beschriebene Umgehung der Seneszenz auch in den *Pik3ca*\*-Tieren zu erfolgen. Konform dazu zeigten Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saur, dass in PDAC keine Expression der Tumorsuppressoren p16<sup>Ink4A</sup> und p19<sup>ARF</sup> vorhanden ist und auch Analysen mittels komparativer genomischer Hybridisierung zeigten häufig eine Deletion des *CDKN2A*-Genlokus in PI3K\*-induzierten PDACs (Eser *et al.*, 2013).

## 5.2 Fazit

Die Parallelen zwischen dem *Kras*\*- und dem *Pik3ca*\*-Mausmodell, insbesondere die Ähnlichkeiten in der Entwicklung von PanINs und metastasierendem PDAC, die *Kras*-unabhängige Aktivierung des PI3K-Signalwegs und Mechanismen wie Seneszenz und Hyperproliferation, aber auch ähnliche Ergebnisse in Inhibitionsversuchen lassen den Schluss zu, dass onkogenes KRAS bei der Tumorentstehung und Tumoraufrechterhaltung des PDAC über PI3K agiert. Obwohl KRAS zahlreiche Signalwege aktiviert, genügt in dem *Pik3ca*\*-Mausmodell dieser Studie die alleinige Aktivierung des PI3K-Signalwegs, um PDAC hervorzurufen (Eser *et al.*, 2013).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten zeigen, dass *Kras*-Effektoren stark gewebs- und kontextspezifisch sind. Hierbei spielt vermutlich das Zusammenspiel von Tumoren und Tumormikromilieu eine wichtige Rolle, die je nach Gewebe unterschiedlich ist und die Signalwirkung und damit die Tumorentstehung stark beeinflussen kann.

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die KRAS-vermittelte Karzinogenese in unterschiedlichen Tumorarten (Gewebearten) über unterschiedliche Mechanismen erfolgt.

---

Dies würde auch die unterschiedlichen Effekte von KRAS-gerichteten Therapien in verschiedenen Tumoren erklären (Singh *et al.*, 2010).

### 5.3 Ausblick

Collisson *et al.* gelang es, murine PanINs durch onkogenes  $\text{Braf}^{\text{V600E}}$ , also über den Raf-MEK-ERK-Signalweg zu induzieren und nicht wie in unserer Studie über den PI3K-AKT-Signalweg (Collisson *et al.*, 2012). Ob dies nun bedeutet, dass PanINs über unterschiedliche KRAS-Effektor-Signalwege hervorgerufen werden können oder durch die Interaktion („*crosstalks*“) dieser beiden Signalwege, gilt es in Zukunft zu untersuchen. Eine Möglichkeit hierfür wäre ein Mausmodell, das den MAPK-Signalweg unterhalb von Raf konstitutiv aktiviert. Die essenziellen Knotenpunkte in den Signalwegen herauszufinden ist die Grundlage, um klinisch einsetzbare Therapeutika zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit sowie die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen die Bedeutung des PI3K-PDK-AKT-Signalwegs als einen solchen essenziellen Knotenpunkt des Pankreaskarzinoms. Die Ergebnisse sind bereits vielversprechend und es besteht die berechtigte Hoffnung, die Prognose von Patienten mit dieser bösartigen Krebserkrankung durch zielgerichtete Therapien in Zukunft verbessern zu können.

## 6 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich die Prognose für Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) kaum verbessert. Mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 6–12 Monaten ist das Pankreaskarzinom heutzutage immer noch eine der am bösartigsten verlaufenden Krebserkrankungen. Das liegt v.a. daran, dass dieser Tumor i.d.R. erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird und daher in der Mehrzahl der Fälle nicht mehr operabel ist. Des Weiteren spricht er schlecht auf therapeutische Maßnahmen wie Chemo- oder Radiotherapie an.

Das *KRAS*-Gen ist in fast 100% der PDACs mutiert, aktuell gibt es aber trotz vielversprechender Forschungsergebnisse noch keinen klinisch einsetzbaren *KRAS*-Inhibitor. Daher werden aktuell in zahlreichen Studien Inhibitoren der *KRAS*-Effektor-Signalwege getestet. Der PI3K-PDK-AKT-Signalweg ist ein solcher *KRAS*-Effektor-Signalweg und in der Mehrzahl aller PDACs aktiviert. In dieser Studie wurde die Rolle des PI3K-Signalwegs in der Kanzerogenese des *Kras*-abhängigen PDAC untersucht.

Dies erfolgte anhand einer *Ptf1<sup>Cre/+</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>*-Knockin-Mauslinie, welche onkogenes PI3K (PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R/+</sup>) im Pankreas exprimiert und damit den PI3K-Signalweg konstitutiv aktiviert. Die Tiere entwickeln innerhalb weniger Monate pankreatische intraepitheliale Läsionen (PanINs), die nach über einem Jahr in Pankreaskarzinome mit Metastasierung in Lymphknoten, Leber und Lunge übergehen.

Hinsichtlich PanIN- und PDAC-Progression, Metastasierung, PI3K-Aktivierung und Mechanismen wie Seneszenz und Hyperproliferation weist dieses Mausmodell starke Parallelen zu dem etablierten *Ptf1<sup>Cre/+</sup>;LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>*-Mausmodell auf. Das lässt vermuten, dass PI3K eine bedeutende Rolle in der *Kras*-induzierten PDAC-Entstehung einnimmt.

In der vorliegenden Arbeit konnte im *Pik3ca*\*-Mausmodell die Aktivierung des MAPK-Signalwegs nachgewiesen werden. Möglicherweise interagieren also der PI3K- und der MAPK-Signalweg in der Karzinogenese.

Die Analyse der molekularen Mechanismen, welche onkogene Prozesse wie die Initiation, Progression, Aufrechterhaltung, Metastasierung oder Invasion des PDAC kontrollieren, erlaubt es, Zielstrukturen für die Prävention, Intervention und Therapie des PDAC zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde der PI3K-Signalweg als eine solche Zielstruktur identifiziert und *in vitro* validiert.

## 7 Summary

With a median survival of 6–12 months after diagnosis, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the malignancies with the worst prognosis. In the last decades there has been no major breakthrough in treatment of PDAC. This is due to the fact that PDAC is usually diagnosed in later stages of the disease and, in most of the cases, resection of the tumor is not achievable anymore. Moreover, therapies like chemotherapy and radiotherapy are normally not successful.

*KRAS* is mutated in almost 100% of the PDACs. Up to now, no efficient and clinically applicable *KRAS* inhibitor has been found or developed. To overcome this problem, inhibitors of the *KRAS*-effector signaling pathways are tested. One of these pathways is the PI3K-PDK-AKT signaling pathway, which is activated in most of the PDACs. Therefore, the role of PI3K in the carcinogenesis of *Kras*-dependent PDACs was analyzed in this study.

The PI3K signaling pathway is an important contributor to many cancers and is activated in the majority of the PDACs. We used a *Ptf1<sup>Cre/+</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>* knock-in mouse line which expresses oncogenic PI3K (PI3K-p110 $\alpha$ <sup>H1047R/+</sup>). Activation of the PI3K signaling pathway leads to development of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and PDAC, which metastasizes into organs like lymph nodes, liver, and lung.

This mouse model showed close resemblance to the well-established *Ptf1<sup>Cre/+</sup>;LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>* mouse model concerning development of PanINs and PDACs, metastasis, PI3K activation, and mechanisms like senescence and hyperproliferation. Hence, PI3K seems to play an important role in initiation, progression and metastasis of PDAC.

In this study the activation of the MAPK signaling pathway in *Pik3ca*\* mice was verified. The results argue for a crosstalk between the PI3K and the MAPK signaling pathways in carcinogenesis of PDAC.

Deeper insight into molecular mechanisms of processes like tumor initiation, progression, maintenance, metastasis or invasion will reveal therapeutic target proteins and lead to the breakthrough discovery of efficient and successful PDAC treatment strategies. In the current study the PI3K signaling pathway was identified as such an essential node and validated *in vitro*.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adams JR, Xu K, Liu JC *et al.*, 2011. Cooperation between Pik3ca and p53 mutations in mouse mammary tumor formation. *Cancer Research* **71**, 2706–17.
- Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC *et al.*, 2007. S3-Guidelines “Exocrine pancreatic cancer”. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **45**, 487–523.
- Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M *et al.*, 2003. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* **17**, 3112–26.
- Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravello P, Liu D, 2013. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *Journal of Hematology & Oncology* **6**, 1–11.
- Alessi DR, James SR, Downes CP *et al.*, 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current Biology* **7**, 261–9.
- Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C *et al.*, 2012. Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt pathway potentiates insulin secretion through upregulation of newcomer granule fusions in pancreatic  $\beta$ -cells. *PloS One* **7**, e47381.
- Ardito CM, Grüner BM, Takeuchi KK *et al.*, 2012. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* **22**, 304–17.
- Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy S a G, 2004. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* **23**, 8571–80.
- Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK, 2005. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer* **5**, 921–9.
- Bader AG, Vogt PK, 2005. Inhibition of Protein Synthesis by Y Box-Binding Protein 1 Blocks Oncogenic Cell Transformation. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 2095–106.
- Baker NM, Der CJ, 2013. Drug for an “undruggable” protein. *Nature* **497**, 577–8.
- Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC *et al.*, 2006. Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 5947–52.
- Bardeesy N, DePinho RA, 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer* **2**, 897–909.
- Bardeesy N, Sharpless NE, 2006. RAS unplugged: negative feedback and oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 451–3.
- Barrett S, Bridges A, Dudley D *et al.*, 2008. The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 6501–4.

- Blasco RB, Francoz S, Santamaría D *et al.*, 2011. C-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* **19**, 652–63.
- Brendan D. Manning, Cantley LC, 2007. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261–74.
- Caldwell, DeNicola, Martins *et al.*, 2012. Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene* **31**, 1599–608.
- Cao P, Maira S-M, García-Echeverría C, Hedley DW, 2009. Activity of a novel, dual PI3-kinase/mTor inhibitor NVP-BEZ235 against primary human pancreatic cancers grown as orthotopic xenografts. *British Journal of Cancer* **100**, 1267–76.
- Carnero A, 2009. Novel inhibitors of the PI3K family. *Expert Opinion Investigational Drugs* **18**, 1265–77.
- Carol H, Morton CL, Gorlick R *et al.*, 2010. Initial Testing (Stage1) of the Akt Inhibitor GSK690693 Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatric Blood Cancer* **55**, 1329–37.
- Castellano E, Downward J, 2011. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer* **2**, 261–74.
- Collado M, Serrano M, 2010. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *National Reviews Cancer* **10**, 51–7.
- Collisson EA, Trejo CL, Silva JM *et al.*, 2012. A central role for RAF/JNK in tumours: evidence from mice and humans. Effector Pathway. *Cancer Discovery* **2**, 685–93.
- Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA, 2010. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 1075–83.
- Ebi H, Corcoran RB, Singh A *et al.*, 2011. Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 4311–21.
- Engelman JA, Chen L, Tan X *et al.*, 2008. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature Medicine* **14**, 1351–6.
- Eser S, Reiff N, Messer M *et al.*, 2013. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell* **23**, 406–20.
- Feldman RI, Wu JM, Polokoff MA *et al.*, 2005. Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 19867–74.
- Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M, 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* **30**, 193–204.
- Fruman D, Meyers R, Cantley L, 1998. Phosphoinositide kinases. *Annual Reviews of Biochemistry* **67**, 481–507.

- Geering B, Cutillas PR, Nock G, Gharbi SI, Vanhaesebroeck B, 2007. Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7809–14.
- Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P *et al.*, 2007. Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* **129**, 957–68.
- Guz Y, Montminy MR, Stein R *et al.*, 1995. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* **121**, 11–8.
- Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G, 2008. Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer* **7**, 1–10.
- Hanahan D, Weinberg RA, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74.
- Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S, 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70.
- Herreros-Villanueva M, Gironella M, Castells A, Bujanda L, 2013. Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clinica Chimica Acta* **418**, 22–9.
- Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L, 2012. Mouse models of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* **18**, 1286–94.
- Hezel AF, Bardeesy N, 2008. Prognostic markers in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Cancer Biology & Therapy* **7**, 1360–1.
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA, 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* **20**, 1218–49.
- Hidalgo M, 2010. Pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* **362**, 1605–17.
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A *et al.*, 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–50.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS *et al.*, 2005. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469–83.
- Hruban RH, Adsay V, Albores-Saavedra J *et al.*, 2001. Pancreatic Intraepithelial Neoplasia – A New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions. *The American Journal of Surgical Pathology* **25**, 579–86.
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J *et al.*, 2006a. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Research* **66**, 95–106.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE, 2000. Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* **6**, 2969–72.
- Hruban RH, Rustgi AK, Brentnall TA, Tempero MA, Wright C V, Tuveson DA, 2006b. Pancreatic cancer in mice and man: the Penn Workshop 2004. *Cancer Research* **66**, 14–7.



- Ijichi H, 2011. Genetically-engineered mouse models for pancreatic cancer: advances and current limitations. *World Journal of Clinical Oncology* **2**, 195–202.
- Jackson EL, Willis N, Mercer K *et al.*, 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & Development* **15**, 3243–8.
- Jaster R, 2004. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Molecular Cancer* **3**.
- Karreth FA, 2012. C-Raf is required for the initiation of lung cancer by K-RasG12D. *UKPMC Funders Group* **1**, 128–36.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield M, 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annual Review of Cell and Development* **17**, 615–75.
- Kennedy AL, Adams PD, Morton JP, 2011. Ras, PI3K/Akt and senescence – Paradoxes provide clues for pancreatic cancer therapy. *Small GTPases* **2**, 264–7.
- Korc M, 2007. Pancreatic cancer-associated stroma production. *The American Journal of Surgery* **194**, S84–6.
- De La O J-P, Emerson LL, Goodman JL *et al.*, 2008. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 18907–12.
- Laemmli U, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- Leach SD, 2004. Mouse models of pancreatic cancer: the fur is finally flying! *Cancer Cell* **5**, 7–11.
- Lebowitz PF, Davide JP, Prendergast GC, 1995. Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6613–22.
- Lerner EC, Zhang TT, Knowles DB, Qian Y, Hamilton a D, Sebti SM, 1997. Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyltransferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines. *Oncogene* **15**, 1283–8.
- Levy DS, Kahana JA, Kumar R, 2009. AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* **113**, 1723–9.
- Leystra AA, Deming DA, Zahm CD *et al.*, 2012. Mice Expressing Activated PI3K Rapidly Develop Advanced Colon Cancer. *Cancer Research* **72**, 2931–6.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ, 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **8**, 627–44.
- Maira S-M, Furet P, Stauffer F, 2009. Discovery of novel anticancer therapeutics targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Future Medicinal Chemistry* **1**, 137–55.

- Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J *et al.*, 2008. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics* **7**, 1851–63.
- Marone R, Erhart D, Mertz AC *et al.*, 2009. Targeting melanoma with dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors. *Molecular Cancer Research* **7**, 601–13.
- Mendoza MC, Er EE, Blenis J, 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 320–8.
- Morris JP, Wang SC, Hebrok M, 2010. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer* **10**, 683–95.
- Morton JP, Timpson P, Karim SA *et al.*, 2010. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 246–51.
- Mukherjee B, Tomimatsu N, Amancherla K, Camacho C V., Pichamoorthy N, Burma S, 2012. The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Is a Potent Inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-Mediated DNA Damage Responses. *Neoplasia* **14**, 34–43.
- Nakhai H, Sel S, Favor J *et al.*, 2007. Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* **134**, 1151–60.
- Navas C, Hernández-Porras I, Schuhmacher AJ, Sibilía M, Guerra C, Barbacid M, 2012. EGF Receptor Signaling is essential for K-Ras Oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**, 318–30.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA *et al.*, 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**, 983–95.
- Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T, 1993. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *The EMBO Journal* **12**, 4251–9.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ *et al.*, 2010. Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* **324**, 1457–61.
- Pearce LR, Komander D, Alessi DR, 2010. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 9–22.
- Perera RM, Bardeesy N, 2012. Ready, set, go: the EGF receptor at the pancreatic cancer starting line. *Cancer Cell* **22**, 281–2.
- Pérez-Mancera PA, Guerra C, Barbacid M, Tuveson DA, 2012. What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology* **142**, 1079–92.
- Pinho A V, Rooman I, Reichert M *et al.*, 2011. Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis. *Gut* **60**, 958–66.

- Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q *et al.*, 2009. V600E-BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 4519–24.
- Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR, 2013. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21**, 418–29.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D, 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* **11**, 761–74.
- Rangarajan A, Weinberg RA, 2003. Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature Reviews Cancer* **3**, 952–9.
- Reichert M, Saur D, Hamacher R, Schmid RM, Schneider G, 2007. Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Research* **67**, 4149–56.
- Reiser-Erkan C, Erkan M, Pan Z *et al.*, 2008. Hypoxia-inducible proto-oncogene Pim-1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biology & Therapy* **7**, 1352–9.
- Rhim AD, Stanger BZ, 2010. Molecular Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression: Aberrant Activation of Developmental Pathways. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **97**, 41–78.
- Rhodes N, Heerding DA, Duckett DR *et al.*, 2008. Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Cancer Research* **68**, 2366–74.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J, 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *The EMBO Journal* **15**, 2442–51.
- Rooman I, Real FX, 2012. Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development? *Gut* **61**, 449–58.
- Rosty C, Young JP, Walsh MD *et al.*, 2013. PIK3CA Activating Mutation in Colorectal Carcinoma: Associations with Molecular Features and Survival. *PloS One* **8**, e65479.
- Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G, 2013. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*, 1–15.
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A *et al.*, 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**, 554.
- Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ, 2003. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *British Journal of Cancer* **89**, 2110–5.
- Schmidt-Kittler O, Zhu J, Yang J *et al.*, 2010. PI3Ka Inhibitors That Inhibit Metastasis. *Oncotarget* **1**, 339–48.
- Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM, 2005. Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects. *Gastroenterology* **128**, 1606–25.

- Seidler B, Schmidt A, Mayr U *et al.*, 2008. A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 10137–42.
- Serra V, Markman B, Scaltriti M *et al.*, 2008. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Research* **68**, 8022–30.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW, 1997. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell* **88**, 593–602.
- Shrikhande S V, Barreto SG, 2012. Surgery for pancreatic carcinoma: state of the art. *The Indian Journal of Surgery* **74**, 79–86.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A, 2013. Cancer Statistics, 2013. *A Cancer Journal for Clinicians* **63**, 11–30.
- Singh M, Lima A, Molina R *et al.*, 2010. Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nature Biotechnology* **28**, 585–93.
- Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL *et al.*, 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* **3**, 192–222.
- Toker A, 2000. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Molecular Pharmacology* **57**, 652–8.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 4350–4.
- Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA *et al.*, 2004. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* **5**, 375–87.
- Vaccaro V, Sperduti I, Milella M, 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* **364**, 1817–25.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR, 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical Journal* **346**, 561–76.
- Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B, 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 329–41.
- Vanhaesebroeck B, Leever S, Panayotou G, Waterfield M, 1997. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 267–72.
- Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P, 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 195–203.

- Vogt PK, Hart JR, Gymnopoulos M *et al.*, 2012. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K): The Oncoprotein. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **1**, 1–23.
- Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L, 1988. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* **332**, 644–6.
- Ying H, Elpek KG, Vinjamoori A *et al.*, 2011. PTEN is a major tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates an NF- $\kappa$ B-cytokine network. *Cancer Discovery* **1**, 158–69.
- Yothaisong S, Dokduang H, Techasen A *et al.*, 2013. Increased activation of PI3K/AKT signaling pathway is associated with cholangiocarcinoma metastasis and PI3K/mTOR inhibition presents a possible therapeutic strategy. *Tumor Biology* **34**, 3637–48.
- Yu C, Mao X, Li WX, 2005. Inhibition of the PI3K pathway sensitizes fludarabine-induced apoptosis in human leukemic cells through an inactivation of MAPK-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**, 391–7.
- Yuan W, Stawiski E, Janakiraman V *et al.*, 2013. Conditional activation of Pik3ca(H1047R) in a knock-in mouse model promotes mammary tumorigenesis and emergence of mutations. *Oncogene* **32**, 318–26.
- Zhao L, Vogt PK, 2008. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* **27**, 5486–96.
- Zhao L, Vogt PK, 2010. Hot-spot mutations in p110 $\alpha$  of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS. *Cell Cycle* **9**, 596–600.
- Zimmermann G, Papke B, Ismail S *et al.*, 2013. Small molecule inhibition of the KRAS–PDE $\delta$  interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* **497**, 638–42.

## 9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Eckhard Wolf vom Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Tierärztlichen Fakultät in München für die Leitung dieser Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Dieter Saur danke ich vielmals für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Dissertation. Ein Dank auch an Stefan Eser für die Betreuung meiner praktischen Tätigkeit.

Ich danke Frau Dr. Mariel Paul für ihre stetige und kritische Auseinandersetzung mit der Arbeit, ihren Beistand bei Fragestellungen aller Art, ihre Weitsicht und ihre unermüdliche Geduld. Danke auch an Anna Kettenberger und meine Mutter für Korrekturen und ihr Engagement.

Ein großes Dankeschön möchte ich allen Mitgliedern der Saur- und Schneider-Arbeitsgruppen aussprechen für die stetige moralische Unterstützung, hilfreiche Anregungen und die großartige und einzigartige Arbeitsatmosphäre. Vanessa Klein, Miriam Schiller und Ursula Götz danke ich besonders für die technische Unterstützung.

Schließlich möchte ich mich von Herzen bei meiner gesamten Familie und bei meinen Freunden, meiner „zweiten Familie“, bedanken. Die tollen Unternehmungen, die lustigen Stunden mit euch und eure vielfachen Ermutigungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. In besonderem Maße möchte ich hier meinen Eltern Dr. Gerhard und Elisabeth Dobler danken. Danke, dass ihr mich auf meinem Weg bedingungslos unterstützt und immer hinter mir steht.