

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Institut für Pathologie

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito



Funktionelle Rolle des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C während der Regeneration des Pankreas

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Johanna Caroline Kulenkampff

im Jahr 2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit
Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

(Institut für Pathologie)

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Nikolas Stoecklein

(Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie)

Zusammenfassung

In meiner Arbeit wurde die funktionelle Rolle von Tenascin C bei der Pankreasregeneration untersucht. Eine fehlende Regeneration nach einer Pankreatitis kann der Ausgangspunkt für die Karzinogenese sein, weshalb insbesondere die chronische Inflammation ein bedeutender Risikofaktor des Pankreaskarzinoms ist.

Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration gilt die ausgeprägte Plastizität der Azinuszellen. Diese verlieren ihren charakteristischen azinären Phänotyp und transdifferenzieren in einen potentiell reversibel duktalem Phänotyp. Charakteristika dieser „azinär-duktalem Metaplasie“ sind unter anderem die Reexpression von Progenitorgenen und eine erhöhte Zellproliferation. So kann das geschädigte Pankreasgewebe ersetzt und die Organintegrität gesichert werden.

Tenascin C ist ein multifunktionelles Molekül der extrazellulären Matrix und wird von aktivierten pankreatischen Stellatumzellen synthetisiert und sezerniert. Im gesunden Pankreas ist die Tenascin C-Expression sehr gering, eine Überexpression ist unter anderem im Rahmen der Pankreasregeneration und der Karzinogenese nachweisbar. Tenascin C aktiviert den Integrin-vermittelten Signalweg, was unter anderem eine Phosphorylierung der Kinasen FAK und Src zur Folge hat. Dies führt zu einer zur Aktivierung weiterer Signalwege wie beispielsweise des PI3K-Akt-Signalwegs und zum anderen beeinflusst Src direkt die Proliferation und Differenzierung der Zellen.

In den Experimenten wurde eine akute Pankreatitis bei Wildtyp-Mäusen durch Injektionen des Cholezystokinin-Analogons Caerulein ausgelöst. In der akuten Phase der Inflammation konnte neben einer erhöhten Expression von Tenascin C auch eine erhöhte Expression von mehreren Integrinrezeptoruntereinheiten sowie von repräsentativ ausgewählten pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgenen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in *in vitro* Experimenten mit Azinuszellsuspensionen gezeigt werden, dass eine veränderte Rezeptorzusammensetzung der Integrine einen Einfluss auf den Differenzierungsgrad der Azinuszellen hat. Die Integrinrezeptoren haben einen inhibierenden Einfluss auf die Expression der Progenitor- und Differenzierungsgene. Mithilfe von 3D-Kollagenkulturen konnte ein inhibierender Effekt des Moleküls Tenascin C auf die Ausbildung von „azinär-duktalem Metaplasien“ sowie eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate nachgewiesen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl das extrazelluläre Matrixmolekül Tenascin C als auch der durch das Matrixmolekül aktivierte Integrin-vermittelte Signalweg progenerative Eigenschaften besitzen.

Abstract

In my thesis, the functional role of tenascin C during pancreas regeneration was investigated. A pancreatitis that has not been regenerated can be the origin of carcinogenesis, which is the reason why, chronic inflammation is a significant risk factor of pancreatic cancer.

The marked plasticity of the acinar cells is considered to be a prerequisite for successful regeneration. Acinar cells lose their characteristic acinar phenotype and transdifferentiate in a potentially reversible manner into a ductal phenotype. Features of this „acinar-to-ductal metaplasia“ are, inter alia, the re-expression of progenitor genes and an increased cell proliferation. In this way, it is possible to replace the damaged pancreas tissue and to secure the organic integrity.

Tenascin C is a multimodal molecule of the extracellular matrix and it is secreted from activated pancreatic stellate cells. In a healthy pancreas, the concentration of tenascin C is very low; an overexpression is present, for example, during pancreas regeneration and carcinogenesis. Tenascin C activates the integrin-mediated pathway with phosphorylation of the FAK and Src kinases. That results, on the one hand, in the activation of further signaling pathways, as for example that of the PI3-Akt signal pathway, and, on the other hand, Src directly influences the proliferation and differentiation of the cells.

In the course of the experiments, acute pancreatitis of wild-type mice was triggered by injections of the cholecystokinin analogue caerulein. In the acute phase of the inflammation, apart from an increased expression of tenascin C, an increased expression of several integrin receptor subunits as well as of representatively selected pancreatic progenitor and differentiation genes was found. Furthermore, in *in vitro* experiments with acinar cell suspensions it could be demonstrated that a changed receptor composition of the integrins has an influence on the differentiation degree of the acinar cells. The integrin receptors have an inhibiting influence on the expression of the progenitor and differentiation genes. On the basis of 3D collagen cultures, an inhibiting effect of the tenascin C molecule on the process of “acinar-to-ductal metaplasia”, as well as a significant increase of the proliferation rate could be proved.

The findings of this work show that the extracellular matrix molecule tenascin C through activation of the integrin signaling pathway might have pro-regenerative role in the pancreas.

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ADM	Azinär-duktales-Metaplasie
AFL	atypische flache Läsion
Akt	Proteinkinase B
α -SMA	glattmuskuläres Aktin α
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CCK	Cholezystokinin
cDNA	komplementäre DNS
CK19	Cytokeratin 19
Ct	cycle threshold
Erk	extrazellulär regulierende Kinase
EvG	Elastica-van-Gieson
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin Eosin
Hes1	hairy and enhancer of split-1 (Hes Familie bHLH Transkriptionsfaktor 1)
H ₂ O	Wasser
Hz	Hertz
IPMN	intraduktal papillär muzinöse Neoplasie
kDa	Kilodalton
MCN	muzinöse zystische Neoplasie
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
n.s.	nicht signifikant
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	pankreatisch duktales Adenokarzinom
Pdx1	Pancreatic-duodenal homebox 1
Ppib	Peptidyl-Prolyl-Isomerase B
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
Rbpjl	Rekombination Signal Bindungsprotein für Immunglobulin kappa J-Region ähnlich
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
Sox9	sex determining region Y-box 9
Std	Stunde
TBS	Tris gepufferte Saline
TBS-T	Tris gepufferte Saline mit Tween
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tgf- α	Transformierender Wachstumsfaktor α
Tnc	Tenascin C
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Pankreas	1
1.1.1 Anatomie und Physiologie.....	1
1.1.2 Embryonalentwicklung.....	2
1.2 Pankreatitis.....	3
1.2.1 Akute Pankreatitis	4
1.2.2 Chronische Pankreatitis	4
1.2.3 Regeneration	5
1.2.4 Azinär-duktales Metaplasie.....	6
1.3 Pankreaskarzinom.....	7
1.4 Stromainteraktionen.....	8
1.4.1 Rolle des Stromas.....	8
1.4.2 Pankreatische Stellatumzellen.....	8
1.4.3 Extrazelluläre Matrix.....	10
1.4.4 Tenascin C	10
1.5 Integrin vermittelter Signalweg.....	12
2 Ziele der Arbeit	14
3 Materialien	15
3.1 Geräte.....	15
3.2 Verbrauchsmaterialien	15
3.3 Chemikalien	16
3.4 Medien	17
3.5 Puffer	18
3.6 primäre Antikörper	18
3.7 sekundäre Antikörper.....	19
3.8 Inhibitoren.....	19
3.9 Proteine	20
3.10 Primer.....	20
3.11 Kits.....	20
3.12 Mäuse.....	21
4 Methoden.....	22
4.1 Caerulein-induzierte akute Pankreatitis	22
4.2 Histologie.....	22
4.2.1 Gewebeeinbettung.....	22
4.2.2 Schneiden der Paraffinblöcke	23

4.2.3 Immunhistochemie	23
4.2.4 Immunfluoreszenz	24
4.3 Zellkultur	25
4.3.1 Azinuszellisolation	25
4.3.2 3D-Kollagen Kultur	25
4.4 Genexpressionsanalyse	27
4.4.1 Isolierung der RNA aus Zellen	27
4.4.2 Isolierung der RNA aus Gewebe	28
4.4.3 RNA-Konzentrationsmessung	28
4.4.4 cDNA – Synthese	28
4.4.5 Quantitative Real-Time PCR	29
4.5 Proteinbiochemische Methoden	31
4.5.1 Proteinisolation	31
4.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	31
4.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
4.5.4 Western Blot	33
4.6. Statistische Auswertung	34
5 Ergebnisse	35
5.1 Caerulein-induzierte akute Pankreatitis	35
5.2 Genexpression während der akuten Pankreatitis	36
5.2.1 Expression von Tenascin C	36
5.2.2 Expression von Integrinrezeptoren	38
5.2.3 Expression von pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgenen	40
5.3 Einfluss von Tenascin C auf Azinuszellsuspensionen	43
5.3.1 Einfluss auf die Integrinrezeptoren	43
5.3.2 Einfluss auf den pankreatischen Progenitor- und Differenzierungszellstatus	45
5.3.3 Einfluss auf den pankreatischen Progenitor- und Differenzierungszellstatus nach der Behandlung mit einem Integrininhibitor	47
5.4 Signalwegsaktivität nach Tenascin C-Behandlung	49
5.4.1 Einfluss auf die längerfristige Expression der Proteine Akt, FAK und Src	50
5.5 Einfluss von Tenascin C auf ADM Formationen	52
5.5.1 Analyse der Anzahl und Größe	52
5.5.2 Histologische Darstellung und Proliferationsanalyse	54
6 Diskussion	56
6.1 Rolle von Tenascin C während der Pankreasregeneration	57
6.2 Einfluss von Tenascin C auf ADM-Formationen	57
6.3 Tenascin C in Signalwegen der Pankreasregeneration	59
6.4 Rolle der Integrinrezeptoren während der Pankreasregeneration	61

6.5 Zusammenhang zwischen pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgenen und Integrinen <i>in vitro</i>	62
6.6. Regeneration und Karzinogenese	63
6.7 Zusammenfassung und Ausblick.....	64
7 Abbildungsverzeichnis	68
8 Tabellenverzeichnis.....	69
9 Literaturverzeichnis.....	70
Danksagung.....	75

1 Einleitung

1.1 Pankreas

1.1.1 Anatomie und Physiologie

Das Pankreas ist ein S-förmiges Oberbauchorgan, welches zum Gastrointestinaltrakt zählt und zwischen dem Duodenum und der Milz lokalisiert ist. Makroskopisch wird das Pankreas in drei Teile gegliedert: Kopf, Körper und Schwanz (siehe Abbildung 1A). Das Organ ist in Läppchen strukturiert und setzt sich aus exokrinem Gewebe und endokrinen Drüsen zusammen (Longnecker, 2014).

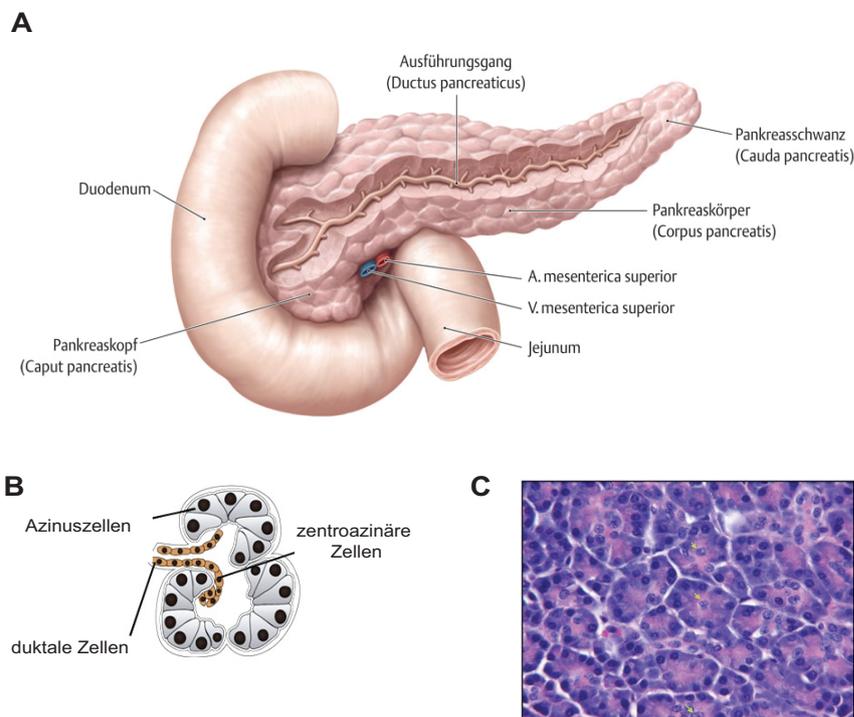


Abbildung 1: Anatomie des Pankreas

Abb. 1A: Lokalisation und makroskopische Anatomie des Pankreas (entnommen aus (Schünke et al., 2012), mit Genehmigung des „Georg Thieme Verlages KG“)

Abb. 1B: schematische Darstellung von Azinuszellen (modifiziert nach (Heinrich et al., 2015), mit Genehmigung der „Nature Publishing Group“)

Abb. 1C: Exokrine Gewebe eines adulten Pankreas, (entnommen aus (Longnecker, 2014), in Rücksprache mit „Michigan Publishing“ besteht für diese Abbildung eine „Creative Commons Non-Commercial license“)

Der exokrine Teil umfasst etwa 95% des Gewebes und besteht vor allem aus Azinuszellen und einem Ausführungsgangsystem. In den Azinuszellen, welche die Endstücke der Drüsen bilden, sind inaktivierte Vorstufen der Verdauungsenzyme gespeichert. Diese werden meist erst im Darm durch Enterokinasen aktiviert. Die Azini sind über Schaltstücke, welche von kubischem Epithel ausgekleidet sind, mit dem Ausführungsgangsystem verbunden (siehe Abbildung 1B und 1C). Die duktalem

Epithelzellen sezernieren Bikarbonat zur pH-Wert-Einstellung des Verdauungssekrets und leiten dieses in den Darm weiter (Aumüller et al., 2014).

Der endokrine Teil des Organs ist für die Hormonproduktion zuständig. Das Gewebe besteht aus Langerhans-Inseln, welche aus vier verschiedenen Zelltypen aufgebaut sind. 70% der endokrinen Zellen sind Insulin produzierende B-Zellen, des Weiteren befinden sich Glukagon produzierende A-Zellen, Somatostatin produzierende D-Zellen und pankreatisches Peptid produzierende PP-Zellen im endokrinen Gewebe (Aumüller et al., 2014).

1.1.2 Embryonalentwicklung

Etwa am neunten Tag der murinen Embryonalentwicklung sind die Pankreasknospen erstmalig morphologisch erkennbar (Shih et al., 2013). Das Organ bildet sich während der Embryonalentwicklung aus einer dorsalen und einer ventralen Anlage aussprossend aus dem mesenterialen Endoderm (Edlund, 2002).

In der frühen Phase der Pankreasentwicklung, welche auch als „primäre Transition“ bezeichnet wird, wachsen beide Knospen entlang des späteren Duodenums aufeinander zu (siehe Abbildung 2) und fusionieren etwa am 12,5ten Tag zu einem Organ. Gleichzeitig proliferieren die Zellen stark und beginnen eine verzweigte, tubuläre Struktur einzunehmen. In dieser Phase sind die undifferenzierten Epithelzellen des Pankreas umgeben von mesenchymalen Zellen (Shih et al., 2013). Mesenchymale Signale an epitheliale Zellen sind entscheidend für das Wachstum, die morphologische Entwicklung und die Differenzierung des Pankreas (Edlund, 2002).

Schon etwa ab dem 8,5ten Tag der Pankreasentwicklung werden in den Progenitorzellen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise „Pancreatic-duodenal homeobox 1“ (Pdx1) (Cano et al., 2007) und „sex determining region Y-box 9“ (Sox 9) exprimiert (Lynn et al., 2007).

Während der „zweiten Transition“, welche ab dem 12,5ten Tag bis zur Geburt stattfindet, kommt es neben weiterer Proliferation und Verzweigung der Zellen, wie in Abbildung 2 dargestellt, zur Differenzierung in endokrine, azinäre und duktale Zelltypen (Shih et al., 2013). Vorangegangene Studien des Transkriptionsfaktors Hes1 haben gezeigt, dass der Notch-Signalweg während der Embryonalentwicklung einen Teil der Zelldifferenzierung kontrolliert (Edlund, 2002). Am Ende der zweiten

Transition hat das Organ seine endokrinen und exokrinen Strukturen weitestgehend ausgebildet (Shih et al., 2013).

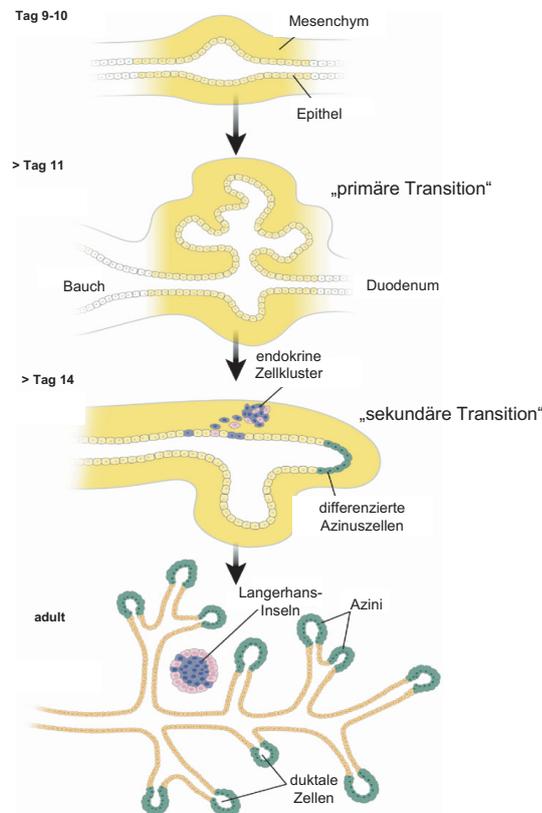


Abbildung 2: Pankreatische Organeogenese
(modifiziert nach (Cano et al., 2007), mit Genehmigung der „American Gastroenterological Association“)

1.2 Pankreatitis

Die Pankreatitis ist eine Entzündung des Pankreasgewebes, welche in eine akute und eine chronische Form eingeteilt wird.

Die Entzündung (auch Inflammation genannt) ist physiologisch selbstlimitierend, da nach der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen zeitnah auch antiinflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden. Bei chronischen Verläufen ist einer dieser beiden Mechanismen gestört, was zu einer andauernden Entzündung führt. Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen und aktivierte T-Lymphozyten spielen nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Inflammation, durch das Freisetzen von extrazellulären Proteasen, proangiogenetischen Faktoren und Chemokinen wirken sie auch an der Entwicklung von malignen Läsionen mit (Coussens and Werb, 2002). Patienten mit einer chronischen Pankreatitis haben ein etwa 16fach erhöhtes Risiko ein pankreatisches Adenokarzinom zu entwickeln (Carriere et al., 2009).

1.2.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine plötzlich auftretende Entzündung des Pankreas, die in etwa 80% der Fälle mild und komplikationslos verläuft (Carriere et al., 2009). Bei etwa jeder fünften akuten Pankreatitis treten allerdings ernsthafte Komplikationen, wie zum Beispiel eine Sepsis und Organversagen auf (Hyun and Lee, 2014). Mit 38% ist die häufigste Ursache einer akuten Entzündung eine Obstruktion durch einen Gallenstein. Dabei wird der Druck im Gallen- und/oder Pankreasgang durch den Stein erhöht, was zu einer vermehrten Aktivierung der Verdauungsenzyme führt. Dies hat eine Autodigestion und Inflammation des Pankreas zur Folge. Die zweithäufigste Ursache ist in 36% der Fällen ein Alkoholabusus; die zugrundeliegende Pathogenese ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Weitere Ursachen können metabolisch, autoimmun oder medikamenteninduziert sein; in 15-25% der Fälle kann keine Ursache gefunden werden (Wang et al., 2009). Morphologisch zeichnet sich eine akute Pankreatitis durch eine starke Immuzellinfiltration und eine Stromareaktion des umgebenden Gewebes aus (Hausmann et al., 2016).

In Tierexperimenten kann eine Pankreatitis durch eine intraperitoneal mehrfach täglich verabreichte supramaximale Dosis des Cholezystokinin-Analogons Caerulein ausgelöst werden. Durch die Bindung an den CCK-Rezeptor mit hoher Affinität induziert Caerulein die Exozytose von Zymogengranula der Azinuszellen und die Sekretion von Verdauungsenzymen. Nachdem der CCK-Rezeptor mit hoher Affinität gesättigt ist, bindet Caerulein an den CCK-Rezeptor mit niedriger Affinität, was zu einer verminderten Sekretion von Verdauungsenzymen führt. Durch das biphasische Verhalten, gekennzeichnet durch Stimulation, gefolgt von Inhibition, kommt es zur Akkumulation der Verdauungsenzyme in den Azinuszellen. Der dadurch entstehende akute Gewebeschaden, welcher nur die Azinuszellen und nicht die Inseln und Gänge betrifft, ist allerdings im murinen Tiermodell vollständig reversibel (Hyun and Lee, 2014).

1.2.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine progressive und irreversible Entzündung des Pankreas, die sowohl den exokrinen als auch den endokrinen Organteil betrifft (Witt et al., 2007) und mit morphologischen Organveränderungen wie beispielsweise intestinaler Fibrose und Azinuszellatrophie einhergeht (Hyun and Lee, 2014).

Charakteristisch für die chronische Pankreatitis ist eine massive Immunzellinfiltration und eine ausgeprägte Akkumulation von extrazellulären Matrixmolekülen, welche durch aktivierte pankreatische Stellatumzellen sezerniert werden (Michalski et al., 2007).

Der häufigste Grund für die Entstehung einer chronischen Entzündung ist der Alkoholabusus, weitere Ursachen können beispielsweise Genmutationen, Obstruktionen, Hypertriglyceridämie, Hyperkalzämie oder Ursachen autoimmunen Ursprungs sein (Witt et al., 2007). Folgen einer chronischen Pankreatitis können zum einen eine signifikante exokrine Insuffizienz, welche zu einer Maldigestion führt, und zum anderen die Entwicklung eines Diabetes mellitus sein (Witt et al., 2007). Patienten mit einer chronischen Pankreatitis haben, wie in Kapitel 1.2 schon geschrieben, ein 16fach höheres Risiko ein pankreatisches Adenokarzinom zu entwickeln (Carriere et al., 2009).

In Tierexperimenten kann eine chronische Pankreatitis auch durch eine längere, mehrfach wöchentliche Injektion von Caerulein ausgelöst werden (Sah et al., 2013).

1.2.3 Regeneration

Im Rahmen einer humanen akuten oder chronischen Pankreatitis werden sehr selten chirurgische Maßnahmen ergriffen und in diesen Fällen wird meist infiziertes und nekrotisches Gewebe entfernt, welches zur Regenerationsanalyse nicht geeignet ist. Daher sind Tiermodelle zur Untersuchung der Pankreasregeneration von hoher Bedeutung (Murtaugh and Keefe, 2015). Es gibt verschiedene Modelle zur Untersuchung der Pankreasregeneration wie z.B. eine partielle Pankreatektomie, eine Gangligatur oder die Induktion einer akuten Inflammation durch Injektion von Caerulein (Jensen et al., 2005).

Insbesondere die Regenerationsfähigkeit des exokrinen Pankreasgewebes ist stark ausgeprägt (Hausmann et al., 2016). Der Regenerationsprozess beinhaltet eine akute Phase der Gewebeschädigung und Inflammation, nachfolgend unterliegen verbleibende Azinuszellen einer Metaplasie zur Ersetzung des geschädigten Gewebes und der Redifferenzierung zur Wiederherstellung der Gewebeintegration. Beeinflusst wird der Prozess durch Zell-Zell-Interaktionen zwischen Azinuszellen, Leukozyten und Fibroblasten (Murtaugh and Keefe, 2015).

1.2.4 Azinär-duktales Metaplasie

Eine Metaplasie beschreibt die potentiell reversible Umwandlung eines differenzierten Zelltyps in einen anderen differenzierten Zelltyp (Welsch and Deller, 2010). Eine Metaplasie ist mit einem erhöhten Risiko für nachfolgende Neoplasien assoziiert (Means et al., 2005).

In verschiedenen Mausmodellen konnte im Rahmen einer Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis eine azinär-duktales Metaplasie (im folgenden „ADM“ genannt) gezeigt werden (Benitz et al., 2016). Durch das Vorhandensein interner oder externer Stressfaktoren, einer onkogenen Kras-Mutation oder im Rahmen einer Inflammation ausgeschüttete Zytokine und Wachstumsfaktoren können Azinuszellen spontan ihren charakteristischen Phänotyp und die Expression spezifischer azinärer Marker wie z.B. Amylase verlieren (Aichler et al., 2012, Storz, 2017). Die Zellen transdifferenzieren in einen duktales Phänotyp (Liou et al., 2015) und exprimieren duktales Marker wie beispielsweise CK19 (Aichler et al., 2012). Die histologische Darstellung einer ADM ist in Abbildung 3A gezeigt.

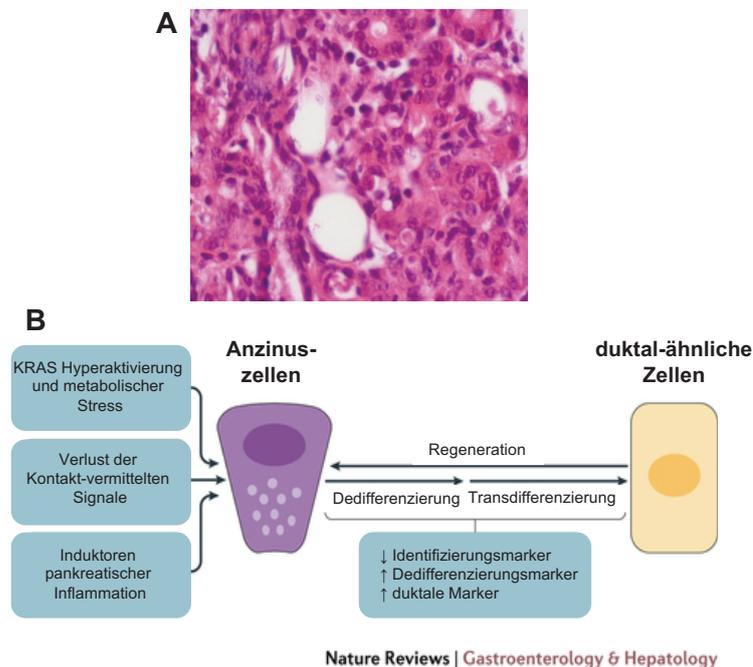


Abbildung 3: Azinär-duktales Metaplasie

Abb. 3A: ADM Formation bei einer Wildtyp Maus 48 Stunden nach der letzten Caerulein Injektion
Abb. 3B: Azinuszellplastizität und –metaplasie zu einem duktales Phänotyp im adulten Pankreas (modifiziert nach (Storz, 2017), mit Genehmigung der „Nature Publishing Group“)

ADM ist eine Voraussetzung für die Regeneration. Die Zellen erlangen dabei eine Möglichkeit zur Proliferation, um den vorhandenen Gewebeschaden zu ersetzen. Des

Weiteren verändert sich im Rahmen einer ADM die Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren; die Zellen exprimieren - wie in Abbildung 3B dargestellt - weniger spezifische Differenzierungsgene für Azinuszellen (Benitz et al., 2016) und mehr pankreatische Progenitorgene wie z.B. *Sox9*, *Hes1* oder *Pdx1* (Jensen et al., 2005). Außerdem ist die Expression von *Bmi1* und *Ring1b*, beides katalytische Untereinheiten des „Polycomb repressor complex 1“ bei der ADM Formationen erhöht. Sie sind vor allem in adulten und embryologischen Stammzellen aktiviert, um deren Zellstatus durch Inaktivierung von Differenzierungsgenen aufrechtzuerhalten. Die Reaktivierung während eines inflammatorischen Prozesses ist möglicherweise verantwortlich für die verringerte Expression von azinären Differenzierungsgenen (Benitz et al., 2016). Im Laufe der Regeneration erlangen die Azinuszellen ihren Phänotyp zurück; die Formation einer ADM ist potentiell vollständig reversibel (Hausmann et al., 2016).

1.3 Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt die vierthäufigste Krebstodesursache sowohl beim männlichen als auch beim weiblichen Geschlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 8% (Siegel et al., 2016). Gründe für diese schlechte Prognose sind unter anderem fehlende Möglichkeiten der Früherkennung und unzureichende Therapieoptionen. Bei vielen Patienten wird das Karzinom erst im metastasierten Zustand diagnostiziert (Maitra and Hruban, 2008). Risikofaktoren sind unter anderem hohes Alter, Nikotinkonsum, eine positive Familienanamnese, Diabetes mellitus und chronische Pankreatitis (Li et al., 2004).

Die bekanntesten Vorläuferläsionen sind die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), die intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN) und die muzinösen zystischen Neoplasien (MCN) (Maitra et al., 2005). Alternativ wurden auch atypische flache Läsionen, AFLs, beschrieben und als Vorläuferläsionen klassifiziert (Aichler et al.). In neueren Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt einer ADM die Zellen sehr anfällig gegenüber onkogenen Stimuli sind (Benitz et al., 2016, Guerra et al., 2007). Die Karzinogenese eines PDACs kann mit der Formation einer ADM z.B. im Rahmen einer fehlenden Regeneration nach Inflammation beginnen (Aichler et al., 2012). Nicht zur Redifferenzierung fähige ADMs können sich zu präkanzerösen PanIN entwickeln (Storz, 2017).

1.4 Stromainteraktionen

1.4.1 Rolle des Stromas

Die funktionelle Rolle der Stromalen Reaktion sowohl bei pankreatischen Regenerationsprozessen als auch bei der Karzinogenese ist weiterhin nur unzureichend beschrieben. Das Stroma umgibt ADM Strukturen in der akuten und chronischen Pankreatitis, Vorläuferläsionen und pankreatische Adenokarzinome. Die lange Zeit angenommene protektive Stroma-Funktion wurde zuletzt jedoch in Untersuchungen teilweise widerlegt. Mehrere Studien vermuten sogar eine promaligne Eigenschaft und eine mögliche Initiierung der Karzinogenese durch das aktivierte Stroma. Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen Typ I, fördern Tumorwachstum und Metastasierung (Erkan et al., 2008). Außerdem stellt das umgebende Stroma eine Art „Barriere“ für Chemotherapeutika dar; dies kann unter anderem eine Therapieresistenz bedingen (Paron et al., 2011).

1.4.2 Pankreatische Stellatumzellen

Pankreatische Stellatumzellen sind periazinär gelegene Gewebszellen mit „sternartigen“ zytoplasmatischen Ausläuferelementen (siehe Abbildung 4A) (Omary et al., 2007).

Physiologisch machen sie etwa 4% aller Pankreaszellen aus (Apte et al., 1998) und regulieren die Synthese und den Abbau der extrazellulären Matrix (Mantoni et al., 2011). Bei der chronischen Pankreatitis oder dem Pankreaskarzinom übernehmen sie eine Schlüsselfunktion (Omary et al., 2007).

Pankreatische Stellatumzellen können durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Im aktivierten Zustand transdifferenzieren sie zu Myofibroblasten und können exponentiell proliferieren (Paron et al., 2011). Aktivierte Stellatumzellen migrieren zum Gewebsschaden (Omary et al., 2007) und agieren als zentraler Mediator der desmoplastischen Reaktion (Mantoni et al., 2011). Die Aktivierung kann durch eine unabhängige Feedbackschleife aufrechterhalten und durch glattmuskuläres Aktin (α -SMA) als Marker detektiert werden (Erkan et al., 2008).

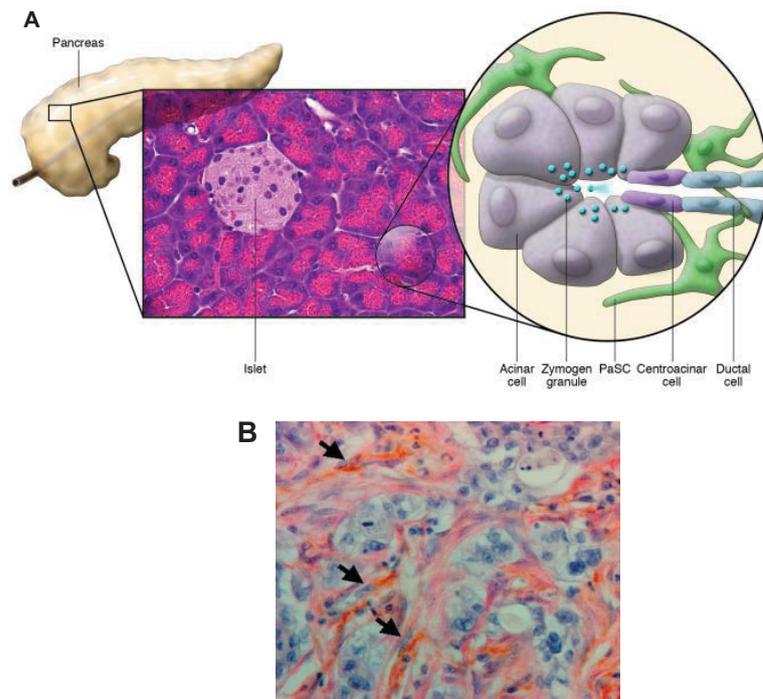


Abbildung 4: Pankreatische Stellatumzellen

Abb. 4A: Schema der exokrinen Zellen und periazinäre Lokalisation der pankreatischen Stellatumzellen (PaSZ) (entnommen aus (Omary et al., 2007), mit Genehmigung der „American Society for Clinical Investigation“)

Abb. 4B: Kolokalisation von α -SMA und Tenascin C im Tumorstroma, die Pfeile zeigen auf doppelt positive Stromazellen (entnommen aus (Esposito et al., 2006), mit Genehmigung des „Journal of Pathology“)

Im Rahmen einer chronische Pankreatitis spielen Fibroblasten und Myofibroblasten bei der Entstehung der Organfibrose eine wichtige Rolle durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, was zu einer vermehrten Synthese von extrazellulären Matrixmolekülen führt (Akhmedov and Gaus, 2019). Dazu wurde unter anderem, wie in Abbildung 4B dargestellt, eine immunhistochemische Untersuchung der Ko-Lokalisation des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C und α -SMA durchgeführt (Esposito et al., 2006).

Des Weiteren gehen aktivierte pankreatische Stellatumzellen eine bidirektionale Verbindung mit Tumorzellen ein und triggern deren Proliferation und Invasion des umgebenden Gewebes (Coetzee et al., 2019). Stellatumzellen interagieren auch mit Endothelzellen und aktivieren so die Angiogenese (Apte and Wilson, 2012).

In einigen Veröffentlichungen ist die Aktivität der pankreatischen Stellatumzellen auch als Prognosefaktor diskutiert worden. Eine hohe Aktivität der Zellen weist auf einen schlechteren Krankheitsverlauf hin (Erkan et al., 2008).

1.4.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix besteht als nicht-zelluläre Gewebskomponente vorwiegend aus Wasser, Polysacchariden und Proteinen. Jedes Gewebe besitzt eine extrazelluläre Matrix mit einer einzigartigen Zusammensetzung und Topologie (Frantz et al., 2010).

Funktionell ist die extrazelluläre Matrix von Bedeutung für die Form- und Strukturgebung von Geweben und Organen sowie für die Zelladhäsion. Weiterhin vermittelt sie über Integrinrezeptoren Signalwegsfunktionen in benachbarten Zellen (Hynes, 2009). Die extrazelluläre Matrix ist des Weiteren ein Reservoir für sowohl lösliche als auch unlösliche Signalmoleküle (Comoglio and Trusolino, 2005). Auch mechanische Eigenschaften der extrazellulären Matrix, wie beispielweise Konsistenz oder Verformbarkeit, haben einen Einfluss auf die Zellen. Beeinflusst werden die Differenzierung, die Proliferation, die Polarität und die Migration der Zellen (Hynes, 2009).

Die extrazelluläre Matrix spielt neben dem Pankreaskarzinom auch in verschiedenen weiteren Tumoren wie z.B. dem Mammakarzinom eine wichtige Rolle (Ioachim et al., 2002). In den Tumoren sind häufig molekulare oder physikalische Veränderungen des extrazellulären Milieus festgestellt worden, welche zu einer Umwandlung von gesunden Epithelzellen in maligne Zellen führt und für eine Beteiligung der extrazellulären Matrix an der Aktivierung von onkogenen Signalwegen spricht (Comoglio and Trusolino, 2005). Tumorstroma ist steifer als normales Stroma (Cox and Erler, 2011). Diese Beobachtungen weisen auf eine aktive Beteiligung der extrazellulären Matrix an der Karzinogenese hin.

1.4.4 Tenascin C

Tenascin C ist ein multifunktionelles extrazelluläres Matrixmolekül (Midwood et al., 2016). Es besteht aus sechs Monomeren, welche an den N-Termini über Disulfidbrücken verbunden sind und so einen etwa 1080-1500 kDa großen Hexamer formen (Paron et al., 2011). Der Aufbau eines Monomers und des Hexamers ist in Abbildung 5A dargestellt. Des Weiteren besitzt Tenascin C verschiedene Molekülformen, welche durch alternatives Spleißen und Proteinmodifikation entstehen. Der Molekülname setzt sich aus den lateinischen Wörtern „tenere“ (übersetzt: „halten“) und „nasci“ (übersetzt: „geboren werden“) zusammen und beschreibt bereits zwei wichtige Aufgabenbereiche des Glykoproteins: Strukturgebung und

Embryonalentwicklung. Die Tenascin-Familie ist evolutionär stark konserviert, alle Mitglieder besitzen dieselbe molekulare Architektur (Midwood et al., 2016). Bevor die Tenascin-Familie entdeckt wurde, hieß das extrazelluläre Matrixmolekül „Cytoactin“, weshalb ihm der Buchstabe C zugewiesen wurde (Midwood et al., 2016).

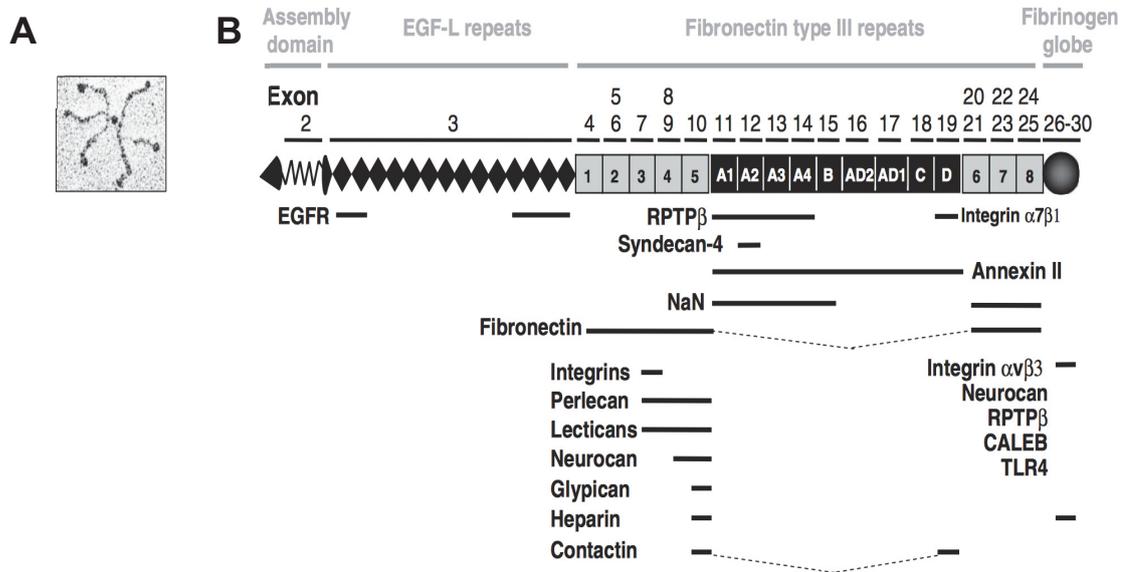


Abbildung 5: Aufbau und Interaktionen des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C

Abb. 5A: Darstellung des humanen Tenascin C als Hexamer in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (entnommen aus (Midwood and Orend, 2009), mit Genehmigung der „International CCN Society“)

Abb. 5B: Proteinstruktur, Organisation in verschiedene Proteindomänen und Bindungspartner des humanen Tenascin C (entnommen aus (Midwood and Orend, 2009), mit Genehmigung der „International CCN Society“)

Im gesunden Pankreas wird Tenascin C nur in sehr geringen Mengen in der Muskelwand von Blutgefäßen oder in der Nähe von interlobulären Ausführungsgängen exprimiert (Paron et al., 2011). Während der Embryonalentwicklung, der Wundheilung und bei Gewebeschäden bzw. Gewebeumbau - wie beispielsweise im Rahmen einer chronischen Pankreatitis oder eines PDACs - wird es vermehrt von pankreatischen Stellatumzellen sezerniert (Esposito et al., 2006). Die Hauptfunktion des Tenascin C-Moleküls ist die eines „Stressproteins“, welches Zelladhäsion, Migration und Proliferation moduliert (Midwood et al., 2016). Die Tenascin C-Expression nimmt parallel zur Pankreaskarzinomprogression aus Vorläuferläsionen wie z.B. bei pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) zu (Esposito et al., 2006). Im pankreatisch-duktalem Adenokarzinom konnte Tenascin C insbesondere um exokrine Drüsenanteile des Gewebes nachgewiesen werden (Paron et al., 2011). Allerdings konnte keine Korrelation zwischen der Prognose von Pankreaskarzinompatienten und dem Expressionslevel nachgewiesen werden (Paron et al., 2011).

Tenascin C bindet unter anderem, wie in Abbildung 5B dargestellt, an verschiedene weitere extrazelluläre Matrixmoleküle wie z. B. Fibronectin, Annexin II (Esposito et al., 2006), Kollagen oder Periostin. Diese inter-Matrix Interaktionen sind wahrscheinlich vor allem strukturell bedeutsam. So beeinflussen sie beispielsweise die Steifheit des Gewebes und die Signale der extrazellulären Matrix an die Zellen. Außerdem bindet Tenascin C an sechs verschiedene Integrine (Midwood et al., 2016).

1.5 Integrin vermittelter Signalweg

Integrine sind eine aus etwa 24 Heterodimeren bestehende Transmembranproteinfamilie; ihre Mitglieder befinden sich auf der Zelloberfläche von allen tierischen Zellen. Sie setzen sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen, welche nicht kovalent verbunden sind. Integrine sind verantwortlich für die Zelladhäsion zur extrazellulären Matrix und haben eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion (Shishido et al., 2014).

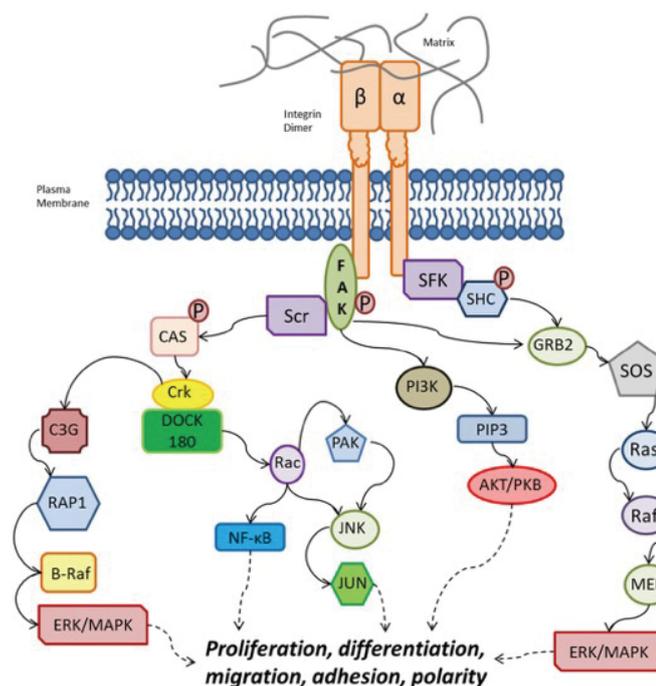


Abbildung 6: Integrin vermittelte intrazelluläre Signalwege

(entnommen aus (Shishido et al., 2014), in Rücksprache mit dem „Frontiers Verlag“ besteht für diese Abbildung eine „Creative Commons Attribution License“)

Vier Integrine wurden in vorangegangenen Untersuchungen als Bindungspartner von Tenascin C identifiziert: $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$ und $\alpha_V\beta_6$. Sie binden an die dritte Fibronectin Typ 3-Domäne des extrazellulären Matrixmoleküls. Funktionell hat beispielsweise die Interaktion von Tenascin C mit den Rezeptoren $\alpha_9\beta_1$ und $\alpha_V\beta_3$ eine Förderung der

Zellproliferation zur Folge; gleichzeitig inhibiert die Bindung an den Integrinrezeptor $\alpha_v\beta_3$ die Apoptose. Des Weiteren gibt es die Vermutung, dass Tenascin C auch an den Kollagenrezeptor $\alpha_2\beta_1$ binden kann, allerdings konnte diesbezüglich noch keine Bindungsdomäne identifiziert werden (Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2015).

Im Rahmen der Signaltransduktion beinhaltet der direkte intrazelluläre Signalweg eine Aktivierung von Tyrosinkinase durch die Integrine. Beispielweise wird FAK („fokale Adhäsionskinase“) durch die β -Untereinheit phosphoryliert; FAK kann seinerseits den PI3K-Akt-Signalweg aktivieren und die Tyrosinkinase Src phosphorylieren. Außerdem kann FAK die MAP Kinase ERK, eine extrazellulär regulierende Kinase, über zwei verschiedene Signalwege aktivieren, welche in Abbildung 6 dargestellt sind (Shishido et al., 2014). Durch die Bindung an Integrine und die dadurch ausgelöste Signaltransduktion kann Tenascin C als extrazelluläres Matrixmolekül Einfluss auf Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Polarität von Zellen nehmen (Shishido et al., 2014).

Die Rolle bzw. Funktion des Integrin-vermittelten Signalweges im Rahmen der pankreatischen Regeneration und Karzinogenese ist noch nicht geklärt.

2 Ziele der Arbeit

Meine Promotion beschäftigt sich mit der Frage des Einflusses und der Funktion des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C im Rahmen der Pankreasregeneration infolge einer akuten, experimentell ausgelösten Pankreatitis. Es ist wichtig, den Prozess der Pankreasregeneration zu analysieren, weil eine fehlende Ausheilung der Inflammation schwerwiegende Folgen wie beispielsweise einen Funktionsverlust des Organs oder eine Karzinomentstehung haben kann (Hausmann et al., 2016).

Die Schwerpunkte der Experimente lagen zum einen auf einer Analyse des Einflusses von Tenascin C auf die ADM-Formationen und deren Charakteristika. Zum anderen sollte eine Untersuchung der Signalwegsaktivierung durch Tenascin C erfolgen um mögliche therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren.

Zunächst wurde die Expression von Tenascin C, von verschiedenen pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgenen sowie von Integrinrezeptoruntereinheiten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Caerulein-induzierten Pankreatitis untersucht.

Des Weiteren wurden in *in vitro* Untersuchungen Azinuszellsuspensionen unterschiedlich lange mit verschiedenen Konzentrationen eines humanen rekombinanten Tenascin C-Proteins behandelt. Anschließend wurden diese Zellen molekularbiologisch hinsichtlich der Expression von verschiedenen pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgenen sowie von Integrinrezeptoren analysiert. Darüber hinaus wurden die behandelten Azinuszellsuspensionen proteinbiochemisch bezüglich der Aktivierung des Integrin-Signalweges über p-FAK und p-Src sowie von p-Akt aus dem PI3k-Akt-Signalweg und von p-Erk aus dem MAP-Kinase-Signalweg untersucht. Verschiedene Komponenten der Signalwege werden bereits als mögliche therapeutische Angriffspunkte diskutiert (Wong et al., 2016, Mao et al., 2016).

Außerdem wurden isolierte Azinuszellen in dreidimensionale Zellkulturen in Kollagen Typ I eingebettet und etwa 7 Tage lang kultiviert. Die ADM-Formationen sind in dieser Art der Zellkultur sehr gut analysierbar. Zu Beginn der Kultivierungszeit wurden einige Zellen mit Caerulein, Tgf- α und verschiedenen Konzentrationen Tenascin C behandelt. Am Ende erfolgte sowohl eine quantitative als auch eine funktionelle Untersuchung.

3 Materialien

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Denver Instrument (New York, USA)
Brutschrank	Mytrom (Heilbad Heiligenstadt, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad (Hercules, USA)
Inkubationsschüttler	Edmund Bühler GmbH (Hechingen, Deutschland)
Light-Cycler (iQ5)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mikroskop	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences (Nebraska, USA)
pH-Meter	Hanna Instruments GmbH (Vöhringen, Deutschland)
Photometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipettierhilfe „pipetus“	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
PowerPac Basic	Bio-Rad (Hercules, USA)
Rotationsmikrotom	Slee (Mainz, Deutschland)
Spektrophotometer („CLARIOstar“)	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland)
Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Tischzentrifuge	Sprout (Hobart, Australien)
Gewebe-Shredder	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Trockenschrank	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Wasserbad	Fisher & Rintelen GmbH (Essen, Deutschland)
Vortexmixer	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Reaktionsgefäße (0,2-2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Gewebekassette	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare LifeScience (Freiburg, Deutschland)
Objektträger	Marienfeld (Lauda Königshofen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Starlab (Hamburg, Deutschland)

Pipettenspitzen „Filter tip one“	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Skalpelle	Feather Safety Razor (Osaka, Japan)
Sterilfilter	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Stripetten	Costar (Tewksbury, USA)
Whatman-Paper	GE Healthcare Life Science (Freiburg, Deutschland)
Zellkulturplatten 6-Well-Platte	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
12-Well-Platte	TPP (Trasadingen, Schweiz)
96-Well-Platte	TPP (Trasadingen, Schweiz)
10 cm Zellkulturschale	BD Bioscience (San Jose, USA)
96-Well-Platten qRT-PCR	Bio-Rad (Hercules, USA)

3.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
30% Acrylamidstammlösung	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bovine Serum Albumin Fraktion V, pH 7,0	GE Healthcare (Pasching, Österreich)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Caerulein	Sigma (München, Deutschland)
Dexamethasone	Sigma (München, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ethanol absolute	VWR (Radnor, USA)
Eukitt quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma (München, Deutschland)
4% Formaldehyd	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	VWR (Radnor, USA)
Hank's Balanced Salt Solution	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Hepes Buffer Solution (1M)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Isofluran	Piramal Healthcare (Morpeth, Vereinigtes Königreich)
Isopropanol	Otto Fischar GmbH & Co KG (Saarbrücken, Deutschland)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Collagenase P	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Collagenase Typ V	Sigma (München, Deutschland)
Mayers Hämalaunlösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mounting Medium DAPI	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nonfat dry milk/Milchpulver	Bio-Rad (Hercules, USA)
Nuklease-freies Wasser	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PBS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Phosphataseinhibitor „PhosStop“	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Proteaseinhibitor	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
RIPA-Puffer	Sigma (München, Deutschland)
SDS Pellets	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SYBR Green Supermix	Bio-Rad (Hercules, USA)
TEMED	Bio-Rad (Hercules, USA)
Tris base	Sigma (München, Deutschland)
Tris HCl	Sigma (München, Deutschland)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsininhibitor	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Xylene	VWR (Radnor, USA)

3.4 Medien

Medien	Hersteller
RPMI	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Waymouth's MB 752/1	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
2D Medium	10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 0,1 mg/ml Trypsininhibitor 0,01% Dexamethasone (20 mg/ml stock) 5mM Hepes 0,13% NaHCO ₃ → mit Waymouth's MB 752/1 auffüllen
3D Medium	20% FCS 2% Penicillin/Streptomycin 0,2 mg/ml Trypsininhibitor 0,02% Dexamethasone (20 mg/ml stock) 10mM Hepes 0,26% NaHCO ₃ → mit Waymouth's MB 752/1 auffüllen

3.5 Puffer

Puffer	Chemikalien/Herstellung
Lämmli-Puffer (6x)	12 mM EDTA 12% (w/v) SDS 850 mM β -Mercaptoethanol 0,06% (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer	0,1% (w/v) SDS 25mM Tris base 192 mM Glycin → mit Aqua dest. auffüllen
Natrium Citratpuffer, pH 6	10mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrate → mit Aqua dest. auffüllen
TBS	0,1M Tris-HCl; pH 7,5 0,15M Natriumchlorid → mit Aqua dest. auffüllen
Transferpuffer, pH 8,5	25mM Tris HCl pH 8,5 0,2M Glycin 20% (v/v) Methanol → pH-Wert Einstellung am pH Meter mittels HCl und NaOH, anschließend mit Aqua dest. auffüllen
1,0M Tris pH 6,8	1M Tris HCl → pH-Wert Einstellung am pH Meter mittels HCl und NaOH, mit Aqua dest. auffüllen
1,5M Tris pH 8,8	1,5M Tris HCl → pH-Wert Einstellung am pH Meter mittels HCl und NaOH, anschließend mit Aqua dest. auffüllen

3.6 primäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Anwendungsgebiet und Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
AKT	Kaninchen	WB 1:1.000	Cell Signaling (Danvers, USA)	4691
Alpha-SMA	Maus	IHC 1:200	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab7817
Amylase	Maus	IHC 1:200	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	sc-46657
BrdU	Maus	IHC 1:200	Cell Signaling (Danvers, USA)	5292

CK 19 (Troma III)	Ratte	IHC 1:300	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA)	
ERK	Kaninchen	WB 1:1.000	Cell Signaling (Danvers, USA)	4695
FAK	Kaninchen	WB 1:1.000	Cell Signaling (Danvers, USA)	13009
GAPDH	Maus	WB 1:10.000	Sigma (München, Deutschland)	SAB1405848
Integrin β_3	Kaninchen	IHC 1:200	Cell Signaling (Danvers, USA)	13166
Integrin β_6	Maus	IHC 1:2.000	Merck (Darmstadt, Deutschland)	MAB2076Z
p-AKT	Kaninchen	WB 1:500	Cell Signaling (Danvers, USA)	4060
p-ERK	Kaninchen	WB 1:500	Cell Signaling (Danvers, USA)	4370
p-FAK	Kaninchen	WB 1:500	Cell Signaling (Danvers, USA)	3281
p-Src Family	Kaninchen	WB 1:500	Cell Signaling (Danvers, USA)	6943
Src	Kaninchen	WB 1:1.000	Cell Signaling (Danvers, USA)	2109
Tenascin C	Maus	IHC 1:200	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab86182

3.7 sekundäre Antikörper

Spezies	Anwendungsgebiet und Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
Esel Anti-Maus Alexa Fluor® 488 konjugiert	IF 1:1.000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	A-21131
Esel Anti-Ratte Alexa Fluor® 594 konjugiert	IF 1:200	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	A-21209
Ziege Anti-Maus	WB 1:10.000 IHC 1:200	Li-Cor (Lincoln, USA)	925-32210
Ziege Anti-Kaninchen	WB 1:10.000 IHC 1:200	Li-Cor (Lincoln, USA)	925-32211
Ziege Anti-Ratte	IHC 1:200	Biozol (Eching, Deutschland)	LS-C68441-1000

3.8 Inhibitoren

Inhibitor	Inhibitionsziele	Konzentration	Hersteller
SB273005	Integrinrezeptoren $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$	10 μ M	Selleckchem (München, Deutschland)

3.9 Proteine

Protein	Hersteller
Recombinant Human Tenascin C	R&D Systems (Minneapolis, USA)

3.10 Primer

Primer	Sequenz fwd (5'-3')	Sequenz rev (5'-3')
<i>Amylase</i>	TCCACCTGTTTGAGTGGCGCTGGGT	TGGGTGGAGAGACCTGCACACCTGC
<i>Bmi1</i>	GGCTCCAATGAAGACCGAGG	ATCATTACCTCTTCCTTAGGCT
<i>Hes1</i>	AAAATTCCTCCTCCCCGGTG	TTTGGTTTGTCGGGTGTCG
<i>Itgα_v</i>	TGTGGACCGAGACGTTTCATG	CTCGATCGGCAGGTTCTTGT
<i>Itgα₈</i>	GCATCCCTGGTGTCTTTGA	GGAGTGGCCCAAATAACCGA
<i>Itgα₉</i>	GAGCCGCACCATCAACCTAT	CTCCACCTTACCTTGGCTC
<i>Itgβ₁</i>	TTGCCTTGCTGCTGATTTGG	AGTTGTCACGGCACTCTTGT
<i>Itgβ₃</i>	TTGGCCTTGCTACTCTGCTC	ATTGGTGAAGGTGGAGGTGG
<i>Itgβ₆</i>	AGAACGCTCTAAGGCCAAGT	CCTGTGCTTGTAGGTCACGT
<i>Pdx1</i>	TGCCACCATGAACAGTGAGG	GGAATGCGCACGGGTC
<i>Ppib</i>	GGAGCGCAATATGAAGGTGC	CTTATCGTTGGCCACGGAGG
<i>Rbpjl</i>	GTATCGAAGTCAGTGGCGGT	GCAGGCTCAGGTGAGTCAAA
<i>Ring1b</i>	GTTGATTCTCGAGTCTCGCTC	TGAGACATTTCCGGCTCCTGC
<i>Sox9</i>	GCAAGCTGGCAAAGTTGATCT	GCTGCTCAGTTCACCGATG

3.11 Kits

Kit	Hersteller
ABC Kit IgG Maus	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
ABC Kit IgG Kaninchen	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

3.12 Mäuse

interne Name (offizieller Name)	Hintergrund	Herkunft	Referenz
KC (Ptf1a ^{Cre/+} ; LSL-Kras ^{G12D/+})	C57-BI6/J	p48 ^{Cre/+} Mäuse (C57BL/6J; StockPtf1a ^{tm1.1(Cre)Cvw}) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Schmid (Klinikum rechts der Isar, TU München) zur Verfügung gestellt und mit LSL- Kras ^{G12D/+} (B6.129S4-Kras ^{tm4Tyj} /J, #008179, Jackson Laboratory) gekreuzt.	Ptf1a ^{Cre/+} und Kras Hingorani et al. 2003 (Kawaguchi et al. 2002)
KPC (pPtf1a ^{Cre/+} ; LSL-Kras ^{G12D/+} ; Trp53 ^{flox/+})	C57-BI6/J	KC Mäuse wurden mit Trp53 ^{tm1Bm/+} Mäusen (B6.129P2- Trp53 ^{tm1Bm} /J, #008462, Jackson Laboratory) gekreuzt.	Trp53 ^{tm1Bm/+} (Marino S et. al, 2000)

4 Methoden

4.1 Caerulein-induzierte akute Pankreatitis

Wildtyp Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen zur Induktion einer akuten Pankreatitis an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 8mal mit 100 µg pro kg Körpergewicht Caerulein intraperitoneal injiziert. Es wurden pro Injektion 2 ml injiziert. Das Caerulein wurde in 0,9% NaCl gelöst. Zur Untersuchung der Regeneration wurde das Gewebe sofort, 1, 2, 4, und 7 Tage nach der letzten Injektion entnommen. Nach etwa 7 Tagen ist aufgrund von vorangegangenen Untersuchungen davon auszugehen, dass das Pankreas weitestgehend regeneriert und funktionsfähig ist (Hausmann et al., 2016). Als Kontrolle wurden Mäuse nur mit 0,9 % NaCl behandelt.

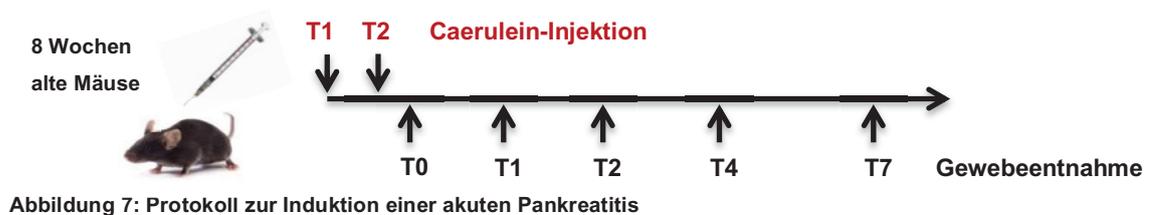


Abbildung 7: Protokoll zur Induktion einer akuten Pankreatitis

Das Aktenzeichen des Projektes „Funktion des extrazellulären Matrixproteins Tenascin C bei der Pankreatitis-induzierten Geweberegeneration, Pankreas-karzinogenese und Metastasierung“ beim Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz lautet: 84-02.04.2016.A453.

Meinen FELASA B-Schein habe ich von der „Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben“ der Universitätsklinik Düsseldorf am 26.08.2016 ausgehändigt bekommen.

4.2 Histologie

4.2.1 Gewebeeinbettung

Das Gewebe wurde nach der Entnahme in eine Gewebekassette überführt und über Nacht in 4% PBS-gepuffertes Formaldehyd gelegt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend in 70% Ethanol überführt. Nach der Entwässerung wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet.

4.2.2 Schneiden der Paraffinblöcke

Die in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden am Rotationsmikrotom mit einer Schnittdicke von 4 μm geschnitten. Zur Glättung wurden die Schnitte in ein etwa 46°C warmes Wasserbad gelegt und später auf einen Objektträger überführt. Anschließend wurden die Schnitte für 60 Minuten bei 60°C im Trockenschrank getrocknet um die Haftung am Objektträger zu steigern.

4.2.3 Immunhistochemie

Zunächst wurde das Gewebe 3 x 5 Minuten in Xylol deparafinisiert und anschließend zur Rehydrierung je 3 Minuten durch eine absteigende Alkoholreihe geführt. In einem Puffer zur Antigendemaskierung (siehe Tabelle 1) wurden die Schnitte 10 Minuten in der Mikrowelle bzw. im Dampfkochtopf gekocht und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Bei der Antigendemaskierung handelt es sich um eine Wiederherstellung der ursprünglichen Epitopkonformation, wodurch eine Bindung zwischen Antigen und Antikörper erneut möglich ist. Im nachfolgenden Waschschrift wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten im Waschpuffer (siehe Tabelle 1) gewaschen. Anschließend wurde mittels dreißigminütiger Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid/PBS die Peroxidaseaktivität reduziert. Nach einem erneuten Waschschrift, der, wie vorstehend beschrieben, durchgeführt wurde, wurden die Schnitte mithilfe einer Lösung bestehend aus PBS mit 10% Serum, 1% BSA und 0,1% Triton-X eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Gewebe mit Parafilm abgedeckt. Die Blockierung dient der Sättigung unspezifischer Bindungsstellen und demzufolge einer Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung. Die primären Antikörper wurden, wie in Tabelle 1 aufgeführt, in der Blockierungslösung verdünnt und auf die Schnitte pipettiert, erneut mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde zunächst nach vorstehend beschriebener Vorgehensweise gewaschen und anschließend ein sekundärer, biotinylierter Antikörper (siehe Tabelle 1) nach Herstellerangaben 1:200 verdünnt auf die Schnitte pipettiert und mit Parafilm abgedeckt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Währenddessen wurde die ABC-Reaktion aus einem ABC Kit bestehend aus den Reagenzien A und B/PBS-T (0,1% Tween) vorbereitet und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten, wie zuvor beschrieben durchgeführten Waschschrift, wurde die ABC Reaktion auf das

Gewebe aufgetragen, mit Parafilm abgedeckt und 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde ein letztes Mal gewaschen und mit DAB-Lösung gefärbt. Dafür wurde 2% Chromogen mit dem Substratpuffer gemischt und 200 µl auf jeden Gewebeschnitt gegeben. Wichtig ist ein gleichzeitiger Beginn um eine möglichst exakte und identische Einwirkzeit angeben zu können und eine bessere Vergleichbarkeit der Schnitte zu gewährleisten. Bei einer sich nicht mehr verstärkenden Braunfärbung des Gewebes wurde die Färbung durch die Überführung in Leitungswasser gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte für wenige Sekunden in Mayers Hämalaunlösung gegengefärbt und in fließendem Leitungswasser für etwa 5 Minuten gebläut. Zur Dehydrierung durchlaufen die Proben für je 2 Minuten die aufsteigende Alkoholreihe und wurden schließlich 3 x 5 Minuten in Xylol platziert. Letztendlich wurde ein Tropfen des Eindeckelmediums „Eukitt quick-hardening mounting medium“ auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

primärer Antikörper	Verdünnung Gewebe	Verdünnung Zellen	Antigendemaskierung	Waschpuffer	sekundärer Antikörper
Alpha-SMA	1:200		Citratpuffer, 15 Min. im Dampfdrucktopf	PBS-T	Anti-Maus IgG
Amylase	1:200	1:2.000	Citratpuffer, 10 Min. in der Mikrowelle	PBS-T	Anti-Maus IgG
BrdU		1:800	Citratpuffer, 10 Min. in der Mikrowelle	PBS-T	Anti-Maus IgG
CK19 (Troma III)	1:200	1:2.000	EDTA-Puffer, 15 Min. im Dampfdrucktopf	TBS-T	Anti-Ratte IgG
Integrin β_3	1:200		Citratpuffer, 10 Min. in der Mikrowelle	PBS-T	Anti-Kaninchen IgG
Integrin β_6	1:2.000		Pronase E 1:20, 6 Min. bei 37°C	PBS-T	Anti-Maus IgG
Tenascin C	1:200		Citratpuffer, 10 Min. in der Mikrowelle	PBS-T	Anti-Maus IgG

Tabelle 1: Immunhistochemie-Protokolle

4.2.4 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden die Schnitte anfänglich in Xylol 3 x 5 Minuten entparaffinisiert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur

Antigendemaskierung wurden die Schnitte 10 Minuten in 10 mM Natrium-Citratpuffer gekocht und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach 3 5minütigen Waschschritten in PBS-T wurden die Schnitte mit einer Lösung bestehend aus 10% Eselserum, 1% BSA, 0,1% Triton X in PBS bedeckt und blockiert. Danach wurde der primäre Antikörper in der in Tabelle 1 aufgeführten Verdünnung auf die Schnitte pipettiert, mit Paraffinfilm abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst erneut, wie oben beschrieben, in PBS-T gewaschen. Der konjugierte sekundäre Antikörper wurde in 1% Eselserum enthaltendem PBS gelöst und auf die Schnitte gegeben. Nach einer 1-stündigen Inkubation folgten 3 x 5minütige Waschschrritte mit PBS-T. Abschließend wurden die Schnitte mit „DAPI Mounting Medium“ eingedeckelt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Azinuszellisolation

Zur Isolation von Azinuszellen wurde das entnommene Pankreasgewebe zügig in eiskaltes PBS überführt. Das Organ wurde daraufhin mit 10 ml RPMI Medium versetzt, mit 1mg/ml Kollagenase Typ V gelöst in RPMI infiltriert, und mit Hilfe von Skalpell in sehr kleine Stücke geschnitten. In einer 10 cm Zellkulturschale wurde das Gewebe für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Gewebe mit 10 ml RPMI mit 10% FCS versetzt, um die Kollagenase-Aktivität zu inhibieren, und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt; die 10 cm Kulturschale wurde mit weiteren 10 ml des zuvor beschriebenen Mediums ausgewaschen. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 300 rpm wurde das Zellpellet in 10 ml RPMI mit 10% FCS resuspendiert und durch einen 100 µm Filter gegeben. Der Filter wurde mit weiteren 10 ml RPMI 10% FCS gespült und erneut 5 Minuten bei 300 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml RPMI mit 10% FCS gelöst und erneut durch einen 100 µm Filter pipettiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 300 rpm wurde das Zellpellet in das 2D-Medium aufgenommen.

4.3.2 3D-Kollagen Kultur

Für die 3D-Kollagen Kultur wurde am ersten Tag das frisch isolierte Pankreas zunächst in 10 ml 0,5 mg/ml Kollagenase P enthaltendem RPMI-Medium in möglichst kleine

Stücke geschnitten und anschließend 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Gewebe in 10 ml RPMI-Medium mit 5% FCS in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 300 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 10 ml RPMI-Medium mit 5% FCS gelöst und durch einen 100 µm Filter gegeben. Der Filter wurde daraufhin mit 10 ml RPMI-Medium mit 5% FCS gespült. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 300 rpm wurde das Zellpellet in 20 ml RPMI-Medium mit 5% FCS gelöst und erneut zentrifugiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit „Hank’s Balanced Salt Solution“ und anschließendem Zentrifugieren wurden die Zellen in 2D Medium gelöst, ggf. mit 10 µM Caerulein gelöst in 0,9 % NaCl behandelt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am Folgetag wurde eine 12-Well-Platte mit verschiedenen Schichten wie in Abbildung 8 dargestellt angesetzt.



Abbildung 8: Aufbau einer 3D-Kollagen Kultur

Auf einer 12-Well-Platte wurde zunächst eine 1mg/ml Kollagenschicht auspolymerisiert. Danach wurden die Azinuszellen in eine 1,5 mg/ml Kollagenschicht eingebettet und nach einer einstündigen Auspolymerisation mit 2D Medium bedeckt.

Zunächst wurde die Platte mit einer 400 µl Kollagenschicht mit einer Endkonzentration von 1mg/ml bedeckt. Diese setzte sich wie folgt zusammen:

- 10x PBS: finale Volumen/10 = ml PBS
- Kollagen Typ I: (finale Volumen*finale Kollagenkonzentration in mg/ml)/Kollagenkonzentration
- 1N NaOH: Kollagenvolumen*0,023
- 3D Medium: finale Volumen – Volumen (Kollagen + 10x PBS + NaOH)
- NaHCO₃: 10% des finalen Volumens

Zum Auspolymerisieren wurde die Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden erneut mit „Hank’s Salt Solution“ gewaschen und danach in 3D Medium aufgenommen. Für die folgende Kollagenzellschicht wurde eine Lösung nach der oben beschriebenen Zusammensetzung mit der Zellsuspension anstatt des 3D

Mediums und einer Kollagenendkonzentration von 1,5 mg/ml hergestellt. Anschließend wurden 1500 µl der Zell-Kollagen-Suspension auf die zuvor auspolymerisierte Kollagenschicht pipettiert und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 1500 µl 2D Medium auf die Zellkollagenschicht gegeben um ein Austrocknen zu verhindern. In das 2D Medium wurde je nach Versuchsplanung Tenascin C gelöst in PBS in verschiedenen Konzentrationen und 50 ng/ml Tgf- α gegeben. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Am 5. Tag der Kultur wurden 10 µM BrdU gelöst in 0,9 % NaCl zugegeben. Nach Durchführung einer Fotodokumentation der Wells wurde am sechsten Tag das 2D Medium entfernt, die Collagenmatrix aus dem Well gelöst und in eine Einbettkassette überführt. Nach einem Fixationsschritt, bei dem die Kollagenkultur über Nacht in 4 % Formaldehyd bei 4°C gelagert wurde, wurde 3 x jeweils 10 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend in 70% Ethanol überführt. Nach der Entwässerung wurde die 3D Kultur in Paraffin eingebettet und am Mikrotom geschnitten.

4.4 Genexpressionsanalyse

4.4.1 Isolierung der RNA aus Zellen

Die Isolierung der RNA erfolgte mithilfe des RNeasy Plus Mini Kits, welches nach Herstellerangaben verwendet wurde. Als Pipettenspitzen wurden „Filter tip one“ verwendet. Die Zellen wurden zunächst bei 300 rpm 5 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet anschließend mit PBS einmalig gewaschen. Anschließend wurden 350 µl RLT Plus Puffer im Verhältnis 1:100 mit β -Mercaptoethanol versetzt und zur Lyse auf die Zellen gegeben. Das Zell-Puffer-Gemisch wurde auf eine *gDNA Eliminator spin column* pipettiert und bei 10.000 rpm 30 Sekunden zentrifugiert um die genomische DNA aus der Probe zu entfernen. Danach wurde die Säule entsorgt. Zum Durchfluss wurden 350 µl 70% Ethanol hinzugegeben, dann auf eine *RNeasy spin column* -in einem 2 ml Sammelröhrchen stehend- gegeben und bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert. Zu diesem Zeitpunkt war die RNA an die Membran der Säule gebunden, sodass in den folgenden Waschschrritten der Durchfluss entsorgt werden konnte. Im jetzt folgenden ersten Waschschrtritt wurden zunächst 700 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl RPE Puffer, welcher zuvor mit Ethanol versetzt wurde, in die *RNeasy spin column*

pipettiert und erneut 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde anschließend wiederholt, allerdings wurde die Zentrifugationszeit auf 2 Minuten erhöht. Am Ende wurde die Membran durch 1minütiges Zentrifugieren getrocknet. Die RNA wurde durch 30 µl RNase freies Wasser von der Membran eluiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Membran gegeben um den RNA-Gehalt der Probe zu erhöhen. Die isolierte RNA wurde bei -80°C eingefroren.

4.4.2 Isolierung der RNA aus Gewebe

Zur Isolierung der RNA aus Gewebe wurde ein Gewebe-Shredder der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde eine rostfreie Stahlkugel mit einem Durchmesser von 7 mm in ein 2 ml Reaktionsröhrchen gegeben und für 15 Minuten auf Trockeneis platziert. Anschließend wurden bis zu 30 mg des frisch isolierten bzw. eingefrorenen Gewebes zusätzlich in das Gefäß gegeben und für weitere 15 Minuten auf Trockeneis gelagert. Danach wurden 350 µl des RLT-Puffers aus dem „RNeasy Plus Mini Kit“ 1:100 mit β-Mercaptoethanol versetzt, mit in das 2 ml Gefäß pipettiert und dies im Gewebe-Shredder für 5 Min bei 50 Hz geschreddert. Anschließend wurde die RNA-Isolation mit dem „RNeasy Plus Mini Kit“ wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben fortgeführt.

4.4.3 RNA-Konzentrationsmessung

Die RNA-Konzentrationsmessung wurde mittels Photometer durchgeführt. Die Probe wurde dafür 1:19 mit RNase freiem Wasser verdünnt. RNase freies Wasser wurde ebenfalls zur Einstellung des Blindwertes verwendet.

2 µl der Probe wurden auf die Messeinheit des Photometers aufgetragen. Neben der RNA-Konzentration, die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde, wurde auch die Qualität der Probe durch Berechnung des Quotienten der Wellenlängen 260 nm und 280 nm festgestellt. Dieser soll zwischen 1,8 und 2 liegen (Application Note, Eppendorf).

4.4.4 cDNA – Synthese

Mittels reverser Transkription wird durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen die isolierte RNA in komplementäre DNA umgeschrieben.

Die cDNA-Synthese wurde mithilfe des „RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits“ von Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt.

Der cDNA-Synthese Mix bestand aus:

- 2 µg RNA
- 1 µl Primer („random hexamer“)
- 4 µl 5x Reaction Buffer
- 1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)
- 2 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl Reverse Transcriptase (200 U/µl)

Der Mix wurde zunächst 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Letztendlich wurde die Probe 5 Minuten auf 70°C erhitzt und die cDNA zur Aufbewahrung bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

4.4.5 Quantitative Real-Time PCR

Durch eine quantitative Real-Time PCR kann nachgewiesen werden, ob und in welcher Menge ausgewählte Gene in der cDNA-Probe vorliegen. Die Quantität wird durch den interkalierenden Farbstoff SYBR Green, welcher fluoresziert, bestimmt. Der Anstieg des Fluoreszenz-Signals mit jedem Zyklus ist proportional zum Zuwachs der zu amplifizierenden DNA.

Der qRT-PCR Mix bestand aus:

- 2 µl cDNA (20ng/µl)
- 10 µl 2x SYBR green Mastermix
- 1 µl Primer forward (10µM)
- 1 µl Primer reverse (10µM)
- 6 µl Nuclease-freies Wasser

Die Proben wurden jeweils als Dubletten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Neben den zu untersuchenden Genen wurde auch das murine Haushaltsgen *Ppib* aufgetragen; dessen Expression ist trotz der Behandlungen konstant.

		Zeit	Temperatur
Zyklus 1	Initiale Denaturierung	3:00	95°C
Zyklus 2 (40x)	Denaturierung	0:20	95°C
	Annealing	0:20	55°C
	Extension	0:20	68°C
Zyklus 3 (87x)	Finale Verlängerung	0:10	55°C
bis Entnahme	Kühlung		4°C

Tabelle 2: qRT-Programm des Lightcyclers

Beispielhaft sind in Abbildung 9 repräsentative Schmelzkurven verschiedener Gene dargestellt.

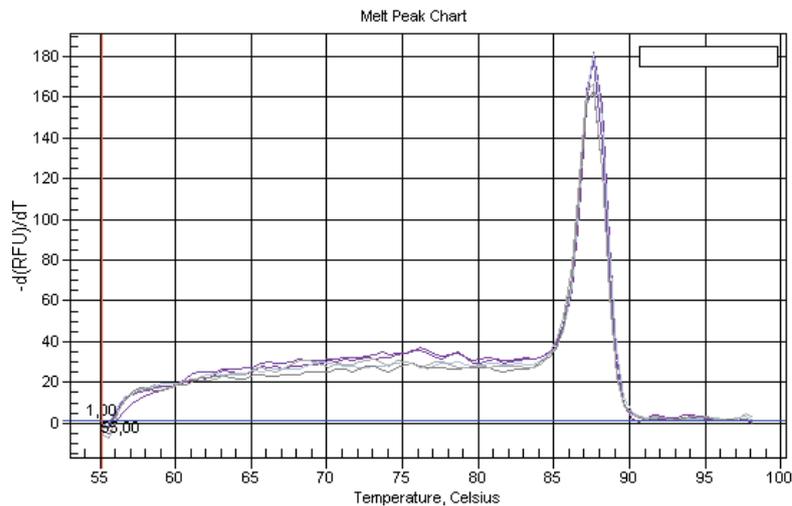


Abbildung 9: Repräsentative Schmelzkurven

Ausgewertet wurde die qRT-PCR mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Pfaffl, 2001). Der CT-Wert gibt den Beginn des exponentiellen Wachstums einer Kurve an. Für jede Probe wurde das zu untersuchende Gen auf das Haushaltsgen relativiert: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct-Gen} - \text{Ct-Ppib}$. Zur Berechnung der normalisierten Expression wurde die Probe auf die Kontrolle des jeweiligen Experiments nach folgender Formel normiert: $\Delta\Delta\text{CT} = 2^{-(\Delta\text{CT-Gen-Probe} - \Delta\text{CT-Gen-Kontrolle})}$. Werte über 1 stehen für eine vermehrte Expression des Gens, wohingegen Werte unter 1 für eine verminderte Expression des Gens sprechen (Pfaffl, 2001).

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Proteinisolation

Die isolierten Azinuszellsuspensionen wurden zunächst auf Eis gestellt, zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Der Protein-Lysepuffer setzt sich zusammen aus 200 µl Ripa-Puffer, jeweils nach Angaben des Herstellers einfach eingesetztem Proteaseinhibitor und Phosphataseinhibitor. Das Zell-Puffer-Gemisch wurde 20 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß transferiert und bei -80°C eingefroren.

4.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des „Pierce™ BCA Protein Assay Kits“ von der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zunächst wurden 2 µl der Probe 1:5 mit Ripa-Puffer verdünnt. Die BCA-Arbeitslösung bestehend aus Reagenz A und Reagenz B in einem 50:1 Verhältnis wurde in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nachdem die verdünnte Proteinprobe dazugegeben wurde, wurde die Platte 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Nachweis wird kolorimetrisch durchgeführt; die Reagenzien bilden mit den Proteinen Farbkomplexe. Je höher die Proteinkonzentration, desto höher ist auch die Anzahl der ausgebildeten Farbkomplexe. Mithilfe des Spektrophotometers wurde bei 562 nm die Absorption gemessen. Die Werte wurden mit einer Albumin-Standardkurve mit aufsteigenden Konzentrationen von 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml ausgewertet. Die Absorptionen der Probe wurde gegen die gemessene Absorption der Eichlösung aufgetragen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Geradengleichung bestimmt.

4.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Als Elektrophorese wird die Wanderung gelöster, elektrisch geladener Moleküle in einem elektrischen Feldes bezeichnet (Michov, 1996).

Dabei wurden zunächst ein 8% bzw. 12% Trenngel und für die oberen 4 cm ein grobporigeres 6% Sammelgel gegossen. Für größere Proteine wie z.B. FAK wurde ein niedrigerer prozentualer Anteil an Acrylamid verwendet. Polyacrylamid hat in der SDS-Gelelektrophorese die Funktion eines Trägermaterials; seine Konzentration bestimmt die Porengröße.

Die Proteinproben sollen zunächst im Sammelgel fokussiert und später im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden.

Das 8% Trenngel für 1 Gel bestand aus:

- 4,6 ml H₂O
- 2,7 ml 30% Acrylamidlösung
- 2,5 ml 1,5M Tris pH 8,8
- 100 µl 10% SDS
- 100 µl 10% Ammonium persulfat
- 6 µl TEMED

Das 12% Trenngel für 1 Gel bestand aus:

- 3,3 ml H₂O
- 4 ml 30% Acrylamidlösung
- 2,5 ml 1,5M Tris pH 8,8
- 100 µl 10% SDS
- 100 µl 10% Ammonium persulfat
- 4 µl TEMED

Sobald Ammoniumpersulfat und TEMED dazugegeben wurden, sollte das Trenngel aufgrund der beginnenden Polymerisation zügig zwischen die beiden Glasscheiben bis etwa 4 cm unterhalb des Glasrandes gegossen werden. Auf das Trenngel wurde eine dünne Schicht Isopropanol aufgetragen um eine glatte Kante des Gels zu erreichen. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde die Isopropanolschicht entfernt und das Sammelgel bis zur Oberkante der Glasplatte aufgetragen.

Das 6% Sammelgel für 1 Gel bestand aus:

- 1,4 ml H₂O
- 330 µl 30% Acrylamidlösung
- 250 µl 1,5M Tris pH 6,8
- 20 µl 10% SDS
- 20 µl 10% Ammonium persulfat
- 2 µl TEMED

Schließlich wurde ein Probenkamm in das flüssige Sammelgel gesteckt.

Zur Vorbereitung wurde zunächst eine innerhalb eines Experiments einheitliche Gesamtproteinkonzentration zwischen 20 µg bis 50 µg durch Verdünnung mit dem

Proteinlysepuffer hergestellt. Anschließend wurden die Proben mit β -Mercaptoethanolhaltigem 6-fach Ladepuffer Lämmli und destilliertem Wasser versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Die vorbereiteten Gele wurden in eine Elektrophorese-Kammer eingespannt, welche zuvor mit Laufpuffer gefüllt wurde und die Proben in die Geldaschen aufgetragen. In die erste Tasche wurde bei jeder Elektrophorese 5 μ l des Markers „PageRuler Plus Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter elektrischer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 30 mA für etwa eine Stunde.

4.5.4 Western Blot

Die im Gel aufgetrennten Proteine sollen im nächsten Schritt durch das Anlegen einer Spannung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Dies geschieht nach dem Prinzip des „Semidry-Blotting“. Als erstes wird die Kassette leicht mit Transferpuffer angefeuchtet. Whatman-Paper und die Nitrocellulosemembran wurden in Transferpuffer getränkt und nach dem in Abbildung 10 dargestellten Schema in der Kassette positioniert.

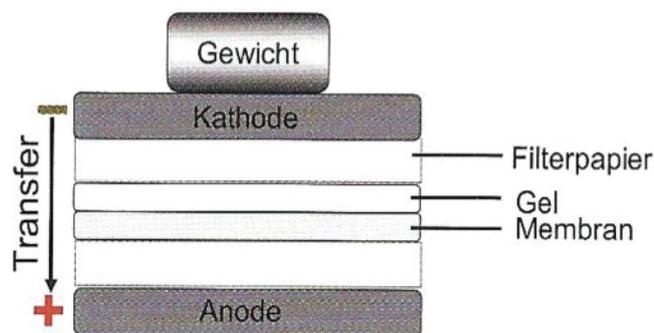


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Transfers eines Semidry-Blots
(entnommen aus (Joppien et al. 2010), mit Genehmigung des „Elsevier“ Verlages)

Wichtig ist es, vor dem Transfer die Luftblasen zwischen den „Schichten“ zu entfernen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von etwa 25 V bzw. einer Stromstärke von circa 0,3 A für 40 Minuten im „Trans-Blot Turbo Transfer System“ werden die Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran überführt.

Anschließend wurde die Membran zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen für etwa zwei Stunden bei Raumtemperatur in 5% BSA/TBS-T (TBS mit 0,1% Tween) auf dem Inkubationsschüttler blockiert. Zur Proteindetektion wurden Primär- und

Sekundärantikörper eingesetzt. Der primäre Antikörper, welcher über Nacht in 5% BSA/TBS-T bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert wurde, bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein. Am Folgetag wurde nach einem 3 x 15minütigen Waschschrift mit TBS-T, in dem nicht gebundene Antikörper entfernt wurden, der sekundäre Antikörper, gelöst in 5% Milchpulver/TBS-T, hinzugefügt. Dieser inkubiert eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler und bindet spezifisch an den Primärantikörper desselben Wirts. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein erneuter Waschschrift von 3 x 15 Minuten mit TBS, da Tween eine ausgeprägte Eigenfluoreszenz besitzt. Der Sekundärantikörper ist mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, welche später durch Bildgebung im Infrarotbereich am „LiCor-Odyssey-Imager“ ausgewertet wurden. Es wurden zum einen ein sekundärer Antikörper aus dem Kaninchen verwendet, welcher grüne Banden generiert; der verwendete sekundäre Antikörper aus der Maus zeigte ein rotes Signal.

Die Quantifizierung des Proteinexpressionslevels erfolgte mittels Normierung auf das Haushaltsprotein GAPDH.

4.6. Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung wurden mithilfe des Programms „GraphPad Prism 7“ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Im zweizeitigen ungepaarten t-Test wurde das Signifikanzniveau der Versuchsergebnisse berechnet und als resultierender p-Wert dargestellt. Je kleiner der p-Wert, desto größer ist die Evidenz gegen die Nullhypothese (Held et al., 2013). P-Werte unter 0,05 wurden in dieser Arbeit als statistisch signifikant gewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler („standard error of the mean“ (SEM)) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Caerulein-induzierte akute Pankreatitis

Zur Induktion einer akuten Pankreatitis mit starker Schädigung des exokrinen Gewebes wurden Wildtyp-Mäusen mit 8 stündlichen supramaximalen Dosen Caerulein an 2 aufeinander folgenden Tagen behandelt. Zur Überprüfung dieses Modells wurden morphologisch die Charakteristika einer akuten Inflammation, wie z.B. Infiltration von Leukozyten, Ödembildung und eine ausgeprägte Stromareaktion, überprüft.

Diese drei Zeichen einer Inflammation sind am 1. und 2. Tag nach der letzten Caerulein-Injektion - insbesondere in der HE Färbung - deutlich zu erkennen. Des Weiteren ist die Ausbildung von ADM-Formationen gut erkennbar.

Eine Immunhistochemie für Amylase, als Marker unter anderem für die Schädigung des exokrinen Kompartiments, zeigt einen Verlust von azinären Strukturen im Rahmen der akuten Inflammation. Die Färbung für CK19, als Marker für die Ausbildung von ADM-Formationen, lässt eine Zunahme an duktalem Strukturen erkennen.

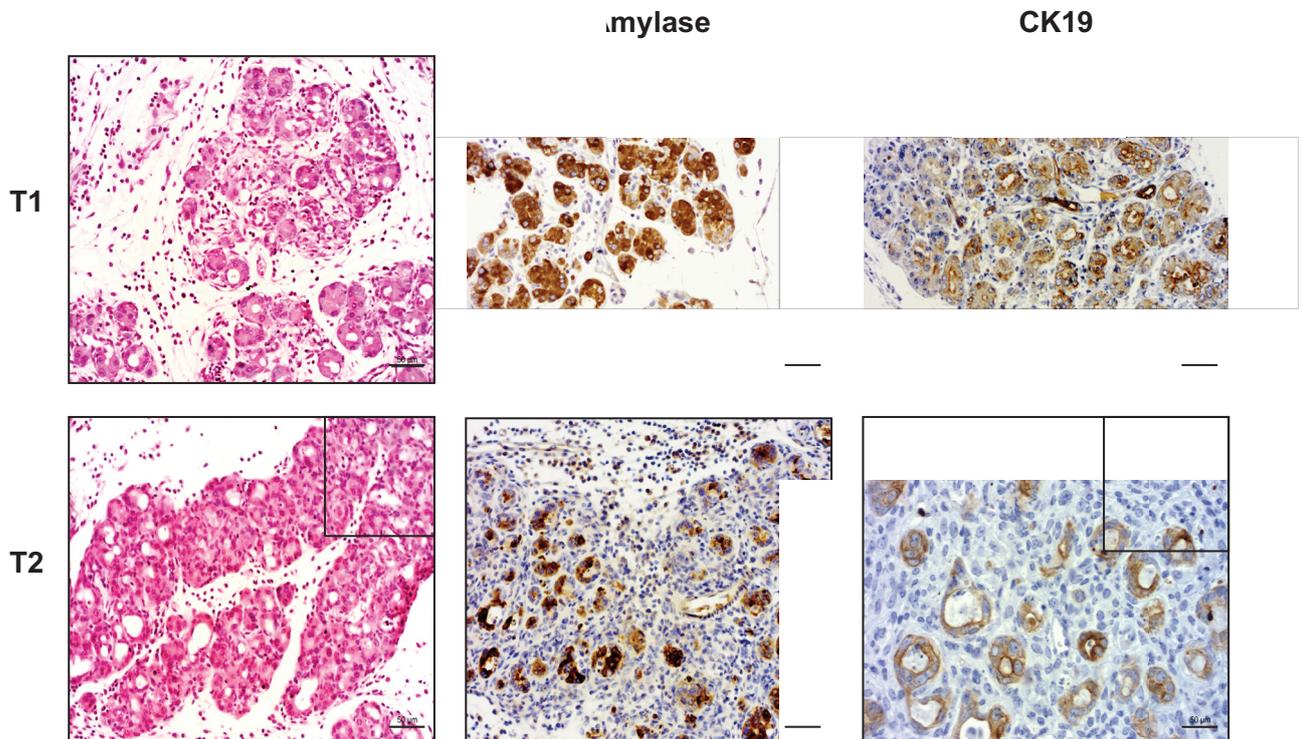


Abbildung 11: Morphologische Untersuchung der akuten Pankreatitis

Wildtyp-Mäusen wurde an 2 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 8mal 100 intraperitoneal injiziert, das Gewebe wurde 1 und 2 Tage (T1 bzw. T2) nach der Injektion in Paraffin eingebettet. Dargestellt sind repräsentative Hämatoxylin Eosin (HE)-Färbungen sowie immunhistochemische Färbungen für Amylase und CK19. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. Am rechten oberen Bildrand ist ggf. eine stärkere Vergrößerung einzelner ADM-Formationen dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass das zuvor beschriebene Modell der Injektion von supramaximalen Dosen des Cholezystokinin-Analogons Caerulein im Pankreasgewebe zu einer akuten Inflammation und zur Ausbildung von ADM-Formationen führt.

5.2 Genexpression während der akuten Pankreatitis

5.2.1 Expression von Tenascin C

Um die Relevanz des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C während der akuten inflammatorischen Phase und der Pankreasregeneration beurteilen zu können, wurde zunächst die Genexpression an verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Als Kontrolle dienen Wildtyp-Mäuse, welchen ausschließlich NaCl injiziert wurde.

Die Tenascin C-Expression steigt 24 Stunden nach der letzten Injektion sehr stark auf seinen maximalen Wert während der akuten Inflammation an. Nach etwa 48 Stunden beginnt die Organregeneration (Kong et al., 2016). Zu diesem Zeitpunkt ist das Expressionsniveau von Tenascin C bereits wieder gesunken; es fällt auch am 4. und 7. Tag, verglichen mit den Vorwerten, deutlich ab. Am 7. Tag entspricht das Expressionslevel etwa dem des Ausgangswertes an Tag 0 (siehe Abbildung 12).

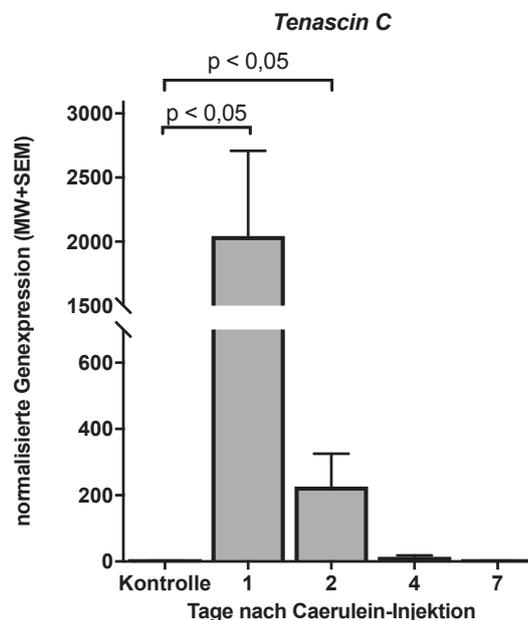


Abbildung 12: Tenascin C Expression während der Caerulein induzierten akuten Pankreatitis

Wildtyp-Mäusen wurde an 2 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 8mal 100 μg pro kg Körpergewicht Caerulein intraperitoneal injiziert. Die RNA wurde 1, 2, 4 und 7 Tage nach der letzten Injektion isoliert. Als Kontrolle dienen Wildtyp-Mäuse, welchen ausschließlich 0,9 % NaCl injiziert wurde. Die Genexpression von *Tenascin C* wurde mittels qRT-PCR analysiert. *Ppib* wurde als Haushaltsgen verwendet. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n=3.

Diese Genanalyse zeigt, dass die Tenascin C-Expression während der akuten Inflammation stark erhöht ist, im Rahmen des Regenerationsprozesses bereits absinkt und am Ende der Regeneration wieder etwa dem Kontrollwert entspricht.

Aktivierte pankreatische Stellatumzellen migrieren zum Gewebeschaden und stellen eine Sezernierungsquelle für Enzyme und extrazelluläre Matrixproteine dar (Paron et al., 2011). Sie konnten in vorangegangenen Untersuchungen explizit als Produzent von Tenascin C identifiziert werden (Esposito et al., 2006). Die immunhistochemische Untersuchung von glattmuskulärem Aktin (α -SMA), eines Markers für aktivierte Stellatumzellen, zeigte eine deutliche stromale Expression an Tag 1 und 2 (siehe Abbildung 13).

Mithilfe der Immunhistochemie für Tenascin C wurde das Protein ebenfalls an beiden Zeitpunkten nachgewiesen. Um die Lokalisation der Tenascin C-Expression genauer zu analysieren, wurde an konsekutiven Gewebeschnitten der beiden Zeitpunkte eine Elastica-van-Gieson-Färbung durchgeführt. Diese Färbung färbt Kollagenfasern, welche ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix sind, rot. Eine ähnliche Lokalisation der Kollagen- und Tenascin C-Expression konnte - wie in Abbildung 13 dargestellt - zu beiden Zeitpunkten gezeigt werden.

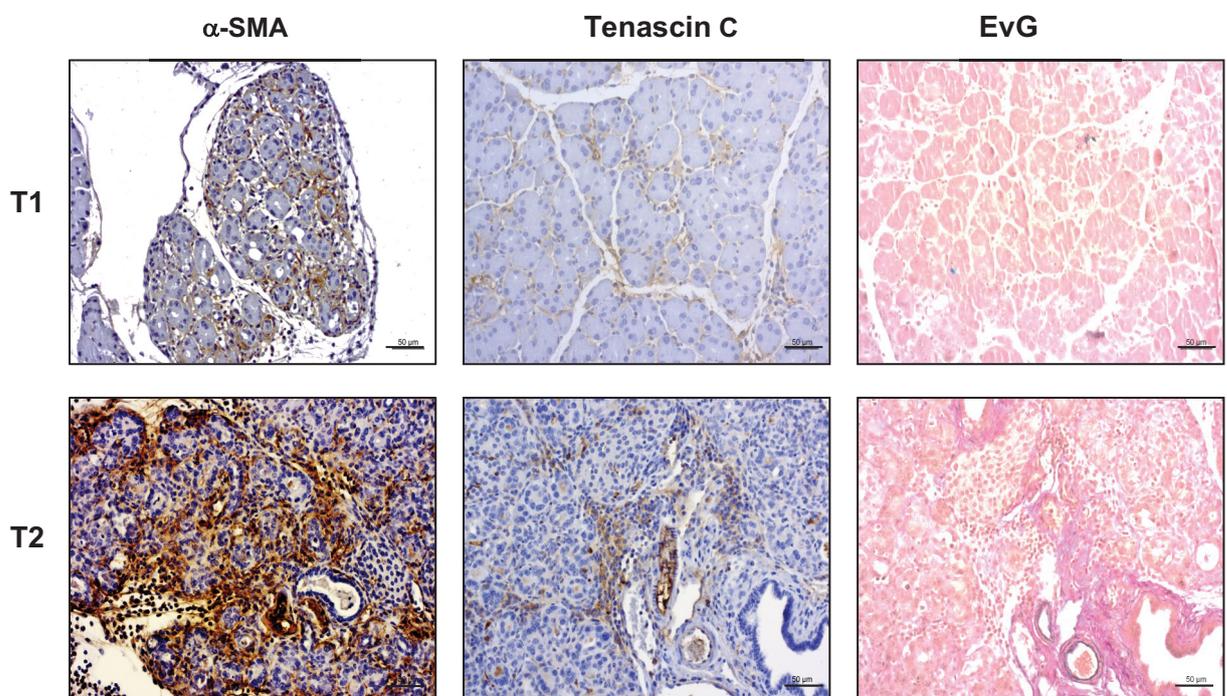


Abbildung 13: Morphologische Untersuchung der extrazellulären Matrix bei der akuten Pankreatitis

Wildtyp-Mäusen wurden an 2 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 8mal 100 µg pro kg Körpergewicht Caerulein intraperitoneal injiziert. Das Gewebe wurde am 1 und 2 Tage (T1 bzw. T2) nach der letzten Injektion entnommen und in Paraffin eingebettet. Dargestellt sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung für α -SMA und Tenascin C sowie der Elastica-van-Gieson Färbung (EvG). Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Die Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Tenascin C an stromalen Prozessen während der akuten Pankreatitis und der Regeneration.

5.2.2 Expression von Integrinrezeptoren

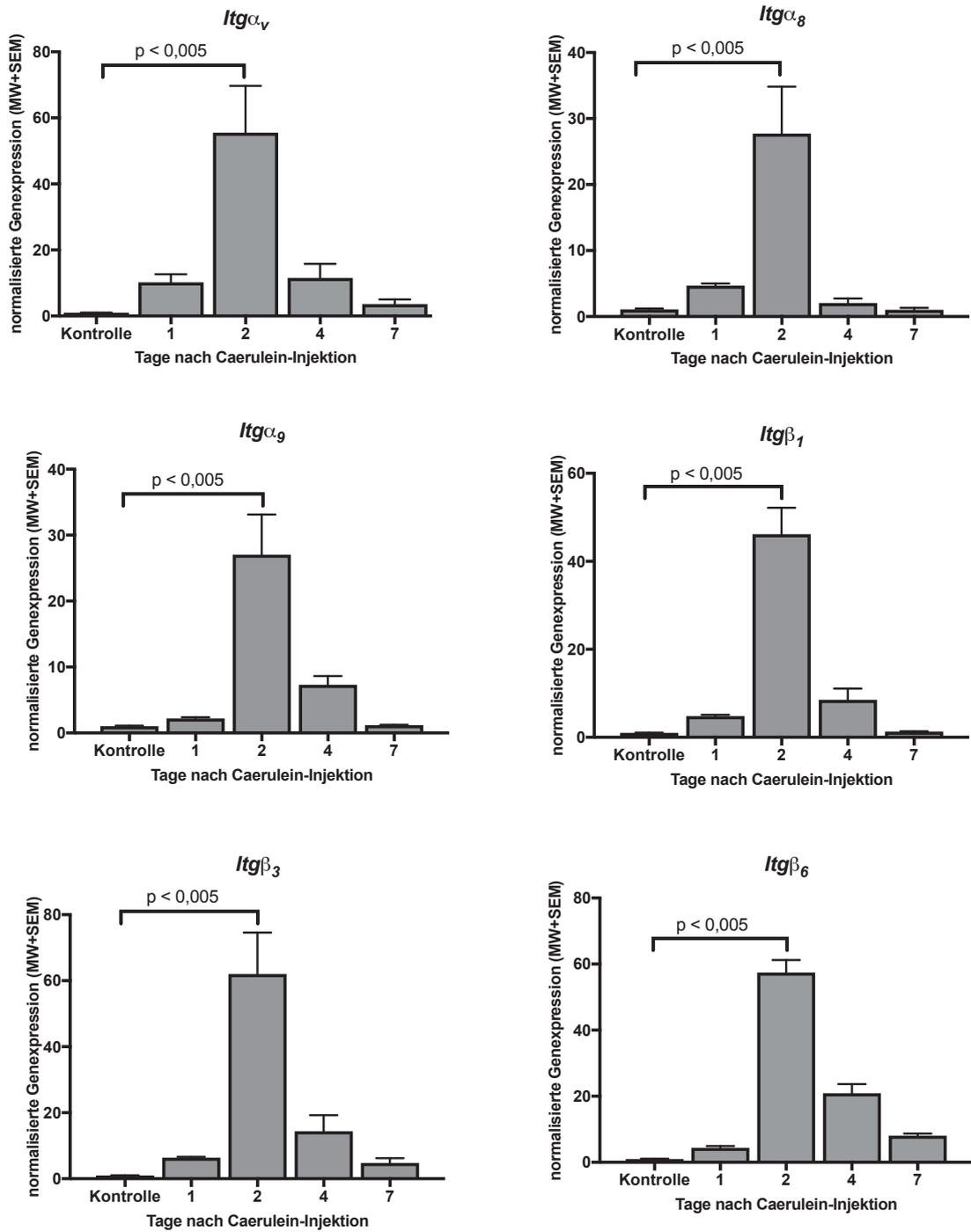
Aufgrund der zuvor gezeigten Überexpression von Tenascin C, wurde im nächsten Schritt eine Analyse der Expression von Signalwegskomponenten angestrebt. Wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben bindet Tenascin C an verschiedene Integrin-Rezeptoren ($\alpha_9\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_V\beta_6$).

Deshalb wurde untersucht, wie sich die Expression dieser Integrinrezeptoren während der Phasen der akuten Inflammation und der Regeneration verhält.

Als Kontrolle dienen Wildtyp-Mäuse, welchen ausschließlich NaCl injiziert wurde.

Die Expression der Integrinuntereinheiten α_V , α_8 , α_9 , β_1 , β_3 und β_6 steigt in den ersten beiden Tagen signifikant an und erreicht ihren maximalen Wert 48 Stunden nach der letzten Caerulein-Injektion. Wie in Abbildung 14A erkennbar, ist an den späteren beiden Zeitpunkten die Expression bereits wieder abgefallen. α_8 , α_9 und β_1 erreichen am 7. Tag etwa wieder das Ausgangsniveau, während α_V , β_3 und β_6 auch zu diesem Zeitpunkt noch eine leicht erhöhte Expression aufweisen. Analysen auf Proteinebene des Gewebes weisen am 1. und 2. Tag mittels immunhistochemischer Färbung für die beiden Integrinuntereinheiten β_3 und β_6 ebenfalls eine induzierte Expression nach Caeruleingabe auf. Eine deutliche erhöhte Expression der beiden Integrinuntereinheiten β_3 und β_6 am 2. Tag verglichen mit dem 1. Tag ist auch in der Immunhistochemie, dargestellt in der Abbildung 14B, zu erkennen. Die Lokalisation der Integrinrezeptoren ist hauptsächlich im periazinären und intralobulären Stroma.

A



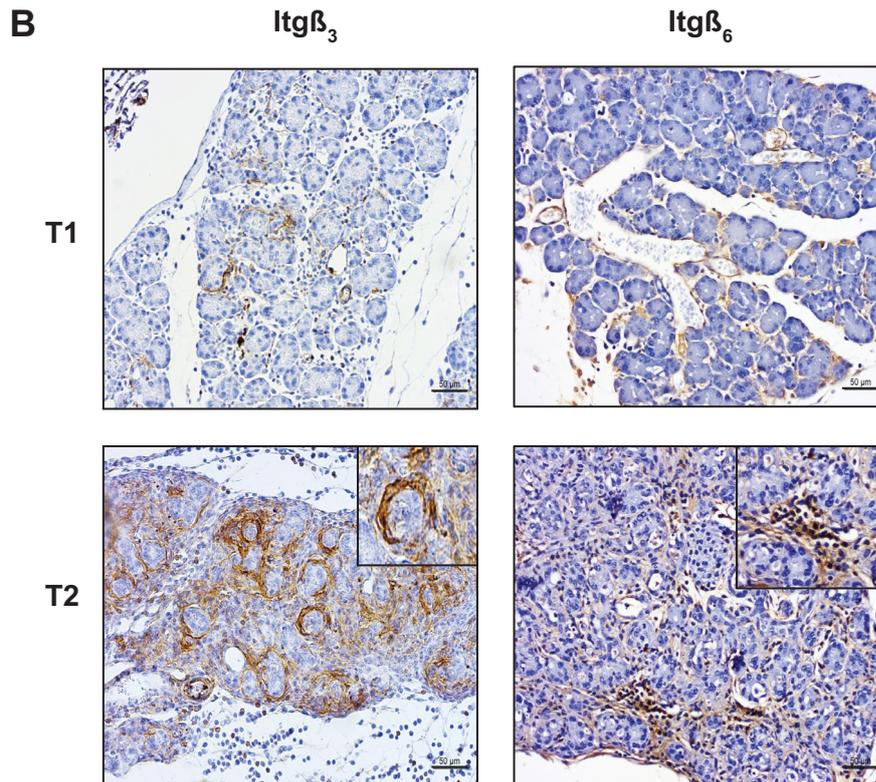


Abbildung 14: Integrinexpression während der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis

Wildtyp-Mäusen wurde an 2 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 8mal 100 μg pro kg Körpergewicht Caerulein intraperitoneal injiziert.

Abb. 14A: Die RNA wurde 1, 2, 4 und 7 Tage nach der letzten Injektion isoliert. Als Kontrolle dienen Wildtyp-Mäuse, welchen ausschließlich 0,9 % NaCl injiziert wurde. Die Genexpression der Integrin (Itg)-Untereinheiten α_4 , α_6 , α_9 , β_1 , β_3 und β_6 wurde mittels qRT-PCR analysiert. *Ppib* wurde als Haushaltsgen verwendet. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n = 3.

Abb. 14B: Das Gewebe wurde 1 und 2 Tage (T1 bzw. T2) nach der letzten Injektion entnommen und in Paraffin eingebettet. Dargestellt sind repräsentative immunhistochemische Färbungen der Integrin-Untereinheiten β_3 und β_6 . Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . Am linken oberen Bildrand ist ggf. eine stärkere Vergrößerung dargestellt.

Die gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass die Integrinrezeptoren - ähnlich wie Tenascin C - während der akuten Phase der Pankreatitis deutlich vermehrt exprimiert sind und im Laufe der Regeneration wieder abfallen.

5.2.3 Expression von pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgenen

Um zu sehen, ob die vermehrte Expression der Integrinrezeptoren sich auch auf den Zellstatus auswirkt, wurden verschiedene pankreatische Progenitor- und Differenzierungsgene während der akuten Inflammation und der Regeneration analysiert. Außerdem zeichnen sich ADM, welche Bestandteile des Regenerationsprozesses sind, unter anderem durch die Re-Expression von Progenitorgenen aus (Jensen et al., 2005).

Als Kontrolle dienen Wildtyp-Mäuse, welchen ausschließlich NaCl injiziert wurde.

Pdx1, *Bmi1* und *Ring1b* wurden als repräsentative pankreatische Progenitorgene ausgewählt (Cano et al., 2007, Martínez-Romero et al., 2009). Alle drei Gene zeigen einen Anstieg des Expressionsniveaus bereits einen Tag nach der letzten Caerulein-Induktion. Ihr Maximum erreichen sie während der akuten Inflammation in der Probe nach 48 Stunden, der Anstieg ist signifikant gegenüber der Kontrolle (siehe Abbildung 15). Im Laufe der anschließenden Regenerationsphase sinkt die Expression aller 3 Progenitorgene. Während *Pdx1* am Ende des Regenerationsprozesses etwa auf das Expressionslevel der Kontrolle abfällt, bleibt die Expression von *Bmi1* und *Ring1b* auch nach 7 Tagen noch erhöht.

Als Differenzierungsgene wurden *Hes1* und *Sox9* ausgewählt, welche auch als Marker für duktaile Strukturen und für die ADM-Bildung gelten (Wong et al., 2016). Das Expressionsverhalten der Differenzierungsgene ist dem der Progenitorgene sehr ähnlich. Auch *Hes1* und *Sox9* haben ihre höchste Expression 48 Stunden nach der letzten Caerulein-Injektion. Beide Differenzierungsgene haben am Ende der Regenerationsphase am 7. Tag in etwa das Ausgangsniveau der Kontrolle erreicht.

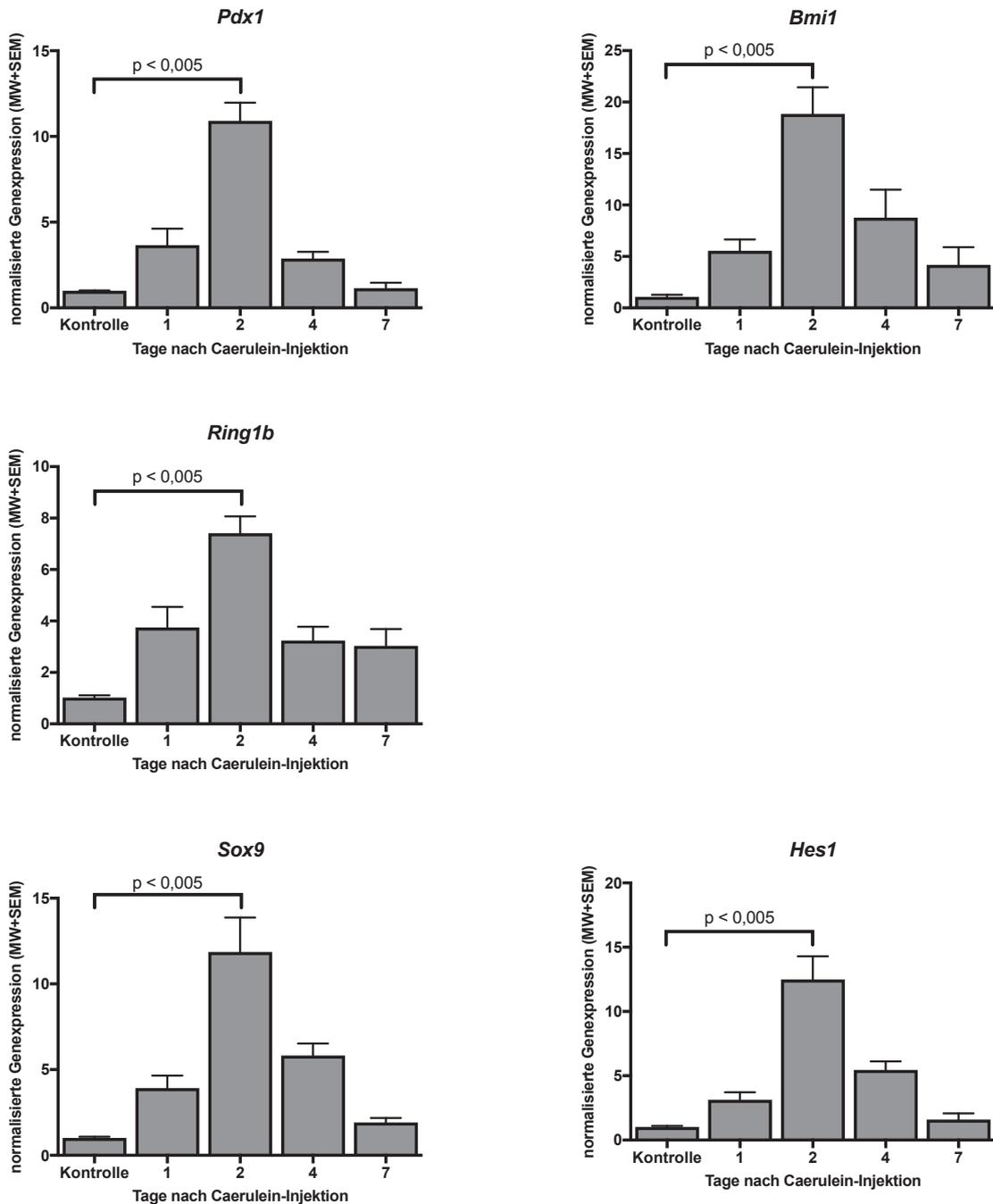


Abbildung 15: Expression von Progenitor- und Differenzierungsgenen während der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis

Wildtyp-Mäusen wurde an 2 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 8mal 100 μg pro kg Körpergewicht Caerulein intraperitoneal injiziert. Die RNA wurde 1, 2, 4 und 7 Tage nach der letzten Injektion isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als Kontrolle dienen Wildtyp-Mäuse, welchen ausschließlich 0,9 % NaCl injiziert wurde. Die Genexpression von *Pdx1*, *Bmi1*, *Ring1b*, *Sox9* und *Hes1* wurde mittels qRT-PCR analysiert. *Ppib* wurde als Haushaltsgen verwendet. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n=3.

Dieser Versuch hat gezeigt, dass der Prozess der akuten Inflammation im Pankreas nicht nur die Expression des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C und der Integrinrezeptoren beeinflusst, sondern auch auf den Zellstatus einen Einfluss hat. Es steigt während der Pankreatitis sowohl die Expression von Progenitor- als auch von

Differenzierungsgenen signifikant. Im Laufe der Regeneration nehmen die Zellen wieder in etwa den Ausgangszellstatus ein.

5.3 Einfluss von Tenascin C auf Azinuszellsuspensionen

5.3.1 Einfluss auf die Integrinrezeptoren

Um einen möglichen Einfluss von Tenascin C auf die Expression der Integrinuntereinheiten zu untersuchen wurde ein *in vitro* Modell mit Azinussuspensionszellen angewandt. Der Verdacht eines Zusammenhangs besteht, da - wie zuvor dargestellt - sowohl Tenascin C als auch die Integrinrezeptoren, an welche das extrazelluläre Matrixprotein bindet, während der akuten Pankreatitis vermehrt exprimiert werden.

Das *in vitro* eingesetzte humane rekombinante Protein Tenascin C ist sehr stabil, weshalb auch noch nach 120 Stunden von einem Effekt auf die Azinuszellsuspension ausgegangen werden kann. Durch eine tägliche Behandlung mit dem Protein verändern sich die Ergebnisse nicht.

Nach 24 Stunden zeigen die Integrinuntereinheiten α_V , α_8 und β_6 eine konzentrationsabhängige Zunahme der Expression; je höher die eingesetzte Tenascin C-Konzentration, desto höher die Expression. Bei den Rezeptoren β_1 und β_3 steigt die Expression erst bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$. Das Expressionsniveau des Integrins α_9 steigt nach 24 Stunden durch eine Tenascin C-Behandlung nicht an.

Nach 72 Stunden steigt die Expression fast aller Integrinrezeptoren konzentrationsabhängig an; erneut gilt: je höher die verwendete Tenascin C-Konzentration desto höher die Integrinexpression. Einzig die Integrinunterheit β_6 zeigt einer Stagnation auf einem niedrigen Niveau verglichen mit den Tenascin C-behandelten Proben nach 24 Stunden. Das Expressionslevel ist nach 72 Stunden bei den Untereinheiten α_V und β_1 niedriger und bei α_9 und β_3 höher verglichen mit den Werten nach 24 Stunden. Beim Integrinrezeptor α_8 ist die Expression der Kontrolle und der Probe, die mit einer Tenascin C-Konzentration von 100 ng/ml behandelt wurde, niedriger; die Probe, die mit der höheren Tenascin C-Konzentration behandelt wurde, weist eine höhere Expression verglichen mit dem Niveau der Proben nach 24 Stunden auf.

Nach 120 Stunden weisen - mit Ausnahme von α_V - die untersuchten Integrinuntereinheiten ein niedrigeres Expressionsniveau auf als nach 24 oder 72 Stunden. Der α_V -Rezeptor weist nach 120 Stunden ein niedrigeres Expressionsniveau als nach 24 auf, allerdings ist dies höher als das nach 72 Stunden gemessene Niveau. Das Expressionslevel aller analysierten Integrinrezeptoren ist zu diesem Zeitpunkt ebenfalls konzentrationsabhängig; allerdings gilt hier: je höher die Tenascin C-Konzentration desto niedriger die Integrinexpression (siehe Abbildung 16).

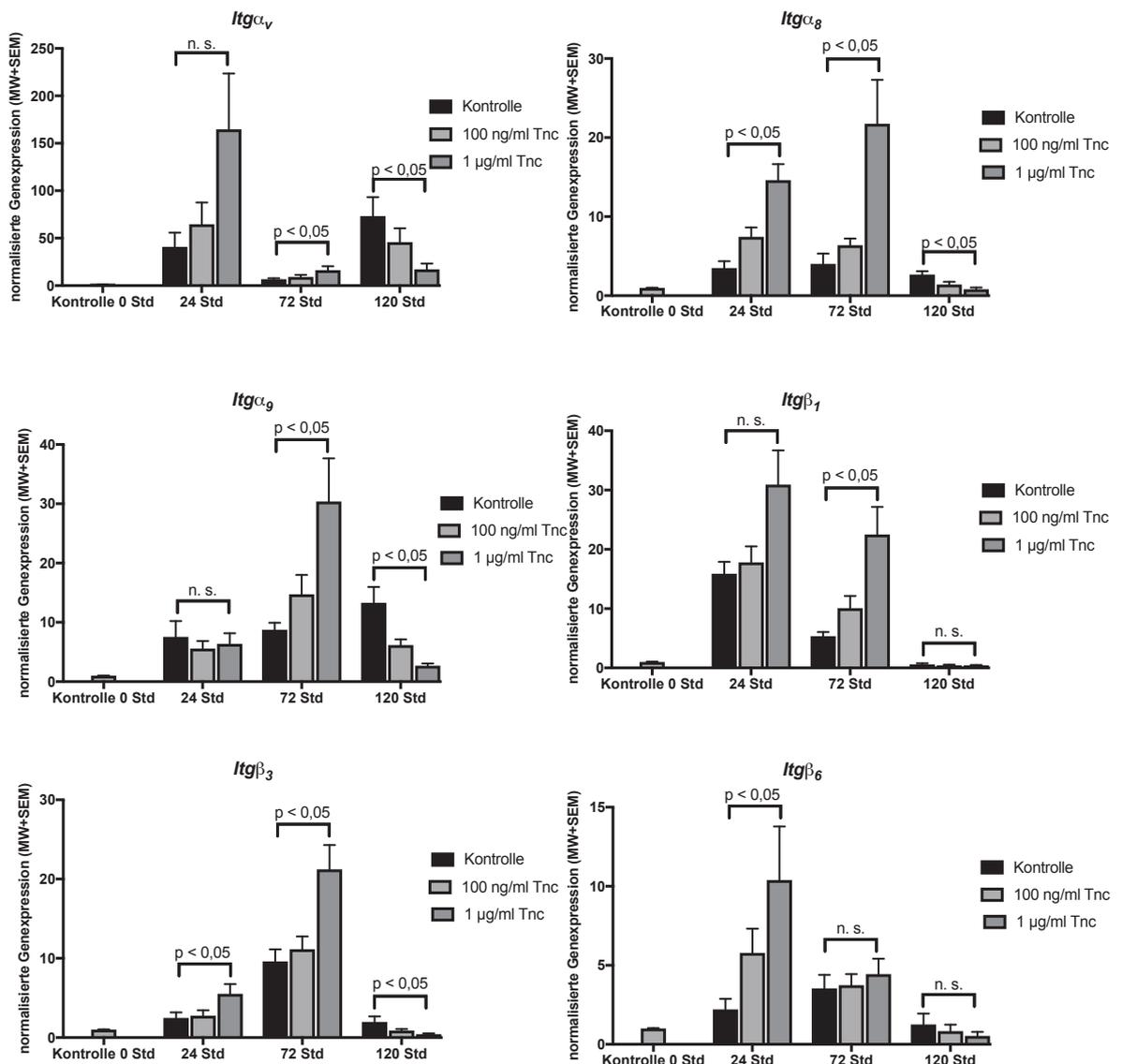


Abbildung 16: Integrinexpression in mit Tenascin C behandelte Azinuszellsuspensionen

Azinuszellen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert und anschließend in Suspensionszellkultur mit 5% FCS aufgenommen. Die Azinuszellsuspensionen wurden mit 100 ng/ml bzw. 1 µg/ml rekombinantem humanem Tenascin C (Tnc) behandelt. Nach 24, 72 und 120 Stunden wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR für die Integrin-Untereinheiten α_V , α_8 , α_9 , β_1 , β_3 und β_6 durchgeführt. Als Kontrolle dienen zum einen unbehandelte Azinuszellen, bei welchen die RNA direkt nach der Zellisolation isoliert wurde (0 Std), und zum anderen Azinuszellsuspensionen, bei welchen die RNA 24, 72 bzw. 120 Stunden nach der Zellisolation isoliert wurde. Als Haushaltsgen wurde *ppib* eingesetzt. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n. s. = nicht signifikant. n = 6.

Zusammenfassend kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass der Effekt von Tenascin C auf die Integrinrezeptoren sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ist. Grob ist nach 24 und 72 Stunden ein positiv konzentrationsabhängiger Zusammenhang auf einem höheren Expressionsniveau zu verzeichnen, während nach 120 Stunden ein negativ konzentrationsabhängiger Zusammenhang auf einem niedrigeren Expressionslevel nachweisbar ist. Allerdings zeigen die Integrinuntereinheiten keine einheitliche Reaktion auf die Behandlung mit dem extrazellulären Matrixmolekül, sowohl das Expressionsmuster als auch das Expressionslevel sind heterogen.

5.3.2 Einfluss auf den pankreatischen Progenitor- und Differenzierungszellstatus

In vorangegangenen Untersuchungen von Pinho et al. konnte gezeigt werden, dass Azinuszellen in Suspensionskultur in einen Progenitor-ähnlichen Status dedifferenzieren (Pinho et al., 2010). Mit Hilfe dieses Modells soll der Einfluss von Tenascin C auf die Ausbildung des Progenitor- und Differenzierungsstatus *in vitro* genauer untersucht werden.

Es konnte bestätigt werden, dass die Progenitor- und Differenzierungsgene in Azinussuspensionzellen gegenüber nativen Azinuszellen vermehrt exprimiert werden (Abbildung 17).

Bei allen untersuchten Genen (*Pdx1*, *Bmi1*, *Ring1b*, *Sox9* und *Hes1*) zeigt sich nach 24 Stunden eine konzentrationsabhängige Expression; je höher die eingesetzte Tenascin C-Konzentration desto niedriger die Expression.

Ebenfalls bei allen 5 Genen konnte ein umgekehrter Effekt sowohl nach 72 als auch nach 120 Stunden festgestellt werden. Zu diesen Zeitpunkten ist das Expressionsniveau aller Gene höher als nach 24 Stunden und es besteht ein positiv konzentrationsabhängiger Einfluss von Tenascin C; wurde eine höhere Konzentration eingesetzt, führt dies zu einer höheren Expression der Progenitor- und Differenzierungsgene.

Die Höhe der normalisierten Genexpression von *Pdx1*, *Bmi1*, *Ring1b*, *Sox9* und *Hes1* unterscheidet sich zwischen den beiden Zeitpunkten 72 und 120 Stunden kaum. Einzig bei *Pdx1* lässt sich eine etwas niedrigere Expression der mit 1 µg/ml Tenascin C behandelten Probe nach 120 Stunden verzeichnen. Bei den beiden

Differenzierungsgenen *Sox9* und *Hes1* ist die Höhe der Expression nach 120 Stunden in beiden mit dem rekombinanten humanen Tenascin C behandelten Proben höher verglichen mit den gleichbehandelten Proben nach 72 Stunden.

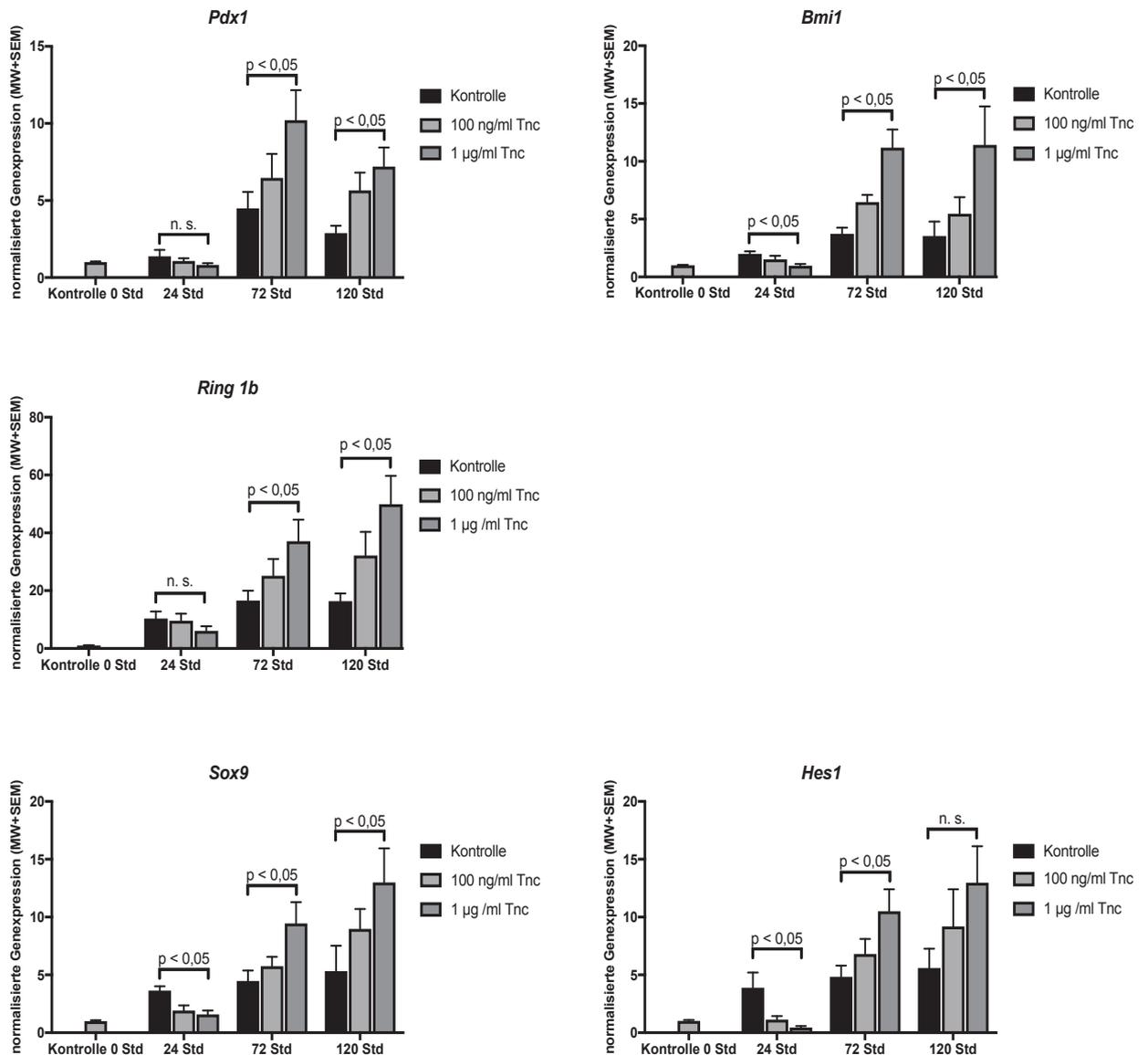


Abbildung 17: Progenitor- und Differenzierungsstatus in mit Tenascin C behandelten Azinuszellsuspensionen
Azinuszellen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert und anschließend in Suspensionszellkultur mit 5% FCS aufgenommen. Die Azinuszellsuspensionen wurden mit 100 ng/ml bzw. 1 µg/ml rekombinanten humanen Tenascin C (Tnc) behandelt. Nach 24, 72 und 120 Stunden wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR für die Gene *Pdx1*, *Bmi1*, *Ring1b*, *Sox9* und *Hes1* durchgeführt. Als Kontrolle dienen zum einen unbehandelte Azinuszellen, bei welchen die RNA sofort nach der Zellisolierung isoliert wurde (0 Std), zum anderen Azinuszellsuspensionen, bei welchen die RNA 24, 72 bzw. 120 Stunden nach der Zellisolierung isoliert wurde. Als Haushaltsgen wurde *ppib* eingesetzt. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n. s. = nicht signifikant. n = 6.

Die Progenitor- und Differenzierungsgene zeigen ebenfalls einen sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängigen Einfluss von Tenascin C. Allerdings ist dieser - gegensätzlich zu den Integrinrezeptoren - nach 24 Stunden konzentrationsabhängig inhibierend und an beiden späteren Zeitpunkten konzentrationsabhängig fördernd.

5.3.3 Einfluss auf den pankreatischen Progenitor- und Differenzierungszellstatus nach der Behandlung mit einem Integrininhibitor

Um zu sehen, ob das gegenläufige zeitliche Expressionsmuster der Integrinuntereinheiten und der pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgene in den mit Tenascin C behandelten Azinuszellsuspensionen im Zusammenhang stehen, wurden die Proben mit dem extrazellulären Matrixmolekül und zusätzlich mit dem Integrininhibitor SB273005 behandelt.

Der Integrininhibitor inhibiert laut Herstellerangaben unter anderem den α_V -Rezeptor, welcher - wie in Abbildung 16 dargestellt - ein ausgesprochen hohes Expressionsniveau nach der Behandlung mit Tenascin C erreicht.

Es wurde in diesem Experiment der Zeitpunkt nach 24 Stunden untersucht. Wie bereits in Kapitel 5.3.2 beschrieben, hat die alleinige Behandlung mit Tenascin C zu diesem Zeitpunkt einen konzentrationsabhängig inhibierenden Einfluss auf die Expression der pankreatischen Progenitorgene *Pdx1*, *Bmi1* und *Ring1b* sowie der Differenzierungsgene *Sox9* und *Hes1*.

Durch die zusätzliche Behandlung mit dem Integrininhibitor SB273005 wurde dieser Effekt bei *Pdx1* und *Bmi1* aufgehoben. Tenascin C hat nun einen konzentrationsabhängig fördernden Einfluss; bei beiden eingesetzten Konzentrationen des rekombinanten humanen Proteins zeigen die Proben mit dem Inhibitor ein deutlich höheres Expressionslevel. In den Kontrollen wurde durch die alleinige Behandlung mit dem Integrininhibitor kein Expressionsunterschied festgestellt.

Für das pankreatische Progenitorgen *Ring1b* konnte erst bei einer Tenascin C-Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikant höhere Expression durch die additive Behandlung mit SB273005 gemessen werden; bei der Kontrolle und einer eingesetzten Tenascin C-Konzentration von 100 ng/ml wurde kein Expressionsunterschied durch die Hinzugabe des Integrininhibitor festgestellt.

Bei den Differenzierungsgenen *Sox9* und *Hes1* wurde in der Kontrolle ein niedrigeres, in den beiden mit Tenascin C behandelten Proben ein höheres Expressionsniveau durch die Behandlung mit dem Integrininhibitor nachgewiesen werden.

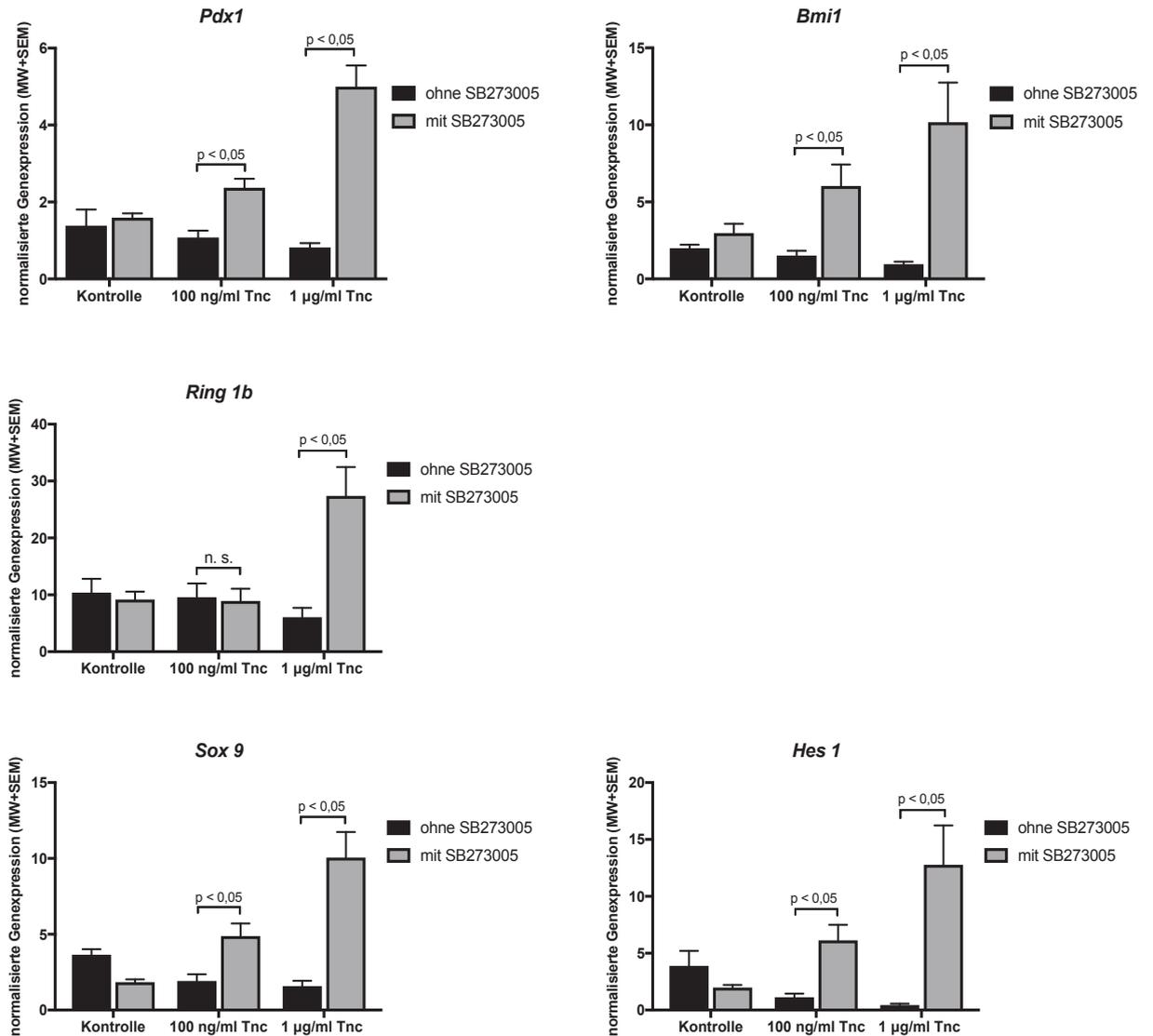


Abbildung 18: Progenitor- und Differenzierungsstatus in mit 24 Stunden mit Tenascin C und SB273005 behandelten Azinuszellsuspensionen

Azinuszellen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert und anschließend in Suspensionszellkultur mit 5% FCS aufgenommen. Die Azinuszellsuspensionen wurden mit 100 ng/ml bzw. 1 µg/ml rekombinantem humanem Tenascin C (Tnc) und 10 µM des Integrininhibitors SB273005 behandelt. Nach 24 Stunden wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR für die Gene *Pdx1*, *Bmi1*, *Ring1b*, *Sox9* und *Hes1* durchgeführt. Als Kontrolle dienen zum einen unbehandelte Azinuszellsuspensionen und ausschließlich mit 10 µM SB273005 behandelte Azinuszellsuspensionen. Bei beiden Kontrollen wurde die RNA ebenfalls nach 24 Stunden isoliert. Als Haushaltsgen wurde *ppib* eingesetzt. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n. s. = nicht signifikant. n = 6.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass sich der in Kapitel 5.3.2 dargestellte konzentrationsabhängig inhibierende Einfluss von Tenascin C auf repräsentativ ausgewählte pankreatische Progenitor- und Differenzierungsgene durch die zusätzliche Behandlung mit dem Integrininhibitor SB273005 in einen konzentrationsabhängig fördernden Effekt umwandelt. Ein Zusammenhang zwischen der Signalwegsaktivität und dem Zellstatus konnte in diesem Experiment nachgewiesen werden.

5.4 Signalwegsaktivität nach Tenascin C-Behandlung

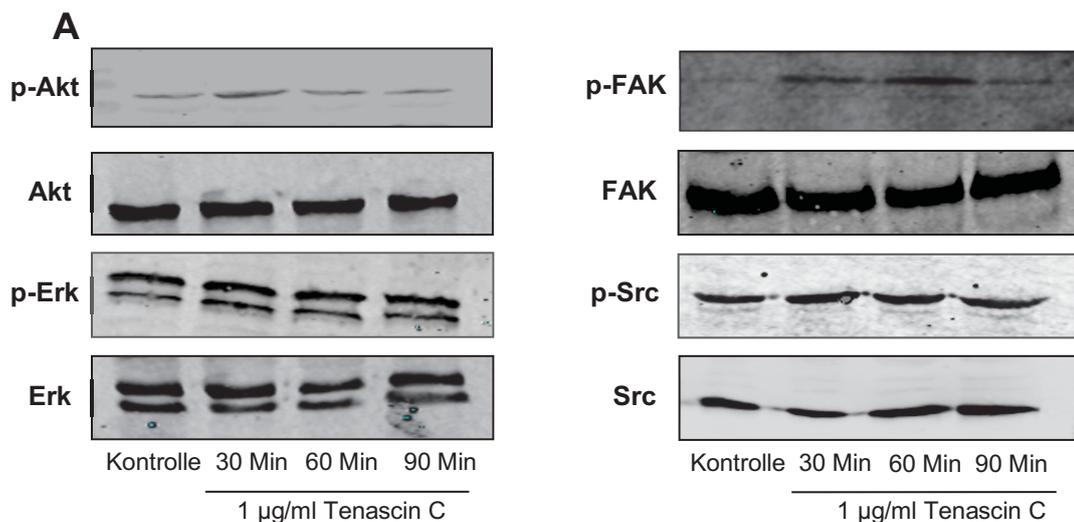
Um zu sehen, welche Signalwege Tenascin C aktiviert, wurden Proteine aus dem MAP-Kinase-, PI3K-Akt- und Integrin-vermittelten Signalweg in mit Tenascin C behandelten Azinuszellsuspensionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung analysiert. Es wurden sehr kurze Zeiträume (30, 60 und 90 Minuten) gewählt, da das Phosphorylierungslevel schnell absinkt. Über diesen Zeitraum bleibt die Expression der unphosphorylierten Proteinform konstant, sodass die Expression auf diese, wie in Abbildung 19B dargestellt, normiert wurde.

P-Akt, ein Protein aus dem PI3K-Akt Signalweg, erreicht seine maximale Expression 30 Minuten nach der Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Tenascin C. Die Expression fällt nach 60 Minuten ab und sinkt nach 90 Minuten weiter. Nach 90 Minuten ist etwa das Expressionslevel der unbehandelten Kontrolle erreicht.

P-Erk, ein Protein aus dem MAP-Kinase-Signalweg, zeigt zu keinem Zeitpunkt nach der Tenascin C-Behandlung einen signifikanten Anstieg oder Abfall der Expression.

Das Expressionslevel von **p-FAK**, einem Protein aus dem Integrin-vermittelten Signalweg, steigt nach 30 und noch weiter nach 60 Minuten signifikant an verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Nach 90 Minuten ist ein deutlicher Abfall der Proteinexpression zu erkennen.

P-Src, ebenfalls ein Protein aus dem Integrin-vermittelten Signalweg, zeigt einen signifikanten Expressionsanstieg nach 30 Minuten. Das Expressionslevel ist nach 60 Minuten noch weiter erhöht nachweisbar und stagniert in dieser Höhe nach 90 Minuten.



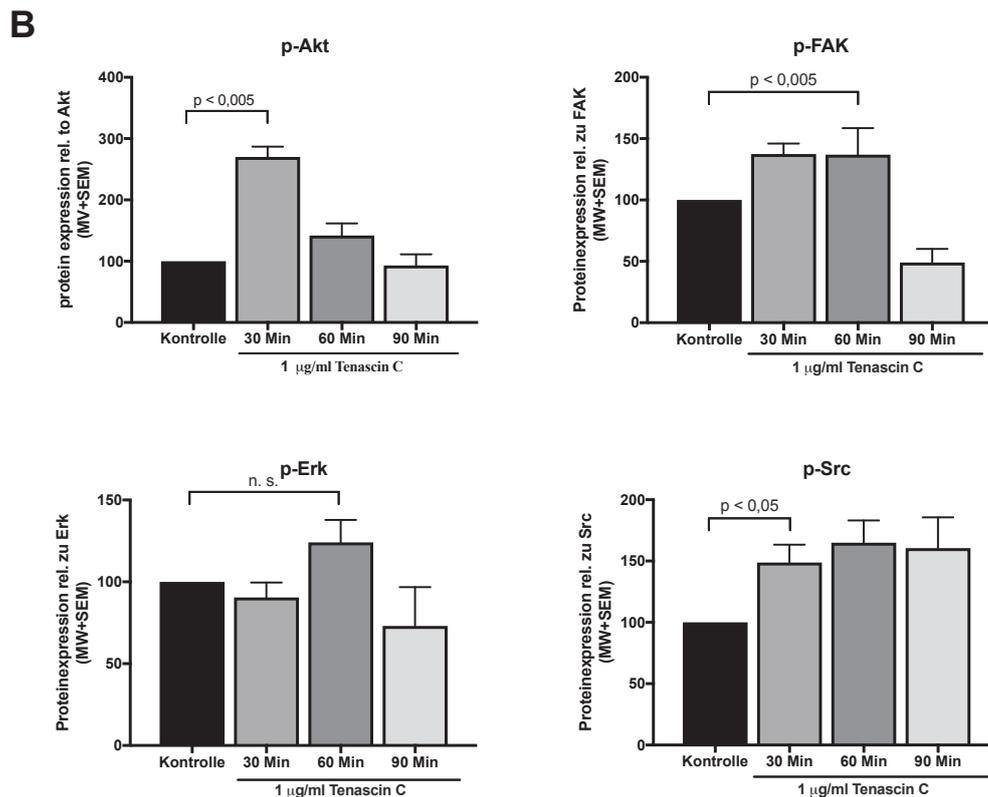


Abbildung 19: Aktivität von p-Akt, p-Erk, p-FAK und p-Src in Azinuszellen nach Tenascin C-Behandlung

Azinuszellen von Wildtyp-Mäusen wurden isoliert, 3 Stunden im Kulturmedium mit 1% FCS bei 37°C inkubiert und 30, 60 bzw. 90 Minuten lang mit 1 µg/ml rekombinatem humanem Tenascin C behandelt. Anschließend wurden Proteine isoliert und Western Blot Analysen durchgeführt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Azinuszellen. $n \geq 4$.

Abb. 19A: Dargestellt sind repräsentative Western Blots für p-Akt, Akt, p-Erk, Erk, p-FAK, FAK, p-Src und Src.

Abb. 19B: Proteinexpression von p-Akt, p-Erk, p-FAK und p-Src wurde quantitativ relativ zur jeweiligen unphosphorylierten Proteinform analysiert. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n. s. = nicht signifikant.

In diesem Experiment konnte eine Aktivierung von p-Akt aus dem PI3k-Akt-Signalweg sowie von p-FAK und p-Src aus dem Integrin-vermittelten Signalweg durch die Behandlung mit Tenascin C gezeigt werden.

5.4.1 Einfluss auf die längerfristige Expression der Proteine Akt, FAK und Src

Um zu sehen, ob die dargestellten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nach der Tenascin C-Behandlung in der Genexpression auch einen Einfluss auf die Gesamtmenge der Signalwegs-Kinasen haben, wurden Analysen der Proteine Akt, FAK und Src in Azinuszellsuspensionen durchgeführt.

Akt zeigt weder nach 24 noch nach 120 Stunden eine signifikante Veränderung der Expression durch die Tenascin C-Behandlung, was in Abbildung 20 durch einen

repräsentativen Western Blot und die quantitative Auswertung relativ zum Haushaltsgen GAPDH dargestellt ist.

Die **FAK** Expression wird nach 24 Stunden durch die Behandlung mit 100 ng/ml Tenascin C kaum beeinträchtigt, während die Behandlung mit 1 µg/ml des rekombinanten Proteins zu einer verminderten Expression führt. Nach 120 Stunden zeigt sich eine konzentrationsabhängige verstärkte Expression des Proteins FAK; je höher die Tenascin C-Konzentration ist, desto höher ist die Proteinexpression.

Auf das Protein **Src** hat die Behandlung mit beiden Konzentrationen des extrazellulären Matrixproteins nach 24 Stunden keine signifikante Auswirkung. Nach 120 Stunden hingegen führen beide eingesetzten Tenascin C Konzentrationen zu einer etwa gleichwertig erhöhten Expression von Src.

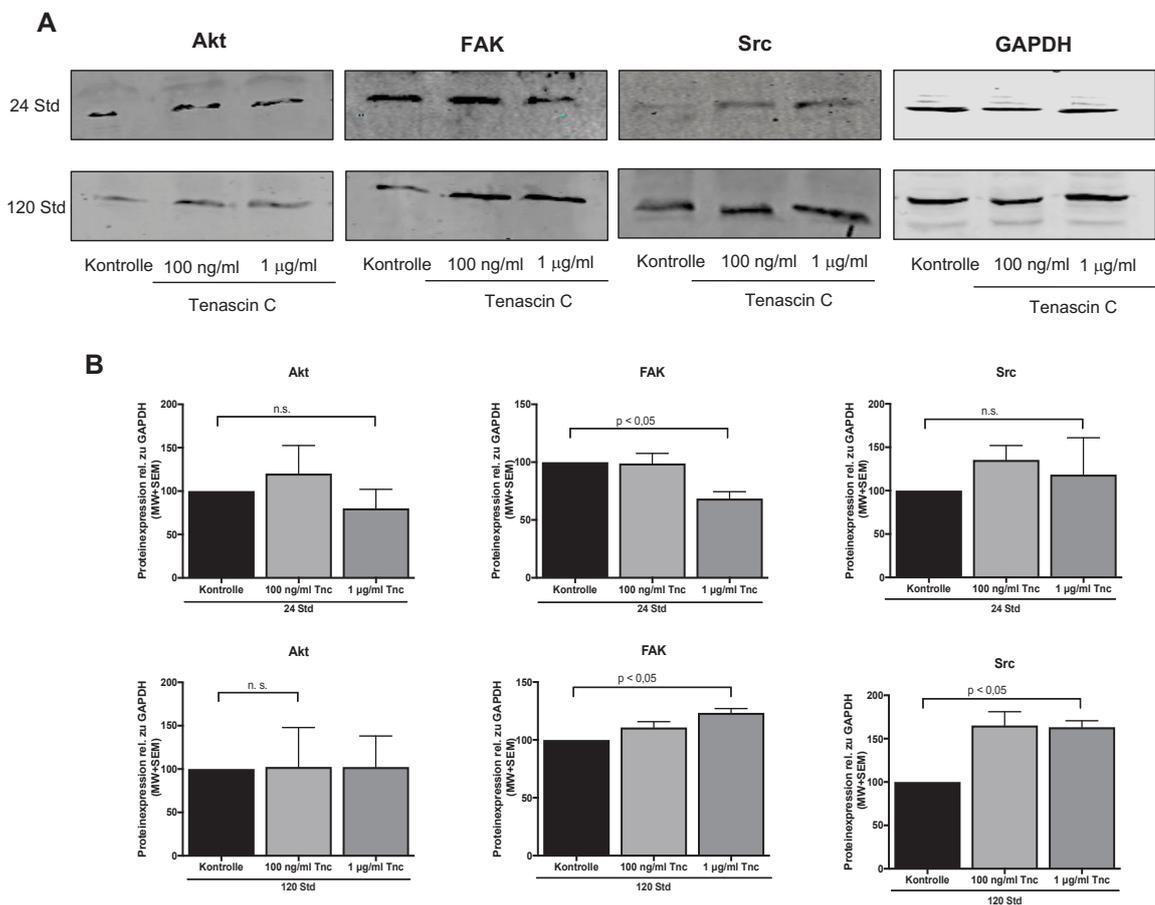


Abbildung 20: Expression der Proteine Akt, FAK und Src in 24 und 120 Stunden mit Tenascin C behandelten Azinuszellsuspensionen

Azinuszellen von Wildtyp-Mäusen wurden isoliert, mit 100 ng/ml bzw. 1 µg/ml rekombinantem humanem Tenascin C behandelt und 24 bzw. 120 Stunden lang in Kulturmedium mit 5% FCS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Proteine isoliert und Western Blot Analysen durchgeführt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Azinuszellsuspensionen. Als Haushaltsgen wurde GAPDH eingesetzt; n = 3

Abb. 20A: Dargestellt sind repräsentative Western Blots für Akt, FAK, Src und GAPDH jeweils nach 24 und 120 Stunden Inkubationszeit.

Abb. 20B: Proteinexpression von Akt, FAK und Src quantitativ relativ zum Haushaltsgen GAPDH analysiert. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n. s. = nicht signifikant.

Der Nachweis eines phosphorylierten Proteins war nach 24 bzw. 120 Stunden nicht möglich.

Auf Proteinebene konnte nach 24-stündiger Behandlung mit Tenascin C ein inhibierender Einfluss auf die Expression von FAK und nach 120-stündiger Behandlung ein fördernder Einfluss auf die Expression von FAK und Src nachgewiesen werden. Beides sind Signalwegproteine des Integrin-vermittelten Signalwegs.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Azinuszellsuspensionen mit Tenascin C sich erstens auf die Expression der Integrinrezeptoren, zweitens auf Proteine, welche Bestandteil des Integrin-vermittelten Signalweges sind, und drittens auf den Zellstatus durch die veränderte Expression von Progenitor- und Differenzierungsgenen auswirkt.

5.5 Einfluss von Tenascin C auf ADM Formationen

5.5.1 Analyse der Anzahl und Größe

Um den Einfluss von Tenascin C auf die ADM-Formationen genauer zu untersuchen, wurde mit wildtypischen Azinuszellen eine Kollagen-basierte 3D-Zellkultur durchgeführt. Kollagen ist sehr stark in der extrazellulären Matrix vertreten (Frantz et al., 2010), was zu einer physiologischen Zellmobilität beiträgt.

In den unbehandelten 3D-Kulturen adhären die Azinuszellen aneinander und bilden auch durch die Tenascin C-Behandlung keine ADMs und auch keine anderen morphologisch zu beobachtenden Veränderungen aus.

Durch die *in vitro* Stimulation mit Caerulein entwickeln alle 3D-Kulturen ADMs; mehrere Zellen bilden runde Strukturen mit einem deutlich erkennbaren Lumen aus, welche in den nativen Bildern in Abbildung 21A dargestellt sind. Die Anzahl der ADMs nimmt konzentrationsabhängig durch die Tenascin C-Behandlung ab: je höher die Proteinkonzentration, desto weniger ADM-Formationen bilden sich.

Der Größenunterschied zwischen den nur mit Caerulein und mit Caerulein und Tenascin C behandelten 3D-Kulturen ist nicht signifikant. Allerdings ist eine Tendenz erkennbar, dass in den Kulturen, die mit Caerulein und 1 µg/ml Tenascin C behandelt wurden, etwas kleinere ADMs zu finden sind als in den nur mit Caerulein behandelten Kollagenkulturen.

Durch die zusätzliche Stimulation mit Tgf- α , einem Wachstumsfaktor, bilden sich deutlich größere ADM-Formationen (siehe Abbildung 21A). Diese Größenerhöhung

geht mit einer Anzahlverminderung einher, verglichen mit den 3D-Kulturen ohne Tgf- α .

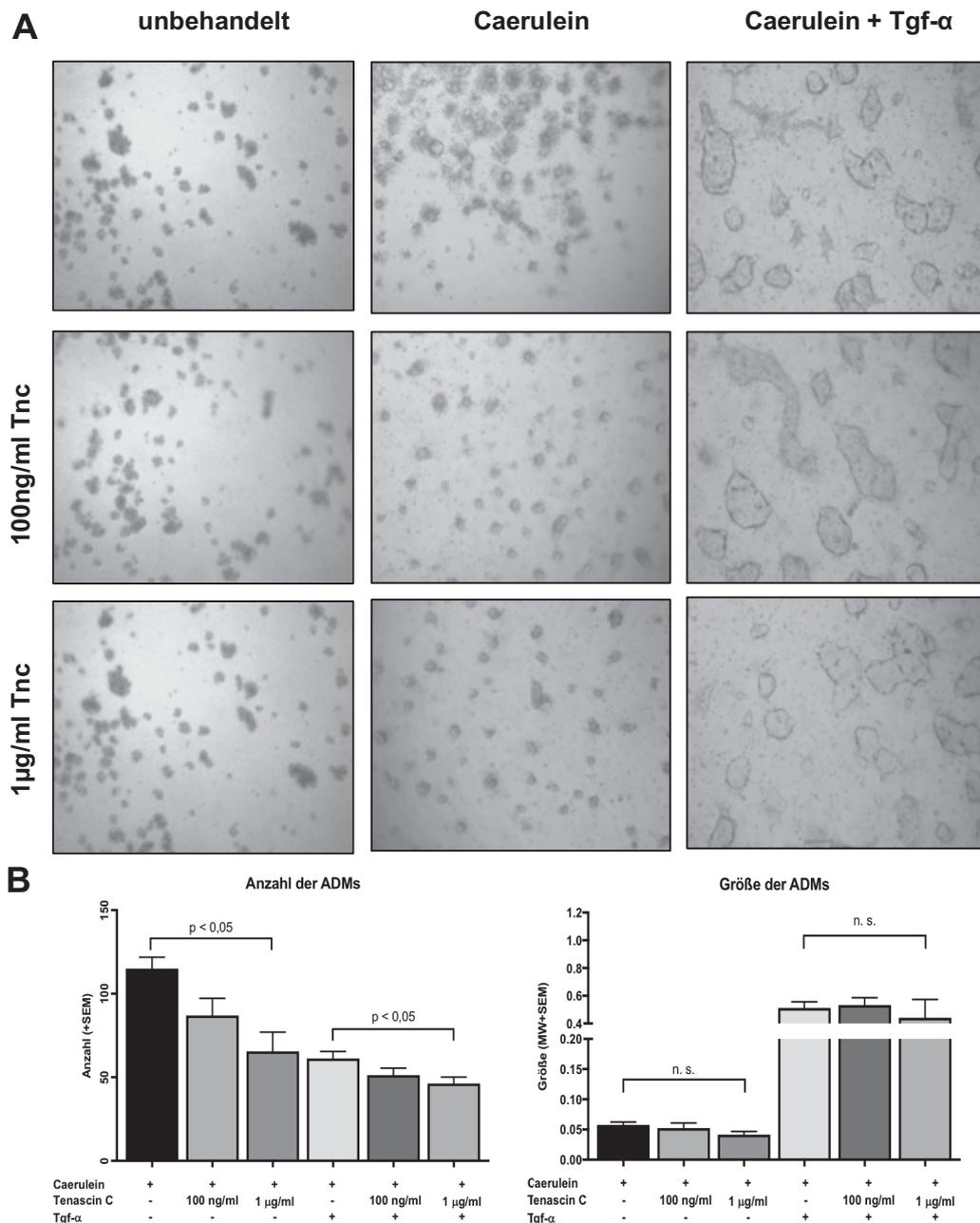


Abbildung 21: Anzahl und Größe der ADM Formationen in 3D-Zellkulturen

Azinsuszellen wurden aus wildtypischen Mäusen isoliert, 2/3 der Zellen wurden mit Caerulein behandelt und anschließend alle Zellen in 3D-Kollagen-Kulturen kultiviert. Die Kulturen wurden sowohl mit 100 ng/ml bzw. 1 µg/ml rekombinantem humanem Tenascin C als auch mit 50 ng/ml Tgf- α alle 2 Tage behandelt. n = 4.

Abb. 21A: Dargestellt sind repräsentative Bilder der unterschiedlich behandelten 3D-Kulturen.

Abb. 21B: Quantitative Auswertung der Anzahl und Größe der ADMs. Die Größe wurde mittels ImageJ ermittelt. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n. s. = nicht signifikant.

Die quantitative Auswertung zeigt, ähnlich wie in den mit Caerulein und Tenascin C behandelten Kollagenkulturen, eine signifikante konzentrationsabhängige Anzahlreduktion und keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der ADMs. Die

Anzahlreduktion ist auch hier -dargestellt in Abbildung 21B- konzentrationsabhängig: je größer die Tenascin-C Konzentration desto weniger ADM-Formationen. Der Einfluss von Tenascin C auf die Größe ist nicht signifikant; die vorbeschriebene Tendenz ist jedoch in dieser Experimentkonstellation ebenfalls erkennbar.

Es konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass Tenascin C einen signifikanten, konzentrationsabhängig inhibierenden Einfluss auf die Anzahl von ADM-Formationen in einer *in vitro* Kollagenkultur hat.

5.5.2 Histologische Darstellung und Proliferationsanalyse

Zur besseren Analyse und Charakterisierung der entstandenen ADM-Formationen wurden die 3D-Kulturen in Paraffin eingebettet und gefärbt. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 22A dargestellt.

In der Hämatoxylin Eosin-Färbung sind runde Strukturen und die sie formenden Zellen deutlich zu erkennen. Um diese als metaplastische Zellen identifizieren zu können, wurde die Expression von einem azinären Marker (Amylasen) und einem duktalem Marker (CK19) mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung analysiert. Die Zellen der runden Strukturen exprimieren nahezu ausschließlich CK19 (grün in Abbildung 22A), die umliegenden Zellen exprimieren Amylase (rot in Abbildung 22A), was sie als Azinuszellen identifiziert. Die gelb gefärbten Zellen exprimieren beide Marker.

Die immunhistochemische Färbung für Bromdesoxyuridin (BrdU), einem Marker für proliferierende Zellen, wurde quantitativ ausgewertet. Die zusätzlich mit 1 µg/ml Tenascin C behandelten Kulturen weisen prozentuell signifikant mehr proliferierende Zellen auf, als die nur mit Caerulein oder mit Caerulein und Tgf- α behandelten Kulturen.

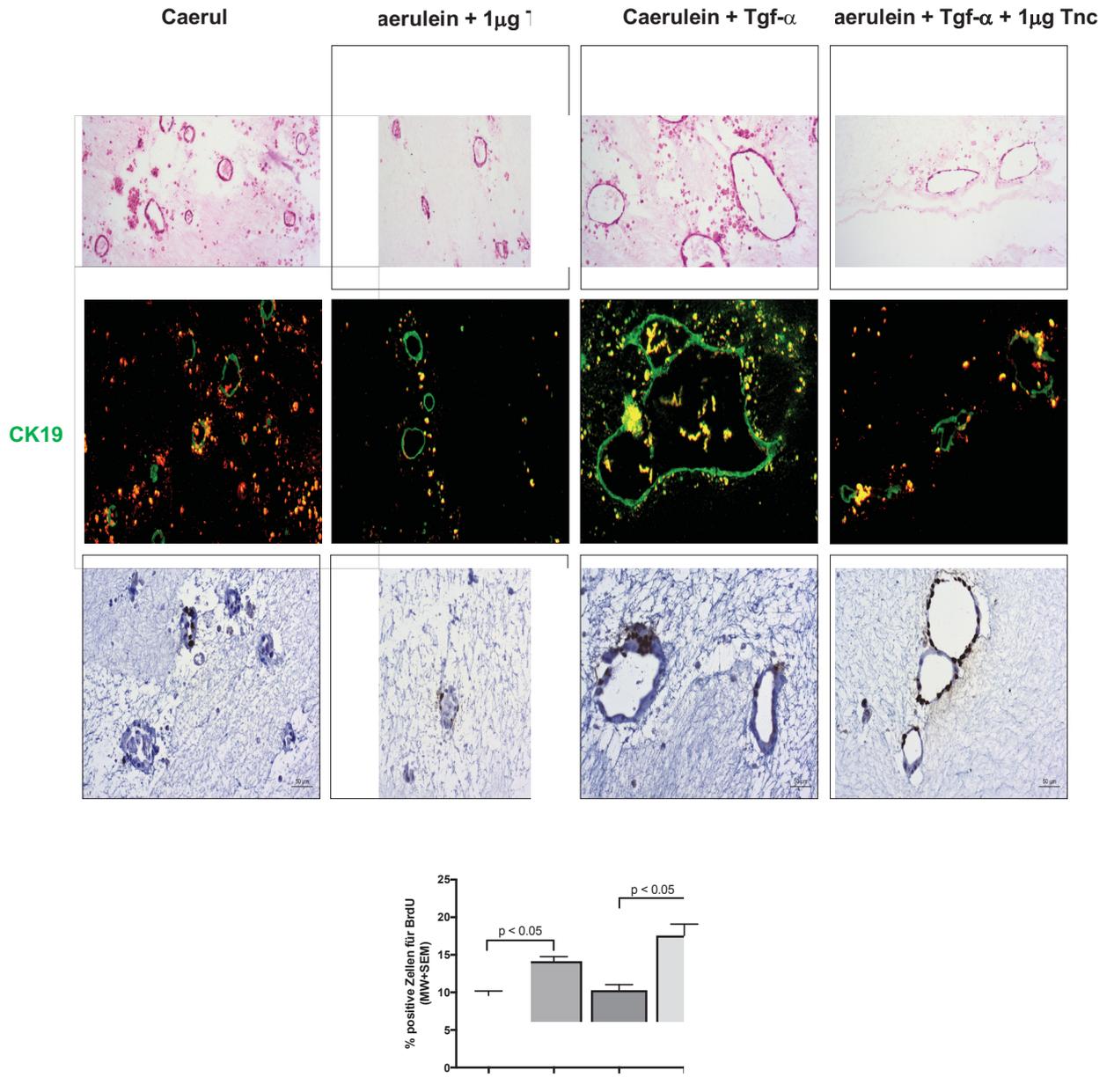


Abbildung 22: Histologische Analyse der

Die 3D-Zellkulturen wurden nach einer Kultiv

ingebettet und gefärbt.

Abb. 22A: Dargestellt sind repräsentative Hamatoxylin Eosin (HE)-Färbungen sowie Immunfluoreszenzen für Amylase (rot) und CK19 (grün) und Immunhistochemie für BrdU. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

Abb. 22B: Die Anzahl der positiven Zellen für Bromdesoxyuridin (BrdU) wurde quantitativ durch Auszählung ausgewertet. P-Werte wurden mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt. n = 4

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass es sich bei den kreisrunden Strukturen der in vitro 3D-Kollagenkultur um ADM-Formationen handelt, welche duktaile Marker exprimieren. Außerdem wurde in den mit Tenascin C behandelten Proben eine signifikant höhere Proliferationsrate mithilfe einer immunhistochemischen Färbung mit BrdU nachgewiesen.

6 Diskussion

Mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 8% (Siegel et al., 2016) stellt das duktales Adenokarzinom des Pankreas die vierthäufigste krebisbedingte Todesursache dar. Aufgrund dieser schlechten Prognose ist es das Ziel, alle bekannten Risikofaktoren zu minimieren. Dazu zählt unter anderem die Inflammation des Pankreas, da Patienten mit einer chronischen Pankreatitis ein erhöhtes Risiko haben, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Carriere et al., 2009).

Charakteristisch sowohl für die chronische Pankreatitis, die in ihrer klassischen, alkohol-assoziierten Form in Folge rezidivierender Schübe einer akuten Pankreatitis entsteht, als auch für das Pankreaskarzinom ist eine ausgeprägte Stromareaktion. Die Funktion des Stromas ist noch weitestgehend unklar, allerdings wird in neueren Untersuchungen unter anderem eine promaligne Eigenschaft und eine aktive Beteiligung an der Karzinogenese beispielsweise durch Beeinflussung der Proliferation und Invasion vermutet (Coetzee et al., 2019). Durch Stimulation von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren produzieren aktivierte pankreatische Stellatumzellen extrazelluläre Matrixmoleküle wie z.B. Tenascin C. Dieses Protein ist unter physiologischen Bedingungen im adulten Körper nur in sehr geringen Mengen nachweisbar; im Rahmen von Gewebeumbau, Inflammation und Tumorerkrankungen wird es allerdings deutlich vermehrt exprimiert. Bei Karzinomen wirkt Tenascin C sich insbesondere auf das Tumorstwachstum und die Metastasierung durch die Beeinflussung von Motilität und Zelladhäsionen aus (Paron et al., 2011, Orend and Chiquet-Ehrismann, 2006). Über die Wirkung von Tenascin C auf die Regeneration des Pankreas ist bisher wenig bekannt.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Plastizität der Azinuszellen insbesondere bei der Regeneration eine entscheidende Rolle spielt (Hausmann et al., 2016). Die azinär-duktales Metaplasie ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration und potentiell vollständig reversibel (Jenssen et al., 2005). Allerdings sind die Zellen im metaplastischen Zustand besonders anfällig gegenüber onkogenen Stimuli. Bei Vorhandensein dieser Stimuli kann die proliferative Eigenschaft als Charakteristikum der ADM beibehalten werden und es können Vorläuferläsionen entstehen (Coussens and Werb, 2002). Die Metaplasie kann den Startpunkt der Karzinogenese darstellen (Aichler et al., 2012).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Rolle des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C während der Pankreasregeneration nach akuter durch Caerulein-induzierten

Pankreatitis *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Im Besonderen standen die ADM und ihre Charakteristika im Fokus der Experimente. Des Weiteren sollten Signalwege identifiziert werden, die durch das extrazelluläre Matrixprotein aktiviert werden, um mögliche therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren.

6.1 Rolle von Tenascin C während der Pankreasregeneration

Die Tenascin C-Expression ist -wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben- während der Regeneration nach akuter Pankreatitis mit einem maximalen Wert 24 Stunden nach der letzten Caerulein-Injektion deutlich gesteigert. Nach 7 Tagen ist das Expressionsniveau wieder etwa auf den Ausgangswert abgefallen (siehe Abbildung 12). Dies passt zu den morphologischen Beobachtungen, dass das Pankreasgewebe von Wildtyp-Mäusen nach dieser Zeit wieder regeneriert und auch die exokrinen Anteile wieder funktionsfähig sind.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte ebenfalls eine vermehrte Tenascin C-Expression bei chronischer Pankreatitis um tubuläre Komplexe, die das morphologische Korrelat einer ADM darstellen, nachgewiesen werden (Esposito et al., 2006). Bei der akuten Inflammation ist die Expression von Tenascin C stromal (nachgewiesen mithilfe der Färbung der Kollagenfasern in der Elastica-van-Gieson-Färbung in Abbildung 13), zwischen azinären Komplexen und um ADM-Formationen zu finden. Die Plastizität der Azinuszellen, welche sich beispielsweise in der Ausbildung von ADMs zeigt, spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Regeneration (Benitz et al., 2016); welchen Einfluss Tenascin C auf diese Zellformation hat, wurde daher im Rahmen weiterer Experimente genauer untersucht.

6.2 Einfluss von Tenascin C auf ADM-Formationen

Die ADM ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Pankreasregeneration und konnte sowohl im murinen als auch im humanen Pankreatitisgewebe nachgewiesen werden (Means et al., 2005, Benitz et al., 2016).

Die *in vivo* immunhistochemisch nachgewiesene periazinär lokalisierte Tenascin C-Expression (siehe Abbildung 13) deutet auf eine Interaktion zwischen Tenascin C und den azinären Zellkomplexen hin. Der Ablauf dieser Interaktion konnte in den

Experimenten und auch in vorangegangenen Untersuchungen noch nicht geklärt werden.

Des Weiteren konnte morphologisch eine Zunahme an α -SMA, einem Marker für aktivierte Stellatumzellen, welche das extrazelluläre Matrixmolekül Tenascin C sezernieren (Esposito et al., 2006), nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sprechen für eine Aktivierung von Stellatumzellen nach Induktion einer akuten Pankreatitis, die zur vermehrten Produktion und Sekretion von Tenascin C führt, was wiederum einen Einfluss auf die Pankreasregeneration -insbesondere auf die ADM-Formationen- nach akuter Pankreatitis hat.

Ein *in vitro* Modell zur genaueren Analyse verschiedener Einflüsse auf die ADM-Formationen ist die 3D-Kollagen-Kultur. Durch die Stimulation der Azinuszellen mit Caerulein und der Lage in einer Kollagenschicht, in welcher die Zellen sich relativ ähnlich wie in der extrazellulären Matrix bewegen können, formen die Zellen duktal-ähnliche Strukturen. Diese exprimieren duktale Marker wie z.B. CK19. Da aus dem Wildtyp-Pankreasgewebe Azinuszellen isoliert wurden und alle Zellen, die in keine runde Struktur eingebunden sind, Amylase als azinären Marker exprimieren, konnten die Strukturen als ADM identifiziert und daraufhin genauer analysiert werden.

Tenascin C hat einen signifikant inhibierenden Effekt auf die Anzahl der ADMs, die Größe ist nicht signifikant verändert (siehe Abbildung 21). Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Das bedeutet, dass eine hohe Tenascin C-Konzentration in einer Pankreatitis umgebenden Stromareaktion zu einer verringerten Anzahl an ADMs führt und damit das Risiko der malignen Entartung verringert ist. Daher könnte die Tenascin C-Konzentration im Stroma ggf. als Prognosefaktor für die Reversibilität einer Pankreatitis genutzt werden.

Außerdem wurden die Zellkulturen mit Tgf- α behandelt; einem Wachstumsfaktor, der zu den Zytokinen zählt und durch die Aktivierung einer autokrinen Schleife eine erhöhte Proliferationsrate bewirkt (Barton et al., 1991). In unserem Experiment führte die Behandlung mit Tgf- α zu einer deutlichen Größenzunahme der Formationen, was eine Anzahlabnahme aufgrund der gleichbleibenden Größe des Wells nach sich zog (siehe Abbildung 21). Auch in vorangegangenen Untersuchung von Pankreastumoren korrelierte der Nachweis von Tgf- α unter anderem mit einer erhöhten Tumorgroße (Yamanaka et al., 1993).

Durch die Hinzugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Tenascin C wurde die Anzahl der proliferativen Zellen in der 3D-Kollagenkultur durchschnittlich um 4% erhöht. Durch die alleinige Behandlung mit Tgf- α änderte sich die Proliferationsrate nicht. Allerdings konnte durch die duale Behandlung mit Tenascin C und Tgf- α die Rate an proliferativen Zellen durchschnittlich sogar um 7% erhöht werden (siehe Abbildung 22). In Anwesenheit von Tenascin C scheint Tgf- α einen Einfluss auf die Zellproliferation zu haben. Der Mechanismus, über welchen Tenascin C bzw. Tenascin C und Tgf- α die Proliferation fördern, konnte in diesem Modell nicht untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich aus den Experimenten ein tendenziell progenerativer Einfluss von Tenascin C auf die ADMs im Rahmen einer akuten Pankreatitis ableiten, da das Matrixprotein inhibierend auf die Anzahl und fördernd auf die Proliferation wirkt.

6.3 Tenascin C in Signalwegen der Pankreasregeneration

Neben dem Integrin-vermittelten Signalweg, spielen bei der Regeneration bzw. der ADM die Wnt-, Notch und PI3K-Akt-Signalwege eine wichtige Rolle. Diese drei Signalwege inhibieren zum einen die Transkription von spezifischen azinären Genen und unterstützen zum anderen die Transkription von duktalem Genen. Sie sind in den azinären Transdifferenzierungsprozess involviert und werden als mögliche Angriffspunkte einer Therapie diskutiert (Wong et al., 2016).

Das extrazelluläre Matrixmolekül Tenascin C aktiviert *in vitro* ausgewählte Proteine des PI3K-Akt- und des Integrin-vermittelten Signalweges (siehe Abbildung 19).

Wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben, kann FAK, eine „fokale Adhäsionskinase“, aktiviert durch Phosphorylierung einer β -Integrinuntereinheit, seinerseits den PI3K-Akt-Signalweg und die Tyrosinkinase Src phosphorylieren. Src ist in verschiedenen Signalwegen, welche auf Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Polarität von Zellen Einfluss nehmen, integriert (Shishido et al., 2014). Die Aktivierung von Src hat außerdem eine Verbesserung der dynamischen Zell-Matrix-Adhäsionen zur Folge (Avizienyte and Frame, 2005). In unseren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Tenascin C im Rahmen des Integrin-vermittelten Signalweges p-FAK und p-Src aktiviert (siehe Abbildung 19) und dadurch vielfältige Wirkungen auf die Zellen ausüben kann, welche noch nicht genauer im Rahmen der ADM-Formationen untersucht wurden.

Der MAP-Kinase-Signalweg, welcher durch die Tyrosinkinase Src aktiviert werden kann und eine Rolle im Rahmen der Pankreatitis spielt (Wong et al., 2016), wird nach unseren Ergebnissen durch die Tenascin C-Behandlung in Azinuszellen hingegen nicht aktiviert.

P-Akt als zentrales Protein des PI3K-Akt-Signalweges ist in strukturellen Veränderungen wie z.B. die Ausbildung von ADMs durch Beeinflussung des Aktin „Remodelling“ involviert. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass z.B. bei einem Verlust von PI3K sowohl die azinäre Morphologie beibehalten als auch die Entstehung von PanIN und PDAC inhibiert wird (Wong et al., 2016). Tenascin C scheint diesen Signalweg zu aktivieren. Dies ist zum einen ein überraschendes Ergebnis, da dem extrazellulären Matrixmolekül in anderen Experimenten ein pro-regenerativer Charakter nachzuweisen ist. Zum anderen ist der PI3K-Akt-Signalweg allerdings von großer Bedeutung bei der Pankreaskarzinogenese, was in Kapitel 6.6 weiterführend diskutiert wird.

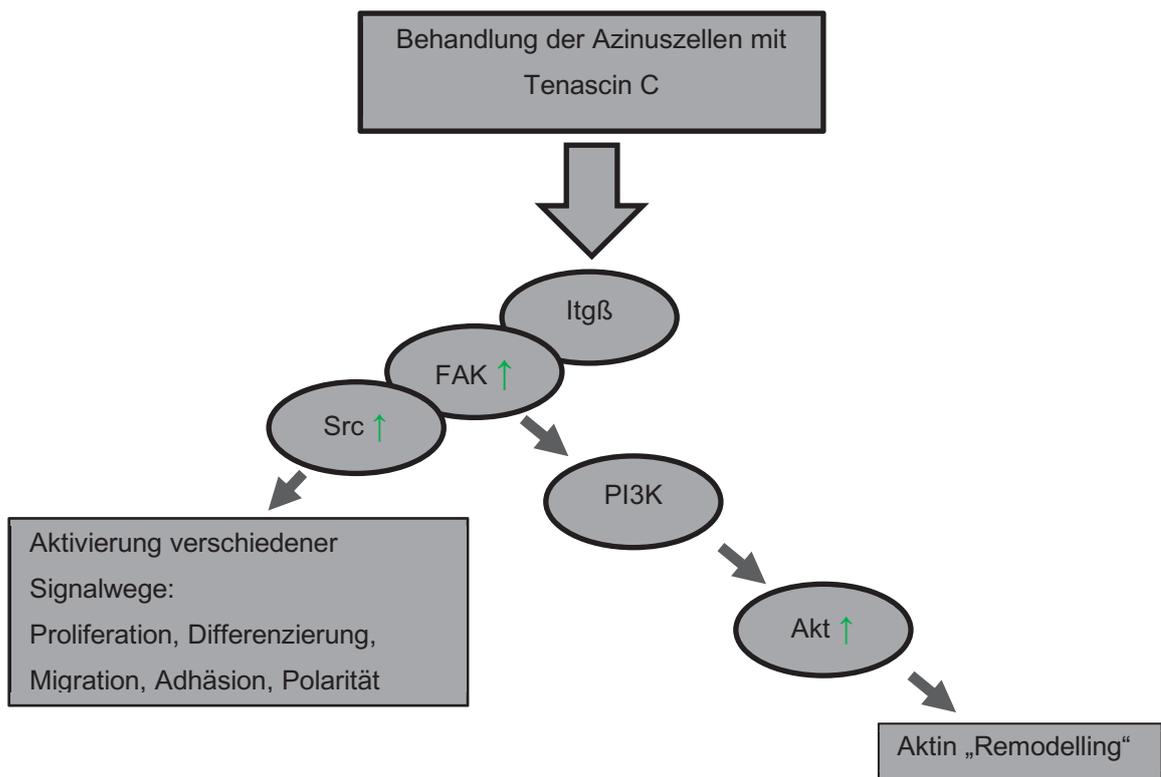


Abbildung 23: Signalwegsaktivität nach Tenascin C-Behandlung

Graphische zusammenfassende Darstellung, der durch die Behandlung mit Tenascin C hochregulierte Proteine (mit grünem Pfeil markiert). Darstellung nach (Shishido et al., 2014).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Fokus in den folgenden Experimenten auf den Integrin-vermittelten Signalweg im Rahmen der Pankreasregeneration gelegt.

6.4 Rolle der Integrinrezeptoren während der Pankreasregeneration

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die transmembranösen Integrine einen Einfluss auf die Pankreasregeneration haben. Beispielsweise führte die pankreasspezifische Ablation von der Integrinuntereinheit β_1 unter anderem zu einer progressiven Organdegeneration, welche durch einen Pankreatitis-ähnlichen Phänotyp gekennzeichnet ist. Im Rahmen einer Caerulein-induzierten Pankreatitis, für welche die β_1 defizienten Mäuse anfälliger sind, verlieren die Azinuszellen schneller ihre Zellintegrität (Bombardelli et al., 2010).

Exemplarisch wurden die durchgeführten Experimente auf die sechs Integrinuntereinheiten, an welche Tenascin C bindet, beschränkt. Dies sind α_V , α_8 , α_9 , β_1 , β_3 und β_6 (Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2015). Alle sechs Integrine sind während der akuten Inflammation mit einem maximalen Wert 48 Stunden nach der letzten Caerulein-Injektion erhöht. Nach der morphologisch nachgewiesenen Regeneration etwa am siebten Tagen ist das Expressionslevel bei allen Integrinuntereinheiten wieder deutlich gesunken und bei α_8 , α_9 und β_1 sogar auf das Niveau des Ausgangswertes an Tag 0 (siehe Abbildung 14a). Die Integrinfunktion wird durch das Expressionslevel der Rezeptordimere auf der Zelloberfläche und durch das Level der Integrinaktivität bestimmt (del Zoppo and Milner, 2006). Aufgrund der zuvor beschriebenen Expressionssteigerung, welche sich auf den Zeitraum der akuten Pankreatitis beschränkt, kann von einer Funktionssteigerung und daher von einer aktiven Beteiligung der Integrinrezeptoren am Regenerationsprozess ausgegangen werden.

Des Weiteren konnten die Integrinuntereinheiten β_3 und β_6 mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen auch morphologisch während der akuten Inflammation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14b). Die hochregulierte Integrinexpression ist insbesondere im periazinären und intralobulären Stroma lokalisiert. Da die transmembranösen Glykoproteine als wichtiger Mediator in der Zell-Matrix-Interaktion identifiziert werden konnten (Koukoulis et al., 1991) und funktionell das Zellverhalten z.B. durch die Bildung einer transmembranösen Verbindung zwischen der Matrix und dem Zellzytoskelett oder durch die Übermittlung von extrazellulären Stimuli in die Zellen der extrazellulären Matrix beeinflussen können (del Zoppo and Milner, 2006), ist die Stromalokalisation nachvollziehbar.

Die Stromareaktion ist ein wichtiger Bestandteil der Morphologie der akuten Pankreatitis (Hausmann et al., 2016) und setzt sich progredient im Rahmen der chronischen Pankreatitis und der Karzinogenese fort (Haerberle et al., 2018). Die Integrine spielen hier als Signalvermittler insbesondere bei der akuten Inflammation eine wichtige Rolle.

Im regenerierten Pankreas sind die Rezeptoruntereinheiten auf einem durchschnittlich etwa 40-fach niedrigeren Niveau exprimiert (siehe Abbildung 14a).

6.5 Zusammenhang zwischen pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgenen und Integrinen *in vitro*

In einem Azinuszellsuspensions-Modell zeigt sich, dass die Progenitor- und Differenzierungsgene 24 Stunden nach der Tenascin C-Behandlung geringer exprimiert werden (siehe Abbildung 17), während die Integrinrezeptoren 24 Stunden nach der Behandlung mit dem extrazellulären Matrixmolekül vermehrt exprimiert werden (siehe Abbildung 16). Nach 120 Stunden zeigt sich ein gegensätzlicher Effekt. Die Abbildung 24 veranschaulicht exemplarisch für *Hes1* und *Itgβ₆* diese Experimentergebnisse.

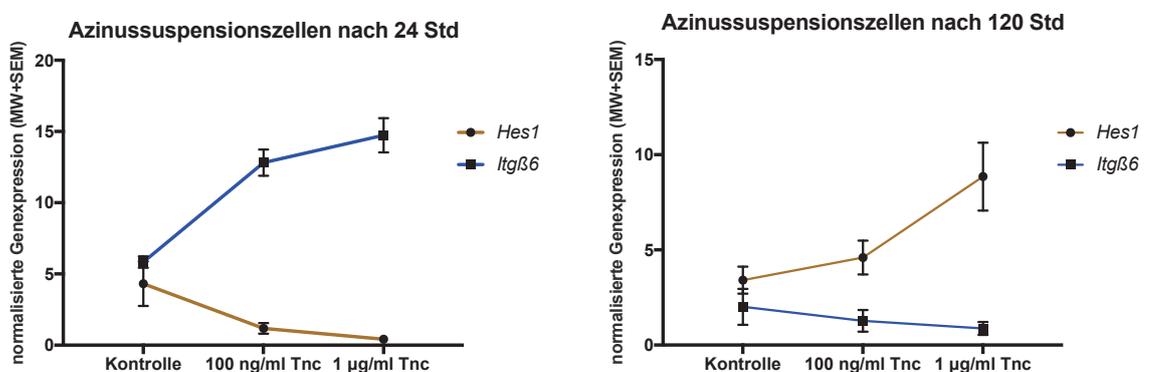


Abbildung 24: Vergleich der Expressionen von *Hes1* und *Itgβ₆* in 24 bzw. 120 Stunden mit Tenascin C behandelten Azinuszellsuspensionen

Azinuszellen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert und anschließend in Suspensionszellkultur mit 5% FCS aufgenommen. Die Azinuszellsuspensionen wurden mit 100 ng/ml bzw. 1 µg/ml rekombinantes humanes Tenascin C (Tnc) behandelt. Nach 24 und 120 Stunden wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR für die Gene *Hes1* und *Integrin β₆* (*Itgβ₆*) durchgeführt. Als Kontrolle dienen Azinuszellsuspensionen, bei denen die RNA 24 bzw. 120 Stunden nach der Zellisolation isoliert wurde. Als Haushaltsgen wurde *ppib* eingesetzt. n = 6.

Die Expression der Progenitor- und Differenzierungsgene ist ein Charakteristikum der ADM (Benitz et al., 2016); in Abbildung 15 konnten ein signifikanter Anstieg repräsentativ ausgewählter Gene im Verlauf der akuten Pankreatitis nachgewiesen werden.

Der Zusammenhang dieser Gene und des Integrin-vermittelten Signalweges wurde bisher in keiner Untersuchung beschrieben.

Integrinrezeptoren unterliegen vielfältigen Einflüssen. Um den Zusammenhang zwischen der gegensätzlich verlaufenden Gen- und Integrin-Expression herstellen zu können, wurde ein „Rescue-Experiment“ durchgeführt. In den Azinuszellsuspensionen, welche zusätzlich mit dem Integrininhibitor SB273005 behandelt wurden, hat Tenascin C nach 24 Stunden einen konzentrationsabhängigen, fördernden Einfluss auf die pankreatischen Progenitor- und Differenzierungsgene. Besonders bei der höheren Tenascin C-Konzentration von 1 µg/ml ist ein deutlicher Expressionsanstieg nach der Behandlung mit SB273005 zu sehen (siehe Abbildung 18).

Dieses Ergebnis lässt zunächst den Rückschluss zu, dass eine veränderte Rezeptorzusammensetzung einen Einfluss auf den Differenzierungsgrad der Azinuszellen hat. Die Integrine scheinen einen inhibierenden Einfluss auf die Progenitor- und Differenzierungsgene der Azinuszellen zu haben. Der inhibierende Effekt von Tenascin C auf den Progenitor- und Differenzierungsstatus nach 24 Stunden, welcher bei Integrinexpression deutlich nachweisbar war, fällt weg. Dies würde den Zellen im Rahmen der Pankreasregeneration eine Rückkehr in einen differenzierten und deutlich weniger vulnerablen Zellstatus ermöglichen. Die Integrine würden damit durch die Unterstützung der Reversibilität der ADM-Formationen zu einer erfolgreichen Regeneration beitragen und den Beginn der Karzinogenese verhindern.

6.6. Regeneration und Karzinogenese

Die ADM ist zwar potentiell vollständig reversibel; sie kann allerdings auch den Startpunkt der Karzinogenese darstellen, da die Zellen in diesem Zustand sehr anfällig gegenüber onkogenen Stimuli sind (Benitz et al., 2016). Zudem ist die in dieser Arbeit im Fokus stehende stromale Umgebungsreaktion eine wichtige Gemeinsamkeit der Inflammation und der Karzinogenese (Omary et al., 2007). Die Tenascin C-Expression nimmt parallel zur Progression des Pankreaskarzinoms zu (Esposito et al., 2006).

In der Untersuchung von Azinuszellen in 3D-Kulturen konnte – wie bereits in Kapitel 6.2. beschrieben – gezeigt werden, dass Tenascin C die Regeneration durch eine Reduktion der ADM-Anzahl und die Förderung der Zellproliferation, positiv beeinflusst. Dadurch wird das Risiko einer malignen Entartung gesenkt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Tenascin C auf verschiedene Signalwege, welche sowohl bei der Regeneration als auch bei der Karzinogenese eine Rolle spielen, untersucht. Es konnte zum einen eine Aktivierung von p-FAK nach einer Behandlung von Azinuszellen mit Tenascin C nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). FAK ist ein wichtiger Mediator zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix. Die Tyrosinkinase ist ein bedeutender Bestandteil des Integrin-vermittelten Signalweges (Shishido et al., 2014). Die Bedeutung dieses Signalweges für die Regeneration wurde bereits in Kapitel 6.4 diskutiert. Im pankreatischen Adenokarzinom konnte ebenfalls eine starke Aktivierung der „fokalen Adhäsionskinase“ (FAK) nachgewiesen werden; die Kinase wurde als wichtiger Regulator der Gewebefibrose und der immunsuppressiven Umgebungsreaktion identifiziert. Eine Inhibition der Tyrosinkinase führt zu einer Reduzierung der Tumorprogression und durch die Reduktion der immunsuppressiven Reaktion zu einem verbesserten Ansprechen auf eine Immuntherapie (Jiang et al., 2016).

Des Weiteren konnte eine Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges durch eine Behandlung der Azinuszellen mit Tenascin C nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). Dieser Signalweg ist bei der Pankreaskarzinogenese ebenfalls von großer Bedeutung aufgrund seiner Funktion im Rahmen der Apoptose und Zellproliferation. Etwa 50% der Karzinome weisen eine Deregulation dieses Signalwegs auf, eine erhöhte Aktivität des Proteins Akt ist keine Ausnahme beim Pankreaskarzinom. Eine Inhibition dieses Signalweges kann zu einer verringerten Zellproliferation und zu einer vermehrten Apoptose führen, sodass dies als therapeutische Option des Pankreaskarzinoms derzeit diskutiert wird (Mao et al., 2016).

6.7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen unter anderem die Vielfalt der Einflussfaktoren auf die pankreatische Regeneration. Eine große Bedeutung hat -wie bei der Pankreaskarzinogenese- in diesem Prozess die Stromareaktion.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass Tenascin C als Bestandteil der extrazellulären Matrix und die Integrinrezeptoren nach der akuten Caerulein-induzierten Pankreatitis stark hochreguliert sind (siehe Abbildungen 12 und 14). Ein Zusammenhang konnte durch den Nachweis der Aktivierung verschiedener Proteine des Integrin-vermittelten

Signalweges nach der Behandlung mit Tenascin C nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19).

Die Integrine werden durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst und haben ihrerseits auch vielfältige Wirkungen. Eine dieser Wirkungen, welche eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Pankreasregeneration hat, konnte in unseren Experimenten analysiert werden: die Reduktion der Expression von Progenitor- und Differenzierungsgenen (siehe Abbildungen 16 - 18). Diese Gene werden im Rahmen der ADM vermehrt exprimiert (Benitz et al., 2016). Die Expressionsreduktion durch die Integrine hat eine Rückkehr der metaplastischen Azinuszellen zu ihrem azinären Phänotyp zur Folge, was ein Schlüsselschritt der erfolgreichen Regeneration ist.

Für das Glykoprotein Tenascin C konnte ebenfalls eine pro-regenerative Eigenschaft nachgewiesen werden. Tenascin C fördert die Proliferation (siehe Abbildung 22), was ein weiteres Charakteristikum der ADM-Formationen ist und entscheidend für die Regeneration des Gewebeschadens. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Tenascin C zu einer signifikanten Reduktion der ADM-Formationen *in vitro* führt. Die Anzahl an proliferativen Zellen kann durch die zusätzliche Behandlung mit Tgf- α noch gesteigert werden (siehe Abbildung 21).

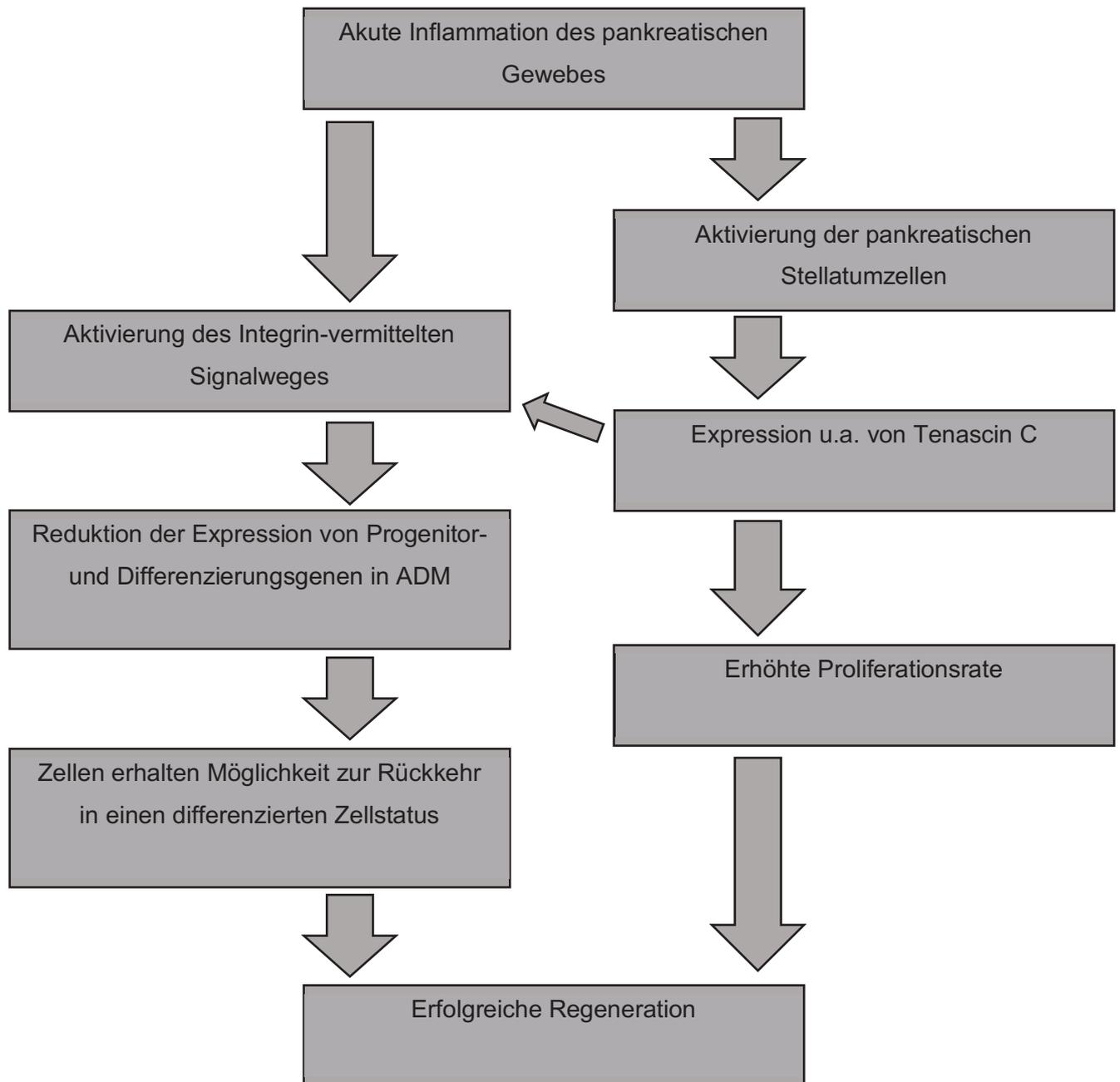


Abbildung 25: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse

Um die Rolle von Tenascin C bei der Pankreasregeneration genauer zu analysieren, wären *in vivo* Experimente z.B. an einem Tenascin C defizienten Mausmodell wichtig. Einige Voruntersuchungen zeigen bei diesen Mäusen eine eingeschränkte bis fehlende Regeneration der akuten Pankreatitis, was die zuvor beschriebenen Ergebnisse in ihrer Aussage unterstützt. Es müsste genauer untersucht werden, ob die Tenascin C defizienten Mäuse die akute Inflammation überhaupt regenerieren können und wie lange dies dauert.

Interessant wären auch weitere Experimente, in welchen die Rolle von Tenascin C an späteren Zeitpunkten und bei der chronischen Pankreatitis analysiert würde. Evtl. hat Tenascin C zunächst einen pro-regenerativen Einfluss in Folge einer akuten Pankreatitis, später könnte die Förderung der Proliferation auch zu der oftmals beschriebenen „Barriere“, welche insbesondere im Rahmen der Chemotherapie des Pankreaskarzinoms wichtig ist, führen (Paron et al., 2011).

Des Weiteren könnte eine Analyse mit Signalwegsinhibitoren als mögliche Therapieoption der Pankreatitis sehr interessant sein. Beispielweise wäre der Einsatz von FAK-Inhibitoren im Rahmen der Pankreasregeneration spannend, da vorangegangene Untersuchungen gezeigt haben, dass ein FAK-Inhibitor beim Pankreaskarzinom einen inhibierenden Einfluss auf das Tumorwachstum hat (Hochwald et al., 2009).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Pankreas	1
Abbildung 2: Pankreatische Organeogenese.....	3
Abbildung 3: Azinär-duktale Metaplasie	6
Abbildung 4: Pankreatische Stellatumzellen	9
Abbildung 5: Aufbau und Interaktionen des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C	11
Abbildung 6: Integrin vermittelte intrazelluläre Signalwege	12
Abbildung 7: Protokoll zur Induktion einer akuten Pankreatitis.....	22
Abbildung 8: Aufbau einer 3D-Kollagen Kultur	26
Abbildung 9: Repräsentative Schmelzkurven.....	30
Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Transfers eines Semidry-Blots	33
Abbildung 11: Morphologische Untersuchung der akuten Pankreatitis.....	35
Abbildung 12: Tenascin C Expression während der Caerulein induzierten akuten Pankreatitis	36
Abbildung 13: Morphologische Untersuchung der extrazellulären Matrix bei der akuten Pankreatitis	37
Abbildung 14: Integrinexpression während der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis...	40
Abbildung 15: Expression von Progenitor- und Differenzierungsgenen während der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis.....	42
Abbildung 16: Integrinexpression in mit Tenascin C behandelte Azinuszellsuspensionen	44
Abbildung 17: Progenitor- und Differenzierungsstatus in mit Tenascin C behandelten Azinuszellsuspensionen	46
Abbildung 18: Progenitor- und Differenzierungsstatus in mit 24 Stunden mit Tenascin C und SB273005 behandelten Azinuszellsuspensionen	48
Abbildung 19: Aktivität von p-Akt, p-Erk, p-FAK und p-Src in Azinuszellen nach Tenascin C-Behandlung	50
Abbildung 20: Expression der Proteine Akt, FAK und Src in 24 und 120 Stunden mit Tenascin C behandelten Azinuszellsuspensionen	51
Abbildung 21: Anzahl und Größe der ADM Formationen in 3D-Zellkulturen.....	53
Abbildung 22: Histologische Analyse der 3D-Zellkulturen	55
Abbildung 23: Signalwegsaktivität nach Tenascin C-Behandlung	60
Abbildung 24: Vergleich der Expressionen von Hes1 und Itgβ ₆ in 24 bzw. 120 Stunden mit Tenascin C behandelten Azinuszellsuspensionen	62
Abbildung 25: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	66

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunhistochemie-Protokolle	24
Tabelle 2: qRT-Programm des Lightcyclers.....	30

9 Literaturverzeichnis

- AICHLER, M., SEILER, C., TOST, M., SIVEKE, J., MAZUR, P. K., DA SILVA-BUTTKUS, P., BARTSCH, D. K., LANGER, P., CHIBLAK, S., DURR, A., HOFLE, H., KLOPPPEL, G., MULLER-DECKER, K., BRIELMEIER, M. & ESPOSITO, I. 2012. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol*, 226, 723-34.
- AKHMEDOV, V. & GAUS, O. 2019. New aspects of formation and progression of pancreatic fibrosis in pancreatitis. *Herald of Pancreatic Club*, 43, 20-24.
- APTE, M. V., HABER, P. S., APPLGATE, T. L., NORTON, I. D., MCCAUGHAN, G. W., KORSTEN, M. A., PIROLA, R. C. & WILSON, J. S. 1998. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 43, 128-33.
- APTE, M. V. & WILSON, J. S. 2012. Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27, 69-74.
- AUMÜLLER, G., AUST, G., CONRAD, A., ENGELE, J. & KIRSCH, J. 2014. *Duale reihe Anatomie*, Georg Thieme Verlag.
- AVIZIENYTE, E. & FRAME, M. C. 2005. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology*, 17, 542-547.
- BARTON, C. M., HALL, P. A., HUGHES, C. M., GULLICK, W. J. & LEMOINE, N. R. 1991. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *The Journal of pathology*, 163, 111-116.
- BENITZ, S., REGEL, I., REINHARD, T., POPP, A., SCHAFFER, I., RAULEFS, S., KONG, B., ESPOSITO, I., MICHALSKI, C. W. & KLEEFF, J. 2016. Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 7, 11424-33.
- BOMBARDELLI, L., CARPENTER, E. S., WU, A. P., ALSTON, N., DELGIORNO, K. E. & CRAWFORD, H. C. 2010. Pancreas-specific ablation of β 1 integrin induces tissue degeneration by disrupting acinar cell polarity. *Gastroenterology*, 138, 2531-2540. e4.
- CANO, D. A., HEBROK, M. & ZENKER, M. 2007. Pancreatic development and disease. *Gastroenterology*, 132, 745-62.
- CARRIERE, C., YOUNG, A. L., GUNN, J. R., LONGNECKER, D. S. & KORC, M. 2009. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. *Biochem Biophys Res Commun*, 382, 561-5.
- COETZEE, A., CARTER, E., HEWARD, J., MARDAKHEH, F., GROSE, R. & KOCHER, H. 2019. Targeting FGFR signaling to disrupt cellular cross-talk in pancreatic cancer. AACR.
- COMOGLIO, P. M. & TRUSOLINO, L. 2005. Cancer: the matrix is now in control. *Nat Med*, 11, 1156-9.
- COUSSENS, L. M. & WERB, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-7.
- COX, T. R. & ERLER, J. T. 2011. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease models & mechanisms*, 4, 165-178.

- DEL ZOPPO, G. J. & MILNER, R. 2006. Integrin–matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26, 1966-1975.
- EDLUND, H. 2002. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet*, 3, 524-32.
- ERKAN, M., MICHALSKI, C. W., RIEDER, S., REISER-ERKAN, C., ABIATARI, I., KOLB, A., GIESE, N. A., ESPOSITO, I., FRIESS, H. & KLEEFF, J. 2008. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6, 1155-61.
- ESPOSITO, I., PENZEL, R., CHAIB-HARRIRECHE, M., BARCENA, U., BERGMANN, F., RIEDL, S., KAYED, H., GIESE, N., KLEEFF, J., FRIESS, H. & SCHIRMACHER, P. 2006. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J Pathol*, 208, 673-85.
- FRANTZ, C., STEWART, K. M. & WEAVER, V. M. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123, 4195-200.
- GUERRA, C., SCHUHMACHER, A. J., CANAMERO, M., GRIPPO, P. J., VERDAGUER, L., PEREZ-GALLEGO, L., DUBUS, P., SANDGREN, E. P. & BARBACID, M. 2007. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell*, 11, 291-302.
- HAEBERLE, L., STEIGER, K., SCHLITTER, A. M., SAFI, S. A., KNOEFEL, W. T., ERKAN, M. & ESPOSITO, I. 2018. Stromal heterogeneity in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 18, 536-549.
- HAUSMANN, S., REGEL, I., STEIGER, K., WAGNER, N., THORWIRTH, M., SCHLITTER, A. M., ESPOSITO, I., MICHALSKI, C. W., FRIESS, H., KLEEFF, J. & ERKAN, M. 2016. Loss of Periostin Results in Impaired Regeneration and Pancreatic Atrophy after Cerulein-Induced Pancreatitis. *Am J Pathol*, 186, 24-31.
- HEINRICH, C., SPAGNOLI, F. M. & BERNINGER, B. 2015. In vivo reprogramming for tissue repair. *Nature cell biology*, 17, 204-211.
- HELD, L., RUFIBACH, K. & SEIFERT, B. 2013. *Medizinische statistik: konzepte, methoden, anwendungen*, Pearson Deutschland GmbH.
- HOCHWALD, S. N., NYBERG, C., ZHENG, M., ZHENG, D., WOOD, C., MASSOLL, N. A., MAGIS, A., OSTROV, D., CANCE, W. G. & GOLUBOVSKAYA, V. M. 2009. A novel small molecule inhibitor of FAK decreases growth of human pancreatic cancer. *Cell cycle*, 8, 2435-2443.
- HYNES, R. O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326, 1216-9.
- HYUN, J. J. & LEE, H. S. 2014. Experimental models of pancreatitis. *Clin Endosc*, 47, 212-6.
- IOACHIM, E., CHARCHANTI, A., BRIASOULIS, E., KARAVASILIS, V., TSANOU, H., ARVANITIS, D., AGNANTIS, N. J. & PAVLIDIS, N. 2002. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *European journal of cancer*, 38, 2362-2370.
- JENSEN, J. N., CAMERON, E., GARAY, M. V., STARKEY, T. W., GIANANI, R. & JENSEN, J. 2005. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology*, 128, 728-41.

- JIANG, H., HEGDE, S., KNOLHOFF, B. L., ZHU, Y., HERNDON, J. M., MEYER, M. A., NYWENING, T. M., HAWKINS, W. G., SHAPIRO, I. M. & WEAVER, D. T. 2016. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nature medicine*, 22, 851.
- JOPPIEN, S., MAIER, S. L. & WENDLING, D. S. 2010. *Basics experimentelle Doktorarbeit*, Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- KONG, B., BRUNS, P., BEHLER, N. A., CHANG, L., SCHLITTER, A. M., CAO, J., GEWIES, A., RULAND, J., FRITZSCHE, S. & VALKOVSKAYA, N. 2016. Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut*, gutjnl-2015-310913.
- KOUKOULIS, G., VIRTANEN, I., KORHONEN, M., LAITINEN, L., QUARANTA, V. & GOULD, V. 1991. Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. Correlations with their functions as receptors and cell adhesion molecules. *The American journal of pathology*, 139, 787.
- LI, D., XIE, K., WOLFF, R. & ABBRUZZESE, J. L. 2004. Pancreatic cancer. *The Lancet*, 363, 1049-1057.
- LIU, G. Y., DOPPLER, H., BRAUN, U. B., PANAYIOTOU, R., SCOTTI BUZHARDT, M., RADISKY, D. C., CRAWFORD, H. C., FIELDS, A. P., MURRAY, N. R., WANG, Q. J., LEITGES, M. & STORZ, P. 2015. Protein kinase D1 drives pancreatic acinar cell reprogramming and progression to intraepithelial neoplasia. *Nat Commun*, 6, 6200.
- LONGNECKER, D. S. 2014. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- LYNN, F. C., SMITH, S. B., WILSON, M. E., YANG, K. Y., NEKREP, N. & GERMAN, M. S. 2007. Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10500-5.
- MAITRA, A., FUKUSHIMA, N., TAKAORI, K. & HRUBAN, R. H. 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Advances in anatomic pathology*, 12, 81-91.
- MAITRA, A. & HRUBAN, R. H. 2008. Pancreatic cancer. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, 3, 157-188.
- MANTONI, T. S., LUNARDI, S., AL-ASSAR, O., MASAMUNE, A. & BRUNNER, T. B. 2011. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through β 1-integrin signaling. *Cancer research*, 71, 3453-3458.
- MAO, Y., XI, L., LI, Q., CAI, Z., LAI, Y., ZHANG, X. & YU, C. 2016. Regulation of cell apoptosis and proliferation in pancreatic cancer through PI3K/Akt pathway via Polo-like kinase 1. *Oncology Reports*, 36, 49-56.
- MARTÍNEZ - ROMERO, C., ROOMAN, I., SKOUDY, A., GUERRA, C., MOLERO, X., GONZÁLEZ, A., IGLESIAS, M., LOBATO, T., BOSCH, A. & BARBACID, M. 2009. The epigenetic regulators Bmi1 and Ring1B are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *The Journal of pathology*, 219, 205-213.
- MEANS, A. L., MESZOELY, I. M., SUZUKI, K., MIYAMOTO, Y., RUSTGI, A. K., COFFEY, R. J., JR., WRIGHT, C. V., STOFFERS, D. A. & LEACH, S. D. 2005. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development*, 132, 3767-76.
- MICHALSKI, C. W., GORBACHEVSKI, A., ERKAN, M., REISER, C., DEUCKER, S., BERGMANN, F., GIESE, T., WEIGAND, M., GIESE, N. A. & FRIESS, H. 2007. Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in

- turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis. *Journal of translational medicine*, 5, 1.
- MICHOV, B. 1996. *Elektrophorese: theorie und praxis*, Walter de Gruyter.
- MIDWOOD, K. S., CHIQUET, M., TUCKER, R. P. & OREND, G. 2016. Tenascin-C at a glance. *J Cell Sci*, 129, 4321-4327.
- MIDWOOD, K. S. & OREND, G. 2009. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*, 3, 287-310.
- MURTAUGH, L. C. & KEEFE, M. 2015. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annual review of physiology*, 77, 229.
- OMARY, M. B., LUGEA, A., LOWE, A. W. & PANDOL, S. J. 2007. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*, 117, 50-9.
- OREND, G. & CHIQUET-EHRISMANN, R. 2006. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer letters*, 244, 143-163.
- PARON, I., BERCHTOLD, S., VOROS, J., SHAMARLA, M., ERKAN, M., HOFER, H. & ESPOSITO, I. 2011. Tenascin-C enhances pancreatic cancer cell growth and motility and affects cell adhesion through activation of the integrin pathway. *PLoS One*, 6, e21684.
- PFÄFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29, e45-e45.
- PINHO, A. V., ROOMAN, I., REICHERT, M., DE MEDTS, N., BOUWENS, L., RUSTGI, A. K. & REAL, F. X. 2010. Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis. *Gut*, gut. 2010.225920.
- SAH, R. P., DUDEJA, V., DAWRA, R. K. & SALUJA, A. K. 2013. Cerulein-induced chronic pancreatitis does not require intra-acinar activation of trypsinogen in mice. *Gastroenterology*, 144, 1076-1085. e2.
- SCHÜNKE, M., SCHULTE, E. & SCHUMACHER, U. 2012. Prometheus. LernAtlas der Anatomie. Innere Organe. Illustrationen von M. Voll und K. Wesker. Stuttgart: Thieme.
- SHIH, H. P., WANG, A. & SANDER, M. 2013. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 29, 81-105.
- SHISHIDO, S., BONIG, H. & KIM, Y. M. 2014. Role of integrin alpha4 in drug resistance of leukemia. *Front Oncol*, 4, 99.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66, 7-30.
- STORZ, P. 2017. Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
- TUCKER, R. P. & CHIQUET-EHRISMANN, R. 2015. Tenascin-C: its functions as an integrin ligand. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 65, 165-168.
- WANG, G. J., GAO, C. F., WEI, D., WANG, C. & DING, S. Q. 2009. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 15, 1427-30.
- WELSCH, U. & DELLER, T. 2010. *Lehrbuch Histologie*, Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- WITT, H., APTE, M. V., KEIM, V. & WILSON, J. S. 2007. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*, 132, 1557-73.

- WONG, C. H., LI, Y. J. & CHEN, Y. C. 2016. Therapeutic potential of targeting acinar cell reprogramming in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 22, 7046-57.
- YAMANAKA, Y., FRIESS, H., KOBRIN, M., BUCHLER, M., BEGER, H. & KORC, M. 1993. Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer research*, 13, 565-569.

Danksagung

Zuerst danke ich Frau **Prof. Dr. Irene Esposito** für ihren Einsatz als meine Doktormutter. Ich durfte meine Experimente in ihrem Institut durchführen und Sie hat sich auch persönlich ausgesprochen engagiert um meine Ergebnisse und meine weitere Versuchsplanung gekümmert. Des Weiteren danke ich Frau Prof. Esposito für die Möglichkeit, Sie auf mehrere nationale und internationale Kongresse begleiten und dort meine Arbeit als Poster präsentieren zu dürfen. Diese Erfahrung war einzigartig.

Außerdem danke ich **Dr. Ivonne Regel** für ihr großes Engagement! Frau Dr. Regel hatte immer Ideen für neue Versuche; hatte sowohl im Labor und bei der Auswertung meiner Daten als auch beim Schreiben stets wertvolle Tipps und ist für mich weit mehr als nur eine Betreuerin und Arbeitsgruppenleiterin gewesen. Sogar im Home-Office in München hat Frau Dr. Regel mich keine Stunde mit einem Problem alleine gelassen, ganz herzlichen Dank dafür!

Ohne das tolle **Laborteam** hätte ich wahrscheinlich viele Methoden niemals umsetzen können. Ich danke insbesondere Natascha, Franca, Wolfgang, Britta, Lisa, Lena und Olga für die Beantwortung meiner tausend Fragen, für die unermüdliche Unterstützung und für die Aufmunterung, wenn ein Versuch missglückt war. Ich werde die Zeit mit euch allen im Patho-Labor immer in sehr guter Erinnerung behalten und eure Hilfe niemals vergessen.

Am Ende danke ich meiner **Familie** für die liebe Unterstützung. Meine Eltern und meiner Schwester haben mich in jeder Phase dieser Promotion unterstützt; ihr habt euch meine Sorgen angehört und mich immer motiviert. Besonders meine Mutter hat meine Promotion immer sehr interessiert; sie hat mich insbesondere bei Formulierungen unterstützt und diese Arbeit in dieser Form ermöglicht, vielen Dank!