

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

Die Rolle von Tenascin C in der Pankreasregeneration *in vivo*

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

vorgelegt von
Liva Maria Rudroff

im Jahr 2026

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

Gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito
Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle von Tenascin C (TNC) während der Pankreasregeneration. TNC ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das sowohl bei Inflammationsprozessen als auch in der Tumorgenese, einschließlich des Adenokarzinoms der Pankreas, vermehrt exprimiert wird. Während die Rolle von TNC im Pankreaskarzinom bereits intensiv untersucht wurde, sind die Auswirkungen von TNC auf die Entzündung und Regeneration des Pankreas bisher unklar. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von TNC während der Regeneration genauer zu untersuchen, mit Schwerpunkt auf der azinär-duktalem Metaplasie (ADM) – einer metaplastischen Reaktion mit Transformation von azinären Zellen hin zu einem duktalem Phänotypen, welche die Reparatur unterstützt, jedoch zugleich ein mögliches Transformationsrisiko birgt.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von TNC *in vivo* an einem TNC-Knockout-Mausmodell untersucht. Durch eine Injektion von Caerulein nach einem standardisierten Protokoll wurde eine akute Pankreatitis ausgelöst, die Organentnahme erfolgte zu frühen und späten Zeitpunkten, um den zeitlichen Verlauf der Entzündung und der Regeneration zu analysieren. Mittels histomorphologischen sowie immunhistochemischen Färbungen wurden der Schweregrad der Entzündung, der Regenerationsprozess sowie die ADM-Formationen analysiert. Zudem wurde die Aktivierung von pankreatischen Stellatumzellen als TNC-Quelle sowie die Expression von Integrin-Rezeptoren als TNC-Bindungspartner analysiert.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass der Schweregrad der Entzündung in den WT- und KO-Gruppen ähnlich war und die Regeneration nach 7 Tagen fast gänzlich abgeschlossen war. Die KO-Gruppe zeigte jedoch eine leicht beeinträchtigte Regeneration mit einem höheren Entzündungsgrad nach 7 Tagen. TNC-KO-Mäuse zeigten eine weitere Verzögerung der Regeneration mit einem höheren Ki67-Index und einer verzögerten Sox9-Expression. Die ADM-Bildung war in beiden Gruppen ähnlich, außerdem wiesen ADM eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zum Gesamtgewebe auf. Die Veränderung von einem azinären zu einem duktalem Phänotyp zeigte bei beiden Genotypen einen starken Anstieg des duktalem Markers CK19, aber nur einen leichten Rückgang des azinären Markers Amylase. ADM-Formationen zeigten eine signifikant höhere Integrin- β 6-Expression als das Gesamtgewebe, wobei die Integrin- β 6-Expression zudem bei TNC-KO etwas höher lag als bei TNC-WT. Darüber hinaus aktivierte die Entzündung pankreatische Stellatumzellen, führte aber nicht zur Bildung eines reifen kollagenen Stromas.

Diese Arbeit bietet erste Hinweise, dass ein TNC-Mangel die Regeneration der Bauchspeicheldrüse nach einer Caerulein-induzierten Pankreatitis leicht verzögert, was die Rolle eines stabilen stromalen Gerüsts bei der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität unterstreicht.

Abstract

In this thesis, the role of Tenascin C (TNC) in the process of pancreas regeneration was examined. TNC is an extracellular matrix protein involved in tissue repair following injury as well as in cancer progression, including pancreatic ductal adenocarcinoma. Although its role in cancer is well-studied, TNC effects on pancreatic inflammation and regeneration remain unclear. This work aimed to examine TNC's role in regeneration after acute pancreatitis, with a focus on acinar-ductal metaplasia—a metaplastic response to inflammation with a transformation of acinar cells to a ductal phenotype that aids repair but also carries a possible transformation risk.

In this study, the role of TNC was investigated *in vivo* using a TNC knockout (KO) mouse model. Acute pancreatitis was induced by cerulein injections according to a standardized protocol, and necropsy was performed at early and late time points to analyze the temporal course of inflammation and regeneration. Histomorphological and immunohistochemical staining methods were used to assess the severity of inflammation, the regeneration process, and ADM formation. Furthermore, the activation of pancreatic stellate cells as TNC source and the expression of integrin receptors as TNC binding partners were analyzed.

The experiments showed that the severity of inflammation was similar in the wild-type (WT) and KO groups, and regeneration was nearly complete after seven days. However, the KO group exhibited slightly impaired regeneration with a higher degree of inflammation after seven days. TNC-KO mice demonstrated a further delay in regeneration, with an increased Ki67 proliferation index and delayed Sox9 expression. ADM formation was similar in both groups, and ADM exhibited a higher proliferation rate compared to the overall tissue. The transition from an acinar to a ductal phenotype was accompanied by a strong increase in the ductal marker CK19 in both genotypes, but only a slight decrease in the acinar marker amylase. ADM formations displayed significantly higher integrin- β 6 expression than the overall tissue, with integrin- β 6 expression being slightly higher in TNC-KO mice than in TNC-WT mice. Additionally, inflammation activated pancreatic stellate cells but did not lead to the formation of a mature collagenous stroma.

This study provides initial evidence that a deficiency in TNC slightly delays pancreatic regeneration following cerulein-induced pancreatitis, highlighting the importance of a stable stromal framework in maintaining tissue integrity.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Reagenz	Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Reagenz
ADM	Azinär-duktales Metaplasie
AP	Akute Pankreatitis
α-SMA	Alpha-Glattmuskelaktin (engl. <i>Alpha smooth Muscle Actin</i>)
BD-IPMN	Seitengang-IPMN (engl. <i>Branch-Duct IPMN</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
CK19	Cytokeratin-19
CP	Chronische Pankreatitis
d	Tag (engl. <i>Day</i>)
d.h.	das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DANN	Desoxyribonukleinsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
EvG	Elastica-van-Gieson-Färbung
EZM	Extrazelluläre Matrix
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
GEMM	Genetisch modifiziertes Mausmodell (engl. <i>genetically engineered mouse model</i>)
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
Ki-67	Proliferationsmarker, Eigenname
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
MCN	Muzinöse zystische Neoplasie
MD-IPMN	Hauptgang-IPMN (engl. <i>Main-Duct IPMN</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
Muc1	Mucin 1 (Glykoprotein)
MX-IPMN	gemischter Typ IPMN (engl. <i>Mixed-type IPMN</i>)

o.g.	oben genannte
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PDAC	Pankreaskarzinom des duktales Typs (engl. <i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>)
PSC	Pankreatische Stellatzellen (engl. <i>Pancreatic Stellate Cells</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of mean</i>)
Smad4	SMAD-Familienmitglied 4 (engl. <i>SMAD Family Member 4</i>)
Sox9	Sex-determinierende-Region-Y-verwandtes HMG-Box-Protein 9 (engl. <i>Sex determining Region Y-related HMG box protein 9</i>)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (engl.: <i>Tris-Buffered Saline with Tween-20</i>)
Tbl.	Tabelle
TGF-β1/2	Transformierender Wachstumsfaktor Beta 1/2 (engl. <i>Transforming Growth Factor Beta 1/2</i>)
TME	Tumormikroumgebung (engl. <i>tumor microenvironment</i>)
TNC	Tenascin C
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	- 7 -
1.1	PANKREATITIS	- 7 -
1.1.1	<i>Akute Pankreatitis</i>	- 7 -
1.1.2	<i>Chronische Pankreatitis</i>	- 9 -
1.1.3	<i>Mausmodelle der akuten & chronischen Pankreatitis</i>	- 10 -
1.2	REGENERATION	- 11 -
1.3	KARZINOGENESE UND VORLÄUFERLÄSIONEN DES PANKREAS	- 12 -
1.4	TENASCIN C	- 13 -
1.5	FAKTOREN DER PANKREASPATHOGENESE IM ZUSAMMENHANG MIT TENASCIN C	- 15 -
1.5.1	<i>Stromale Reaktion und Pancreatic stellate cells</i>	- 15 -
1.5.2	<i>Integrinrezeptoren</i>	- 17 -
1.5.3	<i>Sox9</i>	- 18 -
1.6	ZIELE DER ARBEIT	- 20 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 21 -
2.1	MAUSKOLLEKTIV	- 21 -
2.2	MATERIAL	- 23 -
2.2.1	<i>Geräte</i>	- 23 -
2.2.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	- 24 -
2.2.3	<i>Chemikalien</i>	- 24 -
2.2.4	<i>Puffer</i>	- 25 -
2.2.5	<i>Primäre Antikörper</i>	- 26 -
2.2.6	<i>Sekundäre Antikörper</i>	- 26 -
2.2.7	<i>Software</i>	- 27 -
2.3	METHODEN	- 27 -
2.3.1	<i>Gewebeaufarbeitung</i>	- 27 -
2.3.2	<i>Färbemethoden des Gewebes</i>	- 27 -
2.3.3	<i>Auswertung des Gewebes</i>	- 31 -
2.3.4	<i>Statistik</i>	- 36 -
3	ERGEBNISSE	- 38 -
3.1	INFLAMMATION	- 38 -
3.2	PROLIFERATION.....	- 40 -
3.3	ADM-FORMATION	- 43 -
3.3.1	<i>Amylase und CK19 in ADM-Formationen</i>	- 44 -
3.3.2	<i>Proliferationsrate in ADM</i>	- 47 -
3.4	EXPRESSION VON SOX9.....	- 49 -
3.5	EXPRESSION VON INTEGRINREZEPTOREN	- 51 -
3.6	FIBROSE	- 55 -
4	DISKUSSION	61
4.1	EINFLUSS VON TENASCIN C AUF DIE REGENERATION	62
4.2	EINFLUSS VON TNC AUF DIE BILDUNG VON EZM.....	63
4.3	EINFLUSS VON TNC AUF DIE INTEGRINREZEPTOREXPRESSION	65
4.4	EINFLUSS VON TNC AUF DIE ADM-FORMATIONEN	66
4.5	LIMITATIONEN	68
4.6	AUSBlick	69
5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	70
6	TABELLENVERZEICHNIS.....	71
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	73

1 Einleitung

1.1 Pankreatitis

Die Pankreatitis ist eine Entzündung des exokrinen Gewebes der Bauchspeicheldrüse und geht symptomatisch u.a. mit Schmerzen, Übelkeit und Funktionsverlust einher. Sie wird in eine akute und eine chronische Form unterteilt. Dabei treten diese beiden Formen meist getrennt voneinander auf, eine rezidivierende akute Pankreatitis (AP) kann jedoch in eine chronische Pankreatitis (CP) übergehen (Habtezion et al., 2019).

1.1.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine Entzündung des exokrinen Pankreasgewebes, welche mit starken Schmerzen, Flüssigkeitsverlust und multiplen Organkomplikationen einhergehen kann. Sie weist eine Inzidenz von 13-43/100.000 Einwohnern pro Jahr in Deutschland (Beyer et al., 2022) auf und stellt eine der häufigsten benignen gastrointestinalen Indikationen für einen stationären Aufenthalt in Deutschland dar (Beyer et al., 2022). Zudem zeigt sich in den letzten Jahren weltweit eine steigende Inzidenz (James and Crockett, 2018).

Das klinische Leitsymptom einer AP sind die epigastrischen, gürtelförmigen Schmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken. Zudem kann es begleitend zu Übelkeit, Erbrechen, Meteorismus bis hin zum paralytischen Ileus kommen. Dabei wird die AP in zwei Verlaufsformen eingeteilt. Die deutlich häufigere Verlaufsform ist die interstitiell-ödematöse Form (80-85%), bei der es vor allem zu Apoptosen und Ödembildung kommt (Banks et al., 2013). Diese verläuft meist mild, tritt vor allem lokal im Pankreas selbst auf und heilt innerhalb weniger Tage vollständig aus (Murtaugh and Keefe, 2015). Bei der schweren Verlaufsform, der hämorrhagisch-nekrotischen Form, kommt es hingegen zu großflächigen, makroskopischen Fettgewebsnekrosen und massiven Flüssigkeitsverschiebungen ins Interstitium bis hin zum hypovolämischem Schock (Afghani et al., 2015). Zudem kommt es neben der lokalen Entzündung zu einem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom und zum Multiorganversagen (Bhatia et al., 2003). Ferner kommt es bei ca. 20-30% der Patient:innen zu rezidivierenden AP und bei 10% zum Übergang in eine chronische Pankreatitis (Yadav and Lowenfels, 2013).

Die zwei häufigsten Ursachen einer AP stellen die biliäre und die äthyltoxische Form dar, mit jeweils > 30% der Fälle (Beyer et al., 2022). Bei der biliären Form kommt es durch einen Gallensteinabgang zur Verlegung des Ductus choledochus und des Ductus pancreaticus auf Höhe der Papilla Vateri und dadurch zu einem Rückstau des Pankreassekrets in das Pankreas. Die Vorläuferenzyme im Sekret werden durch den Druckanstieg im Gangsystem bereits im Pankreas aktiviert und führen zu einer

Autodigestion des Organs (Wang et al., 2009). Bei der äthlytoxischen AP kommt es durch den Alkohol zur direkten Azinuszellschädigung, auch hier wird als Folge eine verfrühte Aktivierung der Enzyme im Pankreas vermutet (Wang et al., 2009). Ferner kann eine AP medikamentös, iatrogen oder autoimmun induziert sein, weitere Risikofaktoren der AP stellen fettreiche, ballaststoffarme Ernährung, Rauchen, eine Hypertriglyceridämie, eine Hyperkalzämie, infektiologische Erkrankungen wie Mumps oder medizinische Eingriffe wie eine ERCP dar (Wang et al., 2009).

Pathophysiologisch kommt es durch die Enzymaktivierung zur Zellschädigung, Ödembildung, vaskulären Schäden und später zum Zelltod, wobei insbesondere Nekrosen zum Schweregrad der Erkrankung beitragen (Bhatia et al., 2005). Die Gewebeschädigung führt zu einer Zytokinausschüttung aus den Azinuszellen, wodurch Immunzellen, insbesondere neutrophile Granulozyten und später Makrophagen, angelockt werden (Habtezion et al., 2019). Das histologische Bild einer AP mit ihren Charakteristika ist in Abbildung 1 dargestellt.

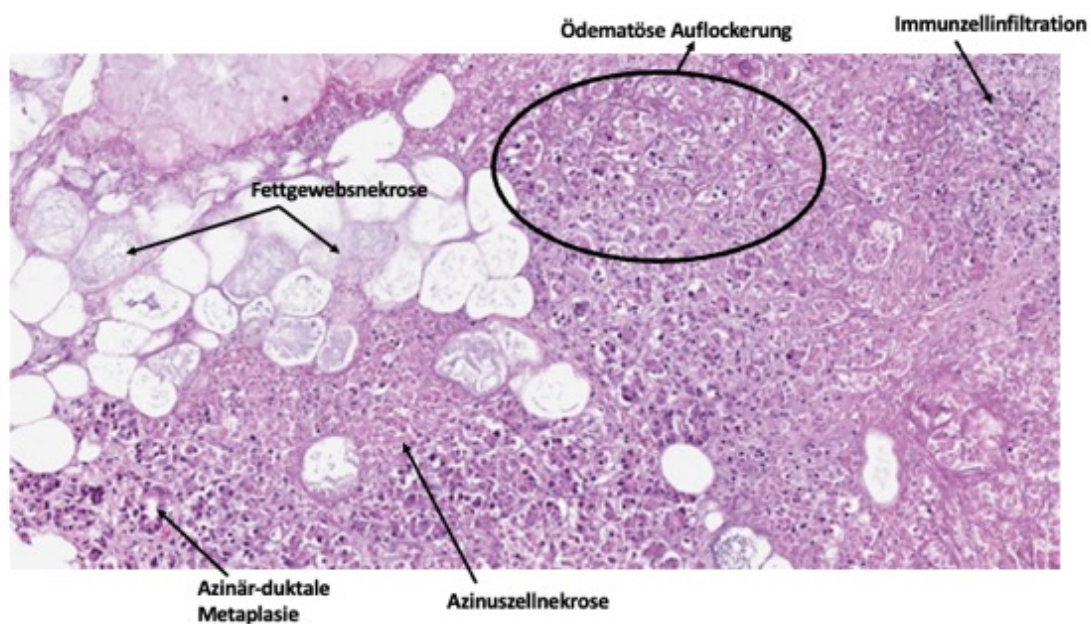


Abbildung 1: Histologische Darstellung einer akuten Pankreatitis. Die charakteristischen Merkmale einer AP sind ersichtlich wie die Immunzellinfiltration, die Ödembildung zwischen den Azinuszellen sowie Azinuszell- und Fettgewebnekrosen. In der linken unteren Bildecke zeigt sich eine azinär-duktales Metaplasie., welche stark an Gangstrukturen erinnern. Das Präparat wurde hier mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt, Auflösung 100 µm. Das Bild wurde aus der digitalen Präparate-Sammlung des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf entnommen.

Die therapeutischen Möglichkeiten während der akuten Phase einer AP sind sehr limitiert, eine kausale Therapie – bis auf die endoskopische Entfernung auslösender Gallensteine bei der biliären akuten Pankreatitis besteht nicht. Wichtig ist vor allem eine engmaschige Kreislaufüberwachung sowie eine ausreichende Volumentherapie der Patient:innen, um der Dehydration und intravasalen Exsikkose entgegenzuwirken (Beyer et al., 2022). Hierbei

konnte in zahlreichen Studien ein positiver Einfluss auf die Entwicklung von Nekrosen und die Letalität bei einem frühzeitigen Beginn der Volumentherapie gezeigt werden (Banks et al., 2006). Zudem wird frühzeitig eine analgetische Therapie und eine Thrombembolieprophylaxe gestartet; weitere Komplikationen werden nachfolgend kausal behandelt, Beispiele sind hier die Behandlung eines Nierenversagens oder die interventionelle Nekrosektomie und Drainage bei Verdacht auf infizierten Nekrosen (Beyer et al., 2022).

1.1.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis (CP) ist ein schweres Krankheitsbild, welches mit einer Reduktion der 10-Jahresüberlebensrate von über 20% gegenüber der Allgemeinbevölkerung einhergeht (Beyer et al., 2022).

Patient:innen mit CP beklagen oft diffuse gürtelförmige Schmerzen, die z.T. über Tage anhalten können. Zudem kann es im Verlauf zu Maldigestionen mit Gewichtsabnahme, Diarrhö, Meteorismus als Ausdruck der gestörten exokrinen Funktion sowie einem Insulinmangeldiabetes kommen (Herold 2020, S. 503).

Die Entwicklung einer CP ist dabei in 80% der Fälle auf eine äthyltoxische Genese zurückzuführen, die idiopathische Form ist mit 15% auf Platz zwei der Ursachen. Weniger häufig sind chronische Pankreatitiden in Form einer autoimmunen Pankreatitis, einer hereditären Pankreatitis oder in Form einer obstruktiven Pankreatitis bspw. bei Tumoren im Pankreaskopf. Weitere Risikofaktoren sind Nikotinabusus, Medikamente (z.B. Diuretika, NSAR, Betablocker) oder ein Hyperparathyreoidismus (Herold 2020, S.503).

Bei der CP kommt es zu einer irreversiblen Gewebsschädigung mit Fibrosierung, Azinuszellatrophie, Kalzifikationen und Gangveränderungen. Diese morphologischen Veränderungen führen zu einer progredienten exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz (Zheng et al., 2013).

Neben der progredienten Verschlechterung der Organfunktion ist eine CP auch mit zahlreichen Komplikationen assoziiert. Die häufigste Komplikation ist hierbei mit 20% die Ausbildung einer Pankreaspseudozyste. Diese können sich spontan zurückbilden, es kann jedoch auch zu Einblutungen, Kompressionen von Gefäßen oder des Gallengangs sowie zur Infektion und Abszessbildung kommen. In diesen Fällen muss eine endoskopische oder chirurgische Drainierung der Pseudozyste erfolgen. Die gefürchtetste Komplikation ist die Entwicklung eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC), welche bei Patient:innen mit CP um das 16-Fache erhöht ist (Carriere et al., 2009).

1.1.3 Mausmodelle der akuten & chronischen Pankreatitis

Beide Formen der Pankreatitis werden in den meisten Fällen konservativ behandelt. In seltenen Fällen müssen allerdings ausgedehnte Nekrosen oder geschädigte Gewebeareale chirurgisch reseziert werden (Murtaugh and Keefe, 2015).

Um die Pathophysiologie der Pankreatitis besser zu verstehen und um mögliche medikamentöse Therapien zu erproben, müssen experimentelle Studien daher oft auf Tiermodelle zurückgreifen. Außerdem geben Tiermodelle wichtige Einblicke in die Regeneration des Pankreas und ihre beeinflussenden Faktoren. Dennoch ist die Übertragbarkeit auf den Menschen nur eingeschränkt möglich, sie können daher nie als einziges Modell dienen.

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten, eine Pankreatitis im Tiermodell auszulösen: die genetischen und die nicht-genetischen Modelle. In genetischen Modellen entstehen durch zielgerichtet induzierte Mutationen pankreatitis-ähnliche Zellveränderungen, die insbesondere in der Erforschung von idiopathischer, hereditärer Pankreatitis oder zum Testen medikamentöser Therapien Anwendung finden (Saloman et al., 2019).

Zum anderen gibt es nicht-genetische Modelle, bei denen durch chemische Substanzen eine Pankreatitis ausgelöst wird, indem analog zur AP im Menschen eine verfrühte Aktivierung der Pankreasenzyme im Organ selbst nachgeahmt wird. Diese Modelle dienen vor allem dem Verständnis von biliären, alkohol-induzierten oder autoimmunen Pankreatiden (Saloman et al., 2019).

Weit verbreitet unter den nicht-genetischen Modellen ist die Caerulein-induzierte Pankreatitis im Mausmodell (Saloman et al., 2019). Caerulein ist ein Cholecystokinin (CCK)-Analogon, welches intraperitoneal verabreicht wird. Durch seine Bindung an CCK-Rezeptoren im Pankreas stimuliert es die Enzymsekretion (Willemer et al., 1992). Durch deren übermäßige Sekretion werden die Enzyme bereits im Pankreas aktiviert und es kommt analog zur biliären Pankreatitis beim Menschen zu einer Autodigestion des Organs (Murtaugh and Keefe, 2015).

In einem alternativen Verfahren werden Gallensäuren über eine ERCP appliziert, was jedoch technisch herausfordernd ist und daher seltener eingesetzt wird. Weitere mögliche Triggersubstanzen im Tiermodell sind Cholecystokinin 8, Muskarinagonisten oder L-Arginin (Habtezion et al., 2019).

Der Vorteil der nicht-genetischen Modelle ist eine einfache Übertragbarkeit auf verschiedene Versuchstiere sowie deren gute Steuerbarkeit. So kann durch Dosis, Häufigkeit und Applikationsdauer der Chemikalien sowohl zwischen einer milden und einer schweren Form als auch zwischen einer AP und einer CP gewählt werden. So reicht bei ersterem eine Gabe über wenige Tage aus, eine CP hingegen erfordert eine Gabe über 3-10 Wochen (Saloman et al., 2019).

1.2 Regeneration

Das Pankreas zeigt eine hohe Regenerationsfähigkeit, die als Folge jedweder Inflammation des exokrinen Pankreas induziert wird. Im Zentrum steht dabei das Ersetzen der geschädigten Azinuszellen, wofür zwei wesentliche Vorgänge beschrieben sind.

Zum einen werden die geschädigten Zellen durch Proliferation von gesunden, bereits bestehenden reifen Azinuszellen ersetzt (Zhou and Melton, 2018). Nachweisbar ist dies durch eine erhöhte Expression des Proteins Ki-67, welches sich im Zellkern befindet und im Allgemeinen während der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus exprimiert wird. Es dient in der Diagnostik insbesondere als Proliferationsmarker einer Zellpopulation oder eines Gewebes, da es immunhistochemisch einfach nachzuweisen ist (Scholzen and Gerdes, 2000). Hierbei dient Ki-67 v.a. zur Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit von Tumoren, welche Rückschluss auf die Aggressivität und somit die Prognose von Tumoren ermöglicht. Zusätzlich dient es im Rahmen von Entzündungen zur Darstellung der Zellteilungsaktivität des Gewebes (Remnant et al., 2021).

Eine eher untergeordnete Rolle in der Azinuszellerneuerung spielt hingegen die Neogenese aus Stammzellen (Murtaugh and Keefe, 2015). Zum anderen kommt es während der Regeneration zu einer Transdifferenzierung der Azinuszellen hin zu einem duktalem Phänotypen. Dieser Prozess wird azinär-duktales Metaplasie (ADM) genannt. Hierbei kommt es zu einer genetischen und morphologischen Veränderung der Azinuszellen, charakteristisch ist hierbei eine Abnahme der zymogenen Granula und eine Lumenausbildung (Zhou and Melton, 2018). Auf der einen Seite kommt es zu einer Abnahme von azinären Transkriptionsfaktoren, z.B. Ptf1a, Mist1 und Nr5a2, wodurch die Enzymsynthese herunterreguliert wird (Marstrand-Dauce et al., 2023). Hierbei kommt es zu einer geringeren Expression von azinären Markern wie Amylase und Trypsin (Wang et al., 2019). Auf der anderen Seite kommt es zu einer Hochregulation von duktalem Markern, wie dem Vorläufergenen *Sox9*, *Hnf6* und *Cytokeratin-19* (CK19) (Marstrand-Dauce et al., 2023). Dieser Prozess ist zunächst reversibel und stellt eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration nach AP dar. Eine Hypothese ist hierbei, dass die Runterregulierung der azinären Marker die Enzymausschüttung und damit die Autodigestion verringert (Marstrand-Dauce et al., 2023). Die dabei gesparte Energie durch geringere Enzymproduktion und -ausschüttung kann wiederum für die Proliferation verwendet werden. Zudem können ADM durch die Hochregulierung von Vorläufergenen besser proliferieren, während ausgereifte Azinuszellen kaum mitotische Aktivität aufweisen (Marstrand-Dauce et al., 2023). Nach Abklingen der Inflammation und somit den Stimuli der ADM-Bildung, kommt es zur Redifferenzierung der metaplastischen Zellen hin zu gesunden Azinuszellen und damit zur Ausheilung der Entzündung (Zhou and Melton, 2018).

Jedoch scheinen die Azinuszellen während der ADM besonders empfindlich für neoplastische Entartung und folglich für die Tumorgenese zu sein (Benitz, 2015). Kommt es während dieser Phase zu Mutationen in den Zellen, hierbei führend eine *KRAS*-Mutation, begünstigt dies die Ausbildung von Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms (PDAC) und anschließend des Karzinoms selbst (s. Abb. 2). ADM werden daher aktuell als eine mögliche prämaligne Läsion des PDAC erforscht (Marstrand-Dauce et al., 2023).

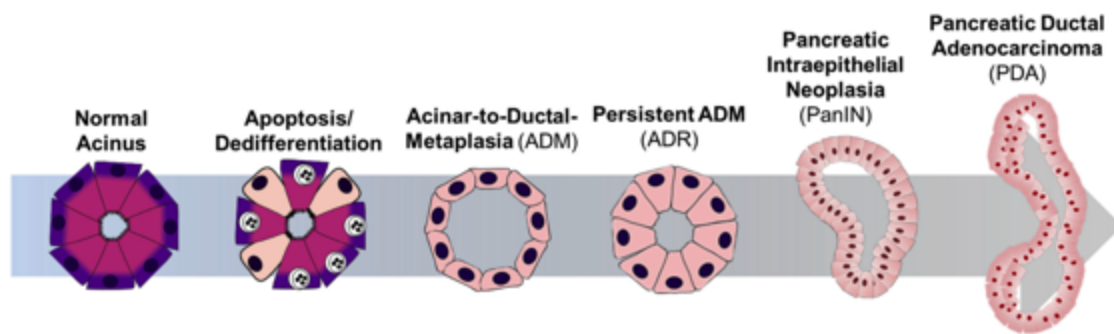


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Karzinogenese der Azinuszellen hin zum Pankreaskarzinom. Die Abbildung zeigt einen gesunden Azinuszellkomplex, welcher über verschiedene Zwischenschritte zum Karzinomzellkomplex entartet. Im Rahmen von Azinuszellschädigung kommt es zunächst zur Apoptose sowie zur Bildung von ADM. Kommt es nicht zur gewollten Re-differenzierung zurück zu gesunden Azinuszellen, kommt es zur persistierenden ADM, welche wiederum zu Vorläuferläsionen und später zum Karzinom werden kann. Im Rahmen dieser Karzinogenese kommt es zu verschiedenen Mutationen (z.B. *KRAS* als Voraussetzung für eine Transformation), diese sind aus Übersichtsgründen hier nicht dargestellt. (entnommen aus Chuvin et al. 2017, Acinar-to-Ductal Metaplasia Induced by Transforming Growth Factor Beta Facilitates *KRAS*^{G12D}-driven Pancreatic Tumorigenesis, URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28752115/>, genehmigt unter den Konditionen der Creative Commons Attribution Noncommercial License)

1.3 Karzinogenese und Vorläuferläsionen des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) ist mit 92% die häufigste maligne Entartung im Pankreas und weist trotz intensiver Forschung weiterhin eine schlechte Prognose mit einer 5- Jahresüberlebensrate bei derzeit ca. 10% auf (Regel et al., 2020). Begründet ist dies zum einen durch ein spätes Auftreten von Symptomen und dadurch einer späten Diagnosestellung sowie einer frühen Metastasierung.

Im Rahmen der Karzinogenese gehen dem PDAC verschiedene Vorläuferläsionen voraus. Bereits gesichert als prämaligne Läsionen sind hierbei die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) sowie die muzinöse zystische Neoplasie (MCN) zu nennen (Distler et al., 2014). Diese Läsionen werden nach ihrem Dysplasiegrad in low-grade und high-grade unterteilt, wobei die low-grade Neoplasien zunächst klinisch beobachtet werden, die high-grade Neoplasien jedoch

als *carcinoma in situ* gelten und hierbei eine operative Behandlung empfohlen wird (Basturk et al., 2015).

Die beiden wichtigsten Vorläuferläsionen sind die PanIN und die IPMN, wobei die PanIN die häufigste Läsion ist. Hierbei kommt es histologisch zu einer mikroskopisch kleinen flachen oder papillären epithelialen Proliferation der kleinen Nebengänge (Distler et al., 2014). IPMN beschreibt eine makroskopische überwiegend papilläre, muzin-produzierende Neoplasie, die entweder im Hauptgang (*main duct*, *MD-IPMN*), in den Nebengängen (*branch duct*, *BD-IPMN*) oder in beiden (*mixed-type*, *MX-IPMN*) auftreten kann (Basturk et al., 2015).

Als weitere mögliche prä-maligne Läsionen werden aktuell die bereits genannte ADM sowie die atypische flache Läsion (AFL) diskutiert (Opitz et al., 2021). Bei der AFL handelt es sich um intralobuläre Zusammenschlüsse von kleinen Gängen mit einer Größe von < 0,5cm, meistens nicht muzinös. Sie weisen meist quaderförmige Zellen mit Kernatypien und ein aktiviertes Stroma auf

Das PDAC zeichnet sich zudem durch zahlreiche Mutationen aus, die es dem Tumor u.a. ermöglichen, das Immunsystem zu unterdrücken (*immune escape*) und damit das Tumorwachstum zu begünstigen (Hashimoto et al., 2022). Vier Mutationen zeigen sich hierbei als Treibermutation: das Onkogen *K-RAS* sowie die Tumorsuppressorgene *TP53*, *CDKN2A* und *SMAD4* (Jones et al., 2008, Waddell et al., 2015). Bereits während der Bildung der Vorläuferläsionen treten erste Mutationen auf, bei Progression zum PDAC nehmen diese in ihrer Anzahl zu (Kanda et al., 2012). Das PDAC ist somit ein Karzinom mit multiplen, heterogenen Mutationen.

1.4 Tenascin C

Tenascin C (TNC) ist ein Protein der extrazellulären Matrix (EZM), welches im PDAC vermehrt exprimiert wird und *in vitro* eine tumorfördernde Wirkung zeigt (Paron et al., 2011). TNC besteht aus sechs Monomeren, welche über den N-Terminus verbunden ein Hexamer formen (s. Abb. 4). Es hat ein Gewicht von 180 bis 400 kDa. Durch seine komplexe Form kann das Protein an zahlreiche unterschiedliche Strukturen wie Kollagen, Fibronectin, Periostin, aber auch Proteine der Zelloberfläche binden (Marzeda and Midwood, 2018). Außerdem hat TNC durch alternatives Spleißen und Proteinmodifikation zahlreiche Isoformen, welche jeweils weitere unterschiedliche Bindungspartner haben und dadurch multiple weitere Funktionen ermöglichen (Midwood et al., 2016).

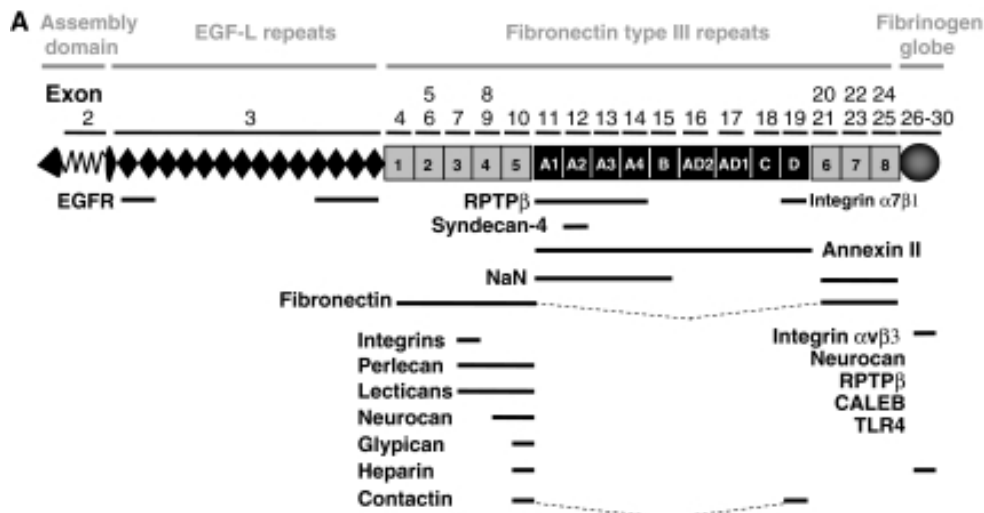


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Tenascin C sowie seinen Bindungspartnern. Die Abbildung zeigt oben eine schematische Darstellung von Tenascin C, wobei die Exon/Intron-Struktur sowie die Aufteilung und Lokalisation der verschiedenen Proteindomänen dargestellt ist. Unten rechts sind die verschiedenen Bindungspartner von Tenascin C dargestellt. (Darstellung entnommen aus Midwood et al. 2009, The role of tenascin-C in tissue injury and - 14 -umorigenesis, URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19838819/>, genehmigt unter den Konditionen der Creative Commons Attribution Noncommercial License)

Im gesunden Gewebe ist TNC nur in geringem Ausmaß vorhanden, die physiologischen Funktionen lassen sich bereits im Namen erkennen (lat. Tenere – halten, lat. Nasci – geboren werden). So wird TNC während der Embryonalentwicklung stark exprimiert und ist an der Morphogenese vieler Gewebearten und Organen beteiligt (Midwood et al., 2016). Im adulten Organismus zeigt es sich nur noch vereinzelt im Bindegewebe, in einigen Epithelzellen sowie in Stammzellnischen, z.B. im Knochenmark (Chiquet-Ehrismann et al., 2014).

Dennoch ist TNC auch im adulten Organismus bedeutsam, da es als „Stressprotein“ des Körpers wirkt. Bei Entzündungs- und Wundheilungsprozessen kommt es durch Gewebeschäden zu einer erhöhten Expression. Über Bindung an verschiedene Rezeptoren oder Proteine der EZM nimmt TNC Einfluss auf die Zellproliferation, Zellmigration und Zelladhäsion (Midwood et al., 2016). Verschiedene Daten zeigen dabei sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte des Proteins, sodass es insgesamt einen regulativen Einfluss auf Entzündungsgeschehnisse zu haben scheint (Marzeda and Midwood, 2018). Eine langfristige Erhöhung von TNC ist hingegen pathologisch und mit vielen Erkrankungen wie chronischen Erkrankungen oder Karzinomen assoziiert (Udalova et al., 2011).

Im Pankreas wird TNC durch spezifische Fibroblasten, sogenannte pankreatische Stellatumzellen (*pancreatic stellate cells*, *PSC*), produziert und zeigt im gesunden Pankreas analog zu anderen Organen zunächst eine sehr geringe Expression. Bei pathologischen Veränderungen des exokrinen Pankreas finden sich jedoch erhöhte Expressionslevel für TNC (Juuti et al., 2004), zudem wurde während der Karzinogenese von Vorläuferläsionen

hin zum PDAC eine progredient ansteigende Expression des Proteins gefunden (Esposito et al., 2006).

TNC zeigt hierbei einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation und Migration des Tumors sowie dessen Angiogenese. Einen Effekt auf das Überleben und somit die Prognose bei PDAC konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden (Paron et al., 2011) (Juuti et al., 2004). Wegen der *in vitro* Effekte auf Pankreastumorzellen sowie einem schlechteren Überleben in Assoziation mit TNC in anderen Tumoren (e.g. kolorektale Karzinom, Mammakarzinome) sind weitere Untersuchungen zu dessen Funktion sinnvoll. Über die Rolle von TNC während einer Pankreatitis und dessen Ausheilung ist bisher wenig bekannt, wobei erste *in vitro* Versuche einen pro-regenerativen Effekt während der akuten Inflammation zeigten (Kuhlenkampff, 2020).

1.5 Faktoren der Pankreasepathogenese im Zusammenhang mit Tenascin C

1.5.1 Stromale Reaktion und Pancreatic stellate cells

Allgemein ist das Stroma eines Organs der Anteil, der das funktionelle Hauptgewebe umgibt und sich aus kollagenen, elastischen und retikulären Bindegewebsfasern sowie verschiedenen Proteoglykanen zusammensetzt. Zum einen dient es als physikalischer Stützapparat des Organs, ist aber auch aktiv an der Organfunktion u.a. durch Zell-Zell-Kontakte und Signaltransduktion beteiligt.

Die sogenannte stromale Reaktion beschreibt die Aktivierung von Fibroblasten im Stroma als Antwort auf eine Gewebsschädigung. Dies ist im ersten Moment Teil der physiologischen Wundheilung, es kommt hier nach Immunzellinfiltration und Phagozytose der Entzündung zu einer proliferativen Phase. Die in dieser Phase aktivierten Fibroblasten synthetisieren extrazelluläre Matrixproteine, um das Gewebe zu erneuern.

Dieser Prozess tritt u.a. während der Pankreasregeneration auf. Während der AP kommt es noch kaum bis gar nicht zur Ausbildung eines vermehrten Stromas, die Regeneration erfolgt hier über die in Kapitel 1.2 genannten Prozesse. Im Rahmen einer CP und dem PDAC kommt es jedoch zur Ausbildung einer ausgeprägten Stromareaktion (Bynigeri et al., 2017). Seine Rolle rückt immer mehr in den Fokus, da es einen stimulierenden Einfluss auf die Erkrankungen nimmt und damit von zentraler Bedeutung in der Pathogenität beider Erkrankungen ist (Jin et al., 2020).

Das Stroma setzt sich zusammen aus zellulären (Fibroblasten, Immunzellen) sowie azellulären Anteilen (EZM-Proteine, Zytokine und Wachstumsfaktoren). Zu den EZM-Proteinen gehört hierbei u.a. TNC, welches in beiden Erkrankungen eine vermehrte Expression zeigt (Esposito et al., 2006).

Die pankreasspezifischen Fibroblasten sind hierbei die oben genannten PSC. Im gesunden Pankreas befinden sie sich in einem ruhenden Zustand und sind periazinär und interlobulär zu finden. Sie machen ca. 4-7% des Gewebes aus (Kleeff et al., 2007). Funktionell dienen PSC der Speicherung von Lipiden und Vitamin A und sind an der regelmäßigen, physiologischen EZM-Erneuerung beteiligt (Bynigeri et al., 2017).

Durch eine Inflammation kommt es zur Aktivierung und Proliferation der PSC, nachweisbar durch die Expression von alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). Auslöser hierfür sind unter anderem oxidativer Stress, proinflammatorische Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, IL1, IL6, IL8), Wachstumsfaktoren, Ethanol und Nikotin, im Verlauf kommt es dann zur autokrinen Aktivierung der PSC selbst (Erkan et al., 2012). In diesem Prozess kommt es zu einer Abnahme der gespeicherten Lipidtröpfchen und die Zellen nehmen einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotypen an (Bynigeri et al., 2017).

Während einer AP zeigen PSC zunächst einen regenerativen Effekt. Durch Ihre Fähigkeit, neutrophile Granulozyten und auch nekrotische Azinuszellen zu phagozytieren, tragen sie vermutlich zur Reduktion der Entzündungsaktivität im Gewebe bei (Bynigeri et al., 2017). Obwohl PSC zunächst besonders für ihre profibrogene Funktion in CP und PDAC bekannt waren, scheinen sie während einer AP zunächst einen eher inhibierenden Einfluss auf die Fibrogenese zu nehmen (Bynigeri et al., 2017). Außerdem können PSC mit Integrinrezeptoren interagieren und so ebenfalls eine regenerative Rolle einnehmen (Bynigeri et al., 2017).

Bei Beendigung der Entzündung kommt es zu einer Deaktivierung der PSC, sie gehen wieder in ihren ruhenden Zustand über. Entwickelt sich die Entzündung jedoch zu einem chronischen Zustand, bleiben die Zellen weiterhin aktiviert und übernehmen nun insbesondere ihre profibrogene Funktion (Bachem et al., 2006).

Während der CP führt die Stromabildung zum Ersetzen der geschädigten Azinuszellen und ist somit verantwortlich für den Funktionsverlust des Organs (Bynigeri et al., 2017).

Im PDAC macht das Stroma als Teil des *tumor microenvironment* (TME) mit 50-80% den Hauptanteil des Tumolvolumens aus (Bynigeri et al. 2017). Dieses TME spielt gemeinsam mit den Mutationen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression des PDAC. Auch hier setzt sich das TME aus verschiedenen zellulären Komponenten wie Immunzellen, Fibroblasten und endokrinen Zellen zusammen, u.a. kommt es zu einer starken Vermehrung von PSC (Kleeff et al., 2007). Das TME sowie die PSC sind entscheidende Faktoren des oben beschriebenen *immune escapes* (Opitz et al., 2021). Im PDAC kommt es zur Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder $\text{TGF-}\beta 1/2$, wodurch der Tumor dem Immunsystem entgeht (von Bernstorff et al., 2001). An diesem Prozess sowie bei der Aktivierung von regulatorischen T-Zellen, welche die Effektor-T-Zell-Antwort unterdrücken, scheinen PSC einen wichtigen Anteil zu übernehmen (Kleeff et al.,

2007). Zum anderen bewirkt die starke Fibrosebildung einen Schutz des Tumors vor äußeren Einflüssen, u.a. auch vor Chemotherapeutika oder Bestrahlung. Neben der direkten Synthese des Stromas interagieren PSC auch direkt mit Tumorzellen und stimulieren hierüber das Zellwachstum und die Metastasierung und hemmen auf der anderen Seite die Apoptose der Tumorzellen. Ferner stimulieren sie die Angiogenese, Neuralinvasion sowie die epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) (Kleeff et al., 2007). Während der EMT verlieren epitheliale Tumorzellen ihre Polarität und Gewebehaftung und transformieren zu Mesenchymzellen, wodurch sie einfacher ins Blut übergehen und somit metastasieren können. Tumorzellen können wiederum die Aktivierung weiterer PSC stimulieren und halten somit den Kreislauf am Laufen (Jin et al., 2020); (Erkan et al., 2012).

PSC und TNC stehen im PDAC in engem Zusammenhang, da PSC als einer der Hauptproduzenten von TNC identifiziert wurde (Esposito et al., 2006, Paron et al., 2011). Inwiefern eine erhöhte TNC-Expression auch während der AP oder CP durch PSC bedingt ist, ist aktuell noch unklar.

1.5.2 Integrinrezeptoren

Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche als Zelladhäsionsmoleküle sowohl bei der Zell-Zell-Interaktion als auch bei der Zell-Matrix-Interaktion eine Rolle spielen (Niu and Li, 2017).

Insgesamt sind 24 verschiedene Integrinrezeptoren bekannt, die durch unterschiedliche Zusammensetzung der insgesamt 18 α - und 8 β -Untereinheiten gebildet werden (Ginsberg, 2014). Integrine sind entscheidend an der Signaltransduktion von Zellen untereinander sowie zwischen Zellen und der EZM beteiligt und nehmen so Einfluss auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellüberleben und Zellmigration (Cooper and Giancotti, 2019). Während Wundheilungs- und Inflamationsprozessen kommt es zu einer vermehrten Expression der Integrine, die durch die oben genannten Funktionen einen proregenerativen Effekt auf das entzündete Gewebe ausfüllen. Auf der anderen Seite sind Integrine auch an der Karzinogenese zahlreicher Tumore beteiligt. Über eine Veränderung der EZM kommt es zu einer deregulierten Integrinexpression, welche über intrazelluläre Signalwege Prozesse wie Zellproliferation oder -migration anregt und sich somit tumorfördernd auswirkt (Cooper and Giancotti, 2019).

Einige Integrine stellen einen Bindungspartner von TNC dar, bisher bekannt ist dies für Integrin $\alpha2/7/8/9\beta1$ und $\alpha\beta1/3/6$ (Yoshida et al., 2015).

Die genaue Rolle von Integrinen in der Pankreasregeneration sowie -karzinogenese ist bislang nicht vollständig verstanden.

Erste Studien zeigen einen pro-regenerativen Effekt bei der AP, bei der es u.a. zu einer Störung von Mitochondrien kommt, wogegen die Aktivierung der Integrinrezeptoren $\alpha\beta3/5$ einen protektiven Effekt auf Mitochondrien hat. Dies erfolgt über die Aktivierung des FAK-STAT3-Signal-Weges (Ren et al., 2021).

Auch in CP und im PDAC scheinen Integrine eine Rolle zu spielen, da verschiedene Studien bei beiden Erkrankungen eine erhöhte Expression, u.a. von Integrin $\beta1$, $\alpha6\beta4$ und $\alpha\beta6$, zeigen konnten (Niu and Li, 2017).

Das Heterodimer Integrin $\alpha\beta6$ ist besonders, da die $\beta6$ -Untereinheit nach aktueller Forschung ausschließlich mit der $\alpha\upsilon$ -Untereinheit dimerisieren kann. Ferner wird der Rezeptor ausschließlich auf Epithelzellen exprimiert (Koivisto et al., 2018). Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Integrinen kommt Integrin $\alpha\beta6$ kaum bis gar nicht im gesunden adulten Gewebe vor (Niu and Li, 2017). Eine Hochregulation des Rezeptors findet sich während der Embryogenese, bei Gewebereparatur und konnte zudem während der Karzinogenese zahlreicher Tumore nachgewiesen wurde (Breuss, 1995). So findet sich Integrin $\alpha\beta6$ in Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, des Magens, des Pankreas, des Ovars oder der Mamma (Koivisto et al., 2018). In diesen Organen nimmt der Rezeptor einen stimulierenden Einfluss auf die Zellproliferation und das Wachstum der Tumore und fördert außerdem die Invasion und Metastasierung, u.a. über Modulierung von proteolytischen Proteinen der Zelloberfläche und über Förderung der epithelial-mesenchymalen Transformation (Niu and Li, 2017). Über all diese Prozesse hinweg ist ein hohes Expressionslevel von Integrin $\alpha\beta6$ in Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Niu and Li, 2017). Auch im PDAC hat Integrin $\alpha\beta6$ eine wichtige Rolle, bei über 80% der Patienten kommt es zu einer Expression des Proteins und führt zu den oben genannten tumorfördernden Effekten. Eine Blockade des Rezeptors durch den Antikörper 264RAD kombiniert mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin zeigte in Mäusen ein vermindertes Tumorwachstum sowie ein erhöhtes Überleben, was einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt darstellt (Reader et al., 2019).

1.5.3 Sox9

Der Transkriptionsfaktor Sox9 gehört der Familie der sex-determining region Y box-containing factors (Sox) an und ist an der Entwicklung zahlreicher Organe beteiligt (Ming et al., 2022). Auch in der Pankreogenese übernimmt Sox9 verschiedene Funktionen, die zur Ausbildung des Organs führen.

Zunächst ist Sox9 an dem Erhalt, der Proliferation und dem Überleben von pluripotenten pankreatischen Stammzellen beteiligt (Seymour et al., 2007). Außerdem initiiert es u.a. die endokrine Differenzierung und reguliert pankreatische Transkriptionsfaktoren (Ming et al., 2022). Im Verlauf der Embryogenese nimmt die Expression von Sox9 im Pankreas jedoch

schrittweise ab und beschränkt sich im adulten Pankreas auf die duktafen und zentroazinären Zellen, wodurch diese als fakultative Vorläuferzellen bestehen bleiben (Seymour, 2014). Ferner erhält Sox9 die duktafe Integrität und Zilienformierung (Seymour, 2014).

Neben den physiologischen Funktionen spielt Sox9 jedoch auch in der Regeneration sowie Karzinogenese des Pankreas eine Rolle. So kommt es während der ADM-Formation zu einer Hochregulation von Sox9 in den Azinuszellen, wodurch diese die Metaplasie hin zu duktafen Zellen vornehmen können. Wie bereits oben genannt ist die ADM eine frühe Vorläuferläsion des PDAC, die als möglicher Auslöser der PanIN-Bildung gilt (Seymour, 2014). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression von Sox9 obligatorisch für die Entwicklung von PanIN aus ADM ist, während eine alleinige KRAS-Expression und Unterdrückung von Sox9 nicht zu PanIN-Formationen geführt hat (Seymour, 2014).

Die Interaktion von TNC und Sox9 ist Gegenstand aktueller Forschung. So zeigen Ergebnisse im Mammakarzinom, dass die Hochregulation von Sox9 als Transkriptionsfaktor die Expression von Tenascin C stimuliert (Fazilaty et al., 2016). Die genaue Interaktion im Pankreas bleibt aktuell weiter unklar, auch ein Effekt von TNC auf die Sox9-Expression konnte bisher nicht gezeigt werden.

1.6 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle von Tenascin C während des Regenerationsprozesses des Pankreas im Mausmodell der akuten Pankreatitis. Die genaue Erforschung der zellulären und molekularen Mechanismen der Regeneration nach akuter Pankreatitis stellt nach wie vor ein zentrales Forschungsfeld dar, da diese Erkrankung mit schweren Verläufen sowie einer Einschränkung bis zum Verlust der Pankreasfunktion einhergehen kann. Zudem kann es bei rezidivierenden akuten Pankreatitiden zu chronischen Formen kommen, welche ein erhöhtes Malignitätsrisiko aufweisen.

Ziel der Arbeit ist es, die spezifische Funktion von TNC im Rahmen der Pankreasregeneration zu charakterisieren und zu definieren. Die regenerationsfördernde Wirkung von TNC wurde bereits in verschiedenen Organen, einschließlich *in vitro* im Pankreas, beschrieben. Gleichzeitig deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass TNC im Pankreaskarzinom eine tumorfördernde Funktion ausübt.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht daher die Bedeutung von TNC in der frühen Phase der Pankreasregeneration. Hierfür wurde erstmalig ein *in vivo* Modell durchgeführt, das TNC-Wildtyp und TNC-Knockout Mäuse direkt miteinander vergleicht. Dabei wird nach Caerulein-induzierter akuter Pankreatitis mittels verschiedener histologischer und immunhistochemischer Färbungen die einzelnen Prozesse der Regeneration analysiert. Durch diesen Ansatz wird der Effekt von TNC auf die Regeneration des Pankreas unmittelbar dem Zustand des TNC-Defizits gegenübergestellt, um dessen funktionelle Bedeutung präzise zu erfassen.

2 Material und Methoden

2.1 Mauskollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden genetisch modifizierte Mäuse (*genetically engineered mouse model*, GEMM) verwendet. Das Kollektiv setzt sich dabei aus 2 Kohorten zusammen, welche unterschiedliche Genotypen aufweisen. Die eine Kohorte besteht aus Wildtypmäusen (WT), welche das Protein TNC exprimieren. Die zweite Kohorte besteht aus Knockout-Mäusen (KO), bei welchen das Exon 2 mit dem lacZ-Gen und einer *neomycin resistant cassette* ersetzt wurde, sodass die Produktion von TNC verhindert wird. Diese wurde generiert, um die biologische Wirksamkeit von TNC bei der Pankreatitis und der Karzinogenese charakterisieren zu können. Die genaue genetische Information beider Gruppen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Genetische Information über beide Mauskohorten. Alle Tiere besitzen den gemeinsamen gemischten Hintergrund B6129SF2/J.

Interner Name	Offizieller Name	Hintergrund
TNC-Wildtyp Mäuse	p48Cre ^{+/-} (p48)	Linie p48Cre ^{+/-} (B6.129S6(Cg)- Ptf1a ^{tm2(cre/ESR1)Cvw/J})
TNC-Knockout Mäuse	p48Cre ^{+/-} ; TNC ^{-/-} (p48;Tnc ^{-/-})	Paarung der p48 Linie mit der Mauslinie B6.129-Tnc ^{tmJmol/J} (Tnc ^{-/-})

Die genetisch veränderten Mäuse wurden durch die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet und gehalten. Dies erfolgte mit Genehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2016.A453.

Insgesamt besteht das Mauskollektiv aus 70 Mäusen, wobei die beiden Genotypen jeweils 35 Mäuse umfassen. Bei insgesamt 60 Mäusen wurde mittels Caerulein-Injektion eine akute Pankreatitis ausgelöst. Caerulein ist ein Cholecystokinin-Analogon, welches die Enzymsekretion im Pankreas stimuliert. Infolgedessen kommt es zu einer frühzeitigen Aktivierung der Pankreasenzyme im Organ selbst. In ihrer aktivierten Form führen die Enzyme zu einer Autodigestion des Gewebes und rufen hierbei eine Inflamationsreaktion hervor. Den Mäusen wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen eine supramaximale Dosis von $8 \times 100 \mu\text{g/kg}$ Körpergewicht (KG) Caerulein intraperitoneal injiziert. Hierbei wurde den Mäusen jede Stunde eine Injektion verabreicht, insgesamt 8 Injektionen pro Tag. Die 10 Mäuse, welche nicht mittels Caerulein-Injektion behandelt wurden, erhielten nach dem gleichen Protokoll 0,9% NaCl (physiologische Kochsalzlösung). Sie dienen somit als Kontrollgruppen, da es hier nicht zu einer Pankreatitis kommt.

Die Mäuse wurden zu unterschiedlichen, vorher definierten Zeitpunkten euthanasiert, wobei dies frühe Zeitpunkte (3, 12 und 24 und 48 Stunden) sowie späte Zeitpunkte (7 und 21 Tage) umfasst (s. Abb. 5). Schlussendlich resultieren hieraus 5 Mäuse pro Zeitpunkt und Genotyp (s. Tbl. 2). Die oben beschriebenen Schritte erfolgten bereits im Vorhinein durch das Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die bereits in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Pankreaten wurden für die folgende Arbeit bereitgestellt und aufgearbeitet.

Tabelle 2: Verteilung der Mauskoorte nach den verschiedenen Zeitpunkten und Genotypen.

Die Tabelle zeigt die Aufteilung des Mauskollektivs auf die beiden Genotypen WT und KO sowie auf die verschiedenen Zeitpunkte. Jeder Genotyp hat zudem eine Kontrollgruppe (Control), welche mit Natriumchlorid behandelt wurde. Insgesamt umfasst das Mauskollektiv 70 Mäuse, jede Gruppe umfasst 5 Mäuse.

Zeitpunkt nach letzter Caerulein- Injektion	Wildtyp	TNC-KO
3h	5	5
12h	5	5
24h	5	5
48h	5	5
7d	5	5
21d	5	5
Control	5	5

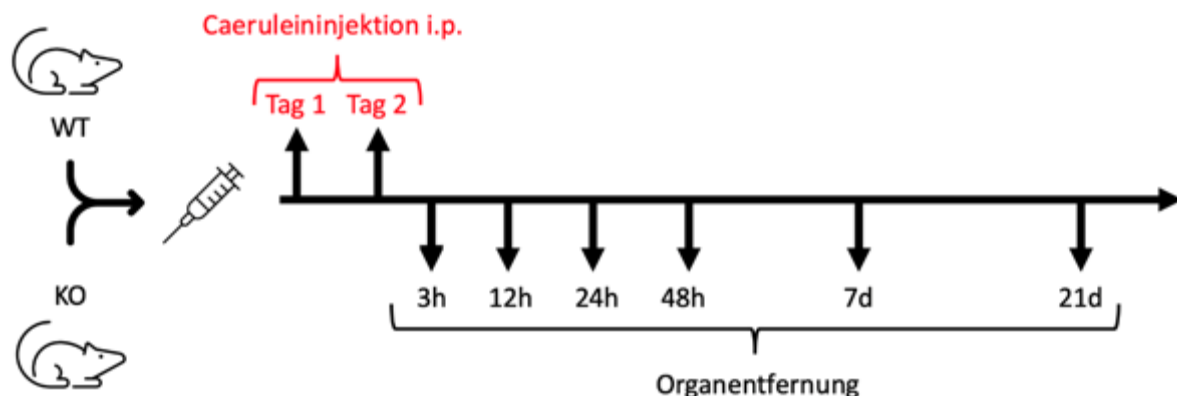


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Caeruleininjektion in die jeweiligen Mauskohorten und die Zeitpunkte der Organentnahme für die Experimente. Nicht inkludiert sind die 10 Mäuse, welche mit Natriumchlorid behandelt wurden. Die Injektion erfolgte analog zu der hier dargestellten Caeruleininjektion, die Organentnahme erfolgte nach 48 Stunden.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Tabelle 3: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge mit Hersteller und Bezugsort.

Gerät	Hersteller
Automated Staining System (i6000TM)	BioGenex (San Ramon, USA)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Kochplatte (Einzelkochplatte THS 2022/E Gastro)	ROMMELSBACHER ElektroHausgeräte GmbH (Dinkelsbühl, Deutschland)
Leica TCS SP8 STED 3X Mikroskop	Leica Microsystem GmbH, Wetzlar
Magnetrührer (IKAMAG® RCT)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, Deutschland)
PAP pen	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg, Deutschland)
pH-Meter (HI-2020 edge®)	Hanna Instruments GmbH (Vöhringen, Deutschland)
Pipetten (Eppendorf Research® plus)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Rotationsmikrotom	Slee (Mainz, Deutschland)
Schnellkochtopf (vitaquick® pressure cooker)	Fissler GmbH (Idar-Oberstein, Deutschland)

Slide Scanner Aperio AT2	Leica Mircosystem GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Tissue-Tek Prisma® <i>Plus</i> Automated Slide Stainer	Sakura Finetek USA, Inc. (Torrance, USA)
Universalwärmeschrank (universal oven UF75)	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Waage	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Wasserbad	MEDAX (Olching, Deutschland)

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge mit Hersteller und Bezugsort.

Material	Hersteller
Autostainer-Pipettenspitzen 1.0ml	BioGenex (San Ramon, USA)
Deckgläser 24x32mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik (Edermünde, Deutschland)
Mikrotomklingen	Feather (Osaka, Japan)
Pipettenspitzen (TipOne® 10µl, 100µl, 1000µl)	STARLAB International GmbH (Hamburg, Deutschland)
Reagiergefäße (0,2 – 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsröhrchen (Cellstar® 5ml, 10ml, 15ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen, Deutschland)
Stripetten	Costar (Tewksbury, USA)
Objektträger (Klinipath B.V.)	VWR Corporation (Pennsylvania, USA)

2.2.3 Chemikalien

Tabelle 5: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge mit Hersteller und Bezugsort.

Chemikalien	Hersteller
DAB Substrat kit	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Citronensäure	Merck KGaA (Darmstadt)
Eindeckelmedium (Eukitt® Quick hardening)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (99,5% denaturated with 1% MEK)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Goat Serum	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Hämalaunlösung	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
IHC Waschpuffer 10x	DCS Innovative Diagnostik-System (Hamburg)
PBS	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Pronase (10165921001)	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Tris Base	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Tween20	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

2.2.4 Puffer

Tabelle 6: Bestandteile und Zusammensetzung der verwendeten Puffer, die für die Experimente hergestellt wurden.

Puffer	Zusammensetzung
Blocking Solution	1% BSA in PBS Goat serum 10% Triton X-100 0,1%
Citratpuffer, pH6	10,7g Citronensäure ➔ Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen pH 6 einstellen
TE Puffer, pH 9	1,21g Tris base 0,29g EDTA ➔ Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen pH 9 einstellen
PBS	9,55g PBS ➔ Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen
TBS-T	24,2 g Tris base 80 g NaCl 0,1% Tween20 (1 ml auf 1 Liter)

→ Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

2.2.5 Primäre Antikörper

Tabelle 7: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten primären Antikörper gegen die aufgelisteten Epitope in alphabetischer Reihenfolge und mit Angabe zur Spezies, der für die Färbungen verwendeten Verdünnungen, die Herstellerangaben mit Bezugsquelle und Produktnummer.

Antikörper gerichtet gegen ...	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
Alpha-SMA	Maus	1:400	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab5694
Amylase	Maus	1:800	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	Sc-46657
CK19	Ratte	1:1600	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA)	TROMA-III-c
Integrine β3	Kaninchen	1:200	Cell Signaling (Danvers, USA)	13166
Integrine β6	Maus	1:4000	Calbiochem (San Diego, USA)	407317
Ki-67	Maus	1:400	BD Pharmingen	550609
Sox9	Kaninchen	1:2000	EMD Millipore	AB5535

2.2.6 Sekundäre Antikörper

Tabelle 8: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten sekundären Antikörper in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe zur Spezies, der für die Färbungen verwendeten Verdünnungen, der Herstellerangaben mit Bezugsquelle und Produktnummer.

Kit	Spezies	Hersteller	Verdünnung
VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Peroxidase	Maus	Vector laboratories Inc. (Burlingame, USA)	1:200
VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Peroxidase	Kaninchen	Vector laboratories Inc. (Burlingame, USA)	1:200

VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Peroxidase	Ratte	Vector laboratories Inc. (Burlingame, USA)	1:200
--	-------	---	-------

2.2.7 Software

Tabelle 9: Listung der für die histologische Färbung, Bildauswertung, statistische Analyse, Dokumentation und Manuskripterstellung der unten genannten Experimente verwendeten Software in alphabetischer Reihenfolge.

Software	Hersteller
Aperio ImageScope (Version 12.3.3.5048)	Leica Microsystem GmbH (Wetzlar, Deutschland)
i6000TM Autostainer Staining System Softwareversion 3.0	BioGenex (San Ramon, USA)
Prism 5	GraphPad Software, Inc (San Diego, USA)
Microsoft Office 365	Microsoft (Redmond, USA)

2.3 Methoden

2.3.1 Gewebeaufarbeitung

Nach Euthanasierung der Mäuse wurden die inneren Organe entnommen, in 4%ig gepuffertem Formaldehyd (Formalin) fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet. Für die vorliegende Promotionsarbeit wurden die bereits im Voraus in Paraffinblöcke eingebetteten Pankreaten verwendet.

Das in Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebe (FFPE-Gewebe) wurde mittels Rotationsmikrotom auf 1,5 µm geschnitten. Dafür wurden die Paraffinblöcke zunächst für mindestens 60 Minuten bei -20°C gekühlt, im Anschluss geschnitten und die Schnitte bei ca. 46°C zum Strecken in ein Wasserbad mit destilliertem Wasser gelegt. Von dort wurden sie auf Objektträger gezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am Folgetag wurden die Schnitte zur Färbung genutzt oder andernfalls bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.3.2 Färbemethoden des Gewebes

2.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zunächst wurden allen Pankreasproben zur Ermittlung des Entzündungsgrad mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt. Das Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau

an, hierunter fallen u.a. DNA und Zellkerne, während das Eosin die acidophilen Strukturen, wie Proteine des Zytoplasmas, rot anfärbt.

Für die Färbung wurden die Objektträger zunächst bei 65°C für 45 Minuten im Heizofen erhitzt, um das Paraffin zu schmelzen. Im Anschluss wurden sie 15 Minuten in Xylol entparaffiniert, jeweils 5 Minuten in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) und abschließend 2 Minuten in destilliertem Wasser gewässert. Es folgte die Zytoplasmafärbung mittels Eosin für 10 Minuten, ein 1-minütiges Waschen mit Leitungswasser und anschließend die Kernfärbung mittels Hämalalaun für 10 Sekunden. Daraufhin wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gewaschen, bis das Wasser klar war, und jeweils 1 Minute in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) dehydriert. Die Gewebefixierung erfolgte für 2 Minuten erneut in Xylol und anschließend wurden die Objektträger eingedeckelt.

2.3.2.2 Elastica-van-Gieson-Färbung

Die Elastica-van-Gieson-Färbung diente der Bewertung der Fibrosebildung. In der Regel kommt es während einer AP nur in geringem Ausmaß zu einer Fibrose. In dieser Arbeit sollte ein möglicher Einfluss von TNC auf das Ausmaß der Fibrosierung ermittelt werden.

Die Färbung erfolgte nach standardisiertem Protokoll im *Tissue-Tek Prisma® Plus Automated Slide Stainer*. Hierbei wurden die Schnitte zunächst mittels Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert. Darauf folgte zunächst die Färbung der elastischen Fasern für 15 Minuten in Resorcin-Fuchsin, danach die Kernfärbung mittels Eisenhämatoxylin nach Weigert für 5 Minuten und abschließend die Zytosolfärbung mittels Pikrofuchsin für 2 Minuten. Zwischen den einzelnen Färbeschritten erfolgte jeweils die Differenzierung des Gewebes mittels HCL-Alkohol (25% HCL und 70% Ethanol im Verhältnis 1:100) für 10 Sekunden. Es folgte analog zur HE-Färbung eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydration des Gewebes und eine Fixierung mittels Xylol. Abschließend wurden die Objektträger eingedeckelt.

Durch die Hämatoxylin-Färbung stellen sich die Kerne schwarzbraun dar, während das Resorcin-Fuchsin elastische Fasern schwarzviolett anfärbt. Durch die Gegenfärbung mittels Pikrofuchsin erscheint das Zytoplasma und Muskelgewebe gelb und Kollagenfasern rot, wodurch die Bewertung der Fibrose ermöglicht wird.

2.3.2.3 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie ermöglicht die Färbung verschiedener Proteine, wie beispielsweise Rezeptoren an der Zelloberfläche oder Proteine im Zellkern. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen einer Zelle. In dieser Arbeit wurde die indirekte Immunhistochemie verwendet, bei welcher an den Antigen-bindenden Antikörper (primärer

Antikörper) wiederum ein sekundärer Antikörper bindet. Anschließend erfolgt die Zugabe des ABC-Reagenz, welches exogene Peroxidasen trägt. Diese wandeln wiederum das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) um und führen hiermit zur charakteristischen Braunfärbung der jeweils untersuchten Proteine. Eine schematische Darstellung zeigt sich in Abbildung 6.

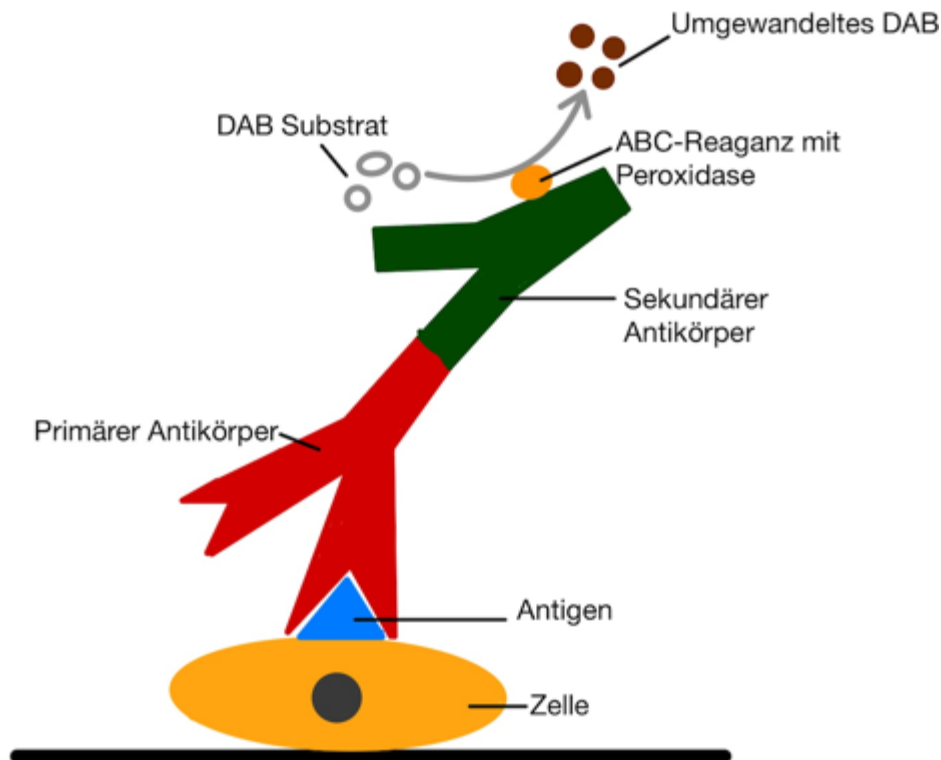


Abbildung 5: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung. Dargestellt ist die Bindungen der einzelnen Bestandteile (Antigen – Primärer Antikörper – Sekundärer Antikörper-ABC-Reagenz mit exogener Peroxidase) sowie die Umwandlung des Substrates (DAB) mit abschließenden Braunfärbung.

Für die genaue Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte zunächst bei 60°C für eine Stunde im Heizofen gebacken, um die Haftung des Gewebes an den Objektträgern zu verbessern und das Paraffin zu schmelzen. Daraufhin wurden die Schnitte 20 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (15 Minuten in 100%, 5 Minuten in 96%, 2 Minuten in 70%) sowie 2 Minuten in destilliertem Wasser gewässert. Es folgte die Antigendemaskierung, welche je nach Antikörper mittels TE- bzw. Citrat-Puffer im Kochtopf, in der Mikrowelle oder mittels dem Enzym Pronase E bei 37°C im Heizofen erfolgte (s. Tbl. 10). Dieser Schritt diente der Freilegung der Epitope, der Bindungsstelle für Antikörper an ein Antigen, da diese aufgrund der Paraffinfixierung initial unzugänglich für Antikörper sind. Nach 20-minütigem Abkühlen und 2-minütigem Waschen in PBS-T bzw. TBS-T, folgt der Peroxidase-Block in 3% H₂O₂. Dies blockiert die

endogenen Peroxidasen im Pankreasgewebe, die anderenfalls im späteren Verlauf das DAB umwandeln können und somit ein falsch-positives Farbsignal erzeugen können.

Die nachfolgenden Schritte wurden mittels Autostainer (i6000, BioGenex) durchgeführt, welcher im Rahmen der vorliegenden Arbeit in unserem Institut reetabliert wurde. Zur weiteren Reduzierung der Hintergrundfärbung wurde das Gewebe für 2x30 Minuten mit Avidin und Biotin geblockt. Im Anschluss inkubierte der primäre Antikörper für 1 Stunde, mit Ausnahme von Integrin $\beta 3$, welcher über Nacht inkubierte. Es folgte eine 30-minütige Inkubation des sekundären Antikörpers, die spezifische Verdünnung der einzelnen Antikörper sowie der dazugehörige sekundäre Antikörper können ebenfalls der Tabelle 10 entnommen werden. Im weiteren Schritt folgte die Hinzugabe des ABC-Reagenz für 30 Minuten sowie anschließend als letzter Schritt im Autostainer die Zugabe des DAB-Substrates mit einer Verdünnung von 1:100 für 5 Minuten.

Für die Schritte im Autostainer wurde die Reagenzmenge pro Schnitt auf 200 μ l eingestellt und die unteren 2/3 des Objektträgers als Verteilungsbereich ausgewählt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Schnitte dreimal mittels IHC-Waschpuffer gewaschen. Nach Abschluss dieser Schritte wurden die Schnitte aus dem Autostainer genommen und zunächst für 2 Minuten in Leitungswasser gewaschen. Danach wurde das Gewebe für 15 Sekunden mittels Hämalun gegengefärbt und unter laufendem Leitungswasser gewaschen, bis das Wasser klar war. Im Anschluss folgte die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und Xylol für jeweils 2 Minuten und zum Abschluss das Eindeckeln der gefärbten Schnitte mit den Deckgläsern.

Tabelle 10: Übersicht der primären Antikörper der Immunhistochemie mit Verdünnungsverhältnis, Spezies des sekundären Antikörpers sowie Methode und Material zur Antigen-Demaskierung.

Primärer Antikörper gerichtet gegen ...	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Antigen-demaskierung
Amylase	1:400	Maus	Citrat, 2x 7 Min in der Mikrowelle
α -SMA	1:800	Maus	Citrat, 15 Min im Kochtopf
CK-19	1:1600	Ratte	TE, 15 Min im Kochtopf
Integrine $\beta 3$	1:200	Kaninchen	Citrat, 2x 7 Min in der Mikrowelle

Integrine $\beta 6$	1:4000	Maus	Pronase E (6 min bei 37°C)
Ki-67	1:400	Maus	Citrat, 15 Min im Kochtopf
Sox9	1:2000	Kaninchen	Citrat, 15 Min im Kochtopf

2.3.3 Auswertung des Gewebes

2.3.3.1 Histologische Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Inflammation des Pankreas beider Mauskohorten über die verschiedenen Zeitpunkte wurde an den entnommenen Organen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung untersucht. In Anlehnung an vorangegangene Arbeiten (Schmidt et al 1991 und Jinjiao et al 2015) erfolgte die Entwicklung eines semi-quantitativen Scores. Dieser umfasste die Ödembildung, Fettgewebnekrosen, die parenchymale Inflammation sowie Immunzellfoci-Bildung. Die Ödembildung sowie die Fettgewebnekrosen wurden hierbei in ihrer Ausprägung von mild bis stark skaliert (s. Tbl. 11). Bei der parenchymalen Inflammation erfolgte zunächst die händische Auszählung aller Immunzellen im Parenchym, sodass pro Gewebeschnitt eine absolute Zahl an Immunzellen im gesamten Gewebe vorlag. Diese wurde durch die gesamte Gewebefläche dividiert, sodass sich die relative Anzahl der Immunzellen pro mm^2 ergab. Nach Auswertung aller Proben wurde hieraus die 25% und 75% Perzentile errechnet, welche jeweils als Grenzwerte für eine schwache bzw. starke Immunzellinfiltration dienten, die entsprechende Skalierung ist in Tabelle 11 dargestellt. Als Foci wurde eine dicht aneinander geordnete Ansammlung von Immunzellen im Gewebe definiert, hiervon ausgeschlossen waren Lymphknoten als physiologische Immunzellansammlung. Hierbei wurde ein Focus mit ca. 400 Immunzellen exemplarisch händisch ausgezählt und durch die Größe dividiert, sodass ein exemplarischer Wert von Immunzellen/ μm^2 für die Foci entstand. Im Anschluss wurden alle weiteren Foci ausgemessen und mit dem o.g. Wert multipliziert, sodass am Ende eine Annäherung für die absolute Anzahl an Immunzellen der jeweiligen Foci errechnet wurde. Zudem wurden alle Foci pro Gewebe gezählt. Die Übersetzung in einen semiquantitativen Score ist ebenfalls in Tabelle 11 aufgeführt.

Nach Auswertung der einzelnen Parameter wurde die Punktezahlen zu einem gemeinsamen Wert für den jeweilige Schnitt addiert, entsprechend ergab sich ein Minimalwert von 0 und ein Maximalwert von 14.

Tabelle 11: Finaler Score zur Ermittlung des Entzündungsgrades in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Der finale Score berücksichtigt die Parameter Ödembildung (0-3), Grad der intersitiellen Inflammation (0-3), parenchymale Inflammation (0-3), und passt die Scores an die Ergebnisse der Färbungen an. Die einzelnen Punkte werden anschließend zu einem Gesamtwert addiert.

Score	Ödem- bildung	Foci (Immunzellen)	Parenchymale Inflammation	Fettgewebsnekrosen
0	Kein Ödem	Keine Foci	Keine parenchymale Inflammation	Keine Fettgewebsnekrose
1	Mild	1-2 Foci	55 Immunzellen/mm ² ($\triangleq$ < 25% Perzentile)	Mild ausgeprägte Nekrose
2	Moderat	2-10 Foci, < 400 Immunzellen/Foci	56-245 Immunzellen/mm ² ($\triangleq$ 25% - 75% Perzentile)	Moderat ausgeprägte Nekrose
3	Stark	2-10- Foci, 400-800 Immunzellen/Foci	246 Immunzellen/mm ² ($\triangleq$ > 75% Perzentile)	Stark ausgeprägte Nekrose
4		2-10 Foci, > 800 Immunzellen/Foci		
5		> 10 Foci		

Im zweiten Schritt wurde die Bildung der ADM-Formationen in der HE-Färbung betrachtet. Hierfür wurde zunächst die Fläche in μm^2 des Gesamtgewebes mit Hilfe der Software berechnet. Anschließend wurden lediglich die ADM-Formationen mittels Annotationen markiert und ebenfalls die Fläche dieser berechnet. Hieraus wurde der prozentuale Anteil der ADM-Formationen an der Gesamtfläche berechnet (s.u.). Für die statistische Analyse wurden diese Prozentwerte verwendet.

$$ADM \text{ Formation in } \% = \frac{\text{Fläche ADM – Formation}}{\text{Fläche Gesamtgewebe}}$$

2.3.3.2 Histologische Auswertung der Elastica-van-Gieson-Färbung

Die EvG-Färbung diente der Bestimmung des Fibrosegrades in den verschiedenen Gruppen. Hierfür wurde ebenfalls ein semi-quantitativer Score verwendet, welcher das Ausmaß der Fibrose in mild, moderat und stark unterteilt und entsprechend Punkte von 0-3 vergibt (s. Tbl. 12).

Tabelle 12: Score zur Ermittlung des Fibrosegrads in der Elastica-van-Gieson-Färbung.
Dieser Score unterteilt die Fibrose in 3 Grade von mild, moderat bis stark.

Scorepunkte	Fibrosegrad
0	Keine Fibrose
1	Mild
2	Moderat
3	Stark

2.3.3.3 Immunhistochemische Auswertung

Für die einzelnen immunhistochemischen Färbungen wurden unterschiedliche Vorgehen für die quantitative Auswertungen gewählt, welche an die jeweiligen Fragestellungen der einzelnen Färbungen angepasst wurden.

Alpha-SMA

Die α -SMA-Färbung wurde am Mikroskop ohne Hinzunahme eines Algorithmus zur semi-automatischen Analyse ausgewertet und umfasst zwei Scores. Im ersten Schritt wurde das Gesamtgewebe betrachtet und das Expressionslevel von positiven Zellen betrachtet. Hierbei wurden positive Fibroblasten im Interstitium und im Parenchym getrennt untersucht und im zweiten Schritt gemäß Tabelle 13 zusammengeführt. Pro Schnitt ergab sich dabei ein Minimalwert von 0 und ein Maximalwert von 3. Im zweiten Schritt wurden die ADM-Regionen betrachtet und mit dem Gesamtgewebe verglichen. Der in Schritt 1 erhobene Punktwert des Gesamtgewebes wurde hierbei zunächst auf 1 nivelliert. Nun wurde in den ADM-Regionen verglichen, ob es zu einer geringeren, vergleichbaren oder höheren α -SMA-Expression als im Gesamtgewebe kommt (s. Tbl. 14).

Tabelle 13: Score zur Quantifizierung von aktivierten PSC mittels α -SMA im Gesamtgewebe.
In diesem Score wird die Expression an zwei Lokalisationen betrachtet, im Interstitium (0-1) und im Parenchym (0-2). Die einzelnen Punkte werden anschließend zu einem Gesamtwert addiert.

Punkte	Expression im Interstitium	Expression im Parenchym
0	Keine Expression	Keine Expression

1	Aktivierte PSC vorhanden	Einzelne wenige aktivierte PSC
2		Aktivierte PSC gleichmäßig über Schnitt verteilt

Tabelle 14: Score zu dem Vergleich des Expressionslevels von aktivierten PSC mittels α -SMA-Färbung im Gesamtgewebe und in den ADM-Formationen. Hierfür wurde die Expression im Parenchym auf eins nivelliert und in den ADM-Formationen betrachtet, ob hier die Expression gleich stark oder stärker ausgeprägt ist.

Punkte	Expression im Parenchym	Expression in ADM-Formation
0		Kein ADM oder keine aktivierten PSC
1	Parenchym auf 1 nivelliert	Anzahl aktivierter PSC in ADM-Formation und Gesamtparenchym gleich
2		Anzahl aktivierter PSC in ADM-Formation erhöht zum Gesamtparenchym

Amylase und CK19

Amylase und CK19 wurden gemeinsam ausgewertet. Physiologisch wird Amylase in den Azinuszellen und CK19 in den dukталen Zellen exprimiert. Bei der ADM wird Amylase hingegen herunterreguliert und CK19 hochreguliert. Das Ziel war, diesen Effekt in den entsprechenden Regionen zu untersuchen. Dafür wurden zunächst alle ADM des jeweiligen Schnittes identifiziert und markiert. Im zweiten Schritt wurde für beide Marker festgelegt, ob es zu einer veränderten Expression im Vergleich zum umliegenden nicht-metaplastischen Gewebe gekommen ist. Hierbei wurde für jede ADM-Formation ein „+“ bei veränderter Expression und ein „-“ bei Expressionslevel entsprechend des umliegenden Gewebes vergeben. Hieraus wurde der prozentuale Anteil der ADM, welche ein verändertes Expressionslevel aufweisen, errechnet. Die jeweiligen Prozentzahlen wurden in der Statistik in die vier Gruppen aufgeteilt, zunächst in WT- und KO-Gruppe und diese wiederum jeweils unterschieden zwischen den Färbungen Amylase und CK19. Abgekürzt ergab sich hieraus die Gruppen WT Amylase, WT CK19, KO Amylase und KO CK19, welche untereinander verglichen wurden.

Da die Schnitte der beiden Färbungen trotz mehrfacher Wiederholungen unterschiedlich starke Hintergrundfärbungen aufwiesen, welche digital nicht abgezogen werden konnten, war eine digitale Auswertung der Intensität nicht möglich.

Integrin $\beta 6$

Die Färbung von Integrin $\beta 6$ wurde mithilfe der Software Aperio ImageScope (Version 12.3.3.5048) ausgewertet. Dabei wurde zunächst ausschließlich das exokrine Pankreasgewebe umrandet, um große Bindegewebsstrukturen, Gefäße und Lymphknoten aus der Analyse herauszunehmen. Der markierte Bereich wurde daraufhin mit dem Algorithmus für Positive-Pixel-Count, mit dem die messbaren Farbpunkte ausgewertet werden, der Software *Aperio ImageScope* analysiert.

Der automatisierte Algorithmus wurde für die untersuchten Gewebe mit der manuellen Auswertung verglichen und angepasst. Dabei wurden die Grenzwerte für die Breite des ausgewählten Feldes, die Grenzwerte der Farbintensität und die Cut-off-Werte für niedrige, mittlere und hohe Färbintensität manuell justiert und optimiert. Diese Anpassung diente für alle weiteren Schnitte dieser Färbung als Grundlage für die Auswertung.

Die positiven Pixel wurden als Prozentwert angegeben, um bei unterschiedlichen Gewebegrößen einen vergleichbaren Wert zu erhalten. Im Anschluss wurden ausschließlich die ADM-Regionen markiert und auf gleiche Weise analysiert. Für die statistische Analyse wurde der prozentuale Anteil an positiven Pixeln der jeweiligen Gruppen WT-Gesamtgewebe, WT-ADM-Regionen, KO-Gesamtgewebe und KO-ADM-Regionen gegenübergestellt.

Integrin $\beta 3$

Die Färbung für Integrin $\beta 3$ wurde am Mikroskop ohne Hinzunahme eines Algorithmus zur semi-automatischen Analyse ausgewertet. Dabei wurde zunächst geschaut, welche Zellen eine positive Färbung annehmen. Ein quantitatives Scoring wurde gemäß der Tabelle 15 durchgeführt.

Tabelle 15: Score zur Ermittlung der Expression von Integrine $\beta 3$ im Gewebe. Der Score differenziert zwischen negativ und positiv mit entsprechender Punktzahl an verschiedenen Lokalisationen im Pankreas.

Punkte	Fibroblasten	Immunzellen	Azinuszellen	ADM-Region
0	negativ	negativ	negativ	negativ
1	positiv	positiv	positiv	positiv

Kernfärbungen Ki-67 und Sox9

Die beiden Kernfärbungen, Ki-67 und Sox9, wurden mittels des Nuclei-count-Algorithmus, zur Erkennung von positiv gefärbten Kernen, der Software *Aperio ImageScope* ausgewertet.

Der automatisierte Algorithmus wurde für die untersuchten Gewebe mit der manuellen Auswertung verglichen und angepasst. Dabei wurden die Grenzwerte für schwach, mittel und stark positiv gefärbte Kerne, der Grenzwert für die zytoplasmatische Färbung sowie die Minimal- und Maximalgröße und Rundung der Kerne manuell justiert und optimiert. Diese Anpassung diente für alle weiteren Schnitte beider Färbungen als Grundlage für die Auswertung.

Aufgrund von Unterschieden in der Färbeintensität innerhalb eines Schnittes konnte kein Algorithmus entwickelt werden, welcher immer im gesamten Schnitt die Kerne gleichwertig erkennen. Daher wurde zunächst per Augenmaß ermittelt, welche Bereiche des Gewebeschnittes für den Algorithmus auswertbar und gleichzeitig repräsentativ für das Gesamtgewebe waren. Diese Bereiche wurden annotiert und durch den Algorithmus ausgewertet. Im Anschluss wurde das gleiche Vorgehen gesondert auf die ADM-Formationen angewandt, auch hier wurden repräsentative Areale ausgewählt.

Der Algorithmus gab dabei sowohl die absolute Zahl der positiven Kerne, die Gesamtkernzahl im ausgewerteten Gewebe als auch die jeweiligen prozentualen Werte an. Für die statistische Analyse wurden die Prozentwerte übernommen, um bei wechselnder Gewebegröße eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Zudem unterschied der Algorithmus zwischen schwach, mittel und stark positiven Kernen. Für die Sox9 Auswertung wurden diese drei Abstufungen zu einem gemeinsamen Prozentwert (positiv gefärbte Kerne) addiert. Für die Auswertung von Ki-67 wurden insbesondere stark dunkelblaue und somit immunhistochemisch negative Kerne von dem Algorithmus als schwach positiven deklariert. Um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden, wurde der Wert der schwach positiven Kerne daher für alle Proben von der Ki-67-Wertung ausgeschlossen.

2.3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism 5. Zentral für die Arbeit war der Vergleich der WT-Gruppe gegen die KO-Gruppe. Hierfür wurde für alle Marker eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, wobei neben dem Vergleich beider Genotypen auch die Veränderungen mit Hinblick auf deren zeitlichen Verlauf erfolgte. Zur graphischen Darstellung wurde der Boxplot-Whisker von Minimum bis Maximum gewählt. Wie oben beschrieben wurde bei allen immunhistochemischen Markern, außer Integrin $\beta 3$, neben der regulären Auswertung des Gesamtgewebes ein Vergleich von Gesamtgewebe gegenüber ADM-Formation durchgeführt. Auch hier wurde zudem zwischen WT und KO unterschieden. Dies wurde mittels multifaktorieller Varianzanalyse erreicht, wobei der Median mit Einbeziehung des SEM (standard error of mean) verglichen wurde. Durch Verwendung der Tukey-Korrektur wurde die Alphafehler-Kumulierung neutralisiert.

Bei Vergleich der beiden Genotypen sowie der verschiedenen Zeitpunkte wurde für die jeweiligen Gruppen der Medianwert verglichen. Dieser erlaubt bei kleiner Gruppengröße sowie asymmetrischer Verteilung innerhalb der Gruppe eine bessere Beschreibung des mittleren Wertes und unterliegt einer geringeren Beeinflussung durch einzelne Ausreißer. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Inflammation

Die Entzündungsaktivität in der Kontroll- und der Experimental-Gruppe wurde in der HE-Färbung ausgewertet.

In der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe zeigt sich eine geringe ödematöse Auflockerung des Gewebes an vereinzelnden Stellen, diese tritt somit auch in geringem Maß bei intraperitonealer Flüssigkeitsinjektion auf. Eine Immunzellinfiltration zeigt sich jedoch nicht.

In der WT-Gruppe zeigt sich zu den frühen Zeitpunkten nach 3 und 12 Stunden eine Inflammation mit Immunzellinfiltration in das Gewebe sowie ödematöser Auflockerung des stark entzündeten Anteils des Gewebes. Nach 24-48 Stunden sieht man bereits ein Abklingen der Entzündung und nach 7 Tagen ist die Entzündung in allen Geweben fast vollständig ausgeheilt (s. Abb. 7 A-C). Im Detail kommt es nach 3 Stunden zu einer Inflamationsreaktion, welche sich nach 12 Stunden auf einem vergleichbaren Niveau bewegt und mit einem Median von 10 Punkten die maximale Entzündungsstärke erreicht. Nach 24 und 48 Stunden kommt es zu einem Abfall der Entzündungsreaktion, wobei insbesondere die Immunzellinfiltration im Parenchym abnimmt. Nach 7 Tagen besteht nur mehr eine geringe intralobuläre Ödembildung, die Immunzellinfiltration hat sich zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig rückgebildet (s. Abb. 7 C). Mit einem Medianwert von 3 Punkten wird hier bereits das Ausgangsniveau der Kontrollgruppe erreicht. Nach 21 Tagen zeigt sich bildmorphologisch eine weitere Abnahme der Ödembildung, welche sich im Graph bei Vergleich der Boxplots von 7 und 21 Tagen nachvollziehen lässt (s. Abb. 8).

In der KO-Gruppe zeigt sich ein vergleichbarer Verlauf mit sichtbarer Inflamationsreaktion während den frühen Zeitpunkten, gefolgt von einem Abfall zurück auf das Niveau der KO-Kontrollgruppe nach 7 und 21 Tagen. In dieser Gruppe zeigt sich ebenfalls nach 3 Stunden eine Inflamationsreaktion, welche bis 12 Stunden noch weiter zunimmt und an dieser Stelle die maximale Entzündungsreaktion mit einem Medianwert von 11 Punkten zeigt. Der Abfall folgt analog zur WT-Gruppe, auch hier ist nach 7 Tagen keine Immunzellinfiltration mehr zu sehen, der mediane Entzündungsscore beträgt hier 4 Punkte. Nach 21 Tagen wird der Ausgangswert der Kontrollgruppe erreicht.

Ein statistisch signifikanter Unterschied in dem Ausmaß der Entzündungsreaktion zwischen den beiden Mauskoorten zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ($p=ns$).

Tendenziell besteht nach 12 Stunden in der KO-Gruppe im Medianwert ein höherer Entzündungsscore, welcher konsekutiv den höchsten Wert der gesamten Auswertung darstellt. Statistisch signifikant ist dieser Unterschied nicht, bei bildmorphologischer

Gegenüberstellung der WT- und KO-Gruppe nach 12 Stunden ist dieser Unterschied nicht eindeutig darstellbar (s. Abb. 7 A-B).

Zudem fällt auf, dass in der KO-Gruppe von 3 bis 12 Stunden eine weitere Zunahme der Entzündung zu vermerken ist, welche in der WT-Gruppe im Medianwert gleichbleibt (s. Abb. 9), dieser Anstieg zeigt sich als nicht signifikant ($p=ns$).

Nach 7 Tagen zeigt die KO-Gruppe einen höheren medianen Entzündungswert als die WT-Gruppe, auch der Boxplot der gesamten Gruppe zeigt sich über dem Boxplot der WT-Gruppe, signifikant ist dieser Unterschied ebenfalls nicht (s. Abb. 8).

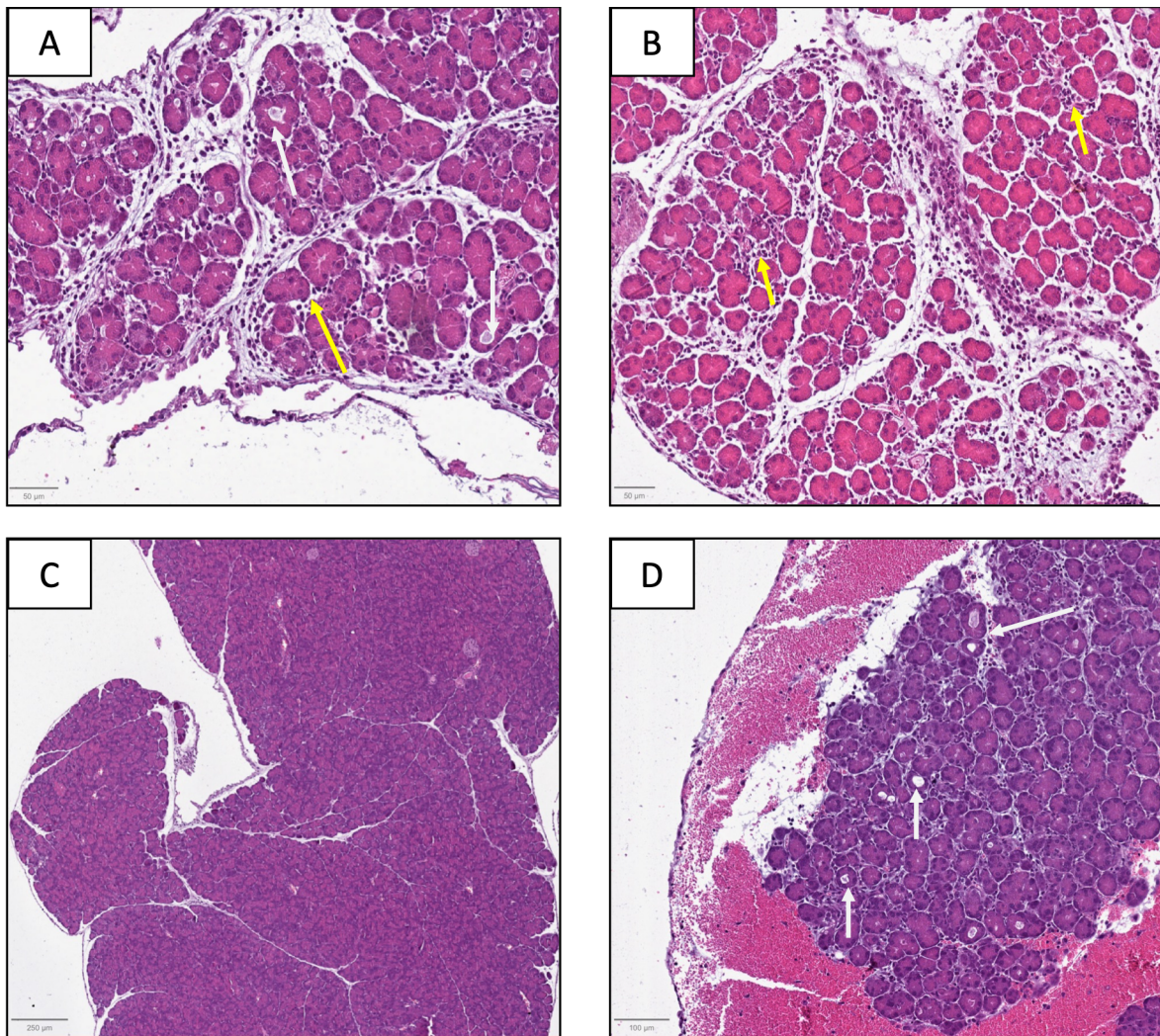


Abbildung 6: Histologische Darstellung der akuten Pankreatitis. A-B. Die Inflammation zeigt sich durch ödematöse Auflockerung des Gewebes, ADM-Formation (s. weiße Pfeile) und Infiltration durch Immunzellen (s. gelbe Pfeile), hierbei der Vergleich von **A** 12 Stunden WT und **B** 12 Stunden KO. **C.** Rückgang der AP nach 7 Tagen im WT, keine ADM-Formationen, keine Immunzellinfiltration, weiterhin leichtes interlobuläres Ödem. **D.** Deutliche ADM-Formation im entzündeten Areal nach 24 Stunden im WT (s. Pfeile). Maßstab bei A-B 50 µm, C 250 µm, D 100 µm.

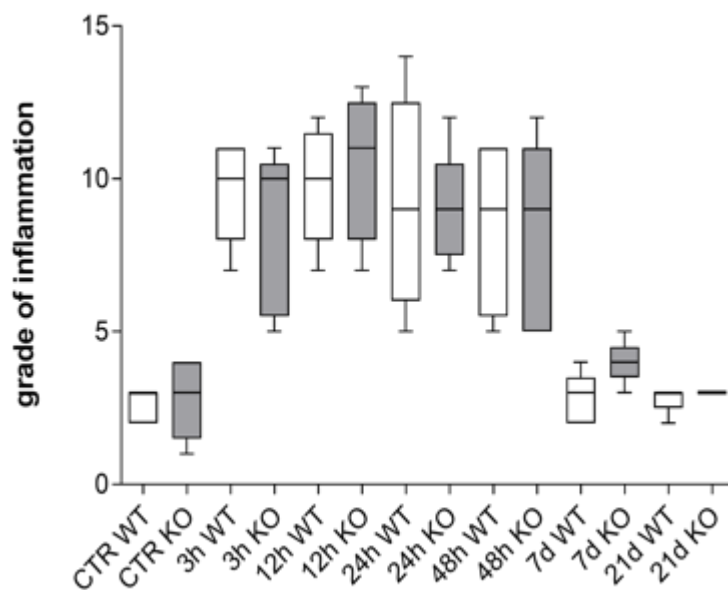


Abbildung 7: Graphische Auswertung der HE-Färbung. Der Graph zeigt den Entzündungsgrad in beiden Genotypen über die Zeit. Es zeigt sich ein starke Entzündung nach 3 Stunden, welche sich bis 48 Stunden auf einem hohen Niveau hält und sich nach 7 Tagen bereits fast auf dem Ausgangsniveau der Kontrollgruppe befindet.

Wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben, stellen sich die Parameter Azinuszellnekrose sowie Apoptose als nicht geeignet für die Bestimmung des Entzündungsausmaßes dar. Die Azinuszellnekrosen waren in fast allen Präparaten nur sehr vereinzelt und gering ausgeprägt. Eine starke nekrotisierende Pankreatitis zeigt sich nur in einer der 70 behandelten Mäuse (WT-Maus bei 24 Stunden). Dieser Parameter für sich betrachtet ist somit nicht zur Bewertung des Schweregrads der Pankreatitis in dieser Arbeit geeignet. Ähnlich verhält es sich mit den Apoptosen. Diese wurden händisch gezählt und es zeigt sich, dass die absolute Anzahl an Apoptose zwischen 8 und 90 Apoptose pro Schnitt liegt. Die Anzahl an Apoptosen ist von der Größe des Organs auf dem jeweiligen Objektträger abhängig und korreliert nicht mit der Entzündungsaktivität. Auch dieser Parameter wurde daher aus der Auswertung dieser Arbeit herausgenommen.

3.2 Proliferation

Als Bestandteil der Regeneration wird im nächsten Schritt die Proliferationsrate des exokrinen Gewebes beider Gruppen mittels Ki-67-Färbung analysiert.

In der mit NaCl behandelten Gruppen zeigt sich bereits eine geringe Proliferationsaktivität in beiden Geweben, welche insgesamt unter 5% liegt.

In der WT-Gruppe zeigt sich in den frühen Entzündungsphasen ein Anstieg der Proliferationsrate und im Verlauf ein Abfall zurück auf das Niveau der WT-Kontrollgruppe

(s. Abb. 10). Im Detail kommt es nach 3 Stunden zu einem Anstieg an Ki-67 positiven Zellen, welche nach 12 Stunden einmalig absinken. Bei Betrachtung der Medianwerte beider Zeitpunkte beträgt der Abfall der Ki-67 positiven Zellen zwischen 3 h und 12 h 2,02%. 24 Stunden nach letzter Caeruleingabe zeigt sich das höchste Expressionslevel an Ki-67 positiven Zellen im Vergleich zum Ausgangswert, der Median beträgt hier 24,38% (s. Abb. 9 A). Im Anschluss folgt schrittweise der Abfall und das Niveau des Kontrollgewebes wird nach 21 Tagen erreicht. Es liegt hier wieder unter 5%.

In der KO-Gruppe zeigt sich ein vergleichbarer Verlauf mit Zunahme der Proliferationsrate in den frühen Entzündungsphase, gefolgt von einem Abfall zurück auf das Niveau der KO-Kontrollgruppe. Nach einem Anstieg bei 3 Stunden, folgt ebenfalls ein geringer Abfall nach 12 Stunden, der Median sinkt hierbei um 7,84% ab. Das höchste Expressionslevel wird nach 24 Stunden erreicht, der Medianwert beträgt 22,5% (s. Abb. 9 B). Der Minimalwert wird nach 21 Tagen erreicht und beträgt 5,97%.

Die Unterschiede der Ki-67 Expression zwischen den beiden Mauskoorten ist statistisch nicht signifikant ($p=ns$).

Beide Gruppen zeigen einen Abfall der Ki-67 positiven Zellen von 3 Stunden zu 12 Stunden (s. Abb. 10). Der Abfall ist in der KO-Gruppe tendenziell stärker ohne statistische Signifikanz.

In der WT-Gruppe zeigt sich von 24 hin zu 48 Stunden nach Pankreatitisinduktion ein stärkerer Abfall der Proliferationsrate als in der KO-Gruppe, der Unterschied zwischen den Gruppen ist statistisch nicht signifikant ($p=ns$).

Die Streuung der Proliferationsrate innerhalb einiger Gruppen ist breit, diese ist zum Zeitpunkt 7 Tage in beiden Gruppen am deutlichsten und hier in der WT-Gruppe stärker als in der KO-Gruppe ausgeprägt (s. Abb. 9 C-D & Abb. 10). Die medianen Werte nach 7 Tagen liegen zwischen denen von 48 Stunden und 21 Tagen, es kommt somit stetig zu einem Abfall der Proliferationsrate (s. Abb. 10).

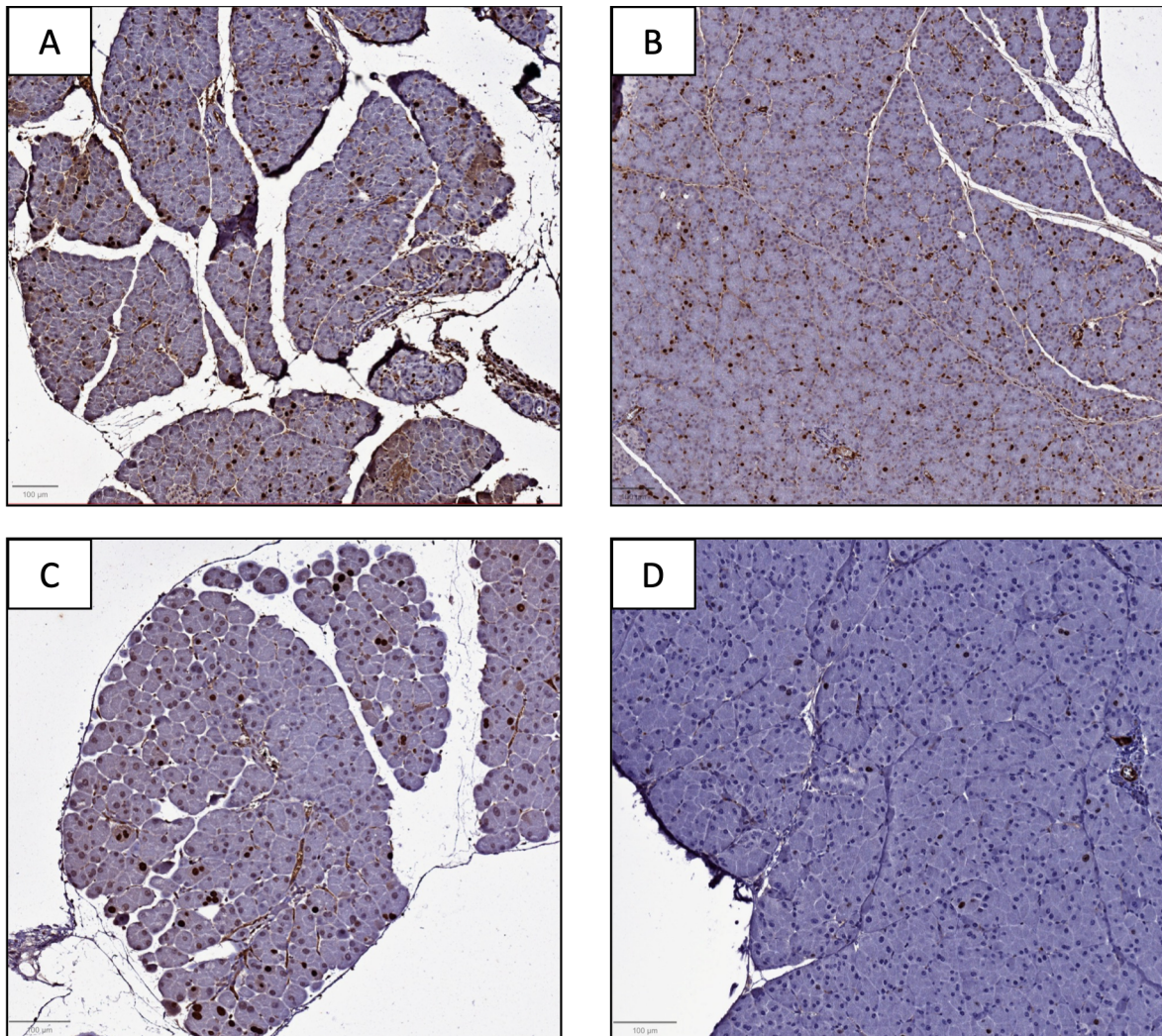


Abbildung 8: Ki-67-Färbung zur Darstellung der Proliferationsaktivität des Gewebes. A-B Nach 24h zeigen sich in beiden Gruppen der größte Anteil an Ki-67-positive Zellkernen, was eine erhöhte Proliferationsaktivität in dem entzündeten Gewebe widerspiegelt. **A** In der WT-Gruppe. **B** In der KO-Gruppe **C-D** Zum Zeitpunkt 7 Tagen zeigt sich eine breite Streuung der prozentualen Ki-67 Expression innerhalb der Gewebe einer Gruppe, hier exemplarisch in zwei Gewebeproben der WT-Gruppe dargestellt, wobei in **C** weiterhin eine starke Proliferationsaktivität mit insgesamt 29,55% besteht und in **D** die Proliferationsaktivität mit 1,63% gering ist. Maßstab bei A-D 100 µm.

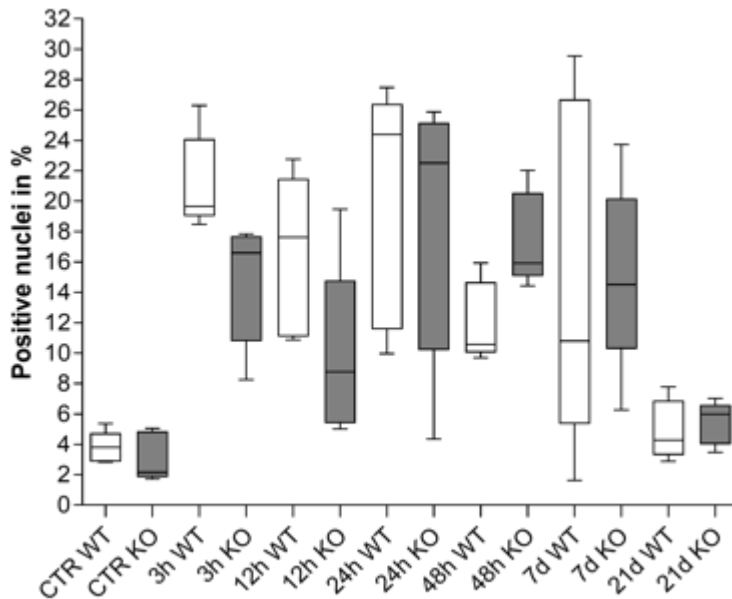


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Ki-67-Färbung über die gesamte Zeitspanne zur Darstellung der Proliferationsaktivität des Gewebes angegeben in %. Der Graph zeigt die Proliferationsaktivität in beiden Genotypen zu allen Zeitpunkten. Es zeigt sich zu den frühen Zeitpunkten von 3-48 Stunden analog zur Inflammationsreaktion eine erhöhte Proliferation im Gewebe. Bei 7 Tagen zeigt sich in beiden Gruppen eine starke Streuung, der Medianwert zeigt sich im Vergleich zu 48 Stunden weiter absinkend. Bei 21 Tagen zeigen sich die Ki-67-positiven Zellkerne wieder auf dem Niveau des Kontrollgewebes.

3.3 ADM-Formation

Wie in Kapitel 1.2 erörtert, stellt die azinär-duktaile Metaplasie einen reversiblen Prozess dar, der den Azinuszellen Plastizität verleiht und damit die Regeneration geschädigter Zellen ermöglicht. Sie stellt jedoch auch eine potenzielle frühe Vorläuferläsion des PDAC dar, weshalb die ADM beider Genotypen sowohl histologisch als auch mittels zahlreicher immunhistochemischer Marker analysiert werden.

In den mit NaCl behandelten Gruppen zeigen sich keine ADM-Formation.

In der WT-Gruppe zeigt sich in den frühen Entzündungsphasen ein Auftreten von ADM, welche mit Beendigung der Entzündung wieder verschwinden (s. Abb. 13 A). Im Detail zeigen sich nach 3 Stunden erste ADM-Formationen mit 0,12% Anteil am Gesamtgewebe, welche über den Zeitraum bis 24 Stunden weiter zunehmen und hier mit einem Anteil von im Median 0,3 % am Gesamtgewebe den Maximalwert erreichen. In einem Einzelschnitt wird mit 1,2% ADM-Anteil der höchste Einzelwert des gesamten Kollektivs gemessen. Nach 48 Stunden kommt es zu einer geringen Abnahme der ADM-Formationen auf 0,23% Anteil am Gesamtgewebe. Zum Zeitpunkt 7 Tage und 21 Tage finden sich keine ADM mehr.

In der KO-Gruppe kommt es ebenfalls während der frühen Entzündungsphase zur Bildung von ADM-Formationen, welche sich nach Abklingen der Entzündung zurückbilden. Dabei

sind nach 3 Stunden 0,17% ADM-Formationen im Gewebe nachzuweisen, nach 12 Stunden wird der mediane Maximalwert von 0,68% Anteil am Gesamtgewebe erreicht. Nach 24 Stunden fällt dieser auf 0,23% ab und bleibt nach 48 Stunden konstant. Nach 7 Tagen und 21 Tagen werden auch hier keine ADM-Formationen mehr nachgewiesen.

Es ist zu beobachten, dass die ADM-Formationen einen dem Entzündungsgrad des Gewebes vergleichbaren auf- und absteigenden Verlauf nehmen (s. Abb. 13 A). Die detaillierte Analyse der ADM-Regionen zeigt eine örtliche Korrelation mit den besonders stark entzündeten bzw. immunzellinfiltrierten Bereichen des Gewebes (s. Abb. 7 A, D).

Im Vergleich beider Genotypen kommt es in der KO-Gruppe zu einem schnelleren Erreichen des Maximalwertes und einem früheren Abfall auf den Ausgangswert als in der WT-Gruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich zu keinem der Zeitpunkte ($p=ns$).

Der Maximalwert von 0,68% nach 12 Stunden in der KO-Gruppe ist doppelt so hoch wie der Maximalwert in der WT-Gruppe mit 0,3%, der Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

3.3.1 Amylase und CK19 in ADM-Formationen

Im nächsten Schritt erfolgt die Betrachtung des azinären Markers Amylase und des duktaalen Markers CK19, da es während ADM zu einem Expressionsverlust azinärer Marker und einer Expression von duktaalen Markern kommt.

In der mit NaCl-behandelten Gruppe zeigt sich eine deutliche Expression von Amylase in den azinären Zellen, die CK19-Expression beschränkt sich auf die duktaalen Zellen und die zentroazinären Zellen (s. Abb. 11 A-B). Im vorliegenden Graphen (s. Abb. 12) sind die Zeitpunkte NaCl-Kontrollgruppe, 7 Tage und 21 Tage mit 0 dargestellt, da diese Gruppen keine ADM aufweisen. Die Amylase- oder CK-19-Expression werden lediglich in den ADM-Regionen untersucht.

Amylase zeigt sich in der WT-Gruppe in den ADM-Formationen in den meisten Zellen positiv. In einzelnen Formationen kommt es zu einem geringgradigen Amylase-Expressionsverlust der Zellen, eine für Amylase vollständig negative ADM-Formation findet sich jedoch in keiner Gewebeprobe (s. Abb. 12).

Bei Betrachtung der Zeitpunkte beobachtet man bei 3 Stunden in der WT-Gruppe, dass in 3 von 5 Gewebeproben weiterhin alle ADM-Formationen Amylase-positiv gefärbt sind. In den anderen beiden Proben ist ebenfalls mit > 70% in beinahe allen ADM-Formationen eine Amylasepositivität zu sehen. Im Verlauf von 12 über 24 bis 48 Stunden sinkt die Amylaseexpression ab. Bei 48 Stunden zeigt sich die geringste Amylaseexpression in den ADM mit 75% Amylase-positiven Zellen, d.h. ein Verlust der Expression in 25% der ADM-Formationen (s. Abb. 12).

In der KO-Gruppe zeigt sich ein ähnliches Bild. Bei 3 und 12 Stunden liegt die Amylaseexpression im Median ebenfalls bei 100%, die geringste Expression zeigt sich auch hier mit 75% bei 48 Stunden, d.h. auch hier kommt es zu einem Verlust von Amylase in 25% der metaplastischen Zellen (s. Abb. 12).

Im Vergleich beider Gruppen zeigt sich, dass die Amylaseexpression in der WT-Gruppe bei 3 und 12 Stunden etwas niedriger als in der KO-Gruppe (s. Abb. 12) ist, ein statistisch signifikanter Unterschied besteht nicht ($p=ns$). Nach 24 und 48 Stunden zeigen sich beide Genotypen auf einem vergleichbaren Niveau. Insgesamt zeigt sich in beiden Genotypen zu allen Zeitpunkten nur einen geringen Verlust der Amylaseexpression in den ADM-Zellen (s. Abb. 11 C).

In den ADM-Formationen zeigt sich im Vergleich zu den gesunden Azinuszellen mehrheitlich eine veränderte Expression von CK19 (s. Abb. 11 D).

In der WT-Gruppe liegt die CK19-Expression nach 3 und 12 Stunden auf einem vergleichbaren Niveau mit respektive 75% und 78,79% CK19-positiven Zellen. Nach 24 und 48 Stunden kommt es zu einem weiteren Anstieg der CK19-Expression mit im Median respektive 94,74% und 93,33% CK19-positiven Zellen in den ADM (s. Abb. 12).

In der KO-Gruppe zeigt sich ein vergleichbarer Verlauf der Expression von CK19. Bereits bei 3 Stunden und 12 Stunden sind mit 88% und 82,61% die meisten ADM-Zellen positiv für CK19. Nach 48 Stunden exprimieren mit einem Median von 100% alle ADM-Zellen CK19 (s. Abb. 12).

Im Vergleich der beiden Genotypen fällt auf, dass sowohl der Minimalwert nach 3 Stunden als auch der Maximalwert nach 48 Stunden in der KO-Gruppe höher liegen (s. Abb. 12). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant, ebenso zeigen die anderen Zeitpunkte keinen signifikanten Unterschied ($p=ns$).

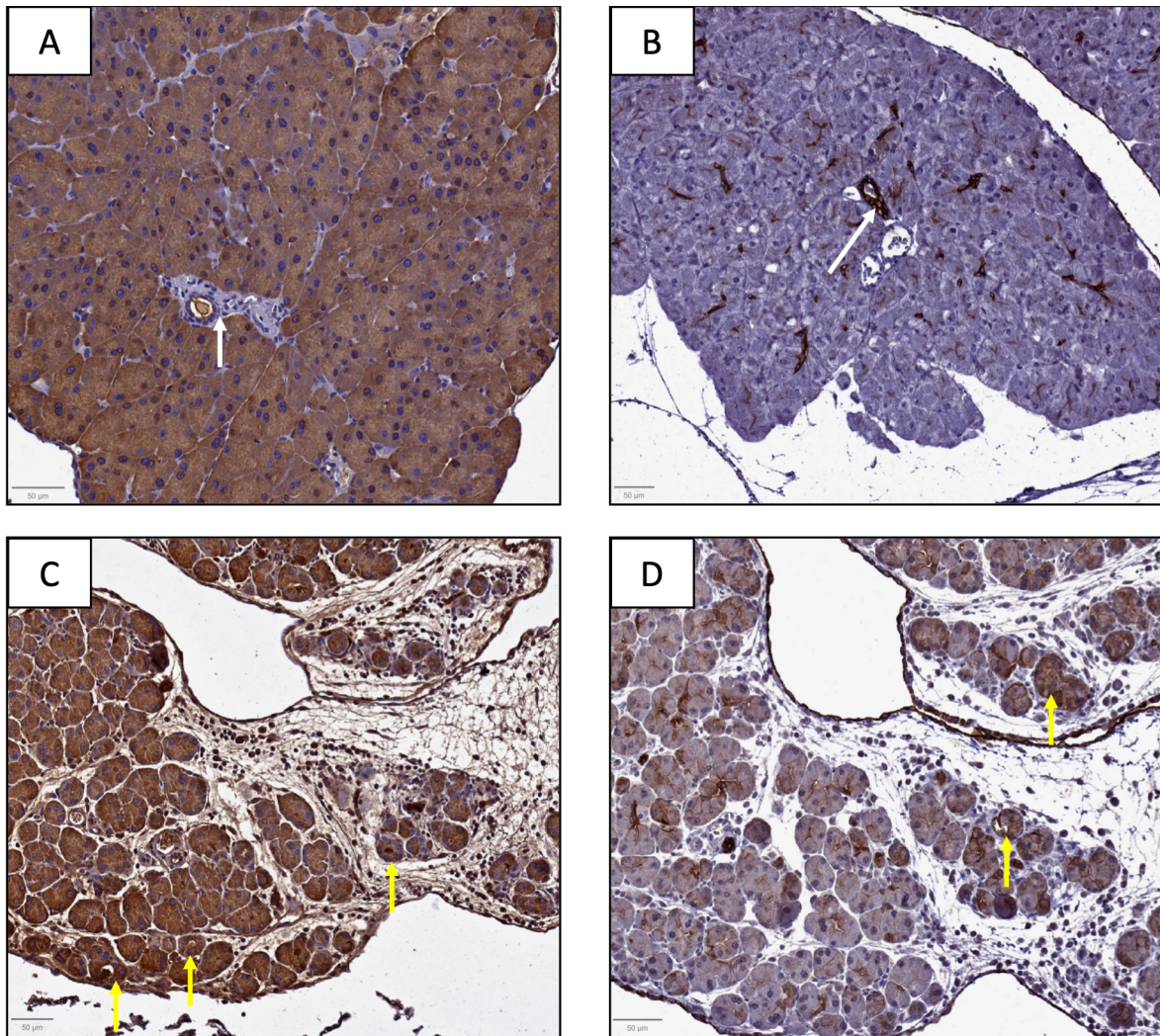


Abbildung 10: Expression von Amylase und CK19. **A** In der Kontrollgruppe zeigt sich die Positivität von Amylase wie erwartet in den azinären Zellen, während das Bindegewebe und der angeschnittene Gang negativ bleiben (weißer Pfeil) **B** In der Kontrollgruppe zeigt sich die Expression von CK19 in den Gängen (weißer Pfeil), während die azinären Zellen negativ bleiben. **C-D** Gegenüberstellung einer Amylase und CK19-Färbung in derselben Probe, hier nach 12 Stunden in der WT-Gruppe zur Beurteilung der Färbintensität in den ADM-Formationen (gelbe Pfeile). **C** Amylase-Färbung; hier lässt nur der rechte Pfeil einen leichten Expressionsverlust erahnen. **D** CK19-Färbung; hier zeigt sich eine gesteigerte Färbung der ADM-Formationen gegenüber den normalen azinären Zellen. Maßstab in A-D 50 µm.

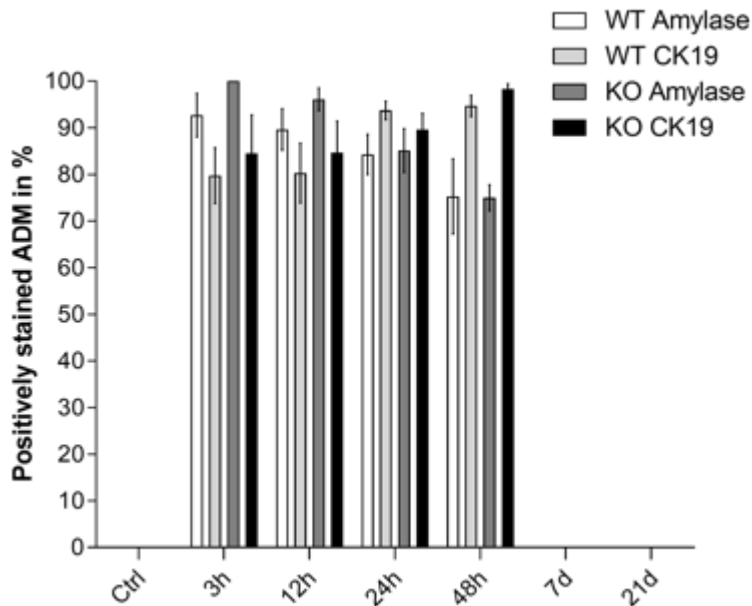


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Expressionslevel von Amylase und CK19 in den ADM-Formationen in Prozent. Der Graph zeigt den prozentualen Anteil der Amylase-positiven ADM-Formationen sowie der CK19-positiven ADM-Formation in beiden Genotypen über alle Zeitpunkte. In beiden Färbungen sieht man von 3 hin zu 48 Stunden eine Veränderung der Expression, wobei Amylase im Verlauf schrittweise abnimmt und CK19 im Verlauf schrittweise zunimmt.

3.3.2 Proliferationsrate in ADM

Nach Ermittlung der Proliferationsrate des gesamten exokrinen Gewebes, wird der Algorithmus für die Ki-67-Auswertung im nächsten Schritt ausschließlich auf die ADM-Formationen angewendet.

In der WT-Gruppe zeigt sich eine erhöhte Proliferationsrate in den ADM-Regionen im Vergleich zum übrigen Gewebe zu allen vier Zeitpunkten, welche ADM aufweisen (s. Abb. 13 B). Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich hier nach 48 Stunden. Die mediane Proliferationsrate der ADM-Region mit 21,43% zu diesem Zeitpunkt liegt beinahe doppelt so hoch, wie das vergleichbare Gesamtgewebes mit 10,57% ($p=0,014$). Zu den anderen Zeitpunkten 3, 12 und 24 Stunden ist der Unterschied nicht statistisch signifikant, zeigt aber die gleiche tendenzielle Differenz ($p=ns$).

In der KO-Gruppe zeigt sich ebenfalls eine höhere Proliferationsrate in den ADM-Regionen gegenüber dem Gesamtgewebe und zu allen vier genannten Zeitpunkten. Die Unterschiede der medianen Proliferationsraten zwischen Gesamtgewebe und ADM sind zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant ($p=ns$).

Beim Vergleich der ADM-Regionen beider Genotypen gegeneinander zeigt die WT-Kohorte eine höhere Proliferationsrate zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden als die KO-Gruppe

(Differenz_{12h} 4,45%, Differenz_{24h} 4,44%). Bei 3 und 48 Stunden liegt die Proliferationsrate der KO-Kohorte im Median höher als in der WT-Gruppe (Differenz_{3h} 4,26%, Differenz_{48h} 3,26%). Zum Zeitpunkt 3 Stunden fällt auf, dass der Median der Proliferationsrate in der KO-Gruppe höher liegt. In der graphischen Darstellung erscheint dagegen die WT-Gruppe höher (s. Abb. 13 B), da hier aufgrund eines Ausreißers mit einer Proliferationsrate von 48,39% die Streuung größer ist.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den ADM-Formationen der WT- und KO-Gruppe besteht zu keinem Zeitpunkt ($p=ns$).

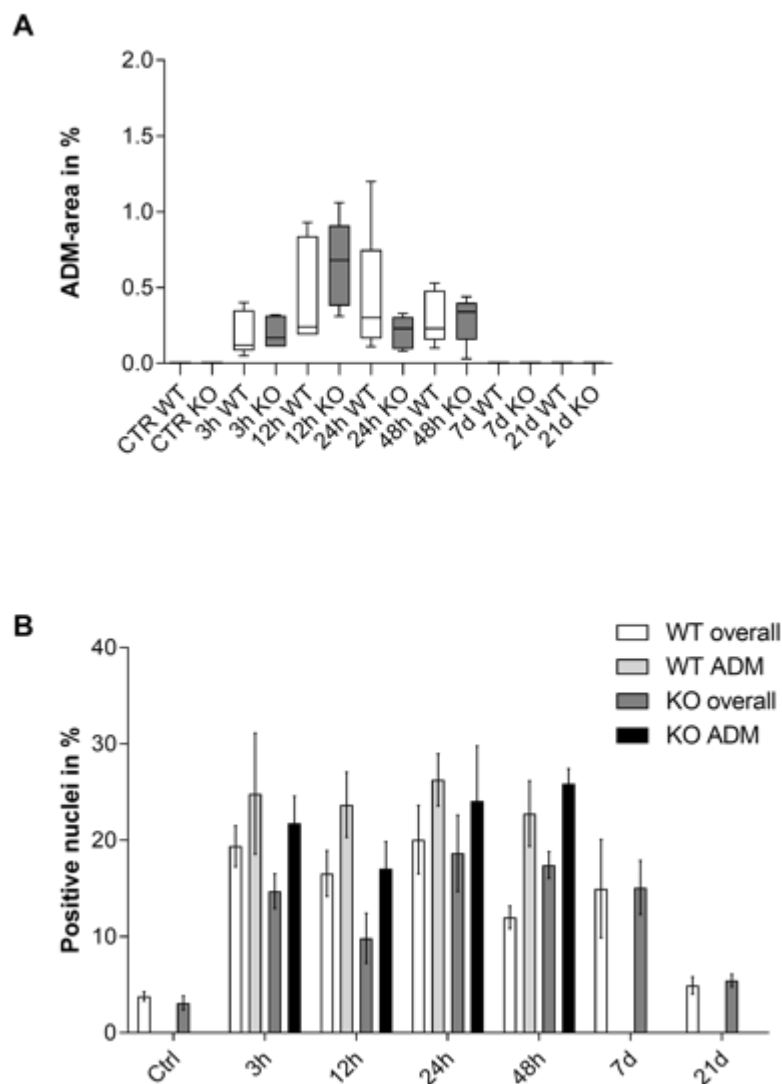


Abbildung 12: Graphische Darstellung der ADM-Auswertung in der HE-Färbung sowie der Ki-67 Färbung. **A** Der Graph zeigt den prozentualen Anteil der ADM-Formationen am Gesamtgewebe in beiden Genotypen über die Zeit. Es zeigt sich, dass die ADM-Formation in den frühen Zeitpunkten mit aktiver Entzündung auftritt und nach 7 Tagen wieder verschwunden ist. **B** Der Graph zeigt die Proliferationsrate in beiden Genotypen im Gesamtgewebe sowie in den ADM-Formationen. In letzteren zeigt sich zu allen Zeitpunkten eine höhere Proliferationsrate als im Gesamtgewebe.

3.4 Expression von Sox9

Das Sox9-Gen (SRY-Box Transcription Factor 9) ist ein Progenitorogen, welches für den Transkriptionsfaktor Sox9 kodiert und physiologisch nur in geringem Maße von Azinuszellen exprimiert wird, aber u.a. während ADM hochreguliert wird.

In der mit NaCl behandelten Gruppen zeigen sich eine respektive geringgradige Expositionen von Sox9 (Median_{WT} 11,74%; Median_{KO} 6,33%).

In der WT-Gruppe zeigt sich in den frühen Entzündungsphasen ein Anstieg der Sox9-Expression und im Verlauf ein Abfall zurück auf das Niveau der WT-Kontrollgruppe (s. Abb. 15 A). Nach 3 Stunden zeigt sich zunächst kein Anstieg der Sox9-Expression im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe, die mediane Sox9-Expression bei 3 Stunden beträgt 9,38%. Nach 12 Stunden kommt es zu einem deutlichen prozentualen Anstieg der Sox9-Expression mit Erreichen des Maximalwertes von 65,28%. Im Anschluss fällt das Expressionslevel, erreicht nach 7 Tage mit einem Medianwert von 13,11% ein ähnliches Niveau wie der Ausgangswert und bleibt danach konstant (s. Abb. 15 A).

In der KO-Gruppe zeigt sich ebenfalls ein Anstieg der Sox9-Expression in den frühen Entzündungsstadien und ein späterer Abfall. Bereits nach 3 Stunden steigt die Sox9-Expression verglichen mit der KO-Kontrollgruppe von 6,33% auf 16,38% an. Anschließend kommt es weiter zum schrittweisen Anstieg der Sox9-Expression, bis der maximale Medianwert bei 48,9% nach 24 Stunden erreicht wird. In den nachfolgenden Zeitpunkten zeigt sich ein rascher Abfall. Analog zur WT-Gruppe liegt der Expressionslevel nach 7 Tagen auf dem Niveau des Kontrollwertes, nach 21 Tagen kommt es zu einem geringen erneuten Anstieg auf 20,7%. Der Anstieg ist gegenüber 7 Tage und der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant (in beiden Fällen $p > 0,9999$) (s. Abb. 15 A).

Die Unterschiede der Sox9-Expression zwischen den beiden Gruppen sind zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant ($p = ns$). Der Verlauf der Maximalwerte unterscheidet sich jedoch. In der WT-Gruppe wird das Maximum nach 12 Stunden erreicht und liegt bei 65,28% Prozent, während dieser in der KO-Gruppe mit 24 Stunden erreicht wird und 48,9% beträgt. Anschließend wurde die Sox9-Expression im Gesamtgewebe und den ADM-Regionen analysiert und beide Gruppen verglichen.

In der WT-Gruppe zeigt sich bei 3 Stunden eine um 17,68% und nach 48 Stunden eine um 26,1% erhöhte Expression von Sox9 in den ADMs verglichen mit dem Gesamtgewebe. Der Unterschied zwischen Gesamtgewebe und ADM-Regionen zeigte sich dabei nach 48 Stunden als statistisch signifikant ($p_{48h} = 0,021$), nach 3 Stunden ist der Unterschied statistisch nicht signifikant ($p = ns$). Bei 12 und 24 Stunden zeigt sich die Sox9-Expression in den ADM-Regionen auf einem ähnlichen Niveau wie im Gesamtgewebe (s. Abb. 15 B).

In der KO-Gruppe zeigt sich bei 3 Stunden eine um 17,84%, bei 12 Stunden eine um 14,06% und bei 48 Stunden eine um 20,17% erhöhte Sox9-Expression in den ADM-

Regionen im Vergleich zum Gesamtgewebe. Nach 48 Stunden zeigt sich der Unterschied zwischen dem Gesamtgewebe und den ADM-Regionen dabei als statistisch signifikant ($p=0,0425$). In den anderen beiden Fällen ist der Unterschied zwischen ADM-Formation und Gesamtgewebe statistisch nicht signifikant ($p=ns$) (s. Abb. 15 B).

Der Vergleich zwischen der WT- und KO-Gruppe in den ADM-Regionen zeigt sich bei 3 und 48 Stunden eine erhöhte Expression in der WT-Gruppe und bei 12 und 24 Stunden eine erhöhte Expression in der KO-Gruppe. Insgesamt sind diese Unterschiede geringgradig, ein statistisch signifikanter Unterschied in den ADM-Regionen zwischen den beiden Genotypen besteht nicht ($p=ns$).

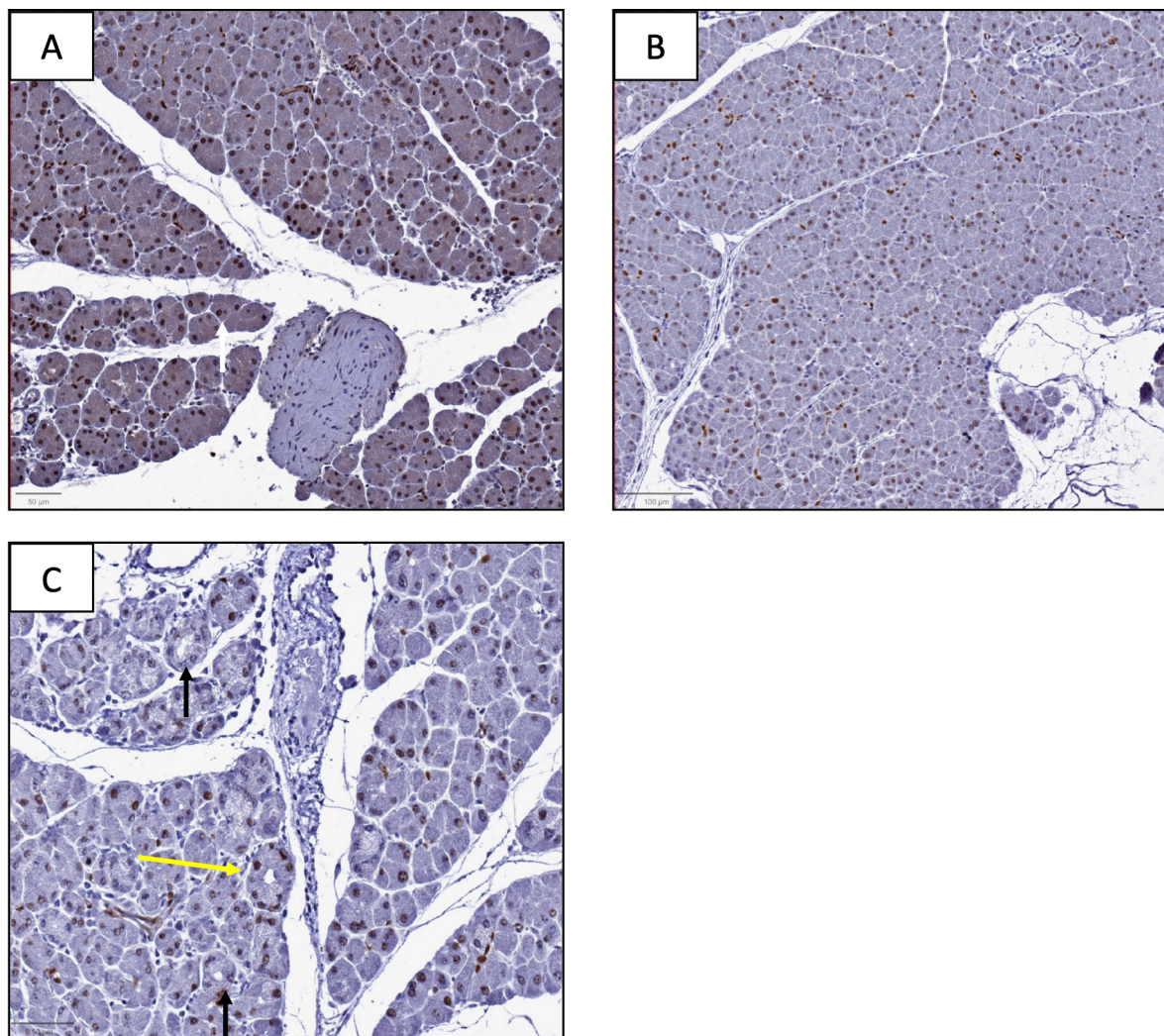


Abbildung 13: Expression von Sox9 während der AP in beiden Genotypen. **A** Bei 12 Stunden im WT zeigt sich die Mehrzahl der Kerne Sox9-positiv, die Zellkerne des Bindegewebes in der Nachbarschaft zeigen sich dabei negativ. **B** Bei 24 Stunden im KO zeigen ebenfalls die Mehrzahl der Zellkerne eine Positivität für Sox9. **C** In den ADM-Formationen zeigt sich ein gemischtes Bild, positiv gefärbte Zellkerne zeigen sich in der ADM mit dem gelben Pfeil, während der schwarze Pfeil Sox9-negative ADM-Formationen markiert. Maßstab in A & C 50 μ m, Maßstab in B 100 μ m.

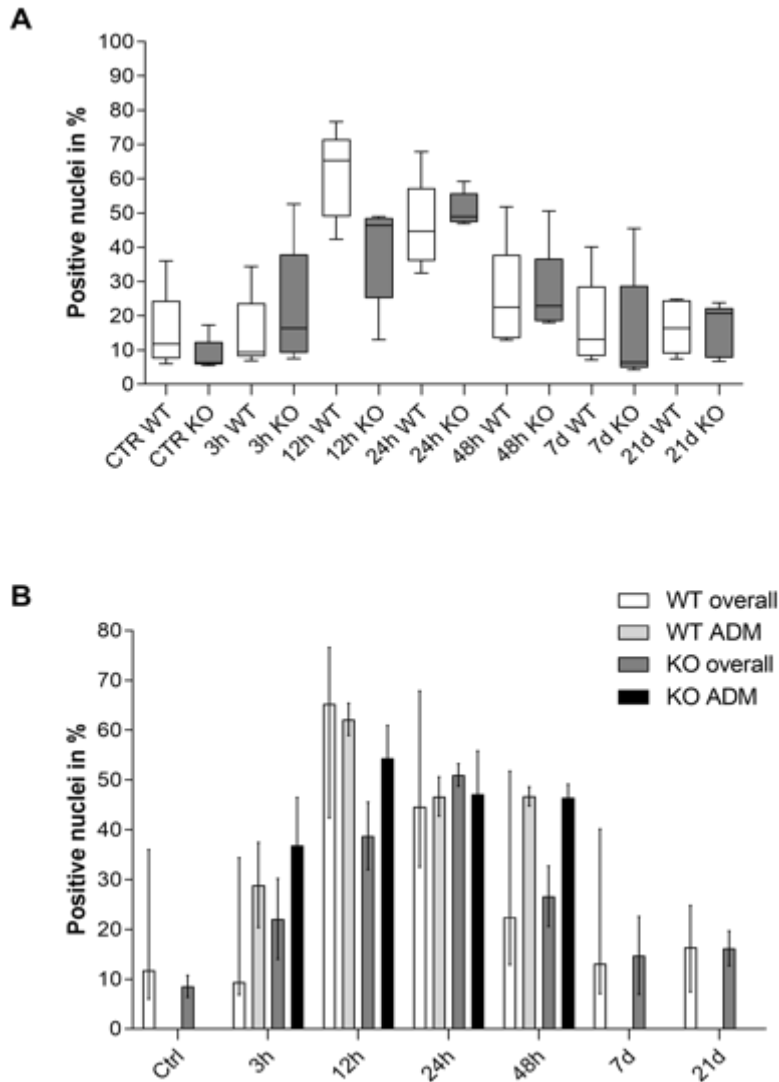


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Sox9-Expression im Gesamtgewebe und in den ADM-Formationen. A Der Graph zeigt die Sox9-Expression in beiden Genotypen über die Zeit. In beiden Gruppen kommt es während der Inflamationsreaktion zu einer erhöhten Sox9-Expression, welche sich mit Beendigung der Entzündung normalisiert. Dabei wird die maximale Expression in der WT-Gruppe nach 12 Stunden, in der KO-Gruppe nach 24 Stunden erreicht. **B** Der Graph zeigt die Sox9-Expression beider Genotypen sowohl in dem Gesamtgewebe als auch in den ADM-Formationen und stellt diese gegenüber. Während nach 3 und 48 Stunden in beiden Genotypen sowie bei 12h in der KO-Gruppe eine erhöhte Sox9 Expression in den ADM-Formationen zu finden ist, zeigt sich in den übrigen Zeitpunkten die Expression auf einem vergleichbaren Niveau.

3.5 Expression von Integrinrezeptoren

Im Anschluss erfolgt die Analyse zur Expression der Integrinrezeptoren $\beta 3$ und $\beta 6$ im Gesamtgewebe.

Die Integrin- $\beta 6$ -Expression zeigt sich immunhistochemisch in beiden Genotypen in periazinären Arealen (s. Abb. 16 A-B).

In der mit NaCl behandelten Gruppen zeigen beide Genotypen einen geringen Nachweis von positiven Pixeln im exokrinen Gewebe, der in beiden Fällen weniger als 1% beträgt.

In der WT-Gruppe zeigt sich in den frühen Entzündungsphasen eine erhöhte Integrin- β 6-Expression, welche mit Abklingen der Entzündung zurück auf das Niveau der WT-Kontrollgruppe absinkt. Bereits nach 3 Stunden steigt die Expression im Gesamtgewebe gegenüber dem Kontrollgewebe an und erreicht seinen Maximalwert mit einem Median von 10,04% positiven Pixeln nach 12 Stunden. Nach 24 Stunden fällt die Expression wieder nahe des Ausgangswertes des Kontrollgewebes mit einem Median von 1,2% positiven Pixeln ab. Nach 7 Tagen liegt der Anteil positiver Pixel wieder unter 1% und bleibt auf diesem Niveau (s. Abb. 17 A).

In der KO-Gruppe zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Integrin- β 6-Expression 3 und 12 Stunden nach letzter Caeruleingabe, der Maximalwert wird mit einem Median von 15,32% Anteil an positiven Pixeln nach 12 Stunden erreicht (s. Abb. 16 A & Abb. 17 A). Nach 24 Stunden sinkt die Expression ebenfalls deutlich ab mit einem positiven Pixelcount von 2% auf das Expressionslevel der KO-Kontrollgruppe (s. Abb 16 C) und sinkt im Folgenden weiter auf unter 1%.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Gesamtgewebe besteht zu keinem Zeitpunkt ($p=ns$). Nach 12 Stunden zeigt sich eine leichte Tendenz für einen Unterschied der Integrinexpression zwischen WT- und KO-Gruppe, wobei in der KO-Gruppe eine stärkere Expression auftritt als in der WT-Gruppe. Zu allen anderen Zeitpunkten zeigt sich das Expressionslevel in beiden Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau.

Im zweiten Schritt folgt erneut der Vergleich des Gesamtgewebes mit den ADM-Regionen. In der WT-Gruppe zeigt sich zu allen untersuchten Zeitpunkten eine erhöhte Expression in den ADM-Regionen im Vergleich zum Gesamtgewebe (s. Abb. 17 B). Diese zeigt sich zu allen Zeitpunkten als statistisch signifikanter Unterschied ($p_{3h}=0,0019$, $p_{12h}=0,0002$, $p_{24h}=0,0280$, $p_{48h}=0,0159$).

In der KO-Gruppe zeigt sich das gleiche Bild (s. Abb. 16 B & 17 B). Hier zeigt sich die erhöhte Expression in den ADM-Formationen zu den Zeitpunkten 3 Stunden und 12 Stunden mit einem um 9,63% bzw. 11,72% höherem positiven Pixelcount in den ADM-Regionen als statistisch signifikant ($p_{3h}=0,005$, $p_{12h}=0,001$); nach 24 und 48 Stunden besteht ebenfalls eine höhere Expression in den ADM-Arealen, hier zeigt sich der Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant ($p=ns$).

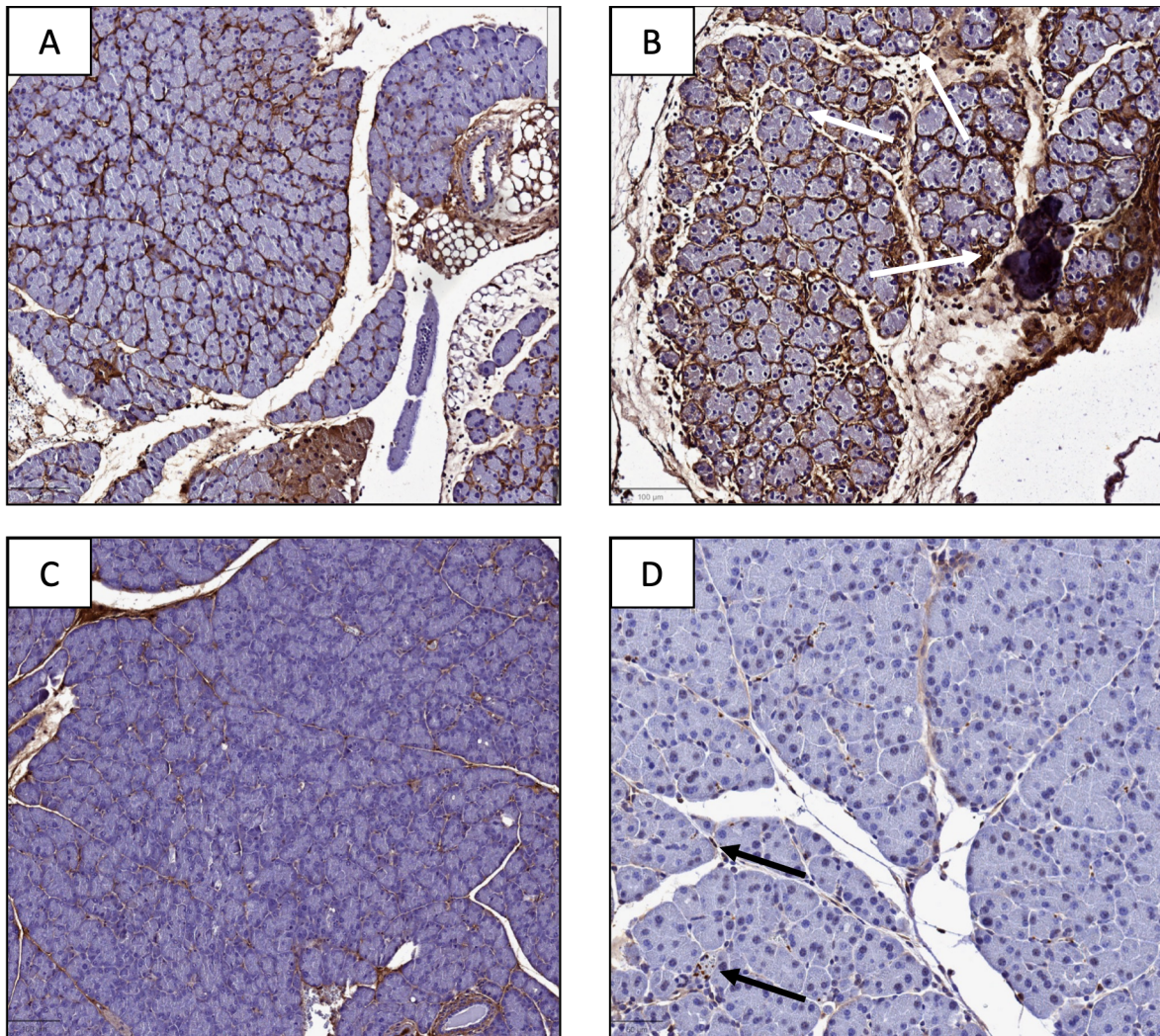


Abbildung 15: Expression von Integrin $\beta 6$ (A-C) und Integrin $\beta 3$ (D) während akuter Entzündung. **A** Nach 12 Stunden zeigt sich eine stark erhöhte basal lokalisierte Expression von Integrin $\beta 6$ an den Azinuszellen, hier exemplarisch gezeigt in einer Maus der KO-Gruppe. **B** In demselben Gewebe wie in A zeigt sich in den ADM-Formationen eine stärkere Integrin $\beta 6$ -Expression als im Gesamtgewebe (s. weiße Pfeile). **C** Nach 24 Stunden, hier ebenfalls exemplarisch gezeigt in einer Maus der KO-Gruppe, kommt es bereits zu einem deutlichen Rückgang der Integrin $\beta 6$ Expression. **D** Das exokrine Pankreasgewebe zeigt keine Anfärbung für Integrin $\beta 3$, hier exemplarisch in einer KO-Maus nach 12 Stunden. Vereinzelt zeigen sich positive fibroblastäre Zellen (s. schwarzer oberer Pfeil) und positive Immunzellen (s. schwarzer unterer Pfeil). **A - C** Maßstab 100 μm , **D** Maßstab 50 μm .

Integrin $\beta 3$ zeigt trotz mehrfacher Wiederholung der Färbung und positivem Nachweis an Pankreaskarzinomgewebe als Positivkontrolle im selben Färbedurchlauf, keine Expression im exokrinen Pankreasgewebe beider Genotypen und zu keinem Zeitpunkt. Es stellen sich lediglich Immunzellen und vereinzelt fibroblastäre Zellen als Integrin- $\beta 3$ -positiv im Gewebe dar (s. Abb. 16 D). Die Ergebnisse wurden dennoch gemäß der oben beschriebenen Auswertung (s. Kapitel 2.2.3) durchgeführt, die statistische Auswertung ergab, dass der Gesamttest statistisch nicht signifikant ist, es somit zu keiner signifikanten Integrin $\beta 3$ Expression kommt. ($p=\text{ns}$).

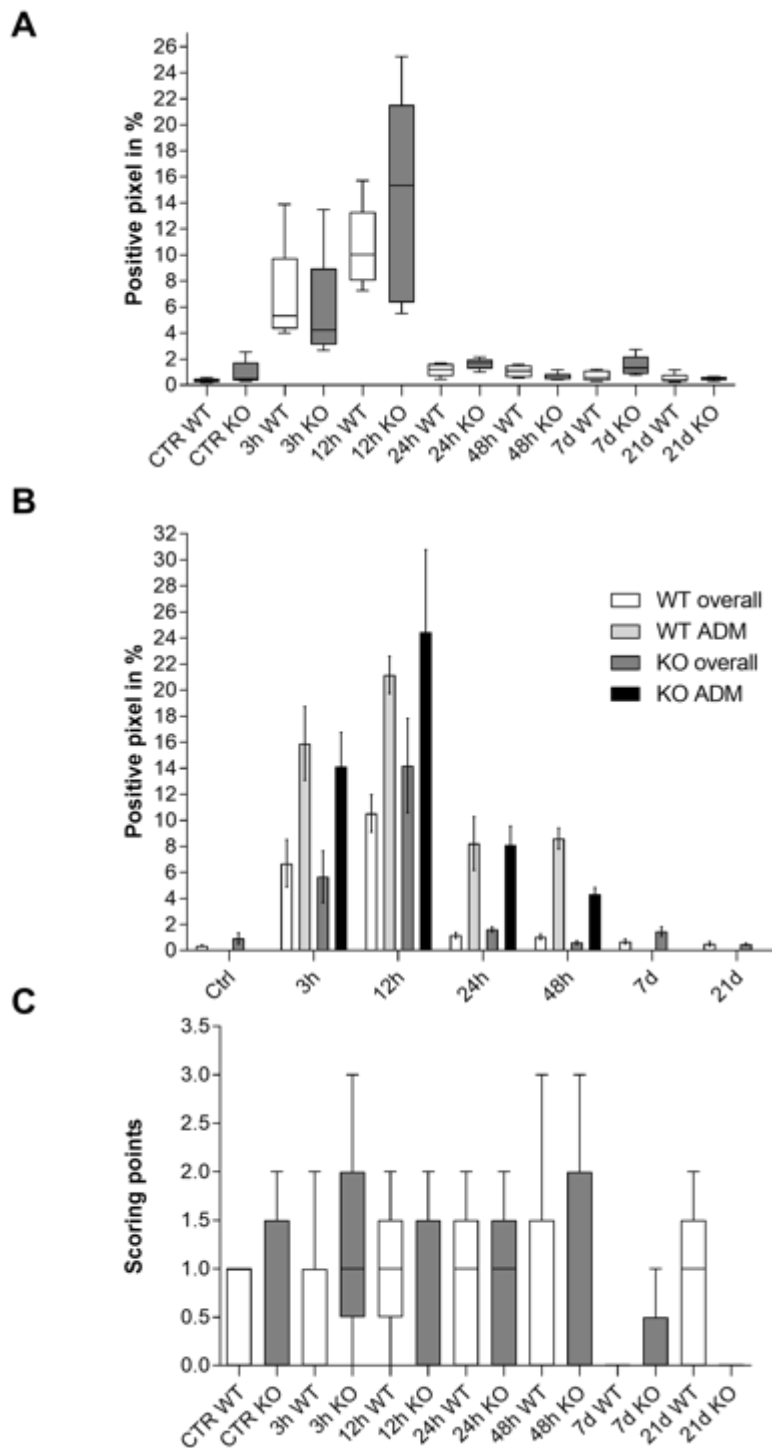


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Integrin $\beta 6$ und $\beta 3$ Expression. **A** Der Graph zeigt die Integrin- $\beta 6$ -Expression in beiden Genotypen im Gesamtgewebe über die Zeit. Es zeigt sich zu Beginn der Entzündungsreaktion nach 3 und 12 Stunden ein deutlicher Anstieg der Integrin- $\beta 6$ -Expression, in beiden Genotypen wird der Maximalwert nach 12 Stunden erreicht. Danach kommt es zu einem rapiden Abfall, sodass sich bereits nach 24 Stunden die Expression derjenigen in der Kontrollgruppe annähert. **B** Der Graph zeigt die Integrin- $\beta 6$ -Expression in beiden Genotypen im Gesamtgewebe sowie in den ADM-Formationen. Hierbei zeigt sich zu allen Zeitpunkten, in denen ADM auftreten, dass diese eine höhere Integrin- $\beta 6$ -Expression aufweisen als das Gesamtgewebe. **C**

C Der Graph zeigt die Integrin- β 3-Expression in beiden Genotypen im Gesamtgewebe, hierbei zeigt sich zu allen Zeitpunkten ein vergleichbarer Wert. Der Gesamttest ist statistisch nicht signifikant.

3.6 Fibrose

Die Fibrosebildung wird zum einen in der Elastica-van-Gieson-Färbung untersucht und in insgesamt drei Schweregrade eingeteilt (leichte, mittelgradige und starke Fibrose).

In der NaCl-Kontrollgruppe zeigt sich keine reife Fibrosebildung.

In der WT-Gruppe zeigt sich nach 12, 24 und 48 Stunden ein geringer Nachweis von fibrotischem Gewebe in jeweils einzelnen Gewebeproben, der Median liegt jedoch in allen Gruppen weiterhin bei 0.

In der KO-Gruppe zeigt sich nach 3 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden sowie nach 7 Tagen ein Nachweis von fibrotischem Gewebe. Während dies nach 3 Stunden und 7 Tagen erneut lediglich jeweils eine murine Gewebeprobe umfasst, zeigen nach 24 und 48 Stunden die Proben von jeweils 3 Mäuse fibrotisches Gewebe. Die Medianwerte liegen hier jeweils bei 1. Histologisch zeigt sich in beiden Gruppen, dass das fibrotische Gewebe jeweils nur aus einzelnen Fibrosträngen besteht (s. Abb. 18 A), reifes kompaktes Fibrosegewebe bildet sich zu keinem der Zeitpunkte aus (s. Abb. 18 B).

Bei der statistischen Analyse erweist sich der Test insgesamt als nicht signifikant, sodass es zu keiner signifikanten Fibrosebildung kommt. ($p=0,0527$) (s. Abb. 19 A).

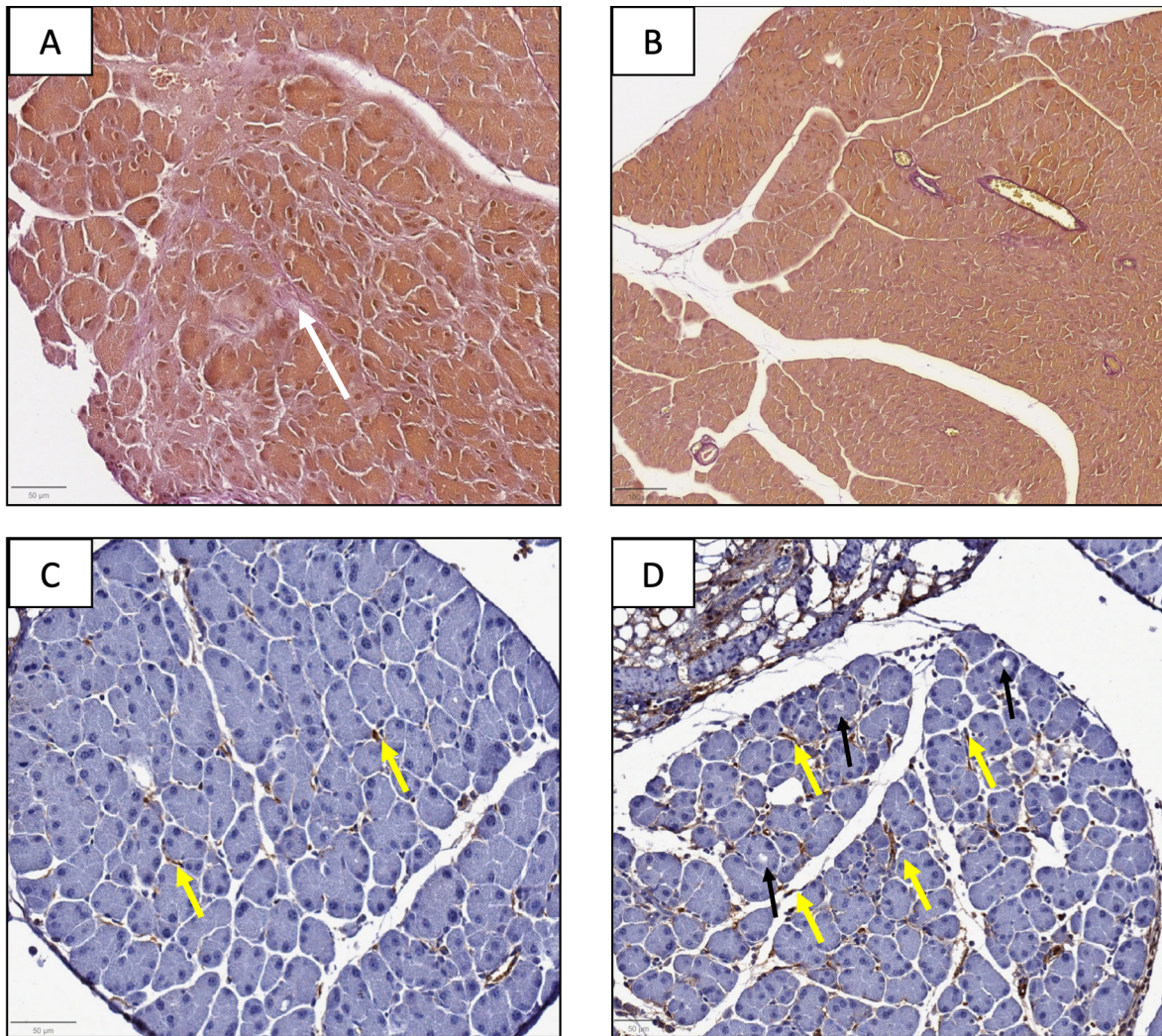


Abbildung 17: Fibrosebildung und PSC-Aktivierung während der AP. **A** In der Elastica-van-Gieson-Färbung zeigt sich teilweise, hier exemplarisch gezeigt nach 24 Stunden in der KO-Gruppe, eine milde Fibrosierung bestehend aus einzelnen Fibrosträngen (s. weißer Pfeil). **B** Nach 7 Tagen, hier in der WT-Gruppe exemplarisch dargestellt, findet sich keine reife Fibrosebildung. **C** In der α -SMA-Färbung, hier bei 12 Stunden im WT, zeigen sich einzelne positiv gefärbte fibroblastäre Zellen zwischen den Azinuszellen verteilt (s. gelbe Pfeile). **D** Im selben Gewebe wie in C zeigt sich in den ADM-Regionen ein höherer Anteil an α -SMA-positiven fibroblastären Zellen (s. gelbe Pfeile). **A, B, D** Maßstab 50 μ m, **C** Maßstab 100 μ m.

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, korreliert die Fibrosebildung während der Pathogenese der Pankreatitis mit der Aktivierung von PSC, das immunhistochemisch über die Anfärbung von α -SMA nachweisbar ist. Die PSC stellen sich sowohl periazinär als auch interstitiell dar (s. Abb. 18 C-D).

In der NaCl-Kontrollgruppe zeigen sich in beiden Genotypen vereinzelt α -SMA-positive Zellen im Interstitium.

In der WT-Gruppe zeigt sich mit Induktion der Inflammation ein Anstieg der α -SMA-positiven Zellzahl, welche nach Abheilung der Inflammation wieder absinkt (s. Abb. 19 B). Konkret zeigt sich die Zunahme der α -SMA-positiven Zellen nach 3, 12 und 24 Stunden, die

Expression ist hier zu allen Zeitpunkten mit einem Median von 3 auf dem gleichen Niveau. Nach 48 Stunden kommt es zur Abnahme der α -SMA-positiven Zellen (aktivierten PSC) und nach 7 Tagen wird der Ausgangswert der Kontrollgruppe erreicht (s. Abb. 19 B).

In der KO-Gruppe zeigt sich ein identischer Verlauf wie in der WT-Gruppe (s. Abb. 19 B), ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht nicht ($p=ns$). Im nächsten Schritt werden Gesamtgewebe und ADM-Regionen gegenübergestellt und im Hinblick auf den jeweiligen Genotyp analysiert.

In der WT-Gruppe zeigt sich zu den Zeitpunkten 3 Stunden und 48 Stunden ein geringerer Nachweis, 12 und 24 Stunden nach Entzündungsinduktion hingegen ein erhöhter Nachweis von α -SMA-positiven PSC in den ADM-Regionen im Vergleich zum Gesamtgewebe (s. Abb. 19 C). Ein statistisch signifikanter Unterschied besteht hierbei nach 12 Stunden ($p=0,0031$), zu den anderen Zeitpunkten ist eine statistische Signifikanz des Unterschiedes nicht nachweisbar ($p=ns$).

In der KO-Gruppe zeigt sich der erhöhte Nachweis zu den Zeitpunkten 3, 12 und 24 Stunden. Nach 48 Stunden weisen die ADM-Regionen einen geringeren Nachweis von aktivierten PSC im Vergleich zum Gesamtgewebe auf (s. Abb. 19 C). Die Unterschiede zeigen sich nach 24 Stunden als statistisch signifikant, zu den anderen Zeitpunkten sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p_{24h}=0,0031$)

Ferner besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl an α -SMA positiven Zellen zwischen WT-ADM und KO-ADM ($p=ns$).

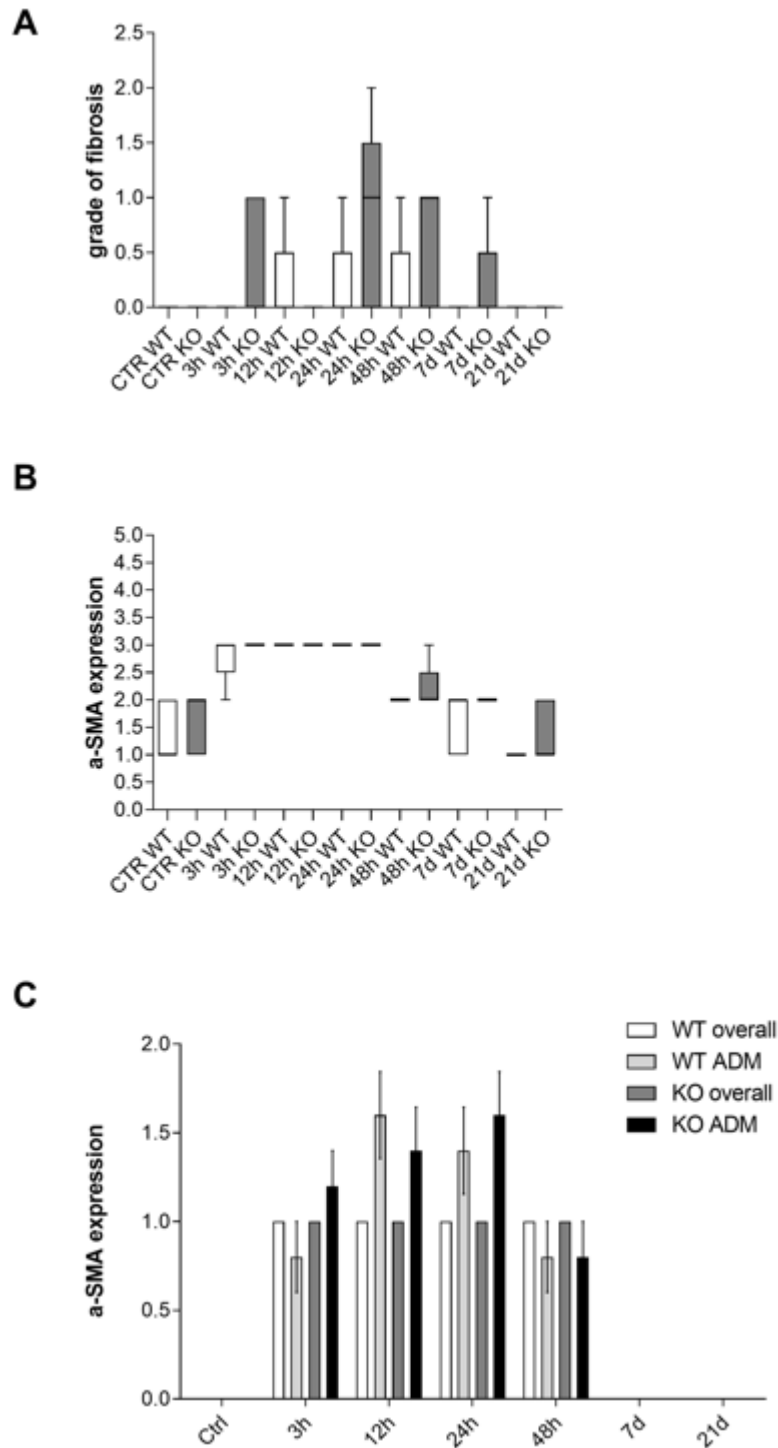


Abbildung 18: Fibrosegrad und α -SMA-Expression in beiden Genotypen. **A** Der Graph zeigt den Fibrosegrad in beiden Genotypen über den zeitlichen Verlauf. Es wird deutlich, dass es in beiden Genotypen nur zu milder Fibrosierung kommt. Zu den Zeitpunkten, welche Fibrose zeigen, ist diese in der KO-Gruppe etwas stärker ausgeprägt als in der WT-Gruppe. Der statistische Test ist jedoch insgesamt nicht signifikant. **B** Der Graph zeigt die α -SMA Expression in beiden Genotypen im Gesamtgewebe. Zu den frühen Zeitpunkten kommt es in beiden Genotypen zu einem identischen Anstieg der α -SMA-positiven Zellzahl. Auch die späten Zeitpunkte sowie die Kontrollgruppe zeigen vereinzelt α -SMA-positive Zellen. **C** Der Graph zeigt den Vergleich der α -SMA-Expression im Gesamtgewebe und den ADM-Regionen in beiden Genotypen. Es zeigt sich bei 12 und 24 Stunden in beiden Genotypen sowie bei 3 Stunden in der KO-Gruppe eine erhöhte Expression in den ADM-

Regionen, bei 48 Stunden zeigen beide Genotypen in den ADM-Formationen eine verringerte α -SMA-Expression

Tabelle 16: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.

Parameter	Relevante Veränderungen
Inflamationsreaktion (HE-Färbung)	• Deutliche Inflamationsreaktion zu den frühen Zeitpunkten in beiden Genotypen • Fast vollständige Regeneration nach 7 Tagen • Kein signifikanter Unterschied zwischen Genotypen, KO nach 7 Tagen etwas erhöhten Inflammationsscore • ADM-Formation während starker Entzündungsreaktion • Keine ADM-Formationen nach 7 Tagen vorhanden • Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen in ADM-Quantität
Proliferation (Ki-67)	• Anstieg der Proliferation während der akuten Entzündung in beiden Genotypen • Nach 7 Tagen bereits rückläufig, Ausgangsniveau erst nach 21 Tagen erreicht • Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen • KO-Gruppe nach 48 Stunden in der Tendenz höhere Proliferationsrate • ADM vs. Gesamtgewebe: In ADM erhöhte Proliferationsrate gegenüber Gesamtgewebe
Azelluläre Fibrose (EvG-Färbung)	• Nur einzelne Fibrosestränge in beiden Genotypen • Keine Ausbildung einer reifen, organisierten Fibrose
Aktivierte PSC (Alpha-SMA)	• Zunahme der α-SMA+ Zellen in beiden Genotypen während akuter Inflammation • Erreichen des Ausgangsniveau an Tag 7 • ADM vs. Gesamtgewebe: In WT-Gruppe nach 12h, in KO-Gruppe nach 24h statistisch signifikant mehr α-SMA+ Zellen in ADM als in Gesamtgewebe
ADM-Formation - (Amylase, CK19)	• Geringer Abfall von Amylase-Expression, niedrigste Expression nach 48 Stunden in beiden Genotypen • Starker Anstieg der CK19-Expression, höchste Expression nach 48 Stunden in beiden Genotypen • CK19 im KO nach 3h und 48h höher als WT

ADM-Formation – (Integrine $\beta 3$ und $\beta 6$)	• Keine Expression von Integrin $\beta 3$ in beiden Genotypen • Erhöhte Expression von Integrin $\beta 6$ bei akuter Entzündung, max. nach 12h, in beiden Genotypen • Ausgangsniveau nach 24h erreicht • Kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen • ADM vs. Gesamtgewebe: signifikant höhere Integrin $\beta 6$ Expression in ADM zu allen Zeitpunkten im WT und bei 3h und 12h im KO • Nach 12h Expression sowohl im Gesamtgewebe als auch in ADM tendenziell höher im KO
ADM-Formation – (Sox9)	• Erhöhte Expression während akuter Inflammation in beiden Genotypen • Ausgangsniveau nach 7 Tagen erreicht • Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen • Maximalwert im WT nach 12h, im KO nach 24h erreicht • ADM vs. Gesamtgewebe: erhöhte Expression in ADM bei 3h und 48h, sowie bei 12h im KO

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von TNC auf die Regeneration des exokrinen Pankreasgewebes am Beispiel einer akuten Pankreatitis bei TNC-Knock-out Mäusen (KO-Gruppe) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen untersucht. Hierbei zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen in der Entzündungsaktivität, der quantitativen ADM-Formationen sowie der Dauer bis zur vollständigen Regeneration. Die Arbeit zeigt dennoch in verschiedenen Färbungen und immunhistochemischen Untersuchungen Hinweise auf eine zeitlich verzögerten Regeneration in der TNC-KO Gruppe. So zeigt sich nach 7 Tagen ein höherer Inflamationsgrad in der KO-Gruppe. Außerdem zeigt sich eine höhere Proliferationsrate in der KO-Gruppe nach 48 Stunden im Vergleich zur WT-Gruppe, welche hier bereits einen stärkeren Abfall aufweist. Auch ist bei der Sox9-Expression ein verzögerter Anstieg und Abfall sowie ein späterer Maximalpunkt in der KO-Gruppe zu beobachten. Insgesamt bieten diese Ergebnisse erste Anhaltspunkte dafür, dass TNC bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der exokrinen Pankreasschädigung einen Einfluss auf die Regeneration hat und ein intaktes Stroma für die Gewebsintegrität von zentraler Bedeutung für die Restitutio ad integrum ist. Der Regenerationsprozess im Pankreas wird von multiplen Faktoren gesteuert, wobei ein Gleichgewicht zwischen diesen Faktoren von großer Relevanz ist. Bereits durch die Defizienz einzelner Faktoren, wie hier TNC, kann dieser Prozess aus dem Gleichgewicht geraten.

Im Rahmen der Auswertung zeigen einige der erhobenen Marker einen vergleichbaren Expressionsverlauf. Hierzu gehören der Proliferationsmarker Ki-67, das Progenitorgen Sox9, der Rezeptor Integrin $\beta 6$ sowie α -SMA als Marker für aktivierte pankreatische Stellatumzellen (PSC). Sie alle werden im Rahmen der Inflammation vermehrt exprimiert bzw. aktiviert und sind bei Eintritt der Regeneration rückläufig. Allerdings zeigen sich dabei interessante Unterschiede beim Zeitpunkt der maximalen Expression. So ist beispielsweise bei Integrin $\beta 6$ als erstem der genannten Marker bereits nach 24 Stunden ein deutlicher Abfall nachzuweisen, obwohl zu diesem Zeitpunkt die Entzündung noch anhält. Ebenfalls zeigen die ADM-Marker Amylase und CK-19 durch die Formation der ADM eine veränderte Expression, wobei nach 48 Stunden der Zeitpunkt der niedrigsten Amylase- und höchsten CK19-Expression erreicht ist. Dagegen waren in dieser Arbeit die Fibrosebildung (Elastica-van-Gieson-Färbung) sowie der Rezeptor Integrin $\beta 3$ für die Beurteilung der Regeneration sowie der Rolle von TNC nicht geeignet. Beide zeigen im Rahmen der akuten Inflammation keinen Anstieg, sie scheinen möglicherweise erst im späteren Verlauf der Pankreatitispathogenese eine Rolle zu spielen.

4.1 Einfluss von Tenascin C auf die Regeneration

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit ist, ob eine TNC-Defizienz einen negativen Einfluss auf die Regeneration nach akuter Inflammation im Pankreas hat. TNC ist im Körper an zahlreichen Wundheilungsprozessen beteiligt und zeigt auch im Pankreas bei akuter Entzündung eine erhöhte Expression (Midwood and Orend, 2009, Kuhlenkampff, 2020). In dieser Arbeit zeigen sich rein histomorphologisch (HE-Färbung) zwar erste Tendenzen, jedoch kein signifikanter Unterschied in der Regeneration zwischen der WT-Gruppe und der TNC-KO-Gruppe. So kommt es zunächst simultan in beiden Gruppen zu einer Entzündungsreaktion, die in beiden Gruppen nach ca. 7 Tagen fast vollständig ausgeheilt ist. Dieser Verlauf passt zu vorangegangenen Ergebnissen bezogen auf den Verlauf der humanen Pankreatitis (Murtaugh and Keefe, 2015). Bei der genauen Betrachtung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte fällt zu einem auf, dass die maximale Inflammation nach 12 Stunden in der KO-Gruppe etwas höher liegt. Bei Betrachtung beider Boxplots zu diesem Zeitpunkt zeigt sich die Streuung jedoch in einem ähnlichen Bereich und auch bildmorphologisch zeigt sich hier kein offensichtlicher Unterschied. Zum anderen wird deutlich, dass die TNC-KO-Gruppe nach 7 Tagen einen erhöhten Inflammationsscore im Vergleich zum WT aufweist, hier zeigt sich in der Tendenz somit eine verzögerte Regeneration in der KO-Gruppe.

Insgesamt zeigen sich die Tendenzen hier gering ausgeprägt. Möglicherweise kann die TNC-Defizienz insbesondere im Kontext einer akuten, prinzipiell selbstlimitierenden Entzündung durch andere EZM-Proteine wie beispielsweise Periostin ausgeglichen werden, die ebenfalls in der Pankreasepathogenese eine bedeutende Rolle spielen (Smid et al., 2015).

Die Analyse einzelner Proteine in der Immunhistochemie zeigt ebenfalls eine veränderte Proteinexpression in den TNC-KO-Mäusen und unterstützt damit Hinweise auf eine verzögerte Regeneration in dieser Gruppe. Die Ki-67-Expression als Marker für die Proliferationsrate weist in beiden Genotypen eine breite Streuung auf. Der Hintergrund ist hierbei, dass die Expression von Ki-67 von der jeweiligen Phase des Zellzyklus abhängt (Sobecki et al., 2017). Nichtsdestotrotz ist Ki-67 ein etablierter Marker der Zellproliferation, weshalb auch in dieser Arbeit die Rolle von TNC auf seine Expression untersucht wurde. Um ein möglichst genaues Ergebnis in den unterschiedlichen Schnitten trotz der Streuung zu gewährleisten, wurde die Analyse an den vorliegenden Gewebeschnitten mehrfach angepasst, u.a. die Parameter des Algorithmus zur Erkennung positiv gefärbter Zellkerne. Zur Kontrolle wurden die Gewebeproben teilweise händisch nachgefärbt. Alle diese Maßnahmen konnten die Unregelmäßigkeiten nicht vollständig ausgleichen und die Streuung blieb evident.

Schlussendlich beschränkte sich die vergleichende Analyse der Gruppen auf die Medianwerte, die den erwarteten typischen Anstieg während der Phase der Inflammation sowie den Abfall der Ki-67-Expression im Rahmen der Regeneration zeigen. Dieser Verlauf der Expression passt auch zu dem globalen, visuellen Gesamteindruck beim Mikroskopieren. Beim Vergleich

der medianen Expressionrate zwischen der WT-Gruppe und der KO-Gruppe zeigt sich ein zeitlich versetzter Anstieg der Proliferationsrate in der KO-Gruppe. Während zu den Zeitpunkten 3, 12 und 24 Stunden der WT höher liegt, liegt die KO-Gruppe nach 48 Stunden höher. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Proliferation im Rahmen der AP in der KO-Gruppe länger erhöht bleibt und es somit zu einer verlängerten bzw. verzögerten Regeneration kommt. Die Sox9-Expression zeigt ebenfalls einen ähnlichen, zeitlich versetzten Verlauf in der KO-Gruppe. Während im WT-Gewebe bereits nach 12 Stunden die maximale Expression erreicht wird, ist dies im Gewebe der KO-Gruppe erst nach 24 Stunden der Fall.

Zusammenfassend geben der Verlauf des Inflammationsgrades sowie die Expressionsmuster von Ki-67 und Sox9 somit erste Indizien für eine zeitlich verzögerte bzw. verlängerte Regeneration in den TNC-KO-Mäusen.

4.2 Einfluss von TNC auf die Bildung von EZM

Da in der Pathogenese der Pankreatitis neben den Veränderungen des exokrinen Gewebes auch die Rolle der extrazellulären Matrix (EZM) zunehmend erkannt wird, wurden auch im Rahmen dieses Regenerationsmodells die EZM und ihre histomorphologischen Komponenten genauer analysiert.

Histologisch zeigt sich keine Ausbildung von reifem Stroma in beiden Genotypen. Der Nachweis einzelner Fibrostränge ist dabei zu vernachlässigen, da die Veränderungen nur minimal ausgeprägt sind und sich zwischen WT- und TNC-KO-Gruppe nicht signifikant unterscheiden. Damit zeigt sich, dass auch das Fehlen von TNC in diesem Modell zu keinem der Zeitpunkte zu einer Fibrosierung des Pankreasgewebes im Rahmen der Regeneration nach der AP führt.

Während es bei einer AP kaum oder gar nicht zur Fibrosebildung kommt, ist die Fibrose dagegen ein zentrales Merkmal der chronischen Pankreatitis und des PDAC und trägt zu deren Krankheitswert bei (Witt et al., 2007). Im Mittelpunkt der Synthese dieses Stromas stehen verschiedene Zellen. In neuesten Studien wurde beispielsweise nekrotischen Azinuszellen eine wichtige Rolle als Trigger bei der Fibrosebildung nachgewiesen (An et al., 2023). In dieser Arbeit wurde in der HE-Färbung der Gewebeproben kaum Azinuszellnekrosen detektiert, was somit einer der Gründe sein kann, weshalb es nicht zu einer Fibrose kommt.

Eine zentrale Rolle für die Fibrogenese spielen die pankreatischen Stellatumzellen (Feig et al., 2012), die TNC ausschütten, was wiederum über zahlreiche Prozesse wie Zellproliferation oder Zellmigration tumorfördernd wirkt (Juuti et al., 2004, Esposito et al., 2006).

Trotz fehlender Ausbildung eines kollagenfaserreichen Stromas während einer AP, kommt es dennoch zur Aktivierung ruhender PSC (Barrera et al., 2020), was auch in dieser Arbeit mittels alpha-SMA-Immunhistochemie gezeigt werden konnte. Die Aktivierung der PSC im Rahmen der Entzündung lässt sich hierbei in beiden Genotypen beobachten, auch das Abklingen der

Entzündung führt in beiden Gruppen simultan zur Inaktivierung. Dabei zeigt sich kein Unterschied in der Anzahl der aktivierten PSC zwischen beiden Genotypen.

Grundsätzlich haben PSC in der Pathogenese der Pankreatitis zwei unterschiedliche Rollen, die Förderung der Regeneration und die Bildung der Fibrose (Omary et al., 2007). Im Rahmen der akuten Inflammation, wie im hier vorliegenden Mausmodell, steht die regenerative Funktion im Vordergrund. So wurde gezeigt, dass PSC sowohl im menschlichen Gewebe also auch in Tierexperimenten u.a. durch Anregung von Zellproliferation, Zellmigration und Bildung neuer Parenchymzellen zu einer Geweberegeneration beitragen (Omary et al., 2007). Außerdem wirken PSC während einer akuten Pankreatitis eher anti-fibrogen, da sie EZM-abbauende Proteasen stimulieren (Omary et al., 2007). Zudem scheinen PSC während einer akuten Inflammation durch Phagozytose von neutrophilen Granulozyten und apoptotischen Zellen zur Terminierung der Entzündung beizutragen (Shimizu et al., 2005). Dies erklärt auch, weshalb es in dieser Arbeit an einem Modell der AP zu keiner relevanten Fibrosebildung trotz PSC-Aktivierung kommt, denn die PSC tragen hier zunächst zur Regeneration bei.

Allerdings wurde gezeigt, dass PSC im Pankreaskarzinom TNC sezernieren (Geleta et al., 2022). Unklar ist, ob PSC auch in der AP TNC ausschütten. In jedem Fall zeigt die vorliegende Arbeit, dass eine TNC-Defizienz im KO-Genotyp der Mäuse weder mit einer geringeren PSC-Aktivierung noch mit einer signifikant verschlechterten Regeneration einhergeht. Die Ausschüttung von TNC durch PSC scheint somit entweder keine zentrale Rolle in der Regeneration der AP einzunehmen oder durch Aktivierung anderer Faktoren ausgeglichen werden zu können.

Die zweite Funktion der PSC, die bisher im Fokus der Forschung stand, ist die fibrogene Funktion mit Bildung des Stromas in der CP und beim PDAC (Bynigeri et al., 2017). Es stellt sich die Frage, welche Faktoren zum Überwiegen dieses fibrogenen Effektes der PSC führen. Zum einen kommt die zeitliche Komponente in Betracht, denn in der vorliegenden Untersuchung waren die PSC nach Abklingen der Inflammation nach ca. 48 Stunden wieder inaktiviert. Somit reichte die Dauer ihrer Aktivierung nicht für eine reife Stromaausbildung aus. Kommt es dagegen zu einer längerfristigen Gewebsschädigung im Pankreas, wird offensichtlich die Fibrogenese und insgesamt die Stromabildung stimuliert (Barrera et al., 2020).

Ein weiterer Aspekt wäre die Anzahl der aktivierten PSC. Im physiologischen Pankreasgewebe machen PSC lediglich 5-7% aus (Erkan et al., 2012). Auch in dieser Arbeit kommt es zwar in beiden Genotypen zu einer Aktivierung von PSC, deren Anzahl mit geschätzt <10% bleibt aber sehr gering.

Im PDAC zeigte sich hingegen mit 50-80% Stromaanteil ein starker quantitativer Anstieg von aktivierten PSC im Gewebe (Apte et al., 2015). Somit führt möglicherweise erst eine größere Anzahl an aktiven PSC zu einer effektiven Fibrose- und Stromabildung.

Zuletzt zeigt sich in den ADM bei starker Entzündung eine höhere PSC-Aktivierung als im restlichen Gewebe, wobei dies in beiden Genotypen gleich ausgeprägt ist. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass ADM selbst bspw. durch Ausschüttung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren ein lokales Milieu schaffen, das die PSC-Aktivierung steigert (PSC-Aktivierung erst durch die ADM). Eine andere mögliche Erklärung ist, dass es ein Resultat dessen ist, dass in Regionen der ADM-Entstehung vermehrter Zellstress, entzündliche Inflammation und Gewebeumbau vorherrschen, was nicht nur die ADM-Bildung, sondern ggf. auch die PSC-Aktivierung triggert (gleichzeitige ADM-Entstehung und PSC-Aktivierung). Inwiefern PSC die ADM-Formation während der Regeneration beeinflussen, ist nicht bekannt, aufgrund der späteren tumorfördernden Wirkung von PSC ist ein Einfluss auf die Entartung im Rahmen der Regeneration nicht auszuschließen. In einem PDAC-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung von TNC auf Tumorzellen zu einer geringeren Proliferation und einer geringeren PSC-Aktivierung führt, sodass diese in einen ruhenden Zustand übergehen, was wiederum einen Abfall der TNC-Expression nach sich zieht (Geleta et al., 2022). Dieser Effekt scheint jedoch während der akuten Inflammation noch nicht stattzufinden, da bei TNC-Defizienz keine verringerte PSC-Aktivierung sichtbar ist.

4.3 Einfluss von TNC auf die Integrinrezeptorexpression

Integrinrezeptoren nehmen sowohl in der Pankreasregeneration als auch in der Pankreaskarzinogenese eine wichtige Rolle ein. Die Integrinrezeptoren $\beta 3$ und $\beta 6$ stellen dabei Bindungspartner von TNC dar, wodurch die Zellproliferation stimuliert wird.

Integrin $\beta 3$ zeigt in dieser Arbeit keine Expression. Ein methodischer Fehler konnte durch die Expression in einem gleichzeitig gefärbten Tumorgewebe als positive Kontrolle ausgeschlossen werden. Während TNC *in vitro* eine Stimulation von Integrin $\beta 3$ gezeigt hatte (Kuhlenkampff, 2020), scheint der Rezeptor bei akuter Inflammation noch keine Rolle zu spielen.

Integrin $\alpha v\beta 6$ hingegen zeigt einen deutlichen Anstieg während der akuten Entzündungsphase, wobei die maximale Expression in beiden Genotypen nach 12 Stunden erreicht wird. Durch Bindung von TNC sowie anderen Mediatoren wird nun die Proliferation stimuliert, welche entsprechend in der Ki-67-Färbung leicht versetzt nach 24 Stunden am stärksten ausgeprägt ist. In der Tendenz zeigt sich zudem nach 12 Stunden, dass die KO-Gruppe eine erhöhte Expression von Integrin $\beta 6$ aufweist. Auch wird Integrin $\beta 6$ in den ADM-Formationen signifikant stärker exprimiert als im Gesamtgewebe. Eine erhöhte Integrin $\beta 6$ -Expression zeigt sich auch in PDAC-Vorläuferläsionen (Steiger et al., 2017). Zudem fördert Integrin $\beta 6$ im PDAC selbst das Tumorstadium u.a. durch Stimulation der Proliferation, Migration und verstärkten Invasivität der Tumorzellen (Reader et al., 2019). Eine spannende Frage hieraus ist, ob die erhöhte Integrin $\beta 6$ Expression auch ein erhöhtes

Transformationsrisiko bei TNC-Defizienz bedeutet. Dies ist jedoch mit den vorliegenden Daten nicht zu beantworten und bleibt spekulativ.

4.4 Einfluss von TNC auf die ADM-Formationen

Die azinär-duktaile Metaplasie ist eine Reaktion der Azinuszellen auf inflammatorischen Stress und ein Zustand, in welchem sie eine hohe Plastizität besitzen. Zum einen wird dieser Zustand als wichtiger Teil der Gewebsregeneration diskutiert, zum anderen stellt er ein Risiko für eine präkanzeröse Entwicklung dar (Ge et al., 2022).

Die genaue Bedeutung der ADM auf die Regeneration wird aktuell kontrovers diskutiert. Zum einen wird angenommen, dass die ADM durch Re-Differenzierung zurück zu normalen Azinuszellen deren Regeneration ermöglichen (Chuvin, 2017, Grabliauskaite, 2015). Andere Arbeiten hinterfragen jedoch den tatsächlichen Anteil von ADM an regenerierten Azini, da sich die meisten Zellen aus bereits vorhanden Azinuszellen regenerieren (Strobel et al., 2007, Desai et al., 2007).

Diese Arbeit analysierte, inwiefern TNC einen Einfluss auf die ADM-Formationen und hierüber auf die Regeneration nimmt.

Zunächst zeigt sich, dass der prozentuale Anteil an ADM in beiden Genotypen sehr gering ist, und nur in Ausnahmefällen über 1% steigt, wobei die ADM insbesondere in den stark entzündeten Arealen nachzuweisen sind.

Der geringe prozentuale Anteil von ADM könnte dafür sprechen, dass auch nur ein geringer Anteil an Azinuszellen aus den ADM regenerieren, passend zu Hypothesen aus o.g. Arbeiten (Strobel et al., 2007, Desai et al., 2007). Auf der anderen Seite zeigen sich die ADM insbesondere in den stark entzündeten Arealen, das bedeutet vor allem dort, wo auch die meiste Regeneration stattfindet. Zudem zeigen ADM im Vergleich zum Gesamtgewebe eine erhöhte Proliferationsrate und die erhöhte Zellteilung kann die Re-Differenzierung erst ermöglichen. Es ist somit wahrscheinlich, dass die ADM ein wichtiger Teil der Regeneration sind und durch Re-Differenzierung die Gewebereparation ermöglichen.

Die genauen Einflussfaktoren auf die Bildung und die Re-Differenzierung der Azinuszellen sind aktuell noch nicht hinreichend verstanden. TNC zeigte bereits *in vitro* einen inhibierenden Effekt auf die Entstehung von ADM (Kuhlenkampff, 2020). Die hier vorliegenden Daten *in vivo* zeigen jedoch keinen statistisch signifikanten quantitativen Unterschied in den ADM bei TNC-WT und TNC-KO. Zudem kommt es in beiden Genotypen nach 48 Stunden zu einer Abnahme der ADM-Formationen und nach 7 Tagen zeigen sich keine ADM mehr im Gewebe. Das Fehlen von TNC führt somit nicht zu einem verlängerten Bestehen von ADM.

Die Proliferationsrate in den ADM zeigt sich während den einzelnen Zeitpunkten in der WT- sowie in der KO-Gruppe vergleichbar. Bei Betrachten des Verlaufes zeigt sich jedoch, dass in der WT-Gruppe die Proliferation zu Beginn (3 und 12 Stunden) in der Tendenz über der KO-

Gruppe liegt, während diese nach 48 Stunden eine höhere Proliferationsrate in den ADM aufweist. Zudem wird nach 48 Stunden in der KO-Gruppe die maximale Proliferationsrate erreicht, während diese im WT bereits nach 24 Stunden erreicht ist. Somit deutet dieser Verlauf erneut auf eine verzögerte Regeneration im TNC-KO hin, da die Proliferation in den ADM länger erhöht bleibt.

Betrachtet man anschließend die beiden ADM-definierenden Marker Amylase und CK19 zeigt sich ein inhomogenes Bild. Während die erhöhte Expression von CK19 als duktaler Marker in den meisten ADM und bereits 3 Stunden nach letzter Caerulein-Gabe auftritt, kommt es erst stark verzögert zum Abfall der Expression des azinären Markers Amylase. Die ADM, die bei akuter Inflammation auftreten, nehmen somit erste duktale Charakteristika an, es kommt jedoch nicht zu einem kompletten Verlust der azinären Marker und somit nicht zu ausgereiften ADM. Der partielle Erhalt des azinären Phänotyps stellt eine Voraussetzung für die Redifferenzierung dar und untermauert erneut die oben genannte Hypothese, dass gesunde Azini aus ADM regenerieren können. Erst nach 48 Stunden zeigt sich in beiden Genotypen ein signifikanter Unterschied zwischen Amylase- und CK19-Expression, hier kommt es erst zu einem deutlichen Abfall der Amylase-Expression. Darüber hinaus zeigt sich die CK19-Expression nach 48 Stunden in der KO-Gruppe höher als in der WT-Gruppe, was als Anhalt einer verzögerten Re-Differenzierung gedeutet werden kann.

Eine weitere Hypothese beschreibt, dass der Verlust des azinären Phänotyps und somit der damit verbunden Enzymsekretion das Parenchym vor einem Aggravieren der Inflammation schützt (Marstrand-Dauce et al., 2023). Die vorliegenden Färbungen zeigen, dass die Amylase-Expression nach 3 und 12 Stunden in der WT-Gruppe etwas schneller abfällt, zu den späteren Zeitpunkten ist der Verlust der Amylase-Expression jedoch vergleichbar. Möglicherweise weist der frühere Abfall auf ein schnelleres Einsetzen der Regeneration sowie ein schnelleres Eindämmen der Inflammation durch TNC hin.

Das Progenitorgen Sox9 bzw. dessen Genprodukt, der Transkriptionsfaktor Sox9, ist ein weiterer Marker, der von Azinuszellen im Rahmen der ADM exprimiert wird (Pin et al., 2015). Hierbei zeigt sich in dieser Arbeit bei beiden Genotypen ein Anstieg während der akuten Entzündung und entsprechend ein Abfall nach erfolgreicher Regeneration. Dieser Anstieg ist sowohl im Gesamtgewebe als auch in den ADM-Regionen nachzuweisen, teilweise liegt die Sox9-Expression in den ADM sogar unter der im Gesamtgewebe (12 Stunden im WT und 24 Stunden in beide Genotypen). Während im Gesamtgewebe der Verlauf der Sox9-Expression im TNC-KO verzögert zur WT-Gruppe stattfindet, zeigt sich die Expression in den ADM-Formationen auf einem vergleichbaren Niveau.

Möglicherweise gehen die Sox9-positiven Azini zunächst in einen dukталen Genotyp über und erst im nächsten Schritt erfolgt die Metaplasie hin zum dukталen Phänotypen. In diesem Falle gäbe es Azini, welche durch die Sox9-Expression in einer Art „Bereitschafts-Stadium“ zur

Metaplasie treten, und erst bei länger bestehender starker Inflammation tatsächlich den ADM-Phänotypen annehmen. Da bei der AP jedoch frühzeitig die Regeneration eintritt, wird die Änderung des Phänotyps nicht erreicht. Dies passt zu dem unvollständigen Verlust des azinären Phänotyps in den vorhandenen ADM, eine reife ADM-Formation wird somit möglicherweise bei nur kurzzeitiger Inflammation nicht erreicht. Dies könnte ein Schutzmechanismus sein, welcher das Dysplasierisiko in diesem frühen Stadium minimiert. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die ADM-Formationen in beiden Genotypen ähnlich stark ausgeprägt ist und auch der Verlust der azinären sowie die Zunahme der dukталen Marker vergleichbar verlaufen. Dennoch zeigt sich durch die erhöhte Proliferationsrate sowie die erhöhte Expression von CK19 nach 48 Stunden im KO eine leicht verzögerte Re-Differenzierung und somit Regeneration.

Weder die WT- noch die KO-Mäuse zeigen in diesem Modell auf lange Sicht, hier nach 21 Tage, dysplastische Zellen oder fortbestehende ADM-Formationen. Das alleinige Fehlen von TNC ohne zusätzliches Auftreten von weiteren, karzinogenen Mutationen scheint somit nicht ausreichend für die Entwicklung von Vorläuferläsionen bei akuter Inflammation zu sein. Allerdings deutet ein leicht verzögerter Abfall von dukталen Markern in den ADM und die o.g. erhöhte Integrin $\beta 6$ -Expression in der KO-Gruppe nach 48 Stunden auf eine protektive Wirkung von TNC hin. Daraus resultiert die unmittelbare Frage, wie sich die Entartungswahrscheinlichkeit in *Kras*-mutierten Mäusen mit TNC-Defizienz verhalten würde.

4.5 Limitationen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Unterschied zwischen den beiden Genotypen WT und TNC-KO untersucht und dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden. Dennoch zeigten sich Tendenzen bei den Ergebnissen, die einen ersten Anhaltspunkt darauf geben, dass TNC einen stimulierenden Effekt auf die Regeneration nimmt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse ist es daher wichtig zu reflektieren, welche möglichen Limitationen und Fehlerquellen das hier vorliegende Experiment aufweist.

Zum einen wird in der vorliegenden Arbeit der Effekt auf die Regeneration in der akuten Pankreatitis und somit an einem frühen Punkt der Regeneration untersucht. Vorherige Studie zeigen, dass die Expression von TNC in der CP erhöht ist (Esposito et al., 2006). Möglicherweise wäre in einem CP-Modell somit ein deutlicherer Effekt zu sehen.

Zum anderen zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine geringe Größe der Mausekohorten. So wurden insgesamt 70 Mäuse eingeschlossen, welche jedoch auf 14 Gruppen verteilt waren, sodass die Anzahl der Mäuse pro Gruppe eher gering ist. So kommt es zum Teil zu einer breiten Streuung bei den Ergebnissen und es lassen sich lediglich Tendenzen ableiten. Zur Überprüfung der Tendenzen wäre hier ein Rescue-Experiment denkbar, wobei TNC-KO Mäusen ebenfalls mittels Caerulein eine AP induziert wird. Im Anschluss sollte ein Teil der

Mäuse mittels rekombiniertem TNC behandelt werden, um die Rolle von TNC weiter zu definieren.

Neben der Pathologie lässt sich der Schweregrad der Pankreatitis auch durch die Bestimmung von Laborwerten (z.B. Leukozyten, CRP, PCT, IL-6, IL-8 Lipase, Calcium, Kreatinin) beschreiben (Rau et al., 2004, Mihoc et al., 2025). Diese könnten sich möglicherweise als sensitivere Marker erweisen und die Dynamik der Parameter Rückschlüsse auf den Verlauf der Inflammation und Regeneration geben.

4.6 Ausblick

Aus der hier vorliegenden Arbeit ergeben sich weitere Fragestellungen, die in zukünftigen Untersuchungen betrachtet werden sollten.

TNC zeigt in der AP vor allem einen regenerativen, und damit einen aus medizinischer Sicht erwünschten Effekt auf das Pankreasgewebe. Im PDAC ändert sich dies; zwar werden hier die gleichen zellulären Prozesse wie Zellproliferation aktiviert, es kommt jedoch durch Förderung u.a. von Metastasierung und Angiogenese zu einem prokanzerogenen Effekt (Leppanen et al., 2019, Xu et al., 2015). Es stellt sich somit die Frage, zu welchem Zeitpunkt auf dem Weg von der Inflammation hin zur Karzinogenese der Wandel zu diesem pathologischen Effekt von TNC auf das Pankreasgewebe erfolgt. Konkret sollte untersucht werden, welchen Effekt TNC in der rezidivierenden AP und in der CP einnimmt. Hierzu wäre ein Mausmodell mit den zwei Genotypen (TNC-WT und TNC-KO) und wiederholte Caerulein-Injektion über mehrere Wochen denkbar.

Zudem ist bekannt, dass die Expression von TNC während der Karzinogenese schrittweise zunimmt (Esposito et al., 2006). Der genaue Effekt auf die Vorläuferläsionen des PDAC ist bisher unklar. Ein denkbare Experiment wäre in diesem Fall die Injektion von Caerulein bei KC-Mäusen (*Kras*-Mutation), welche ebenfalls in TNC-WT und TNC-KO aufgeteilt werden. Hierbei sollte untersucht werden, ob das Fehlen von TNC simultan mit einer vorhandenen KRAS-Mutation die Entwicklung von Vorläuferläsionen begünstigt.

Diese Arbeit zeigt die Regeneration nach AP *in vivo*, sowohl bei erhaltener TNC-Expression als auch ohne TNC. Während *in vitro* Ergebnisse klare regenerative Effekte von TNC gezeigt haben (z.B. in Zellkultur), ist der Effekt von TNC *in vivo* deutlich geringer, ein eindeutiger Einfluss des Fehlens von TNC auf die Heilung in der KO-Gruppe ist nicht auszumachen. Dies könnte beispielsweise durch kompensatorische Effekte anderer EZM-Proteine oder durch eine kompensatorische Hochregulation alternativer Signaturen im TNC-defizienten Organismus (z.B. veränderte Integrin- oder DAMP-Signaturen) a priori bedingt sein.

Zusammenfassend ist die Funktion von Tenascin C in der frühen Phase der Pankreasregeneration noch nicht abschließend verstanden und bedarf weiterer experimenteller Klärung.

5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologische Darstellung einer akuten Pankreatitis.	- 8 -
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Karzinogenese der Azinnuszellen hin zum Pankreaskarzinom.....	- 12 -
Abbildung 3: Vergleich Inzidenzen und Mortalität verschiedener Krebserkrankungen in Deutschland, Angabe in Prozent.	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 4: Schematische Darstellung von Tenascin C sowie seinen Bindungspartnern.	- 14 -
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Caeruleininjektion in die jeweiligen Mausekohorten und die Zeitpunkte der Organentnahme für die Experimente.....	- 23 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung.	- 29 -
Abbildung 7: Histologische Darstellung der akuten Pankreatitis.	- 39 -
Abbildung 8: Graphische Auswertung der HE-Färbung.....	- 40 -
Abbildung 9: Ki-67-Färbung zur Darstellung der Proliferationsaktivität des Gewebes. ...	- 42 -
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ki-67-Färbung über die gesamte Zeitspanne zur Darstellung der Proliferationsaktivität des Gewebes angegeben in %.	- 43 -
Abbildung 12: Expression von Amylase und CK19.	- 46 -
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Expressionslevel von Amylase und CK19 in den ADM-Formationen in Prozent.	- 47 -
Abbildung 11: Graphische Darstellung der ADM-Auswertung in der HE-Färbung sowie der Ki-67 Färbung.	- 48 -
Abbildung 14: Expression von Sox9 während der AP in beiden Genotypen..	- 50 -
Abbildung 15: Graphische Darstellung der Sox9-Expression im Gesamtgewebe und in den ADM-Formationen.....	- 51 -
Abbildung 16: Expression von Integrin β6 (A-C) und Integrin β3 (D) während akuter Entzündung.....	- 53 -
Abbildung 17: Graphische Darstellung der Integrin β6 und β3 Expression.....	- 54 -
Abbildung 18: Fibrosebildung und PSC-Aktivierung während der AP.....	- 56 -
Abbildung 19: Fibroseggrad und α-SMA-Expression in beiden Genotypen.	- 58 -

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genetische Information über beide Mausekohorten.....	- 21 -
Tabelle 2: Verteilung der Mausekohorte nach den verschiedenen Zeitpunkten und Genotypen.....	- 22 -
Tabelle 3: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge mit Hersteller und Bezugsort.....	- 23 -
Tabelle 4: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge mit Hersteller und Bezugsort.....	- 24 -
Tabelle 5: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge mit Hersteller und Bezugsort.....	- 24 -
Tabelle 6: Bestandteile und Zusammensetzung der verwendeten Puffer, die für die Experimente hergestellt wurden.....	- 25 -
Tabelle 7: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten primären Antikörper gegen die aufgelisteten Epitope in alphabetischer Reihenfolge und mit Angabe zur Spezies, der für die Färbungen verwendeten Verdünnungen, die Herstellerangaben mit Bezugsquelle und Produktnummer.....	- 26 -
Tabelle 8: Listung der für die histologische Aufarbeitung und Färbung der unten genannten Experimente verwendeten sekundären Antikörper in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe zur Spezies, der für die Färbungen verwendeten Verdünnungen, der Herstellerangaben mit Bezugsquelle und Produktnummer.	- 26 -
Tabelle 9: Listung der für die histologische Färbung, Bildauswertung, statistische Analyse, Dokumentation und Manuskripterstellung der unten genannten Experimente verwendeten Software in alphabetischer Reihenfolge.....	- 27 -
Tabelle 10: Übersicht der primären Antikörper der Immunhistochemie mit Verdünnungsverhältnis, Spezies des sekundären Antikörpers sowie Methode und Material zur Antigen-Demaskierung.	- 30 -
Tabelle 11: Finaler Score zur Ermittlung des Entzündungsgrades in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	- 32 -
Tabelle 12: Score zur Ermittlung des Fibrosegrads in der Elastica-van-Gieson-Färbung.	- 33 -
Tabelle 13: Score zur Quantifizierung von aktivierten PSC mittels α-SMA im Gesamtgewebe.....	- 33 -

Tabelle 14: Score zu dem Vergleich des Expressionslevels von aktivierten PSC mittels α-SMA-Färbung im Gesamtgewebe und in den ADM-Formationen.	- 34 -
Tabelle 15: Score zur Ermittlung der Expression von Integrine β3 im Gewebe.....	- 35 -
Tabelle 16: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.....	- 59 -

7 Literaturverzeichnis

- AFGHANI, E., PANDOL, S. J., SHIMOSEGAWA, T., SUTTON, R., WU, B. U., VEGE, S. S., GORELICK, F., HIROTA, M., WINDSOR, J., LO, S. K., FREEMAN, M. L., LERCH, M. M., TSUJI, Y., MELMED, G. Y., WASSEF, W. & MAYERLE, J. 2015. Acute Pancreatitis-Progress and Challenges: A Report on an International Symposium. *Pancreas*, 44, 1195-210.
- AN, J., JIANG, T., QI, L. & XIE, K. 2023. Acinar cells and the development of pancreatic fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 71-72, 40-53.
- APTE, M. V., XU, Z., POTHULA, S., GOLDSTEIN, D., PIROLA, R. C. & WILSON, J. S. 2015. Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too! *Pancreatology*, 15, S32-8.
- BACHEM, M. G., ZHOU, Z., ZHOU, S. & SIECH, M. 2006. Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3, S92-6.
- BANKS, P. A., BOLLEN, T. L., DERVENIS, C., GOOSZEN, H. G., JOHNSON, C. D., SARR, M. G., TSIOTOS, G. G., VEGE, S. S. & ACUTE PANCREATITIS CLASSIFICATION WORKING, G. 2013. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*, 62, 102-11.
- BANKS, P. A., FREEMAN, M. L. & PRACTICE PARAMETERS COMMITTEE OF THE AMERICAN COLLEGE OF, G. 2006. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 101, 2379-400.
- BARRERA, L. N., EVANS, A., LANE, B., BRUMSKILL, S., OLDFIELD, F. E., CAMPBELL, F., ANDREWS, T., LU, Z., PEREZ-MANCERA, P. A., LILOGLOU, T., ASHWORTH, M., JALALI, M., DAWSON, R., NUNES, Q., PHILLIPS, P. A., TIMMS, J. F., HALLORAN, C., GREENHALF, W., NEOPTOLEMOS, J. P. & COSTELLO, E. 2020. Fibroblasts from Distinct Pancreatic Pathologies Exhibit Disease-Specific Properties. *Cancer Res*, 80, 2861-2873.
- BASTURK, O., HONG, S. M., WOOD, L. D., ADSAY, N. V., ALBORES-SAAVEDRA, J., BIANKIN, A. V., BROSENS, L. A., FUKUSHIMA, N., GOGGINS, M., HRUBAN, R. H., KATO, Y., KLIMSTRA, D. S., KLOPPPEL, G., KRASINSKAS, A., LONGNECKER, D. S., MATTHAEI, H., OFFERHAUS, G. J., SHIMIZU, M., TAKAORI, K., TERRIS, B., YACHIDA, S., ESPOSITO, I., FURUKAWA, T. & BALTIMORE CONSENSUS, M. 2015. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol*, 39, 1730-41.
- BENITZ, S. 2015. Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells.
- BEYER, G., HOFFMEISTER, A., MICHL, P., GRESS, T. M., HUBER, W., ALGÜL, H., NEESSE, A., MEINING, A., SEUFFERLEIN, T. W., ROSENDAHL, J., KAHL, S., KELLER, J., WERNER, J., FRIESS, H., BUFLER, P., LÖHR, M. J., SCHNEIDER, A., LYNEN JANSEN, P., ESPOSITO, I., GRENACHER, L., MÖSSNER, J., LERCH, M. M. & MAYERLE, J. 2022. S3-Leitlinie Pankreatitis – Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol*, 60, 419-521.
- BHATIA, M., SLAVIN, J., CAO, Y., BASBAUM, A. I. & NEOPTOLEMOS, J. P. 2003. Preprotachykinin-A gene deletion protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284, G830-6.
- BHATIA, M., WONG, F. L., CAO, Y., LAU, H. Y., HUANG, J., PUNEET, P. & CHEVALI, L. 2005. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*, 5, 132-44.
- BREUSS, J. M. 1995. Expression of the $\beta 6$ integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling.
- BUCKLEY, C. W. & O'REILLY, E. M. 2024. Next-generation therapies for pancreatic cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 18, 55-72.
- BYNIGERI, R. R., JAKKAMPUDI, A., JANGALA, R., SUBRAMANYAM, C., SASIKALA, M., RAO, G. V., REDDY, D. N. & TALUKDAR, R. 2017. Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J Gastroenterol*, 23, 382-405.

- 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.
- CHIQUET-EHRISMANN, R., OREND, G., CHIQUET, M., TUCKER, R. P. & MIDWOOD, K. S. 2014. Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biol*, 37, 112-23.
- CHUVIN, N. 2017. Acinar-to-Ductal Metaplasia Induced by Transforming Growth Factor Beta Facilitates KRASG12D-driven Pancreatic Tumorigenesis.
- COOPER, J. & GIANCOTTI, F. G. 2019. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell*, 35, 347-367.
- DESAI, B. M., OLIVER-KRASINSKI, J., DE LEON, D. D., FARZAD, C., HONG, N., LEACH, S. D. & STOFFERS, D. A. 2007. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration. *J Clin Invest*, 117, 971-7.
- DISTLER, M., AUST, D., WEITZ, J., PILARSKY, C. & GRUTZMANN, R. 2014. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int*, 2014, 474905.
- ERKAN, M., ADLER, G., APTE, M. V., BACHEM, M. G., BUCHHOLZ, M., DETLEFSEN, S., ESPOSITO, I., FRIESS, H., GRESS, T. M., HABISCH, H. J., HWANG, R. F., JASTER, R., KLEEFF, J., KLOPPPEL, G., KORDES, C., LOGSDON, C. D., MASAMUNE, A., MICHALSKI, C. W., OH, J., PHILLIPS, P. A., PINZANI, M., REISER-ERKAN, C., TSUKAMOTO, H. & WILSON, J. 2012. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*, 61, 172-8.
- 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.
- FAZILATY, H., GARDANEH, M., AKBARI, P., ZEKRI, A. & BEHNAM, B. 2016. SLUG and SOX9 Cooperatively Regulate Tumor Initiating Niche Factors in Breast Cancer. *Cancer Microenviron*, 9, 71-4.
- FEIG, C., GOPINATHAN, A., NEESSE, A., CHAN, D. S., COOK, N. & TUVESON, D. A. 2012. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*, 18, 4266-76.
- GARAJOVA, I., PERONI, M., GELSOMINO, F. & LEONARDI, F. 2023. A Simple Overview of Pancreatic Cancer Treatment for Clinical Oncologists. *Curr Oncol*, 30, 9587-9601.
- GE, W., GOGA, A., HE, Y., SILVA, P. N., HIRT, C. K., HERRMANN, K., GUCCINI, I., GODBERSEN, S., SCHWANK, G. & STOFFEL, M. 2022. miR-802 Suppresses Acinar-to-Ductal Reprogramming During Early Pancreatitis and Pancreatic Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 162, 269-284.
- GELETA, B., TOUT, F. S., LIM, S. C., SAHNI, S., JANSSON, P. J., APTE, M. V., RICHARDSON, D. R. & KOVACEVIC, Z. 2022. Targeting Wnt/tenascin C-mediated cross talk between pancreatic cancer cells and stellate cells via activation of the metastasis suppressor NDRG1. *J Biol Chem*, 298, 101608.
- GINSBERG, M. H. 2014. Integrin activation. *BMB Rep*, 47, 655-9.
- GRABLIAUSKAITE, K. 2015. Molecular mechanisms of acinar-to-ductal metaplasia formation during pancreatitis.
- HABTEZION, A., GUKOVSKAYA, A. S. & PANDOL, S. J. 2019. Acute Pancreatitis: A Multifaceted Set of Organelle and Cellular Interactions. *Gastroenterology*, 156, 1941-1950.
- HASHIMOTO, A., HANDA, H., HATA, S. & HASHIMOTO, S. 2022. Orchestration of mesenchymal plasticity and immune evasiveness via rewiring of the metabolic program in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Front Oncol*, 12, 1005566.
- ISAJI, S., MIZUNO, S., WINDSOR, J. A., BASSI, C., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., HACKERT, T., HAYASAKI, A., KATZ, M. H. G., KIM, S. W., KISHIWADA, M., KITAGAWA, H., MICHALSKI, C. W. & WOLFGANG, C. L. 2018. International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatol*, 18, 2-11.
- JAMES, T. W. & CROCKETT, S. D. 2018. Management of acute pancreatitis in the first 72 hours. *Curr Opin Gastroenterol*, 34, 330-335.
- JIN, G., HONG, W., GUO, Y., BAI, Y. & CHEN, B. 2020. Molecular Mechanism of Pancreatic Stellate Cells Activation in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *J Cancer*, 11, 1505-1515.
- JONES, S., ZHANG, X., PARSONS, D. W., LIN, J. C., LEARY, R. J., ANGENENDT, P., MANKOO, P., CARTER, H., KAMIYAMA, H., JIMENO, A., HONG, S. M., FU, B., LIN, M. T., CALHOUN, E. S., KAMIYAMA,

- M., WALTER, K., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., HARTIGAN, J., SMITH, D. R., HIDALGO, M., LEACH, S. D., KLEIN, A. P., JAFFEE, E. M., GOGGINS, M., MAITRA, A., IACOBUZIO-DONAHUE, C., ESHLEMAN, J. R., KERN, S. E., HRUBAN, R. H., KARCHIN, R., PAPADOPOULOS, N., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., VELCULESCU, V. E. & KINZLER, K. W. 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321, 1801-6.
- JUUTI, A., NORDLING, S., LOUHIMO, J., LUNDIN, J. & HAGLUND, C. 2004. Tenascin C expression is upregulated in pancreatic cancer and correlates with differentiation. *J Clin Pathol*, 57, 1151-5.
- KANDA, M., MATTHAEI, H., WU, J., HONG, S. M., YU, J., BORGES, M., HRUBAN, R. H., MAITRA, A., KINZLER, K., VOGELSTEIN, B. & GOGGINS, M. 2012. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142, 730-733 e9.
- KLEEFF, J., BECKHOVE, P., ESPOSITO, I., HERZIG, S., HUBER, P. E., LOHR, J. M. & FRIESS, H. 2007. Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer*, 121, 699-705.
- KOIVISTO, L., BI, J., HAKKINEN, L. & LARJAVA, H. 2018. Integrin α v β 6: Structure, function and role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 99, 186-196.
- KUHLENKAMPFF, J. 2020. Funktionelle Rolle des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C während der Regeneration des Pankreas.
- LEPPANEN, J., LINDHOLM, V., ISOHOOKANA, J., HAAPASAARI, K. M., KARIHTALA, P., LEHENKARI, P. P., SAARNIO, J., KAUPPILA, J. H., KARTTUNEN, T. J., HELMINEN, O. & HUHTA, H. 2019. Tenascin C, Fibronectin, and Tumor-Stroma Ratio in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 48, 43-48.
- MARSTRAND-DAUCE, L., LORENZO, D., CHASSAC, A., NICOLE, P., COUVELARD, A. & HAUMAITRE, C. 2023. Acinar-to-Ductal Metaplasia (ADM): On the Road to Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) and Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*, 24.
- MARZEDA, A. M. & MIDWOOD, K. S. 2018. Internal Affairs: Tenascin-C as a Clinically Relevant, Endogenous Driver of Innate Immunity. *J Histochem Cytochem*, 66, 289-304.
- 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.
- MIHOC, T., PIRVU, C., DOBRESCU, A., BREBU, D., MACOVEI, A. M. O., PANTEA, S., BORZA, C., DUMITRESCU, P. & CARA, M. L. 2025. Comparative Analysis of Laboratory Markers, Severity Scores, and Outcomes in 179 Patients with Severe Acute Pancreatitis. *Biomedicines*, 13.
- MING, Z., VINING, B., BAGHERI-FAM, S. & HARLEY, V. 2022. SOX9 in organogenesis: shared and unique transcriptional functions. *Cell Mol Life Sci*, 79, 522.
- MURTAUGH, L. C. & KEEFE, M. D. 2015. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annu Rev Physiol*, 77, 229-49.
- NICHETTI, F., ROTA, S., AMBROSINI, P., PIRCHER, C., GUSMAROLI, E., DROZ DIT BUSSET, M., PUSCEDDU, S., SPOSITO, C., COPPA, J., MORANO, F., PIETRANTONIO, F., DI BARTOLOMEO, M., MARIANI, L., MAZZAFERRO, V., DE BRAUD, F. & NIGER, M. 2024. NALIRIFOX, FOLFIRINOX, and Gemcitabine With Nab-Paclitaxel as First-Line Chemotherapy for Metastatic Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Netw Open*, 7, e2350756.
- NIU, J. & LI, Z. 2017. The roles of integrin α v β 6 in cancer. *Cancer Lett*, 403, 128-137.
- 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.
- OPITZ, F. V., HAEBERLE, L., DAUM, A. & ESPOSITO, I. 2021. Tumor Microenvironment in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Cancers (Basel)*, 13.
- 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.
- PIN, C. L., RYAN, J. F. & MEHMOOD, R. 2015. Acinar cell reprogramming: a clinically important target in pancreatic disease. *Epigenomics*, 7, 267-81.
- RAU, B., SCHILLING, M. K. & BEGER, H. G. 2004. Laboratory markers of severe acute pancreatitis. *Dig Dis*, 22, 247-57.

- READER, C. S., VALLATH, S., STEELE, C. W., HAIDER, S., BRETNALL, A., DESAI, A., MOORE, K. M., JAMIESON, N. B., CHANG, D., BAILEY, P., SCARPA, A., LAWLOR, R., CHELALA, C., KEYSE, S. M., BIANKIN, A., MORTON, J. P., EVANS, T. J., BARRY, S. T., SANSOM, O. J., KOCHER, H. M. & MARSHALL, J. F. 2019. The integrin alphavbeta6 drives pancreatic cancer through diverse mechanisms and represents an effective target for therapy. *J Pathol*, 249, 332-342.
- REGEL, I., MAYERLE, J. & MAHAJAN, U. M. 2020. Current Strategies and Future Perspectives for Precision Medicine in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 12.
- REMNANT, L., KOCHANOVA, N. Y., REID, C., CISNEROS-SOBERANIS, F. & EARNSHAW, W. C. 2021. The intrinsically disorderly story of Ki-67. *Open Biol*, 11, 210120.
- REN, Y., LIU, W., ZHANG, L., ZHANG, J., BI, J., WANG, T., WANG, M., DU, Z., WANG, Y., ZHANG, L., WU, Z., LV, Y., MENG, L. & WU, R. 2021. Milk fat globule EGF factor 8 restores mitochondrial function via integrin-mediated activation of the FAK-STAT3 signaling pathway in acute pancreatitis. *Clin Transl Med*, 11, e295.
- SALOMAN, J. L., ALBERS, K. M., CRUZ-MONSERRATE, Z., DAVIS, B. M., EDDERKAoui, M., EIBL, G., EPOUHE, A. Y., GEDEON, J. Y., GORELICK, F. S., GRIPPO, P. J., GROBLEWSKI, G. E., HUSAIN, S. Z., LAI, K. K. Y., PANDOL, S. J., UC, A., WEN, L. & WHITCOMB, D. C. 2019. Animal Models: Challenges and Opportunities to Determine Optimal Experimental Models of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 48, 759-779.
- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-22.
- SEYMOUR, P. A. 2014. Sox9: a master regulator of the pancreatic program. *Rev Diabet Stud*, 11, 51-83.
- SEYMOUR, P. A., FREUDE, K. K., TRAN, M. N., MAYES, E. E., JENSEN, J., KIST, R., SCHERER, G. & SANDER, M. 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 1865-70.
- SHIMIZU, K., KOBAYASHI, M., TAHARA, J. & SHIRATORI, K. 2005. Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*, 128, 2105-18.
- SMID, J. K., FAULKES, S. & RUDNICKI, M. A. 2015. Periostin Induces Pancreatic Regeneration. *Endocrinology*, 156, 824-836.
- SOBECKI, M., MROUJ, K., COLINGE, J., GERBE, F., JAY, P., KRASINSKA, L., DULIC, V. & FISHER, D. 2017. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res*, 77, 2722-2734.
- STANTON, K. J., SIDNER, R. A., MILLER, G. A., CUMMINGS, O. W., SCHMIDT, C. M., HOWARD, T. J. & WIEBKE, E. A. 2003. Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *Am J Surg*, 186, 486-92.
- STEIGER, K., SCHLITTER, A. M., WEICHERT, W., ESPOSITO, I., WESTER, H. J. & NOTNI, J. 2017. Perspective of alphavbeta6-Integrin Imaging for Clinical Management of Pancreatic Carcinoma and Its Precursor Lesions. *Mol Imaging*, 16, 1536012117709384.
- STROBEL, O., DOR, Y., ALSINA, J., STIRMAN, A., LAUWERS, G., TRAINOR, A., CASTILLO, C. F., WARSHAW, A. L. & THAYER, S. P. 2007. In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology*, 133, 1999-2009.
- UDALOVA, I. A., RUHMANN, M., THOMSON, S. J. & MIDWOOD, K. S. 2011. Expression and immune function of tenascin-C. *Crit Rev Immunol*, 31, 115-45.
- VON BERNSTORFF, W., VOSS, M., FREICHEL, S., SCHMID, A., VOGEL, I., JOHNK, C., HENNE-BRUNS, D., KREMER, B. & KALTHOFF, H. 2001. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*, 7, 925s-932s.
- WADDELL, N., PAJIC, M., PATCH, A. M., CHANG, D. K., KASSAHN, K. S., BAILEY, P., JOHNS, A. L., MILLER, D., NONES, K., QUEK, K., QUINN, M. C., ROBERTSON, A. J., FADLULLAH, M. Z., BRUXNER, T. J., CHRIST, A. N., HARLIWONG, I., IDRISOGLU, S., MANNING, S., NOURSE, C., NOURBAKHS, E., WANI, S., WILSON, P. J., MARKHAM, E., CLOONAN, N., ANDERSON, M. J., FINK, J. L., HOLMES, O., KAZAKOFF, S. H., LEONARD, C., NEWELL, F., POUDEL, B., SONG, S., TAYLOR, D., WADDELL, N., WOOD, S., XU, Q., WU, J., PINESE, M., COWLEY, M. J., LEE, H. C., JONES, M. D., NAGRIAL, A. M., HUMPHRIS, J., CHANTRILL, L. A., CHIN, V., STEINMANN, A. M., MAWSON, A., HUMPHREY,

- E. S., COLVIN, E. K., CHOU, A., SCARLETT, C. J., PINHO, A. V., GIRY-LATERRIERE, M., ROOMAN, I., SAMRA, J. S., KENCH, J. G., PETTITT, J. A., MERRETT, N. D., TOON, C., EPARI, K., NGUYEN, N. Q., BARBOUR, A., ZEPPS, N., JAMIESON, N. B., GRAHAM, J. S., NICLOU, S. P., BJERKVIG, R., GRUTZMANN, R., AUST, D., HRUBAN, R. H., MAITRA, A., IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., WOLFGANG, C. L., MORGAN, R. A., LAWLOR, R. T., CORBO, V., BASSI, C., FALCONI, M., ZAMBONI, G., TORTORA, G., TEMPERO, M. A., AUSTRALIAN PANCREATIC CANCER GENOME, I., GILL, A. J., ESHLEMAN, J. R., PILARSKY, C., SCARPA, A., MUSGROVE, E. A., PEARSON, J. V., BIANKIN, A. V. & GRIMMOND, S. M. 2015. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518, 495-501.
- 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.
- WANG, L., XIE, D. & WEI, D. 2019. Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia and Pancreatic Cancer. *Methods Mol Biol*, 1882, 299-308.
- WILLEMER, S., ELSASSER, H. P. & ADLER, G. 1992. Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res*, 24 Suppl 1, 29-39.
- 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.
- XU, Y., LI, Z., JIANG, P., WU, G., CHEN, K., ZHANG, X. & LI, X. 2015. The co-expression of MMP-9 and Tenascin-C is significantly associated with the progression and prognosis of pancreatic cancer. *Diagn Pathol*, 10, 211.
- YADAV, D. & LOWENFELS, A. B. 2013. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144, 1252-61.
- YANG, J., XU, R., WANG, C., QIU, J., REN, B. & YOU, L. 2021. Early screening and diagnosis strategies of pancreatic cancer: a comprehensive review. *Cancer Commun (Lond)*, 41, 1257-1274.
- YOSHIDA, T., AKATSUKA, T. & IMANAKA-YOSHIDA, K. 2015. Tenascin-C and integrins in cancer. *Cell Adh Migr*, 9, 96-104.
- ZHENG, L., XUE, J., JAFFEE, E. M. & HABTEZION, A. 2013. Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 144, 1230-40.
- ZHOU, Q. & MELTON, D. A. 2018. Pancreas regeneration. *Nature*, 557, 351-358.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mich auf dem Weg dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Irene Esposito bedanken, dass sie mir diese Arbeit ermöglicht hat und mich über die gesamte Zeit unterstützt und gefördert hat. Mit ihrer fachlichen und wissenschaftlichen Expertise als auch mit ihrer Begeisterung für die Forschung hat sie mich zugleich gefordert wie motiviert. Ich schätze mich sehr glücklich mit Ihnen wissenschaftlich zusammengearbeitet zu haben.

Außerdem würde ich mich gerne bei dem gesamten Kollegium des Instituts für Pathologie der Uniklinik Düsseldorf für die intensive Betreuung, Unterstützung und Hilfe während des gesamten Projektes bedanken.

Zunächst möchte ich mich hier explizit bei Frau Dr. Lena Häberle bedanken, die ich jederzeit kontaktieren konnte und die immer ein offenes Ohr für neue Ideen oder die gemeinsame Diskussion meiner Ergebnisse hatte. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Yavas bedanken, die mich ebenfalls in meinem Projekt unterstützt und bei Fragen jederzeit beraten hat. Ein besonderer Dank gilt zudem Dr. Martin Schlensog und Sandra Biskup für die tatkräftige Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung der Laborarbeiten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen engen Freunden danken, die mich über die Jahre immer unterstützt haben und ohne die ich heute nicht an diesem Punkt stehen würde.