

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar

Identifizierung und Charakterisierung Foxd1- und Wt1-positiver Zellen im Pankreas

Alexander Wuschek

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Jörg H. Kleeff
(schriftliche Beurteilung)
Prof. Dr. Hana Algül
(mündliche Prüfung)
2. apl. Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan

Die Dissertation wurde am 21.03.2016 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.03.2017 angenommen.

Meinen Eltern und meiner Schwester Marina.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das Pankreas | 1 |
| 1.1.1 | Makroskopie und Funktion | 1 |
| 1.1.2 | Organogenese..... | 1 |
| 1.1.3 | Histologie..... | 1 |
| 1.2 | Pankreatitis..... | 2 |
| 1.2.1 | Akute Pankreatitis..... | 2 |
| 1.2.2 | Chronische Pankreatitis..... | 3 |
| 1.3 | Duktales Adenokarzinom des Pankreas..... | 3 |
| 1.4 | Interstitium | 5 |
| 1.4.1 | Mesenchymale Zellen..... | 5 |
| 1.4.2 | Pankreassternzellen | 6 |
| 1.5 | Foxd1 | 7 |
| 1.6 | Wt1 | 7 |
| 1.7 | Lineage Tracing..... | 8 |
| 1.7.1 | Cre/loxP-System..... | 8 |
| 1.7.2 | CreER(T2)-System | 9 |
| 1.7.3 | Transgene Reportermaus..... | 9 |
| 2 | Zielstellung der Arbeit..... | 10 |
| 3 | Material | 11 |
| 3.1 | Chemikalien und Reagenzien..... | 11 |
| 3.2 | Größen- und Massenstandard..... | 12 |
| 3.3 | Kulturmedien | 12 |
| 3.4 | Enzyme | 12 |
| 3.5 | Geräte | 12 |
| 3.6 | Software | 13 |
| 3.7 | Primäre Antikörper..... | 14 |
| 3.8 | Sekundäre Antikörper..... | 14 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.9 | Antibiotika..... | 15 |
| 3.10 | Primer..... | 15 |
| 3.11 | Kits | 15 |
| 3.12 | Biologisches Material..... | 16 |
| 3.13 | Verbrauchsmaterialien | 16 |
| 4 | Methoden..... | 17 |
| 4.1 | Tamoxifen-Induktion | 17 |
| 4.2 | Cerulein Injektion..... | 17 |
| 4.3 | Zellkultur..... | 17 |
| 4.4 | RNA Isolation | 18 |
| 4.5 | Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA | 19 |
| 4.6 | cDNA Synthese | 20 |
| 4.7 | Quantitative <i>realtime</i> -PCR..... | 20 |
| 4.8 | Proteinisolation..... | 21 |
| 4.9 | Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 21 |
| 4.10 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 22 |
| 4.11 | Western Blot..... | 23 |
| 4.12 | MTT-Test..... | 25 |
| 4.13 | Anfertigen von Gewebeschnitten für histologische Analysen | 26 |
| 4.14 | Immunhistochemische Färbung | 26 |
| 4.15 | Immunfluoreszenz-Färbung..... | 28 |
| 4.15.1 | Von Paraffinschnitten | 28 |
| 4.15.2 | Immunfluoreszenz von Zellkulturen | 28 |
| 4.16 | Immunhistochemische Doppelmarkierung..... | 29 |
| 5 | Ergebnisse | 32 |
| 5.1 | Genexpressionsanalyse | 32 |
| 5.2 | Analyse der Proteinexpression..... | 35 |
| 5.3 | Nachweis von Foxd1- und Wt1-positiven Zellen in Zellkultur | 37 |
| 5.4 | Immunhistochemische Doppelfärbung | 39 |
| 5.5 | Immunmarkierung im transgenen Mausmodell..... | 40 |
| 5.5.1 | Fibroblasten in vitro | 42 |

| | |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 6 Diskussion | 44 |
| 6.1 Foxd1 | 44 |
| 6.1.1 Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext | 44 |
| 6.1.2 Immunhistochemische Färbung | 46 |
| 6.1.3 Immunfluoreszenzfärbung | 47 |
| 6.1.4 Western Blot..... | 47 |
| 6.1.5 Genexpressionsanalyse | 48 |
| 6.2 Wt1 | 49 |
| 6.2.1 Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext | 49 |
| 6.2.2 Immunmarkierung..... | 50 |
| 6.2.3 Genexpressionsanalyse | 52 |
| 7 Zusammenfassung..... | 54 |
| 7.1 Foxd1 | 54 |
| 7.2 Wt1 | 54 |
| 8 Abkürzungsverzeichnis | 55 |
| 9 Danksagung | 56 |
| 10 Literaturverzeichnis | 57 |

1 Einleitung

1.1 Das Pankreas

1.1.1 Makroskopie und Funktion

Das Pankreas ist eine etwa 13 bis 18 cm lange, sich von der Konkavität des Duodenums bis zum Milzhilus ziehende, exokrin und endokrin aktive Drüse. Die Funktion dieses ca. 80g schweren, retroperitoneal liegenden Organs ist zum einen die Sekretion von Verdauungsenzymen, zum anderen die Homöostase des Blutglukosespiegels. Durch den Ductus pancreaticus major werden die Enzyme zur Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Fettspaltung zusammen mit einem bikarbonathaltigen Sekret, welches den sauren Magensaft neutralisiert, in das Duodenum abgeleitet. Die für den Blutzucker relevanten, antagonistischen Hormone Insulin und Glukagon werden direkt ins Blut abgegeben (Schiebler, 2004).

1.1.2 Organogenese

Das erste morphologische Anzeichen in der Organogenese des Pankreas im Mausmodell ist die dorsale Ausstülpung des Vorderdarms auf Höhe des ventralen Leberdiverculums am Embryonaltag 9,5 (Wessels and Cohen, 1967) und der damit einhergehenden Evagination des Endoderms in das darüber liegende Mesenchym (Gittes, 2009). Die ventrale Ausstülpung erfolgt circa 12 Stunden später (Spooner et al., 1970). Die im Verlauf azinär und duktal differenzierten Zellen entstehen aus dem Epithel der ventralen und dorsalen Ausstülpungen, deren Gangsystem sich dichotom aufzweigt (Gittes, 2009). Die endokrin aktiven Langerhansschen Inselzellen entstehen wiederum aus diesen primitiven gangartigen Zellen, indem sie sich vom Lumen abspalten (Rosenberg, 1995).

1.1.3 Histologie

Die für die exokrine Pankreasfunktion verantwortliche strukturelle Einheit besteht aus den sogenannten Azini (lat. acinus, die Beere) und dem Gangsystem, welches sich aus intra- und interlobulären dukталen Gängen zusammensetzt. Ein Azinus besteht aus rundlich bis oval angeordneten Epithelzellen, die ein gemeinsames Lumen umsäumen, in welches sie verschiedene Verdauungsenzyme abgeben. Die in der Mitte eines jeden Azinus befindlichen, zentroazinären Zellen bilden das Anfangsstück des intralobulären Ganges. In dieses Gangsystem findet die Sekretion von

Bikarbonat, Ionen und Flüssigkeit statt (Junqueira et al., 2004). Dieses Sekret wird über den Pankreashauptgang in das Duodenallumen abgeleitet. Die endokrin aktiven Zellen des Pankreas liegen in den sogenannten Langerhansschen Inseln, welche verteilt über das gesamte Pankreas vorzufinden sind. Der häufigste Zelltyp dieser Inseln sind die Insulin-produzierenden β -Zellen mit einem Anteil von 80 Prozent. Das antagonistisch wirkende Glukagon wird von α -Zellen hergestellt, die 15 bis 20 Prozent der Zellen einer Langerhansschen Insel ausmachen. Eine geringe Zellfraktion von 5 Prozent synthetisiert das Somatostatin und wird als δ -Zelle bezeichnet (Elayat et al., 1995).

1.2 Pankreatitis

Die Pankreatitis bezeichnet eine entzündliche Erkrankung des Pankreas. Diese kann in zwei Verlaufsformen untergliedert werden: die akute und die chronische Pankreatitis.

1.2.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis tritt auf, wenn die inaktiven Enzymvorstufen bereits im Organ aktiviert werden, bevor sie das Intestinallumen erreicht haben. Es kommt hierbei zu einem Selbstverdau des Organs. Die häufigsten Ursachen der akuten Pankreatitis sind zu jeweils 40 Prozent Gallenwegserkrankungen und Alkoholmissbrauch (Gullo et al., 2002). Seltener Ursachen sind Medikamente, zu hohe Blutspiegel an Kalzium oder Triglyceriden (Badalov et al., 2007, Fortson et al., 1995, Frick et al., 1995). Bestimmte gastrointestinale Eingriffe, wie beispielsweise die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP), können ebenfalls eine akute Pankreatitis auslösen (Gottlieb and Sherman, 1998). Hierbei werden Azinuszellen geschädigt, die aktive Verdauungsenzyme ausschütten und somit die Pankreatitis induzieren. Es folgt die Freisetzung pro-inflammatorischer Signale, die Einwanderung von Immunzellen und eine fibrotische Reaktion, welche durch aktivierte mesenchymale Stellatum- (Stern-)zellen oder Fibroblasten hervorgerufen wird (Algul et al., 2002). Die Schädigung induziert ebenfalls regenerative Prozesse. Verbleibende, nicht-geschädigte Azinuszellen verändern ihren Phänotyp und nehmen ein proliferatives, Progenitor-ähnliches, duktales Stadium ein. Diese azinär-duktales Metaplasie (ADM) kann z.B. Ausgangspunkt der Entstehung eines Pankreaskarzinoms sein (Liou et al., 2013). Zerstörtes exokrines Gewebe wird durch regenerierende Azinuszellen ersetzt. Die pathophysiologischen Veränderungen der

Pankreatitis, wie Metaplasien, Neoplasien und die fibrotische Reaktion, können im murinen Tiermodell dargestellt werden. Hierfür wird den Tieren das Cholezystokinin-Analogon Cerulein intraperitoneal appliziert um eine Entzündungsreaktion auszulösen. Dieser Prozess kommt dem der humanen Erkrankung, die meist durch Alkohol oder Verlegung des Galleabfluss ausgelöst wird, sehr nahe und ist eines der am häufigsten verwendete Tiermodelle der akuten Pankreatitis (Lerch and Gorelick, 2013, Lankisch et al., 2015).

1.2.2 Chronische Pankreatitis

In manchen Fällen führt eine anhaltende Entzündungsreaktion zum Übergang von der akuten zur chronischen Pankreatitis (Bhanot and Moller, 2009, Pinho et al., 2014). Die meisten Studien, die sich auf die chronische Pankreatitis beziehen, fokussierten sich auf die alkoholinduzierte Form. Ein wichtiges mikroskopisches Kriterium der (alkoholinduzierten) chronischen Pankreatitis ist die Fibrose (Vonlaufen et al., 2007). Bahnbrechend hinsichtlich der wissenschaftlichen Aufarbeitung der Pankreasfibrose war die Fähigkeit, Pankreassternzellen zu kultivieren (Apte et al., 1998). Die bei der Pankreatitis auftretende Zellnekrose der Azinuszellen hat eine Entzündungsreaktion zur Folge. Diese führt zu einer Aktivierung der Pankreassternzellen zu Myofibroblasten, die auf diese Stimulation mit vermehrter Synthese von extrazellulärer Matrix reagieren (Bachem et al., 2006). Diese induzierte Fibrose wird im Rahmen der akuten Pankreatitis wieder abgebaut, wohingegen sie bei einer chronischen Pankreatitis bestehen bleibt (Apte and Wilson, 2004). Wie in vielen anderen Organen auch, kann ein Status andauernder Gewebeschädigung und Entzündung zur Entstehung eines Karzinoms führen (Beachy et al., 2004). Beispiele hierfür sind das kolorektale Karzinom bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (Triantafillidis et al., 2009), das hepatozelluläre Karzinom bei an Hepatitis C Erkrankten (Takano et al., 1995) sowie das Magenkarzinom bei Helicobacter pylori positiven Gastritiden (Parsonnet et al., 1991). Eine ähnliche Korrelation wurde für das duktales Adenokarzinom des Pankreas bei chronischer Pankreatitis beschrieben (Pinho et al., 2014).

1.3 Duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas, das morphologisch den Gangzellen des Pankreas ähnelt, ist mit einem Anteil von 85 Prozent die häufigste aller Tumorarten

des Pankreas (Hezel et al., 2006). In Europa ist das Pankreaskarzinom die zehnthäufigste Karzinomentität. Es zählt zu den aggressivsten Tumoren. Unter 5 Prozent aller Patienten mit dieser Diagnose können auf Dauer geheilt werden (Cascinu et al., 2010). Die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit für einen Patienten liegen bei nur circa 7% (Siegel et al., 2015). Die hohe Mortalität hängt mit der meist schon zum Diagnosezeitpunkt vorhandenen Metastasierung zusammen. In nur 5 bis 25 Prozent der Fälle ist der Tumor resezierbar. Bei einer adjuvanten Behandlung mit Gemcitabine besteht bei Patienten nach Tumorresektion ein krankheitsfreies Überleben von durchschnittlich 13,4 Monaten, bei nicht operablen Tumoren versterben die Patienten in 3 bis 12 Monaten (Nieto et al., 2008). Zu den Risikofaktoren zählen zahlreiche Umwelteinflüsse sowie genetische Veränderungen. Der am stärksten kontrollierbare Risikofaktor für die Entstehung des Pankreaskarzinoms ist der Nikotinabusus (Lowenfels and Maisonneuve, 2004). Ebenso wurde eine Korrelation zu starkem Alkoholabusus nachgewiesen (Tramacere et al., 2010). Fall-Kontroll- sowie prospektive Studien zeigten eine erhöhte Inzidenz des Pankreaskarzinom bei Patienten, die an Diabetes mellitus vorerkrankt waren (Stevens et al., 2007, Huxley et al., 2005). Obwohl es eine sehr große Schnittmenge an Patienten mit Diabetes und Übergewicht gibt, kann ein erhöhter Body-Mass-Index als ein weiterer unabhängiger Risikofaktor angesehen werden (Li et al., 2009). Wie auch in anderen Organen des Gastrointestinaltrakts kann eine chronische Entzündung im Rahmen der Inflammation-Dysplasie-Karzinom-Sequenz zu einer Entartung führen (Clevers, 2004), weswegen die chronische Pankreatitis ebenfalls mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist ein Adenokarzinom zu entwickeln (Malka et al., 2002). Neben diesen Umweltfaktoren wird angenommen, dass 10 Prozent aller duktaalen Pankreaskarzinome aufgrund einer genetischen Prädisposition entstehen (Hezel et al., 2006). In Familien mit gehäuftem Auftreten des duktaalen Adenokarzinom des Pankreas wurden beispielsweise Mutationen im kationischen Trypsinogen-Gen *PRSS1* (Whitcomb et al., 1996) sowie den vom hereditären non-polypösen Kolonkarzinom bekannten Genen *MLH1* und *MLH2* beobachtet (Gargiulo et al., 2009). Weitere Keimbahnmutationen, die zur Karzinogenese führen, betreffen Tumorsuppressorgene wie *BRCA1/2* oder *LKB1* (Greer and Whitcomb, 2007, Morton et al., 2010). Analysen resezierter Tumore von Patienten mit duktaalem Pankreaskarzinom führten zudem zur Identifikation karzinogener somatischer

Mutationen. Zu nennen wären hier, neben weiteren, das Onkogen *k-ras* sowie die Tumorsuppressorgene *p53*, *p16 (INK4A)* und *Smad4* (Rozenblum et al., 1997).

1.4 Interstitium

Das Interstitium, das auch als Stroma bezeichnet wird, kann definiert werden als der Extrazellulärraum eines Organs abzüglich des Endovaskulärraums (Jain, 1987). Es besteht aus den Stromazellen und der von ihnen sezernierten extrazellulären Matrix. Diese weit gefasste Definition schließt beispielsweise Fibroblasten und gewebespezifische Makrophagen ein (Filer et al., 2007). Das Interstitium spielt eine essentielle Rolle in der chronischen Inflammation. Es wird angenommen, dass der Übergang von einer akuten zu einer chronischen Entzündung durch eine fehlende Inaktivierung der durch Fibroblasten unterhaltenen Immunreaktion initiiert wird (Buckley et al., 2001). Eine übermäßige Produktion von extrazellulärer Matrix durch Fibroblasten und Pankreassternzellen im Rahmen der Pankreatitis und der Karzinogenese wird desmoplastische Reaktion genannt und gehört zu den histologischen Hauptcharakteristika des duktales Adenokarzinom des Pankreas (Rasheed et al., 2012, Armstrong et al., 2004). Per Definition ist der histologische Ausgangspunkt eines jeden Karzinoms eine Epithelzelle beziehungsweise die in dieser Zelle stattgefundenen genetische Mutation (Lengauer et al., 1998). Aktivierte Fibroblasten schaffen zusätzlich eine positive Mikroumgebung, die die Entstehung eines Karzinoms unterstützt (Bhowmick et al., 2004). Dieser funktionelle Einfluss von Stromazellen auf die Epithelzellen wird über die Sekretion von extrazellulärer Matrix, die Förderung der Angiogenese und die Ausschüttung von parakrinen Signalen ausgeübt (Tlsty and Hein, 2001). Die Rolle des Stroma als Mediator wurde allerdings erweitert mit dem Nachweis, dass Stromazellen per se die Karzinogenese einer nicht-karzinösen Epithelzelle initiieren können (Olumi et al., 1999). Es besteht also ein beidseitiges Abhängigkeitsverhältnis zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen in der Entstehung von Karzinomen (Elenbaas and Weinberg, 2001).

1.4.1 Mesenchymale Zellen

Die Relevanz des mesenchymal-epithelialen Zusammenspiels während des Embryonalstadiums sowie der Karzinogenese ist seit langem bekannt (Cunha et al., 1980, Larue and Bellacosa, 2005). Das sich entwickelnde Mesenchym induziert die Proliferation angrenzender Epithelzellen während der Organogenese. Diese Differenzierung der Epithelzellen führt wiederum dazu, dass sich angrenzende

mesenchymale Zellen differenzieren. Die sekretorische Aktivität der mesenchymalen Zellen nehmen mit dem Differenzierungsgrad ab. Desweiteren exprimieren diese epithelialen Zellen Zytokine, die die Mesenchymzelle in diesem Differenzierungsstatus halten, wodurch während der physiologischen Organogenese ein Gleichgewicht der mesenchymal-epithelialen Interaktion erreicht wird (Bhowmick et al., 2004). In der Karzinogenese kommt dieses Äquilibrium aus der Balance und die entartete Epithelzelle unterstützt eine Aktivierung der ruhenden Fibroblasten zu Myofibroblasten, die *alpha smooth muscle actin* (α Sma) exprimieren (Ronnov-Jessen and Petersen, 1993, Gabbiani et al., 1971). Myofibroblasten in reaktivem Stroma sezernieren extrazelluläre Matrix wie Kollagene, Fibronectin, Tenascin und Versican (Lagace et al., 1985, Brown et al., 1999, Mackie et al., 1987, Hauptmann et al., 1995, Hanamura et al., 1997). Darüber hinaus produzieren Myofibroblasten verschiedene Proteasen wie *fibroblast activation protein* (FAP) und Matrix Metalloproteasen (Park et al., 1999, DeClerck, 2000). Die Expression dieser beiden Komponenten führt zu einer Remodellierung der extrazellulären Matrix, die essentiell für das Wachstum und die Migration der Karzinomzelle ist (Tuxhorn et al., 2001).

1.4.2 Pankreassternzellen

Eine Zellpopulation im Pankreas, an der in den letzten 15 Jahren sehr viel Forschung betrieben wurde, ist die Pankreassternzelle. Sie ist eng verwandt mit der Sternzelle der Leber (Ito-Zelle), wurde jedoch circa 100 Jahre später entdeckt und konnte erstmals im Jahre 1998 isoliert und kultiviert werden (Apte et al., 1998, Bachem et al., 1998). Im adulten Pankreas liegen die Pankreassternzellen an der Basalseite von Azinuszellen und zeigen lange zytoplasmatische Fortsätze. Ruhende Pankreassternzellen zeichnen sich wie die Ito-Zellen der Leber durch intrazelluläre Vitamin A-Fetttröpfchen aus, wohingegen aktivierte Pankreassternzellen extrazelluläre Matrix sezernieren und damit maßgeblich an der Pankreasfibrose beteiligt sind. Des Weiteren sind aktivierte Pankreassternzellen positiv für α Sma, wobei bis dato noch nicht aufgeklärt werden konnte, ob diese Zellen eine von Myofibroblasten zu unterscheidende Zellentität darstellen (Erkan et al., 2012). Obwohl durch Analyse des Transkriptoms von Pankreassternzellen und Fibroblasten als bewiesen gilt, dass diese beiden Zellen zwei verschiedene Subpopulationen darstellen, ist die ontogenetische Herkunft der Pankreassternzellen nach wie vor Objekt aktueller Forschung (Buchholz et al., 2005).

1.5 Foxd1

Foxd1 ist ein Protein, das in *Drosophila* entdeckt und im Jahre 1989 zum ersten Mal in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben wurde. Als Transkriptionsfaktor liegt es im Nukleus der Zelle und besitzt eine Forkhead-Domäne zur DNA-spezifischen Bindung (Weigel et al., 1989, Pierrou et al., 1994). Die erste spezifische Funktion von Foxd1 wurde in der Niere beschrieben. Durch Ausschalten des Transkriptionsfaktors Foxd1 ergab sich eine signifikant gestörte Nephrogenese. Es wurde nachgewiesen, dass bestimmte vom Stroma sezernierte Zytokine fehlten, die physiologisch mesenchymale Zellen zur Transition zu tubulären Epithelzellen befähigen. Homozygote Mangelmutanten im murinen Modell sind nicht überlebensfähig und sterben spätestens 24 Stunden nach der Geburt (Hatini et al., 1996). Zudem wurde nachgewiesen, dass Foxd1 eine essentielle Rolle während der Entwicklung des Nervus Opticus und der Retina zukommt. Foxd1 war während der Organogenese im Bereich des ventralen Dienzephalon, sowie der ventrotemporalen Retina exprimiert. In Mangelmutanten kam es daher zu einer gestörten Entwicklung des Chiasma opticum, sowie der ventrolateralen Retina (Herrera et al., 2004). Eine Analyse der genetischen Abstammungslinie in der Niere hat ergeben, dass aus Foxd1-positiven mesenchymalen Zellen während der Nephrogenese α Sma-negative interstitielle Perizyten entstehen. Diese wiederum differenzieren sich während der Nierenfibrose in α Sma-positive Myofibroblasten aus (Humphreys et al., 2010).

1.6 Wt1

Das Nephroblastom, auch Wilms-Tumor genannt, ist eine Neoplasie der Niere, die einen von 10000 Neugeborenen betrifft (Morrison et al., 2008). Die genetische Ursache besteht in einer Deletion des *Wt1*-Gens auf dem Genlocus 11p13, einem Tumorsuppressorgen mit vier Zinkfingermotiven (Call et al., 1990). Ein homozygoter Mangel des *Wt1* Tumorsuppressor führt zum Symptomenkomplex des WAGR-Syndroms. Hieraus lässt sich auch die Relevanz und Aufgabe des Proteins erahnen. Die betroffenen Kinder haben einen Wilms-Tumor, leiden unter einer Aniridie (Fehlen der Iris im Auge), haben genitale Fehlbildungen und sind zudem geistig stark retardiert (Fischbach et al., 2005). *Wt1* spielt eine wesentliche Rolle während der Nierenentwicklung. Der Urnierengang (Wolff-Gang), der epithelialen Ursprungs ist, und das mesenchymale metanephrogene Blastem waren ursprünglich voneinander getrennte Strukturen. Zwischen beiden Strukturen besteht eine epithel-

mesenchymale Beeinflussung. Das mesenchymale metanephrogene Blastem induziert die Bildung der Ureterknospe aus dem Urnierengang, aus der im Verlauf durch dichotome Aufzweigung das Nierenbeckenkelchsystem entsteht. Die Ureterknospe wiederum induziert die Umwandlung von mesenchymalen Zellen in Epithelgewebe, aus dem die Nephrone hervorgehen. Diese gegenseitige Einflussnahme wird reziproke Induktion genannt und findet in homozygoten *Wt1*-Knockout Mäusen nicht statt (Kreidberg et al., 1993, Lechner and Dressler, 1997). In gesunden, adulten Nieren wird *Wt1* jedoch nur noch in Podozyten exprimiert (Guo et al., 2002). Bei der Entwicklung des Herzens ist *Wt1* ein wichtiger Teil einer Kaskade, die für eine normale Entwicklung der Koronargefäße Voraussetzung ist (Wagner et al., 2005b). Des Weiteren ist *Wt1* notwendig für eine normale Embryonalentwicklung des olfaktorischen Epithels (Wagner et al., 2005a). Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2009, die einen großen Beitrag zu der Wahl dieses Dissertationsthemas hatte, zeigt, dass in der Leber *Wt1*-positive, aus dem Septum transversum Mesenchym stammende, submesotheliale Zellen als Vorläuferzellen von Lebersternzellen und perivaskulären, mesenchymalen Zellen fungieren (Asahina et al., 2009, Asahina et al., 2011).

1.7 Lineage Tracing

Beim Lineage tracing handelt es sich um eine Methode zur Markierung von spezifischen Zellpopulationen, deren Verlauf zum Beispiel bei Krankheitsbildern verfolgt werden kann. Hierbei wird eine Zelle so markiert, dass die Markierung an nachfolgende Zellgenerationen weitergegeben wird (Kretzschmar and Watt, 2012).

1.7.1 Cre/loxP-System

Für die Markierung spezifischer mesenchymaler Zellpopulation im Pankreas wurden in dieser Arbeit Mausmodelle mit dem Cre/loxP System verwendet. Den Experimenten mit diesem transgenen Mausmodell liegt die sequenzspezifische DNA-Rekombination zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen zu Grunde (Sternberg and Hamilton, 1981). Dieses Cre-Rekombinase/loxP-System ist ein etabliertes Werkzeug um DNA im Zielorganismus genetisch zu modifizieren. In Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen findet hierbei ein Mechanismus statt, bei dem je ein Rekombinase-Enzym an die palindromischen Sequenzen der beiden loxP-Stellen gebunden wird. Beide an die loxP-Sequenzen gebundenen Rekombinasen bilden daraufhin ein Tetramer und im Verlauf eine Schleife in der DNA-Tertiärstruktur,

wodurch die beiden loxP-Palindrome in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Voziyanov et al., 1999). Bei gleichgerichteter Anordnung der beiden loxP-Sequenzen zueinander wird die zirkuläre DNA zwischen den loxP-Stellen ausgeschnitten und die beiden offenen Enden des DNA-Stranges anschließend miteinander ligiert (Nagy, 2000).

1.7.2 CreER(T2)-System

Das CreERTm-System ist ein induzierbares System und hat den Vorteil, dass die Initiierung der Cre/loxP-Rekombination zeitlich kontrollierbar ist. Hierbei ist die Cre-Rekombinase an einen mutierten humanen Östrogenrezeptor gebunden und liegt im Zytosol. Erst durch Tamoxifen-Gabe, einem selektiven Östrogenrezeptoragonisten, kommt es zur Translokation der Cre-Rekombinase in den Zellkern und damit zur loxP-spezifischen Rekombination (Feil et al., 2009).

1.7.3 Transgene Reportermaus

Die für die Experimente verwendeten transgenen Mäuse entstanden aus der Verpaarung zweier etablierter Mäusestämme. Zum einen kam der Stamm Wt1^{tm2}(cre/ERT2)Wtp/J (Jackson Laboratories, Farmington, CT, USA) zum Einsatz (Zhou et al., 2008). Hierbei handelt es sich um ein knock-in Allel, bei dem das CreERTm-Fusionsprotein der Kontrolle des Wt1-Promotors unterstellt wird. Dadurch wird CreERTm in allen Wt1-positiven Zellen exprimiert. Zum anderen wurde der Stamm B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J (Jackson Laboratories) genutzt (Madisen et al., 2010). In der DNA dieses Stammes befindet sich eine loxP-flankierte Stoppkassette, die die Transkription des nachgelagerten Fluoreszenzproteins td-Tomato verhindert. Durch Kreuzung beider Stämme entstand eine Filialgeneration mit dem Genotypen Wt1Cre^{ERT};td-Tom^{flox}. Durch Tamoxifen-Induktion wandert die in Wt1-positiven Zellen exprimierte Cre-Rekombinase in den Zellkern und schneidet die für tdTomato zuständige Stoppkassette heraus. Da somit tdTomato ausschließlich in Wt1-positiven Zellpopulationen exprimiert wird, eignet sich dieses Mausmodell zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Wt1-positiven Zellen.

2 Zielstellung der Arbeit

Die exakte Herkunft mesenchymaler Zellen im Pankreas ist bis dato nicht lückenlos nachvollziehbar. Im adulten Pankreas mangelt es bei der Einordnung mesenchymaler Zellen an eindeutigen Zuweisungen. Ebenso ist unklar, welche Zellpopulation zur starken fibrotischen Reaktion während einer Pankreatitis beiträgt. Zwar konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass isolierte Sternzellen die Möglichkeit besitzen, sich in Myofibroblasten zu differenzieren, einen Beweis hierfür gibt es *in vivo* jedoch noch nicht (Bachem et al., 1998). Ziel dieser Arbeit ist es somit mesenchymale Zellen beziehungsweise Sternzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren, um den Beweis zu erbringen, dass diese Zellen für die fibrotische Reaktion bei der Pankreatitis verantwortlich sind. Hierfür wurde die Markierung von Foxd1- und Wt1-positiven Zellen gewählt. Die beiden Transkriptionsfaktoren werden hauptsächlich von mesenchymalen Zellen exprimiert. Zum einen konnten Asahina et al. zeigen, dass aus Wt1-positivem Septum transversum Mesenchym adulte Zellen der Leber, wie mesotheliale Zellen und Ito-Zellen, hervorgehen (Asahina et al., 2009). Zum anderen zeigten Humphreys et al. in der Niere, dass Foxd1-positive mesenchymale Zellen die Vorläuferpopulation von adulten Perizyten bilden, die sich im adulten Organ im Rahmen der Fibrose zu Myofibroblasten aktivieren lassen (Humphreys et al., 2010). Foxd1 und Wt1 sollen daher in dieser Arbeit durch verschiedene Methoden im Pankreas nachgewiesen werden. Durch Induktion einer Pankreatitis mit nachfolgender Fibrose soll zudem eine Einschätzung getroffen werden, wie sich die zu untersuchenden Zellen während der Pankreasfibrose verhalten, da von diesem pathologischen Prozess bekannt ist, dass dort die Population der mesenchymalen Zellen eine Schlüsselrolle spielt.

3 Material

Alle aufgeführten Puffer und Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt.

3.1 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 5'-Bromo-2'-deoxyuridine | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Acrylamid | BioRad, Hercules, CA, USA |
| Albumin Fraktion V, proteasefrei | Roth, Karlsruhe |
| Amersham ECL Western blotting detection reagents | GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK |
| Ammoniumpersulfat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Aqua B. Braun, pyrogenfrei | Braun, Melsungen |
| Cerulein | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dulbecco's PBS | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| EGTA | Roth, Karlsruhe |
| Eselserum | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ethanol 100%, 96%, 70%, 50% | Fischar, Saarbrücken |
| Ethanol, Emsure | Merck, Darmstadt |
| Gelatine | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Hämalaun | Merck, Darmstadt |
| HCl 5N Salzsäure | Krankenhausapotheke MRI, München |
| Histo Mark RED | KPL, Gaithersburg, MD, USA |
| Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI | Dianova, Hamburg |
| Isofluran | Albrecht GmbH, Aulendorf |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe |
| Liquid DAB+Substrat | Dako, Carpinteria, CA, USA |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe |
| MTT | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| NaOH 5N Natronlauge | Krankenhausapotheke MRI, München |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) | Life technologies, Darmstadt |
| NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X) | Life technologies, Darmstadt |
| Paraformaldehyd, 8 % in Aqua destillata | Krankenhausapotheke MRI, München |
| PBS Pulver | Biochrom, Berlin |
| RNAse freies Wasser | Quiagen, Hilden |
| Saponin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| SDS ultrapure | Roth, Karlsruhe |
| Streptavidin-Phosphatase | KPL, Gaithersburg, MD, USA |
| SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| SYBR green | Roche Applied Science, Mannheim |
| Tamoxifen | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tetramethylethylendiamin | Roth, Karlsruhe |
| Tri-Natriumcitrat Dihydrat | Roth, Karlsruhe |
| Tris-HCl | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Triton X-100 | Roth, Karlsruhe |

Material

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------------|
| Trizma base | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tryptan Blue Stain 0,4 % | Invitrogen, Auckland, NZ |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe |
| Vectamount Permanent Mounting Medium | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Xylol | Roth, Karlsruhe |
| Z-fix | Sigma-Aldrich, Steinheim |

3.2 Größen- und Massenstandard

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|

3.3 Kulturmedien

| | |
|---------------------|--------------------------|
| Fetales Kälberserum | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| RPMI-1640 Medium | Sigma-Aldrich, Steinheim |

3.4 Enzyme

| | |
|----------------------------------------------|--------------------------|
| Kollagenase IV (von <i>C. histolyticum</i>) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Phosphatase Inhibitor, PhosStop | Roche, Basel, Schweiz |
| Protease Inhibitor | Roche, Basel, Schweiz |
| Trypsin-EDTA solution 10 x | Sigma-Aldrich, Steinheim |

3.5 Geräte

| | |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|
| Autoklave VX-75 | Systec, Wetzlar |
| Einbettstation EG1160 | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Elektrophoresekammer, Mini-PROTEAN | BioRad, Hercules, CA, USA |
| Elektrophorese-Stromanschluss | Biometra, Göttingen |
| Elektrophorese-Zubehör | Whatman, Dassel |
| Hera Cell 150 Wärmeschrank | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Hera Safe Sterilbank | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Kühlplatte COP30 | Medite Medizintechnik, Burgdorf |
| LightCycler 480 | Roche Applied Science, Mannheim |
| Luminometer, Glomax Multi+ | Promega, Fitchburg, WI, USA |
| Mikroskop Axioskop 40 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Mikroskop, Axiovert 40 CFL | Zeiss, Oberkochen |
| Mikroskop-Kamera AxioCam MRm | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Mikrotom RM2255 | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Neubauer-Zählkammer | Marienfeld, Lauda-Königshofen |
| Orbitalschüttler Vibrax VXR | IKA, Staufen |
| Paraffin-Streckbad GFL-1052 | Hilab, Düsseldorf |
| pH-Meter | WTW, Weilheim |
| Pipetboy | Integra Bioscience, Fernwald |
| Röntgenfilmentwicklungsmaschine Optimax | Protec, Oberstenfeld |
| Röntgenkassette 18 x 24 cm | Rego, Augsburg |
| Rotator-Mixer | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Spektrophotometer NanoDrop® 2000 | Peqlab, Erlangen |

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------------------|
| Thermomixer | Eppendorf, Hamburg |
| Ultraschall-Homogenisator, UP100 | Hielscher, Teltow |
| Vakuum Gewebeprozessor ASP200S | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Vortex Mixer | Neo Lab, Heidelberg |
| Waage A120S | Sartorius, Elk Grove, IL, USA |
| Wärmeschrank 37 °C Heraeus | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Wärmeschrank Hera Cell 150 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Wasserbad GFL 1052 | Julabo, Seelbach |
| Wasserfiltersystem Milli-Q Advantage | Millipore, Schwallbach |
| Zentrifuge 5415R | Eppendorf, Hamburg |
| Zyto-Zentrifuge | Hettich, Tuttlingen |

3.6 Software

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------------|
| AxioVision SE64 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Luminometer-Software, Instinct | Promega, Madison, WI, USA |
| LightCycler® 480 Software | Quiagen, Hilden |
| Excel 2007 | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |

3.7 Primäre Antikörper

| Name | Bestellnr. | Spezies | Methode/Verdünnung | Hersteller |
|--------------------------------------|------------|---------|-------------------------------------|------------------------------------------------|
| Anti-CD31, Clone JC70A | M0823 | Maus | IHC 1:20 | Dako, Carpinteria, CA, USA |
| Anti-Desmin, Clone D33 | M0760 | Maus | IHC 1:100 | Dako, Carpinteria, CA, USA |
| Anti-Foxd1 | ab49156 | Hase | WB 1:800, IHC 1:300, IF 1:200 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-Gapdh | sc-32233 | Maus | WB 1:500 | Santa Cruz, Dallas, TX, USA |
| Anti-HSP27 | CS2442 | Maus | WB | Cell signalling, Danvers, MA, USA |
| Anti-Vimentin | ab8978 | Maus | IHC 1:200 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-Wt1 | sc-192 | Hase | WB 1:800, IF 1:200 | Santa Cruz, Dallas, TX, USA |
| Anti- α -Sma | ab5694 | Hase | IF 1:200 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti- α -Sma, Clone 1A4 | M0851 | Maus | WB 1:1000, IHC 1:1000, IF 1:1000 | Dako, Carpinteria, CA, USA |
| Anti- β -Actin (AC-15) | sc-69879 | Maus | WB | Santa Cruz, Dallas, TX, USA |
| Anti- β -Tubulin | ab6046 | Hase | WB | Abcam, Cambridge, UK |
| monoclonal tdTomato, clone 2H2 | TA180009 | Maus | IHC 1:200, IF1:200 | Origene Technologies, Rockville, MD, USA |

3.8 Sekundäre Antikörper

| Name | Bestellnr. | Spezies | Methode/Verdünnung | Hersteller |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------|--------------------|-----------------------------------------------|
| Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) | A-21202 | Esel | IF 1:500 | Invitrogen life technologies, Darmstadt |
| Alexa Fluor® 568 Donkey Anti-Mouse IgG | A10037 | Esel | IF 1:1000 | Invitrogen life technologies, Darmstadt |
| Alexa Fluor® 633 Donkey Anti-Goat IgG (H+L) | A-21082 | Esel | IF 1:1000 | Invitrogen life technologies, Darmstadt |
| Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate) | 4413S | Ziege | IF 1:500 | Cell signalling, Danvers, MA, USA |
| Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer, Anti- mouse | K4001 | Ziege | IHC unverdünnt | Dako, Carpinteria, CA, USA |
| Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer, Anti- rabbit | K4003 | Ziege | IHC unverdünnt | Dako, Carpinteria, CA, USA |
| ECL Mouse IgG, HRP-linked | NA931V | Schaf | WB 1:5000 | GE |

| | | | | |
|---------------------------------------------------|----------|-------|-----------|------------------------------------------------|
| whole Ab (from sheep) | | | | Healthcare, Chalfont St. Giles, UK |
| ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey) | NA934V | Esel | WB 1:5000 | GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK |
| normal rabbit IgG Alexa Fluor® 488 | sc-45068 | Ziege | IF 1:1000 | Santa Cruz, Dallas, TX, USA |

3.9 Antibiotika

| | |
|---------------------------------|--------------------------|
| Penicillin-Streptomycin in NaCl | Sigma-Aldrich, Steinheim |
|---------------------------------|--------------------------|

3.10 Primer

| Gen | Richtung | Primer | Produktlänge | Anl.-Temp | Lokalisation |
|--------------|-----------|------------------------|--------------|-----------|--------------|
| <i>Foxd1</i> | fw 5'-3' | CACCCCCTCCTGGACTAACC | 65 BP | 55° | exon 1 |
| <i>Foxd1</i> | rev 5'-3' | CGGGCGCTCTAGACTTGAC | 65 BP | 55° | exon 1 |
| <i>Ppib</i> | fw 5'-3' | GGAGCGCAATATGAAGGTGC | 135 BP | 55° | exon 2/3 |
| <i>Ppib</i> | rev 5'-3' | CTTATCGTTGGCCACGGAGG | 135 BP | 55° | exon 2/3 |
| <i>Wt1</i> | fw 5'-3' | AGGTAAAACAAGTAAAAGCCCT | 180 BP | 55° | exon 8/10 |
| <i>Wt1</i> | rev 5'-3' | GCACACTTTCCTGCCTGG | 180 BP | 55° | exon 8/10 |
| <i>αSma</i> | fw 5'-3' | CTGTCAGGAACCCTGAGACGC | 136 BP | 55° | exon 1/2 |
| <i>αSma</i> | rev 5'-3' | GGATGGGAAAACAGCCCTGG | 136 BP | 55° | exon 1/2 |

3.11 Kits

| | |
|-------------------------------|--------------------------------------------|
| cDNA Synthese-Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| M.O.M. Kit | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| RNeasy Plus Mini Kit | Qiagen, Hilden |

3.12 Biologisches Material

| | |
|----------------------------------------------------|------------------------------------|
| C57BL/6J Wildtyp, acht Wochen alt, weiblich | Charles River, Wilmington, MA, USA |
| B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J #007914 | Jackson, Farmington, CT, USA |
| STOCK Wt1tm2(cre/ERT2)Wtp/J #010912 | Jackson, Farmington, CT, USA |

3.13 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 96 Well Mikrotiterplatte | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| 96 Well PCR Platte | Starlab, Hamburg |
| Chromatographie-Papier | Whatman, Dassel |
| Amersham Hyperfilm ECL | GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK |
| Einbett-Kassetten | Roth, Karlsruhe |
| Einmal-Wägeschalen | Roth, Karlsruhe |
| Einwegskalpell | Feather, Osaka, Japan |
| Histowachs | Merck, Darmstadt |
| Insulinspritzen Micro-Fine 1 ml (U100) | B.Braun, Melsungen |
| Lab-Tek™ II Chamber Slides, 4 well | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| LightCycler 480 PCR-Platten Folie | Roche Applied Science, Mannheim |
| Menzel Gläser 24x50 mm | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Mikrotomklingen R35 | Feather, Osaka, Japan |
| Objektträger Superfrost Plus | Menzel, Braunschweig |
| Parafilm "M" | Pechiney, Chicago, IL, USA |
| Petri-Schalen 10 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Pipetten 10 µl, 100 µl, 1 ml. Research Plus | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1 ml | Starlab, Hamburg |
| Polypropylen Röhrchen 15 ml, 50 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Protran™ Nitrozellulosemembran BA 85 | Whatman, Dassel |
| Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml | Sarstedt, Nümbrecht |
| Serologische Pipetten 5,10,25,50 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Vasofix Safety 22 G 0.9x25 mm Kanüle | B.Braun, Melsungen |
| Verlängerte Pipettenspitzen, Gel Saver II | Kisker, Steinfurt |
| Wägepapier | Macherey-Nagel, Düren |
| Zellfilter, 100 µm | Becton Dickinson, Heidelberg |

4 Methoden

4.1 Tamoxifen-Induktion

Die Administration von Tamoxifen wurde an Mäusen des Genotyps $Wt1Cre^{ERT};td\text{-Tom}^{lox}$ vorgenommen, die sich in ihrer 7. Lebenswoche befanden. Die Tamoxifengabe fand über fünf Tage jeden zweiten Tag statt, wobei die drei Gaben genau eine Woche vor der geplanten Tötung der Maus lag. Es wurden 4 mg Tamoxifen (Sigma Aldrich, Steinheim) in 200 μ l Leitungswasser aufgeschlemmt und die Suspension wurde über eine orale Sondenfütterung mit einer Spritze und einer aufgesetzten weichen Plastik Vasofix Safety 22 G Kanüle (B.Braun, Melsungen) den Mäusen zugeführt.

4.2 Cerulein Injektion

Cerulein ist ein Cholezystokinin-Analogon, welches 1968 in der Haut des australischen Korallenfinger-Laubfroschs entdeckt wurde (De Caro et al., 1968). Der primäre physiologische Effekt von Cholezystokinin ist die Enzymproduktion und Enzymsekretion des Pankreas zu erhöhen. Bei supramaximaler Cholezystokinin-Wirkung, wie es bei der Administration von Cerulein der Fall ist, überschreitet die Proteinsynthese die Sekretionskapazität der Zelle und es kommt zur intrazellulären Akkumulation der synthetisierten Enzyme (Gorelick et al., 1993). In der Folge kommt es zur akuten Pankreatitis (Lampel and Kern, 1977). Den Mäusen wurden 100 μ g/kg Körpergewicht Cerulein (Sigma Aldrich, Steinheim), gelöst in 100 μ l physiologischer Kochsalzlösung in den Intraperitonealraum injiziert. Dieser Schritt wurde pro Tag achtmal im Abstand von 60 Minuten durchgeführt und am Folgetag wiederholt. 48 Stunden nach der letzten der 16 Injektionen wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt, getötet und die Pankreata entnommen.

4.3 Zellkultur

Acht Wochen alte Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurden deren Pankreata entnommen und in eisgekühltem PBS (Dulbecco's PBS, Sigma-Aldrich, Steinheim) zwischengelagert. Anschließend wurden die Pankreata auf eine Petri-Schale (Greiner Bio-One, Frickenhausen) gelegt und mit Hilfe einer Insulinspritze (B.Braun, Melsungen) mit 7 ml einer Lösung bestehend aus 1 mg/ml Kollagenase IV von *C. histolyticum* (Sigma-

Aldrich) in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) durchsetzt. Zudem wurde der Pankreas mit einem Einwegskalpell (Feather, Osaka, Japan) in kleinste Stücke geschnitten. Diese Suspension wurde mit einer serologischen Pipette (Greiner Bio-One) in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen (Greiner Bio-One) gegeben, welches für 20 Minuten auf einem Rotator-Mixer (Greiner Bio-One) bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) inkubiert wurde. Die Kollagenase wurde nach der Inkubation mit einer Lösung bestehend aus 10 % FCS (Sigma-Aldrich) in RPMI-1640 inaktiviert. Danach wurde die Zellsuspension durch einen 100 µm Nylon Zellfilter (Becton Dickinson, Heidelberg) in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 300 rpm bei RT zentrifugiert (Zyto-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen). Durch die Zentrifugation bei niedriger Drehgeschwindigkeit wurden die schweren Azinuskomplexe von den leichteren Zellen, wie Fibroblasten und Perizyten abgetrennt, die sich als Zellsuspension im Überstand befanden. Der entstandene Überstand wurde bei 1200 rpm zentrifugiert. Dadurch bildete sich wieder ein Zellpellet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer Nährlösung resuspendiert, die sich aus 10 % FCS in RPMI-1640, sowie 1 % Penicillin-Streptomycin (KPL, Gaithersburg, MD, USA) zusammensetzte. Mit dieser Zellsuspension wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen wurden je 500 µl pro Kammer eines 4 well Lab-Tek™ II Chamber Slides gegeben, welche im Folgenden zur Immunfluoreszenzfärbung verwendet wurden, zum anderen wurden je 5 ml auf eine Petri-Schale aufgetragen, womit im Verlauf eine Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR durchgeführt wurde und eine qualitative Bestimmung bestimmter Proteine durch Western Blots folgten. Des Weiteren wurden Petri-Schalen angelegt, deren Zellen für einen MTT-Test bestimmt waren. Sämtliche Gefäße wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Überstand verworfen und das jeweilige Gefäß mit PBS gewaschen. Aufgrund stärkerer Anhaftung der Fibroblasten an Polystyren wurde diese Zellfraktion aufgereinigt (Grinnell, 1978). Die Gefäße wurden anschließend je nach Versuchsaufbau mit verschiedenen angereicherten Medien befüllt und über einen vordefinierten Zeitraum bei 37 °C inkubiert.

4.4 RNA Isolation

Die Isolation von RNA erfolgte aus den beschriebenen in vitro Kulturen und wurde gemäß Protokoll des Herstellers und Reagenzien des RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen,

Hilden) durchgeführt. Der Überstand wurde zunächst verworfen und die Petrischale mit PBS gespült, um frei schwimmende Zellen sowie Detritus zu entfernen. Nun wurde jede Petrischale für 5 Minuten mit 600 µl einer Lösung bestehend aus 1 % 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) in RLT Plus Buffer (aus dem RNeasy Plus Mini Kit) benetzt. Das Zelllysat wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert und für 30 Sekunden im Vortex Mixer vermengt. Das Lysat wurde auf die gDNA Eliminator spin column gegeben um genomische DNA herauszufiltern und auf ein 2 ml Reagiergefäß gesetzt um den Durchfluss aufzufangen, der nach 30 Sekunden Zentrifugation (Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) bei RT und 10000 rpm entstand. Zum Durchfluss wurden 600 µl 70 % Ethanol (Emsure, Merck, Darmstadt) hinzu pipettiert, mit diesem vermischt und auf eine RNAeasy Spin column gegeben. Nach 15 Sekunden Zentrifugation bei RT und 10000 rpm wurde das Filtrat verworfen und die RNAeasy Spin column weiteren Schritten zugeführt. Erst wurden 700 µl RW1 auf die Zentrifugiersäule gegeben und für 15 Sekunden bei RT und 10000 rpm zentrifugiert, dann wurde die Prozedur mit 700 µl RPE wiederholt. Das Filtrat wurde jeweils verworfen. Die Zentrifugiersäule wurde nochmals für 1 Minute bei RT und 10000 rpm zentrifugiert. Um die RNA aus der RNAeasy Spin column zu lösen, wurde diese auf ein 1,5 ml Reagiergefäß gesetzt und 20 µl RNase freies Wasser mittig aufpipettiert. Nach dem Zentrifugieren für 1 Minute bei RT und 10000 rpm wurde das Eluat bezüglich der RNA Konzentration quantifiziert (siehe 4.5, Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA) und anschließend bei -80 °C konserviert.

4.5 Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA

Das Eluat, das aus dem Isolierungsvorgang mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) entstand, wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop® 2000 (Peglab, Erlangen) analysiert. Hierzu wurden von jeder Probe 1 µl auf die Messsonde des Geräts pipettiert. Die Abhängigkeit der Konzentration der zu untersuchenden Substanz von der Lichtabsorption folgt den Regeln des Lambert-Beer Gesetzes. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 280 nm und von Proteinen bei 260 nm (Huberman, 1995). Das Verhältnis zwischen beiden Parametern wird zur Bestimmung der Reinheit der RNA im Eluat verwendet. Ein Quotient von circa 2 wurde als nicht kontaminiert akzeptiert. Zudem wurde die Probe verworfen, falls sich eine RNA-Gesamtkonzentration von weniger als 100 ng pro µl ergab.

4.6 cDNA Synthese

Verwendet wurde das cDNA Synthese-Kit „Thermo scientific Verso cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific). In ein 1,5 ml Reagiergefäß wurde 1 µg RNA gegeben, weiterhin wurde nach dem Herstellerprotokoll 4 µl cDNA synthesis buffer, 2 µl dNTP Mix, 1 µl RNA Primer (random hexamers), 1 µl RT Enhancer und 1 µl Verso Enzyme Mix zugeführt. Das Gemisch wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Die Inkubation fand bei 42°C für eine Stunde statt. Nachfolgend wurden die Enzyme für zwei Minuten bei 95°C in einem Thermomixer inaktiviert. Nach Verdünnung mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 20 ng cDNA/µl wurden die Reagiergefäße bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

4.7 Quantitative *realtime*-PCR

Um die Expression bestimmter Gene zu quantifizieren wurde eine qPCR mit dem LightCycler 480 (Roche Applied Science, Mannheim) durchgeführt. Die qPCR zeichnet sich dadurch aus, dass noch während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion ihre Produkte durch einen fluoreszierenden Farbstoff gekennzeichnet und über dessen Lichtemission quantifiziert werden können (VanGuilder et al., 2008). Verwendet wurde hierfür ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff (SYBR Green, Roche), der spezifisch doppelsträngige DNA bindet und nur als Farbstoff-dsDNA-Komplex fluoresziert. Hierfür wurden 2 µl der zu quantifizierenden cDNA pro Reaktion verwendet, was 40 ng entspricht. In jedes Well (96-Well Platte, Starlab, Hamburg) wurden zudem 10 µl SYBR Green, 6 µl RNase freies Wasser und jeweils 1 µl der entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer hinzu pipettiert. Jede Reaktion wurde in Dubletten angelegt um aus den Ergebnissen am Ende einen Mittelwert bilden zu können. Das PCR-Gerät begann mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 2 Minuten. Darauf folgen 40 Zyklen, die sich in jeweils 3 Schritte gliederten: ein 15-sekündiger Denaturierungsschritt bei 95 °C, wobei die DNA Doppelstränge voneinander getrennt werden, 15 Sekunden „Annealing“ bei 55 °C, also Anlagerung der Primer an die entsprechenden Sequenzen der Einzelstränge und abschließend die komplementäre Verlängerung „Elongation“ der Primer in 5'-3' Richtung für 20 Sekunden bei 68 °C. Während der exponentiellen Phase der PCR Reaktion verdoppelt sich somit die Anzahl an DNA-Molekülen mit jedem Zyklus. Am Ende der Reaktionszyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse angefügt, um die Spezifität der Primer evaluieren zu können.

Zur Quantifizierung der DNA-Konzentrationen aus den Absorptionskurven wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt (Pfaffl, 2001). Der CT-Wert (Cycle Threshold beziehungsweise Schwellenwert-Zyklus) gibt den Zyklus an, in dem das Fluoreszenzsignal für die jeweilige Reaktion signifikant wurde. Die Expression der untersuchten Kandidatengene wurde auf das Haushaltsgen *Ppib* normiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct-Gen} - \text{Ct-Ppib}$).

4.8 Proteinisolation

Die Zellkultur wurde wie bereits beschrieben über einen je nach Experiment vordefinierten Zeitraum inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Petrischale mit PBS gespült. Um die anhaftenden Zellen vom Polystyren abzulösen, wurde der Boden mit einer 0,05 %-igen Trypsin-Lösung (Sigma-Aldrich) benetzt. Nach zwei Minuten Einwirkzeit bei 37 °C wurde das Enzym durch Zugabe von 5 ml 10 % FCS inaktiviert. Das Lysat wurde in ein Polypropylen Röhrchen gegeben und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde dem Zellpellet ein Protease-Inhibitor und Phosphatase-Inhibitor Cocktail zugegeben, gelöst in einem Zellysepuffer aus 2 % SDS (Roth, Karlsruhe) in 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich) bei einem pH von 8,0. Die Reagiergefäße wurden für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 15 Sekunden zum Zellaufschluss mit einem Ultraschall-Homogenisator (Hielscher, Teltow) behandelt und für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reagiergefäß gegeben und bis zur Analyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bei -80 °C gelagert. Ein Teil der Probe wurde sofort der Bestimmung der Proteinkonzentration zugeführt.

4.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Hierzu wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Reagenz wurde nach Protokoll des Herstellers zubereitet und davon je 200 μl in ein Well einer 96 Well Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) gegeben. In jedes Well wurden nun 10 μl des Zellysates pipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte in ein Luminometer (Glomax Multi+, Promega, Fitchburg, WI, USA) gegeben. Die Proteinkonzentrationen wurden durch die gemessenen Absorptionswerte mit Hilfe einer Eichgeraden berechnet, welche mittels Albuminproben bekannter Konzentrationen aufgestellt wurde. Die

kolorimetrische Detektion beruht auf dem Prinzip, dass Proteine im alkalischen Milieu Kupfer von Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren können. Einwertige Kupferionen wiederum reagieren mit der in der Reagenz enthaltenen Bicinchoninsäure zu einem Komplex, der im violetten Wellenlängenbereich bei 562 nm photometrisch quantifiziert werden kann (Smith et al., 1985).

4.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde durchgeführt um die Proteine der Molekülmasse nach aufzutrennen. Verwendet wurde hierbei eine Mini-PROTEAN Elektrophoresekammer (BioRad, Hercules, CA, USA). Zwischen die Glasplatten der Apparatur (Whatman, Dassel) wurde ein Trenngel gegeben, welches nach 45 Minuten polymerisierte. Anschließend wurde ein Sammelgel auf das Trenngel gegeben und mit einem Kamm Probenfächer zum Eingeben der Proteinlysate geschaffen. Die Zusammensetzung der Gele ist nachfolgend aufgelistet.

| Sammelgel | |
|------------------------------------------------------|--------|
| Destilliertes Wasser | 4,1 ml |
| Polyacrylamid 30 % (BioRad, Hercules, CA, USA) | 3,3 ml |
| Tris HCl 1,5 M bei pH 8,8 (Sigma-Aldrich, Steinheim) | 2,6 ml |
| SDS 10 % (Roth, Karlsruhe) | 100 µl |
| Ammoniumpersulfat 10 % (Sigma-Aldrich, Steinheim) | 15 µl |
| Tetramethylethylenediamin (Roth, Karlsruhe) | 50 µl |
| | |
| Trenngel | |
| Destilliertes Wasser | 3 ml |
| Tris HCl 1,5 M bei pH 8,8 (Sigma-Aldrich, Steinheim) | 1,3 ml |
| Polyacrylamid 30 % (BioRad, Hercules, CA, USA) | 750 µl |
| Tetramethylethylenediamin (Roth, Karlsruhe) | 50 µl |
| Ammoniumpersulfat 10 % (Sigma-Aldrich, Steinheim) | 10 µl |
| Tetramethylethylenediamin (Roth, Karlsruhe) | 25 µl |

Der Kamm wurde nach 30 Minuten dem Sammelgel entnommen. Von den bereits beschriebenen Proteinlysaten wurden 20 µg Gesamtprotein in ein Reagiergefäß gegeben. Es wurden 6 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Life technologies, Darmstadt) und 2,4 µl NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X) (Life technologies) hinzu pipettiert und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Um die Proteine zu denaturieren wurde das Gemisch für 5 Minuten auf 95 °C erwärmt (Thermomixer, Eppendorf) und nachfolgend mit Hilfe von verlängerten Pipettenspitzen Gel Saver II (Kisker, Steinfurt) in die Probenaschen des Sammelgels gegeben. In eine der Taschen wurden zudem 5 µl des Page Ruler prestained protein ladder (Thermo Fisher Scientific) pipettiert um der später gefärbten Proteinbande eine Molekülgröße zuordnen zu können. Die Elektrophoresekammer wurde mit einem Tris-Glycin-Puffer, bestehend aus 25 mM Tris (Sigma-Aldrich) und 190 mM Glycin (Roth) befüllt und an eine Stromstärke von 30 mA angeschlossen. Durch das im NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Life technologies) enthaltene Coomassie G250 konnte eine blaue Bande als Kontrolle der adäquaten Laufzeit verwendet werden. Als diese Bande das Gel komplett durchquert hatte wurde die Elektrophorese gestoppt.

4.11 Western Blot

Für den Western Blot wurde, wie auch in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, die Mini-PROTEAN Elektrophoresekammer (BioRad) verwendet. Auf das Trenngel, welches aus dem zuvor beschriebenen Vorgang hervorging wurde eine Protran™ Nitrozellulosemembran BA 85 (Whatman, Dassel) gelegt. Gel und Membran wurden

in einen Stapel Filterpapier eingebettet und mit Hilfe von Schwämmen in der Blot-Kassette fixiert. Als Puffer wurde eine Lösung aus 25 mM Tris, 190 mM Glycin und 20 % Methanol (Roth) verwendet. Zum Transferieren der Proteine wurde für eine Stunde eine Spannung von 100 V angeschlossen. Die negativ geladenen Proteine wanderten dadurch vom Gel Richtung Anode und werden auf der Membran gebunden. Die Blotting-Kammer wurde mit Kühllakkus versehen um ein Überhitzen des Puffers während des Blottingvorgangs zu vermeiden. Nachfolgend wurde die Membran in ein 50 ml Reagiergefäß gegeben und mit 5 % Milchpulver (Roth) in Dulbecco's PBS (Sigma-Aldrich) mit 0,1 % Tween 20 (Roth), im Nachfolgenden PBST genannt, für 12 Stunden auf einen Rotatormixer bei 4 °C gelegt. Dieser Schritt soll die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran blockieren. Zum Nachweis des Zielproteins wurde die Membran erneut in ein 50 ml Reagiergefäß gegeben und der entsprechende primäre Antikörper verdünnt in 5 % Milchpulver in PBST zugegeben. Die Inkubation fand für 2 Stunden bei RT auf einem Rotatormixer (Greiner Bio-One) statt. Danach wurde die Membran dreimalig für jeweils 10 Minuten mit PBST gespült. Um den primären Antikörper, der nun an das Zielprotein gebunden wurde sichtbar zu machen, wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper in Kontakt gebracht. Da sich der sekundäre Antikörper speziesspezifisch gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers richtet, muss dieser entsprechend der Wirtspezies des primären Antikörpers ausgewählt werden. Verwendet wurden HRP-gebundene IgG-Antikörper (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 % Milchpulver in PBST. Mit diesem wurde die Membran bei RT für eine Stunde inkubiert. Nach dem Waschen der Membran mit PBST für insgesamt dreimal zehn Minuten wurde die Membran in eine Röntgenkassette gelegt und mit Amersham ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare) inkubiert, um die durch HRP katalysierte Oxidation von Luminol zu starten, welche zur Chemolumineszenz führt. In einem abgedunkeltem Raum wurde nun Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) für einige Sekunden in die Röntgenkassette auf die Membran gelegt und nachfolgend in den automatischen Einzug der Röntgenfilmentwicklungsmaschine Optimax (Protec, Oberstenfeld) gegeben. Falls hierbei kein ausreichendes Signal detektiert werden konnte wurde die Membran noch zusätzlich mit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) bedeckt und nochmals ein Röntgenfilm in die Kassette gelegt und entwickelt. Sofern ein weiteres Zielprotein auf derselben Membran angefärbt werden

sollte, wurde die Membran von Antikörpern befreit. Das sogenannte „Strippen“ wurde mit Hilfe eines auf pH 2.5 eingestellten Puffers durchgeführt, welcher 200 mM Glycin (Roth) und 280 mM NaCl (Roth) enthielt. Die Membran wurde mit diesem bei 80 °C für 20 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen in PBST konnte erneut geblockt und der bereits beschriebene Vorgang mit einem anderen primären Antikörper wiederholt werden.

4.12 MTT-Test

Um die Zellviabilität zu bestimmen wurde wie beschrieben (siehe Zellkultur) eine Petri-Schale über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gefäß mit PBS gespült. Das Gefäß wurde mit 0,05 %-iger Trypsin-Lösung inkubiert, um anhaftende Zellen vom Gefäß zu lösen. Das Enzym wurde nach zweiminütigem Einwirken bei 37 °C mit 10 % FCS in RPMI-1640 inaktiviert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypan Blue Stain 0,4 % (Invitrogen, Auckland, NZ) vermengt, in eine Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen) gegeben und mit Hilfe eines Mikroskop, Axiovert 40 CFL (Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Hierzu wurden vier Großquadrate der Kammer ausgezählt und der Mittelwert mit 20000 multipliziert. Das Ergebnis entsprach der Zellzahl pro ml Zellsuspension. Die Konzentration war Berechnungsgrundlage für das Volumen an Nährlösung die zugegeben werden musste, um eine Zielkonzentration von 50000 Zellen pro ml herzustellen. Hiervon wurden jeweils 100 µl pro Well in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert, was 5000 Zellen pro Well ergab. Nährmedium war je nach Versuchsaufbau eine bestimmte FCS-Konzentration und 1 % Penicillin-Streptomycin in RPMI-1640. Die Inkubationszeit wurde im Vorfeld auf ein bis fünf Tage festgelegt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden 10 µl MTT (Sigma-Aldrich) zu den Zellen gegeben und nach vier Stunden die Zellen mit einem Puffer lysiert. Der Puffer wurde hergestellt aus 10 % SDS (Roth) und 0,01 N HCl (Krankenhausapotheke MRI, München) in ddH₂O. Am darauffolgenden Tag wurde die Mikrotiterplatte in ein Luminometer (Glomax Multi+, Promega, Fitchburg, WI, USA) gegeben. Da nur lebende Zellen das MTT in das blau-violette Formazan umsetzen, konnte durch Messung der Absorption die Viabilität der Zellen im zeitlichen Verlauf nachvollzogen werden (Mosmann, 1983).

4.13 Anfertigen von Gewebeschnitten für histologische Analysen

Hierfür wurden acht Wochen alte Mäuse vom Genotyp $Wt1Cre^{ERT};td\text{-Tom}^{lox}$ mit Isofluran (Albrecht GmbH, Aulendorf) anästhesiert und anschließend getötet. Die herauspräparierten Pankreata wurden in Einbett-Kassetten (Roth) gegeben und über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd fixiert, welches hergestellt wurde aus gleichen Teilen 8 % Paraformaldehyd (Krankenhausapotheke MRI) und PBS (Biochrom, Berlin). Am nächsten Morgen wurden die fixierten Gewebe zum Entwässern in den Vakuum Gewebeprozessor ASP200S (Leica Microsystems, Wetzlar) gegeben. Nach diesem automatisierten Prozess wurden die Pankreata mit Hilfe der Einbettstation EG1160 (Leica Microsystems, Wetzlar) in Histowachs (Merck, Darmstadt) zu einem Paraffingewebeblock gegossen. Um das Erhärten des Wachses zu beschleunigen wurden diese auf eine Kühlplatte (COP30, Medite Medizintechnik, Burgdorf) gegeben. Nach dem mechanischen Fixieren der gekühlten Wachsböcke in einem RM2255 (Leica Microsystems) wurden durch Mikrotomklingen R35 (Feather, Osaka, Japan) 2,5 µm dünne Schichten vom Paraffinblock abgetragen. Diese Schnitte wurden für wenige Minuten auf 40 °C warmes Wasser gegeben (Wasserbad GFL 1052, Julabo, Seelbach) um mit Hilfe der Oberflächenspannung des Wassers und Streckung des Wachses Falten in der Paraffinschicht beheben zu können. Anschließend wurden die Wachsstreifen auf einen Objektträger Superfrost Plus (Menzel, Braunschweig) gezogen. Diese wurden über Nacht bei 37 °C in einen Wärmeschrank (Heraeus, Thermo Fisher Scientific) gegeben um die Haftung des Gewebes am Glas zu optimieren.

4.14 Immunhistochemische Färbung

Am Folgetag wurden die Gewebeschnitte zum Entparaffinieren für dreimal zehn Minuten in Xylol (Roth) gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Hierzu verwendet wurde Ethanol (Fischer, Saarbrücken) in welches die Schnitte für jeweils fünf Minuten in verschiedenen Konzentrationen eingelegt wurden (3x 100 %, 1x 96 %, 1x 70 %, 1x 50 %). Nachfolgend wurden die Schnitte für jeweils fünf Minuten in destilliertem Wasser belassen. Für das Antigen-Retrieval wurden die Objektträger in 10 mM Citratpuffer pH 6 (Tri-Natriumcitrat Dihydrat, Roth) bei 600 Watt in einer Mikrowelle (Siemens, München) gekocht. Es wurde darauf geachtet, dass ab dem Erreichen der Siedetemperatur der Kochvorgang zehn Minuten später beendet wurde. Die

Gewebeschnitte kühlten für etwa eine Stunde im Puffer stehend bei RT aus. Danach wurden diese dreimal in PBS für jeweils fünf Minuten gereinigt. Anschließend wurde ein Blockierungsschritt vollzogen. Dieser hat den Zweck, unspezifische Bindungsstellen der anschließend aufpipettierten Antikörper zu verringern. Als Blockierlösung wurde 0,5 % Triton X-100 (Roth), 1 % Albumin Fraktion V, proteasefrei (Roth) und 10 % Eselserum (Sigma-Aldrich) in PBS verwendet und für eine Stunde auf dem Objektträger belassen. Im Anschluss wurde der Gewebeschnitt mit dem Primärantikörper, der sich gegen das gesuchte Antigen richtet, inkubiert. Dieser wurde mit einem Puffer bestehend aus 1 % Albumin in PBS im entsprechenden Verhältnis verdünnt. Die Inkubation fand über Nacht bei 4 °C statt und wurde durch einen dreimaligen Waschvorgang mit PBS abgeschlossen. Zur Detektion des Primärantikörpers am Zielepitop wurde ein sekundärer Antikörper ausgewählt, der sich gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers richtet. Demensprechend wurde ein Sekundärantikörper (EnVision+ System- HRP Labelled Polymers, Dako, Carpinteria, CA, USA) gewählt, der sich gegen die Wirtsspezies richtet, in der der Primärantikörper hergestellt wurde. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei RT wurden die Schnitte durch PBS von ungebundenen Antikörpern befreit. Um den Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplex sichtbar zu machen, wurden die Objektträger mit Liquid DAB+ Substrat (Dako) inkubiert. Es handelt sich hierbei um ein Substratsystem, das bei Kontakt mit der an den Sekundärantikörper konjugierten Peroxidase mit einer Braunfärbung reagiert. Bei ständiger mikroskopischer Kontrolle wurde bei Farbumschlag die Reaktion beendet, indem der Objektträger in ddH₂O gegeben wurde. Um eine bessere Übersicht innerhalb des Gewebes zu bekommen, wurden die Präparate für einige Sekunden in Hämalaun (Merck, Darmstadt) gegeben, welches hauptsächlich die Zellkerne blau anfärbt. Die Gewebeschnitte wurden im Anschluss für einige Minuten unter laufendes Leitungswasser gegeben. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder entwässert, welche der anfangs geschilderten absteigenden Alkoholreihe in umgedrehter Reihenfolge entsprach. Nach einem 30-minütigen Bad im Xylol wurde dem Objektträger mit Vectamount Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ein Menzel Glas 24 x 50mm (Thermo Fisher Scientific) aufgesetzt. Die Bildaufnahmen entstanden mit der Mikroskop-Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss, Oberkochen) unter dem Mikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss).

4.15 Immunfluoreszenz-Färbung

4.15.1 Von Paraffinschnitten

Die Immunfluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten folgt analog dem Protokoll der Immunhistochemiefärbung bis zu dem Zeitpunkt, an dem mit dem sekundären Antikörper inkubiert wird. Bei der Immunfluoreszenzfärbung ist am Zweitantikörper ein Fluorophor konjugiert. Durch eine Verdünnungslösung aus 0,5 % Triton X-100 (Roth) und 1 % Albumin Fraktion V, proteasefrei (Roth) in PBS wurden die Sekundärantikörper auf einen Titer von 1:1000 verdünnt. Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei RT auf den Objektträgern belassen. Überschüssige Antikörper wurden abermals mit PBS entfernt. Zur Vermeidung eines zu raschen Ausbleichens der Fluorophore sowie zur Anfärbung der Nucleoli im Gewebe wurde auf die Objektträger Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI (Dianova, Hamburg) gegeben und anschließend mit einem 24 x 50 mm Menzel Glas (Thermo Fisher Scientific) abgedeckt. Mit dem Fluoreszenzmikroskop Mikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss) und der Mikroskop-Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss) wurden Digitalphotographien aufgenommen. Da jedes Fluorophor ein anderes Emissionsspektrum besitzt und eine spezifische Anregungswellenlänge benötigt, wurden mehrere Bilder eines Bildausschnitts unter bestimmten Modi angefertigt und digital mit der Software AxioVision SE64 (Carl Zeiss) überlagert.

4.15.2 Immunfluoreszenz von Zellkulturen

Die anfangs beschriebenen Zellkulturen in 4 well Lab-Tek™ II Chamber Slides wurden bei 37 °C in einem 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin haltigem RPMI-1640 Medium für eine Woche inkubiert. Nach Verwerfen des Überstandes und einem sorgfältigen Entfernen des Detritus durch Zugabe von PBS und Verwendung des Orbitalschüttlers Vibrax VXR (Ika, Staufen), wurden die am Boden der Chamber Slides adhäsiven Fibroblasten durch Z-fix (Sigma-Aldrich) für 15 Minuten bei RT fixiert. Um die Fixierlösung gründlich zu entfernen wurden die Kammerdeckgläser dreimal mit PBST gespült. Darauf folgte ein Permeabilisierungsschritt, da unter anderem intrazelluläre Proteine angefärbt werden sollten. Hierzu wurden die Kammern für 30 Minuten mit 1 % Triton X-100 (Roth) in PBS bei 37 °C inkubiert. Einem erneuten Spülen mit PBST folgte ein Blockierungsschritt mit 10 % BSA (Albumin Fraktion V, proteasefrei, Roth) und 0,3 % Triton X-100 in PBS. Dieser einstündige Schritt ist notwendig, um unspezifische Bindungen der später

verwendeten Antikörper zu verhindern. Für die Antikörper wurde ein Verdünnungspuffer hergestellt, welcher aus 1 % BSA und 0,3 % Triton X-100 in PBS bestand. Die geeignetste Verdünnung für jeden einzelnen Antikörper ist im Materialkapitel aufgeführt. Der Primärantikörper im Verdünnungspuffer wurde für drei Stunden bei RT auf den Kammerdeckgläsern belassen. Danach wurden diese dreimalig mit PBST auf dem Orbitalschüttler gereinigt um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Um die Primärantikörper detektieren zu können wurden die Kammern mit einem gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Zweitantikörper inkubiert, an dessen Fc-Fragment ein fluoreszierendes Molekül gebunden war. Auch der Zweitantikörper wurde in einem bestimmten Verhältnis in Verdünnungspuffer gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurden die Kammern mit PBST gespült und die entfernbaren Polystyrol-Aufsätze abgenommen. Auf die Objektträger wurde anschließend Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI (Dianova) gegeben und mit einem 24 x 50 mm Menzel Glas (Thermo Fisher Scientific) bedeckt. DAPI bindet sich spezifisch an DNA und dient somit der Anfärbung der Zellkerne. Mit dem Fluoreszenzmikroskop Mikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss) und der Mikroskop-Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss) wurden Digitalphotographien aufgenommen. Da jeder Farbstoff nur mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden kann, wurden mehrere Bilder für einen Bildausschnitt angefertigt. Diese wurden mit der Software AxioVision SE64 (Carl Zeiss) überlagert.

4.16 Immunhistochemische Doppelmarkierung

Die Anfertigung der Gewebeschnitte für die immunhistochemische Doppelmarkierung entspricht im Wesentlichen dem bereits beschriebenen Vorgehen (Siehe „Anfertigen von Gewebeschnitten für histologische Analysen“) Nur wurden in diesem Ansatz Wildtypmäusen C57BL/6J (Charles River, Wilmington, MO, USA) statt transgener Mäuse verwendet und als Fixat Z-fix (Sigma-Aldrich) statt Paraformaldehyd. Nach der Nacht im Wärmeschrank wurden die Gewebeschnitte zum Entparaffinieren für dreimal zehn Minuten in reines Xylol (Roth) gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nachfolgend wurden die Schnitte für jeweils fünf Minuten erst in destilliertes Wasser und dann in einen Waschpuffer gegeben. Dieser wurde wie folgt hergestellt: in 1 l PBS (Biochrom, Berlin) wurden 2 g Gelatine (Roth) gegeben und auf einem Magnetrührer (IKA,

Staufen) bei 75 °C mit Hilfe eines Magnetstäbchens (Roth) durchmischt. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurden 1 g Albumin Fraktion V, proteasefrei (Roth) und 500 mg Saponin (Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Die Schnitte wurden zur Antigen-Rückgewinnung einer Pufferlösung zugeführt. Diese bestand aus 10 mM Trizma base (Sigma-Aldrich) und 0,5 mM EGTA (Roth) in ddH₂O und wurde auf pH 9,0 eingestellt. Die Objektträger wurden im Puffer stehend in eine Mikrowelle (Siemens, München) gegeben. Bei 600 Watt wurde der Puffer zur Antigen-Rückgewinnung zum Kochen gebracht. Dieser Schritt wurde nach 10-minütigem Kochen beendet. Anschließend wurde der Puffer inklusive Schnitte für circa eine Stunde bei RT abgekühlt. Danach wurden die Gewebeschnitte im Waschpuffer gereinigt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermindern, wurde nun ein Blockierungsschritt vorgenommen. Hierzu wurden die Proben für eine Stunde mit einer Blockierlösung inkubiert. Diese wurde wie der Waschpuffer hergestellt, mit dem Unterschied der 10-fachen Konzentration an Albumin Fraktion V, proteasefrei (Roth), nämlich 1 % Albumin, 0,05 % Saponin und 0,2 % Gelatine in PBS (Biochrom, Berlin). Anschließend wurde der Gewebeschnitt mit dem ersten Primärantikörper der nachzuweisenden Antigene, die in einem Verdünnungspuffer in einem bestimmten Verhältnis diluiert waren inkubiert und mit Parafilm "M" (Pechiney, Chicago, IL, USA) bedeckt. Der Verdünnungspuffer bestand aus 0,1 % Albumin Fraktion V, proteasefrei und 0,3 % Triton X-100 (Roth) in PBS. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Objektträger belassen. Danach wurden die Schnitte nochmals dreimalig gewaschen. Es wurde ein Sekundärantikörper gewählt, der sich gegen die Spezies richtet, in der der erste Primärantikörper erzeugt wurde. Dieser Sekundärantikörper war zudem mit HRP konjugiert, was notwendig ist um ihn in nachfolgenden Schritten sichtbar zu machen. Verwendet wurde EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako). Die Inkubationszeit für diesen Antikörper betrug eine Stunde und fand bei Raumtemperatur statt. Danach wurden die Schnitte im Waschpuffer von ungebundenen Antikörpern befreit. Um das erste gesuchte Antigen sichtbar zu machen wurden die Gewebeproben mit Liquid DAB+ Substrat (Dako) inkubiert. Die Reaktion fand bei ständiger Kontrolle unter einem Mikroskop statt. Bei Braunfärbung wurde die Reaktion beendet indem der Objektträger in ddH₂O gegeben wurde. Nach einem erneuten Reinigen im Waschpuffer wurde nun der zweite primäre Antikörper in einem bestimmten Verhältnis zum Verdünnungspuffer auf den Gewebeschnitt gegeben. Dieser wurde

für 90 Minuten bei RT auf diesem belassen. Hierauf folgte ein wiederholtes Abspülen des ungebundenen Antikörpers mit Hilfe des Waschpuffers. Da der zweite primäre Antikörper in der Maus kloniert wurde, fand dessen Detektion durch Mouse on Mouse (M.O.M.) Biotinylated Anti-Mouse Ig Reagent statt, das dem Vector M.O.M. Immunodetection Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) entnommen war. Dieser biotinylierte Antikörper wurde im Verhältnis 1:250 mit dem Verdünnungspuffer vermischt und für 30 Minuten bei RT auf die Präparate gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wurden diese für eine halbe Stunde bei RT mit Streptavidin-Phosphatase (KPL, Gaithersburg, MD, USA) inkubiert. Dieses Detektionssystem beruht auf der starken Komplexbindung von Streptavidin an Biotin (Livnah et al., 1993). Die an das Streptavidin gebundene Phosphatase ist Voraussetzung für die nachfolgende Anfärbung. Nach weiterem mehrfachem Waschen erfolgte diese durch Histo Mark RED (KPL). Auch diese Reaktion wurde laufend unter einem Mikroskop kontrolliert und bei ausreichender Intensität durch ddH₂O beendet. Zur besseren Orientierung im histologischen Präparat wurden die Schnitte zusätzlich für wenige Sekunden in Hämalaun (Merck, Darmstadt) gegeben, um die Zellkerne blau anzufärben. Die Gewebeschnitte wurden unter laufendes Leitungswasser gestellt bis keine blauen Schlieren mehr vom Objektträger abgingen. Danach wurden die Präparate mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, welche der anfangs genannten absteigenden Alkoholreihe in invertierter Reihenfolge entsprach. Nachdem die Objektträger für 30 Minuten in Xylol standen, wurden diese mit Vectamount Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories) unter Menzel Gläsern 24 x 50 mm (Thermo Fisher Scientific) eingedeckelt. Die Bildaufnahmen entstanden mit der Mikroskop-Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss) unter dem Mikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss).

5 Ergebnisse

5.1 Genexpressionsanalyse

Es wurden murine, mesenchymale Fibroblasten aus dem Pankreas und in zwei verschiedenen Medien inkubiert. Die Verwendung von Vollmedium (10 % FCS in RPMI-1640 mit 1 % Penicillin-Streptomycin) und Hungermedium (0,5 % FCS in RPMI-1640 mit 1 % Penicillin-Streptomycin) hatte das Ziel, die Aktivierung von Fibroblasten zu stimulieren beziehungsweise zu verlangsamen (Olivera and Spiegel, 1993). Die RNA wurde jeweils nach 24 Stunden und nach 72 Stunden isoliert. Für die Quantifizierung der Genexpression wurden die Ct-Werte jeweils auf das Haushaltsgen *Ppib* normalisiert und als *fold change* im Vergleich zu den Zellen auf 0,5 % FCS nach 24h dargestellt. Somit konnten Veränderungen im Expressionsniveau der Zielgene während einer in vitro induzierten Aktivierung der Fibroblasten gezeigt werden. Für die Mittelwerte wurde jeweils ein 95%-Konfidenzintervall angegeben.

α Sma

Als Aktivierungsmarker für die Fibroblasten wurde α Sma gewählt. Die Expression von α Sma stieg in Hungermedium wie auch Vollmedium deutlich an. Im Hungermedium erhöhte sich die normalisierte Expression von 1,000 auf $37,169 \pm 19,009$. Im Vollmedium konnte eine Steigerung von $2,200 \pm 0,845$ auf $200,258 \pm 48,274$ gezeigt werden. Somit zeigt sich innerhalb eines Zeitraumes von 48 Stunden eine durchschnittliche Steigerung der α Sma Expression in vitro um den Faktor 37 im Hungermedium und um den Faktor 91 im Vollmedium (Abb. 1).

Foxd1

Trotzdem die frisch isolierten Fibroblasten für 72 Stunden auf Hungermedium gehalten wurden, zeigte sich eine im Vergleich zur Messung nach 24 Stunden signifikant erhöhte Foxd1 Genexpression. Die normalisierte Expression zum Haushaltsgen *Ppib* stieg von 1,000 auf $6,081 \pm 2,926$. Ein gegenläufiges Ergebnis war im Vollmedium vorzufinden. Dort sank die normalisierte Expression im selben Zeitraum von $0,810 \pm 0,324$ auf $0,200 \pm 0,112$ (Abb. 1).

Wt1

Bezüglich *Wt1* konnte im Hungermedium, wie auch im Vollmedium jeweils eine Steigerung der Expression im zeitlichen Verlauf nachvollzogen werden. Im Hungermedium stieg diese von 1,000 auf $2,881 \pm 1,639$. Im Vollmedium hingegen veränderte sich die quantitative Expression von $1,117 \pm 0,574$ auf $4,377 \pm 2,185$. Der Unterschied der Expression nach 72 Stunden Inkubation zwischen beiden Medien zeigt jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied, da die normalisierte Expression bei einem Signifikanzniveau von 5% im Hungermedium bei $2,881 \pm 1,639$ und im Vollmedium bei $4,377 \pm 2,185$ lag (Abb. 1).

MTT-Test

Um die Zellviabilität der Fibroblasten *in vitro* zu beschreiben und mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse korrelieren zu können, wurde ein MTT-Test zeitgleich und unter selben Inkubationsbedingungen durchgeführt. Somit kann eine Aussage darüber getroffen werden, wie stark das gewählte Inkubationsmedium eine Auswirkung auf die Zellvermehrung der Fibroblasten hat. Im Vollmedium mit 10% FCS zeigte sich eine anfängliche Vermehrung der Zellzahl nach 24 Stunden, im Verlauf nimmt diese jedoch ab. Im Hungermedium ist eine konstante Abnahme der Fibroblastenzahl zu verzeichnen (Abb. 1).

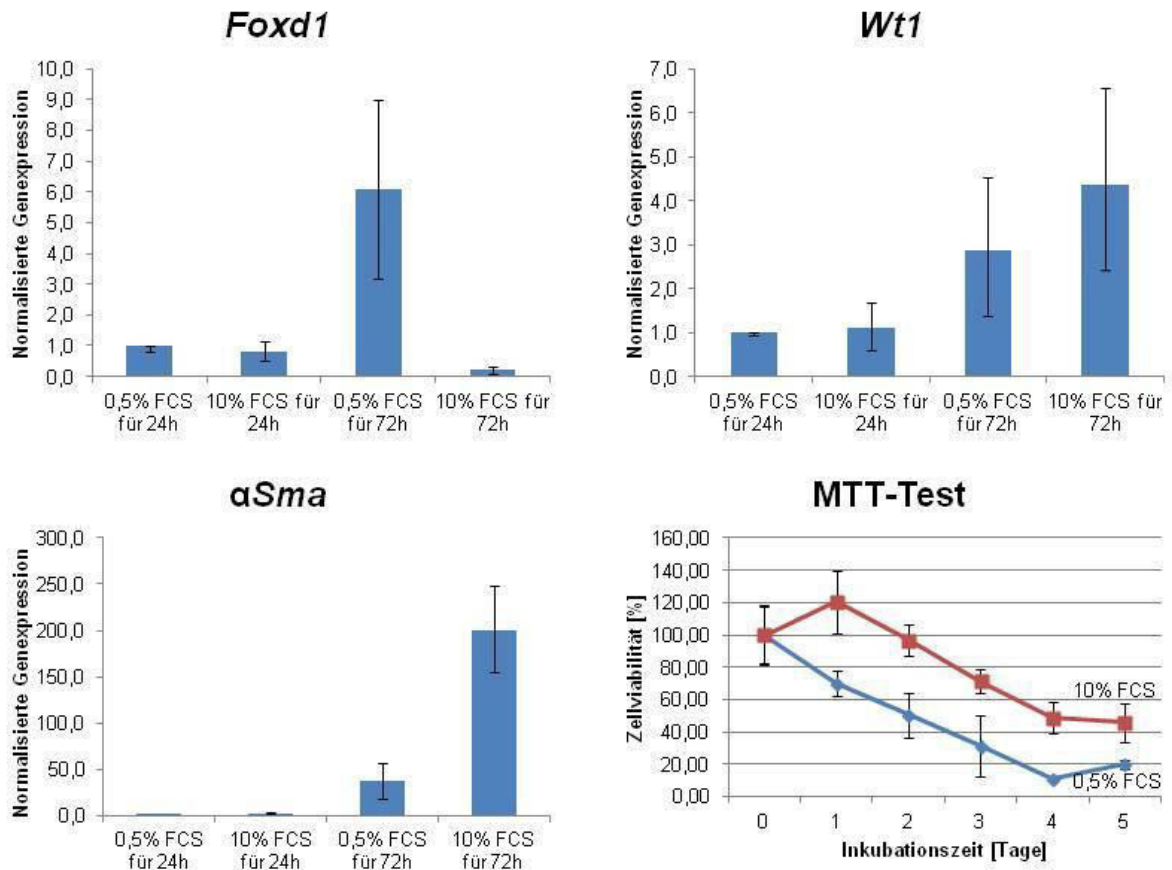


Abbildung 1: *Foxd1*, *Wt1* und *αSma*: Normalisierung der Expression der Zielgene *Foxd1*, *Wt1* und *αSma* zur Expression des Referenzgen *Ppib* in murinen Fibroblasten in vitro. Die mRNA wurden für alle vier Gene nach 24 Stunden (24 h) und 72 Stunden (72 h) Inkubation der Zellen in jeweils Hungermedium (0,5 % FCS) und Vollmedium (10 % FCS) isoliert. Bei *Foxd1* steigt die Expression im Hungermedium nach 72 Stunden im Verlauf an, sinkt jedoch im Vollmedium. Die Expression von *Wt1* steigt in beiden Medien an.

Die *αSma*-Expression steigt in beiden Medien deutlich an. Dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM, n=3.

MTT-Test: Die Analyse der Zellviabilität der Fibroblasten in 0,5 % FCS sowie 10 % FCS über fünf Tage zeigt im Vollmedium eine initiale Vermehrung der Zellzahl, im weiteren Verlauf nimmt die Zellzahl jedoch ab. Im Hungermedium ist eine weitestgehend lineare Abnahme der Fibroblastenzahl zu verzeichnen. Dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM, n=3.

5.2 Analyse der Proteinexpression

Der quantitative Nachweis von Foxd1 und Wt1 in den Fibroblasten des Pankreas gelang bereits auf Ebene der RNA mit Hilfe der qRT-PCR. Zur Quantifizierung auf Proteinebene wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Isolierte Fibroblasten aus Pankreata acht Wochen alter Wildtypmäuse, wurden hierfür *in vitro* verschiedenen Wachstumsbedingungen ausgesetzt um die Aktivierung der Fibroblasten zu stimulieren beziehungsweise zu verlangsamen. Die Fibroblasten wurden im Voll- und Hungermedium für jeweils 24 und 72 Stunden inkubiert um anschließend Proteine aus den vier Versuchsgruppen zu isolieren. Um die detektierten Banden der Western Blots zu validieren, wurde die Molekulargröße der Zielproteine auf der Membran befindlichen Protein-Leiter abgelesen und mit den Literaturwerten korreliert. Die mit einem Antikörper gegen Foxd1 gefärbte Membran zeigte eine Bande bei 46 kDa. Es kommt zu einer Steigerung der Expression bei zunehmender Inkubationsdauer und bei höherer FCS-Konzentration. Eine auf Wt1 gefärbte Membran zeigt eine Bande ähnlich zunehmender Intensität in allen Versuchsuntergruppen bei 52 kDa. Durch diesen Versuch konnte ebenfalls eine gesteigerte Proteinexpression für Wt1 durch die Aktivierung von Fibroblasten gezeigt werden. α Sma konnte bei 42 kDa detektiert werden. Dessen Expression nimmt erwartungsgemäß, als Marker für aktivierte Fibroblasten, im Vollmedium stark zu. Bei 37 kDa fand sich eine Bande für Gapdh, welches als Haushaltsgen fungieren sollte. Es konnte allerdings eine deutliche Zunahme der Bande im Zeitverlauf beobachtet werden. Auf Grund dieser Tatsache kommt Gapdh in diesem Fall nicht als Haushaltsgen in Frage, da sich die Expression während der *in vitro* induzierten Fibrose verändert und nicht konstant bleibt (Abb. 2).

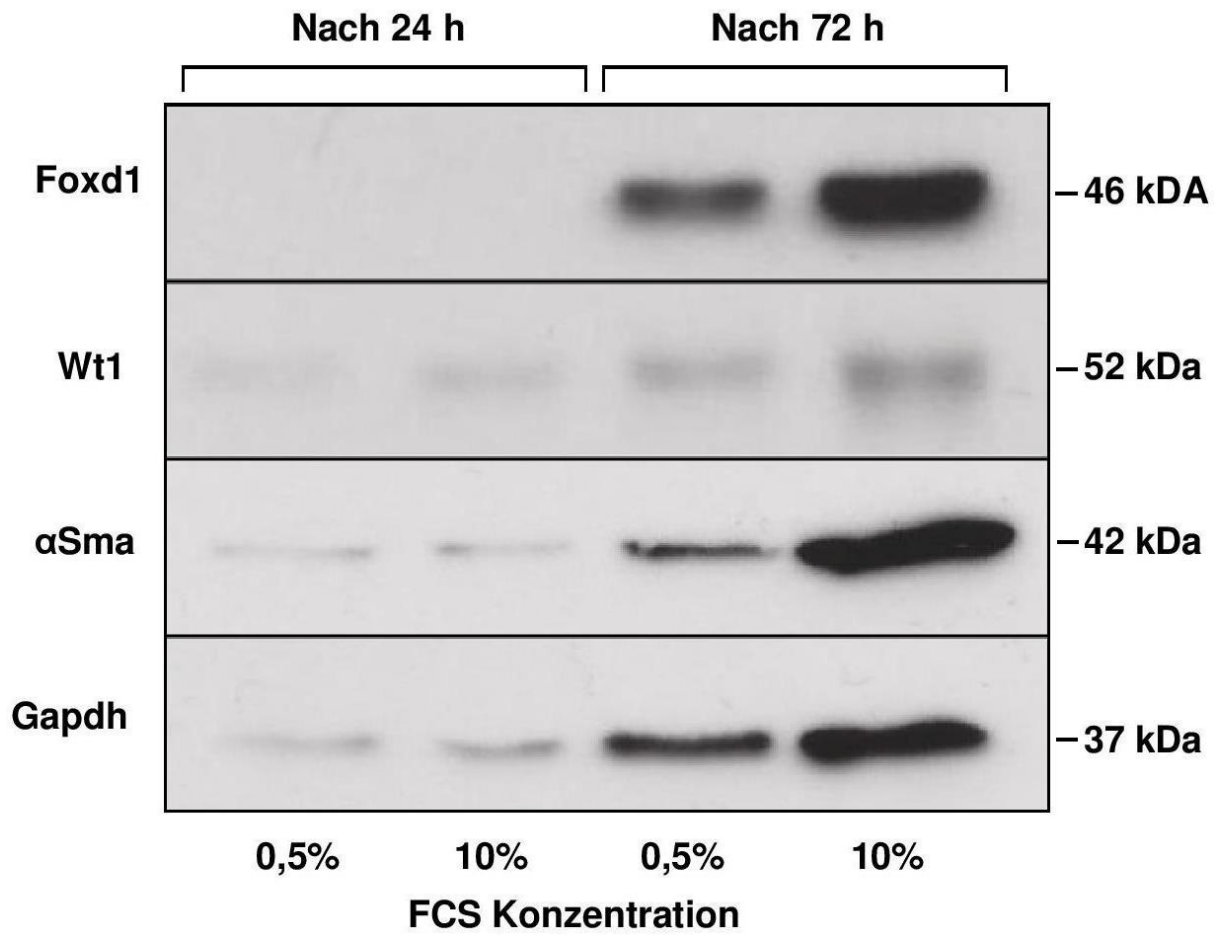


Abbildung 2: Western Blot isolierter Proteine aus Pankreasfibroblasten acht Wochen alter Wildtypmäuse. Die Fibroblasten wurden *in vitro* in Hungermedium (0,5 % FCS in RPMI-1640) und Vollmedium (10 % FCS in RPMI-1640) inkubiert. Nach 24 beziehungsweise 72 Stunden wurden die Proteine isoliert. Zielproteine für die Detektion waren Foxd1, Wt1, αSma und Gapdh.

5.3 Nachweis von Foxd1- und Wt1-positiven Zellen in Zellkultur

Um einen Eindruck davon zu bekommen, ob Foxd1 und Wt1 in aktivierten Fibroblasten nachweisbar ist, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung beider Zielproteine mit α Sma durchgeführt. Die Zellen stammen aus Pankreata acht Wochen alter Wildtypmäuse. Nach der Isolation der Fibroblasten wurden diese für eine Woche mit einem Vollmedium (10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin in RPMI-1640) zur Aktivierung stimuliert. Die Zielproteine Foxd1 und Wt1 wurden mit spezifischen Antikörpern rot gefärbt. Diese rot fluoreszierenden Zellen standen singulär und wiesen eine runde bis ovale Zellform auf. Eine erfolgreiche Fibroblastenaktivierung kann am Nachweis von α Sma in den grün angefärbten Zellsomata verschiedener Fibroblasten im Präparat nachvollzogen werden. Es zeigen sich charakteristische multiple Ausziehungen des Zytoplasmas, die den grün fluoreszierenden Zellen einen sternförmigen Umriss verleihen. Eine Überlagerung der von α Sma mit Foxd1 beziehungsweise Wt1 war nicht erkennbar. Zellen waren entweder α Sma-positiv und Foxd1-negativ, oder α Sma-negativ und Foxd1-positiv. Selbiges galt für Wt1. Die Färbung von Foxd1 zeigte eine nicht erwartete zytoplasmatische Färbung, was auf eine unspezifische Reaktion des Antikörpers hinweisen könnte. Der Anteil von Foxd1- sowie Wt1-positiver Zellen in den entsprechenden Färbungen wurde auf unter 5 % der Gesamtzellzahl geschätzt (Abb. 3).

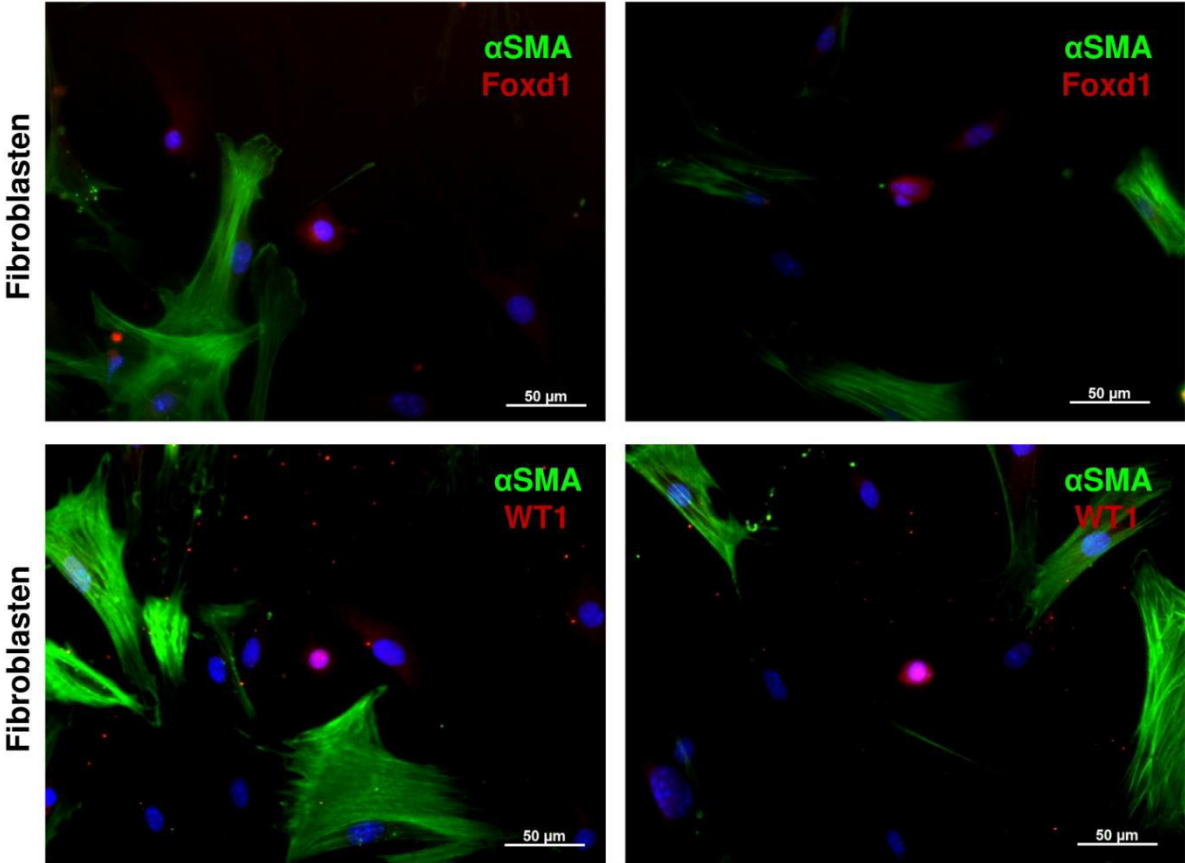


Abbildung 3: Immunfluoreszenzfärbung in vitro isolierter Pankreasfibroblasten acht Wochen alter Wildtypmäuse. Foxd1- und Wt1-positive Zellen zeigen eine rote Farbe, der Myofibroblastenmarker α Sma fluoresziert grün.

5.4 Immunhistochemische Doppelfärbung

Um herauszufinden welche weiteren Eigenschaften die Foxd1+ Zellen im Pankreas haben, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung durchgeführt. Die Pankreata stammten von acht Wochen alten, unbehandelten Wildtypmäusen C57BL/6J (Charles River, Wilmington, USA). Die Präparate wurden zum einen auf Foxd1 gefärbt, zum anderen auf verschiedene Zellmarker. Dadurch konnten im Gewebe zwei Zellpopulation gleichzeitig nachgewiesen, sowie deren Lage zueinander dargestellt werden. Es wurde α Sma, ein etablierter Marker für Myofibroblasten verwendet (Nagamoto et al., 2000). Um die Doppelfärbung richtig interpretieren zu können, sei auf die Tatsache verwiesen, dass auch Perizyten um Arteriolen und Venolen im Pankreas α Sma-positiv sind (Morikawa et al., 2002). Des Weiteren wurde auf das endotheliale Glykoprotein CD31 immungefärbt, um vaskuläre Strukturen zu markieren (van Mourik et al., 1985). Bei Vimentin und Desmin handelt es sich um Intermediärfilamente, die ausschließlich in mesenchymalen Zellen exprimiert werden (Ben Amar et al., 1988). Das Antigen Foxd1 zeigt sich in diesen Präparaten braun, wohingegen sich die Marker α Sma, CD31, Desmin und Vimentin in einem rosaroten Farbton präsentieren. Foxd1-positive Zellen zeigen sich rundlich bis oval, vereinzelt auch exzentrisch. Der Großteil der Foxd1-positiven Zellen zeigt eine intralobuläre, periazinäre Lokalisation. Deutlich erkennbar ist ebenfalls eine unspezifische Braunfärbung der Azinuszellen. Der Anteil Foxd1-positiver Zellen wurde auf unter 10 % geschätzt. Für Foxd1-positive Zellen konnte in keiner Doppelfärbung eine eindeutig erkennbare räumliche Beziehung zu α Sma, CD31, Desmin oder Vimentin gefunden werden (Abb. 4).

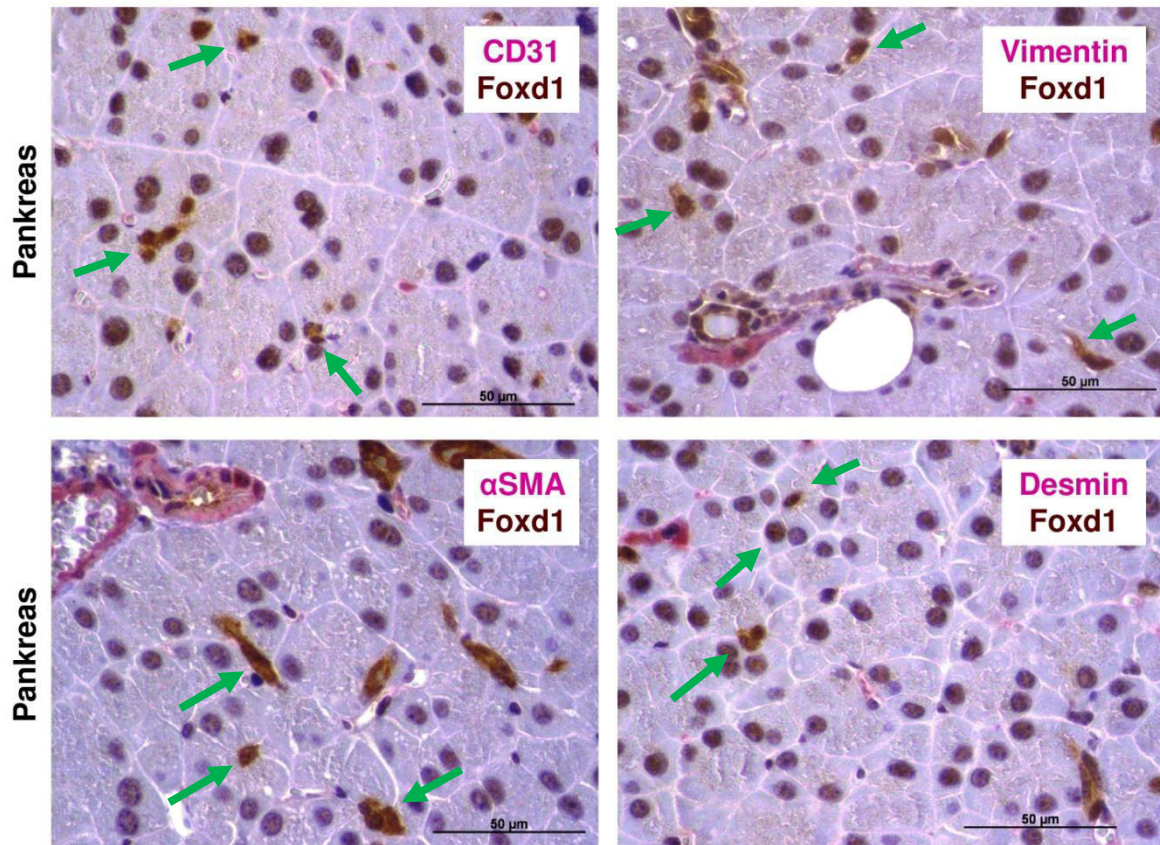


Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung Pankreata acht Wochen alter Wildtypmäuse. Foxd1+ Zellen sind in den Bildausschnitten braun gefärbt. Der endotheliale Marker CD31, der Myofibroblastenmarker α Sma, sowie die mesenchymalen Marker Desmin und Vimentin zeigen sich rosarot. Foxd1-positive Zellen sind mit grünen Pfeilen markiert, da diese nur schwer von den unspezifisch gefärbten Azinuszellen zu unterscheiden sind.

5.5 Immunmarkierung im transgenen Mausmodell

Die Färbung der Foxd1- und Wt1-positiven Zellen mit Hilfe von Antikörpern war sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unbefriedigend. Zudem erschien bei der *in vitro* Aktivierung der Fibroblasten in Zellkultur Wt1 als besserer Kandidat, da es ein ähnliches Expressionsmuster wie α Sma zeigte. Somit wurde zur Markierung von mesenchymalen Zellen im Pankreas das Mausmodell $Wt1^{Cre^{ERT}};tdTom^{flox}$ favorisiert. Als Positivkontrolle wurde die Niere gewählt, da vorangegangene Studien in der Niere nachweisen konnten, dass Podozyten im adulten Organ Wt1-positiv sind (Guo et al., 2002). In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass sich hepatische Stellatumzellen und pankreatische Stellatumzellen sehr ähnlich sind (Omary et al., 2007). Daher wurde zusätzlich die Leber gefärbt, um herauszufinden, ob dort ebenfalls Wt1-positive Zellen vorlagen. Mit Hilfe des Cre/Lox-Systems wurden Organe transgener Mäuse auf die Expression von Wt1 mittels „Lineage Tracing“ untersucht. Beim Genotyp $Wt1^{Cre^{ERT}};tdTom^{flox}$ wird das Fluorophor tdTomato (td-

Tom) ausschließlich in Wt1+ Zellen exprimiert. Es wurde ein Antikörper gegen tdTom (Origene Technologies, Rockville, MD, USA) verwendet, um das Fluorophor tdTomato in der Immunfluoreszenz zu verstärken. Des Weiteren bestand durch die Verwendung eines Antikörpers die Möglichkeit, zusätzliche immunhistochemische Färbungen durchzuführen, die mit Hilfe der Tageslichtmikroskopie analysierbar sind. Zunächst wurden die Organe Pankreas, Niere und Leber auf ihre Expression von Wt1 bzw. td-Tom mittels Immunhistochemie untersucht (siehe Abbildung 5A). In dieser immunhistochemischen Färbung zeigten sich die Zellkerne durch das Hämalaun stark blau und Zellsomata leicht blau angefärbt. Das Zielantigen tdTom wurde braun angefärbt. Positiv-gefärbte Zellen besaßen eine längliche Form und waren periazinär, intra- und interlobulär lokalisiert. In der Niere kamen die Podozyten braun zur Darstellung, wohingegen keine positiven Zellen in der Leber nachgewiesen werden konnten (Abb. 5A). Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung des Pankreas und der Niere auf Vimentin, das einen Marker für mesenchymale Zellen darstellt, hilft bei der Einordnung der Wt1+ Zellen in eine bestimmte Zellpopulation. Hierfür wurde ein grünes Fluorophor verwendet. Die Nucleoli sind durch die Verwendung von DAPI blau gefärbt. Zum Nachweis von tdTom wurde ein rot fluoreszierender Sekundärantikörper gewählt, entsprechend der Autofluoreszenz des Proteins. Es zeigten sich tdTom-positive Zellen mit lang gestreckten Somata intra- und interlobulär an der Basalseite von Azinuszellen. Innerhalb der Gruppe der Vimentin-positiven Zellen gibt es tdTom-positive wie auch negative Zellen, wobei die Anzahl der Letztgenannten überwiegt (Abb. 5B). Für die Induktion einer fibrotischen Reaktion des Pankreas wurden Wt1Cre^{ERT};tdTom^{fllox} Mäuse mit Cerulein behandelt (siehe Methoden) und die Gewebe 48 Stunden nach der letzten Cerulein-Applikation entnommen. Hier zeigte sich eine Zunahme der tdTom-positiven Zellen im Pankreas. Deutlich zu sehen ist ebenso eine stark erhöhte Anzahl an Vimentin-positiven Zellen. Das Ausmaß der Zellvermehrung der Vimentin-positiven Zellen übersteigt jedoch deutlich die der tdTom-positiven Zellen. In vivo ist demnach nur ein geringer Anteil an tdTom- beziehungsweise Wt1-positiver Zellen an der fibrotischen Reaktion beteiligt (Abb 5B, C48h).

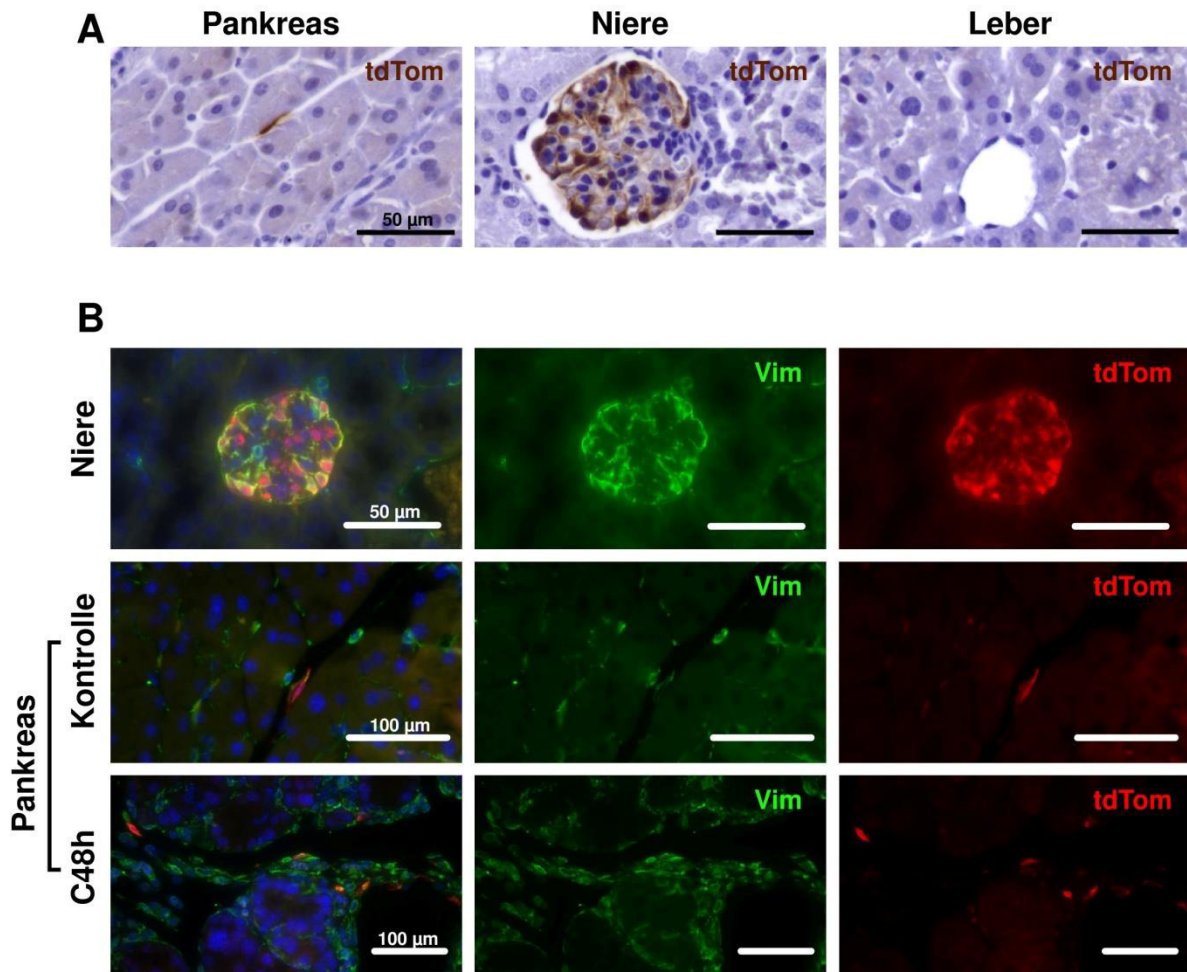


Abbildung 5: Immunhistochemie und Immunfluoreszenzfärbung tdTomato-positiver Zellen. (A) Pankreas, Niere und Leber acht Wochen alter, gesunder $Wt1Cre^{ERT};tdTom^{lox}$ Mäuse wurden in der Immunhistochemie auf die Expression von tdTomato untersucht. Es finden sich vereinzelt positive Zellen im Pankreas. Die Niere wurde als Positivkontrolle gewählt, da bekannt ist, dass adulte Podozyten $Wt1$ exprimieren (Guo et al., 2002). In der Leber konnten hingegen keine $Wt1$ -positiven Zellen identifiziert werden. (B) Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Niere und Pankreasgewebe von Mäusen des Genotyps $Wt1Cre^{ERT};tdTom^{lox}$. In der Niere zeigt sich eine Kolokalisation von tdTom-positiven Zellen mit Vimentin. Dieses fungiert als Positivkontrolle. Im Pankreasgewebe zeigt sich eine Koexistenz von tdTom+/Vimentin+ sowie tdTom-/Vimentin+ Zellen. Deutlich wird eine Vermehrung der tdTom+ Zellpopulation nach zweitägiger Cerulein-Induktion (C48h). Es wurde eine 400-fache Vergrößerung gewählt.

5.5.1 Fibroblasten in vitro

Der vorherige Versuch am Tiermodell wurde durchgeführt um abschätzen zu können, wie stark sich die Anzahl tdTom-positiver Zellen in Cerulein-behandelten Tieren verändert. Des Weiteren wurden die tdTom-positiven Zellen auf ihre Fähigkeit zur Expansion unter aktivierenden Zellkulturbedingungen untersucht. Hierfür wurden Fibroblasten aus Pankreata von Mäusen des Genotyps $Wt1Cre^{ERT};tdTom^{lox}$ isoliert. Diese Fibroblasten stammten zum einen aus unbehandelten Mäusen, die in diesem Falle die Kontrollgruppe darstellen, zum anderen aus Mäusen, deren Pankreasgewebe 48 Stunden nach der letzten Cerulein-Behandlung isoliert wurden.

Die Zellen wurden für 24 Stunden und 96 Stunden in Vollmedium kultiviert. Bereits nach 24 Stunden konnten in der Cerulein-behandelten Gruppe mehr tdTom+ Zellen identifiziert werden als in der Kontrollgruppe (Abb. 6A, B; 24h). Deutlich zu erkennen war auch, dass tdTom+ Zellen unabhängig der Vorbehandlung der Maus *in vivo*, nach Inkubation für 96 Stunden in 10 % FCS, in gleichem Ausmaß mit starker Proliferation reagierten, wobei abhängig von der Ausgangssituation nach 96 Stunden mehr tdTom-positive Zellen in der Kultur der Cerulein-behandelten Tiere zu erkennen waren (Abb. 6A, B; 96h).

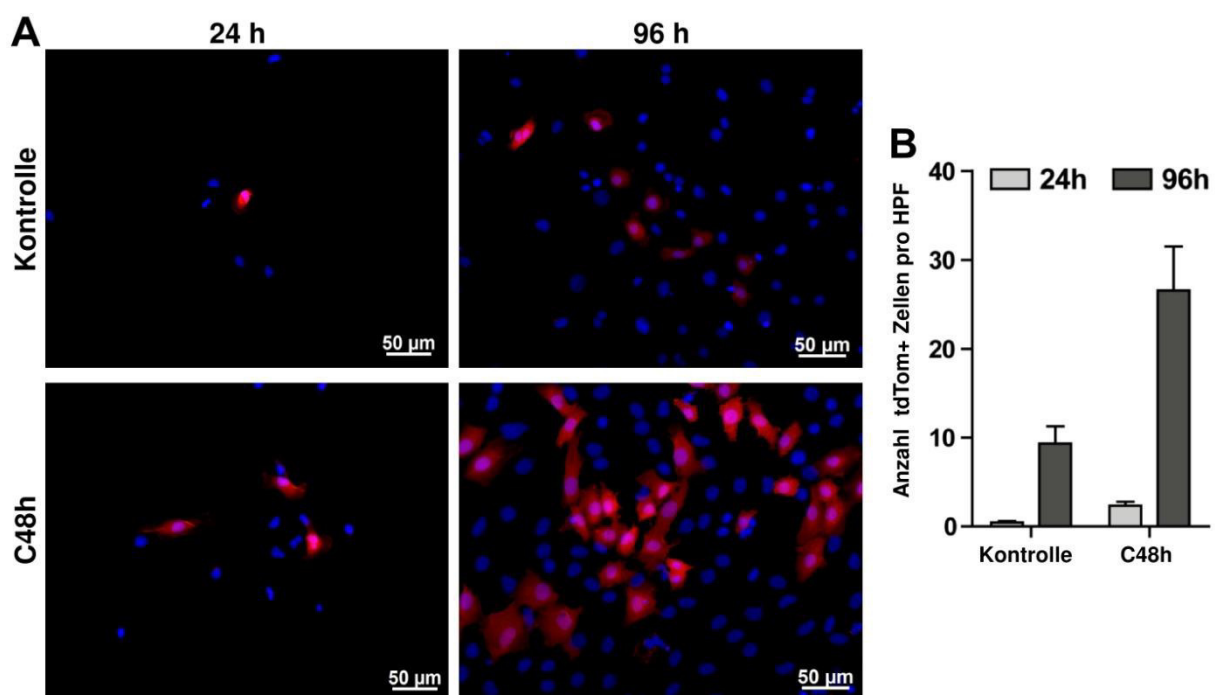


Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung *in vitro* isolierter Fibroblasten aus Pankreata acht Wochen alter Wt1Cre^{ERT};tdTom^{lox} Mäuse. (A) Es wurden zum einen gesunden Mäusen Pankreata entnommen (Kontrolle), zum anderen Wurfgeschwister, die 48 Stunden vor Tötung mit Cerulein behandelt wurden (C48h). Die isolierten Fibroblasten wurden für einen Tag (24 h) sowie vier Tage (96 h) *in vitro* in Vollmedium belassen und danach fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es zeigt sich eine deutliche Expansion abhängig von der Inkubationszeit in beiden Subgruppen. Des Weiteren konnte in den Cerulein-induzierten Tieren eine höhere Anzahl an tdTom-positiven Fibroblasten isoliert werden, die sich ebenfalls *in vitro* deutlich vermehren. (B) TdTom+ Zellen für beide Vorbehandlungen und Zeitpunkte wurden manuell ausgezählt als absolute Anzahl an rot fluoreszierenden Zellen pro Hauptgesichtsfeld (HPF) \pm Standardabweichung (n=3) angegeben.

Im selben Experiment fiel zudem auf, dass tdTom-positive Zellen derselben Maus bei gleichen Wachstumsbedingungen auf demselben Präparat eine unterschiedliche Zellmorphologie zeigten. Zum einen zeigten sich runde bis ovale Zellsomata (Abb. 7A), wohingegen andere Zellgruppen identifiziert werden konnten, die längliche Fortsätze aufwiesen (Abb. 7B). Die runden tdTom-positiven sind deutlich kleiner als

die Zellen, die Fortsätze besitzen. Die maximale Längenausdehnung der größeren, fortsatztragenden Zellen beträgt das in etwa 3- bis 6-fache der rundlich-ovalen Zellen.

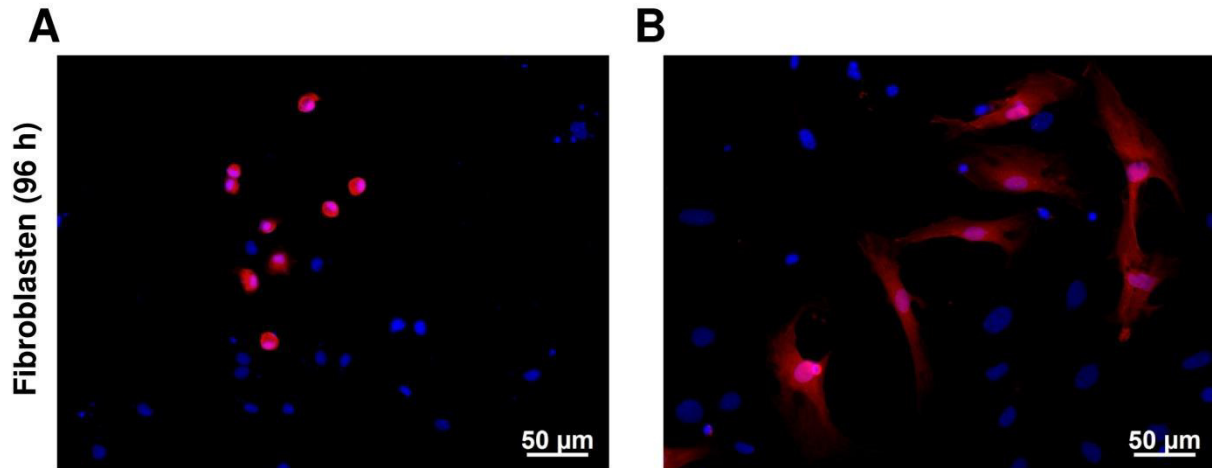


Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung in vitro isolierter Fibroblasten aus Pankreata acht Wochen alter, gesunder *Wt1Cre^{ERT};tdTom^{fllox}* Mäuse, die für 96 Stunden in Vollmedium inkubiert wurden. (A) In diesem Hauptgesichtsfeld zeigt sich eine Population tdTom-positiver Zellen, die eine runde bis ovoide Morphologie besitzen. (B) Im selben Präparat konnte eine Fibroblastenpopulation tdTom-positiver Zellen identifiziert werden, deren Somata zahlreiche Fortsätze und Verzweigungen untereinander aufwiesen.

6 Diskussion

6.1 Foxd1

6.1.1 Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

Der Nachweis der essentiellen Rolle des Transkriptionsfaktors Foxd1 für das stromale Mesenchym während der Nephrogenese stoß Spekulationen über eine ähnliche Relevanz von Foxd1 in anderen Organen an (Hatini et al., 1996). Parallelen in der Organogenese des Pankreas und der Niere bestehen vor allem in der Abhängigkeit des Wachstums des epithelialen Kompartiments vom Mesenchym. Dieser Zusammenhang wurde im Pankreas schon 1960 in einem Experiment gezeigt, als rudimentäres pankreatisches Epithelium eines sich entwickelnden Mausembryos in vitro kultiviert wurde. Aus dem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass das Epithelium allein nicht wachstumsfähig ist und sich nur in Kokultur mit Mesenchym entwickelt (Golosow and Grobstein, 1962). Der Nachweis auf molekularer Ebene folgte erst 2001. Es konnte gezeigt werden, dass während der Embryogenese *Fibroblast growth factor 10* (Fgf10) von mesenchymalen Zellen exprimiert wird, die direkt an die ventrale und dorsale Pankreasanlage angrenzen.

Bei selektiver Ausschaltung dieses Faktors wurden zwar die initialen Ausstülpungen der beiden Anlagen ausgebildet, allerdings arretierte die weitere Verzweigung des Pankreasepithels beziehungsweise die Differenzierung von PDX1+ Vorläuferzellen an diesem Punkt (Bhushan et al., 2001). Seitdem wurden viele weitere Keimbahnmutationen in genetischen Modellen induziert, die zu tiefgreifender Erkenntnis der mesenchymal-epithelialen Signalübertragung führten. Es wurden die Signalwege Retinsäure, Wnt, weitere FGF-Isoforme, BMP, TGFbeta, und EGF als essentielle Regulatoren der Entstehung des Pankreas identifiziert (Gittes, 2009). Ein murines Modell, bei dem ein spezifischer Verlust des Mesenchyms während der Embryogenese des Pankreas möglich war, wurde 2011 erstmals beschrieben. Da das Homeobox Gen *Nkx3.2* nur im Mesenchym und nicht in den anderen Kompartimenten des Pankreas während der Organogenese anzutreffen ist, konnten in einer *Nkx3.2-Cre;DTR* transgenen Maus die mesenchymalen Zellen zu beliebigen Zeitpunkten in der Embryogenese deletiert werden. Hier zeigte sich, dass mesenchymale Zellen zu frühen sowie späteren Entwicklungszeitpunkten die Proliferation von Vorläuferzellen und differenzierten Zellen im Pankreas steuern (Landsman et al., 2011). Die Entwicklung des Pankreas läuft also unter vielen Gesichtspunkten ähnlich der Nephrogenese ab. Während der Pankreasentstehung knospen die Pankreasanlagen aus dem epithelialen Endodermschlauch in das umgebende Mesenchym, von dem die weitere Differenzierung und dichotome Verzweigung zu einem Gangsystem abhängt (Kim and Hebrok, 2001). Ähnlich kann bei der Entwicklung der Niere beobachtet werden, dass die Ureterknospe aus dem Urnierengang in das umgebende metanephrische Mesenchym wächst. Die epitheliale Ureterknospe wächst unter bilateraler Abhängigkeit von Signalen aus dem Mesenchym in dieses ein und verzweigt sich weiter, um das Sammelsystem zu bilden (Dressler, 2006). Von diesen sehr vergleichbaren Vorgängen in der Entwicklung beider Organe ist die Nephrogenese weitaus besser erforscht. Die ausgesprochen tragende Rolle des *Foxd1*-Transkriptionsfaktors in der Niere führte zu der Frage, in wie fern dieser auch im Pankreas von Bedeutung ist. Insbesondere der Beweis, dass aus *Foxd1*-positiven mesenchymalen Zellen interstitielle Zellen in der adulten Niere entstehen, die in der Nierenfibrose eine entscheidende Rolle spielen (Humphreys et al., 2010), lässt Spekulationen über ähnliche Mechanismen in Pathologien des Pankreas zu.

6.1.2 Immunhistochemische Färbung

Eine immunhistochemische Färbung auf Foxd1 im adulten Pankreas der Maus zeigte das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors auch nach abgeschlossener Organogenese. Wie im Ergebnisteil zu sehen ist (siehe 4.15, Immunhistochemische Doppelmarkierung), sind die meisten Foxd1+ Zellen intralobulär und periazinär lokalisiert. Mit Hilfe einer Doppelfärbung auf ein zweites Antigen konnte eine weitere Charakterisierung der Zellen erfolgen. Zum einen konnte bei einer immunhistochemischen Färbung auf Foxd1 und CD31 gezeigt werden, dass beide Zelltypen nicht direkt aneinander grenzen. Diese Erkenntnis spricht dafür, dass es sich bei Foxd1+Zellen nicht um Perizyten handelt, da diese sonst mit den Kapillaren oder postkapillären Venolen benachbart sein müssten (Hirschi and D'Amore, 1996). Um weitere Aussagen treffen zu können wurde das Gewebe auf die Expression von α Sma und Foxd1 untersucht. Hierbei zeigten sich in der Doppelfärbung von Foxd1 und α Sma zwei verschiedene Zellpopulationen. α Sma war in diesen nativen, adulten Pankreata in glattmuskulären Anteilen der Blutgefäße und des Gangsystems vorzufinden. Somit kann vermutet werden, dass Foxd1 im nativen, adulten Pankreas nicht in Zellen exprimiert wird, die zum glattmuskulär differenzierten Zelltyp gehören. Ob Foxd1 in Myofibroblasten oder aktivierten Pankreassternzellen positiv ist, kann im gesunden und nicht vorbehandelten Pankreas jedoch nicht beantwortet werden (Apte et al., 1998). Durch Immunmarkierung mit Anti-Vimentin-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass es Vimentin-positive Zellen gibt, die anhand der Lage innerhalb des Gewebes Perizyten zuzuordnen sind. Diese Zellen besitzen keine räumliche Assoziation zu Foxd1-positiven Zellen. Ähnliches wurde bei der Doppelfärbung auf Foxd1 und Desmin deutlich, da eindeutig Desmin-positive und eindeutig Foxd1-positive Zellen im Gewebe identifiziert werden konnten. Ob die Foxd1-positiven Zellen Vimentin- oder Desmin-positiv sind ist eine Frage, die diese Immunmarkierung nicht vollständig beantworten kann. Obwohl die Chromogenkombination sehr sensitiv zwei verschiedene Zellpopulationen nachweisen kann, ist die Visualisierung einer Kolo-kalisation bei dieser Farbkombination nicht immer eindeutig möglich. Die rot-braune Mischfarbe, die sich aus der Reaktion von alkalischer Phosphatase mit der HistoMark Red Lösung zu rot und HRP mit DAB zu braun ergibt, ist visuell nicht leicht von den Einzelfarben unterscheidbar (van der Loos, 2008).

6.1.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Erkenntnis, dass Foxd1 im Pankreas vermutlich nicht in α Sma-differenzierten Zellen exprimiert wird, zeigte sich nicht nur in der immunhistochemischen Doppelfärbung, sondern bestätigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung auf Foxd1 und α Sma in vitro. Hier konnten keine Foxd1+/ α Sma+ Zellen identifiziert werden. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Foxd1 in ruhenden Fibroblasten positiv ist, die sich im Verlauf myofibroblastenartig differenzieren und ihre Foxd1 Expression einstellen. Dieses Verhalten Foxd1-positiver Zellen würde sich mit den Erkenntnissen aus der Niere decken, da dort ebenfalls Foxd1-positive Zellen die Vorläuferpopulation α Sma-negativer interstitieller Zellen darstellt, die sich während der Nierenfibrose in α Sma-positive Myofibroblasten ausdifferenzieren (Humphreys et al., 2010). Als weitere Möglichkeit besteht, dass es sich um zwei von Grund auf verschiedene Zellentitäten handelt und dass Vorgängerkzellen von Myofibroblasten nie Foxd1 exprimiert haben. Als Kritikpunkt der Methode sei angemerkt, dass in der immunhistochemischen wie auch in der Immunfluoreszenzfärbung ein Färbungsmuster zu erkennen ist, das den Zellkern wie auch das Zytosol der Zelle umfasst. Da es sich bei Foxd1 jedoch um einen nukleär lokalisierten Transkriptionsfaktor handelt, ist ein unspezifisches Färbeverhalten des Antikörpers gegen Foxd1 nicht auszuschließen.

6.1.4 Western Blot

Der Nachweis des Foxd1 Transkriptionsfaktors aus isolierten Pankreasfibroblasten durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot geschah durch Identifizierung einer spezifischen Bande bei 46 kDa. Obwohl nach 24 Stunden keine eindeutige Bande zu sehen war, ist nach 72 Stunden im Hungermedium und vor allem im Vollmedium eine deutliche Intensitätszunahme der Banden zu verzeichnen. Der Nachweis von Foxd1 im Western Blot soll vor allem die Hypothese untermauern, dass Foxd1 in einer Subpopulation von Fibroblasten im Pankreas vorzufinden ist. Dies wurde dadurch bewerkstelligt, dass die Fibroblasten durch die beschriebene Adhäsion an Polystyren (siehe 4.3, Zellkultur) isoliert wurden. Allerdings kann mit diesen Ergebnissen des Western Blots keine semiquantitative Analyse durchgeführt werden. Obwohl durch die Proteinquantifizierung mit Hilfe des BCA-Assays die Konzentration geschätzt werden konnte und dadurch theoretisch eine Gleichbeladung jeder Probetasche durch Zugabe des entsprechenden Volumens gegeben sein müsste, ergaben sich Probleme bei der Suche eines geeigneten Antikörpers gegen ein Haushaltsgen.

Nachdem mit den Antikörpern Anti- β -Tubulin (Abcam, Cambridge, UK), Anti-HSP27 (Cell signalling, Danvers, MA, USA) und Anti- β -Actin (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) versucht wurde eine Gleichbeladung der Taschen zu beweisen, wurde letzten Endes Anti-Gapdh (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) verwendet, da mit diesem Antikörper eine Bande bei jeder Probe eindeutig nachzuweisen war. Unvorteilhaft ist jedoch, dass die Intensität der Banden für Gapdh nach 72 Stunden sich so signifikant von den Banden nach 24 Stunden unterscheidet, dass keine verlässliche Aussage über die Zunahme der Proteinexpression von Foxd1 möglich ist. Es ist daher davon auszugehen, dass sich Gapdh während der Aktivierung der Fibrosierung verändert, und daher nicht als geeignetes Haushaltsgen in Frage kommt. Die Verstärkung des Signals bei der Markierung von α Sma spricht für eine deutliche Fibroblastenaktivierung im zeitlichen Verlauf und im Vollmedium. Das gleichartige Bandenmuster für Foxd1 lässt eine ähnliche Reaktion des Transkriptionsfaktors auf Proteinebene vermuten, jedoch aus vorher erwähnten Gründen nicht belegen.

6.1.5 Genexpressionsanalyse

Mit der Durchführung einer quantitativen *realtime*-Polymerase-Kettenreaktion konnte die Genexpression des Transkriptionsfaktors *Foxd1* gemessen werden. In diesem Versuchsaufbau wurden die isolierten Fibroblasten für 24 und 72 Stunden im Hunger- und Vollmedium inkubiert. Hierbei fiel auf, dass sich nach drei Tagen die Genexpression signifikant im Hungermedium erhöhte. Im Vollmedium hingegen sank die Genexpression des Foxd1-Gens. Aus dieser Diskrepanz könnte unter anderem abgeleitet werden, dass bei starker Aktivierung der Fibroblasten, wie es im Vollmedium gegeben ist, zu einer Herunterregulation der Foxd1-Genexpression kommt. Im Vergleich zu den entsprechenden Proteinbanden im Western Blot zeigt sich allerdings eine starke Intensitätszunahme nach 72 Stunden im Vollmedium. Es ist denkbar, dass dieser Unterschied nach Aktivierung der Fibroblasten auf der Protein- und RNA-Ebene auf einer negativen Rückkopplung beruht, was bedeutet, dass der Transkriptionsfaktor Foxd1 die Transkription von Genen induziert, die für einen Repressor codieren, welche wiederum die Expression von Foxd1 hemmen. Das wohl bekannteste Modell einer solchen reziproken Abhängigkeit wurde 1961 anhand des Lac-Operons beschrieben (Monod and Jacob, 1961). Im Hungermedium mit 0,5 % FCS hingegen konnte gezeigt werden, dass sich die RNA-Expression von *Foxd1* deutlich erhöht hat. Die Inkubation mit Hungermedium kann zum einen die

Apoptose der Zelle zur Folge haben, zum anderen ist bekannt, dass sich durch den Entzug von Wachstumsfaktoren die Zellen in der Ruhephase G_0 synchronisieren (Araki et al., 1990, Chen et al., 2012). Falls die Erhöhung der *Foxd1*-Genexpression eine direkte Folge der Inkubation in der 0,5 % FCS-haltigen Nährlösung ist, kann angenommen werden, dass der *Foxd1* Promotor entweder von proapoptotischen oder den Zellzyklus regulierenden Genen abhängt. Da im Vollmedium die Expression nach 72 Stunden im Gegensatz zum Hungermedium sank, ist davon auszugehen, dass die Transkription von *Foxd1* durch Aktivierung der Fibroblasten deutlich reduziert wird. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenz, die zeigt, dass es unter den Fibroblasten eine *Foxd1*-positive Subpopulation gibt, wird deutlich, dass *Foxd1* vor allem in ruhenden Fibroblasten exprimiert wird. Zu dieser Annahme würde die vermehrte Expression von *Foxd1* in den mit Hungermedium inkubierten Zellen passen, da diese sich eher in der Ruhephase befinden als diese, die im Vollmedium einem Überangebot an Wachstumsfaktoren ausgesetzt wurden.

6.2 Wt1

6.2.1 Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

Die Identifizierung des *Wt1*-Proteins als wichtiger Transkriptionsfaktor in der Entwicklung der Niere hatte viele weitere Investigationen zur Folge (Kreidberg et al., 1993, Call et al., 1990). Es wurde erforscht, dass sich eine Defizienz von *Wt1* auf das olfaktorische System, die Koronararterien und die Hämatopoese auswirken kann (Wagner et al., 2005a, Wagner et al., 2005b). In einigen Organen konnte durch Methoden der Verfolgung genetischer Abstammung (*Lineage Tracing*) Zellpopulationen identifiziert werden, deren Progenitorzellen *Wt1*-positiv waren. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass es epikardiale *Wt1*-positive Vorläuferzellen gibt, aus denen im Rahmen der Herzentwicklung im Mausmodell eine Untergruppe voll funktionsfähiger Myozyten hervorgeht (Zhou et al., 2008). In der Leber wurde gezeigt, dass *Wt1*-positive Zellen aus dem Mesothelium des Septum Transversum die Vorläuferzellpopulation von mesothelialen, submesothelialen, perivaskulären und Stellatumzellen bilden (Asahina et al., 2011). Vor allem die Relevanz *Wt1*-positiver Zellen in der Leber spielte eine entscheidende Rolle bei der Wahl dieses Forschungsprojekts, denn beide Organe stammen ontogenetisch von endodermalen Zellen des embryonalen Vorderdarms ab (Slack, 1995, Tremblay and

Zaret, 2005). Diese Annahme bestätigte sich bei modellhaften Induktionsversuchen embryonaler Stammzellen. Es wurde festgestellt, dass die Differenzierung zu Zellen, aus denen später Pankreas und Leber hervorgehen, von denselben Signalwegen abhängen (Gadue et al., 2006). Dieses enge embryologische und zytologische Verwandtschaftsverhältnis ließ vermuten, dass Wt1 eine ähnliche Rolle im Pankreas spielen könnte. Die Wichtigkeit des Wt1 Proteins in adulten Organismen nach abgeschlossener Embryonalentwicklung zeigte sich bei einem Wt1-Knockout im Mausmodell, das eine gestörte Homöostase der Podozytenfunktion in der Niere zur Folge hatte (Guo et al., 2002). Die Tatsache, dass Wt1 nicht nur im Entwicklungsprozess eine tragende Rolle spielt, sondern auch im adulten Organ, ließ das Vorhandensein des Proteins im ausdifferenzierten Pankreas als möglich erscheinen. Der Nachweis von Wt1 im Adenokarzinom des Pankreas gelang bereits (Oji et al., 2004). Um die Relevanz von Wt1 in der Karzinogenese zu evaluieren, wurden verschiedene Pankreaskrebszelllinien *in vitro* mit Wt1-Antisense-Oligonukleotiden behandelt, die das Wt1-Gen unterdrücken. Dies hatte eine signifikante Suppression der Zellviabilität zur Folge (Oji et al., 2004). Ein interessanter Therapieansatz beim Adenokarzinom des Pankreas wurde 2014 publiziert. Patienten wurden neben dem Gemcitabine Standard-Therapieschema mit einem Wt1-Peptid Impfstoff behandelt. Die im Ergebnis signifikant verlängerte mediane Überlebenszeit wurde auf die in der Interventionsgruppe erhöhte Anzahl an Wt1-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zurückgeführt (Nishida et al., 2014). Die Erkenntnisse über Wt1 in der Leber und Niere, sowie die ausgesprochene Relevanz von Wt1 im Adenokarzinom des Pankreas, waren Anlass für eine weitere Charakterisierung von Wt1-positiven Zellen.

6.2.2 Immunmarkierung

6.2.2.1 Paraffinpräparate

Die in dieser Arbeit gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen des adulten Pankreas von Mäusen des Genotyps Wt1Cre^{ERT};td-Tom^{flox} zeigen das Vorhandensein Wt1-positiver Zellen im murinen Pankreas *in vivo* (siehe Abbildung 5A). Eine Kolokalisation von Wt1+ Zellen mit Vimentin lässt nahe legen, dass es sich um Zellen mesenchymalen Ursprungs handelt. Vimentin kann zwar im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Transition des Typs II in Zellen epithelialen Ursprungs während eines Inflammationsreizes positiv werden, da sich diese Zellen jedoch auch in

Präparaten gesunder Mäuse zeigten, scheint eine primär mesenchymale Abstammung wesentlich wahrscheinlicher (Witzgall et al., 1994). In diesem Kontext sei auf die signifikante Rolle des Wt1-Proteins verwiesen, bei dessen Knockout es zu einer Störung der mesenchymal-epithelialen Transition und zu embryonalen Entwicklungsstörungen vieler Organe kommt. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass Wt1 eine wichtige Rolle in der epithelial-mesenchymalen Balance des adulten Pankreas spielt. Die immunhistochemische Färbung verschiedener Organe der Mäuse des Genotyps Wt1Cre^{ERT};td-Tom^{flox} diente zur Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle, sowie zur Abschätzung der Funktionsfähigkeit des Antikörpers gegen td-Tom (Origene Technologies, Rockville, MD, USA). Als Positivkontrolle wurde die Niere gewählt, von der bekannt ist, dass die Podozyten im adulten Organ Wt1 exprimieren. Der Antigennachweis in der Leber hingegen war negativ, da dort nach Abschluss der Organogenese keine Expression von Wt1 in der Literatur beschrieben wurde oder bekannt ist (Yaoita et al., 1999). Der Nachweis des tdTom in Zellen des adulten Pankreas im Paraffinschnitt spricht daher für die Existenz Wt1-positiver Zellen im nativen adulten Pankreas. Bei der immunhistochemischen Färbung ist zudem zu erkennen, dass es sich bei den Wt1+ Zellen um eine einzeln stehende und weitestgehend periazinär oder periduktal lokalisierte Zellentität handelt. Die längliche Zellform spricht zudem dafür, dass es sich um mesenchymale Stellatumzellen handelt. Bei einer Gruppe von Mäusen, die lebend supramaximaler Ceruleinstimulation ausgesetzt waren, zeigte sich eine erhöhte Zellzahl an Wt1-positiven Zellen in vivo und in vitro.

6.2.2.2 In vitro

Für die Charakterisierung der mesenchymalen Wt1-positiven Zellen wurden Fibroblasten aus dem Pankreas von Mäusen isoliert. Mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung auf Wt1 und α Sma konnte eine weitere Einordnung der Eigenschaften der Zellen vorgenommen werden, da α Sma im fibrotischen Pankreas in aktivierten Pankreassternzellen, sog. Myofibroblasten, positiv ist (Apte et al., 1998). Da es sich bei Wt1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, sollte die Färbung nur im Zellkern lokalisiert sein. In diesem in vitro Experiment ist dies nicht der Fall, weswegen eine unspezifische Färbung des Antikörpers nicht auszuschließen ist. In der Literatur gibt es allerdings auch Hinweise darauf, dass Wt1 sowohl im Zellkern, wie auch dem Zytosol der Zelle vorkommt und

zwischen beiden Kompartimenten hin- und herwandert (Niksic et al., 2004). Da durch dieses statische Experiment mit einem Untersuchungszeitpunkt nicht zu bestimmen war, ob *Wt1*-positive Zellen *in vitro* auf induzierte Fibroblastenaktivierung reagieren, wurden die fluoreszierenden Zellen einer nicht vorbehandelten Maus des Genotyps *Wt1Cre^{ERT};td-Tom^{fllox}* nach 24 und 96 Stunden Inkubation im Vollmedium, nach indirekter Färbung des Primärantikörpers gegen tdTom, fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt (siehe „Immunmarkierung im transgenen Mausmodell, Fibroblasten *in vitro*“). Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Vermehrung der *Wt1*+Zellen im zeitlichen Verlauf. Hierbei machte es keinen Unterschied ob die Zellen aus nativen oder Cerulein vorbehandelten Mäusen stammten. Zellmorphologisch konnten innerhalb der *Wt1*-positiven Zellen auf demselben Objektträger verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Ausprägungen beobachtet werden (Abb. 7). Dies weist daraufhin, dass es entweder verschiedene Aktivierungsstadien der *Wt1*+ Zellen oder von Grund auf mehrere *Wt1*+ Zellentitäten gibt. Ob der Unterschied in der Morphologie der *Wt1*+ Zelle eine Verschiedenartigkeit in den Funktionen der Zellen widerspiegelt ist nicht auszuschließen. Zusammenfassend ist anzunehmen, dass *Wt1*-positive Zellen wie Fibroblasten oder Sternzellen in Zellkultur aktiviert werden können und *in vivo* wie bei der fibrotischen Reaktion eine Expansion zeigen, allerdings eine von den klassischen Myofibroblasten oder aktivierten Pankreassternzellen zu unterscheidende Zellentität darstellen.

6.2.3 Genexpressionsanalyse

Bei Betrachtung der quantitativen *realtime*-PCR von *in vitro* inkubierten Fibroblasten konnte eine Erhöhung der *Wt1*-Transkription nach 72 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert nach 24 Stunden im Voll- wie auch Hungermedium nachvollzogen werden. Im selben Versuchsaufbau wurde zudem der Myofibroblastenmarker *αSma* quantifiziert. Da nach der Inkubation der Fibroblasten im Vollmedium sich nach drei Tagen ein sehr deutlicher Anstieg von *αSma* um den Faktor 91 beschreiben ließ, ist von einer starken Aktivierung von Fibroblasten und Pankreassternzellen in diesem Versuchsaufbau auszugehen. Die Diskrepanz des Transkriptionsanstiegs von *αSma* und *Wt1* untermauert die Ergebnisse aus den Immunfluoreszenzfärbungen, in denen gezeigt werden konnte, dass *Wt1*-positive Zellen vermutlich eine von aktivierten Myofibroblasten und Pankreassternzellen zu unterscheidende Fibroblasten Subpopulation darstellen. Eine entscheidende Frage bei der Interpretation des

Anstiegs von *Wt1*-codierender RNA ist, ob die Zunahme der *Wt1*-Genexpression durch Proliferation der *Wt1*⁺ Subpopulation oder durch hochregulieren des Transkriptionsfaktors bei weitestgehend konstanter Zellzahl zustande kommt. Im MTT-Test zeigt sich eine nach 72 Stunden Inkubation in Vollmedium um circa ein Drittel reduzierte Fibroblastenzahl. Hier ist allerdings unklar, welchen Anteil *Wt1*⁺ Zellen an dem Ergebnis der Viabilitätsanalyse haben, in die alle Subtypen von Fibroblasten eingehen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Immunmarkierungen der Fibroblasten von *Wt1*Cre^{ERT};td-Tom^{flox}-Mäusen, in denen eine deutliche Expansion der *Wt1*-positiven Zellen zu sehen war, kann jedoch angenommen werden, dass die Transkriptionserhöhung zum Großteil auf einer Zellvermehrung *Wt1*-positiver Zellen beruht.

7 Zusammenfassung

7.1 Foxd1

Das Vorhandensein des Foxd1-Transkriptionsfaktors konnte auf mehreren Ebenen (Protein, RNA und Immunmarkierung) nachvollzogen werden. Foxd1-positive Zellen sind, wie auch schon in anderen Organen beschrieben, Teil des Interstitiums des Pankreas. Die fehlende zellspezifische Koexpression von Foxd1 und α Sma legt nahe, dass Foxd1 nicht in Myofibroblasten oder aktivierten Pankreassternzellen vorhanden ist. Ob diese aktivierten Interstitialzellen im Pankreas aus Foxd1-positiven Vorläuferzellen hervorgehen, wie es z.B. in der Nierenfibrose gezeigt werden konnte (Humphreys et al., 2010), konnte in dieser Arbeit nicht vollständig beantwortet werden. Auf RNA-Ebene zeigte sich eine vermehrte Expression von *Foxd1* in vitro im Hungermedium, wohingegen sich im Vollmedium ein gegenläufiges Ergebnis zeigte. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass Foxd1 in ruhenden Zellen oder stammzellartigen Zellen des Interstitiums des Pankreas vorhanden ist, in ausdifferenzierten oder aktivierten Pankreassternzellen sowie Myofibroblasten hingegen weitestgehend fehlt.

7.2 Wt1

Die Koexpression von Wt1 und Vimentin im Pankreas von transgenen $Wt1^{Cre^{ERT}};tdTom^{lox}$ -Mäusen bestätigt die Annahme, Wt1 sei in mesenchymalen Zellen vorzufinden, welche aus der Veröffentlichung von Asahina et al. im Jahr 2008 entstand. Dort wurden Wt1-positive Zellen als eine Vorläuferpopulation diverser mesenchymaler Zellen in der Leber beschrieben (Asahina et al., 2009). Im Gegensatz zu Foxd1-positiven Zellen zeigte sich allerdings eine Expansion von Wt1-positiven Zellen bei in vitro induzierter Fibroblastenaktivierung, als auch bei der Cerulein-vermittelten fibrotischen Reaktion in vivo. Dies bestärkt die Annahme einer besonderen Relevanz Wt1-positiver Zellen in der Pathogenese der Pankreasfibrose.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BP | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| cDNA | complementary DNA, komplementäre DNS |
| CreER | Rekombinase-Östrogenrezeptor |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidine |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| dsDNA | double-stranded deoxyribonucleic acid, Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure |
| ECL | Enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycoltetraacetat |
| et al. | et alii, und andere |
| FCS | fetal calf serum, Fetales Kälberserum |
| gDNA | Genomic deoxyribonucleic acid, genomische DANN |
| HPF | high-power field (engl. Hauptgesichtsfeld) |
| HRP | horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase |
| IgG | Immunglobulin G |
| IHC | Immunohistochemie |
| kDA | Kilodalton |
| LDS | Lithiumdodecylsulfat |
| M.O.M. | mouse on mouse |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| MRI | München Rechts der Isar |
| mRNA | messenger ribonucleic acid, Boten-RNA |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| N | Normalität |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| Ppib | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B |
| q-RT-PCR | Real-Time-quantitative-PCR, quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |

9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Frau Dr. Ivonne Regel für die Betreuung dieses Projekt und bei Herrn Prof. Jörg Kleeff für die Möglichkeit an der TU München zu promovieren bedanken. Des Weiteren herzlichen Dank an die MTAs Isabell, Manja, Irina und Nadja sowie an meinen alten Schulfreund und Laborkollegen Tobi.

10 Literaturverzeichnis

- ALGUL, H., TANDO, Y., SCHNEIDER, G., WEIDENBACH, H., ADLER, G. & SCHMID, R. M. 2002. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation. *Pancreatology*, 2, 503-9.
- APTE, M. V., HABER, P. S., APPLGATE, T. L., NORTON, I. D., MCCAUGHAN, G. W., KORSTEN, M. A., PIROLA, R. C. & WILSON, J. S. 1998. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 43, 128-33.
- APTE, M. V. & WILSON, J. S. 2004. Mechanisms of pancreatic fibrosis. *Dig Dis*, 22, 273-9.
- ARAKI, S., SHIMADA, Y., KAJI, K. & HAYASHI, H. 1990. Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*, 168, 1194-200.
- ARMSTRONG, T., PACKHAM, G., MURPHY, L. B., BATEMAN, A. C., CONTI, J. A., FINE, D. R., JOHNSON, C. D., BENYON, R. C. & IREDALE, J. P. 2004. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 10, 7427-37.
- ASAHINA, K., TSAI, S. Y., LI, P., ISHII, M., MAXSON, R. E., JR., SUCOV, H. M. & TSUKAMOTO, H. 2009. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*, 49, 998-1011.
- ASAHINA, K., ZHOU, B., PU, W. T. & TSUKAMOTO, H. 2011. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology*, 53, 983-95.
- BACHEM, M. G., SCHNEIDER, E., GROSS, H., WEIDENBACH, H., SCHMID, R. M., MENKE, A., SIECH, M., BEGER, H., GRUNERT, A. & ADLER, G. 1998. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*, 115, 421-32.
- BACHEM, M. G., ZHOU, Z., ZHOU, S. & SIECH, M. 2006. Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3, S92-6.
- BADALOV, N., BARADARIAN, R., ISWARA, K., LI, J., STEINBERG, W. & TENNER, S. 2007. Drug-induced acute pancreatitis: an evidence-based review. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5, 648-61; quiz 644.
- BEACHY, P. A., KARHADKAR, S. S. & BERMAN, D. M. 2004. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 432, 324-31.
- BEN AMAR, M. F., PAYS, A., TEBABI, P., DERO, B., SEEBECK, T., STEINERT, M. & PAYS, E. 1988. Structure and transcription of the actin gene of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, 8, 2166-76.
- BHANOT, U. K. & MOLLER, P. 2009. Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis. *Lab Invest*, 89, 489-97.
- BHOWMICK, N. A., NEILSON, E. G. & MOSES, H. L. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432, 332-7.
- BHUSHAN, A., ITOH, N., KATO, S., THIERY, J. P., CZERNICHOW, P., BELLUSCI, S. & SCHARFMANN, R. 2001. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development*, 128, 5109-17.
- BROWN, L. F., GUIDI, A. J., SCHNITT, S. J., VAN DE WATER, L., IRUELA-ARISPE, M. L., YEO, T. K., TOGNAZZI, K. & DVORAK, H. F. 1999. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*, 5, 1041-56.
- BUCHHOLZ, M., KESTLER, H. A., HOLZMANN, K., ELLENRIEDER, V., SCHNEIDERHAN, W., SIECH, M., ADLER, G., BACHEM, M. G. & GRESS, T. M. 2005. Transcriptome

- analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med (Berl)*, 83, 795-805.
- BUCKLEY, C. D., PILLING, D., LORD, J. M., AKBAR, A. N., SCHEEL-TOELLNER, D. & SALMON, M. 2001. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*, 22, 199-204.
- CALL, K. M., GLASER, T., ITO, C. Y., BUCKLER, A. J., PELLETIER, J., HABER, D. A., ROSE, E. A., KRAL, A., YEGER, H., LEWIS, W. H. & ET AL. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, 60, 509-20.
- CASCINU, S., FALCONI, M., VALENTINI, V., JELIC, S. & GROUP, E. G. W. 2010. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 21 Suppl 5, v55-8.
- CHEN, M., HUANG, J., YANG, X., LIU, B., ZHANG, W., HUANG, L., DENG, F., MA, J., BAI, Y., LU, R., HUANG, B., GAO, Q., ZHUO, Y. & GE, J. 2012. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS One*, 7, e28203.
- CLEVERS, H. 2004. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*, 118, 671-4.
- CUNHA, G. R., REESE, B. A. & SEKKINGSTAD, M. 1980. Induction of nuclear androgen-binding sites in epithelium of the embryonic urinary bladder by mesenchyme of the urogenital sinus of embryonic mice. *Endocrinology*, 107, 1767-70.
- DE CARO, G., ENDEAN, R., ERSPAMER, V. & ROSEGHINI, M. 1968. Occurrence of caerulein in extracts of the skin of *Hyla caerulea* and other Australian hylids. *Br J Pharmacol Chemother*, 33, 48-58.
- DECLERCK, Y. A. 2000. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer*, 36, 1258-68.
- DRESSLER, G. R. 2006. The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 509-29.
- ELAYAT, A. A., EL-NAGGAR, M. M. & TAHIR, M. 1995. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat*, 186 (Pt 3), 629-37.
- ELENBAAS, B. & WEINBERG, R. A. 2001. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*, 264, 169-84.
- ERKAN, M., ADLER, G., APTE, M. V., BACHEM, M. G., BUCHHOLZ, M., DETLEFSEN, S., ESPOSITO, I., FRIESS, H., GRESS, T. M., HABISCH, H. J., HWANG, R. F., JASTER, R., KLEEFF, J., KLOPPPEL, G., KORDES, C., LOGSDON, C. D., MASAMUNE, A., MICHALSKI, C. W., OH, J., PHILLIPS, P. A., PINZANI, M., REISER-ERKAN, C., TSUKAMOTO, H. & WILSON, J. 2012. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*, 61, 172-8.
- FEIL, S., VALTCHEVA, N. & FEIL, R. 2009. Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol*, 530, 343-63.
- FILER, A., RAZA, K., SALMON, M. & BUCKLEY, C. D. 2007. Targeting stromal cells in chronic inflammation. *Discov Med*, 7, 20-6.
- FISCHBACH, B. V., TROUT, K. L., LEWIS, J., LUIS, C. A. & SIKI, M. 2005. WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. *Pediatrics*, 116, 984-8.
- FORTSON, M. R., FREEDMAN, S. N. & WEBSTER, P. D., 3RD 1995. Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 90, 2134-9.
- FRICK, T. W., MITHOFER, K., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., RATTNER, D. W. & WARSHAW, A. L. 1995. Hypercalcemia causes acute pancreatitis by pancreatic secretory block, intracellular zymogen accumulation, and acinar cell injury. *Am J Surg*, 169, 167-72.
- GABBIANI, G., RYAN, G. B. & MAJNE, G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27, 549-50.

- GADUE, P., HUBER, T. L., PADDISON, P. J. & KELLER, G. M. 2006. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 16806-11.
- GARGIULO, S., TORRINI, M., OLLILA, S., NASTI, S., PASTORINO, L., CUSANO, R., BONELLI, L., BATTISTUZZI, L., MASTRACCI, L., BRUNO, W., SAVARINO, V., SCIALLERO, S., BORGONOVO, G., NYSTROM, M., BIANCHI-SCARRA, G., MARENI, C. & GHIORZO, P. 2009. Germline MLH1 and MSH2 mutations in Italian pancreatic cancer patients with suspected Lynch syndrome. *Fam Cancer*, 8, 547-53.
- GITTES, G. K. 2009. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol*, 326, 4-35.
- GOLOSOW, N. & GROBSTEIN, C. 1962. Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Dev Biol*, 4, 242-55.
- GORELICK, ADLER & KERN 1993. Cerulein-induced pancreatitis. In: GO, V. L. W., DIMAGNO, E. P., GARDNER, J. D., LEBENTHAL, E., REBER, H. A. & SCHEELE, G. A. (eds.) *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*. New York: Raven Press.
- GOTTLIEB, K. & SHERMAN, S. 1998. ERCP and biliary endoscopic sphincterotomy-induced pancreatitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 8, 87-114.
- GREER, J. B. & WHITCOMB, D. C. 2007. Role of BRCA1 and BRCA2 mutations in pancreatic cancer. *Gut*, 56, 601-5.
- GRINNELL, F. 1978. Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *Int Rev Cytol*, 53, 65-144.
- GULLO, L., MIGLIORI, M., OLAH, A., FARKAS, G., LEVY, P., ARVANITAKIS, C., LANKISCH, P. & BEGER, H. 2002. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas*, 24, 223-7.
- GUO, J. K., MENKE, A. L., GUBLER, M. C., CLARKE, A. R., HARRISON, D., HAMMES, A., HASTIE, N. D. & SCHEDL, A. 2002. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet*, 11, 651-9.
- HANAMURA, N., YOSHIDA, T., MATSUMOTO, E., KAWARADA, Y. & SAKAKURA, T. 1997. Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int J Cancer*, 73, 10-5.
- HATINI, V., HUH, S. O., HERZLINGER, D., SOARES, V. C. & LAI, E. 1996. Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev*, 10, 1467-78.
- HAUPTMANN, S., ZARDI, L., SIRI, A., CARNEMOLLA, B., BORSI, L., CASTELLUCCI, M., KLOSTERHALFEN, B., HARTUNG, P., WEIS, J., STOCKER, G. & ET AL. 1995. Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas. Expression of tenascin and fibronectin isoforms. *Lab Invest*, 73, 172-82.
- HERRERA, E., MARCUS, R., LI, S., WILLIAMS, S. E., ERSKINE, L., LAI, E. & MASON, C. 2004. Foxd1 is required for proper formation of the optic chiasm. *Development*, 131, 5727-39.
- HEZEL, A. F., KIMMELMAN, A. C., STANGER, B. Z., BARDEESY, N. & DEPINHO, R. A. 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20, 1218-49.
- HIRSCHI, K. K. & D'AMORE, P. A. 1996. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res*, 32, 687-98.
- HUBERMAN, J. A. 1995. Importance of measuring nucleic acid absorbance at 240 nm as well as at 260 and 280 nm. *Biotechniques*, 18, 636.
- HUMPHREYS, B. D., LIN, S. L., KOBAYASHI, A., HUDSON, T. E., NOWLIN, B. T., BONVENTRE, J. V., VALERIUS, M. T., MCMAHON, A. P. & DUFFIELD, J. S. 2010. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*, 176, 85-97.

- HUXLEY, R., ANSARY-MOGHADDAM, A., BERRINGTON DE GONZALEZ, A., BARZI, F. & WOODWARD, M. 2005. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*, 92, 2076-83.
- JAIN, R. K. 1987. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*, 47, 3039-51.
- JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. & GRATZL, M. 2004. *Histologie*, Heidelberg, Springer.
- KIM, S. K. & HEBROK, M. 2001. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev*, 15, 111-27.
- KREIDBERG, J. A., SARIOLA, H., LORING, J. M., MAEDA, M., PELLETIER, J., HOUSMAN, D. & JAENISCH, R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74, 679-91.
- KRETZSCHMAR, K. & WATT, F. M. 2012. Lineage tracing. *Cell*, 148, 33-45.
- LAGACE, R., GRIMAUD, J. A., SCHURCH, W. & SEEMAYER, T. A. 1985. Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast: variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 408, 49-59.
- LAMPEL, M. & KERN, H. F. 1977. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 373, 97-117.
- LANDSMAN, L., NIJAGAL, A., WHITCHURCH, T. J., VANDERLAAN, R. L., ZIMMER, W. E., MACKENZIE, T. C. & HEBROK, M. 2011. Pancreatic mesenchyme regulates epithelial organogenesis throughout development. *PLoS Biol*, 9, e1001143.
- LANKISCH, P. G., APTE, M. & BANKS, P. A. 2015. Acute pancreatitis. *Lancet*, 386, 85-96.
- LARUE, L. & BELLACOSA, A. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 24, 7443-54.
- LECHNER, M. S. & DRESSLER, G. R. 1997. The molecular basis of embryonic kidney development. *Mech Dev*, 62, 105-20.
- LENGAUER, C., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-9.
- LERCH, M. M. & GORELICK, F. S. 2013. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 144, 1180-93.
- LI, D., MORRIS, J. S., LIU, J., HASSAN, M. M., DAY, R. S., BONDY, M. L. & ABBRUZZESE, J. L. 2009. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*, 301, 2553-62.
- LIU, G. Y., DOPPLER, H., NECELA, B., KRISHNA, M., CRAWFORD, H. C., RAIMONDO, M. & STORZ, P. 2013. Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF-kappaB and MMPs. *J Cell Biol*, 202, 563-77.
- LIVNAH, O., BAYER, E. A., WILCHEK, M. & SUSSMAN, J. L. 1993. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5076-80.
- LOWENFELS, A. B. & MAISONNEUVE, P. 2004. Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 34, 238-44.
- MACKIE, E. J., THESLEFF, I. & CHIQUET-EHRISMANN, R. 1987. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol*, 105, 2569-79.
- MADISEN, L., ZWINGMAN, T. A., SUNKIN, S. M., OH, S. W., ZARIWALA, H. A., GU, H., NG, L. L., PALMITER, R. D., HAWRYLYCZ, M. J., JONES, A. R., LEIN, E. S. & ZENG, H. 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 13, 133-40.
- MALKA, D., HAMMEL, P., MAIRE, F., RUFAT, P., MADEIRA, I., PESSIONE, F., LEVY, P. & RUSZNIEWSKI, P. 2002. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*, 51, 849-52.
- MONOD, J. & JACOB, F. 1961. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 26, 389-401.

- MORIKAWA, S., BALUK, P., KAIDOH, T., HASKELL, A., JAIN, R. K. & MCDONALD, D. M. 2002. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*, 160, 985-1000.
- MORRISON, A. A., VINEY, R. L. & LADOMERY, M. R. 2008. The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. *Biochim Biophys Acta*, 1785, 55-62.
- MORTON, J. P., JAMIESON, N. B., KARIM, S. A., ATHINEOS, D., RIDGWAY, R. A., NIXON, C., MCKAY, C. J., CARTER, R., BRUNTON, V. G., FRAME, M. C., ASHWORTH, A., OIEN, K. A., EVANS, T. R. & SANSOM, O. J. 2010. LKB1 haploinsufficiency cooperates with Kras to promote pancreatic cancer through suppression of p21-dependent growth arrest. *Gastroenterology*, 139, 586-97, 597 e1-6.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- NAGAMOTO, T., EGUCHI, G. & BEEBE, D. C. 2000. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 1122-9.
- NAGY, A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26, 99-109.
- NIETO, J., GROSSBARD, M. L. & KOZUCH, P. 2008. Metastatic pancreatic cancer 2008: is the glass less empty? *Oncologist*, 13, 562-76.
- NIKSIC, M., SLIGHT, J., SANFORD, J. R., CACERES, J. F. & HASTIE, N. D. 2004. The Wilms' tumour protein (WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. *Hum Mol Genet*, 13, 463-71.
- NISHIDA, S., KOIDO, S., TAKEDA, Y., HOMMA, S., KOMITA, H., TAKAHARA, A., MORITA, S., ITO, T., MORIMOTO, S., HARA, K., TSUBOI, A., OKA, Y., YANAGISAWA, S., TOYAMA, Y., IKEGAMI, M., KITAGAWA, T., EGUCHI, H., WADA, H., NAGANO, H., NAKATA, J., NAKAE, Y., HOSEN, N., OJI, Y., TANAKA, T., KAWASE, I., KUMANOGOH, A., SAKAMOTO, J., DOKI, Y., MORI, M., OHKUSA, T., TAJIRI, H. & SUGIYAMA, H. 2014. Wilms tumor gene (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother*, 37, 105-14.
- OJI, Y., NAKAMORI, S., FUJIKAWA, M., NAKATSUKA, S., YOKOTA, A., TATSUMI, N., ABENO, S., IKEBA, A., TAKASHIMA, S., TSUJIE, M., YAMAMOTO, H., SAKON, M., NEZU, R., KAWANO, K., NISHIDA, S., IKEGAME, K., KAWAKAMI, M., TSUBOI, A., OKA, Y., YOSHIKAWA, K., AOZASA, K., MONDEN, M. & SUGIYAMA, H. 2004. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 95, 583-7.
- OLIVERA, A. & SPIEGEL, S. 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365, 557-60.
- OLUMI, A. F., GROSSFELD, G. D., HAYWARD, S. W., CARROLL, P. R., TLSTY, T. D. & CUNHA, G. R. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, 59, 5002-11.
- OMARY, M. B., LUGEA, A., LOWE, A. W. & PANDOL, S. J. 2007. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*, 117, 50-9.
- PARK, J. E., LENTER, M. C., ZIMMERMANN, R. N., GARIN-CHESA, P., OLD, L. J. & RETTIG, W. J. 1999. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem*, 274, 36505-12.
- PARSONNET, J., FRIEDMAN, G. D., VANDERSTEEN, D. P., CHANG, Y., VOGELMAN, J. H., ORENTREICH, N. & SIBLEY, R. K. 1991. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, 325, 1127-31.
- PFÄFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PIERROU, S., HELLQVIST, M., SAMUELSSON, L., ENERBACK, S. & CARLSSON, P. 1994. Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J*, 13, 5002-12.
- PINHO, A. V., CHANTRILL, L. & ROOMAN, I. 2014. Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 345, 203-9.

- RASHEED, Z. A., MATSUI, W. & MAITRA, A. 2012. Pathology of pancreatic stroma in PDAC. In: GRIPPO, P. J. & MUNSHI, H. G. (eds.) *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India).
- RONNOV-JESSEN, L. & PETERSEN, O. W. 1993. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest*, 68, 696-707.
- ROSENBERG, L. 1995. In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant*, 4, 371-83.
- 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. & KERN, S. E. 1997. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 57, 1731-4.
- SCHIEBLER 2004. Leibeshöhlen und ihre Organe. *Anatomie*, 9. Auflage.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65, 5-29.
- SLACK, J. M. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121, 1569-80.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- SPOONER, B. S., WALTHER, B. T. & RUTTER, W. J. 1970. The development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro. *J Cell Biol*, 47, 235-46.
- STERNBERG, N. & HAMILTON, D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 150, 467-86.
- STEVENS, R. J., RODDAM, A. W. & BERAL, V. 2007. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*, 96, 507-9.
- TAKANO, S., YOKOSUKA, O., IMAZEKI, F., TAGAWA, M. & OMATA, M. 1995. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. *Hepatology*, 21, 650-5.
- TLSTY, T. D. & HEIN, P. W. 2001. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 54-9.
- TRAMACERE, I., SCOTTI, L., JENAB, M., BAGNARDI, V., BELLOCCO, R., ROTA, M., CORRAO, G., BRAVI, F., BOFFETTA, P. & LA VECCHIA, C. 2010. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J Cancer*, 126, 1474-86.
- TREMBLAY, K. D. & ZARET, K. S. 2005. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol*, 280, 87-99.
- TRIANTAFILLIDIS, J. K., NASIOULAS, G. & KOSMIDIS, P. A. 2009. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*, 29, 2727-37.
- TUXHORN, J. A., AYALA, G. E. & ROWLEY, D. R. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*, 166, 2472-83.
- VAN DER LOOS, C. M. 2008. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *J Histochem Cytochem*, 56, 313-28.
- VAN MOURIK, J. A., LEEKSMA, O. C., REINDERS, J. H., DE GROOT, P. G. & ZANDBERGEN-SPAARGAREN, J. 1985. Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membrane glycoprotein IIa. *J Biol Chem*, 260, 11300-6.
- VANGUILDER, H. D., VRANA, K. E. & FREEMAN, W. M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44, 619-26.
- VONLAUFEN, A., WILSON, J. S., PIROLA, R. C. & APTE, M. V. 2007. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health*, 30, 48-54.
- VOZIYANOV, Y., PATHANIA, S. & JAYARAM, M. 1999. A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res*, 27, 930-41.

- WAGNER, N., WAGNER, K. D., HAMMES, A., KIRSCHNER, K. M., VIDAL, V. P., SCHEDL, A. & SCHOLZ, H. 2005a. A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. *Development*, 132, 1327-36.
- WAGNER, N., WAGNER, K. D., THERES, H., ENGLERT, C., SCHEDL, A. & SCHOLZ, H. 2005b. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*, 19, 2631-42.
- WEIGEL, D., JURGENS, G., KUTTNER, F., SEIFERT, E. & JACKLE, H. 1989. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell*, 57, 645-58.
- WESSELS, N. K. & COHEN, J. H. 1967. Early pancreas organogenesis morphogenesis, tissue interactions, and mass effects. *Develop. Biol.* , 15, 237-270.
- WHITCOMB, D. C., GORRY, M. C., PRESTON, R. A., FUREY, W., SOSENHEIMER, M. J., ULRICH, C. D., MARTIN, S. P., GATES, L. K., JR., AMANN, S. T., TOSKES, P. P., LIDDLE, R., MCGRATH, K., UOMO, G., POST, J. C. & EHRlich, G. D. 1996. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*, 14, 141-5.
- WITZGALL, R., BROWN, D., SCHWARZ, C. & BONVENTRE, J. V. 1994. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest*, 93, 2175-88.
- YAOITA, E., FRANKE, W. W., YAMAMOTO, T., KAWASAKI, K. & KIHARA, I. 1999. Identification of renal podocytes in multiple species: higher vertebrates are vimentin positive/lower vertebrates are desmin positive. *Histochem Cell Biol*, 111, 107-15.
- ZHOU, B., MA, Q., RAJAGOPAL, S., WU, S. M., DOMIAN, I., RIVERA-FELICIANO, J., JIANG, D., VON GISE, A., IKEDA, S., CHIEN, K. R. & PU, W. T. 2008. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*, 454, 109-13.