

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Humanbiologie

**Charakterisierung der Funktion des Transkriptionsfaktors RelA/p65 im
Ela-TGF α transgenen Mausmodell der pankreatischen Karzinogenese**

Marina Lesina

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Haller

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid (nur schriftliche
Beurteilung)

Priv.-Doz. Dr. H. Algül (nur mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 26.10.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21.05.2013 angenommen.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden auf nationalen und internationalen Fachkongressen präsentiert.

Vorträge

1. „NF- κ B/RelA abhängige Interaktion zwischen azinären und duktafen Zellen hemmt die pankreatische Onkogenese durch Induktion von Seneszenz“

Lesina M., Wörmann S., Korneeva O., Riemann M., Neuhöfer P., Wimmer M., Diersch S., Henrich A., Einwächter H., Sperveslage J., Demir I.E., Kehl T., Saur D., Sipos B., Weih F., Schneider G., Schmid R.M., Algül H.

Z Gastroenterol 2012; 50 - K129

DOI: 10.1055/s-0032-1324064

(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. 19.-22. September 2012, Hamburg, **Preis für einen herausragenden Kurzvortrag**)

2. „IKK/NF- κ B/Rel Signalweg reguliert Zellzyklusprogression, Apoptose und Tumordifferenzierung in einem *in vivo* Mausmodell des Pankreaskarzinoms“

Lesina Marina, Kolb Gelia, Dlubatz Karen, Schneider Günter, Sipos Bence, Treiber Matthias, Schmid Roland M. and Algül Hana

Z Gastroenterol 2011; 49 - V102

DOI: 10.1055/s-0031-1285238

(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. 14.-17. September 2011, Leipzig)

3. „Validation of the IKK/NF-kappaB/Rel signalling pathway as therapeutic target in a mouse model of pancreatic cancer“

Lesina Marina, Kolb Gelia, Dlubatz Karen, Sipos Bence, Treiber Matthias, Schmid Roland M. and Algül Hana

(European Pancreatic Club the 42nd meeting. Stockholm, 2010 June 17–19)

4. „Entwicklung des Pankreaskarzinoms im murinen Tumormodell nach gewebsspezifischer Deletion von RelA/p65“

Lesina Marina, Algül Hana, Nakhai Hassan, Paxian Stephan, Treiber Matthias, Schmid Roland M.

Z Gastroenterol 2006; 44 - V14

DOI: 10.1055/s-2006-950876

(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. 13.-16. September 2006, Hannover, **Preis für den besten freien Vortrag**)

5. The role of RelA/p65 in two pancreatic cancer models

Lesina Marina, Algül Hana, Nakhai Hassan, Paxian Stephan, Treiber Matthias, Schmid Roland M.

Gastroenterology, Volume 130, Issue 4, Supplement 2, April 2006, Pages A-1-A-747

(Digestive Disease Week 2006. Los Angeles, 2006 May 20-25)

Posterpräsentationen

1. Validierung des IKK/NF- κ B/Rel Signalwegs als therapeutisches Target in einem in vivo Mausmodell des Pankreaskarzinoms

Lesina Marina, Kolb Gelia, Dlubatz Karen, Sipos Bence, Treiber Matthias, Schmid Roland M. and Algül Hana

Z Gastroenterol 2010; 48 - P544

DOI: 10.1055/s-0030-1263984

(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 15.-18. September 2010, Stuttgart)

2. The IKK/NF-kappaB/Rel signalling pathway regulates apoptosis, cell-cycle progression and tumor differentiation in a mouse model of pancreatic cancer

Lesina Marina, Kolb Gelia, Dlubatz Karen, Sipos Bence, Treiber Matthias, Schmid Roland M. and Algül Hana

(EMBO Workshop „Disease, Development and Stem Cells in the Pancreas“. Stockholm, 2010 June 14–16)

3. Role of RelA/p65 in proliferation, apoptosis and transdifferentiation in the mouse model of pancreatic tumor

Lesina Marina, Algül Hana, Paxian Stephan, Treiber Matthias, Dlubatz Karen, and Schmid Roland M.

Gastroenterology, Volume 134, Issue 4, Supplement 1, April 2008, Pages A-387

(Digestive Disease Week 2008. San Diego, 2008 May 17–22, *DDW Poster of distinction*)

4. Verstärkte und frühzeitige Metaplasien in p65 defizienten TGF- α transgenen Mäusen: Eine neue Rolle von p65?

Lesina Marina, Algül Hana, Nakhai Hassan, Paxian Stephan und Schmid Roland M.
Z Gastroenterol 2004; 42 - 3232

(Tagung der Gesellschaft für Gastroenterologie Bayern in Garmisch-Partenkirchen, Oktober 2004)

Eigene Publikationen (Originalartikel-peer reviewed)

1. **Lesina, M.**, Kurkowski, M. U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., Kloppel, G., Yoshimura, A., Reindl, W., Sipos, B., Akira, S., *et al.* (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer cell* *19*, 456-469.
2. Neuhofer, P., Liang, S., Einwachter, H., Schwerdtfeger, C., Wartmann, T., Treiber, M., Zhang, H., Schulz, H. U., Dlubatz, K., **Lesina, M.**, *et al.* (2012). Deletion of IkappaBalpha Activates RelA to Reduce Acute Pancreatitis in Mice through Upregulation of Spi2A. *Gastroenterology*.
3. Treiber, M., Neuhofer, P., Anetsberger, E., Einwachter, H., **Lesina, M.**, Rickmann, M., Liang, S., Kehl, T., Nakhai, H., Schmid, R. M., and Algul, H. (2011). Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis. *Gastroenterology* *141*, 1473-1485, 1485 e1471-1477.
4. Heid, I., Lubeseder-Martellato, C., Sipos, B., Mazur, P. K., **Lesina, M.**, Schmid, R. M., and Siveke, J. T. (2011). Early requirement of Rac1 in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* *141*, 719-730, 730 e711-717.
5. Dahlhoff, M., Algul, H., Siveke, J. T., **Lesina, M.**, Wanke, R., Wartmann, T., Halangk, W., Schmid, R. M., Wolf, E., and Schneider, M. R. (2010). Betacellulin protects from pancreatitis by activating stress-activated protein kinase. *Gastroenterology* *138*, 1585-1594, 1594 e1581-1583.
6. Algül, H., Treiber, M., **Lesina, M.**, Nakhai, H., Saur, D., Geisler, F., Pfeifer, A., Paxian, S., and Schmid, R. M. (2007a). Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1490-1501.
7. Algül, H., Treiber, M., **Lesina, M.**, and Schmid, R. M. (2007b). Mechanisms of disease: chronic inflammation and cancer in the pancreas--a potential role for pancreatic stellate cells? *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology* *4*, 454-462.
8. Algül, H., Wagner, M., **Lesina, M.**, and Schmid, R. M. (2007c). Overexpression of ErbB2 in the exocrine pancreas induces an inflammatory response but not increased proliferation. *International journal of cancer Journal international du cancer* *121*, 1410-1416.

Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom zeichnet sich durch ein aggressives Wachstum mit frühzeitiger Metastasierung, eine schlechte Prognose und eine hohe Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie aus. Für die Entwicklung einer spezifischen Therapie sind genaue Kenntnisse der molekularen Vorgänge in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms nötig. Zahlreiche Studien belegen eine Aktivierung des IKK-abhängigen NF- κ B/Rel Signalweges im Pankreaskarzinom. Wodurch die Aktivierung von NF- κ B zum malignen Phänotyp führt, ist bislang wenig verstanden.

Mit dem Ziel, die Rolle des NF- κ B-Effektorproteins RelA/p65 in der pankreatischen Tumorentwicklung *in vivo* analysieren zu können, wurde als Grundlage ein klassisches *Ela*-TGF α transgenes Mausmodell des Pankreaskarzinoms verwendet. TGF α (*transforming growth factor alpha*) zählt zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren und ist ein Ligand des EGF-Rezeptors, einer transmembranen Tyrosinkinase, die über die intrazelluläre Signaltransduktion proliferative Stimuli vermittelt. Mit Hilfe gentechnologischer Methoden konnte die Untereinheit RelA/p65 in diesem Wachstumsfaktor-induzierten Mausmodell des Pankreaskarzinoms pankreasspezifisch inaktiviert.

Unsere Daten belegen zum ersten Mal die *in vivo* Bedeutung von RelA/p65 in der pankreatischen Onkogenese. Die genetische Inaktivierung des Signalweges beeinflusste Zellzyklusprogression und Apoptose, führte zu einem signifikant verlängerten Überleben der *Ela*-TGF α transgenen Mäuse und zu einer reduzierten Tumorzinzidenz. Zusätzliche pankreasspezifische Inaktivierung des *Trp53*-Gens beschleunigte die Entstehung der Pankreaskarzinome. Auch in diesem Modell führte die pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 zu einem signifikant verlängerten Überleben. Darüber hinaus zeigen unsere Daten, dass die nukleäre Translokation von RelA/p65 mit der Entdifferenzierung von Pankreaskarzinomen positiv korreliert. Diese Erkenntnis liefert ein nützliches Modell, um den Prozess der Entdifferenzierung genauer zu untersuchen. In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen konnte der IKK/NF- κ B/Rel Signalweg als relevanter Signalweg identifiziert und seine Funktion als therapeutisches Target validiert werden.

Abstract

Human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) is characterized by aggressive growth. In addition, PDA is often not detected until the late stages of the disease and prognosis is generally poor. In contrast to many other solid cancer types, the treatment options for patients with PDA are quite limited. This dire clinical situation exists despite the accelerating knowledge regarding the genetics and biology of PDA. An improved understanding of the multistep process that leads to malignancy has revealed regulatory pathways, which drive tumor development. The IKK/NF- κ B has been shown to be activated in pancreatic cancer cell lines and primary pancreatic tumors. Though the mechanisms by which IKK/NF- κ B contributes to the genesis and progression of PDA have not been fully elucidated.

The aim of the present study was to explore the role of specific NF- κ B subunit RelA/p65 during pancreatic carcinogenesis *in vivo*. We used the transgenic murine model overexpressing TGF α under the control of the elastase promoter. RelA/p65 was specifically inactivated in the pancreas of *Ela*-TGF α transgenic mice using Cre/loxP system.

This study reveals for the first time the role of RelA/p65 in the pancreatic carcinogenesis. RelA/p65 deficient *Ela*-TGF α transgenic mice displayed rapid loss of acinar cells and increased desmoplastic reactions. Progressive loss of acinar cells was due to decreased proliferation and increased apoptosis. Functional inactivation of RelA/p65 led to significantly prolonged survival of TGF α transgenic mice and reduced tumor incidence. Additional deletion of *Trp53* in the pancreas greatly accelerated tumorigenesis in RelA/p65 dependent manner. Interestingly, tumor differentiation in *Ela*-TGF α *Trp53* ^{Δ/Δ} model depends on the NF- κ B/Rel pathway.

Our data display the IKK/NF- κ B/Rel pathway as an important player in the development and progression of pancreatic cancer and reveal this pathway as relevant therapeutic target.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
1.1. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas	11
1.1.1. Klinisch-epidemiologische Aspekte	11
1.1.2. Morphologie des Pankreaskarzinoms	12
1.1.3. Molekulargenetik	14
1.2. NF- κ B/Rel Signalweg	16
1.3. Mausmodelle des Pankreaskarzinoms	19
1.3.1. Transgene Mausmodelle	19
1.3.2. Gewebespezifische Genmanipulation	20
1.4. Zielsetzung der Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Verwendete Materialien	24
2.1.1. Chemikalien	24
2.1.2. Enzyme	26
2.1.3. Kits	26
2.1.4. Oligonukleotide	26
2.1.5. Puffer und Lösungen	28
2.1.6. Verbrauchsmaterialien	30
2.1.7. Geräte	30
2.2. Molekularbiologische Methoden	32
2.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe	32
2.2.2. Quantifizierung von DNA	32
2.2.3. Amplifikation von DNA	32
2.2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.3.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	33
2.2.4. Isolierung von RNA aus Mauspankreas	33
2.2.5. Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR)	34
2.2.5.1. cDNA-Synthese für qRT-PCR	35
2.2.5.2. Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen	35
2.2.5.3. Analyse der qRT-PCR-Daten	35
2.3. Proteinbiochemische Methoden	36

Inhaltsverzeichnis

2.3.1. Isolierung von Proteinen	36
2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	36
2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	37
2.3.4. Western Blot	37
2.3.5. Immunhistochemie	38
2.3.5.1. Herstellung von Präparaten	38
2.3.5.1.1. Gefrierschnitte	38
2.3.5.1.2. Paraffinschnitte	38
2.3.5.2. Streptavidin-Biotin-Methode	39
2.3.5.3. Hämalaun-Eosin-Färbung	39
2.3.5.4. Masson-Trichrom-Färbung	40
2.4. Isolierung muriner Azinuszellen	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65	41
3.2. Deletion von RelA/p65 in Pankreas der transgenen <i>Ela-TGFα</i> Mauslinie	43
3.3. Morphologische Analyse von <i>Ela-TGFα rela^{$\Delta\Delta$}</i> Mäusen	45
3.4. Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose in <i>Ela-TGFα</i> transgenen Mäusen mit pankreasspezifischer Deletion von RelA/p65	51
3.5. Azinär-duktales Metaplasie	53
3.6. Einfluss der pankreasspezifischen Inaktivierung von RelA/p65 auf die Überlebensdauer, Tumorinzidenz, und –morphologie der <i>Ela-TGFα</i> transgenen Mäuse	58
3.7. Interaktion von RelA/p65 und p53 in der Entwicklung von Pankreaskarzinomen	60
3.7.1. Deletion von <i>Trp53</i> in der <i>Ela-TGFα rela^{$\Delta\Delta$}</i> Mauslinie	60
3.7.2. Effekt der pankreasspezifischen Inaktivierung von RelA/p65 auf die Überlebensdauer, Tumorinzidenz, und –morphologie der <i>Ela-TGFα</i> transgenen Mäuse mit zusätzlicher Deletion des <i>Trp53</i> -Gens	61
4. Diskussion	64
4.1. Einfluss von RelA/p65 auf die Apoptose im <i>Ela-TGFα</i> Mausmodell	64
4.2. Einfluss von RelA/p65 auf die Proliferation im <i>Ela-TGFα</i> Mausmodell	66
4.3. Rolle von RelA/p65 bei der Pankreasfibrosierung in <i>Ela-TGFα</i> Mäusen	66
4.4. Die Rolle von RelA/p65 in Transdifferenzierungsprozessen im Pankreas der <i>Ela-TGFα</i> Mäuse	68

Inhaltsverzeichnis

4.5. Bedeutung von RelA/p65 für die Karzinogenese im Pankreas der <i>Ela</i> -TGF α Mäuse -----	71
5. Literaturverzeichnis -----	74
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis -----	83
7. Abkürzungsverzeichnis -----	85
8. Danksagung -----	88

1. Einleitung

1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

1.1.1 Klinisch-epidemiologische Aspekte

In Deutschland sind etwa 3% aller Krebserkrankungen Pankreaskarzinome. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird bei Männern auf ca. 7.390, bei Frauen auf ca. 7.570 geschätzt. Pankreaskarzinome sind bei Männern für 6,3 %, bei Frauen für 7,5 % aller Krebstodesfälle verantwortlich und die vierthäufigste Krebstodesursache bei beiden Geschlechtern. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei etwa 70 Jahren, für Frauen bei etwa 76 Jahren und ist damit jeweils höher als bei Karzinomen anderer Organe (http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html).

Risikofaktoren, die seit vielen Jahren diskutiert werden, sind Nikotin- und Alkoholkonsum (Chiu et al., 2001; Falk et al., 1988), sowie die berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen bei Chemikararbeitern (Erbar, 2002). Weiterhin gilt die hereditäre Pankreatitis mit der Mutation im kationischen Trypsinogen (*PRSSI*) und Mutationen im Serinprotease-Inhibitor, Kazal Typ 1 (*SPINK1*) als Risikofaktor (Whitcomb et al., 1996; Witt et al., 2000). Einige genetische Syndrome gehen mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms einher (Tabelle 1). Dazu gehören das Peutz-Jeghers-Syndrom, das FAMMM-Syndrom, das hereditäre Mammakarzinom und das HNPCC-Syndrom (Hezel et al., 2006; Wilentz et al., 2000).

Das duktales Pankreaskarzinom zeichnet sich durch ein aggressives Wachstum mit frühzeitiger Metastasierung (klassischerweise in die Leber, aber auch in die Lunge), eine schlechte Prognose und limitierte Behandlungsmöglichkeiten aus. Eine sichere Früherkennung des Pankreaskarzinoms ist nicht möglich, da es keine spezifische Vorsorgeuntersuchung gibt.

Die momentan einzige Möglichkeit zur Heilung eines Pankreaskarzinoms besteht in der vollständigen Resektion des Tumors, die allerdings nur bei fünf bis fünfzehn Prozent der Patienten möglich ist (Erbar, 2002). Zusätzlich werden adjuvant Chemotherapeutika, sowie weitere palliative Therapieansätze zur Schmerzbekämpfung und Wiederherstellung der Verdauungspassage angeboten, um die Lebensqualität und Überlebensraten der Patienten zu verbessern (Glimelius et al., 1996). Eine spezifische Chemotherapie, die der Biologie des

Einleitung

Tumors entspricht, existiert gegenwärtig nicht. Dies würde genaue Kenntnisse der molekularen Vorgänge in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms erfordern.

Tabelle 1: Hereditäre Tumorprädispositionssyndrome mit erhöhtem Risiko für Pankreaskarzinom

Tumorprädispositionssyndrom	Gen	Funktion des Gens
Hereditäre Pankreatitis	<i>PRSS 1</i>	Kodiert für das kationische Trypsinogen, auch als Serinprotease 1 (PRSS1) bezeichnet, das zu den meistsynthetisierten sekretorischen Proteinen des Pankreas gehört und zur autolytischen Inaktivierung von Trypsin führt.
Peutz-Jeghers-Syndrom	<i>STK 11</i>	Kodiert für eine Serin/Threonin Kinase, die an der Regulation von Zellteilungs-, Differenzierungs- oder Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist.
FAMMM- und Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom	CDKN2A	Dieser Genlocus enthält die Information für zwei Tumorsuppressorgene p16 ^{INK4A} und p14 ^{ARF} (murines p19 ^{Arf}).
Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom	BRCA 2	Tumorsuppressor-Gen, dessen Produkt sich an der Stabilisierung des Genoms beteiligt.
HNPCC-Kolonkarzinom ohne Polyposis	MMR	Durch die Genprodukte der Mismatch-Reparaturgenen (MMR-Genen) werden in einer normalen Körperzelle Fehler korrigiert, die während der im Rahmen der Zellteilung ablaufenden DNA-Replikation auftreten.

1.1.2 Morphologie des Pankreaskarzinoms

Etwa 75% der Pankreaskarzinome entwickeln sich aus Pankreasgangzellen und werden als duktales Adenokarzinom bezeichnet. Von diesen dukталen Adenokarzinomen befinden sich 70% im Pankreaskopf, 20% im Korpus und 5 - 10% in der Cauda. Die meisten dukталen Pankreaskarzinome sind mäßig bis hoch differenziert und führen zu einer deutlichen desmoplastischen Stromareaktion. Die neoplastischen Drüsen sind verformt, unregelmäßig im Stroma angeordnet, zeigen zelluläre Atypien, Verlust der Zellpolarität sowie Veränderungen des Zellkerns. Ähnlich der Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms wurde auch für das duktales Pankreaskarzinom ein Progressionsmodell definiert und im Jahr 2000 ein allgemeines Nomenklatorsystem für Vorläuferläsionen des invasiven Pankreaskarzinoms, so genannten intraepithelialen Neoplasien des Pankreas (*PanIN*) eingeführt (Hruban et al., 2000; Wilentz et al., 2000).

Einleitung

Dabei unterscheidet man morphologisch drei Differenzierungsgrade von der „*low grade pancreatic duct lesion*“ (hyperplastische flache *PanIN-1A*, hyperplastische papilläre *PanIN-1B*) über die „*high grade pancreatic duct lesion*“ (dysplastische *PanIN-2*) bis zum intraepithelialen Tumor, der die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat, d.h. einem „*carcinoma in situ*“ (*PanIN-3*) (Abbildung 1). Hinsichtlich der Lokalisation der Läsionen innerhalb des Pankreas treten *PanIN-1A*-Läsionen gleichmäßig über das Organ verteilt auf. Die *PanIN-1B*, *PanIN-2* und *PanIN-3* Läsionen wurden dagegen häufiger im Pankreaskopfbereich als im Pankreaskörper oder Pankreasschwanz nachgewiesen (Takaori et al., 2004).

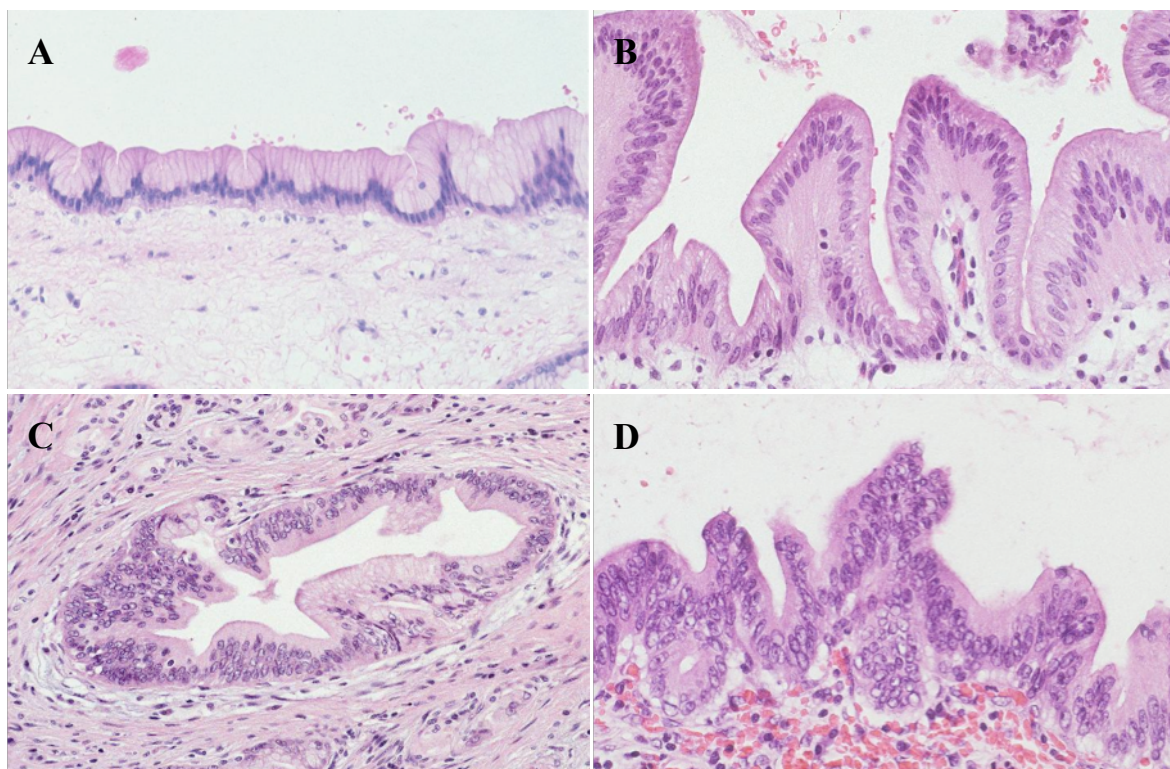


Abbildung 1: Intraepitheliale Neoplasien des Pankreas (*PanIN*) (nach JONHS HOPKINS Pancreas Cancer Web, http://pathology.jhu.edu/pancreas_panin/)

(A) *PanIN 1A* ist flache Epithelläsion aus Zylinderepithel mit basal gelegenen Zellkern und reichlich supranukleär gelegenen Muzin.

(B) *PanIN-1B* hat identische Architektur wie *PanIN 1A* Läsion, jedoch mit papillärem oder milropapillärem Wachstumsmuster.

(C) *PanIN-2* ist Epithelläsion, deren Kerne leichtgradige Atypien wie Kerngrößenschwankungen, Verlust der Polarität und Hyperchromasie aufweisen.

(D) *PanIN-3* ist durch die schweren Zellatypien (Verlust der Zellpolarität, atypische oder gehäufte Mitosen) charakterisiert. Für diese Läsion sind die Bildung von kleinen Epithelzellnestern im Lumen und luminale Nekrose typisch.

1.1.3 Molekulargenetik

Das bereits genannte Progressionsmodell, welches die Entstehung des invasiven Pankreaskarzinoms aus prämaligen Vorstufen postuliert, wird durch molekulargenetische Untersuchungen unterstützt. Die histopathologische Progression der Pankreasganglänionen ist mit einer zunehmenden Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorproteinen assoziiert (Abbildung 2).

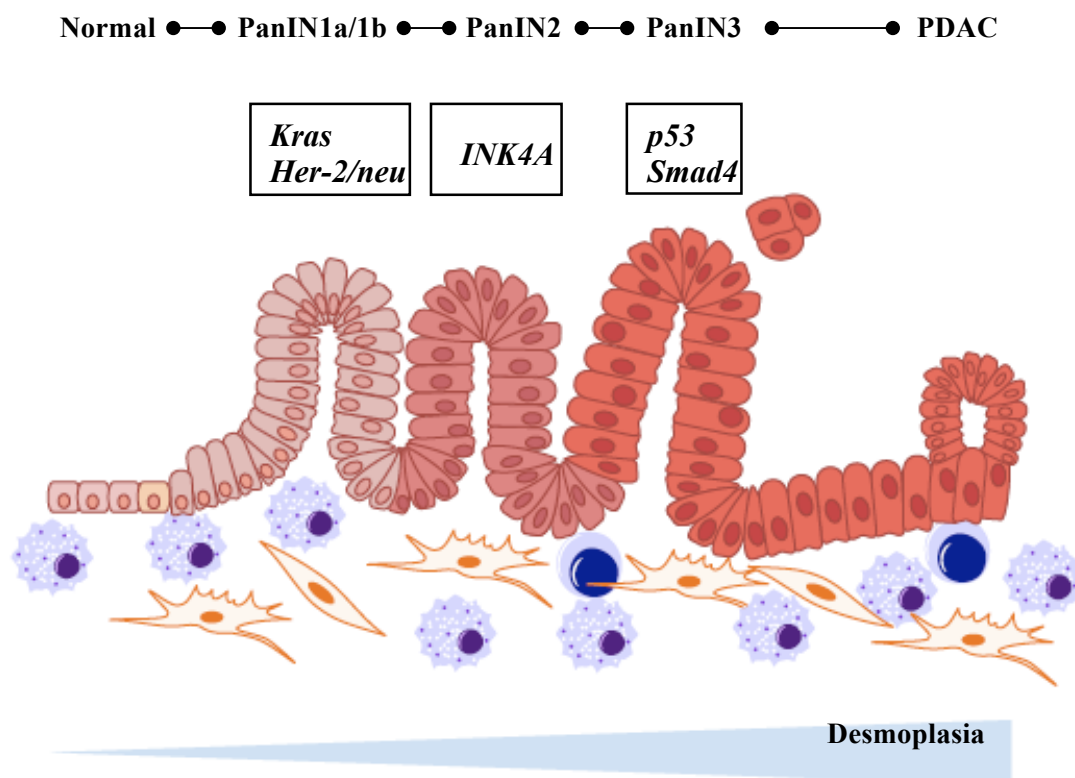


Abbildung 2: Genetische Alterationen im Verlauf der Pankreastumorgnese (Morris et al., 2010)



Die häufigsten molekulargenetischen Veränderungen sind neben der Verkürzung von Telomeren, Mutationen in *Kras* Gen, Verlust von *INK4A* (frühe Ereignisse) sowie Verlust der Funktion von *TP53*, *Smad4* und *BRCA2* (späte Veränderungen) (Almoguera et al., 1988; Caldas et al., 1994; Hahn et al., 1996; Heinmoller et al., 2000; Hruban et al., 2000; Hustinx et

Einleitung

al., 2005; Maitra et al., 2003; Moskaluk et al., 1997; Pellegata et al., 1994; Rozenblum et al., 1997).

Es wird heutzutage angenommen, dass bis zu 90% der Pankreaskarzinome über ein mutiertes *Kras* Onkogen verfügen (Schneider and Schmid, 2003). *Kras* gehört zur Familie der kleinen G-Proteinen und reguliert Zellproliferation und Zelldifferenzierung. *Kras* hat eine GTPase Aktivität und wird über ein regulatorisches Protein ras-GAP (*GTPase activating protein*) stimuliert. GEF (*Guanine nucleotide exchange factors*) katalysieren den Austausch von GDP gegen GTP. Verantwortlich für die Aktivierung des *Kras* Protoonkogens zum Onkogen sind Punktmutationen. Die häufigsten Mutationen finden in Kodon 12 statt und bewirken einen Austausch von Glycin gegen Valin (G12V) oder Glycin gegen Asparaginsäure (G12D) (Bos, 1989). Diese aktivierenden Mutationen führen zu einem Verlust der intrinsischen katalytischen Eigenschaft von *Kras*, was zur Folge hat, dass das Protein konstitutiv aktiv bleibt und sich durch die vorgeschalteten Kontrollproteine nicht mehr regulieren lässt. Da bereits in frühen *PanIN*-Läsionen Mutationen des *Kras* Gens nachweisbar sind, geht man davon aus, dass *Kras* an der Initiation der Tumorentwicklung maßgeblich beteiligt ist.

Ein weiterer, in 80-95% der Fälle von duktalem Pankreaskarzinomen mutierter Genlokus ist der *INK4A/ARF* Lokus auf dem Chromosom 9p21 (auf dem Chromosom 4 bei der Maus). Dieser Genlokus enthält die Information für zwei Tumorsuppressorgene $p16^{INK4A}$ und $p14^{ARF}$ (murines $p19^{Arf}$). Ink4a verhindert die Assoziation von CDK4/6 mit Cyclin D1 und führt so über die Regulation der RB-Aktivität zum G₁-Arrest (Abbildung 3). Die Inaktivierung des *INK4A*-Gens kann als Folge von Deletionen, Mutationen und Promotorhypermethylierung entstehen. Die Tatsache, dass Keimbahnmutationen in Exon1 α des *INK4A*-Gens mit dem FAMMM-Syndrom assoziiert sind, ist ein Hinweis auf eine Beteiligung von *INK4A* an der Pathogenese des duktalem Pankreaskarzinoms. Patienten mit diesem Syndrom haben ein 13-fach erhöhtes Risiko, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Hezel et al., 2006).

Die Tumorprogression wird nicht nur von den Tumorzellen verursacht, sondern auch vom *Tumormicroenvironment* (Lesina et al., 2011). Dieses *Tumormicroenvironment* besteht aus verschiedenen nicht malignen Zellen (Fibroblasten, fibroblast-ähnlichen Stromazellen und Immunzellen), extrazellulärer Matrix und löslichen Molekülen (Abbildung 2). Das *Tumormicroenvironment* unterstützt das Überleben von Krebszellen und induziert die Bildung des Tumors. Dysregulation der Signalkaskaden in Krebszellen führt zur Freisetzung von Faktoren, die das *Tumormicroenvironment* aktiv modulieren.

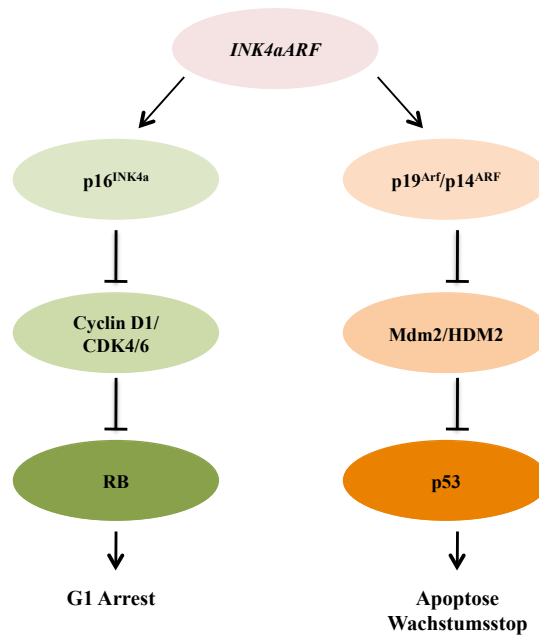


Abbildung 3: Zellzyklus- und Apoptoseregulation durch *INK4a/ARF* Locus (Schneider and Schmid, 2003)

Durch das bessere Verständnis der die maligne Transformation regulierenden molekulargenetischen Mechanismen können wichtige Signalwege identifiziert werden, die eine Rolle in der Tumorentwicklung und -progression spielen. Ein Beispiel dafür stellt der NF- κ B Signalweg dar.

1.2 NF- κ B/Rel Signalweg

In primären Pankreaskarzinomen und in Pankreaskarzinomzelllinien wird, im Gegensatz zum normalen Pankreas, eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B Signalweges detektiert (Liptay et al., 2003). Die Bedeutung dieser Aktivierung besteht in der Vermittlung proliferativer und antiapoptotischer Mechanismen (Orlowski and Baldwin, 2002).

NF- κ B/Rel umfasst eine Familie von Transkriptionsfaktoren, der fünf verschiedene Mitglieder angehören, deren gemeinsames Kennzeichen eine 300 Aminosäuren umfassende hochkonservierte Domäne ist, die so genannte *Rel-Homologie-Domäne* (RHD) (Karin, 2006; Luo et al., 2005). Diese vermittelt die DNA-Bindung, Dimerisierung der NF- κ B/Rel-Proteine, die nukleäre Translokation und Interaktion mit inhibitorischen I κ B-Proteinen.

Aus den Genen für NF- κ B1 und NF- κ B2 können jeweils zwei Vorläuferproteine synthetisiert werden, die sich in ihrer Länge unterscheiden und entsprechend ihrer Molekülmasse (p105, p100) benannt werden. Diese Vorläuferproteine werden nach der Stimulation durch eine

Einleitung

übergeordnete I κ B Kinase (IKK) zu DNA-bindenden Untereinheiten p50 und p52 prozessiert (Abbildung 4).

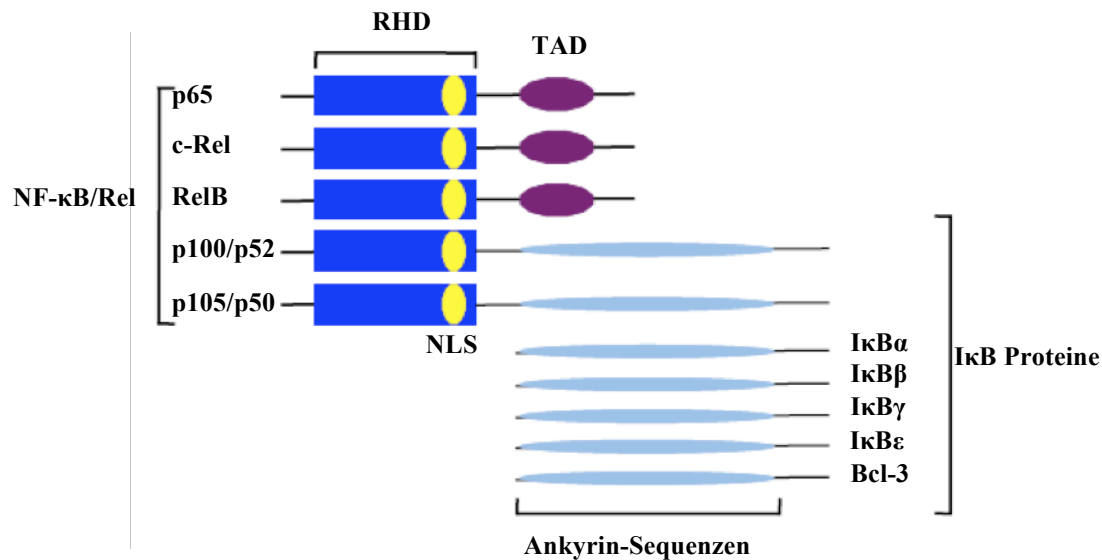


Abbildung 4: NF- κ B und I κ B Proteine

RelA/p65, RelB und c-Rel werden als Rel-Proteine bezeichnet und enthalten im Gegensatz zu p50 und p52 neben der Rel-Homologie-Domäne auch eine Transaktivierungsdomäne im C-Terminus (Heinmoller et al., 2000). NF- κ B/Rel-Proteine können in unterschiedlichen Kombinationen aneinander binden und auf diese Weise Homo- und Heterodimere bilden, die an einen DNA-Abschnitt in der Promotorregion ihrer Zielgene, dem so genannten κ B-Motiv, binden. Heterodimere aus einem Nicht-Rel-Protein (NF- κ B1 oder NF- κ B2) und einem Rel-Protein (RelA/p65, RelB oder c-Rel) wirken aktivierend, während Homodimere ohne Beteiligung von Rel-Proteinen eine hemmende Funktion ausüben.

In unstimulierten Zellen wird NF- κ B durch Assoziation mit den I κ B-Proteinen im Zytoplasma in seiner inaktiven Form gehalten. Diese Interaktion führt dazu, dass das für die nukleäre Translokation notwendige *nuclear localization site* (NLS)-Signal durch I κ Bs maskiert wird. Auf diese Weise wird eine unkontrollierte nukleäre Translokation von Heterodimeren verhindert. Die Mitglieder der I κ B-Proteinfamilie enthalten im C-Terminus die so genannten Ankyrin-Repeat-Sequenzen, die mit der RHD der NF- κ B-Proteine interagieren. NF- κ B kann durch eine Vielzahl extra- und intrazellulärer Stimuli aktiviert werden. Die NF- κ B-aktivierenden Stimuli führen zur Phosphorylierung, Polyubiquitinierung und proteasomalem Abbau der I κ B-Proteine, wodurch die NF- κ B-Dimere freigesetzt werden und in den Kern translozieren. Die nukleäre Translokation von NF- κ B kann über den

Einleitung

Signalweg erfolgen, der durch den IKK-Komplex vermittelt wird (Abbildung 5). Der gesamte Komplex besteht aus drei Untereinheiten: IKK α , IKK β und IKK γ (NEMO). Dieser klassische Weg der NF- κ B-Aktivierung wird hauptsächlich durch proinflammatorische Stimuli oder genotoxischen Stress ausgelöst. Es kommt zur Aktivierung von I κ B α . Die I κ B-Proteine werden polyubiquitiniert und anschließend durch das 26S Proteasom abgebaut. Das dabei freigesetzte Heterodimer, meist bestehend aus RelA/p65 und NF- κ B1/p50, kann über die unmaskierte NLS in den Zellkern translozieren, wo es die Transkription seiner Zielgene reguliert. Dazu gehört auch I κ B α , welches nach einer Neusynthese in den Kern wandert, NF- κ B von der DNA ablöst und zurück ins Zytoplasma transportiert. Durch diese negative Rückkopplung reguliert NF- κ B seine eigene Aktivität (Hoffmann et al., 2006).

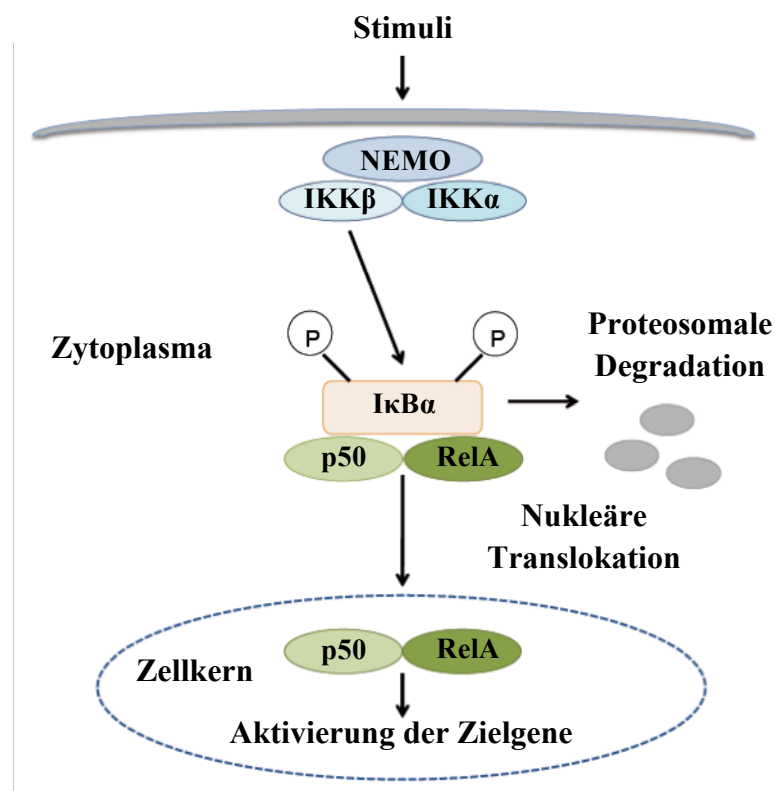


Abbildung 5: Der klassische NF- κ B/Rel Signalweg

Zu den Zielgenen des Heterodimers RelA/p65 und NF- κ B1/p50 gehören solche, die in Immunantworten, Stress- und entzündliche Reaktionen involviert sind (Luo et al., 2005). So kommt den proinflammatorisch regulierten Genen eine besondere Rolle bei der Immunantwort zu. Ein wesentlicher Faktor bei der Immunantwort ist die Signalübertragung durch Botenstoffe wie Zytokine oder Chemokine, welche durch NF- κ B induziert werden

Einleitung

(Abbildung 5). Des Weiteren spielt NF- κ B bei der Regulation der Apoptose eine wesentliche Rolle. Obwohl der Transkriptionsfaktor sowohl pro- als auch antiapoptotische Prozesse reguliert, kommt es in den meisten Zellen zur Hemmung der Apoptose. Die Mitglieder des NF- κ B-Signalweges können Proliferation der Zellen durch die Regulation der Transkription von Cyclin D1, Cyclin E, CDK2 und c-Myc steuern (Kim et al., 2006). Darüber hinaus scheint NF- κ B/Rel für die Ras-vermittelte Transformation in verschiedenen Zelllinien unabdingbar zu sein (Arsura et al., 2000). Dies legt daher die zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors in der Entwicklung von Tumoren nahe.

1.3 Mausmodelle des Pankreaskarzinoms

Für ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen von genetisch bedingten Erkrankungen beim Menschen werden immer häufiger Tiermodelle eingesetzt, mit deren Hilfe neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten entwickelt werden können. Das Pankreaskarzinom gehört zu den Tumorarten, für die in den letzten Jahren eine Reihe von Mausmodellen etabliert wurde, die den humanen Tumor sowohl auf der genetischen als auch auf der morphologischen Ebene widerspiegeln.

1.3.1 Transgene Mausmodelle

Mit Hilfe von transgenen Techniken ist es möglich, fremde DNA in einen Organismus einzubringen. So kann beispielsweise über die Infektion einer embryonalen Stammzelle mit einem Retrovirus, das ein bestimmtes humanes Onkogen trägt, eine Maus generiert werden, die das entsprechende Genprodukt überexprimiert, um dadurch die Auswirkungen dieses Onkogens auf den Organismus untersuchen zu können. Für eine bessere örtliche und zeitliche Kontrolle der Genexpression wird auch hier in konditionalen Modellen das Transgen an einen gewebespezifischen Promoter gekoppelt.

Ein klassisches transgenes Mausmodell ist die transgene TGF α Maus (Sandgren et al., 1990). TGF α (*transforming growth factor alpha*) zählt zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren und ist ein Ligand des EGF-Rezeptors, einer transmembranen Tyrosinkinase, die über die intrazelluläre Signaltransduktion proliferative Stimuli vermittelt, unter anderem auch in Pankreaszellen (Ohlsson et al., 1997). Eric Sandgren und Kollegen (1990) inserierten die cDNA-Sequenz des TGF α Gens der Ratte zwischen ein Elastase-Promoter-Fragment der Ratte und der Sequenz des humanen Wachstumshormons (hGH).

Einleitung

Dieses *Ela-TGF α -hGH*-Konstrukt führte nach Injektion in befruchtete Eizellen einer Maus zur gewebespezifischen Expression von *Tgfa* in Azinuszellen des Pankreas unter der Kontrolle des Elastase-Promoters (Ornitz et al., 1985). Dieses Modell zeigt eine massive Fibrosierung des Pankreas und eine azinär-duktales Metaplasie (Sandgren et al., 1990). Nach 180 Tagen zeigt sich histologisch das Bild von tubulären Komplexen, neben Arealen mit normalen Azini und Arealen, die frühe Zeichen der Metaplasie beinhalten. TGF α transgene Mäuse entwickeln Pankreaskarzinome mit einer Latenz von über einem Jahr (Wagner et al., 1998). Zusätzliche hetero- oder homozygote Deletion des *Trp53*-Gens führt zu einer akzelerierten Entwicklung von Karzinomen (Abbildung 6) (Greten et al., 2001; Wagner et al., 2001). Dieses Modell rekapituliert wesentliche Mechanismen der Tumorentstehung beim Menschen. Ein Nachteil dieses Modells besteht darin, dass es nicht die typischen, beim Pankreaskarzinom des Menschen identifizierten Vorläuferläsionen entwickelt. Da das *Trp53* Gen (*Transformation related protein 53*) in allen Zellen des Organismus ausgeschaltet wurde, zeigt dieses Modell nicht nur Pankreaskarzinome, sondern auch Lymphome und Weichteiltumore (Sarkome).

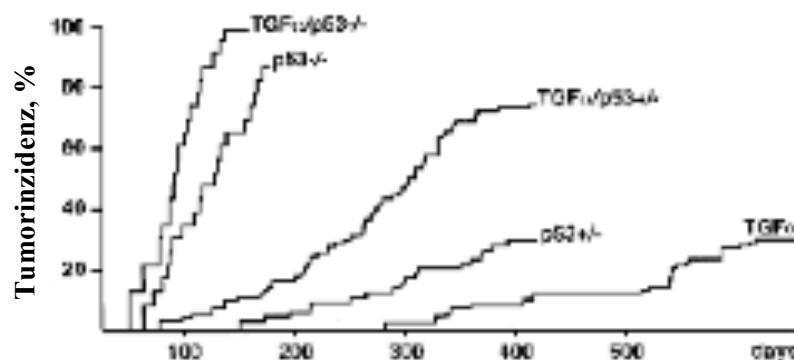


Abbildung 6: Tumorinzidenz der TGF α transgenen Mäuse ohne/mit der hetero- bzw. homozygoten Deletion von *Trp53* (Wagner et al., 2001)

1.3.2 Gewebespezifische Genmanipulation

Mit der Entwicklung der so genannten *knock-out*- und *knock-in*-Technologie wurde ein wesentlicher Fortschritt in der Mausgenetik erzielt. Mit deren Hilfe können Gene des Mausgenoms gezielt ein- und ausgeschaltet werden.

Limitierend bei konventionellen Nullmutanten ist allerdings, dass sie häufig durch den kompletten Verlust der Genfunktion in allen Zellen des Organismus embryonal letal sind oder schwierig interpretierbare Phänotypen verursachen. Um diesem Problem zu entgehen, werden Rekombinationssysteme angewendet, die zahlreiche Möglichkeiten zur Generierung

Einleitung

konditionaler (gewebespezifischer) Gendelektionen bieten. Die Rekombination ist ein durch spezialisierte Enzyme (Rekombinasen) katalysierter Prozess, der eine Spaltung und Neuverknüpfung von DNA beinhaltet. Ein häufig verwendetes Rekombinationssystem leitet sich von der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 ab. Cre katalysiert die Rekombination zwischen zwei *loxP*-Erkennungsequenzen (Sauer and Henderson, 1988). Die *loxP*-Sequenz besteht aus zwei palindromischen Sequenzen mit einer Länge von 13 Basenpaaren, welche ein zentrales nichtsymmetrisches Element aus 8 Basenpaaren (das die Orientierung bestimmt) flankieren. Befinden sich zwei *loxP*-Stellen in gleicher Orientierung, so wird das dazwischen liegende DNA-Segment (ein *gefloxtes* DNA-Segment) durch die Cre-Rekombinase aus dem Chromosom herausgeschnitten und in der Zelle abgebaut (Exzision) (Hoess and Abremski, 1985).

Um Mäuse mit *Cre/loxP*-vermittelten gewebespezifischen Gendelektion zu generieren, werden zwei Mauslinien benötigt. Die *gefloxt* Mauslinie besitzt den *loxP*-flankierten Genabschnitt, während die *Cre*-Mauslinie Cre-Rekombinase selektiv nur in bestimmten Zellen exprimiert. Bei der *gefloxten* Maus wird ein wichtiges Exon (Exons) des Zielgens mit zwei gleichgerichteten *loxP*-Sequenzen so flankiert, dass die *gefloxt* Version des Gens funktionsfähig bleibt und die *gefloxt* Maus bezüglich des Phänotyps von der Wildtypmaus nicht zu unterscheiden sein sollte. Zur Herstellung einer *Cre*-Mauslinie wird ein *Cre* Gen unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors ins Mausgenom integriert. Durch Kreuzen dieser zwei Mauslinien kann eine konditionale Mutation des Zielgens erzeugt werden (Abbildung 7).

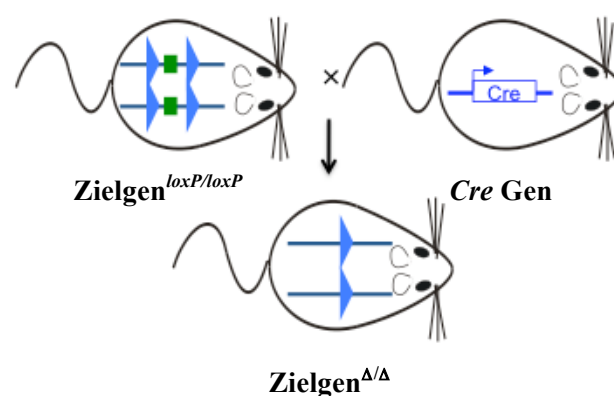


Abbildung 7: Gewebespezifische Inaktivierung eines Zielgens

Die *gefloxt* Maus, bei der ein Exon (grünes Viereck) des Zielgens mit zwei gleichgerichteten *loxP*-Stellen (blauer Pfeil) flankiert ist, wird mit einer *Cre*-Maus, die Cre-Rekombinase in bestimmten Zellarten exprimiert, verpaart. Dies führt zur konditionalen Geninaktivierung.

Ein Vorteil der konditionalen Geninaktivierung ist die Möglichkeit, embryonale Letalität zu vermeiden und die Phänotypen eindeutiger als bei konventionellen Nullmutanten zu

Einleitung

interpretieren. Ein Nachteil dieses Systems ist allerdings, dass die Cre-Rekombinase nicht in allen Zellen des Zielgewebes exprimiert ist, sondern ein Mosaik aus *knock-out* Zellen entsteht. Cre-Rekombinase kann auch in anderen Zellarten exprimiert werden. Deshalb ist es wichtig, die Effizienz und die tatsächliche Gewebespezifität des Gen-*knock-outs* zu überprüfen. Als Kontrolle dafür dienen Reporter-Mäuse, die beispielsweise nach Cre-vermittelter Deletion einer *gefloxten* Stop-Kassette β -Galactosidase exprimieren. Die β -Galactosidase-exprimierenden Zellen lassen sich mit Hilfe der so genannten LacZ-Färbung blau anfärben (Soriano, 1999). Darüber hinaus sollte die Expression des Zielgens auf zellulärer Ebene untersucht werden. Als klassisches Beispiel einer konditionellen Geninaktivierung in der Onkologie gilt das *Trp53 knock-out* Mausmodell. Das Gen *TP53* (**T**umor **p**rotein 53) ist ein Tumorsuppressorgen und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17p13.1 (*Trp53*, auf dem Chromosom 11.B2-C bei der Maus). Es besteht aus 11 Exons und codiert das aus 393 Aminosäuren zusammengesetzte Protein p53, das als universeller Transkriptionsfaktor an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist und eine Vielzahl von Genen reguliert. Mutationen im Gen *TP53* wurden in ca. 50% aller humanen Tumore gefunden und gehören somit zu den häufigsten Veränderungen in Tumoren überhaupt (Soussi et al., 2006). Da die *Trp53*-null-Mutanten nicht-epitheliale Tumore entwickeln, hat die Arbeitsgruppe von Anton Berns eine konditionale *Trp53 knock-out* Maus generiert, bei der die Exons 2-10 des *Trp53* Gens mit den *loxP*-Stellen flankiert sind (Jonkers et al., 2001). Die homozygot *gefloxte Trp53* Maus unterscheidet sich von der Wildtypmaus nicht. Durch Einkreuzen verschiedener gewebespezifischen *Cre*-Mauslinien können vielfältige konditionale *Trp53 knock-out* Mäuse erzeugt werden.

Das andere Beispiel einer auf dem *Cre-loxP*-System basierenden Genmanipulation ist die pankreasspezifische Aktivierung von onkogenem *Kras*, einer Mutation, die man bereits in frühen Vorläuferläsionen beim Menschen beobachtet hat (Hingorani et al., 2003). Die onkogene G12D Mutation wurde in das erste Exon eines *Kras* Allels mittels homologer Rekombination eingeführt. Eine Stop-Kassette, die von *loxP*-Sequenzen flankiert wird, ermöglicht die pankreasspezifische Expression des onkogenen *Kras* Gens. Durch Kreuzen dieser Mäuse mit einer *knock-in* Mauslinie, die Cre-Rekombinase unter dem *Ptf1a/p48* Promoter spezifisch in pankreatischen Vorläuferzellen und in exokrinen Pankreaszellen exprimiert, wird die Stopp-Kassette im Pankreas deletiert und das onkogene *Kras* aktiviert (Hingorani et al., 2003). Diese *Kras*^{G12D} Mäuse entwickeln charakteristische Vorläuferläsionen, die den dukталen *PanINs* beim Menschen histopathologisch ähneln und eine morphologische Progression zeigen, so dass niedriggradige *PanINs* im Frühstadium und

Einleitung

höhergradigen Läsionen (*PanIN-3*) im fortgeschrittenen Stadium beobachtet werden können.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In vorliegender Arbeit soll in der *Ela-TGF α* transgenen Mauslinie mit Hilfe des *Cre-loxP*-Systems die Bedeutung des NF- κ B/Rel Signalweges für die Entstehung bzw. Progression des Pankreaskarzinoms durch die pankreasspezifische Inaktivierung der funktionellen Untereinheit RelA/p65 analysiert werden.

Außerdem soll die Funktion von RelA/p65 im Kontext einer Inaktivierung von *Trp53* untersucht werden und der Einfluss auf die Karzinomentstehung evaluiert werden. Damit soll die Bedeutung einer möglichen therapeutischen Intervention im IKK-Signalweg für das Pankreaskarzinom *in vivo* validiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
APS	Sigma, Steinheim
Bio-RAD Protein Assay	Bio-Rad, München
β -Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
BSA	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma, Steinheim
Dexamethason	Sigma, Steinheim
DMSO	Sigma, Steinheim
DNA-Größenstandard (1kb-Leiter)	Peqlab, Erlangen
Deoxynucleotide Mix	Sigma, Steinheim
DTT	Sigma, Steinheim
EDTA	Sigma, Steinheim
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100%, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Ethanol, abs.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma, Steinheim
FCS	Biochrom KG, Berlin
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES, 1M	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Glycine	Fluka, Buchs, Schweiz
Isofluran „Forene“	Abbott GmbH, Wiesbaden
Ladepuffer (6x)	Peqlab, Erlangen
Magnesiumchlorid	Sigma, Steinheim
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
MEM Amino-acids	Invitrogen, Karlsruhe
MEM Non-essential amino-acids	Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP-40)	Roche, Mannheim
PFA	Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco (Phosphat-gepufferte Elektrolytlösung)	Biochrom KG, Berlin
Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (5000U/ml Penicillin und 5000µg/ml Streptomycin)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Coctail I	Sigma, Steinheim
Phosphatase Inhibitor Coctail II	Sigma, Steinheim
PMSF	Sigma, Steinheim
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Protease Inhibitor Coctail	Sigma, Steinheim
Rat tail collagen type 1	BD
RED Taq Ready Mix	Sigma, Steinheim
Recom. TGF α	R&D
Rotiphorese [®] Gel 30 (30% Acrylamid mit 0,8%Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS Ultra pure	Roth, Karlsruhe
Soybean TI	Sigma, Steinheim
SYTOX Green	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Fluka, Buchs, Schweiz
Trichrom-Stain (Masson)	Sigma, Steinheim
TRIS-hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Trisodium citrate	Sigma, Steinheim
Triton X-100	Sigma, Steinheim
TRIZMA Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma, Steinheim
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin Inhibitor	Roche, Mannheim
Tween [®] 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma, Steinheim
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck, Darmstadt
Waymouth`s Medium	Gibco,UK

Material und Methoden

Vectashild
Vector Laboratories,
Burlingame, CA, USA

Xylol
Merck, Darmstadt

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), und Sigma (Steinheim) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Collagenase P
Roche, Mannheim

Proteinase K
Roche, Mannheim

SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200U/μl)
Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Kits

ABC ELITE
Vector Laboratories,
Burlingame, CA, USA

Amersham ECL™ Western Blotting Detektion Reagents
GE Healthcare,
Buckinghamshire

Blocking Kit (Avidin-Biotin)
Vector Laboratories,
Burlingame, CA, USA

Peroxidase Substrate Kit DAB
Vector Laboratories,
Burlingame, CA, USA

RNeasy® Mini Kit
Qiagen, Hilden

SYBR Green PCR Master Mix 2x
Applied Biosystems, USA

2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Zur Lagerung wurde eine 100 pM wässrige Lösung bei -20°C aufbewahrt, aus der die jeweilige Arbeitskonzentration von 10 pM hergestellt wurde.

PCR-Primer:

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

Material und Methoden

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

p53-loxP-1 sense: 5'-CAC AAA AAC AGG TTA AAC CCA G-3'

p53-loxP-2 antisense: 5'-AGC ACA TAG GAG GCA GAG AC-3'

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

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

hGHI-1 sense: 5'-GGC TTT TTG ACA ACG CTA TG-3'

hGHI-2 antisense: 5'-TAG GAG GTC ATA GAC GTT GC-3'

qRT-PCR-Primer:

α -Amylase sense: 5'-TGG TCA ATG GTC AGC CTT TTT C-3'

α -Amylase antisense: 5'-CAC AGT ATG TGC CAG CAG GAA G-3'

α -SMA sense: 5'-CGC TGC TCC AGC TAT GTG TGA A-3'

α -SMA antisense: 5'-CCC TGG GAG CAT CAT CAC C-3'

CK-19 sense: 5'-ACC CTC CCG AGA TTA CAA CCA-3'

CK-19 antisense: 5'-GGC GAG CAT TGT CAA TCT GT-3'

Collagen I sense: 5'-GCC AAG AAG ACA TCC CTG AA-3'

Collagen I antisense: 5'-GCC ATT GTG GCA GAT ACA GA -3'

Collagen III sense: 5'-TAC ACC TGC TCC TGT GCT TC -3'

Collagen III antisense: 5'-GAG ACC TGG TTG TCC TGG AA -3'

Cyclophilin sense: 5'-ATG GTC AAC CCC ACC GTG T-3'

Cyclophilin antisense: 5'-TTCTGCTGTCTTTGGAACCTTTGTC-3'

Fibronectin sense: 5'-TAC ACC TGC TCC TGT GCT TC -3'

Fibronectin antisense: 5'-GAG ACC TGG TTG TCC TGG AA -3'

Gli1 sense: 5'-TGG ACT CTC TTG ACC TGG ACA AC-3'

Gli1 antisense: 5'-GGC CCT GGG CCT CAT C-3'

Gli3 sense: 5'-CCA GCC GAA AAC GTA CAC TGT-3'

Gli3 antisense: 5'-GGG ATG TTC TTA TCA TGG TCT GAA-3'

Ptch1 sense: 5'-TTG TGG AAG CCA CAG AAA ACC-3'

Ptch1 antisense: 5'-TGT CTG GAG TCC GGA TGG A-3'

Shh sense: 5'-GTG TAC TAC GAG TCC AAG GCA C-3'

Shh antisense: 5'-AGG AAG TCG CTG TAG AGC AGC-3'

Material und Methoden

2.1.5 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer, pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM KH ₂ PO ₄
PBST-Puffer	PBS-Puffer 0,1% (v/v) Tween-20
TBS-Puffer, pH 7,6	20 mM Tris 137 mM NaCl
TBST-Puffer	20 mM Tris 137 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween-20
Lysispuffer für Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen	50 mM Tris, pH8,0 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% (w/v) SDS 0,5 mg/ml Proteinase K, kurz vor der Lyse dazugeben
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
TAE-Puffer	0,4 M Tris 0,2 M Eisessig 0,01 M EDTA · NA ₂ · 2H ₂ O
IP-Puffer	50 mM Hepes, pH 7,9 150 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 0,5% (v/v) NP-40 10% (v/v) Glycerin kurz vor der Lyse zugeben: 1 mM DTT 0,2 mM PMSF 1% (v/v) Protease Inhibitor Coctail 1% (v/v) Phosphatase Inhibitor Coctail I

Material und Methoden

Lämmli-Puffer 5x 1% (v/v) Phosphatase Inhibitor Coctail II
300 mM Tris-HCl, pH 6,8
10% (w/v) SDS
50% Glycerin
0,05% (w/v) Bromphenolblau
5% (v/v) β -mercaptoethanol

Western Blot Puffer:

Trenngelpuffer 1,5 M Tris, pH 8,8

Sammelgelpuffer 0,5M Tris, pH 6,8

Laufpuffer 25 mM Tris-HCl (ohne pH-Einstellung)
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

Transferpuffer 25 mM Tris-HCl (ohne pH-Einstellung)
192 mM Glycin
20% (v/v) Methanol

SDS Gele:

Trenngel	7,5%	10%	12%	15%
dH2O	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
Rotiphorese Gel 30	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
10% APS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l

Material und Methoden

Sammelgel	
dH₂O	3,0 ml
Sammelgelpuffer	1,3 ml
Rotiphorese Gel 30	750 µl
10% SDS	50 µl
10% APS	25 µl
TEMED	10 µl

BrdU-Lösung

Stock-Lösung 50 µg/µl BrdU in H₂O

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm™ ECL

GE Healthcare,
Buckinghamshire

Deckgläschen

Merck, Darmstad

Cryo Tube™ Vials

Nunc, Denmark

Einmal Kanülen Sterican 100

Braun, Melsungen

Filterpipetten

Becton Dickinson,
NJ. USA

Mikroröhre mit Verschuß

Sarstedt, Nümbrecht

Objektträger SuperFrost® Plus

Menzel, Braunschweig

Pipettenspitzen

Eppendorf, Hamburg

15 ml-Polypropylenröhrchen

Becton Dickinson,
NJ. USA

50 ml-Polypropylenröhrchen

Becton Dickinson,
NJ. USA

Thermo-Fast® 96 Detection Plate

Thermo Fischer Scientific,
Epsom, Surrey, UK

Reaktionsgefäße (Safe Lock Tubes versch. Größen)

Eppendorf, Hamburg

Spritzen

Braun, Melsungen

2.1.7 Geräte

Durchlicht und FL-Mikroskop Axiostar Plus

Carl Zeiss AG, Göttingen

Material und Methoden

Co ₂ -incubator HERAcell [®] 240	Heraeus, Langenselbold
Easypet [®] Pippetierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Einkanal Pipetten, 0,5-1.000 µl	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine ZBE 150	ZIEGRA, Isernhagen
Fully Automatic X-ray Film Processor	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
GelDoc [™] XR System	Bio-Rad, München
Homogenisator DIAX 900	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskop (aufrechtes) Axio Imager	Carl Zeiss AG, Göttingen
Mikrotom-Kryostat Cryo-Star HM 560 MV	MICROM, Walldorf
Mikrowelle HF 22024	Siemens, Deutschland
Mini-Protean [®] 3 Cell	Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot Cell [™]	Bio-Rad, München
Multipette [®] plus	Eppendorf, Hamburg
Paraffinstreckbad 1052	GFL, Burgwedel
pH Meter MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	
Real-time-PCR Gerät (ABI-Prism [®] 7700 SDS)	Applied Biosystems, Darmstadt
Rotationsmikrotom HM 355 S	MICROM, Walldorf
Power Pac [™] Basic Power Supply	Bio-Rad, München
Sterlbank: Hera Safe	Heraeus, Langenselbold
Sub-Cell [®] GT Agarose Gel Elektrophoresis Systems	Bio-Rad, München
Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient)	Eppendorf , Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2 [™]	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wärmeschrank	Heraeus, Langenselbold
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Waage analytic	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415 R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415 D (Tischzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe

Da genomische DNA empfindlich ist, dürfen DNA-Lösungen durch Umwenden gemischt werden, nicht vortexen.

Zu einem 1 cm langen Mausschwanzstück wurde 750 µl Lysispuffer zugefügt. Anschließend wurde dem Lysat Proteinase K (5 mg/ml) zugegeben, um die Proteine hydrolytisch zu spalten und somit eine Trennung der gespaltenen Proteine von der DNA zu ermöglichen. Dieser Schritt wurde über Nacht unter Mischen bei 55°C durchgeführt. Nach der vollständigen Auflösung des Schwanzstücks wurde der Probe 250 µl 6M NaCl-Lösung zugegeben, von Hand gut geschüttelt und anschließend für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die unlöslichen Proteine zu sedimentieren. Der Überstand (200 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 175 µl 100% Isopropanol versetzt, danach für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zur Sedimentation der DNA zentrifugiert. Dabei sollte sich ein sichtbares DNA Sediment bilden, das 2x10 min mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen wurde. Die luftgetrocknete DNA wurde in TE-Puffer gelöst und nach der Bestimmung der Konzentration konnte sie in diesem Reinheitsgrad in die PCR eingesetzt werden.

2.2.2 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit einem Eppendorf BioPhotometer bei einer Absorption von 260 nm ermittelt. Die optische Dichte (OD260) von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1cm einer DNA-Menge von 50 µg/µl (doppelsträngige DNA).

2.2.3 Amplifikation von DNA

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR wurde für die Amplifizierung von DNA zur Genotypisierung verwendet. Alle PCRs wurden mit dem RED Taq Ready Mix durchgeführt. Je nach Bedarf wurde das Standardprotokoll jeweiligen Erfordernissen angepasst. Sämtliche PCRs wurden in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient) durchgeführt.

Standardprotokoll:

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen	
Primer sense 10 pmol/ μ l	1 μ l	Initiale Denaturierung 95°C	3 min
Primer antisense 10 pmol/ μ l	1 μ l	Denaturierung 95°C	30 s
RED Taq Ready Mix	12,5 μ l	Annealing je nach Primer	30 s
DNA	1 μ l	Elongation 72°C	1 min
dH ₂ O	9,5 μ l	Finale Polymerisation 72°C	10 min

} 35-40 Zyklen

2.2.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt, um die Größe der erhaltenen PCR-Produkte zu verifizieren. Als Trennprinzip greift hierbei der Molekularsiebeffekt des Agarosegels. Je nach Fragmentgröße wurde eine Agarosekonzentration (w/v) von 1% bis 3% gewählt. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer bis zum vollständigen Auflösen aufgeköcht, nach Abkühlung auf ca. 50°C mit Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ml versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die Proben des PCR-Laufes wurden mit entsprechenden Volumina eines sechsfach konzentrierten Ladepuffers versetzt und in einem horizontalen Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Für die Identifizierung der PCR-Fragmente wurde eine kommerziell erhältliche Mischung aus verschiedenen DNA-Strängen bekannter Länge (DNA-Größenstandard) verwendet. Das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, diente ihrer Visualisierung. Es wird durch UV-Bestrahlung bei 312 nm angeregt und bei einem Absorptionsmaximum von 516 bis 518 nm nachgewiesen. Der Geldokumentation diente das GelDoc™ XR System mit Transilluminator, Kamera und Auswertesoftware. In der PCR wurde nicht die gesamte DNA amplifiziert, sondern nur das zwischen den beiden Amplifikationsprimern gelegene Teilstück. Der Abstand der beiden Primer voneinander und ihre Länge summiert sich zur Größe des PCR-Fragments.

2.2.4 Isolierung von RNA aus Mauspankreas

Die Gewinnung von totaler RNA aus Pankreas erfolgte unter Verwendung des RNeasy® Mini Kits. Das Kit enthält mit Silicagel gefüllte Säulen, über welche die RNA affinitätschromatographisch aufgereinigt wird. Das Gewebe wurde entnommen und in RLT-

Puffer/1% (v/v) β -mercaptoethanol überführt. Es folgte eine Zerkleinerung mit Hilfe eines Homogenisators DIAX 900. Die weiteren Arbeitsschritte richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der Konzentration der RNA erfolgte wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -80°C .

2.2.5 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) bietet die Möglichkeit, die Produktbildung während einer PCR-Reaktion in Echtzeit zu verfolgen. Dabei wird das gebildete PCR-Produkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der am Ende eines jeden PCR-Zyklus mit einer geeigneten Optik angeregt und dessen Fluoreszenzemission dann gemessen wird. Die einfachste und kostengünstigste Strategie der Markierung besteht in der Zugabe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBRTM Green I zur PCR-Reaktion. Da dieser Farbstoff doppelsträngige DNA mit hoher Affinität bindet, ist die Zunahme der Fluoreszenz durch Bildung des PCR-Produktes gut messbar. Einzelsträngige DNA wird von SYBRTM Green I mit deutlich geringerer Affinität gebunden, so dass die Interkalation des Farbstoffs in die einzelsträngigen Oligonukleotid-Primer die Messung nicht behindert. Allerdings wird bei der Verwendung von SYBRTM Green I in der qRT-PCR nicht nur die Fluoreszenz spezifischer PCR-Produkte sondern auch die unspezifischer Produkte, z.B. der so genannten Primerdimere, gemessen. Die Messung unspezifischer Fluoreszenz durch Primerdimere kann durch das Anheben der Detektionstemperatur minimiert werden, da Primerdimere einen geringeren Schmelzpunkt haben als spezifische PCR-Produkte und so ab einer bestimmten Temperatur nicht mehr detektiert werden. Aus diesem Grund wurde die Fluoreszenz in dieser Studie nicht nach dem Elongationsschritt der PCR bei 72°C sondern nach einer kurzen zusätzlichen Inkubation bei 80°C gemessen. Außerdem wurde das Primerdesign so optimiert, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen nur spezifisches PCR-Produkt gebildet wurde. Dies lässt sich durch das Aufzeichnen einer Schmelzkurve des PCR-Produktes gut überprüfen. Dabei wird die PCR-Platte nach Ablauf der PCR langsam von 70°C auf 95°C erwärmt. Am Schmelzpunkt, wenn der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge zerfällt, nimmt die Fluoreszenz der Probe stark ab, da SYBRTM Green die entstehenden DNA-Einzelstränge nur noch mit geringer Affinität bindet.

2.2.5.1 cDNA-Synthese für qRT-PCR

Die cDNA-Synthese erfolgte durch reverse Transkription von 5 µg Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo(dT)12-18Primer (500 µg/µl) und 1 µl (200 units) SuperScript™ II Reverse Transcriptase gemäß Herstellerangaben. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen

Die qRT-PCR wurde mit einem SYBR Green-Reaktionsgemisch aus SYBR Green PCR Master Mix 2x, je 900 nM sense- und antisense-Primer und 100 ng c-DNA in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Die PCR erfolgte in einem ABI-Prism®7700 SDS Gerät bei folgenden Reaktionsbedingungen: 3 min initiale Denaturierung bei 94°C gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus je 30 s Inkubation bei 94°C, 30 s Inkubation bei 60°C, 30 s Inkubation bei 72°C und 3 s Inkubation bei 80°C. Die Fluoreszenzmessung fand nach dem letzten Inkubationsschritt eines jeden PCR-Zyklus statt. Nach der PCR wurden Schmelzkurven der PCR-Produkte aufgenommen, indem von 70 bis 94°C die Temperatur in 0,5°C-Schritten jeweils 3 s lang gehalten und danach die Fluoreszenz gemessen wurde. Die Schmelzkurven zeigten immer die Bildung einzelner spezifischer PCR-Produkte an.

2.2.5.3 Analyse der qRT-PCR-Daten

Werden die Expressionsniveaus der Gene nicht anhand einer gegebenen Kalibrierkurve absolut bestimmt, müssen sie auf die Expressionsniveaus eines oder mehrerer Referenzgene bezogen werden. Als Referenzgene werden solche Gene ausgewählt, deren Expressionsniveau in allen zu vergleichenden Proben konstant ist. Das können klassische „housekeeping“ Gene oder andere Gene sein, deren konstante Expression in den Proben vorausgesetzt werden kann. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse. Für die Normalisierung der qRT-PCR-Daten in dieser Studie wurde Cyclophilin ausgewählt.

In der qRT-PCR wird nicht in DNA Produktmengen oder -konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sog. Ct oder CP (= Crossing Point) Werte herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Im Falle einer 100%-gen

Material und Methoden

Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal.

Um das Expressionsniveau zu berechnen, wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CP Wert des Referenzgens vom CP Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta CP = CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen}$). Das Expressionsniveau einer Probe ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta CP}$.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

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

2.3.1 Isolierung von Proteinen

Frische oder eingefrorene Gewebe wurden mit IP-Puffer, Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren versetzt und mit der Hilfe des Homogenisators zerkleinert. Die Suspension wurde für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Proteinlösungen wurden schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein-Assay nach der modifizierten Methode von Bradford (Bradford, 1976). Der Assay beruht auf dem Prinzip, bei dem verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung von Proteinen an einen Farbstoff zu proportionalen Farbveränderungen führen. Das eingesetzte Coomassie-Brilliantblau G-250 hat in seiner an Protein gebundenen Form ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Als Standard wurde BSA (1 mg/ml) verwendet. Als Leerwert diente IP-Puffer. Proteinlösungen wurden 1:10 mit IP-Puffer verdünnt. Je 200 µl des 1:5 verdünnten Protein Assay Dye Reagents wurden mit je 10 µl der Proben bzw. der Standards in einer 96-Well-Platte gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Lösungen bei 595 nm gemessen und mit Hilfe der Kalibriergeraden wurde die Proteinkonzentration berechnet.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Für elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen wurde das Mini-PROTEAN 3-Gelelektrophorese-System verwendet. Dazu müssen die Proteine in der Primärstruktur vorliegen. Daher wurden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt, und so wurden die Tertiär- und Sekundärstruktur durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung der Proteine so maskiert, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung entstehen. Zum Aufspalten der Schwefelbrücken zwischen Cysteinen wurde β -Mercaptoethanol dazugegeben. Um die Aggregation der Proteine beim Eintritt in das Gel zu verhindern, verwendet man die diskontinuierliche Elektrophorese. Hierfür wurde die Gelmatrix in zwei Bereiche eingeteilt: das weitporige Sammelgel und das engporige Trenngel. Der Anteil des Acrylamids im Trenngel ist umgekehrt proportional zur Größe der untersuchten Proteine und kann 7,5, 10, 12 oder 15% betragen. Durch diese variierenden Gelkonzentrationen sollte immer eine optimale Bandenschärfe im untersuchten Molekulargewichtsbereich erreicht werden. Die Polymerisation wurde durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat initiiert, TEMED diente als ein Polymerisierungskatalysator. Die Geltaschen wurden mit den Proben nach definierten Proteinmengen gefüllt. Eine Spur wurde mit dem Proteinstandard belegt. Der Gellauf wurde in Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 70 V im Sammelgel und 90-120 V (je nach der Gelkonzentration) im Trenngel durchgeführt.

2.3.4 Western Blot

Zur Fixierung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde ein vertikales Tank-Blot System (Mini Trans-Blot) verwendet. Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch 15 s in MeOH 100% hydrophilisiert und anschließend wurden die Membran, das zu blottende Gel und die Filterpapiere in Transferpuffer äquilibriert. Danach wurde ein Sandwich aus Gel, Membran und Filterpapieren luftblasenfrei in eine Blotkassette gelegt. Diese Kassette wurde in eine mit eiskaltem Transferpuffer befüllte Blotkammer überführt (Mini Blot Transfer Cell™) und der Transfer bei 350 mA für 1-2 h durchgeführt. Kleine Moleküle wandern dabei schneller als große, so dass die Transferbedingungen auf das gewünschte Protein abgestimmt werden mussten. Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h bei RT in Blocklösung geschwenkt. Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte bei 4°C über

Material und Methoden

Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x5 min in TBST gewaschen, 1 h bei RT mit peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert und erneut 3x5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem Amersham ECL™ Western Blotting Detektion Reagents auf Amersham Hyperfilm™ ECL.

2.3.5 Immunhistochemie

Durch immunhistologische Techniken wird es möglich, Proteine und andere Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch nachzuweisen. Es gibt mehrere Methoden der immunhistochemischen Färbung. Die Wahl der Methode ist abhängig von der Art und Lokalisation des zu untersuchenden Proteins und der Art und Beschaffenheit des zu untersuchenden Gewebes. Die Qualität der Färbung ist abhängig von der Fixierung des Materials, der richtigen Verdünnung des Antikörpers, der optimalen Inkubationszeit aller Reagenzien, sowie der optimalen Temperatur. Je nach verwendetem Primärantikörper können die immunhistochemischen Untersuchungen an Gefrier- oder Paraffingewebeschnitten durchgeführt werden.

2.3.5.1 Herstellung von Präparaten

2.3.5.1.1 Gefrierschnitte

Die Gewebeproben wurden in Tissue-Tek Medium eingebettet, vorsichtig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C konserviert. Am Kryostat konnten Gefrierschnitte von 5 bis 10 μm Schichtdicke angefertigt und auf Super Frost Plus Objektträger aufgezogen werden. Beim Nachfixierungsverfahren wurde eiskaltes Aceton oder 4% gepuffertes PFA für 10 min verwendet. Der Vorteil der Gefriertechnik liegt in der sehr guten Antigenerhaltung im Gewebe.

2.3.5.1.2 Paraffinschnitte

Die Gewebeproben wurden in 4% gepuffertem PFA über Nacht fixiert, anschließend entwässert und in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden 3,5 μm dicke Schnitte angefertigt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Das Paraffin der Gewebeschnitte wurde in Xylol (2 x 5 min) entfernt und die

Material und Methoden

Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe (jeweils 3 min in 99,8%, 96% und 70% Alkohol) bis zum dH₂O hydratisiert. Um Antigene zu demaskieren erfolgte Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit Enzyme bei Raumtemperatur oder mit Citrat-Puffer in der Mikrowelle. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden Schnitte 15 min in frisch angesetzter 0,3% H₂O₂-Lösung inkubiert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Präparate nach jedem Schritt 3 x mit Waschpuffer (PBS oder TBS) gewaschen. Anschließend wurde die immunhistochemische Färbung nach Avidin-Biotin-Methode durchgeführt.

2.3.5.2 Streptavidin-Biotin-Methode

Streptavidin-Biotin-Methode ist eine indirekte Nachweismethode, die eine starke Affinität von Avidin oder Streptavidin für Biotin nutzt. Bei der Reaktion bindet das Glykoprotein Avidin des enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper. Die Reihenfolge der Applikation ist Primärantikörper - biotinylierter Sekundärantikörper - Avidin-Biotin-Enzymkomplex – Substrat-Chromogenlösung. Als Enzym wird am häufigsten Meerrettichperoxidase verwendet. Die Peroxidase überträgt von Chromogen DAB Elektronen auf das zugegebene Substrat Wasserstoffperoxid, das so zu Wasser reduziert wird. DAB fällt zu einem unlöslichen, bräunlichen Produkt aus. Dieses System hat eine signalverstärkende Wirkung. Für Fluoreszenzantikörperfärbungen werden Sekundärantikörper verwendet, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Fluoreszenzfärbungen haben den Vorteil, dass mit ihrer Hilfe Kolokalisationen von Proteinen nachgewiesen werden können. Ein weiteres Verfahren zur Signalverstärkung ist beispielsweise das Tyramidsystem (*Tyramid signal amplification*).

2.3.5.3 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist die klassische Übersichtsfärbung in der Histologie. Hämalaun markiert vor allem die Zellkerne blau, während Eosin färbt Zytoplasma und extrazellulär Matrix unterschiedlich stark rot an.

2.3.5.4 Masson-Trichrom-Färbung

Zur Darstellung der fibrosierten Areale erfolgte Masson-Trichrom-Färbung mit standardisiertem Färbekit. Kollagenfasern sind tiefblau, die Kerne leuchtend rot und das Zytoplasma blassrosa bis schwach bläulich gefärbt.

2.4 Isolierung muriner Azinuszellen

Das ganze Pankreas wurde entnommen und während der weiteren Verarbeitung in der isotonischen Kochsalzlösung auf Eis gelagert. Die Gewinnung von Azinuszellen erfolgte unter die Verwendung von Plastikmaterial aus Polycarbonat, da Kontakt mit Glas die Azinuszellen stark beschädigt. Zum Verdau wurde die Kollagenase-Lösung in das Organ injiziert, bis sich die einzelnen Pankreas-Läppchen klar voneinander separierten. Anschließend wurde das Gewebe in kleine Fragmente geteilt und für 10 min bei 37°C in der Kollagenase-Lösung inkubiert. Danach wurde die Kollagenase-Lösung gewechselt und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Das so verdaute Gewebe wurde mit Hilfe von Pipetten mechanisch zu einer Gewebe-Zell-Suspension homogenisiert, die durch ein Nylonnetz mit einer Maschengröße von 100 µm filtriert und mit der Waschlösung nachgespült wurde. Im Anschluss wurden die Azinuszellen zweimal gewaschen, wobei der Sedimentationsüberstand jeweils verworfen wurde, und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei 37°C im Medium inkubiert. Die Vitalität der aufbereiteten Azini wurde anhand der Trypanblau-Färbung vor jeder weiteren Verwendung beurteilt und dokumentiert. Dazu wurden jeweils Aliquots (80 µl) der im Medium suspendierten Azini mit 20 µl Trypanblau 0,5% versetzt. Unter einem Lichtmikroskop wurde nach ca. 1-2 min Inkubationszeit Morphologie der Azini beurteilt sowie die Anzahl der blaugefärbten Azini als Anteil der Gesamtmenge geschätzt. In der Trypanblau-Färbung galt das Nicht-Anfärben der Zelle als Nachweis ihrer Vitalität. Zeigten sich in der Trypanblau-Färbung mehr als 85% morphologisch intakte und ungefärbte Azini, wurden diese in weiteren Analysen verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65

Da konventionelle RelA/p65 Knock-out-Mäuse einen embryonal letalen Phänotyp aufweisen, stand zunächst die Generierung einer konditionalen, d.h. gewebespezifischen RelA/p65 Knock-out-Maus im Mittelpunkt. Um RelA/p65 mit Hilfe der Cre-Lox-Technologie pankreasspezifisch inaktivieren zu können, wurden zwei Mauslinien verwendet. Zuerst wurde eine *Ptf1a-cre^{ex1/+}* Mauslinie generiert (Algul et al., 2007). Das Gen, das die Cre-Rekombinase kodiert, wurde in Exon 1 des Pankreas-Transkriptionsfaktors 1 (*Ptf1a*) Locus inseriert. PTF1 ist ein heterotrimerer Proteinkomplex (bestehend aus p48, p64 und p75), der als transkriptioneller Regulator exokriner Enzyme wie Amylase und Lipase in azinären Zellen identifiziert wurde (Krapp et al., 1996; Rose et al., 2001). *Ptf1a/p48* wird in einem frühen Stadium der Pankreasentwicklung exprimiert und für die Entwicklung der ventralen Pankreasanlage benötigt (Kawaguchi et al., 2002; Krapp et al., 1998). *Ptf1a-cre^{ex1/+}* Mäuse zeigen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Durch Kreuzen der *Ptf1a-cre^{ex1/+}* Maus mit der Reporter-Mauslinie *Rosa26^{+LacZ}* (Abbildung 8A) konnte das Expressionsmuster der Cre-Rekombinase durch eine LacZ-Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 8B) (Soriano, 1999).

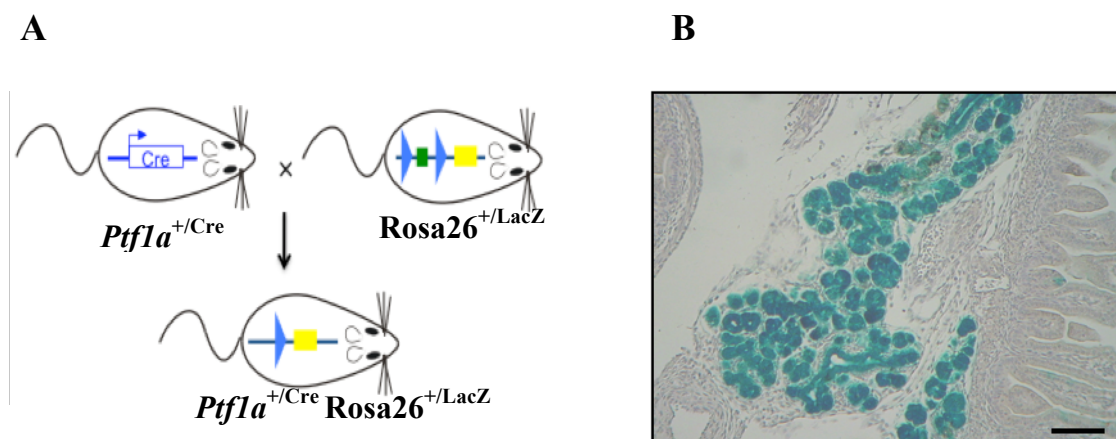


Abbildung 8: Nachweis der pankreasspezifischen Expression der Cre-Rekombinase

(A) Generierung einer Mauslinie, die nach Cre-vermittelter pankreasspezifischer Deletion einer mit *loxP*-Sequenzen (blauer Pfeil) flankierten Stop-Kassette (grünes Viereck) vor dem LacZ-Gen (gelbes Viereck) das Enzym β -Galactosidase exprimiert.

(B) Die LacZ-Färbung der β -Galactosidase-exprimierenden Zellen. Die Expression des LacZ-Gens konzentriert sich auf Azinuszellen und Gangzellen (Algul et al., 2007). Maßstableiste 100 μ m.

Ergebnisse

Für die gewebespezifische Inaktivierung von RelA/p65 benötigte man eine Maus, in deren Genom funktionell entscheidende Anteile des *rela*-Gens von *loxP*-Sequenzen flankiert sind. Die *loxP*-Signale wurden in das Intron 6 und 10 des *rela*-Gens so eingefügt, dass die Exone 7 bis 10 des *rela*-Gens von *loxP*-Sequenzen begrenzt werden (Abbildung 9A).

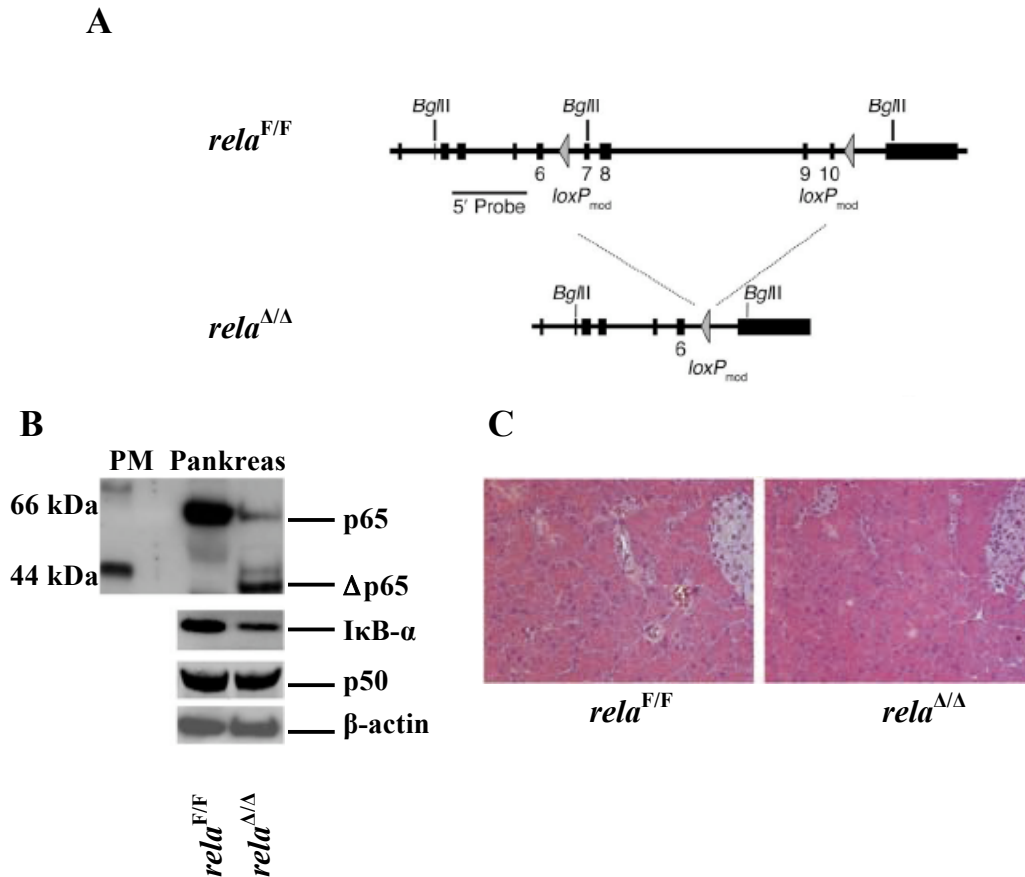


Abbildung 9: Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65

(A) *loxP*-Sequenzen wurden in Intron 6 und 10 des *rela* Gens platziert. Cre-vermittelte Deletion der Exone 7 bis 10 führt zum Verlust einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bgl II.

(B) Die Deletion von *rela* (Exone 7-10) wurde in frisch isolierten Azini einer *rela*^{Δ/Δ} Maus auf Protein-Ebene mittels Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle dienten Proteinlysate aus Azini einer *rela*^{F/F} Maus. Protein Marker (Acosta et al.) bestimmt das Molekulargewicht von Proteinen.

(C) HE-Färbung von Pankreata der *rela*^{F/F} und *rela*^{Δ/Δ} Mäusen (Algul et al., 2007).

Die *rela*^{F/F} Mäuse zeigen einen unauffälligen Phänotyp. Durch Kreuzen einer geflochten *rela* Maus mit der *Ptf1a-cre*^{ex1/+} Maus werden die Exone 7 bis 10 des *rela* Gens selektiv in Azinuszellen, Gangzellen und zum Teil im endokrinen Kompartiment des Pankreas deletiert (*rela*^{Δ/Δ}). Dieser Genabschnitt kodiert einen Teil der *Rel-Homologie-Domäne* (RHD) und das nukleäre Lokalisationssignal (NLS). Dabei entsteht ein deletiertes Protein Δp65 das weder DNA binden noch mit der p50 Untereinheit dimerisieren kann. Außerdem kann Δp65 nicht mit dem Inhibitorprotein IκBα interagieren. Die Western Blot Analyse von pankreatischen

Ergebnisse

Lysaten zeigt eine schwächere Expression von I κ B α in *rela* ^{$\Delta\Delta$} Mäusen im Vergleich zu *rela*^{F/F} Mäusen (Abbildung 9B). I κ B α ist eines der klassischen NF- κ B-Zielgene. Die Expression von p50, einer Untereinheit des NF- κ B/Rel Heterodimers, bleibt dagegen unverändert (Algul et al., 2007). Wie in Abbildung 9C dargestellt, ist die normale Architektur des Pankreas in *rela* ^{$\Delta\Delta$} Mäusen erhalten. Die Generierung einer *rela* ^{$\Delta\Delta$} Mauslinie ermöglicht, RelA/p65 im Pankreas der *Ela*-TGF α transgenen Mäuse spezifisch zu inaktivieren.

3.2 Deletion von RelA/p65 in Pankreas der transgenen *Ela*-TGF α Mauslinie

Um eine pankreasspezifische Deletion der Exons 7 bis 10 des *rela* Gens in der *Ela*-TGF α Mauslinie durchzuführen, wurde eine *Ela*-TGF α transgene Maus mit einer geflochtenen *rela* Maus (*rela*^{F/F}) gekreuzt (Abbildung 10). Da in diesen Mäusen RelA/p65 unverändert exprimiert wird, verhalten sich *Ela*-TGF α *rela*^{F/F} Mäuse genauso wie *Ela*-TGF α transgene Mäuse und dienen als Kontrollmäuse.

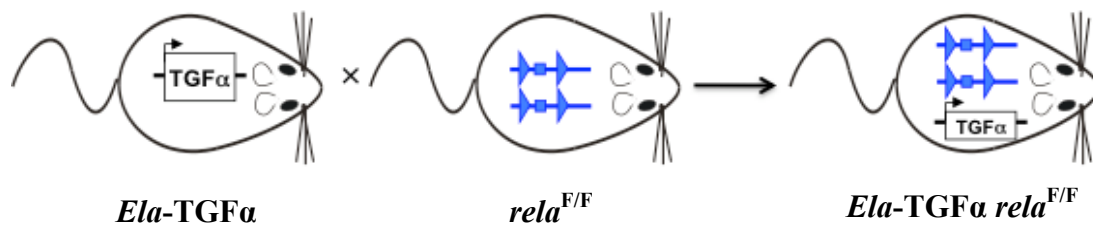


Abbildung 10: Generierung einer *Ela*-TGF α *rela*^{F/F} Mauslinie

LoxP-Sequenzen (blauer Pfeil) flankieren die Exons 7 bis 10 (blaues Viereck) des *rela* Gens.

Nach der in Abbildung 11 dargestellten Kreuzungsstrategie wurde im nächsten Schritt eine *Ela*-TGF α *rela* ^{$\Delta\Delta$} Maus generiert. Dazu wurde durch die weitere Verpaarung zusätzlich zu dem *Ela*-TGF α Konstrukt und dem geflochtenen *rela*-Gen das *Ptf1a-cre*^{ex1/+}-Allel in das Mausgenom eingebracht. Aus dieser Verpaarung entstanden *Ela*-TGF α transgene Mäuse mit homozygoter Deletion von RelA/p65 im Pankreas (*Ela*-TGF α *rela* ^{$\Delta\Delta$}).

Die Identifizierung der *Ela*-TGF α transgenen Tiere mit pankreasspezifischer Deletion der Exons 7 bis 10 des *rela* Gens erfolgte durch die Analyse genomischer DNA. Hierzu wurde die genomische DNA aus Schwanzbiopsien 4 Wochen alter Mäuse isoliert. Nach einer PCR mit sequenzspezifischen Forward- und Reverse-Primern wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ehtidiumbromid angefärbt. Anhand des

Ergebnisse

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

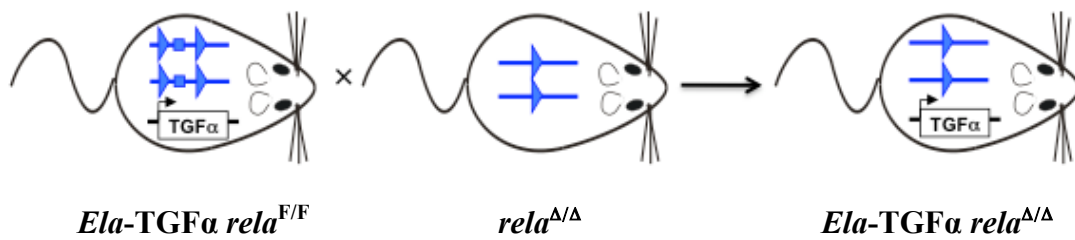


Abbildung 11: Generierung einer *Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}* Mauslinie

Die mit *loxP*-Sequenzen (blauer Pfeil) flankierten Exons 7 bis 10 (blaues Viereck) des *rela* Gens wurden pankreasspezifisch deletiert.

Das Ergebnis einer solchen PCR und der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente ist in Abbildung 12 exemplarisch für zwei Tiere von jeder Mauslinie gezeigt.

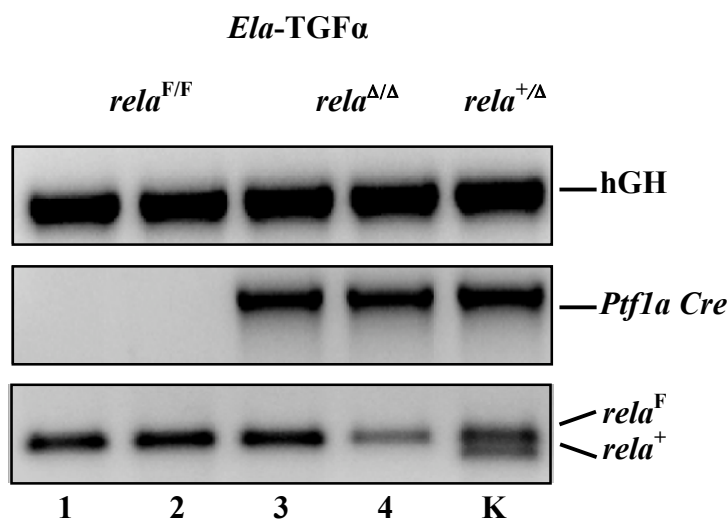


Abbildung 12: PCR Analyse genomischer DNA

DNA Proben von 1 Monate alten *Ela-TGFα rela^{F/F}* und *Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}* Mäusen wurden mit hGH (zeigt transgene Expression von TGFα) und *Ptf1a Cre* Primer getestet. Der *rela*-Lokus wurde auf *loxP*-Sequenzen geprüft. Als Positivkontrolle (K) diente die genomische DNA einer *Ela-TGFα* transgenen heterozygot geflochten *rela* Maus (*Ela-TGFα rela^{+/Δ}*). Diese Maus zeigt transgene Expression von TGFα, eine Cre-Rekombinase spezifische Bande, eine *rela* wt spezifische (264 bp) (*rela⁺*) und eine *rela loxP* spezifische (298 bp) Bande (*rela^F*).

Mit dem hGH Primerpaar wurde bei den Mäusen aus beiden Linien (Spuren 1 bis 4) ein Amplikon erhalten, das die transgene Expression von TGFα bestätigt. Die PCR mit dem *Ptf1aCre* Primerpaar ermöglichte den Nachweis von Cre-Rekombinase in *Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}* Mäusen. Neben den Spuren 1 und 2, die keine Signale aufwiesen und dem

Ergebnisse

Wildtyp zugeordnet wurden, erkannte man in Spuren 3 und 4 Cre-Rekombinase spezifische Signale. Als nächstes wurde der *rela*-Lokus auf *loxP*-Sequenzen getestet. Die durchgeführte PCR ergab für die Proben 1 bis 4 ein *rela loxP* spezifisches Amplikon (298 bp). Diese Proben wurden deshalb als homozygot *gefloxt* eingestuft. In Spur K sind PCR-Ergebnisse von der genomischen DNA einer *Ela-TGF α* transgenen heterozygot *gefloxt* *rela* Maus (*Ela-TGF α rela^{+/ Δ}*) dargestellt, die als Positivkontrolle diente. Diese Maus zeigt transgene Expression von TGF α , eine Cre-Rekombinase spezifische Bande, eine *rela* wt spezifische (264 bp) (*rela⁺*) und eine *rela loxP* spezifische (298 bp) Bande (*rela^F*). Zusammengefasst wurden die Proben 1 und 2 als *Ela-TGF α* transgene Mäuse, bei denen der *rela*-Lokus homozygot *gefloxt* ist, und die Proben 3 und 4 als *Ela-TGF α* transgene Mäuse mit homozygoter Deletion von RelA/p65 im Pankreas klassifiziert.

Zum Nachweis der Deletion der Exone 7 bis 10 des *rela*-Gens wurde die Expression von RelA/p65 mittels Western Blot analysiert. Wie Abbildung 13 zeigt, ist das verkürzte Fragment Δ p65 in 1 Monate alten *Ela-TGF α* transgenen RelA/p65 Knock-out-Mäusen detektierbar, während *Ela-TGF α rela^{F/F}* Mäuse weiterhin das unveränderte Protein RelA/p65 aufweisen. Bindegewebe und endokrine Zellen im Pankreas sind verantwortlich für den schwachen Nachweis von nicht deletiertem RelA/p65 Protein in der *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mauslinie.

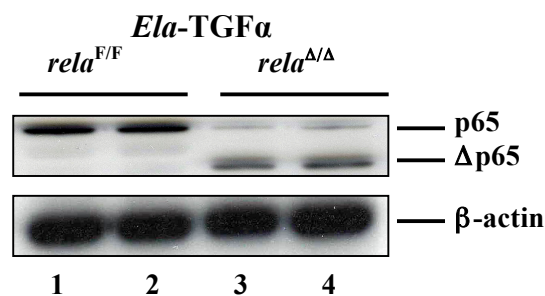


Abbildung 13: Expression von RelA/p65

Western Blot Analyse von 1 Monate alten *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäusen. Exemplarisch sind jeweils zwei Tiere von jeder Mauslinie abgebildet. β -actin dient als Ladekontrolle.

3.3 Morphologische Analyse von *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäusen

Um den Einfluss der genetischen Inaktivierung von RelA/p65 auf morphologische Charakteristika des Pankreas *Ela-TGF α* transgener Mäuse zu untersuchen, wurden *Ela-TGF α rela^{F/F}* and *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Die Aktivierung von RelA/p65 im Pankreas der *Ela-TGF α rela^{F/F}* Mäuse wurde durch eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Gefrierschnitten von Pankreasproben 1 und 3 Monate

Ergebnisse

alter Mäuse untersucht. Die Kerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Sytox Green* grün angefärbt, während p65 mit einem Cy3 (rot) gekoppelten Antikörper markiert wurde. Die nukläere Lokalisation von p65 wurde durch die Überlappung von grünen (*Sytox Green*) und roten (Cy3) Signalen identifiziert. Abbildung 14 zeigt gelbe nukläere Signale in den azinären Zellen der 1 Monat alten *Ela-TGF α rela^{F/F}* Mäuse. Bei *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäusen sind zu diesem Zeitpunkt nur zytoplasmatische Signale zu beobachten. Bei Durchsicht der gefärbten Präparate von 3 Monate alten Mäusen wurde deutlich, dass sowohl Azini als auch duktaile Strukturen von Kontrollmäusen für nukläeres p65 positiv waren, während Pankreata der *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäuse nur zytoplasmatische Signale aufwiesen. Um die Möglichkeit unspezifischer Bindungen des α -p65 Antikörpers in der Immunfluoreszenz zu überprüfen, wurde Isotypkontrolle (IgG3) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen war kein rotes Cy3-Signal sichtbar, ebenso wie beim Auslassen des primären Antikörpers.

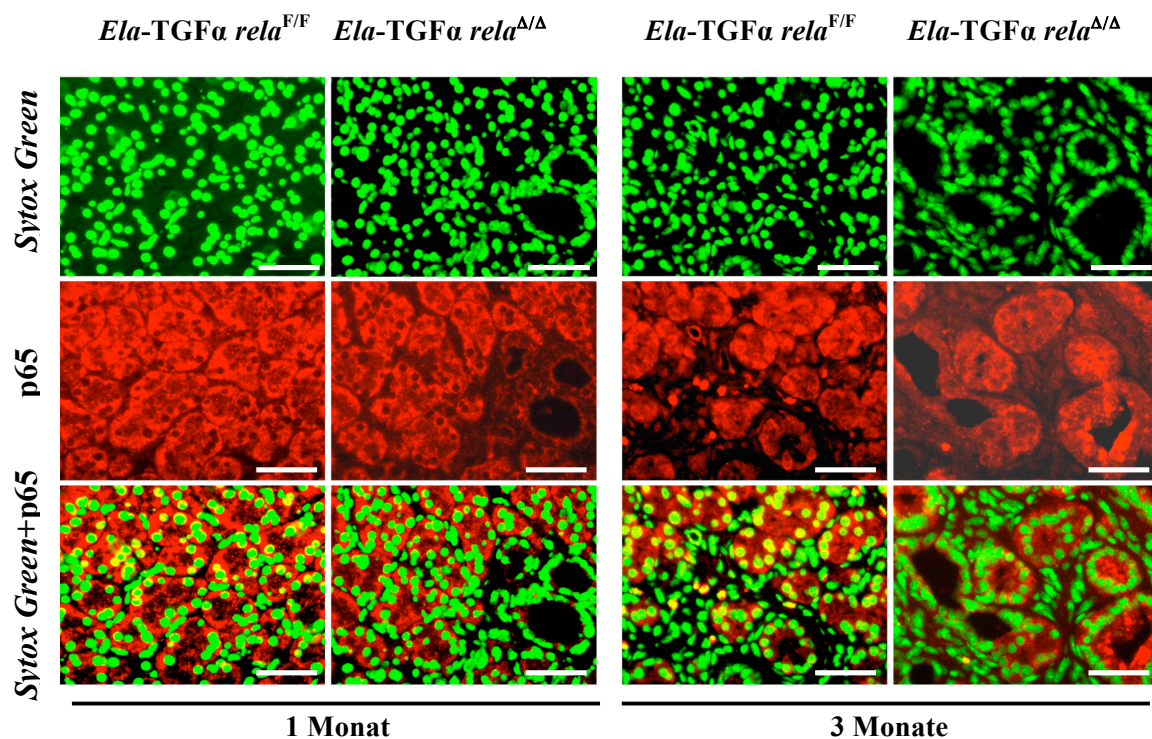


Abbildung 14: Aktivierung von RelA/p65 in Pankreata der *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäuse

Immunfluoreszenzfärbung von p65 in Pankreasproben von 1 und 3 Monate alten Mäusen. Die Färbung erfolgte mit sekundärem Cy3 Antikörper und *Sytox Green* als Kernfarbstoff.

Rot: p65; Grün: *Sytox Green*; Gelb: Überlappung von rot und grün. Maßstableise 50 μ m.

Als nächstes wurde eine histologische Untersuchung von Pankreata der 1, 3 und 9 Monate alten Mäuse beider Linien durchgeführt. Die HE-Färbung ergab Hinweise auf deutliche morphologische Veränderungen in *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäusen im Vergleich zu *Ela-TGF α*

Ergebnisse

rela^{F/F} Mäusen (Abbildung 15A). *Ela-TGF α* transgene Mäuse mit Inaktivierung von RelA/p65 zeigten einen zunehmenden Verlust von Azinuszellen, der ab dem 1. Lebensmonat beginnt und sich mit der Zeit verstärkt. Sowohl die Bildung der duktaalen Strukturen als auch die Fibrosierung im Pankreas transgener RelA/p65 knock-out Mäuse erschienen gesteigert.

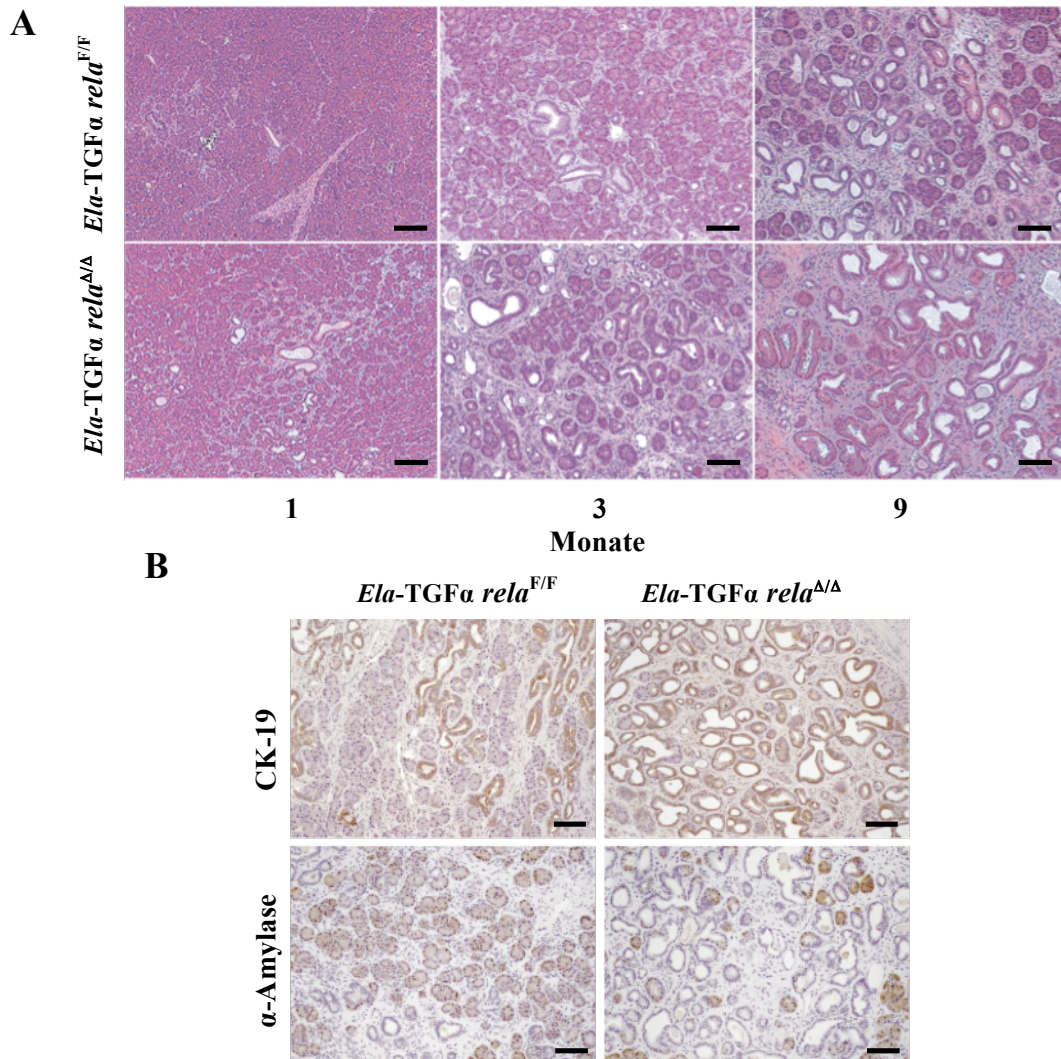


Abbildung 15: Histologische Untersuchung von Pankreata der *Ela-TGF α *rela*^{F/F}* und *Ela-TGF α *rela* ^{Δ/Δ}* Mäuse

(A) Paraffinschnitte von Pankreata beider Mauslinien zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mit Hematoxylin und Eosin gefärbt. Maßstableiste 200 μ m.

(B) Immunhistochemische Analyse von Pankreata der 9 Monate alten Mäuse mit α -Amylase und CK-19 Antikörpern. Maßstableiste 200 μ m.

Zur weiteren Charakterisierung dieser morphologischen Veränderungen wurden in Präparaten von 9 Monate alten Mäusen immunhistochemische Analysen durchgeführt. Wie in Abbildung 15B dargestellt wurde, sind mehr α -Amylase positive Azinuszellen und weniger Cytokeratin 19 (CK-19) positive duktaale Strukturen in Kontrollmäusen im Vergleich zu den *Ela-TGF α*

Ergebnisse

rela^{ΔΔ} Mäusen zu sehen. Um diese Beobachtungen zu untermauern, wurden α -Amylase und CK-19 auf mRNA-Ebene analysiert. Zur Quantifizierung der mRNA-Kopien wurde die gesamt-RNA aus Pankreasgewebeprobe der beiden Mauslinien isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR gemessen. Den Erwartungen entsprechend wurden bei der qRT-PCR Analyse eine signifikante Abnahme von α -Amylase und einen Anstieg von CK-19 in *Ela-TGF α rela*^{ΔΔ} im Vergleich zu *Ela-TGF α rela*^{F/F} Mäusen festgestellt (Abbildung 16).

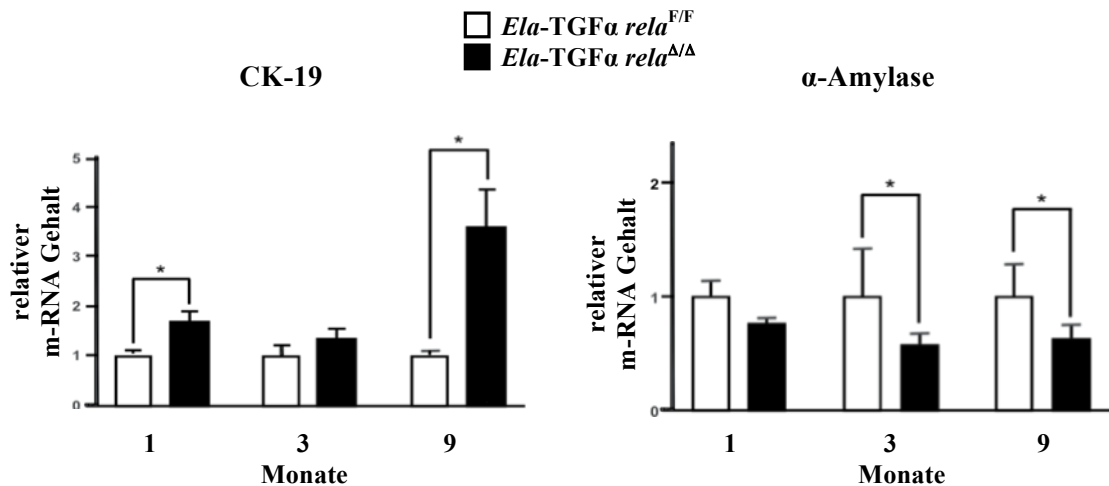


Abbildung 16: Analyse der m-RNA von CK-19 und α -Amylase in *Ela-TGF α rela*^{F/F} und *Ela-TGF α rela*^{ΔΔ} Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Pankreata entnommen, daraus die mRNA isoliert, in cDNA revers transkribiert und der relative Gehalt der m-RNA von CK-19 und α -Amylase mittels qRT-PCR quantifiziert. * $p \leq 0,05$

Um zu analysieren, ob sich die duktaalen Strukturen der *Ela-TGF α rela*^{ΔΔ} Mäuse von duktaalen Strukturen der *Ela-TGF α rela*^{F/F} transgenen Tiere funktionell unterscheiden, wurden p-ERK, Carboanhydrase, CK-19 und Mucin 5 untersucht. Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, wiesen die duktaalen Strukturen beider Mauslinien keine Unterschiede auf.

Ergebnisse

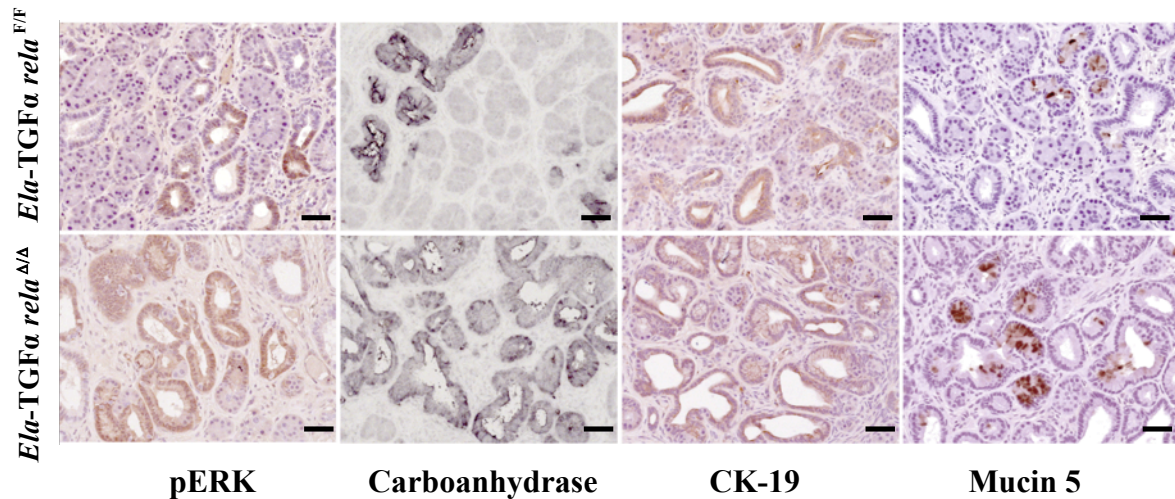


Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse duktaler Strukturen 9 Monate alter *Ela-TGFα rela^{F/F}* and *Ela-TGFα rela^{ΔΔ}* Mäuse

In repräsentativen Pankreasschnitten wurde die Expression von pERK, Carboanhydrase, CK-19 und Mucin 5 immunhistochemisch dargestellt. Maßstableiste 50µm.

Da *Ela-TGFα* transgene Mäuse massive Fibrosierung im Pankreas zeigen (Schmid et al., 1999), stellt sich die Frage, wie die pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 die Pankreasfibrosierung in diesem Modell beeinflusst. Durch Masson-Trichrom-Färbung ist es möglich, Kollagenfasern zu visualisieren. Abbildung 18A zeigt die früher beginnende und zunehmende Kollagenablagerung im Pankreas der *Ela-TGFα rela^{ΔΔ}* im Vergleich zu *Ela-TGFα rela^{F/F}* Mäusen.

Diese Beobachtungen wurden durch qRT-PCR Analyse der mRNA von Fibrose-assoziierten Genen bestätigt. Der Vergleich zwischen *Ela-TGFα rela^{F/F}* und *Ela-TGFα rela^{ΔΔ}* Mäusen zeigte eine signifikante zeitabhängige Steigerung des relativen m-RNA Gehaltes von α -SMA, Kollagen I and Fibronectin in den *Ela-TGFα* transgenen Mäusen mit funktioneller Inaktivierung von RelA/p65. Es wurde kein Unterschied im m-RNA Gehalt von Kollagen III beobachtet (Abbildung 18B).

Ergebnisse

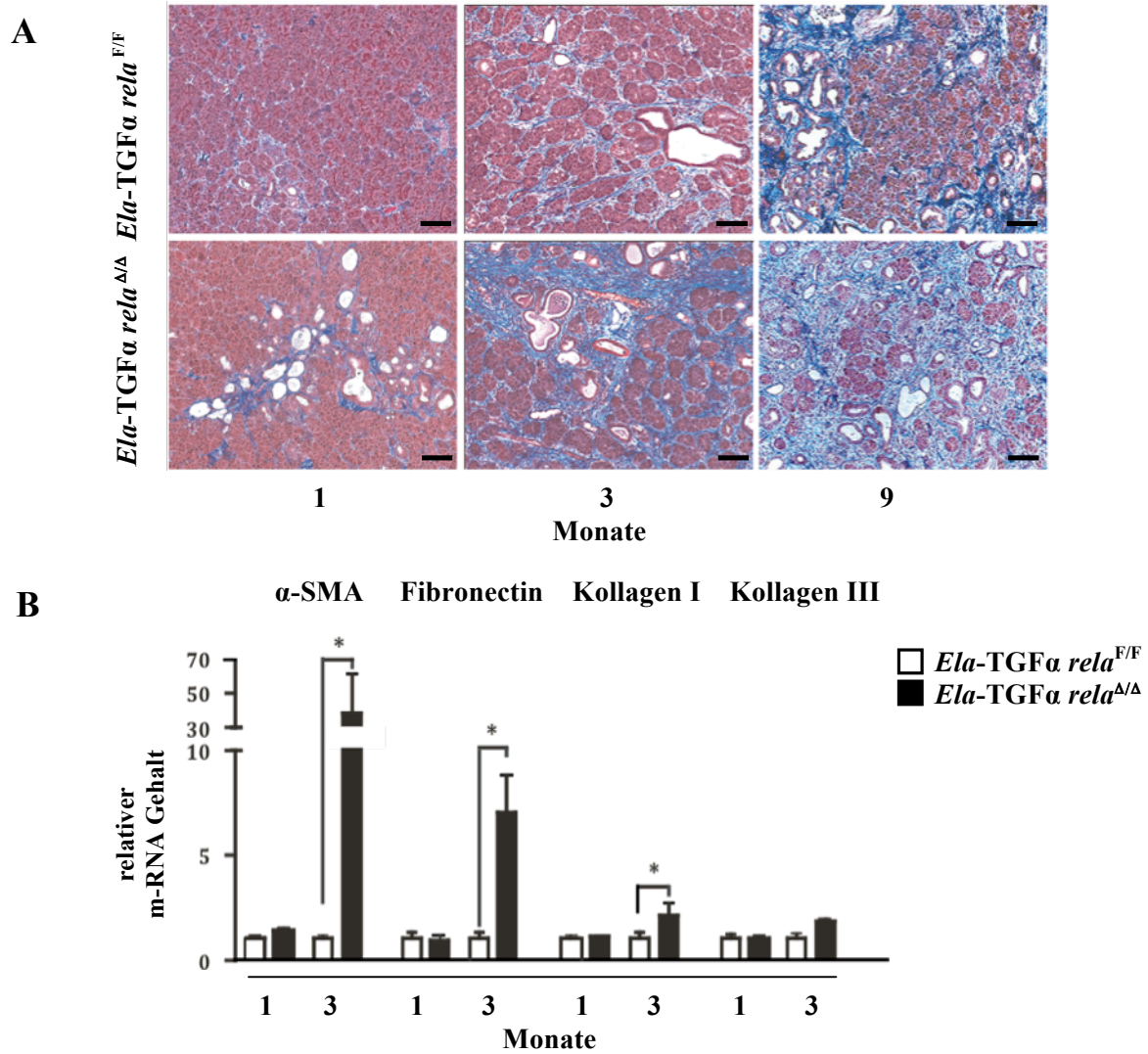


Abbildung 18: Analyse der Pankreasfibrosierung in *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela ^{$\Delta\Delta$}* Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten

(A) Masson-Trichrom-Färbung in repräsentativen Schnittpräparaten von Pankreata zu den angegebenen Zeitpunkten. Kollagenfasern wurden bei dieser Färbetechnik tiefblau dargestellt. Maßstableiste 200 μ m.

(B) qRT-PCR Analyse der mRNA von α -SMA, Fibronectin, Kollagen I, Kollagen III.

* $p \leq 0,05$

Außerdem wurde festgestellt, dass das relative Pankreasgewicht von *Ela-TGF α rela ^{$\Delta\Delta$}* Mäusen nach 1 Monat signifikant und nach 3 Monaten tendenziell reduziert war (Abbildung 19).

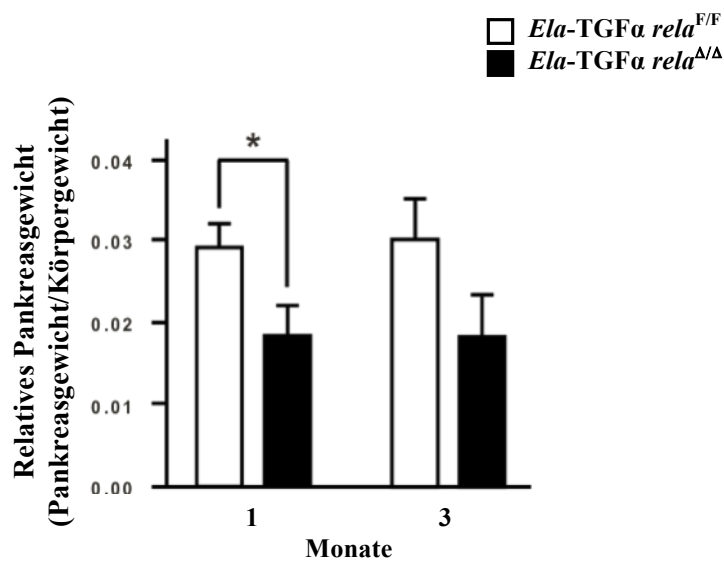


Abbildung 19: Das relative Pankreasgewicht von *Ela-TGFα rela^{F/F}* und *Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}* Mäusen

Das relative Pankreasgewicht wurde bei den jeweils 5 Tieren aus beiden Mausgruppen zu den Zeitpunkten von 1 Monat und 3 Monaten bestimmt. *Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}* Mäuse wiesen niedrigere Werte als Kontrolltiere auf.

Zusammengefasst führte die funktionelle Inaktivierung von RelA/p65 im Pankreas *Ela-TGFα* transgener Mäuse zum Verlust der Azinuszellen, zur zunehmenden Bildung von duktalem Strukturen und zur verstärkten Pankreasfibrosierung .

3.4 Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose in *Ela-TGFα* transgenen Mäusen mit pankreasspezifischer Deletion von RelA/p65

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass der NF-κB/Rel Signalweg an der Regulation von Proliferation und Apoptose beteiligt ist. Deshalb wurden Zellzyklus- und Apoptose-relevante Faktoren in Mäusen beider Genotypen untersucht.

Zur Bestimmung der Proliferation im Pankreas wurde den Versuchstieren eine Stunde vor der Sektion BrdU intraperitoneal (50μg/g Körpergewicht) injiziert. BrdU wird als ein synthetisches Thymidinanalogon in die replizierende DNA anstelle von Thymidin eingebaut und gilt somit als ein Marker der S-Phase. Dieses lässt sich immunhistochemisch an Gewebeschnitten nachweisen (Abbildung 20A). Proliferierende Zellen von 5 Tieren aus jeder Mauslinie zum Zeitpunkt von 1 Monat an jeweils 10 Paraffinschnitten wurden mittels

Ergebnisse

Antikörper gegen BrdU gefärbt und ausgezählt. Bei dieser Auswertung war eine signifikante Abnahme in der Proliferation der azinären Zellen bei *Ela-TGF α rela $^{\Delta/\Delta}$* Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen erkennbar. Die Proliferation der dukталen Zellen im Pankreas von *Ela-TGF α rela $^{\Delta/\Delta}$* Mäusen war ebenso niedriger (Abbildung 20B). Daraus kann geschlossen werden, dass die pankreasspezifische Inaktivierung von NF- κ B/RelA in *Ela-TGF α* transgenen Mäusen zur Reduktion der Proliferationsrate in Azinus- und Gangzellen führt.

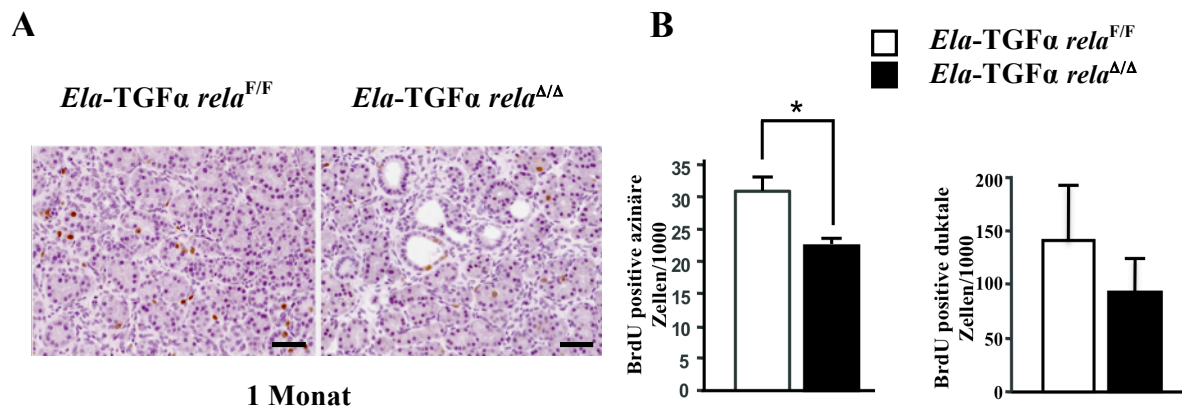


Abbildung 20: Proliferationsaktivität im Pankreas der 1 Monat alten Mäuse

(A) Immunhistochemischer Nachweis der BrdU-Inkorporation in Pankreasproben von Mäusen beider Linien. Maßstableiste 100 μ m.

(B) Untersuchung von Proliferationsaktivität der azinären und dukталen Zellen durch die Ermittlung des Proliferationsindex. Der Proliferationsindex errechnet sich aus dem Anteil BrdU-positiver Zellen pro 1000 Pankreaszellen. * $p \leq 0,05$.

Zur Charakterisierung der Apoptose wurden immunhistochemische und Western Blot Analysen von beiden Mauslinien durchgeführt und die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen untersucht.

Als nächstes wurde die Apoptose durch den Nachweis der aktivierten Caspase-3 (*cleaved* Caspase-3) immunhistochemisch dargestellt. Caspase-3 liegt in ihrer inaktiven Form als Procaspase-3 mit einem Molekulargewicht von 32 kDa im Zytoplasma vor. In apoptotischen Zellen wird diese so genannte Effektorcaspase durch eine Spaltung in zwei Fragmente, p17 und p19, aktiviert. Die aktivierte Caspase-3 ist zytoplasmatisch nachweisbar, häufig überwiegt dabei aber eine perinukleäre Lokalisation, die bei der lichtmikroskopischen Auswertung wie eine Färbung innerhalb des Zellkerns erscheinen kann. Bei Durchsicht der gefärbten Pankreasschnitte von den 6 Monate alten Mäusen wird deutlich, dass verglichen mit den Kontrolltieren die Anzahl *cleaved* Caspase-3-positiver Zellen im Pankreas der *Ela-TGF α rela $^{\Delta/\Delta}$* Mäuse höher ist (Abbildung 21A). Der Nachweis von *cleaved* Caspase-3 in den 6 Monate alten *Ela-TGF α rela $^{\Delta/\Delta}$* Mäusen ließ sich durch Western Blot Analyse bestätigen.

Ergebnisse

Da zu den NF- κ B-Zielgenen die zwei wichtigen antiapoptotischen Regulatoren Bcl-2 und Bcl-x_L gehören (Kucharczak et al., 2003), wurde in weiteren Western Blot Analysen die Expression dieser Mitglieder der Bcl-2 Familie untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Protein Bcl-x_L in *Ela-TGF α rela^{Δ/Δ}* Mäusen herunterreguliert ist, während kein Unterschied in der Expression von Bcl-2 beobachtet werden konnte (Abbildung 21B).

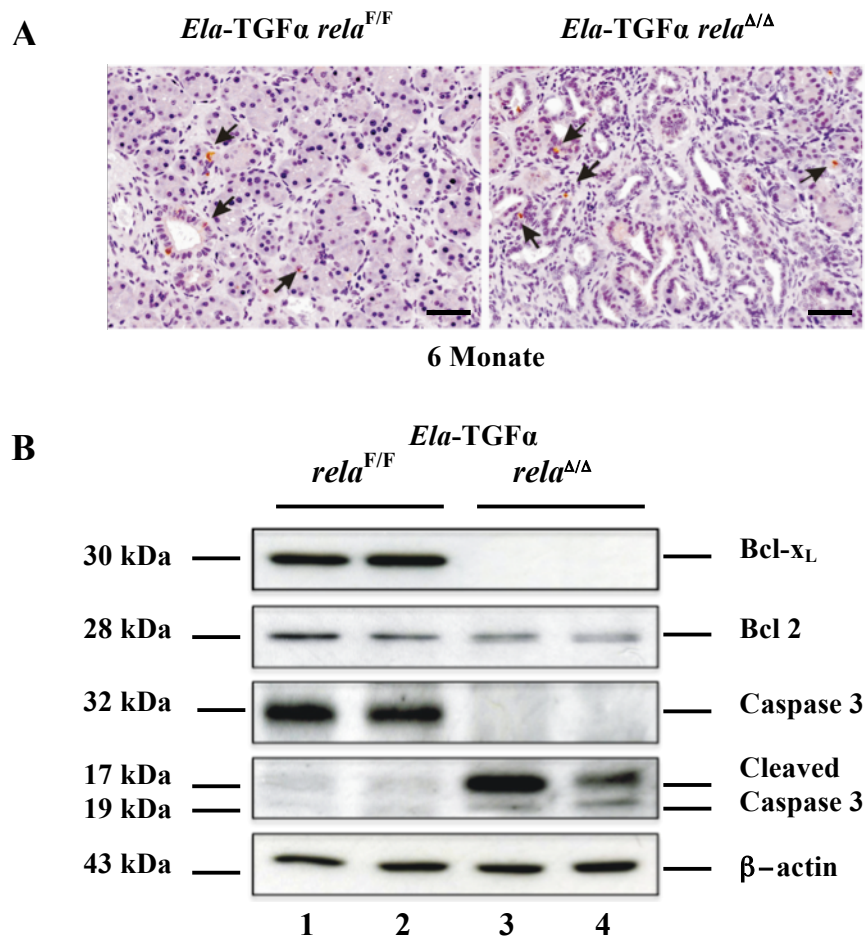


Abbildung 21: Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen in Pankreata 6 Monate alter *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela^{Δ/Δ}* Mäuse

A: Cleaved Caspase 3-positive azinäre und duktale Zellen (Pfeile). Maßstableiste 100 μ m.

B: Western Blot Analyse der Bcl-x_L, Bcl-2, Caspase3, *cleaved* Caspase 3 Proteine in Pankreaslysaten.

3.5 Azinär-duktales Metaplasie

Aus zahlreichen Studien ist es bekannt, dass die TGF α -Überexpression die Bildung von metaplastischen Strukturen *in vivo* induziert (Sandgren et al., 1990; Wagner et al., 1998; Wagner et al., 2002). Dieser Prozess ist mit der Fehlregulation embryonaler Signalwege

Ergebnisse

assoziiert. Rooman und Kollegen haben während der azinär-duktalem Transdifferenzierung *in vitro* gezeigt, dass Pdx-1 (pancreatic duodenal homeobox gene 1) induziert wird (Rooman *et al.*, 2000). Pdx1 gehört einer Familie von Transkriptionsfaktoren an und nimmt eine wichtige Funktion bei der Embryonalentwicklung des Pankreas ein. Im *Ela-TGF α* Mausmodell wurde auch die Überexpression von Pdx-1 festgestellt (Song *et al.*, 1999). Um die Auswirkung der Deletion von RelA/p65 in *Ela-TGF α* transgenen Mäusen auf die azinär-duktalem Metaplasie zu evaluieren, wurde die Expression von Pdx-1 in Pankreata der *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela^{Δ/Δ}* Mäuse immunhistochemisch nachgewiesen. Wie Abbildung 22 zeigt, sind mehr von den Pdx-1 positiven metaplastischen Strukturen in den 6 Monate alten *Ela-TGF α rela^{Δ/Δ}* Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zu sehen.

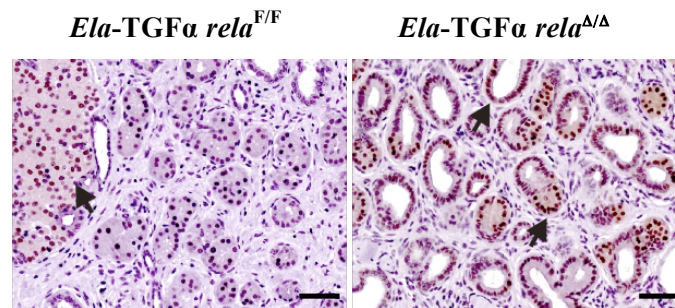


Abbildung 22: Pdx-1 Expression in Pankreata der 6 Monate alten *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela^{Δ/Δ}* Mäuse

Immunhistochemische Darstellung von Pdx-1 Expression (Pfeile) in metaplastischen Strukturen. Pdx-1 Expression in Inselzellen der *Ela-TGF α rela^{F/F}* Maus diente als Positivkontrolle.

Hedgehog Signaltransduktionsweg ist ein sehr wichtiger embryonaler Signalweg, dessen postnatale konstitutive Aktivierung zur Transformation von normalem Pankreasepithel führt (Thayer *et al.*, 2003). Transgene Mäuse mit der Überexpression von Shh unter der Kontrolle des Pdx-Promoters weisen muzinöse tubuläre Komplexen auf, die neoplastischen Läsionen des humanen Pankreaskarzinoms ähnlich sind. Im Anschluss an die bisherigen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die stärkere Bildung von tubulären Komplexen in *Ela-TGF α rela^{Δ/Δ}* Mäusen mit der postnatalen Fehlregulation der Shh-Signalkaskade verbunden ist. Histologisch ließ sich im Gegensatz zu *Ela-TGF α rela^{F/F}* Mäusen eine stärkere Überexpression von Shh in den 6 Monate alten *Ela-TGF α rela^{Δ/Δ}* Mäusen nachweisen (Abbildung 23).

Ergebnisse

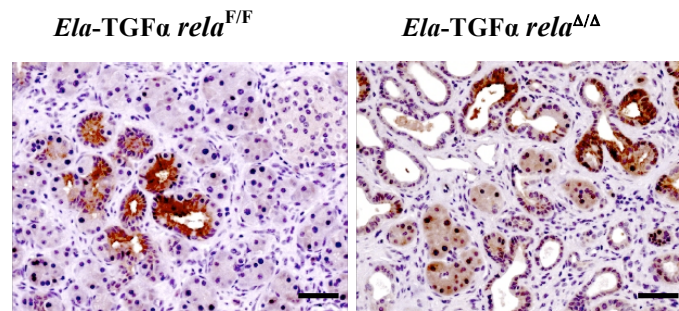


Abbildung 23: Shh-Expression in Pankreata der 6 Monate alten *Ela-TGFα rela^{F/F}* und *Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}* Mäuse

Immunohistochemischer Nachweis von Shh-Expression in repräsentativen Pankreasparaffinschnitten beider Mauslinien. Maßstableiste 100μm.

Da die Transduktion des Shh-Signals auf die jeweiligen Zielgene durch die Gli-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, wurde als nächstes geklärt, ob sich die Expression von Shh, Shh-Rezeptor Patched1 (Ptch1), Gli I und Gli III in beiden Mauslinien unterscheiden. Bei der q-RT-PCR Analyse der mRNA von 3 und 6 Monaten alten Mäusen wurde eine erhöhte Transkription von Shh bei den 3 Monate alten Mäusen und signifikant erhöhte Transkription von Gli 1, Gli 3 und Ptch1 zu beiden Zeitpunkten in *Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}* im Vergleich zu *Ela-TGFα rela^{F/F}* Mäusen festgestellt (Abbildung 24).

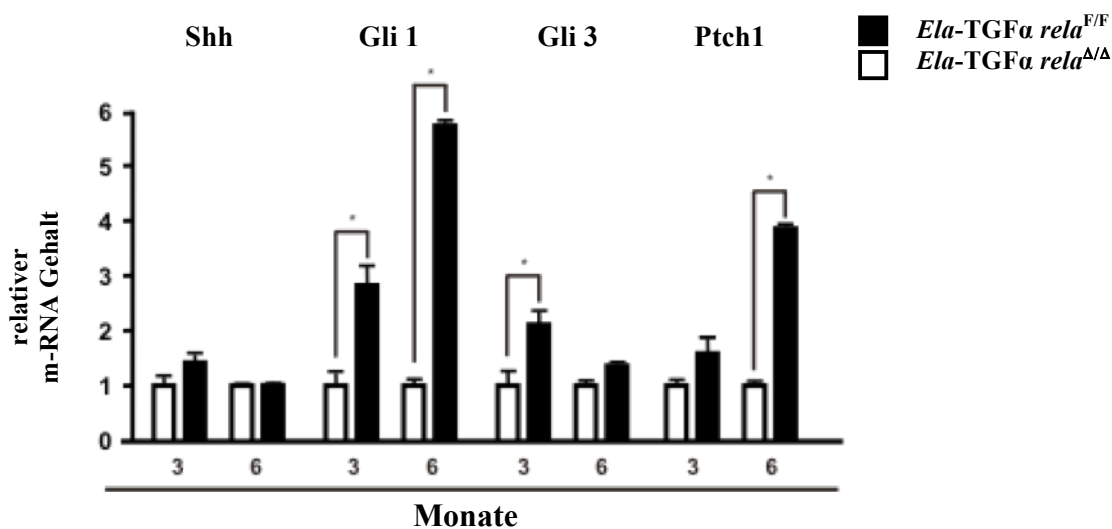


Abbildung 24: Analyse der m-RNA von Shh, Gli 1, Gli 3 und Ptch1 in *Ela-TGFα rela^{F/F}* und *Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}* Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten

mRNA Gehalt von Shh, Gli 1, Gli 3 und Ptch1 wurde in Pankreata mittels q-RT-PCR analysiert.

* $p \leq 0,05$.

Aus den vorliegenden Daten geht hervor, dass die postnatale Aktivierung der mit einer Transdifferenzierung assoziierten embryonalen Signalwege von NF-κB abhängig sein könnte. Um den Einfluß der gewebespezifischen Inaktivierung von RelA/p65 auf die Transdifferenzierung in Pankreas genauer analysieren zu können, wurde die azinär-dukta-

Ergebnisse

Umwandlung *in vitro* rekapituliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Techniken der Isolation pankreatischer azinärer Zellen und der Kultivierung dieser Zellen in Kollagenmatrix etabliert. Azinäre Zellen wurden von 5 Wochen alten geflochtenen *rela* ($rela^{F/F}$) und *rela*-defizienten ($rela^{\Delta/\Delta}$) Mäusen isoliert. Mittels Western Blot wurde die Expression von RelA/p65, α -Amylase (azinus-spezifischer Marker) und CK-8/18 (duktale Marker) in frisch isolierten Azini bestimmt. Wie die Abbildung 25A darstellt, wiesen Azini von $rela^{F/F}$ Mäusen das unveränderte Protein RelA/p65 auf, während in Azini von $rela^{\Delta/\Delta}$ Mäusen das verkürzte Fragment $\Delta p65$ detektierbar war. Azinäre Zellen von beiden Mauslinien wiesen die Expression von α -Amylase auf. Endstücke der intralobulären Duktuli, die zusammen mit Azini isoliert wurden, waren verantwortlich für den schwachen Nachweis von CK-8/18 Proteinen. Isolierte Azini wurden in Kollagenmatrix mit 50ng/ml rhTGF α 5 Tage behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Azini von beiden Mauslinien. Die Abbildung 25B stellt die frisch isolierten Azini und die metaplastischen Strukturen nach der Behandlung mit 50ng/ml rhTGF α mit dem Phasenkontrast-Verfahren dar. Die metaplastischen Veränderungen nach der Behandlung mit 50ng/ml rhTGF α konnten durch die Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden. Um die metaplastischen Strukturen charakterisieren zu können, wurde eine Doppelfärbung mit den azinus-spezifischen α -Amylase und duktal-spezifischen CK-19 Markern durchgeführt. Die Abbildung 25C zeigt am Tag 0 α -Amylase positive Azini und wenige CK-19-positive Endstücke der intralobulären Duktuli in beiden Linien. Nach 2-tägiger Behandlung mit rhTGF α wurden einige Zellen, die α -Amylase und CK-19 koexprimieren, in der $rela^{\Delta/\Delta}$ Linie beobachtet. Koexpression von α -Amylase und CK-19 wurde durch die gelben Signale, die sich aus Überlappung von grünen α -Amylase-positiven und roten CK-19-positiven Signalen resultieren, identifiziert. Am Tag 5 waren keine α -Amylase-positiven Zellen in beiden Linien zu sehen. Bei der Quantifizierung der duktalen Strukturen nach der Behandlung mit rhTGF α wurde deutlich, dass beide Zelllinien metaplastische Veränderungen aufwiesen, aber die Anzahl der duktalen Strukturen in $rela^{\Delta/\Delta}$ Azini ist höher als in $rela^{F/F}$ (Abbildung 25D).

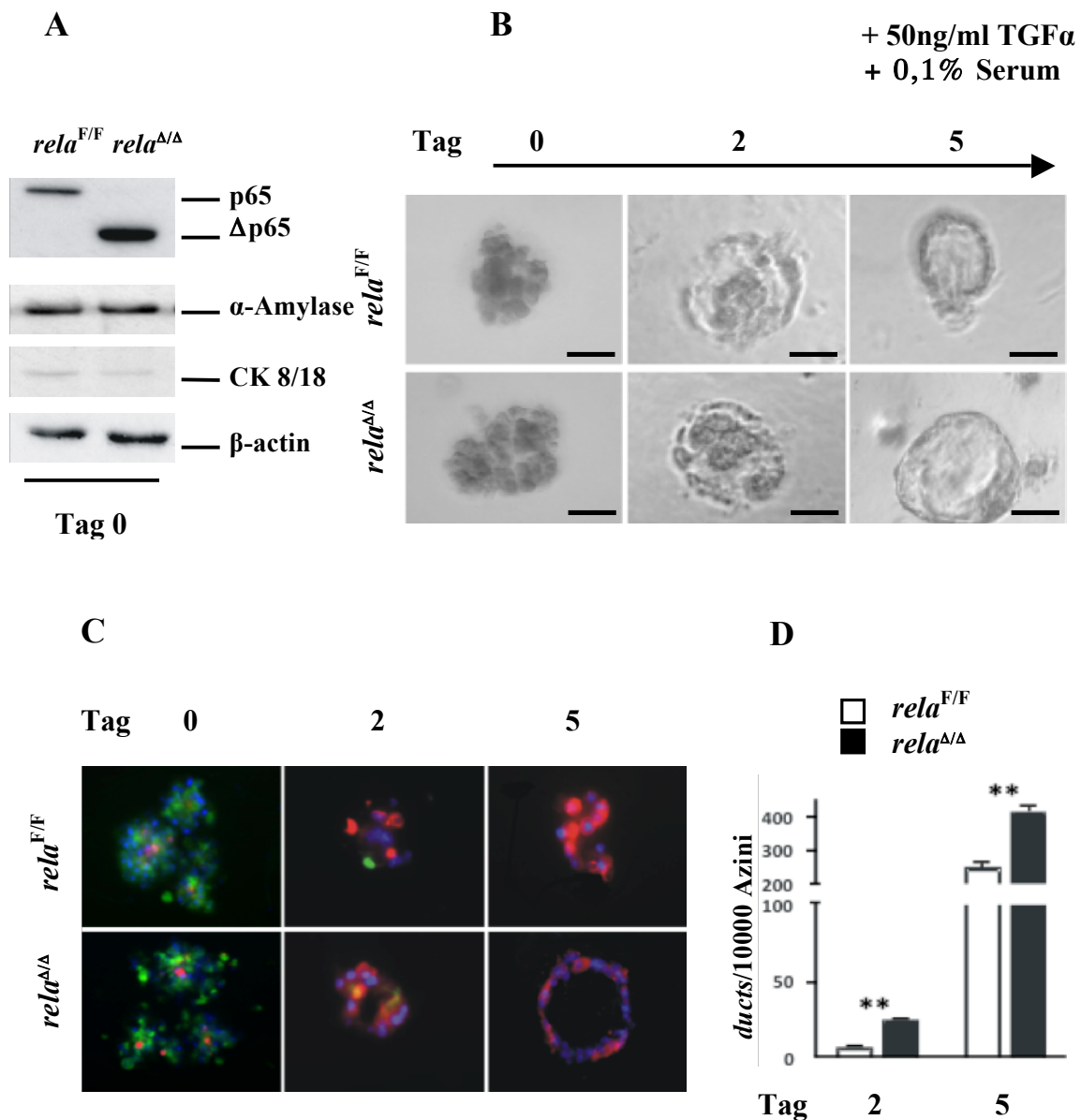


Abbildung 25: Azinär-duktales Metaplasie

(A) Western Blot Analyse der Expression von RelA/p65, α-Amylase und CK-8/18 in Proteinlysaten von frisch isolierten Azini der *rela^{F/F}* und *rela^{Δ/Δ}* Mäuse.

(B) Phasenkontrastdarstellung der frisch isolierten Azini (Tag0) und metaplastischen Strukturen nach 2- tägiger (Tag2) und 5-tägiger (Tag5) Behandlung mit 50ng/ml rh TGFα. Maßstableiste 50µm.

(C) Immunfluoreszenzfärbung der Azini und metaplastischen Strukturen (grün-α-Amylase; rot-CK-19; blau-Kerne).

(D) Quantifizierung der duktales Strukturen nach 2- tägiger (Tag2) und 5-tägiger (Tag5) Behandlung mit 50ng/ml rhTGFα. ** p<0,01.

3.6 Einfluss der pankreasspezifischen Inaktivierung von RelA/p65 auf die Überlebensdauer, Tumorinzidenz, und –morphologie der *Ela-TGF α* transgenen Mäuse

Als nächstes wurde untersucht, ob die Deletion von RelA/p65 Einfluss auf die Überlebensdauer der *Ela-TGF α* transgenen Mäuse hat. Dafür wurden zwei Mauskohorten angelegt und über mehrere Monate täglich überwacht. Dies erfolgte von den erfahrenen Tierpflegern des Tierbereiches des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforchung der Technischen Universität München. Der Tötungszeitpunkt wurde festgestellt, wenn das Verhalten der Tiere folgende Kriterien erfüllt: Apathie, auffällige Aggressivität, Atemstörung, Ausdruck starker Schmerzen, motorische Auffälligkeiten, abnorme Körperhaltung. Mäuse wurden nach diesen Kriterien durch Isofloran-Narkose unverzüglich getötet, die Organe wurden entnommen und analysiert. Damit konnte nicht nur die Überlebensdauer dokumentiert, sondern auch die Tumorinzidenz, und –morphologie bestimmt werden. Die statistische Analyse der Überlebensdauer erfolgte mittels Kaplan-Meier-Analyse und Log-rank-Test.

Abbildung 26 stellt die Überlebensanalyse beider Mauslinien dar. Dabei zeigte sich, dass das mediane Überleben der *Ela-TGF α rela $^{\Delta\Delta}$* Mäuse signifikant verlängert war und lag bei 720 Tagen im Vergleich zu 450 Tagen in der *Ela-TGF α rela $^{F/F}$* Mauslinie.

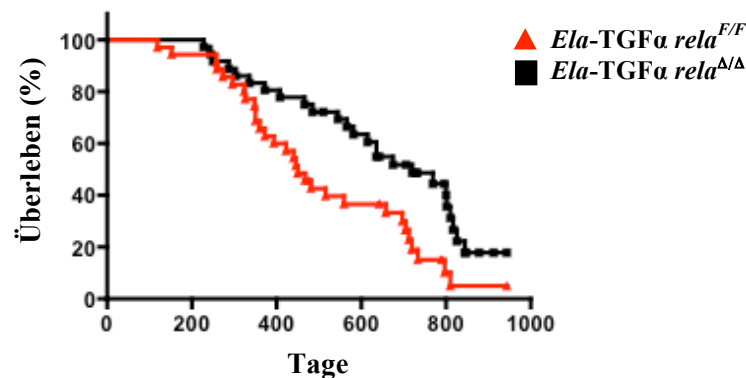


Abbildung 26: Überlebensanalyse von *Ela-TGF α rela $^{F/F}$* und *Ela-TGF α rela $^{\Delta\Delta}$* Mäusen

Das mediane Überleben der *Ela-TGF α rela $^{F/F}$* Mäuse lag bei 450 Tagen vs. 720 Tage in der *Ela-TGF α rela $^{\Delta\Delta}$* Mauslinie. **p=0,0064.

Die Tumorinzidenz beschreibt die Prozentzahl der Tumorträger unter den untersuchten Mäusen in einer Versuchsgruppe. Bei der Untersuchung von 20 *Ela-TGF α rela $^{F/F}$* Mäusen und 22 *Ela-TGF α rela $^{\Delta\Delta}$* Mäusen wurde ein statistisch signifikanter Effekt der funktionellen Inaktivierung von RelA/p65 im Pankreas *Ela-TGF α rela $^{F/F}$* auf die Tumorgenese festgestellt.

Ergebnisse

40% der *Ela-TGF α rela^{F/F}* Mäuse entwickelten Pankreastumore, die *Ela-TGF α rela ^{$\Delta\Delta$}* Gruppe wies hingegen eine Tumorzinzidenz von nur 4,5% auf (Abbildung 27).

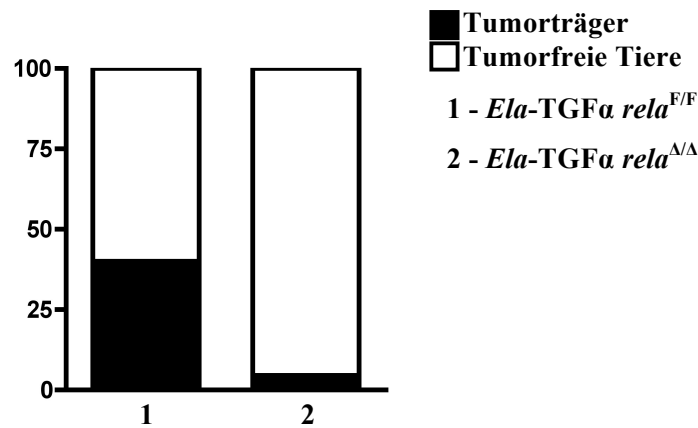


Abbildung 27: Tumorzinzidenz im Pankreas der *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela ^{$\Delta\Delta$}* Mausgruppen

40% der *Ela-TGF α rela^{F/F}* Mäuse entwickelten Pankreastumore, die *Ela-TGF α rela ^{$\Delta\Delta$}* Gruppe wies hingegen eine Tumorzinzidenz von nur 4,5% auf.

Von 42 entnommenen Tumoren wurden 3 μ m dicke Paraffinschnitte angefertigt und HE-gefärbt. Unter 20 von *Ela-TGF α rela^{F/F}* transgenen Mäusen stammenden Präparaten war 1 von 20 Biopsien undifferenziertes Karzinom (5%), 2 von 20 Biopsien waren Azinuszellkarzinome (10%), 2 von 20 Präparaten waren seröse Zystadenome (10%), 3 von 20 Biopsien waren muzinöse Zystadenome (15%). In der *Ela-TGF α rela ^{$\Delta\Delta$}* Gruppe wurde in einem Fall (4,5%) ein Intraduktales papillär-muzinöses Adenom diagnostiziert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Tumorentitäten in % der Gesamtzahl im Pankreas der *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela ^{$\Delta\Delta$}* Mausgruppen

Genotyp	Azinuszellkarzinome	Intraduktales papillär-muzinöses Adenome	Seröse Zystadenome	Muzinöse Zystadenome	Undifferenzierte Karzinome
<i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i>	10	0	10	15	5
<i>Ela-TGFα rela^{$\Delta\Delta$}</i>	0	4,5	0	0	0

Zusammenfassend kann man aus diesen Daten folgern, dass die *Ela-TGF α* transgenen Mäuse mit der funktionellen Inaktivierung von RelA/p65 ein statistisch hochsignifikant verlängertes Überleben ergaben und eine niedrigere Tumorzinzidenz aufwiesen.

3.7 Interaktion von RelA/p65 und p53 in der Entwicklung von Pankreaskarzinomen

3.7.1 Deletion von *Trp53* in der *Ela-TGF α rela Δ/Δ* Mauslinie

Da die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *Trp53* im ganzen Organismus zum Auftreten nicht nur von Pankreaskarzinomen, sondern auch von Lymphomen und Sarkomen führt, wurde eine homozygote Deletion des *Trp53*-Gens gezielt im Pankreas durchgeführt. Dazu wurde die homozygot gefloxt *Trp53*-Maus (*Trp53*^{F2-10/F2-10}), bei der die Exons 2-10 des *Trp53*-Gens mit den *loxP*-Stellen flankiert sind (Jonkers *et al.*, 2001), mit der *Ela-TGF α rela Δ/Δ* Maus gekreuzt. Nach Cre-vermittelter Exzision wurde der Abschnitt zwischen Exon 2 und 10 deletiert und damit das *Trp53*-Gen pankreasspezifisch inaktiviert. Dieser Ansatz diente dazu, die Funktion von RelA/p65 im Kontext einer additiven homozygoten Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *Trp53* in der *Ela-TGF α* transgenen Maus zu untersuchen.

Die Identifizierung der *Ela-TGF α* transgenen Tiere mit pankreasspezifischer Deletion der Exone 7 bis 10 des *rela* Gens und der Exons 2-10 des *Trp53*-Gens erfolgte durch die Analyse genomischer DNA. Nach einer Polymerase-Kettenreaktion wurden die Proben mit sequenzspezifischen Forward- und Reverse-Primern und der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente auf einem Agarosegel genotypisiert (Abbildung 28).

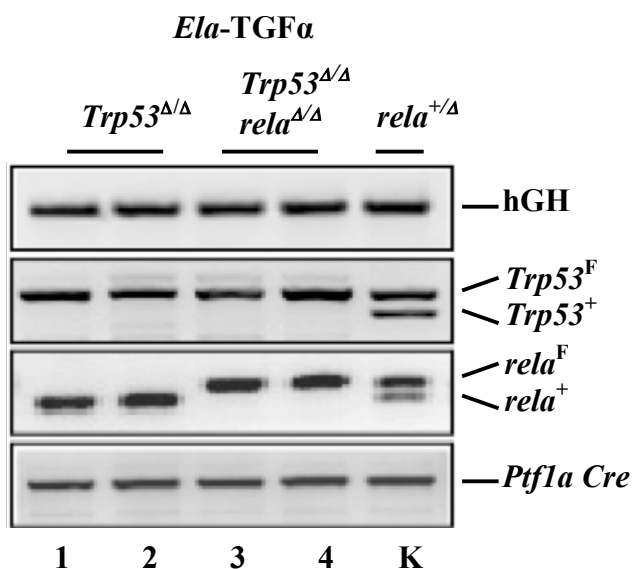


Abbildung 28: PCR Analyse genomischer DNA

DNA Proben von 1 Monate alten *Ela-TGF α Trp53 Δ/Δ* und *Ela-TGF α Trp53 Δ/Δ rela Δ/Δ* Mäusen wurden mit hGH (zeigt transgene Expression von TGF α) und *Ptf1a Cre* Primer getestet. *Trp53* und *rela*-Lokus wurden auf *loxP*-Sequenzen geprüft. Als Positivkontrolle (K) diente die genomische DNA einer *Ela-TGF α* transgenen heterozygot gefloxt *Trp53*; *rela* Maus (*Ela-TGF α Trp53 $^{+/Δ}$ rela $^{+/Δ}$*). Diese Maus zeigt transgene Expression von TGF α ; eine *Trp53* wt spezifische (288 bp) (*Trp53*⁺) und eine *Trp53 loxP* spezifische (370 bp) Bande (*Trp53*^F); eine *rela* wt spezifische (264 bp) (*rela*⁺) und eine *rela loxP* spezifische (298 bp) Bande (*rela*^F); eine Cre-Rekombinase spezifische Bande.

3.7.2 Effekt der pankreasspezifischen Inaktivierung von RelA/p65 auf die Überlebensdauer, Tumorinzidenz, und –morphologie der *Ela-TGF α* transgenen Mäuse mit zusätzlicher Deletion des *Trp53*-Gens

Um den Einfluss von RelA/p65 im Kontext einer pankreasspezifischen Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *Trp53* in der *Ela-TGF α* transgenen Maus auf die Überlebensdauer, Tumorinzidenz und –morphologie zu untersuchen, wurden zwei Mausgruppen (*Ela-TGF α Trp53 $^{\Delta/\Delta}$* und *Ela-TGF α Trp53 $^{\Delta/\Delta}$ rela $^{\Delta/\Delta}$*) analysiert (siehe Kriterien in 3.6). Die Kreuzung TGF α transgener Mäuse mit Mäusen mit pankreasspezifischer Deletion von *Trp53*-Gens beschleunigte die Entstehung der Pankreaskarzinome deutlich. Das mediane Überleben der *Ela-TGF α Trp53 $^{\Delta/\Delta}$* Mäuse war signifikant kürzer und lag bei 310 Tage im Vergleich zu 445 Tagen in der *Ela-TGF α* Mauslinie (Abbildung 29).

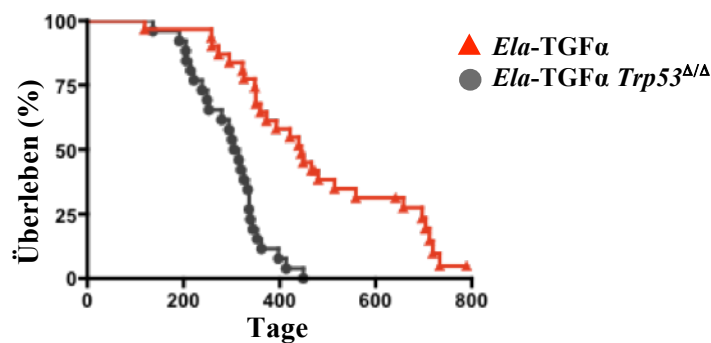


Abbildung 29: Überlebensanalyse von *Ela-TGF α* und *Ela-TGF α Trp53 $^{\Delta/\Delta}$* Mäusen

Das mediane Überleben der *Ela-TGF α* Mäuse lag bei 445 Tagen vs. 310 Tage in der *Ela-TGF α Trp53 $^{\Delta/\Delta}$* Mauslinie. *** $p < 0,0001$.

Zusätzliche pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 verlängert signifikant das mediane Überleben in der *Ela-TGF α Trp53 $^{\Delta/\Delta}$ rela $^{\Delta/\Delta}$* Mauslinie. Wie Abbildung 30 zeigt, lag das mediane Überleben in der *Ela-TGF α Trp53 $^{\Delta/\Delta}$ rela $^{\Delta/\Delta}$* Mauslinie bei 361 Tagen im Vergleich zu den *Ela-TGF α Trp53 $^{\Delta/\Delta}$* Mäusen, die 300 Tage lebten. Aus diesen Daten geht hervor, dass die protektive Funktion von NF- κ B/Rel Signalweg vom *Trp53*-Status unabhängig ist.

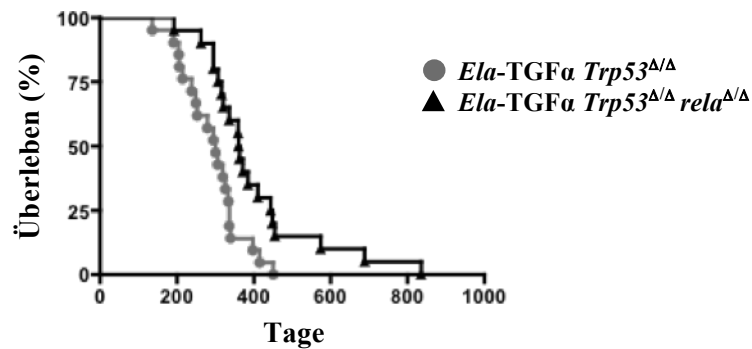


Abbildung 30: Überlebensanalyse von *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ}* und *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ} rela^{Δ/Δ}* Mäusen

Das mediane Überleben der *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ}* Mäuse lag bei 300 Tagen vs. 361 Tage in der *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ} rela^{Δ/Δ}* Mauslinie. **p<0,0043.

Pankreaskarzinome wurden in 100% der Fälle in beiden Mauslinien registriert. Unter 15 von *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ} rela^{Δ/Δ}* Mäusen stammenden Präparaten waren 11 Proben (73,3%) duktale Adenokarzinome, 1 von 15 Proben (6,67%) war undifferenziertes Karzinom, 1 von 15 Proben (6,67%) war Azinuszellkarzinom, 1 von 15 Proben (6,67%) war muzinöses Zystadenom, 1 von 15 Proben (6,67%) war seröses Zystadenom. Unter 12 von *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ}* Mäusen stammenden Präparaten waren 8 Biopsien (66,7%) undifferenzierte Karzinome, 3 von 12 Proben (25%) waren duktale Adenokarzinome, 1 von 12 Proben (8,3%) war Azinuszellkarzinom (Tabelle 3).

Tabelle 3: Tumorentitäten in % der Gesamtzahl im Pankreas von *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ}* und *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ} rela^{Δ/Δ}* Mäusen

Genotyp	Azinuszellkarzinome	Duktale Adenokarzinome	Seröse Zystadenome	Muzinöse Zystadenome	Undiff. Karzinome
<i>Ela-TGFα Trp^{Δ/Δ}</i>	8,3	25	0	0	66,7
<i>Ela-TGFα Trp^{Δ/Δ} rela^{Δ/Δ}</i>	6,67	73,3	6,67	6,67	6,67

Aus dieser histologischen Analyse kann geschlossen werden, dass die Inaktivierung von RelA/p65 einen Einfluss auf die Differenzierung der Karzinome nimmt. In Abbildung 31 sind repräsentative Fotos für duktale Adenokarzinome und undifferenzierte Karzinome dargestellt. Undifferenzierte Pankreaskarzinome werden auch als anaplastische oder sarkomatoide Karzinome bezeichnet (Peters, 2005). Das histologische Wachstumsmuster der anaplastischen

Ergebnisse

Pankreaskarzinome ist ungeordnet. Die Zellen sind groß und pleomorph. Tumoren mit sarkomatoidem Charakter bestehen aus spindeligen Zellen.

Immunhistochemisch sind die undifferenzierten Karzinome durch eine Expression von Vimentin charakterisiert. Diese weisen in der Regel als Zeichen ihrer Dedifferenzierung einen Verlust von Adhäsionsmolekülen auf, sodass E-Cadherin nicht oder nur in nichtmembranöser Lokalisation exprimiert wird (Abbildung 31).

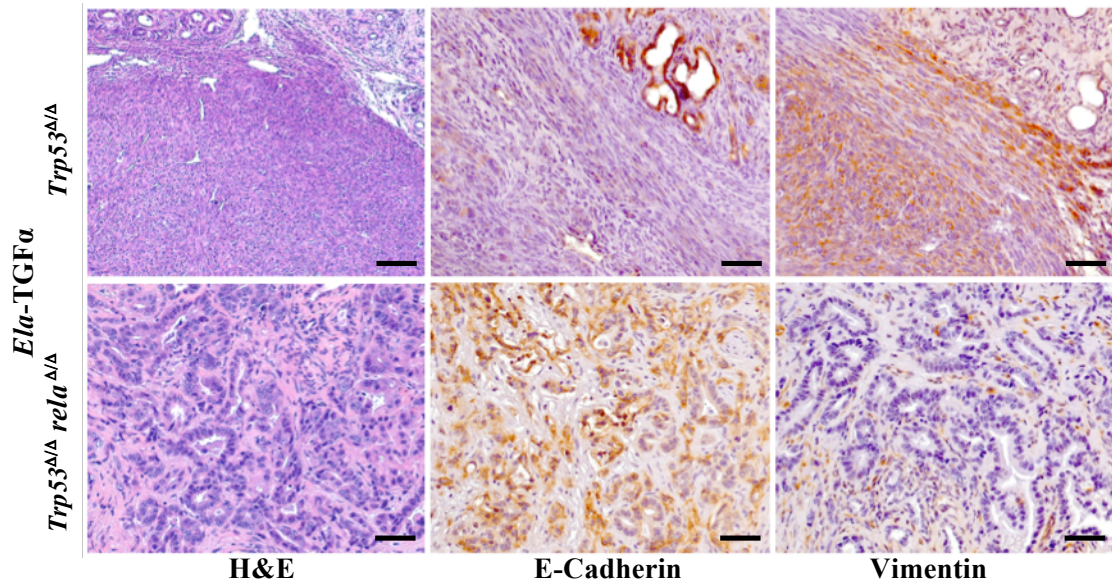


Abbildung 31: Histopathologische Analyse eines repräsentativen undifferenzierten Pankreaskarzinoms von einer *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ}* Maus und eines duktales Pankreaskarzinoms von einer *Ela-TGFα Trp53^{Δ/Δ} rela^{Δ/Δ}* Maus

Pankreaskarzinome wurden mittels Immunhistochemie mit E-Cadherin und Vimentin Antikörper charakterisiert. Maßstableiste 100 μ m.

Zusammengenommen bestätigen und erweitern diese Ergebnisse frühere Befunde über einen kausalen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des NF- κ B Signalweges und der Entdifferenzierung der Pankreaskarzinomen.

4. Diskussion

Eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B wurde im Pankreaskarzinom (Weichert et al., 2007) aber auch in anderen Tumoren beobachtet, einschließlich Melanom (Dhawan and Richmond, 2002; Ueda and Richmond, 2006), Kolonkarzinom (Scartozzi et al., 2007), nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (Tew et al., 2008), Adenokarzinom des Ösophagus (Izzo et al., 2007), Leukämie (Fabre et al., 2007), Lymphom (Zhang et al., 2007) und multiples Myelom (Annunziata et al., 2007; Ni et al., 2001). Aus Untersuchungen an humanen Pankreaszelllinien ist bekannt, dass die aberrante Aktivierung des IKK-Komplexes eine entscheidende Rolle für die erhöhte konstitutive NF- κ B-Aktivität spielen kann. Dies führt zu einer Phosphorylierung und anschließender Degradation der I κ B-Proteine und verhindert eine effiziente NF- κ B-Inhibition (Liptay et al., 2003). Wodurch die Aktivierung von NF- κ B zum malignen Phänotyp des Pankreaskarzinoms beiträgt, ist bislang wenig verstanden. Zahlreiche Studien zeigten, dass Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie durch ihre Bedeutung für Proliferation, Apoptose und Differenzierung an den Prozessen der Onkogenese beteiligt sein können. Um die Rolle des NF- κ B-Effektorproteins RelA/p65 in der Pankreaskarzinogenese *in vivo* analysieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit *Ela-TGF α* transgene Mäuse Mauslinien mit zusätzlicher funktioneller Inaktivierung der Untereinheit RelA/p65 im Pankreas etabliert und eingehend untersucht.

4.1 Einfluss von RelA/p65 auf die Apoptose im *Ela-TGF α* Mausmodell

Eines der Merkmale von malignen Tumoren ist die Apoptoseresistenz, welche wesentlich zu der neoplastischen Proliferation beiträgt. Der programmierte Zelltod kann extrinsisch über Todesrezeptoren sowie intrinsisch über die Mitochondrien und das Endoplasmatische Reticulum vermittelt werden. So blockieren beispielsweise extrinsische Apoptose-Inhibitoren die Aktivierung von Effektorcaspasen, die im Zuge der Apoptose zelluläre Substrate spalten, während intrinsische Regulatoren die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol fördern, was zu einer Aktivierung von den Zelltod fördernden Caspasen führt (Harada and Grant, 2003). Die Apoptoseresistenz von Tumoren kann sowohl mit einer Überexpression von antiapoptotischen Genen als auch mit Dysregulation oder Mutationen von proapoptotischen Faktoren vergesellschaftet sein (Basseres and Baldwin, 2006). NF- κ B ist als wichtiger Regulator der Apoptose bekannt. Hierbei beeinflusst der NF- κ B Signalweg antiapoptotische Mechanismen über die direkte und indirekte Regulation entsprechender

Diskussion

Zielgene, welche die über Todesrezeptoren vermittelte Apoptose (1) oder den mitochondrialen Apoptoseweg (2) inhibieren. Zu der ersten Gruppe der antiapoptotischen Faktoren gehören IAPs 1 und 2, XIAP, cFLIP, TRAF 1 und TRAF 2 (Beyaert et al., 2000; Hyer et al., 2006; Luo et al., 2005; Srinivasula and Ashwell, 2008). Die zweite Gruppe umfasst antiapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie, dazu gehören sowohl Bcl-x_L und Bcl-2, die den apoptotischen Zelltod unter Stabilisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) inhibieren, als auch A1 und A20 (Luo et al., 2005; Naugler and Karin, 2008; Tergaonkar, 2006). Ein kausaler Zusammenhang zwischen NF- κ B Aktivierung und der verminderten Apoptose wurde in zahlreichen Studien gezeigt (Carvalho et al., 2007; Liptay et al., 2003; Pikarsky et al., 2004; Rae et al., 2007). Erhöhte Expression von Bcl-x_L ließ sich in humanen Zelllinien durch dominant negatives I κ B α unterbinden. In diesen Experimenten war eine Regulation von Bcl-2 selbst jedoch nicht nachzuweisen (Chen et al., 2000). Unter den Caspaseinhibitoren ist für XIAP eine NF- κ B-Abhängigkeit beschrieben, dessen Expression sich wiederum durch Überexpression von dominant negativem I κ B α in Endothelzellen hemmen lässt (Stehlik et al., 1998). Ähnliches gilt für Survivin, ein in humanen Neoplasien häufig überexprimiertes Mitglied der IAP-Familie (Kawakami et al., 2005). In humanen T-Zellen betrifft dies auch c-IAP2, nach Stimulation mit TNF- α wurde hier ein positiver Feedback Mechanismus gezeigt, der wiederum zur c-IAP2 abhängigen Stimulation von NF- κ B führt (Chu et al., 1997). In Pankreastumorzelllinien von TGF α transgenen Mäusen, bei denen p53 heterozygot inaktiviert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass durch die Hemmung des NF- κ B Signalweges in diesen Zellen Bcl-x_L herunterreguliert wird und die Zellen anfällig für die Apoptose werden (Greten et al., 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Apoptose-assoziierten Proteine *in vivo* bestätigen diesen Befund. Im Einklang damit wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von RelA/p65 im Pankreas der 6 Monate alten TGF α transgenen Mäuse die Induktion von Bcl-x_L verhindert und somit zur verstärkten Apoptose führt. Es wurde zusätzlich in *Ela*-TGF α *rela* ^{Δ/Δ} Mäusen die Expression der aktivierten Caspase-3, eines der Haupteffektoren der Apoptose, nachgewiesen. Aktivierte Caspase-3 degradiert Apoptose-spezifische Substrate in der Zelle und führt damit zum Abbau der Zelle in den späten Schritten der Apoptose. Diese Daten zeigen, dass NF- κ B in dem TGF α transgenen Mausmodell Apoptose über den mitochondrialen Weg inhibiert.

4.2 Einfluss von RelA/p65 auf die Proliferation im *Ela*-TGF α Mausmodell

Zu den zellulären Prozessen, die an der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen beteiligt sind, gehören wachstumsfaktorunabhängige Proliferation und eine Resistenz gegenüber Signalen, die unter physiologischen Bedingungen zum Wachstumsarrest führen (Hanahan and Weinberg, 2000). Eine Fehlregulation der Signalwege, die in die Zellzyklusregulation involviert sind, findet sich in nahezu jedem soliden Tumor, so auch im Pankreaskarzinom (Rozenblum et al., 1997). Als kritisches Ereignis im Verlauf der Tumorgenese wird dabei das Verlassen des Ruhestadiums G0 und der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase angesehen, in der die DNA repliziert wird. Der Eintritt in jede Phase sowie die weitere Progression des Zellzyklus wird durch komplexe Interaktionen zwischen regulatorischen Elementen, den Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen reguliert (Ivanchuk and Rutka, 2004), deren Expression durch mitogene Signale beeinflusst werden kann. Es wurden unterschiedliche Mechanismen beschrieben, wie die Mitglieder des NF- κ B-Signalweges die Proliferation der Tumorzellen steuern (Kim et al., 2006). Durch die Bindung an den Promotor des zellzyklusrelevanten Cyclin D1 Gens kann NF- κ B die Transkription dieses Gens regulieren. Überexpression von Cyclin D1 beschleunigt die Transition von der G1 in die S-Phase indem das G1-Übergangs kontrollierende Protein Retinoblastom phosphoryliert wird, was zu einer funktionellen Inaktivierung von Rb führt (Yang et al., 2010). Störungen in der NF- κ B Aktivierung führen zu einem verzögerten G1-S Phase Übergang und somit zu einem verlangsamten Zellzyklus.

Die Untersuchung der Proliferationsaktivität von Pankreaszellen erfordert eine geeignete experimentelle Nachweismethode. Ein Nachteil vieler Zellzyklusmarker besteht darin, dass sie nur einen indirekten Nachweis der DNA-Synthese bieten und oft in sich nicht teilenden Zellen exprimiert werden. Die DNA-Synthese wird daher normalerweise durch Inkorporation modifizierter Deoxyribonukleotide (z.B. BrdU) nachgewiesen. Die quantitative Analyse der Proliferation mit Hilfe der BrdU-Inkorporation in *Ela*-TGF α *rela* ^{$\Delta\Delta$} Mäusen zeigte sich signifikant reduziert. Diese mit NF- κ B/RelA Hemmung assoziierte Proliferationsstörung könnte den zunehmenden Verlust von Azinuszellen in der *Ela*-TGF α transgenen Mäusen nach der pankreasspezifischen Inaktivierung von RelA/p65 erklären.

4.3 Rolle von RelA/p65 bei der Pankreasfibrosierung in *Ela*-TGF α Mäusen

Wie bereits in Untersuchungen an *Ela*-TGF α transgenen Mäusen dargelegt werden konnte,

Diskussion

führt die TGF α -Überexpression zu deutlichen morphologischen Veränderungen im Pankreas, die sich unter anderem in eine massive Fibrosierung manifestieren (Bockman and Merlino, 1992; Schmid et al., 1999). Die Organfibrose stellt eine Störung des Gleichgewichts von Deposition und Degradation von Extrazellulärmatrix dar. Verantwortlich für die Produktion von Proteinen der Extrazellulärmatrix wie fibrilläre Kollagene (Typ I und III) sowie das Glycoprotein Fibronectin sind im wesentlichen pankreatische Sternzellen (PSCs), die durch verschiedene Faktoren, beispielsweise TGF α , TGF β , bFGF, PDGF und proinflammatorische Zytokine stimuliert werden können (Bachem et al., 2006; Masamune and Shimosegawa, 2009; Schneider et al., 2001). Die aktivierten PSCs wechseln ihren Phänotyp zu proliferierenden myofibroblastenähnlichen Zellen, die α -SMA exprimieren. α -SMA ist ein intrazelluläres Protein, welches in Zellen der glatten Muskulatur, Myofibroblasten und Myoepithelzellen vorkommt. Es wird im gesunden Pankreas nur in geringen Mengen gefunden. Sein Vorkommen beschränkt sich normalerweise auf vaskuläre glatte Muskelzellen. Obwohl in mehreren Studien die Produktion, Zusammensetzung und Lokalisation der extrazellulären Matrix bei Pankreaserkrankungen untersucht wurde, sind die zugrundeliegenden zellulären, molekularen und biochemischen Zusammenhänge, die zu einer gesteigerten Matrixsynthese und damit Pankreasfibrose führen, immer noch ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der Pankreasfibrosierung beim *Ela*-TGF α transgenen Mausmodell durch die Analyse der mRNA von Fibrose-assoziierten Genen und Masson-Trichrom-Färbung untersucht. Die Daten zeigten, dass die extrazelluläre Matrix im Pankreas beider Genotypen schon zu frühen Zeitpunkten im Vergleich zum Wildtyp verändert ist. Das Pankreas der 4 Wochen alten Mäuse zeigte eine beginnende Fibrosierung, die extrazelluläre Matrix bestand hauptsächlich aus Fibronectin, Kollagen Typ I und Kollagen Typ III. Zum Zeitpunkt 3 Monate führt die pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 in den *Ela*-TGF α transgenen Mäusen zur signifikanten Expressionssteigerung von α -SMA. Fibronectin und Kollagen I sind die vorherrschenden Komponenten extrazellulärer Matrix in *Ela*-TGF α *rela*^{ΔΔ} Mäusen. Es wurde kein Unterschied im Expressionsniveau von Kollagen III in beiden Genotypen beobachtet. Die Masson-Trichrom-Färbung bestätigt die früher beginnende und zunehmende extrazelluläre Matrixablagerung im Pankreas der *Ela*-TGF α *rela*^{ΔΔ} Mäuse im Vergleich zu *Ela*-TGF α *rela*^{F/F} Mäusen. Darüber hinaus zeigten die *Ela*-TGF α *rela*^{ΔΔ} Tiere gegenüber den *Ela*-TGF α *rela*^{F/F} Mäusen eine signifikante Abnahme des relativen Pankreasgewichtes.

Neben den oben beschriebenen Faktoren spielen auch von aktivierten Sternzellen produzierte Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren spezifische Gewebeinhibitoren eine bedeutende

Rolle für die Balance der Matrixproteine, wobei die Pankreasfibrose ein dynamischer Prozess mit verändertem Gleichgewicht von Synthese und Abbau der extrazellulären Matrix ist. TIMP-1 und TIMP-2 hemmen sowohl inaktive als auch aktivierte Metalloproteinasen und verhindern damit die Degradation der extrazellulären Matrix. Die durchgeführte qRT-PCR Analyse von Pankreata der *Ela-TGF α rela^{Δ/Δ}* und *Ela-TGF α rela^{F/F}* Mäuse zu den Zeitpunkten 1 und 3 Monate zeigte keinen Unterschied in der Expression von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 zwischen beiden Genotypen. Die alleinige Hemmung von RelA/p65 in den *Ela-TGF α* transgenen Mäusen hat möglicherweise keinen direkten Einfluss auf die Expression von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 auf mRNA-Ebene.

Die Erklärung für unsere Ergebnisse der Untersuchungen zur Pankreasfibrosierung könnte in einer deutlich erhöhten Apoptose in *Ela-TGF α* transgenen Mäusen mit pankreasspezifischer Inaktivierung von RelA/p65 liegen. Möglicherweise führt die Pankreaszellapoptose zu einer dynamischen Kaskade von Reaktionen. Es beginnt mit einer Aktivierung von Makrophagen, gefolgt von der Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und der Aktivierung von normalerweise im Ruhezustand befindlichen PSCs zu proliferierenden Myofibroblasten. Makrophagen, die apoptotische Zellen und/oder apoptotische Körper aufgenommen haben, scheinen eine gesteigerte Synthese von TGF β 1, der als fibrogener Mediator wirkt, zu zeigen (Fadok et al., 1998). Dies führt zur parakrinen Stimulation von PSCs (Schmid-Kotsas et al., 1999). Verschiedene *in vitro* erhobene Befunde deuten zusätzlich auf autokrine Stimulationsmechanismen bei PSCs hin (Schneider et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass PSCs nicht nur einer parakrinen Wirkung von fibrogenen Mediatoren ausgesetzt sind, sondern den matrixstimulierenden Faktor TGF β 1 selbst synthetisieren und TGF β Rezeptoren exprimieren. Der Nachweis autokriner Stimulationsmechanismen bei PSCs gibt möglicherweise einen Hinweis darauf, dass die Fibrogenese weiterhin aufrechterhalten werden kann, obwohl die auslösende Noxe nicht mehr besteht. Um das genaue Zusammenspiel verschiedenster Faktoren sowie die Komplexität der Entstehung und Beeinflussung von Fibrose im Pankreas zu verstehen werden weitere Studien benötigt.

4.4 Die Rolle von RelA/p65 in Transdifferenzierungsprozessen im Pankreas der *Ela-TGF α* Mäuse

Die Überexpression des Wachstumsfaktors TGF α im Pankreas resultiert bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung von tubulären Komplexen. Diese tubulären Strukturen sind intermediäre Formen zwischen azinären und duktalem Zellen, die auf eine azinär-duktalem

Diskussion

Metaplasie hindeuten (Schmid et al., 1999).

Unter einer Metaplasie wird die Umwandlung eines differenzierten Gewebes in ein anderes differenziertes Gewebe verstanden. Hervorgerufen werden Metaplasien durch chronische Reizzustände (entzündlich, chemisch, hormonal, mechanisch). Es gibt verschiedene Wege, wie eine Metaplasie zustande kommen kann. Bei der Transdifferenzierung wandeln sich ausdifferenzierte Zellen in ausdifferenzierte Zellen eines anderen Typs um (bzw. über eine Zwischenstufe). Bei der Differenzierung von Stammzellen werden so genannte Progenitorzellen aufgrund einer chronischen Reizung in ein auf den jeweiligen Reiz resistenteres Gewebe umgewandelt. Noch ein Weg ist selektive Proliferation oder Verlust von Zellen eines bestimmten Typs (Slack and Tosh, 2001; Tosh and Slack, 2002). Eine Metaplasie ist prinzipiell reversibel, jedoch kann sich bei bestehendem Reiz eine Dysplasie (intraepitheliale Neoplasien) entwickeln (Hruban et al., 2001; Lowenfels et al., 2000; Parsa et al., 1985). Beim Adenokarzinom im distalen Ösophagus geht häufiger eine lang andauernde gastroösophageale Refluxkrankheit mit nachfolgender Umwandlung des Plattenepithels in das magenschleimhautähnliche Zylinderepithel eines Barrett-Ösophagus voraus (Saas, 1999). Mehrere Studien sprechen für die Fähigkeit von ausdifferenzierten azinären Zellen im Pankreas zur Transdifferenzierung in metaplastische duktale Strukturen (Means et al., 2005; Rooman et al., 2000; Rooman et al., 2002; Rooman et al., 2001; Sphyris et al., 2005; Strobel et al., 2007; Wagner et al., 1998). Azinär-duktales Metaplasie wurde in experimentellen Mausmodellen beobachtet, unter anderem bei der Caerulein-induzierten Pankreatitis (Elsasser et al., 1986), nach Obstruktion des Pankreasganges (Rooman et al., 2002; Rooman et al., 2001), nach subtotaler Pankreatektomie (Plachot and Portha, 2001) und in der *Ela-TGF α* transgenen Maus (Schmid et al., 1999). Azinäre Zellen, in denen TGF α überexprimiert wird, verlieren ihre Zymogengranula und werden zu Übergangszellen, die anschließend Merkmale duktaler Zellen erhalten (Schmid et al., 1999). Ob diese Reprogrammierung von Azini in duktales Zellen *in vivo* von RelA/p65 abhängig ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft. Durch histologische Untersuchungen von metaplastischen Strukturen und experimentelle Induktion der Transdifferenzierung konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Pdx1 und der Hedgehog Signaltransduktionsweg für die Transformation von Pankreasepithel essenziell zu sein scheinen (Eberhard and Tosh, 2008; Rooman et al., 2000; Thayer et al., 2003). Unsere immunhistologische Untersuchungen bestätigen, dass die metaplastischen Strukturen in den 6 Monate alten Mäusen beider Genotypen Pdx-1 exprimieren. Dies steht in Einklang mit einer von Song (Song et al., 1999) veröffentlichten Studie, die zeigte, dass die azinär-duktales Metaplasie in *Ela-TGF α* transgenen Mäusen mit

Diskussion

einer Überexpression von Pdx-1 assoziiert ist.

Die Hedgehogaktivität steht in einem engen Zusammenhang mit der Organogenese des Pankreas. Der Signalweg ist im Pankreas einer adulten Maus kaum aktiv. Unter physiologischen Bedingungen wird der Shh-Rezeptor Patched1 in duktalem Zellen exprimiert. Die Expression von anderen Mitgliedern dieser Kaskade, wie Ihh, Patched2 und Smo konnte in Inselzellen gezeigt werden. In azinären Zellen kommt es nicht zu einer Expression von Komponenten des Hedgehog Signalweges (Lau et al., 2006). Die postnatale Deregulierung von diesem Signalweg kann zur Metaplasie und letztendlich zur Neoplasie führen. Shh, ein zentraler Ligand, wurde als ein Initiator der Pankreasneoplasie identifiziert (Thayer et al., 2003). Unsere immunhistochemischen Untersuchungen von Pankreata der *Ela-TGF α* transgenen Mäuse deuten darauf hin, dass die Reaktivierung der Hh-Signalkaskade in diesem Mausmodell ein frühes Ereignis bei der Entwicklung von metaplastischen Strukturen darstellt. Die Expression von Shh steht nach unseren Ergebnissen aber nicht unter dem Einfluss von RelA/p65. Es wurde keine Korrelation zwischen der Hemmung von RelA/p65 und der Expression von Shh im Pankreas *Ela-TGF α* transgenen Mäusen zu den Zeitpunkten von 3 und 6 Monaten nachgewiesen. Die Expression von Ptch1 hingegen ist in *Ela-TGF α rela $\Delta\Delta$* Mäusen signifikant höher. Dieser Effekt könnte durch die deutliche Vermehrung von duktalem Strukturen nach NF- κ B Hemmung in *Ela-TGF α* transgenen Mäusen zu erklären sein. Die erhöhte Ptch1-Expression vermittelt einen negativen Rückkopplungsmechanismus und trägt wesentlich zur Regulation der Signalkaskade bei.

Um die Frage, inwieweit RelA/p65 für die azinäre Transformation wichtig ist, genauer zu klären, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro* Modell etabliert, das die azinär-duktalem Metaplasie rekapituliert. Isolierte Azini von *gefloxten rela* und *rela $\Delta\Delta$* Mäusen wurden im Kollagengel kultiviert, das teilweise Extrazellulärmatrix imitiert, dies könnte auch von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellen sein. In diesen Experimenten sind duktalem Strukturen aus Azini beider Mauslinien nach der Behandlung mit rtTGF α entstanden. Für die Untersuchung des Differenzierungsstatus der Zellen wurden azinus- und duktalem spezifische Marker analysiert. Mittels dieses Transdifferenzierungs-Assays konnte gezeigt werden, dass:

- in *Ela-TGF α* transgenen Mäusen azinäre Zellen ein Ausgangspunkt für Metaplasie sind;
- sich bei der Transdifferenzierung *in vitro* ausdifferenzierte Azinuszellen nach Stimulation mit rtTGF α über eine Zwischenstufe in ausdifferenzierte duktalem Zellen umwandeln (Abbildung 32);

Diskussion

- die azinär-duktaile Transdifferenzierung durch Inaktivierung von RelA/p65 positiv beeinflusst wird.

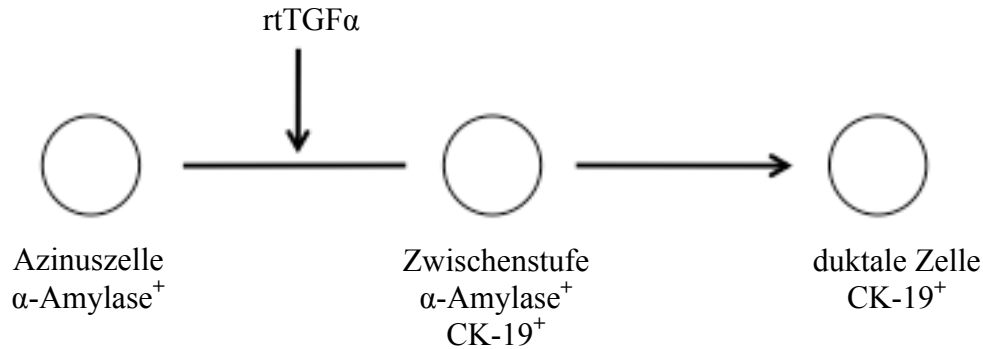


Abbildung 32: Schematische Darstellung der azinär-duktailen Transdifferenzierung *in vitro* nach der Behandlung mit rtTGF α . Azinuszellen exprimieren spezifischen Marker α -Amylase. Duktale Zellen exprimieren spezifischen CK-19 Marker. Zwischenstufe koexprimiert beide Marker: Azinuszell-spezifische α -Amylase und duktalespezifisches CK-19.

Die Quantifizierung der entstandenen CK-19 positiven metaplastischen Strukturen hat ergeben, dass die Deletion von RelA/p65 in Azini in einer deutlich erhöhten Bildung von duktailem Strukturen resultierte. Diese Ergebnisse lassen eine protektive Wirkung von RelA/p65 bei Zellstress vermuten. Dies steht möglicherweise im Einklang mit einer von Algül (Algül et al., 2007) publizierten Studie, in der ein Zusammenhang zwischen RelA/p65 Aktivität und der Caerulein-vermittelten Pankreatitis entdeckt wurde. Darin wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung von RelA/p65 die Azinuszelle schützt.

4.5 Bedeutung von RelA/p65 für die Karzinogenese im Pankreas der *Ela-TGF α* Mäuse

Zu den Zielgenen des Heterodimers RelA/p65 gehören solche, die sowohl pro- als auch antiapoptotische Prozesse regulieren, den Zellzyklus positiv beeinflussen, invasives Wachstum fördern, aber auch zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie führen. Darüber hinaus scheint NF- κ B/Rel für die Ras-vermittelte Transformation in verschiedenen Zelllinien unabdingbar zu sein (Dajee et al., 2003; Hanson et al., 2004). Dies legt daher die zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors (als Tumorsuppressor oder Tumorpromoter) in der Entwicklung von Tumoren nahe. Die Bedeutung des NF- κ B/Rel Signalweges für die

Diskussion

Karzinogenese belegen zahlreiche Untersuchungen an Tumorzelllinien, aber auch an murinen Tumormodellen. Diese Studien legen sowohl eine tumorfördernde, als auch eine inhibierende Rolle des IKK/NF- κ B Signalweges in der Onkogenese nahe. Die Deletion oder Inhibierung von IKK β in Hepatozyten oder Leberkarzinomzellen fördert deren Proliferation und steigert das onkogene Potential (He et al., 2010; Maeda et al., 2005). Spezifische Inhibierung des NF- κ B Signalweges durch die Inaktivierung von Nemo/IKK γ in Hepatozyten hat den gleichen Effekt (Luedde et al., 2007). Die Inaktivierung von IKK β in intestinalen Epithelzellen in einem Kolitis-assoziierten Karzinommodell führt hingegen zur reduzierten Tumorzinzidenz (Greten et al., 2004). Es wurde auch gezeigt, dass die Inaktivierung von IKK β die Progression der H-Ras-induzierten Melanoms inhibiert (Yang et al., 2010). Die Inhibierung des NF- κ B Signalweges in einem Lungenkarzinommodell resultiert ebenso in einer signifikant reduzierten Tumorentwicklung (Meylan et al., 2009). In der kürzlich publizierten Studie wurde gezeigt, dass die pankreasspezifische Inaktivierung von IKK β zur Rolle des NF- κ B/Rel Signalweges eine tumorfördernde Wirkung des IKK/NF- κ B Signalweges nahe legt (Daniluk et al., 2012; Ling, 2012; Maniati et al., 2011). Ob die IKK-assoziierten tumorfördernden Effekte nur durch den Downstream-Effektor des klassischen Signalweges RelA vermittelt werden, ist nicht geklärt. Denkbar ist auch, dass IKK zusätzlich weitere Signalwege aktiviert und somit NF- κ B unabhängige Effekte vermittelt. Bisher fehlen Studien, die eine Bedeutung der NF- κ B-Untereinheiten RelA in der Pankreaskarzinogenese untersuchen (Perkins, 2012). Im *Ela-TGF α* Mausmodell führt die Inaktivierung von RelA tatsächlich zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit. Damit kann postuliert werden, dass der klassische NF- κ B/Rel Signalweg im *Ela-TGF α* Mausmodell als Tumorpromoter wirkt.

Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von NF- κ B und p53 in der Regulation der Tumorentwicklung und -progression wichtig ist (Finkel et al., 2007; Hanahan and Weinberg, 2000; Karin, 2006). p53 kann die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B regulieren. Die Aktivierung von NF- κ B durch p53 korreliert mit der Fähigkeit von p53, Apoptose auszulösen (Ryan et al., 2000). Zusätzlich kann die Induktion der MEK/ERK-Kinasen und die daraus resultierende Aktivierung von NF- κ B aber auch zum Überleben der Zelle führen (Panta et al., 2004; Tergaonkar, 2006). Um den Einfluss des NF- κ B Signalweges auf die Pankreaskarzinogenese im *Ela-TGF α* transgenen Mausmodell im Kontext von p53 zu untersuchen, haben wir eine weitere Mauslinie generiert, in der eine zusätzliche homozygote pankreasspezifische Deletion von *Trp53* vorliegt. Diese Inaktivierung des *Trp53* Gens führte zu einer Erhöhung der Karzinominzidenz in *Ela-TGF α* *Trp53^{ΔΔ}* Mäusen auf 100%. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass die Inaktivierung

Diskussion

des *rela* Gens in der *Ela-TGF α Trp53 Δ/Δ* Mauslinie zu einem verlängerten Überleben dieser Mäuse führt. Aus dieser Analyse konnte geschlossen werden, dass die protektive Funktion des NF- κ B/Rel Signalweges im *Ela-TGF α* Mausmodell vom *Trp53*-Status unabhängig zu sein scheint. Allerdings nimmt die Inaktivierung des *rela*-Gens Einfluss auf die Differenzierung der Karzinome. Der mit der Tumorprogression assoziierte Abbau von Zell-Zell-Kontakten und die damit verbundene Dedifferenzierung von Tumorzellen stellen Parallelen zu einem entwicklungsbiologischen Prozess dar, der als Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet wird (Thiery, 2002). Die EMT ist ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen zu mesenchymalen Zellen umgewandelt werden. Dieser Prozess kann über Veränderungen in der Expression, oder der intrazellulären Verteilung bzw. Funktion von Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren (Snail, Slug, Twist, ZEB-1/-2, nukleäres β -Catenin), Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen (E-Cadherin, Claudine), Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen (Integrine) und Matrixmetalloproteinasen induziert werden (Thompson et al., 2005). Zahlreiche Studien belegen, dass die EMT eine Schlüsselrolle in der Progression maligner Tumoren spielt. Die undifferenzierten Karzinomzellen übernehmen Eigenschaften, die für den mesenchymalen Phänotyp charakteristisch sind. Es werden vermehrt Vimentin oder nukleäres β -Catenin exprimiert, während die Expression von E-Cadherin oder Cytokeratinen 8, 18 und 19 reduziert wird oder ganz verloren geht. Interessanterweise sind viele der Gene, die während der EMT hochreguliert werden, als NF- κ B-Zielgene beschrieben (Huber et al., 2004a; Huber et al., 2004b). Dazu zählen beispielsweise *Twist* und *Snail*, welche E-Cadherin reprimieren (Huber et al., 2005). Ein klarer Zusammenhang wurde auch zwischen der Aktivität von NF- κ B und der Initiation von EMT beim Pankreaskarzinom gezeigt (Maier et al., 2010). Im Einklang mit diesen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass 66,7% der *Ela-TGF α Trp53 Δ/Δ* Mäuse undifferenzierte Karzinome entwickelten. *Ela-TGF α Trp53 Δ/Δ rela Δ/Δ* Mäuse zeigten hingegen in 73,3% der Fälle duktale Adenokarzinome, so dass daraus geschlossen werden konnte, dass RelA/p65 an der Regulation der Tumordifferenzierung beteiligt ist.

Im *Ela-TGF α Trp53 Δ/Δ* Mausmodell besteht offensichtlich eine positive Korrelation zwischen der Entdifferenzierung von Pankreaskarzinomen und der Aktivierung von NF- κ B. Die NF- κ B assoziierte Entdifferenzierung geht mit einem kürzeren Überleben der Mäuse einher. Gleichzeitig ist die EMT abhängig von der NF- κ B Aktivität. Diese Erkenntnis liefert ein nützliches Modell um die Vernetzung von Inflammation, EMT und Entdifferenzierung zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

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

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

Annunziata, C. M., Davis, R. E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., *et al.* (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer cell* *12*, 115-130.

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

Bachem, M. G., Zhou, Z., Zhou, S., and Siech, M. (2006). Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* *21 Suppl* *3*, S92-96.

Basseres, D. S., and Baldwin, A. S. (2006). Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* *25*, 6817-6830.

Beyaert, R., Heyninck, K., and Van Huffel, S. (2000). A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* *60*, 1143-1151.

Bockman, D. E., and Merlino, G. (1992). Cytological changes in the pancreas of transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. *Gastroenterology* *103*, 1883-1892.

Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research* *49*, 4682-4689.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* *72*, 248-254.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* *72*, 248-254.

Caldas, C., Hahn, S. A., da Costa, L. T., Redston, M. S., Schutte, M., Seymour, A. B., Weinstein, C. L., Hruban, R. H., Yeo, C. J., and Kern, S. E. (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature genetics* *8*, 27-32.

Carvalho, G., Fabre, C., Braun, T., Grosjean, J., Ades, L., Agou, F., Tasdemir, E., Boehrer, S., Israel, A., Veron, M., *et al.* (2007). Inhibition of NEMO, the regulatory subunit of the IKK complex, induces apoptosis in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* *26*, 2299-2307.

Chen, C., Edelstein, L. C., and Gelinas, C. (2000). The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Molecular and cellular biology* 20, 2687-2695.

Chiu, B. C., Lynch, C. F., Cerhan, J. R., and Cantor, K. P. (2001). Cigarette smoking and risk of bladder, pancreas, kidney, and colorectal cancers in Iowa. *Ann Epidemiol* 11, 28-37.

Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H., and Ballard, D. W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10057-10062.

Dhawan, P., and Richmond, A. (2002). A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 7920-7928.

Eberhard, D., and Tosh, D. (2008). Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cell Mol Life Sci* 65, 33-40.

Elsasser, H. P., Adler, G., and Kern, H. F. (1986). Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 1, 421-429.

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

Fabre, C., Carvalho, G., Tasdemir, E., Braun, T., Ades, L., Grosjean, J., Boehrer, S., Metivier, D., Souquere, S., Pierron, G., *et al.* (2007). NF-kappaB inhibition sensitizes to starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* 26, 4071-4083.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.

Falk, R. T., Pickle, L. W., Fonham, E. T., Correa, P., and Fraumeni, J. F., Jr. (1988). Life-style risk factors for pancreatic cancer in Louisiana: a case-control study. *Am J Epidemiol* 128, 324-336.

Finkel, T., Serrano, M., and Blasco, M. A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767-774.

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

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

Literaturverzeichnis

- Greten, F. R., Wagner, M., Weber, C. K., Zechner, U., Adler, G., and Schmid, R. M. (2001). TGF alpha transgenic mice. A model of pancreatic cancer development. *Pancreatology* *1*, 363-368.
- Greten, F. R., Weber, C. K., Greten, T. F., Schneider, G., Wagner, M., Adler, G., and Schmid, R. M. (2002). Stat3 and NF-kappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology* *123*, 2052-2063.
- Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* *271*, 350-353.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Harada, H., and Grant, S. (2003). Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* *7*, 117-138.
- He, G., Yu, G. Y., Temkin, V., Ogata, H., Kuntzen, C., Sakurai, T., Sieghart, W., Peck-Radosavljevic, M., Leffert, H. L., and Karin, M. (2010). Hepatocyte IKKbeta/NF-kappaB inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer cell* *17*, 286-297.
- Heinmoller, E., Dietmaier, W., Zirngibl, H., Heinmoller, P., Scaringe, W., Jauch, K. W., Hofstadter, F., and Ruschoff, J. (2000). Molecular analysis of microdissected tumors and preneoplastic intraductal lesions in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* *157*, 83-92.
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., and Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development* *20*, 1218-1249.
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., *et al.* (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell* *4*, 437-450.
- Hoess, R. H., and Abremski, K. (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of molecular biology* *181*, 351-362.
- Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* *25*, 6706-6716.
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Longnecker, D. S., *et al.* (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* *25*, 579-586.
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., and Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* *6*, 2969-2972.
- Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004a). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* *114*, 569-581.

Literaturverzeichnis

- Huber, M. A., Beug, H., and Wirth, T. (2004b). Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage. *Cell Cycle* 3, 1477-1480.
- Huber, M. A., Kraut, N., and Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17, 548-558.
- Hustinx, S. R., Leoni, L. M., Yeo, C. J., Brown, P. N., Goggins, M., Kern, S. E., Hruban, R. H., and Maitra, A. (2005). Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol* 18, 959-963.
- Hyer, M. L., Samuel, T., and Reed, J. C. (2006). The FLIP-side of Fas signaling. *Clin Cancer Res* 12, 5929-5931.
- Ivanchuk, S. M., and Rutka, J. T. (2004). The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints. *Neurosurgery* 54, 692-699; discussion 699-700.
- Izzo, J. G., Malhotra, U., Wu, T. T., Luthra, R., Correa, A. M., Swisher, S. G., Hofstetter, W., Chao, K. S., Hung, M. C., and Ajani, J. A. (2007). Clinical biology of esophageal adenocarcinoma after surgery is influenced by nuclear factor-kappaB expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1200-1205.
- Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M., and Berns, A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nature genetics* 29, 418-425.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., and Wright, C. V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature genetics* 32, 128-134.
- Kawakami, H., Tomita, M., Matsuda, T., Ohta, T., Tanaka, Y., Fujii, M., Hatano, M., Tokuhisa, T., and Mori, N. (2005). Transcriptional activation of survivin through the NF-kappaB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int J Cancer* 115, 967-974.
- Kim, H. J., Hawke, N., and Baldwin, A. S. (2006). NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 13, 738-747.
- Krapp, A., Knofler, M., Frutiger, S., Hughes, G. J., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P. K. (1996). The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *The EMBO journal* 15, 4317-4329.
- Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P. K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & development* 12, 3752-3763.

Literaturverzeichnis

- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y., and Gelinas, C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* *22*, 8961-8982.
- Lau, J., Kawahira, H., and Hebrok, M. (2006). Hedgehog signaling in pancreas development and disease. *Cell Mol Life Sci* *63*, 642-652.
- Lesina, M., Kurkowski, M. U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., Kloppel, G., Yoshimura, A., Reindl, W., Sipos, B., Akira, S., *et al.* (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer cell* *19*, 456-469.
- Liptay, S., Weber, C. K., Ludwig, L., Wagner, M., Adler, G., and Schmid, R. M. (2003). Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer* *105*, 735-746.
- Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., and Whitcomb, D. C. (2000). Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am* *84*, 565-573.
- Luedde, T., Beraza, N., Kotsikoris, V., van Loo, G., Nenci, A., De Vos, R., Roskams, T., Trautwein, C., and Pasparakis, M. (2007). Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer cell* *11*, 119-132.
- Luo, J. L., Kamata, H., and Karin, M. (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* *115*, 2625-2632.
- Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., and Karin, M. (2005). IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* *121*, 977-990.
- Maier, H. J., Schmidt-Strassburger, U., Huber, M. A., Wiedemann, E. M., Beug, H., and Wirth, T. (2010). NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett* *295*, 214-228.
- Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., Yeo, C. J., and Hruban, R. H. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* *16*, 902-912.
- Masamune, A., and Shimosegawa, T. (2009). Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol* *44*, 249-260.
- Means, A. L., Meszoely, I. M., Suzuki, K., Miyamoto, Y., Rustgi, A. K., Coffey, R. J., Jr., Wright, C. V., Stoffers, D. A., and Leach, S. D. (2005). Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* *132*, 3767-3776.

Meylan, E., Dooley, A. L., Feldser, D. M., Shen, L., Turk, E., Ouyang, C., and Jacks, T. (2009). Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* *462*, 104-107.

Morris, J. P. t., Wang, S. C., and Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* *10*, 683-695.

Moskaluk, C. A., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1997). p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research* *57*, 2140-2143.

Ni, H., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J. Z., Amin, H. M., Martinez, R. L., Saeed, S., Barton, K., and Alkan, S. (2001). Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *Br J Haematol* *115*, 279-286.

Ohlsson, B., Jansen, C., Ihse, I., and Axelson, J. (1997). Epidermal growth factor induces cell proliferation in mouse pancreas and salivary glands. *Pancreas* *14*, 94-98.

Orlowski, R. Z., and Baldwin, A. S., Jr. (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends in molecular medicine* *8*, 385-389.

Ornitz, D. M., Palmiter, R. D., Messing, A., Hammer, R. E., Pinkert, C. A., and Brinster, R. L. (1985). Elastase I promoter directs expression of human growth hormone and SV40 T antigen genes to pancreatic acinar cells in transgenic mice. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* *50*, 399-409.

Panta, G. R., Kaur, S., Cavin, L. G., Cortes, M. L., Mercurio, F., Lothstein, L., Sweatman, T. W., Israel, M., and Arsura, M. (2004). ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Molecular and cellular biology* *24*, 1823-1835.

Parsa, I., Longnecker, D. S., Scarpelli, D. G., Pour, P., Reddy, J. K., and Lefkowitz, M. (1985). Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma. *Cancer research* *45*, 1285-1290.

Pellegata, N. S., Sessa, F., Renault, B., Bonato, M., Leone, B. E., Solcia, E., and Ranzani, G. N. (1994). K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer research* *54*, 1556-1560.

Peters, K. (2005). Undifferenzierte Pankreaskarzinome. *Der Pathologe* *26*, 18-21.

Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., and Ben-Neriah, Y. (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* *431*, 461-466.

Plachot, C., and Portha, B. (2001). Impaired pancreatic duct-cell growth in focal areas of regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Histochem J* *33*, 141-147.

Rae, C., Langa, S., Tucker, S. J., and MacEwan, D. J. (2007). Elevated NF-kappaB responses and FLIP levels in leukemic but not normal lymphocytes: reduction by salicylate allows TNF-

induced apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 12790-12795.

Rooman, I., Heremans, Y., Heimberg, H., and Bouwens, L. (2000). Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia* *43*, 907-914.

Rooman, I., Lardon, J., and Bouwens, L. (2002). Gastrin stimulates beta-cell neogenesis and increases islet mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue. *Diabetes* *51*, 686-690.

Rooman, I., Lardon, J., Flamez, D., Schuit, F., and Bouwens, L. (2001). Mitogenic effect of gastrin and expression of gastrin receptors in duct-like cells of rat pancreas. *Gastroenterology* *121*, 940-949.

Rose, S. D., Swift, G. H., Peyton, M. J., Hammer, R. E., and MacDonald, R. J. (2001). The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *The Journal of biological chemistry* *276*, 44018-44026.

Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S. N., Sohn, T. A., Hruban, R. H., Yeo, C. J., and Kern, S. E. (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer research* *57*, 1731-1734.

Ryan, K. M., Ernst, M. K., Rice, N. R., and Vousden, K. H. (2000). Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* *404*, 892-897.

Saas (1999). Ösophagus: Von der Barrett-Metaplasie zum Karzinom. *Deutsches Ärzteblatt* *96*.

Sandgren, E. P., Luetkeke, N. C., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., and Lee, D. C. (1990). Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* *61*, 1121-1135.

Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *85*, 5166-5170.

Scartozzi, M., Bearzi, I., Pierantoni, C., Mandolesi, A., Loupakis, F., Zaniboni, A., Catalano, V., Quadri, A., Zorzi, F., Berardi, R., *et al.* (2007). Nuclear factor-kB tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* *25*, 3930-3935.

Schmid, R. M., Kloppel, G., Adler, G., and Wagner, M. (1999). Acinar-ductal-carcinoma sequence in transforming growth factor-alpha transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci* *880*, 219-230.

Schmid-Kotsas, A., Gross, H. J., Menke, A., Weidenbach, H., Adler, G., Siech, M., Beger, H., Grunert, A., and Bachem, M. G. (1999). Lipopolysaccharide-activated macrophages stimulate the synthesis of collagen type I and C-fibronectin in cultured pancreatic stellate cells. *Am J Pathol* *155*, 1749-1758.

Literaturverzeichnis

- Schneider, E., Schmid-Kotsas, A., Zhao, J., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., Adler, G., Waltenberger, J., Grunert, A., and Bachem, M. G. (2001). Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* *281*, C532-543.
- Schneider, G., and Schmid, R. M. (2003). Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* *2*, 15.
- Slack, J. M., and Tosh, D. (2001). Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 581-586.
- Song, S. Y., Gannon, M., Washington, M. K., Scoggins, C. R., Meszoely, I. M., Goldenring, J. R., Marino, C. R., Sandgren, E. P., Coffey, R. J., Jr., Wright, C. V., and Leach, S. D. (1999). Expansion of Pdx1-expressing pancreatic epithelium and islet neogenesis in transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. *Gastroenterology* *117*, 1416-1426.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* *21*, 70-71.
- Soussi, T., Rubio-Nevado, J. M., and Ishioka, C. (2006). MUT-TP53: a versatile matrix for TP53 mutation verification and publication. *Human mutation* *27*, 1151-1154.
- Sphyris, N., Logsdon, C. D., and Harrison, D. J. (2005). Improved retention of zymogen granules in cultured murine pancreatic acinar cells and induction of acinar-ductal transdifferentiation in vitro. *Pancreas* *30*, 148-157.
- Srinivasula, S. M., and Ashwell, J. D. (2008). IAPs: what's in a name? *Mol Cell* *30*, 123-135.
- Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., and Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* *188*, 211-216.
- Strobel, O., Dor, Y., Alsina, J., Stirman, A., Lauwers, G., Trainor, A., Castillo, C. F., Warshaw, A. L., and Thayer, S. P. (2007). In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology* *133*, 1999-2009.
- Takaori, K., Hruban, R. H., Maitra, A., and Tanigawa, N. (2004). Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* *28*, 257-262.
- Tergaonkar, V. (2006). NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* *38*, 1647-1653.
- Tew, G. W., Lorimer, E. L., Berg, T. J., Zhi, H., Li, R., and Williams, C. L. (2008). SmgGDS regulates cell proliferation, migration, and NF-kappaB transcriptional activity in non-small cell lung carcinoma. *The Journal of biological chemistry* *283*, 963-976.
- Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., Qi, Y. P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V., *et al.* (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* *425*, 851-856.

Literaturverzeichnis

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.

Thompson, E. W., Newgreen, D. F., and Tarin, D. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer research* 65, 5991-5995; discussion 5995.

Tosh, D., and Slack, J. M. (2002). How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 187-194.

Ueda, Y., and Richmond, A. (2006). NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res* 19, 112-124.

Wagner, M., Greten, F. R., Weber, C. K., Koschnick, S., Mattfeldt, T., Deppert, W., Kern, H., Adler, G., and Schmid, R. M. (2001). A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease. *Genes & development* 15, 286-293.

Wagner, M., Luhrs, H., Kloppel, G., Adler, G., and Schmid, R. M. (1998). Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice. *Gastroenterology* 115, 1254-1262.

Wagner, M., Weber, C. K., Bressau, F., Greten, F. R., Stagge, V., Ebert, M., Leach, S. D., Adler, G., and Schmid, R. M. (2002). Transgenic overexpression of amphiregulin induces a mitogenic response selectively in pancreatic duct cells. *Gastroenterology* 122, 1898-1912.

Weichert, W., Boehm, M., Gekeler, V., Bahra, M., Langrehr, J., Neuhaus, P., Denkert, C., Imre, G., Weller, C., Hofmann, H. P., *et al.* (2007). High expression of RelA/p65 is associated with activation of nuclear factor-kappaB-dependent signaling in pancreatic cancer and marks a patient population with poor prognosis. *Br J Cancer* 97, 523-530.

Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., Ulrich, C. D., Martin, S. P., Gates, L. K., Jr., Amann, S. T., Toskes, P. P., *et al.* (1996). Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature genetics* 14, 141-145.

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

Witt, H., Luck, W., Hennies, H. C., Classen, M., Kage, A., Lass, U., Landt, O., and Becker, M. (2000). Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature genetics* 25, 213-216.

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

Zhang, B., Wang, Z., Li, T., Tsitsikov, E. N., and Ding, H. F. (2007). NF-kappaB2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. *Blood* 110, 743-751.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Intraepitheliale Neoplasien des Pankreas (<i>PanIN</i>)-----	
Abbildung 2: Genetische Alterationen im Verlauf der Pankreastumorgenese-----	
Abbildung 3: Zellzyklus- und Apoptoseregulation durch <i>INK4a/ARF</i> Locus-----	
Abbildung 4: NF- κ B und I κ B Proteine -----	
Abbildung 5: Der klassische NF- κ B/Rel Signalweg -----	
Abbildung 6: Tumorinzidenz der TGF α transgenen Mäuse ohne/mit der hetero- bzw. homozygoten Deletion von <i>Trp53</i> -----	
Abbildung 7: Gewebespezifische Inaktivierung eines Zielgens -----	
Abbildung 8: Nachweis der pankreasspezifischen Expression der Cre-Rekombinase -----	
Abbildung 9: Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 -----	
Abbildung 10: Generierung einer <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> Mauslinie-----	
Abbildung 11: Generierung einer <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mauslinie-----	
Abbildung 12: PCR Analyse genomischer DNA -----	
Abbildung 13: Expression von RelA/p65-----	
Abbildung 14: Aktivierung von RelA/p65 in Pankreata der <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> und <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mäuse -----	
Abbildung 15: Histologische Untersuchung von Pankreata der <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> und <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mäuse -----	
Abbildung 16: Analyse der m-RNA von CK-19 und α -Amylase in <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> und <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten-----	
Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse duktaler Strukturen 9 Monate alter <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> and <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mäuse -----	
Abbildung 18: Analyse der Pankreasfibrosierung in <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> und <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten-----	
Abbildung 19: Das relative Pankreasgewicht von <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> und <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mäusen -----	
Abbildung 20: Proliferationsaktivität im Pankreas der 1 Monat alten Mäuse -----	
Abbildung 21: Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen in Pankreata 6 Monate alter <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> und <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mäuse-----	
Abbildung 22: Pdx-1 Expression in Pankreata der 6 Monate alten <i>Ela-TGFα rela^{F/F}</i> und <i>Ela-TGFα rela^{Δ/Δ}</i> Mäuse -----	

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 23: Shh-Expression in Pankreata der 6 Monate alten

Ela-TGF α rela^{F/F} und *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäuse -----

Abbildung 24: Analyse der m-RNA von Shh, Gli 1, Gli 3 und Ptch1 in *Ela-TGF α rela^{F/F}*

und *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten -----

Abbildung 25: Azinär-duktales Metaplasie -----

Abbildung 26: Überlebensanalyse von *Ela-TGF α rela^{F/F}* und *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mäusen ----

Abbildung 27: Tumorzinzidenz im Pankreas der *Ela-TGF α rela^{F/F}* und

Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ} Mausgruppen -----

Abbildung 28: PCR Analyse genomischer DNA -----

Abbildung 29: Überlebensanalyse von *Ela-TGF α* und *Ela-TGF α Trp53 ^{Δ/Δ}* Mäusen -----

Abbildung 30: Überlebensanalyse von *Ela-TGF α Trp53 ^{Δ/Δ}* und

Ela-TGF α Trp53 ^{Δ/Δ} rela ^{Δ/Δ} Mäusen -----

Abbildung 31: Histopathologische Analyse eines repräsentativen undifferenzierten

Pankreaskarzinoms von *Ela-TGF α Trp53 ^{Δ/Δ}* Maus und eines duktales

Pankreaskarzinoms von *Ela-TGF α Trp53 ^{Δ/Δ} rela ^{Δ/Δ}* Maus -----

Abbildung 32: Schematische Darstellung der azinär-duktales Transdifferenzierung

in vitro nach der Behandlung mit rtTGF α -----

Tabelle 1: Hereditäre Tumorpredispositionssyndrome mit erhöhtem

Risiko für Pankreaskarzinom -----

Tabelle 2: Tumorentitäten in % der Gesamtzahl im Pankreas der *Ela-TGF α rela^{F/F}*

und *Ela-TGF α rela ^{Δ/Δ}* Mausgruppen -----

Tabelle 3: Tumorentitäten in % der Gesamtzahl im Pankreas von *Ela-TGF α Trp53 ^{Δ/Δ}*

und *Ela-TGF α Trp53 ^{Δ/Δ} rela ^{Δ/Δ}* Mäusen -----

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium persulfate (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
α-SMA	α-smooth muscle actin
bFGE	Basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaar
BRCA 2	Breast cancer type 2
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDK4/6	Cyclin-dependent kinase 4/6
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cFLIP	Cellular Fas-associated death domain-like IL-1β-converting enzyme (FLICE) inhibitory protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Ela	Elastase
et al.	und Mitarbeiter
FAMMM	Das familiäre atypische multiple Muttermal und Melanom-Syndrom
FCS	Fötales Kälbeserum
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin- Ethansulfonsäure
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
h	Stunde(n)

Abkürzungsverzeichnis

hGH	Human Growth hormone
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
I κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IKK	IkappaB Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MMR	Mismatch- Reparaturgenen
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	Nuclear localization site
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
Pdx-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PFA	Paraformalehyde
pM	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RB	Retinoblastoma protein
Rel	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homologue
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/Minute
rtTGF α	Recombinant TGF α
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

Shh	Sonic hedgehog homolog
SPINK1	Serinproteinaseinhibitor Kazal Typ 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF α	Transforming growth factor α
TGF β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TP53	Tumor protein 53
TRAF	TNF receptor associated factor
TRIS-HCl	Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Hydrochlorid
Trp53	Transformation related protein 53
v/v	Volumen in Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Masse in Volumen
XIAP	X-linked IAP
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

Danksagung

Ich möchte ganz herzlich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu allererst möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meine Mutter und mein Vater haben mein Interesse für die Wissenschaft geweckt. Ohne ihre großartige Unterstützung wären mein Hochschulstudium sowie diese Promotion nicht möglich gewesen. Ganz besonders danke ich meinen beiden Töchtern, Olga und Maria, die mich inspirieren und mir jeden Tag Kraft und Mut geben. Ihnen allen sei die vorliegende Arbeit gewidmet.

Herrn Prof. Dr. Schmid danke ich für die interessante Themenstellung und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen. Seine fachliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen waren eine große Hilfe für den Fortgang meines Projektes.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Michael Schemann für seine Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Hana Algül, der nicht nur die wissenschaftliche Betreuung meines Dissertationsprojektes übernahm, sondern auch meine wissenschaftliche Karriere förderte. Ihm ist für die motivierende und professionelle Anleitung, für sein Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, sowie für seine offene Art, Lebensfreude und Kampfgeist, auch in schwierigen Situationen, zutiefst zu danken. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Ich danke allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die praktische Hilfe im Laboralltag und auch für den wissenschaftlichen Austausch. Besonders möchte ich Herrn Dr. Matthias Treiber danken für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für seine ideenreiche Diskussionsbereitschaft. Weiterhin danke ich Frau Karen Dlubatz für ihre experimentelle Unterstützung.

Allen meinen Freunden danke ich für die bedingungslose Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir in allen Lebenssituationen gaben.