

Technische Universität München

Chirurgische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

Persistenz entzündlicher Proliferations- und Transkriptionsmuster in der
Pankreaskarzinogenese unter Einfluss von onkogenem Kras^{G12D}

Nora Ann Charlotte Behler

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. Christoph Michalski
2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 06.11.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2019 angenommen.

Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine tödliche Erkrankung, deren Ursachen und Entstehung bislang nur schlecht verstanden werden. Als wichtiger Risikofaktor für seine Entstehung gilt die Pankreatitis. Zudem spielt die onkogene Mutation von *Kras* eine kritische Rolle in der frühen Karzinogenese. Dennoch wurden auch in gesunden Individuen onkogene Mutationen von *Kras* nachgewiesen. Im Mausmodell führt eine Aktivierung von *Kras^{G12D}* in embryonalen Vorläuferzellen des Pankreasepithels zur Entstehung von präneoplastischen Läsionen, die in einem Drittel der Tiere zu invasiven Tumoren im Erwachsenenalter fortschreiten. Adulte Zellen hingegen sind für die Aktivierung einer *Kras^{G12D}* Mutation zunächst refraktär. Dies kann bei gleichzeitiger Induktion einer akuten oder chronischen Pankreatitis durchbrochen werden. Es ergibt sich die Hypothese einer komplexen Interaktion zwischen entzündlichen Mechanismen und onkogenem *Kras* in adulten Tieren.

In dieser Arbeit erheben wir in hoher zeitlicher Auflösung mittels histologischer Analysen und Genexpressionsprofilen den Vergleich zwischen der vollständigen Regeneration nach Pankreatitis in WT Tieren und der induzierten Karzinogenese in *p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D}* transgenen Tieren. Wir nutzen ein in der Maus gut etabliertes Modell für die induzierte Pankreatitis mit repetitiver intraperitonealer Gabe von Caerulein im Alter von acht Wochen. Versuchstiere werden innerhalb von vierzehn Tagen nach Induktion der Pankreatitis zu dreizehn Zeitpunkten im WT und acht Zeitpunkten in transgenen Tieren untersucht.

Wir etablieren histologisch die Aufteilung der Regeneration im WT in drei klar abgrenzbare Phasen von *Inflammation*, *Regeneration* und *Refinement*. Hierbei beobachten wir eine zeitlich streng kontrollierte Proliferation des Mesenchyms und Progenitor-ähnlicher Zellen in der *Inflammation*-Phase und sequenziell hierzu massive Proliferation von Epithelzellen des azinären Kompartiments in *Regeneration*- und *Refinement*-Phasen. In *Kras* Tieren im Gegensatz zeigen wir eine überschießende Proliferation in Mesenchymalen und Progenitor-ähnlichen Zelllinien mit Verlust der zeitlichen Regulierung. Analysen der differentiellen Genexpression in WT Tieren untermauern die oben genannte Einteilung in drei Phasen. In *Kras^{G12D}* Tieren findet sich eine Persistenz des inflammatorischen Genexpressionsmusters über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Ein anhaltendes inflammatorisches Genexpressionsmuster unter *Kras* Mutation führt zu einer Änderung des Proliferationsmusters nach Caerulein-induzierter Pankreatitis. Durch hierbei überschießende Proliferation verschiedener Zelltypen entsteht ein zelluläres Mikroumfeld, in dem die Bildung von PDAC favorisiert wird. Zukünftige Forschung sollte sich somit mit der Interaktion von Mikroumfeld und Tumor beschäftigen, sowie Downstream Signalwege von *Kras* und deren Einflüsse auf die Zellproliferation genauer beleuchten.

Abstract

Pancreatic adenocarcinoma (PDAC) is a deadly disease with largely unknown origins. Pancreatitis is understood to be an important risk factor for PDAC. Furthermore, oncogenic mutation of *Kras* plays a pivotal role in early carcinogenesis. However, *Kras*-mutations have also been identified in healthy individuals. In the mouse model activation of *Kras*^{G12D} in embryonic precursor-cells of the pancreatic epithelium leads to development of preneoplastic lesions that in one third of cases progress to invasive cancer in adult animals. Adult cells in contrast are highly refractory to activation of a *Kras*^{G12D} mutation. This being consistently reversible by the induction of acute or chronic pancreatitis, leading to the hypothesis of a complex interaction between inflammatory mechanisms and oncogenic *Kras* in adult animals.

Here, through histological analyses and gene expression profiling, we compare complete organ regeneration in wild type (WT) to early carcinogenesis in *p48*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D} transgenic animals. Induction of pancreatitis is performed by a well-established technique of repetitive intraperitoneal application of Cerulein in WT and *Kras*^{G12D} mice, eight weeks of age. To allow for high temporal resolution, animals are sacrificed at thirteen time points in WT and eight time points in transgenic animals within fourteen days of induction of pancreatitis.

We histologically establish a subdivision of regeneration in three distinct phases of inflammation, regeneration and refinement in WT. We determine that regeneration is accomplished through strict temporal control of proliferation in mesenchymal and progenitor-like cells during inflammation phase and subsequent massive proliferation of epithelial cells of the acinar compartment in regeneration and refinement phases. In contrast, we show a loss of temporal control on mesenchymal and progenitor-like cell-replication in *Kras*-transgenic mice. Analyses of differential gene-expression-levels in WT substantiate the division in three phases of regeneration and show persistence of the inflammatory gene expression profile in *Kras*-transgenic animals throughout the whole observation period.

The proposed results show that a persistent *Kras*-induced inflammatory gene-expression-profile results in a change in proliferation-regulation following Cerulein-induced pancreatitis engendering the formation of a tumor-permissive microenvironment. Future research should focus on the interaction of carcinoma and microenvironment, as well as on downstream signals of *Kras* and their influence on cell-proliferation.

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

- Kong, B., Bruns, P., Behler, N., Schlitter, A.M., Friess, H., Erkan, M., Theis, F.J., Esposito, I., Michalski, C.W., Kleeff, J., 2016. Oncogenic Kras promotes early pancreatic carcinogenesis by perpetuating elements of natural inflammatory response. *Pancreatology* 16, S11.
- Kong, B., Bruns, P., Behler, N., Schlitter, M., Regel, I., Raulefs, S., Friess, H., Erkan, M., Esposito, I., Theis, F., Kleeff, J., Michalski, C., 2016. Histological and molecular landscape of early pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* 16, S33.
- Kong, B.¹, Bruns, P.¹, Behler, N.A.¹, Chang, L., Schlitter, A.M., Cao, J., Gewies, A., Ruland, J., Fritzsche, S., Valkovskaya, N., Jian, Z., Regel, I., Raulefs, S., Irmeler, M., Beckers, J., Friess, H., Erkan, M., Mueller, N.S., Roth, S., Hackert, T., Esposito, I., Theis, F.J., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2016. Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut* gutjnl-2015-310913. ¹Authors contributed equally
- Kong, B., Behler, N., Bruns, P., Schlitter A.M., N. Valkovska, S. Fritzsche, S. Raulefs, Regel, I., Erkan, M., Theis, F.J., Esposito, I., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2013. Pancreatic Progenitor Expansion, Mesenchymal Cell Proliferation and Inflammation are Required During Early Carcinogenesis. *Pancreas* 42, 1360-1361
- Behler, N., Kong, B., Schlitter, S., Fritzsche, S., Bruns, P., Valkovska, N., Raulefs, S., Regel, I., Friess, H., Esposito, I., Kleff, J., Michalski, C.W., 2012. Oncogenic KrasG12D – mediated "switch-on" in cell proliferation during pancreatic regeneration. Postervortrag im Rahmen der 33. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub, Leipzig
- Bruns P, Kong B, Fritzsche S, Behler N, Valkovska N, Raulefs S, Regel I, Friess H, Theis F, Michalski CW, Kleeff J, 2012. Comparative analysis of the microenvironment switch in early stages of pancreatic carcinogenesis. Kurzvortrag im Rahmen der 33. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub, Leipzig

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Bo Kong für seine stetige Unterstützung und Inspiration in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen. Vielen Dank für deinen Rat, Geduld und deine Expertise, welche mir in der Erstellung dieser Dissertation maßgeblich geholfen haben.

Zudem geht mein Dank an Christoph Michalski und Jörg Kleeff für die Möglichkeit meine Promotion unter ihrer Betreuung durchzuführen. Ich bedanke mich für ihre Unterstützung, Erfahrung, Inspiration und regelmäßiges Feedback.

Großer Dank geht an Sina Fritzsche und Weiwei Wu für Ihre lehrreiche, exzellente Einführung und fachliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor. Als weitere bedanke ich mich hier auch bei Natalya Valkovskaya, Chenjia Tao und Simone Hausmann für ihre Hilfe und Expertise. Nadja Maeritz, Irina Fuchs, Isabell Schäffer und Manja Thorwirth danke ich für die hervorragende Arbeit in den Mauszuchträumen und ihre tatkräftige und hochkarätige Unterstützung bei allen Fragen und Arbeiten im Labor.

Für die exzellente bioinformatische Expertise und die freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Ausarbeitung der Publikation möchte ich mich herzlich bei Philipp Bruns bedanken.

Des Weiteren möchte ich Susanne Raulefs und Ivonne Regel für ihren Rat und konstruktive Unterstützung danken.

Vielen Dank auch an Anna Melissa Schlitter, Irene Esposito und Martin Irmeler, deren Labore die weitere Auswertung ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Henrika und Karl Behler, meinem Bruder Karl, Ralph Großmann und Johanna Hüttl für ihre liebevolle Unterstützung, Geduld und Ermutigung auf meinem Lebensweg bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Abbildungsverzeichnis	XV
Tabellenverzeichnis	XXIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Pankreatitis und Pankreaskarzinom: Epidemiologie	1
1.2 Anatomie und Histologie des Pankreas.....	2
1.3 Entstehung des PDAC aus Vorläuferläsionen (Adenom–Karzinom–Sequenz)	2
1.4 Histologische Charakterisierung der PDAC Vorläuferläsionen.....	3
1.5 Histologie des PDAC	5
1.6 Genetische Merkmale des PDAC.....	5
1.7 Funktionsweise der Ras-Proteinfamilie.....	6
1.8 Effekt der Mutation im Ras Protoonkogen	7
1.9 Begründung für die Nutzung des Tiermodells.....	7
1.10 Caerulein-induzierte Pankreatitis.....	8
1.11 Regeneration nach Caerulein-induzierter Pankreatitis in Wild Typ Nagetieren	9
1.12 Bisher aus dem Tiermodell der Kras Mutation gezogene Schlüsse.....	10
1.13 Ziel dieser Arbeit	11
2 Material	15
3 Methoden.....	23
3.1 Experimenteller Aufbau	23
3.2 Mausgenotypen.....	24
3.3 Behandlung.....	24
3.4 Transkriptionsanalyse.....	27
3.5 Färbungen.....	30
3.6 Statistik.....	35
4 Ergebnisse.....	39

4.1	Histologische Analyse der frühen Karzinogenese	39
4.2	Quantitative Analyse der Genexpression.....	41
4.3	Analyse der allgemeinen Proliferationsdynamik in <i>Kras^{G12D}</i> Mäusen	44
4.4	Analyse der Proliferation im azinären Kompartiment	45
4.5	Analyse der Proliferation in ADM und duktalem Kompartiment.....	49
4.6	Analyse der Proliferationsdynamik in Mesenchym und Stammzellähnlicher Population im WT	53
4.7	Analyse der Proliferationsdynamik in Mesenchym und Stammzellähnlicher Population in <i>Kras^{G12D}</i> Tieren	64
5	Diskussion.....	77
5.1	Histologische Analyse der Regeneration und frühen Krazinogenese	77
5.2	Transkriptionsanalysen bestätigen die vollständige Regeneration beim WT und die Perpetuierung der Inflammationsantwort in <i>Kras^{G12D}</i> Pankreata	78
5.3	Analyse der Proliferationsdynamik	79
5.4	Analyse der Proliferationsdynamik im azinären Kompartiment	80
5.5	Analyse der Proliferation in ADM und duktalem Kompartiment.....	81
5.6	Analyse der Proliferationsdynamik in Mesenchym und Stammzellähnlicher Population im WT	82
5.7	Analyse der Proliferationsdynamik in Mesenchym und Stammzellähnlicher Population in <i>Kras^{G12D}</i> Tieren.....	87
5.8	Limitationen	91
5.9	Zusammenfassung.....	92
	Literaturverzeichnis.....	95
	Appendix.....	110

Abkürzungsverzeichnis

ADM	Acinar-to-ductal metaplasia, Azinär zu duktales Metaplasie
AFL	atypical flat lesions, atypical flat lesion
α -SMA	alpha smooth muscle actin
BrdU	Bromodesoxyuridin
C	Celsius
CAF	Cancer associated fibroblast
CCK	Cholecystokinin
Ck19	Cytokeratin 19
CK19	Cytokeratin 19
CP	chronische Pankreatitis
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
engl.	englisch
FSC	fakultative Stammzelle
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GEF	Guanin-Nukleotid exchange Faktoren
GF	Gesichtsfeld
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
Hh	Hedgehog
i.p.	intra peritoneal
IPMN	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
Kras ^{G12D}	P48Cre/+; Kras ^{G12D}
MCN	muzinös-zystische Neoplasie
N ₂	Stickstoff
NaCl-Lösung	Natrium-Chlorid-Lösung
NSCLC	non small cell lung cancer
OR	Odds Ratio
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphate Puffered solution
PCR	polymerase chain reaction
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma / pankreatisches duktales Adenokarzinom
PFA	Paraformaldehyd
RR	relatives Risiko
s.c.	sub cutan
TG	transgen
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
WT	Wild Typ

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: H+E Färbung von Pankreasgewebe mit TC mit großen (A) und kleinen (B) Zellen (Strobel et al., 2007b).....	4
Abbildung 2: Progressionsmodell der PDAC Histologie und Mutationssequenz mit Anmerkung der Reihenfolge der anfallenden Mutationen im Verlauf (Hruban et al., 2000a). Zunächst zeigt sich normales niedrig kuboidales Epithel (Azinuszellen). In PanIN-IA finden sich erste Mutationen typischerweise Kras und Her2/neu in hochprismatischem Epithel. PanIN IB zeigt sich mit Papillenbildung und Beginn von p16 Mutationen. In PanIN II finden sich zunehmend Zellatypien, mehrreihiges hochprismatisches Epithel und p16 Mutation. In PanIN III zeigen sich zunehmend Mutationen, Zellatypie, Nekrose und Mitosen sowie komplexe Papillen.	4
Abbildung 3: H+E Färbung von Pankreasgewebe der Maus mit AFL bestehend aus lobulärer Struktur mit kuboidalen Zellen in charakteristisch angeordnetem umgebendem Stroma (Aichler et al., 2012). .	5
Abbildung 4: Aktivierung und Inaktivierung von Ras-Proteinen: inaktives RAS hat GDP gebunden. Durch Vermittlung von <i>Guanin nucleotide exchange factors (GEF)</i> wird GDP zu GTP phosphoryliert und so RAS aktiviert. Dies führt zu einer Raf-gestützten Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Die natürliche Inaktivierung von RAS über <i>GTPase-aktivierende Proteine (GAP)</i> wird durch die Mutation vermindert. Hieraus folgt eine dauerhafte Aktivierung.	6
Abbildung 5: Versuchsaufbau.....	24
Abbildung 6: Ergebnis der Gelelektrophorese zur Kontrolle des Genotyps von links: DNA-Leiter, negativ Kontrolle (keine heterogene Mutation des gesuchten Genlokus), positiv Kontrolle (heterogene Mutation des gesuchten Genlokus) Nummer 1-18: Tier-Proben. Tier 1 ist negativ für <i>Kras^{G12D}</i> Mutation, Tier 16 ist negativ für <i>Ptf1a^{Cre/+}</i> Mutation, alle weiteren tragen an beiden Loci die gewünschten heterogenen Mutationen.	27
Abbildung 7: RNA Gel-Elektrophorese, (A) sichtbar sind die 28S und die 18S Untereinheit der Ribosomen; (B) degenerierte RNA	29
Abbildung 8: A-D, H&E Färbung von Paraffinschnitten von WT Pankreata, zwischen 3h und 36h nach Caeruleinapplikation zeigen sich vakuolisierte Azinuszellen, Apoptosen, Ödem sowie Immuneinfiltration. Entsprechend wurde dieser Zeitraum als „ <i>Inflammation-Phase</i> “ bezeichnet. (Maßstabsbalken: 50 µm). E, Die „ <i>Regeneration-Phase</i> “, zwischen 48h und Tag 5, präsentiert sich mit Regeneration von azinärem Gewebe sowie Rückgang von Apoptose und Ödem F-G, Zwischen Tag 7 und Tag 14 wird das Bild im WT bestimmt vom regenerierten azinären Kompartiment, diese Zeitspanne wurde „ <i>Refinement-Phase</i> “ genannt. A-G: Färbungen aus Vorarbeit durch Sina Fritzsche. H-K, H&E Färbung von Paraffinschnitten von <i>Kras^{G12D}</i> Pankreata, zwischen 3h und 36h nach Caeruleinapplikation zeigen sich vakuolisierte Azinuszellen, Apoptosen, Ödem sowie Immuneinfiltration und anfängliche Bildung von TCs, L-P, Proben zwischen 48h und Tag 14 werden	

durch blockierte Regeneration mit Stabilisierung des inflammatorischen Programms und erhöhter Immuneinfiltration charakterisiert. Zu diesen Zeitpunkten zeigt sich starke TC, ADM und AFL Bildung. Histologische Schnitte teils veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016). 41

Abbildung 9: PCA der Genexpressionsmuster. Die kleinen Kreise zeigen das Genexpressionsmuster jeweils eines Individuums an, die Farben designieren die Zugehörigkeit des jeweiligen Individuums zu den vorher festgelegten Phasen der Regeneration, Grün=Kontrolle; Gelb=*Inflammation*; Rot=*Regeneration*; Blau=*Refinement*. Die Ellipsoide veranschaulichen ein 95% Konfidenzintervall, in dem Proben der jeweiligen Phase mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% lokalisiert sind. (A) WT Daten; Die Probe von Tag 14, die im Cluster der *Regeneration*-Phase lokalisiert ist wird als Ausreißer angesehen. Die Pfeile indizieren den zeitlichen Ablauf der transkriptionellen Veränderungen und demonstrieren, dass die Regeneration in WT Tieren einen kreisförmigen Verlauf nimmt mit einem „end-to-end“ Muster (B) *Kras^{G12D}* Daten; Hier zeigen die Pfeile die inkomplette Regeneration und ein „end-to-open“ Muster. PCA-Plots veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016)..... 42

Abbildung 10: die PARAFAC-Analyse, eine 3-fach Faktorisierung der transkriptionellen Profile, erlaubt den direkten Vergleich beider Genotypen. Die farbigen Kreise zeigen wiederum das Genexpressionsmuster jeweils eines Individuums, die Farben designieren die Zugehörigkeit des jeweiligen Individuums zu den vorher festgelegten Phasen der Regeneration (Vgl.: Abbildung 9). Die Ellipsoide veranschaulichen ein 95% Konfidenzintervall, in dem Proben der jeweiligen Phase mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% lokalisiert sind. Zur besseren Übersichtlichkeit finden sich WT Daten im linken und *Kras^{G12D}* Daten im rechten Fenster, wobei im rechten, *Kras^{G12D}* Fenster ein orange umrandeter Ellipsoid das 95% Konfidenzintervall der WT *Inflammation* anzeigt. Alle Proben von *Kras^{G12D}* Mäusen - Mit Ausnahme der Kontrollen - zeigen große Ähnlichkeit mit WT Proben der *Inflammation*-Phase, sodass davon auszugehen ist, dass die Entzündungsantwort in *Kras^{G12D}* Tieren, auch auf Ebene der Transkription, von einer anhaltenden Entzündung charakterisiert wird. PARAFAC-Analyse veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016). 43

Abbildung 11: Analyse der allgemeinen Proliferationsdynamik in *Kras^{G12D}* Pankreata: (A) Der Graph zeigt den zeitlichen Verlauf des Proliferationsquotienten in *Kras^{G12D}* Mäusen. Daten von Kontrolltieren wurden als Zeitpunkt 0 dargestellt. Die Phasen der Regeneration im WT sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Daten wurden durch Quantifizierung von positiver nukleärer BrdU Färbung und Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin erzeugt. Die Proliferation in *Kras^{G12D}* Tieren zeigt keine Adhärenz an die im WT festgelegten Phasen (B) IHC Bilder von *Kras^{G12D}* Tieren mit Färbung für BrdU (Maßstabsbalken: 50 µm). IHC und quantitative Analyse veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016)..... 45

Abbildung 12: Proliferationsdynamik von Amylase positiven Zellen: (A,B) Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Amylase in WT (schwarze

Linie) und *Kras*^{G12D} Tieren (rote Linie) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt; (A) Amylase-positive Zellen zeigen im WT eine Proliferation mit zwei Gipfeln jeweils in der *Inflammation* und *Regeneration*-Phase, während in *Kras*^{G12D} Tieren 36 h nach Caeruleingabe ein maximum an Proliferation in diesem Kompartiment zu verzeichnen ist, ohne weiteren Gipfel während der *Regeneration*-Phase. (B) Der Prozentsatz von Amylase-positiven proliferierenden Zellen an der Gesamtheit der proliferierenden Zellen zeigt ab der *Regeneration*-Phase eine fast ausschließliche Proliferation in Amylase positiven Zellen im WT und gleichbleibend niedrigen Anteil dieses Kompartiments zwischen 20 und 40 % an der Gesamtproliferation in *Kras*^{G12D} Tieren. Die IF-Bilder (C) zeigen repräsentative Schnitte der Amylase (Grün) und BrdU (rot) Co-Färbung in WT (linke Spalte) und *Kras*^{G12D} Mäusen (rechte Spalte). Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) homogene Amylaseproduktion in Azinuszellen beider Genotypen, in *Kras*^{G12D} Tieren zeigen sich Regionen mit präformierten ADMs vermindert Amylase-positiv; (24 h) Proliferation im interstitiellen Raum und Amylase-negativen Zellen; (Tag 4) Die Amylase Expression ist nach Regeneration im WT weitgehend reetabliert (Proliferation findet hauptsächlich in Amylase-positiven Zellen statt). In *Kras*^{G12D} Tieren zeigt sich eine mangelhafte Regeneration von Azinuszellen, wobei diejenigen Azinuszellen die regeneriert sind eine starke Amylase-Produktion aufweisen (Proliferation findet sich hauptsächlich in Amylase-negativen Zellen); (Tag 14) Reduzierte Proliferation in beiden Genotypen, homogene Amylase-Produktion im WT, vereinzelt Amylase-positive Zellen in *Kras*^{G12D} Mäusen, ohne proliferative Aktivität. IF und quantitative Analyse veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016). 48

Abbildung 13: IF-Färbung der Proliferation in Ck19 positiven Zellen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der CK19 (Rot) und BrdU (Grün) Co-Färbung in WT (linke Spalte) und *Kras*^{G12D} Mäusen (rechte Spalte). Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Im WT keine Ck19 Expression in Zellen außerhalb von Pankreasgängen, in *Kras*^{G12D} Tieren zeigen Regionen mit präformierten ADMs CK19 Expression in Zellen der ADMs; (12 h, 36 h) Im WT leichte Hochregulation der CK19 Expression, bei nur vereinzelt Teilungen in diesen Zellen, CK19-positive Zellen in *Kras*^{G12D} Tieren proliferieren verstärkt; (Tag 4) Im Laufe der WT Regeneration erneutes Abnehmen der Ck19 Expression und Beschränkung auf Pankreasgangzellen. In *Kras*^{G12D} Tieren im Gegensatz Überproduktion an CK19-positiven Zellen; (Tag 14) unverändertes Bild im WT, in *Kras*^{G12D} Mäusen, weiterhin deutliche CK19-positivität in ADM, TC und AFL mit erhöhter proliferativer Aktivität in dieser Zellpopulation. 50

Abbildung 14: Anzahl und Anteil der Ck19 positiven Zellen: (A, B) Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von CK19 in WT (schwarze Linie) und *Kras*^{G12D} Tieren (rote Linie) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt; (A) CK19-positive Zellen zeigen im WT während der gesamten Beobachtungsspanne nahezu keine Proliferation, während in *Kras*^{G12D} Tieren durchgehend eine verstärkte Proliferation in diesem

Kompartiment zu verzeichnen ist. (B) Der Prozentsatz von CK19-positiven proliferierenden Zellen an der Gesamtheit der proliferierenden Zellen verdeutlicht diese Erkenntnis weiter.....	52
Abbildung 15: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Vimentin-positiven Zellen im WT: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Vimentin (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Vimentin positive Zellen bilden dünne Trennmembranen zwischen Pankreasläppchen; (12 h) deutliche Hochregulation der Vimentin-Expression, bei zahlreichen Teilungen im Vimentin-exprimierenden Mesenchym; (Tag 4) Weiterhin Verdickung der Vimentin-positiven Trennschichten, jedoch Suppression der Proliferation im Mesenchym; (Tag 14) erneut Bild wie in Kontrolltieren mit vereinzelt Proliferation in Vimentin-positiven Zellen.	53
Abbildung 16: Anzahl Vimentin positiver proliferierender Zellen: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Die Proliferation von Vimentin positiven Mesenchymzellen bleibt im WT streng limitiert auf die <i>Inflammation</i> -Phase.	54
Abbildung 17: Prozentsatz Vimentin positiver Zellen an der Gesamteilungsrate: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Während der <i>Inflammation</i> -Phase stellen mesenchymale Zellen den größten Anteil an der Proliferation, bei Suppression der Proliferation in diesem Kompartiment mit Einsetzen der <i>Regeneration</i> -Phase.	55
Abbildung 18: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in α -SMA-positiven Zellen im WT: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der α -SMA (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Ausschließlich Zellen in Gefäßen zeigen α -SMA Expression, dies ohne Proliferation; (12 h) leichte Aktivierung von pankreatischen Stellatumzellen mit Lokalisation im interstitiellen Raum und gesteigerter Proliferation in dieser Zellpopulation im Rahmen der <i>Inflammation</i> -Phase bis 36 h; (Tag 4) deutlicher Verlust an α -SMA positiven Zellen im Vergleich zu Zeitpunkten der <i>Inflammation</i> -Phase (Proliferation ausschließlich in Zellen ohne α -SMA Expression); (Tag 14) erneut Bild wie in Kontrolltieren. IF veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).	56
Abbildung 19: Anzahl α -SMA positiver proliferierender Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Die Proliferation von α -SMA positiven	

Zellen bleibt im WT streng limitiert auf die Inflammation-Phase. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).....	57
Abbildung 20: Prozentsatz α -SMA positiver Zellen an der Gesamtteilungsrate im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Ausschließlich während der <i>Inflammation</i> -Phase stellt das α -SMA positive Zellkompartiment einen signifikanten Anteil der sich teilenden Zellen von bis zu 11,3 %. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).	57
Abbildung 21: IF mit Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt: Pdx1 pos. Zellen (Asterisken) vereinzelt bereits zu Beginn der Inflammation vorhanden	59
Abbildung 22: IF mit Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt: Pdx1 pos. Gangähnliche Strukturen (Quadrate) Pdx1 pos. Zellkerne außerhalb von Gangstrukturen (Asterisken)	59
Abbildung 23: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Pdx1-positiven Zellen im WT: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Ausschließlich Zellen in Langerhans'schen Inseln zeigen Pdx1 Expression, dies ohne Proliferation; (36 h) mit fortschreiten der <i>Inflammation</i> -Phase präsentiert sich eine große Mehrheit der exokrinen Zellen mit Pdx1 Expression im Zellkern und gesteigerter Proliferation in dieser Zellpopulation; (Tag 3) deutliche Abschwächung der Pdx1-Positivität in exokrinen Zellen mit nur noch vereinzelter Proliferation, bei erhaltener Färbung von Langerhans'schen Inselzellen (wenige Teilungen in der β -Zellpopulation, soweit morphologisch festzustellen); (Tag 14) erneut Bild wie in Kontrolltieren.	60
Abbildung 24: Anzahl an Pdx1 positiven proliferierenden Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Pdx1 in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Es findet sich eine geringe Proliferation von Pdx1-positiven Zellen während der gesamten Regeneration, mit leichter Häufung zum Zeitpunkt der ausklingenden <i>Inflammation</i> -Phase.....	61
Abbildung 25: Prozentsatz an Pdx1 positiven proliferierenden Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Pdx1 in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Zum Übergang zwischen <i>Inflammation</i> und <i>Regeneration</i> -Phasen findet sich ein Anstieg der Proliferation	

in Pdx1 positiven Zellen. Im Rahmen der <i>Refinement</i> -Phase ist die Proliferation in diesem Kompartiment erneut mit der Proliferation in Kontrolltieren vergleichbar.	61
Abbildung 26: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Sox9-positiven Zellen im WT: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Sox9 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Sox9 Expression findet sich in Gangzellen (ohne proliferative Aktivität); (36 h) auch exokrine Zellen zeigen Sox9 Expression, zu diesem Zeitpunkt gehäuft Teilungen in Sox9-positiven Zellen; (Tag 4) Exokrine Zellen verlieren graduell die Sox9 Expression, Proliferation in diesem Kompartiment findet sich nur noch vereinzelt; (Tag 14) erneut Bild wie in Kontrolltieren. IF veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).....	62
Abbildung 27: Anzahl an Sox9 positiven proliferierenden Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Sox9 in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Es findet sich eine geringe Proliferation von Sox9-positiven Zellen während der gesamten Regeneration, mit leichter Häufung zum Zeitpunkt der ausklingenden <i>Inflammation</i> - und beginnenden <i>Regeneration</i> -Phase. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).	63
Abbildung 28: Prozentsatz an Sox9 positiven proliferierenden Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Sox9 in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Es zeigt sich mit Ende der <i>Inflammation</i> - und Beginn der <i>Regeneration</i> -Phase ein hoher Prozentsatz von bis zu 52,7 % aller teilenden Zellen mit Sox9 positiver co-Färbung. Im Verlauf ergibt sich ein erneuter Abfall auf Werte um 10% mit Ende der <i>Regeneration</i> - und <i>Refinement</i> -Phasen.	64
Abbildung 29: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Vimentin-positiven Zellen in <i>Kras</i> ^{G12D} Mäusen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Vimentin (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung in <i>Kras</i> ^{G12D} Pankreata, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Es finden sich zwei vorherrschende Bilder, einerseits eine, mit dem WT vergleichbare, Vimentin Expression in mesenchymalen Trennmembranen im regulären Pankreasgewebe (rechts) und im Gegensatz hierzu starke Zunahme an Vimentin-positivem Stroma in Regionen mit präformierten ADMs (hier auch vereinzelte Zellteilungen) (links); (12 h) Zunahme an Vimentin-positiven Zellen sowie deutliche proliferative Aktivität im mesenchymalen Kompartiment; (Tag 4) Weiterhin auch im Vergleich zum WT deutliche Überproduktion an Stroma mit zahlreichen Zellteilungen; (Tag 14) Bild vergleichbar mit Tag 4 unter Abnahme der Proliferation.	65
Abbildung 30: Anzahl an Vimentin positiven proliferierenden Zellen in <i>Kras</i> ^{G12D} im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression	

von Vimentin in WT (schwarz) und *Kras^{G12D}* (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Im Vergleich zur Proliferation im WT, wo Teilungen in Vimentin-positiven Zellen strikt begrenzt auf die Inflammation-Phase erscheinen, zeigt sich in *Kras^{G12D}* Tieren eine deutlich verlängert erhöhte Proliferation von Vimentin-positiven Zellen mit langsamem Abfall erst nach 7 Tagen. 66

Abbildung 31: Prozentsatz an Vimentin positiven proliferierenden Zellen in *Kras^{G12D}* (rot) im Vergleich zum WT (schwarz): Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Prozentual stellen in *Kras^{G12D}* Tieren Vimentin-positive Zellen einen dauerhaft hohen Anteil an sich teilenden Zellen um 60 %..... 67

Abbildung 32: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in α -SMA-positiven Zellen in *Kras^{G12D}* Mäusen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der α -SMA (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung in *Kras^{G12D}* Pankreata, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Ausschließlich Zellen in Gefäßen zeigen α -SMA Expression, dies ohne Proliferation; (12 h) erste Aktivierung von pankreatischen Stellatumzellen mit Lokalisation interstitiellen Raum bei, im Vergleich zum WT, steigender und gesteigerter Proliferation in dieser Zellpopulation; (Tag 4) weiterhin deutliche Überproduktion und Proliferation von aktivierten Stellatumzellen mit starker Abweichung zur Präsentation des WT; (Tag 14) ADM, TC und AFL sind eingebettet in eine überschießende Menge an desmoplastischem Stroma bestehend aus α -SMA positivem Mesenchym (es finden sich ebenso weiterhin gesteigert Zellteilungen in aktivierten Stellatumzellen). IF veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016)..... 68

Abbildung 33: Anzahl an α -SMA positiven proliferierenden Zellen in *Kras^{G12D}* im Vergleich zum WT. Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in α -SMA positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras^{G12D}* Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. In *Kras^{G12D}* Tieren zeigt sich eine im Vergleich zum WT deutlich gesteigerte Anzahl an Zellteilungen in α -SMA positiven Zellen, welche erst nach 7 Tagen rückläufig ist und 14 Tage nach Induktion der Pankreatitis erneut Vergleichbar ist mit der Proliferation in Kontrolltieren dieses Genotyps. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016). 69

Abbildung 34: Prozentsatz an α -SMA positiven proliferierenden Zellen in *Kras^{G12D}* im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in α -SMA positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras^{G12D}* Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen mit

Expression des Markers an der Gesamtzahl der in der S-Phase befindlichen Zellen. Prozentual stellen α -SMA positive Zellen einen im Vergleich zum WT deutlich erhöhten Anteil der Teilenden Zellen nach Pankreatitis dar. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016). 70

Abbildung 35: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Pdx1-positiven Zellen in *Kras*^{G12D} Mäusen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung in *Kras*^{G12D} Pankreata, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Einerseits starke Pdx1 Expression in Zellen in präformierten ADMs, mit gehäufter Proliferation in diesen Zellen, andererseits in regulärem Pankreasgewebe Pdx1 Expression ausschließlich in Zellen in Langerhans'schen, dies ohne Proliferation; (36h) mit fortschreiten der *Inflammation*-Phase präsentiert sich die große Mehrheit der exokrinen Zellen mit Pdx1 Expression im Zellkern und gesteigerter Proliferation in dieser Zellpopulation; (Tag 3) keine Abschwächung der Pdx1-Positivität in exokrinen Zellen in ADM und TCs mit weiterhin gesteigerter Proliferation, bei erhaltener Färbung von Langerhans'schen Inselzellen (wenige Teilungen in der β -Zellpopulation, soweit morphologisch festzustellen); (Tag 14) Metaplastisches Gewebe sowie TCs und AFLs zeigen starke Pdx1 Expression bei vereinzelt Zellteilungen. 71

Abbildung 36: Anzahl an Pdx1 positiven proliferierenden Zellen in *Kras*^{G12D} im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Pdx1 positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras*^{G12D} Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. In *Kras*^{G12D} Tieren findet sich bereits zu Beginn der Inflammation eine erhöhte Anzahl an Teilungen von Pdx1 positiven Zellen, dies steigend über die ersten 60h. Ab 84h nach Induktion der Pankreatitis bis Tag 14 zeigt sich eine schrittweise Reduktion auf Werte wie in Kontrolltieren. 72

Abbildung 37: Prozentsatz an Pdx1 positiven proliferierenden Zellen in *Kras*^{G12D} im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Pdx1 positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras*^{G12D} Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtzahl der in der S-Phase befindlichen Zellen. Im WT zeigt sich über den gesamten beobachtungszeitraum eine relativ konstant niedrige Proliferation in Pdx1 positiven Zellen, welche jedoch zum Zeitpunkt von 36h einen signifikanten Anteil an allen teilenden Zellen ausmacht. In *Kras*^{G12D} Tieren zeigt sich bereits in Kontrolltieren ein erhöhter Anteil an Proliferierenden Zellen als Pdx1 positiv, dies relativ konstant um 20 % aller teilenden Zellen. 72

Abbildung 38: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Sox9-positiven Zellen in *Kras*^{G12D} Mäusen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung in *Kras*^{G12D} Pankreata, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Sox9 Expression findet sich

in Gangzellen (ohne proliferative Aktivität) sowie in Zellen präformierter ADM (mit im Vergleich zum Normalgewebe erhöhter Teilungsrate); (36 h) Sox9 Expression dehnt sich auf nahezu alle Zellen des Exokrinen Kompartiments aus, zu diesem Zeitpunkt eine dem WT vergleichbare Teilungsrate in Sox9-positiven Zellen; (Tag 4) kein Verlust von Sox9 Expression in exokrinen Zellen, Proliferation in diesem Kompartiment bleibt deutlich über das Level des WT erhöht; (Tag 14) Zellen in ADM, TC und AFL zeigen deutliche Sox9 Expression mit weiterhin gesteigerter Proliferation Sox9-positiver Zellen. IF veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016). 73

Abbildung 39: Anteil an Sox9 positiven proliferierenden Zellen in *Kras^{G12D}* im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Sox9 positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras^{G12D}* Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Im Vergleich zum WT zeigen *Kras^{G12D}* Tiere einen steileren Anstieg der Proliferation von Sox9 positiven Zellen, auch findet sich im starken Kontrast zum WT im Verlauf kein kompletter Rückgang der Proliferation in diesem Kompartiment. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016)..... 74

Abbildung 40: Prozentsatz an Sox9 positiven proliferierenden Zellen in *Kras^{G12D}* im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Sox9 positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras^{G12D}* Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtzahl der in der S-Phase befindlichen Zellen. Im Vergleich zum WT zeigen *Kras^{G12D}* Tiere keine klar zeitlich gesteuerte Proliferation von Sox9 positiven Zellen, ihr Anteil an allen Zellteilungen steigt bis 36h schrittweise an und verbleibt bis zum Ende der Beobachtungsspanne auf erhöhten Werten. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016). 75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborequipment	15
Tabelle 2: Chemikalien	16
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	17
Tabelle 4: Reagenzien Kits.....	18
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 6: Software.....	19
Tabelle 7: Primäre Antikörper	19
Tabelle 8: Fluoreszenzantikörper und -Farbstoffe	20
Tabelle 9: IHC sekundärer Antikörper	20
Tabelle 10: erwartete DNA-Fragmentlängen, Kras und Ptf1a.....	27
Tabelle 11: Protokoll zur Gewebeerwässerung.....	30
Tabelle 12: Vorgehensweise für die H&E Färbung.....	31
Tabelle 13: Vorgehensweise für die Immunhistochemie	32
Tabelle 14: Vorgehensweise für die Immunfluoreszenz	33

1 Einleitung

Chronische Entzündungen stehen in diversen Organsystemen in Verbindung mit dem Auftreten von Krebserkrankungen (Lowe and Storkus, 2011). Hierzu gehören unter anderem Lunge (Freire et al., 2013; Wilson et al., 2008), Magen (Bessède et al., 2014), Kolon (Dubois, 2014), Prostata (Elkahwaji, 2012; Kwon et al., 2014) und Gallenblase (Hundal and Shaffer, 2014; Xie et al., 2014). Auch im Falle des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC) wird ein Zusammenhang mit einer entzündlichen Verletzung des Organs (Pankreatitis) gesehen (Hamada et al., 2014). Durch welche Faktoren jedoch diese beiden Krankheitsentitäten in Verbindung stehen ist bis dato nicht abschließend geklärt.

1.1 Pankreatitis und Pankreaskarzinom: Epidemiologie

Die chronische Pankreatitis (CP) ist mit einer mittleren Inzidenz von 5,5 Fällen pro 10⁵ Einwohner/Jahr eine relativ seltene Erkrankung in der westlichen Zivilisation (De-Las-Heras-Castaño, 2014), die wohl am häufigsten durch exzessiven Alkoholkonsum entsteht (Nøjgaard et al., 2010). Epidemiologische Betrachtungen sind zu dem Schluss gekommen, dass Patienten mit CP ein erhöhtes Risiko haben, ein PDAC zu entwickeln (OR 10,35 für CP bei Patienten mit CP, und OR 2,12 für Patienten mit akuter Pankreatitis. RR 6,9 im Vergleich zur gesunden Bevölkerung). Hierbei ist das Risiko an PDAC zu erkranken im ersten Jahr nach Diagnose der CP am höchsten mit einer OR von 23,30 (95% CI: 13,95-38,93) (Bang et al., 2014). Diese Wahrscheinlichkeit variiert jedoch stark im Vergleich zwischen unterschiedlichen Studien (Bang et al., 2014; Lévy et al., 2006; Spanier et al., 2013; Tinto et al., 2002), was auch daran liegen könnte, dass ein großer Teil der chronischen Pankreatitiden durch bis dahin nicht diagnostizierte tumorbedingte Gangobstruktionen hervorgerufen wird (Bracci et al., 2009; Olson, 2012). Die CP ist dennoch nicht als einziger auslösender Faktor zu sehen. Weitere bekannte Risikofaktoren für das PDAC können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum Einen sind Umweltfaktoren zu nennen: chronischer Nikotinabusus (Siegel et al., 2012), übermäßig fettreiche Ernährung, Fettleibigkeit (Bracci, 2012), langjährig bestehender Diabetes mellitus (Li, 2012), Infektion mit *Helicobacter Pylori* und vermutlich auch massiver Alkoholabusus (Duell, 2012), sowie zum Anderen die genetisch prädisponierenden Faktoren, zum Beispiel erhöhtes PDAC Vorkommen in der Familie, BRCA2 Expression und Blutgruppe A, B oder AB (Risch, 2012). Hierbei macht die erbliche Form des PDAC 5-10% aller Fälle aus (Tong et al., 2014). Das Pankreas Karzinom steht mit 2,2% weltweit an 13. Stelle aller Krebsneuerkrankungen. Hierbei ist die Mortalitätsrate mit 3,5% aller Tode aufgrund von Krebserkrankung sehr hoch (Tong et al., 2014). Das PDAC stellt mit über 85% Prozent aller Krebserkrankungen des Pankreas den größten Anteil dar (Reid et al., 2013). Mit einer 5-Jahres Überlebensrate von weniger als 5% und einem medianen Überleben von weniger als 6 Monaten, gilt es als eine der tödlichsten Krebserkrankungen überhaupt (Hezel et al., 2006).

1.2 Anatomie und Histologie des Pankreas

Der Pankreas ist ein exo- und endokrines Organ, das in verschiedenen Säugetierspezies eine unterschiedliche Lage und Aufbau zeigt. Im Menschen liegt er retroperitoneal im Oberbauch in enger Beziehung zum Duodenum und der Milz und zeigt einen kompakten Aufbau, der die Aufteilung in Kopf, Corpus und Schwanz erlaubt. In der Maus hingegen findet man einen diffusen Aufbau genannt „mesenterisch“, insofern als dass der Pankreas verteilt im duodenalen Mesenterium liegt. In beiden Spezies gliedert er sich in unregelmäßige Läppchen die um einen zentralen Gang, den ductus pancreaticus der ins Duodenum mündet, gruppiert sind. Der Pankreas besteht histologisch aus drei Hauptkompartimenten. Den größten Anteil stellt das exokrine Kompartiment dar. Dieses besteht aus den Pankreasgängen sowie den exokrinen Azinuszellen. Der ductus pancreaticus verästelt sich in der Peripherie des Organs zu vielen kleinen Gängen, an deren Ursprung jeweils ein Azinus sitzt. Dieser stellt eine Agglomeration von Azinuszellen dar, die zur Produktion und Sekretion von Verdauungsenzymen dienen. Verbunden sind Gang- und Azinuszellen durch die Zellpopulation der zentroazinären Zellen. Ein weiteres wichtiges Kompartiment des Pankreas sind endokrine Zellen. Hier sind verschiedene Typen bekannt die jeweils Hormone vor allem zur Regulation des Blutzuckerspiegels freisetzen können und gruppiert in Langerhans'schen Inseln im gesamten Organ verteilt sitzen. Dazu gehören α -Zellen, β -Zellen, δ -Zellen, PP-Zellen und ϵ -Zellen. Das dritte Kompartiment des Pankreas ist das Mesenchym, das aus einer Vielzahl an Stütz und Immunzellen besteht und die Pankreas Läppchen unterteilt. In diesem Raum verlaufen auch Blut und Lymphgefäße sowie Pankreasgänge und Nerven (Treuting et al., 2012).

1.3 Entstehung des PDAC aus Vorläuferläsionen (Adenom–Karzinom–Sequenz)

Eine Vielzahl an Studien hat sich in den letzten Jahrzehnten mit der histologischen Aufarbeitung des PDAC beschäftigt. Begründet auf Vorerkenntnissen von Sommers et al. (Sommers et al., 1954) und bestätigt durch Cubilla und Fitzgerald et al. wurde erkannt, dass das duktales Karzinom auf dem Boden dedizierter Vorläuferläsionen entsteht (Cubilla and Fitzgerald, 1976). Histologische Untersuchungen ergaben, dass papilläre, duktales Hyperplasien in Pankreata mit Krebs signifikant häufiger vorkommen. Ebenso kamen signifikante Zellatypien nur vor, wenn im untersuchten Organ Krebs vorzufinden war. (Cubilla and Fitzgerald, 1976; Hruban et al., 2000b). Hierbei befanden sich Zonen mit höhergradiger Atypie häufig innerhalb Zonen niedriggradiger Atypie, was ebenso für eine schrittweise Entartung und Tumorprogression aus intraduktaler Proliferation zu invasivem duktalem Karzinom spricht (Furukawa et al. 1994). Im Jahr 2003 gelang es Hingorani et al. mit Hilfe des

durch onkogenes Kras induzierten Mausmodells für die PDAC Entstehung zu beweisen, dass die in der Maus gefundenen Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien (PanIN) exakt dem Bild der menschlichen Läsionen entsprechen. Ebenso bestätigten sie, dass sich das invasive PDAC im Rahmen der Kras Mutation aus der PanIN als Vorläuferläsion entwickelt (Hingorani et al., 2003). Hiermit wurde zuerst die Annahme begründet, dass die Entstehung des PDAC ähnlich wie weitere gastrointestinale Tumoren auf einer Adenom-Karzinomsequenz beruht. (Aichler et al., 2012, Brune, Abe and Canto, 2006; Liszka et al., 2011). Dabei entsteht eine Primärläsion ohne malignen Charakter, die sich im Verlauf zu einer malignen Neoplasie weiterentwickelt. Weitere Vorläufer des PDAC sind die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN), die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) und die *atypical flat lesion* (AFL) die ebenso einen duktafen phänotyp zeigen (Aichler et al., 2012; Hruban et al., 2000b).

Es ist bisher in Ermangelung von extensiven *lineage tracing* Experimenten noch nicht abschließend geklärt, welche Zellpopulation des Organs als Ursprungszelle des PDAC gewertet werden darf. Derzeit vorherrschende Meinung ist, dass sich das PDAC auf dem Boden einer azinär zu duktafen Metaplasie (engl. *acinar-to-ductal metaplasia* ADM) entwickelt (Guerra et al., 2007; Habbe et al., 2008; Kong et al., 2011).

1.4 Histologische Charakterisierung der PDAC Vorläuferläsionen

Die Bildung von ADM findet unabhängig von PanIN-Bildung statt (Zhu et al., 2007). Sie ist relativ häufig (auch in gesunden Individuen)(Esposito et al., 2007) und wird charakterisiert durch eine erhöhte Zellteilungsrate mit De- und Redifferenzierung von azinären Zellen, mit einer fraglich transienten Metaplasie vom azinären zum duktafen Zelltypus. Aichler et al. beschreiben sie als höchst wahrscheinlichen Ursprung für PDAC (Aichler et al., 2012). Azinäre Zellen die eine ADM untergehen exprimieren in der Folge Marker die im adulten Pankreas typisch sind für das duktafe Kompartiment wie u.a. den Marker Cytokeratin 19 (CK19) (Prévoet et al., 2012; Zhu et al., 2007).

In der ADM finden sich tubuläre Komplexe (TC) (Vgl. Abbildung 1), die definiert werden als zylindrische Röhren ausgekleidet mit einreihigem Epithel von flachen gangähnlichen Zellen, in denen Mitosen zu verzeichnen sind (Iovanna, 1996). Die TC entstehen ebenso durch

Dedifferenzierung aus azinären Zellen (Bockman, 1997; Iovanna, 1996; Reid and Walker, 1999).

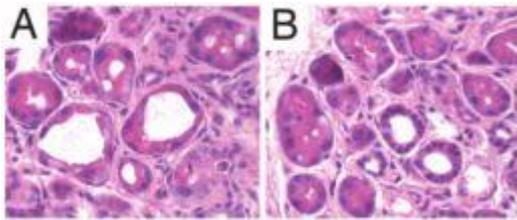


Abbildung 1: H+E Färbung von Pankreasgewebe mit TC mit großen (A) und kleinen (B) Zellen (Strobel et al., 2007b)

Nach dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz, entwickelt sich hierauf die intraepitheliale Neoplasie (PanIN). Sie zeigt drei bzw. vier Grade (Reid et al., 2013). Grad IA wird charakterisiert durch den Austausch von normalem niedrig kuboidalem Epithel durch einreihiges hochprismatisches Epithel ohne Zellatypien oder architektonische Komplexität. Grad IB zeigt erste Bildung von Papillen. In Grad II finden sich Zellatypien sowie der Eindruck von mehrreihigem, hochprismatischem Epithel. PanIN III zeigt schließlich starke Zellatypie, Nekrose, Mitosen, Bildung von komplexen Papillen und Verlust der Zellpolarität (Vgl. Abbildung 2).

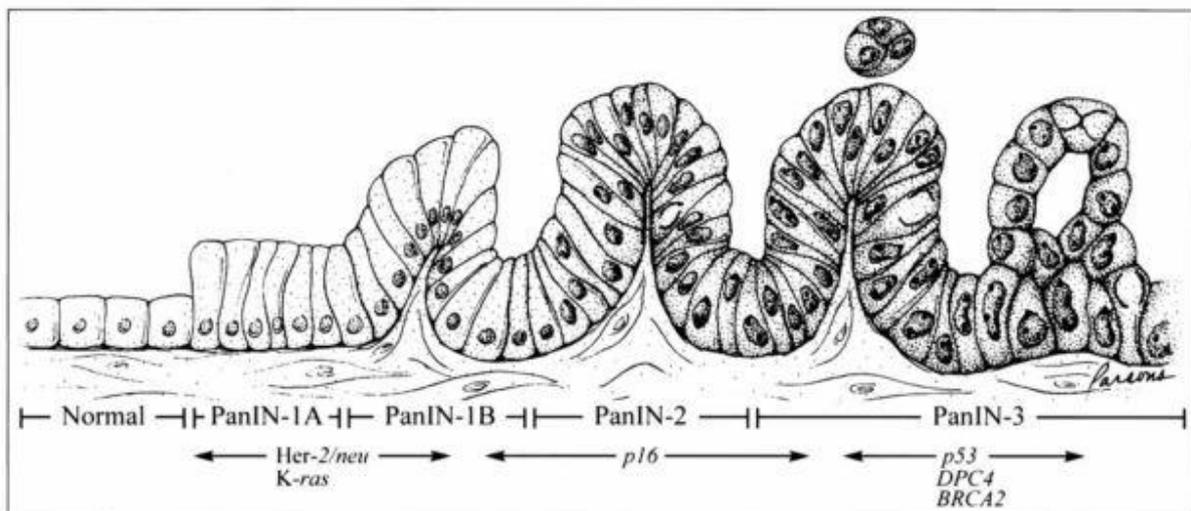


Abbildung 2: Progressionsmodell der PDAC Histologie und Mutationssequenz mit Anmerkung der Reihenfolge der anfallenden Mutationen im Verlauf (Hruban et al., 2000a). Zunächst zeigt sich normales niedrig kuboidales Epithel (Azinuszellen). In PanIN-IA finden sich erste Mutationen typischerweise Kras und Her2/neu in hochprismatischem Epithel. PanIN IB zeigt sich mit Papillenbildung und Beginn von p16 Mutationen. In PanIN II finden sich zunehmend Zellatypien, mehrreihiges hochprismatisches Epithel und p16 Mutation. In PanIN III zeigen sich zunehmend Mutationen, Zellatypie, Nekrose und Mitosen sowie komplexe Papillen.

Weiter in Frage kommende Vorläuferläsionen wurden als *atypical flat lesions* (AFLs) erstmals 2012 von Aichler et al. beschrieben. Sie werden histologisch charakterisiert als tubuläre Strukturen in Regionen von ADM, die kuboidale Zellen mit vergrößertem hyperchromatischem Zellkern, ein hohes Verhältnis von Kernvolumen zu Zytoplasma sowie im Vergleich mit anderen Vorläuferläsionen - inklusive der PanIN - deutlich erhöhte Mitoseraten aufweisen.

Auch das umliegende Stroma ist bei den AFLs als charakteristisch anzusehen, mit einer Vielzahl an spezifisch angeordneten Spindelzellen (Aichler et al., 2012).

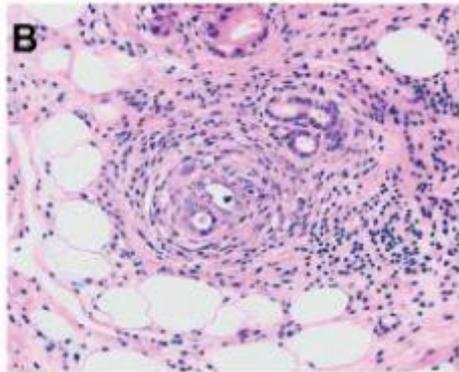


Abbildung 3: H+E Färbung von Pankreasgewebe der Maus mit AFL bestehend aus lobulärer Struktur mit kuboidalen Zellen in charakteristisch angeordnetem umgebendem Stroma (Aichler et al., 2012)

1.5 Histologie des PDAC

Die typische Histologie des PDAC stellt sich als invasive Form seiner Vorläufer dar und zeigt komplex verzweigte drüsenartige Strukturen, die mit niedrigen kuboidalen, aber auch hochprismatischen Zellen gesäumt sind und Zelltypen sowie intrazelluläre Muzinansammlungen zeigen (Reid et al., 2013). Hierbei ist das Durchbrechen der Basalmembran mit Invasion des umgebenden Gewebes Grundbedingung der histologischen Diagnose. Des Weiteren zeigt sich eine weitreichende zufallsartige Verteilung der Neoplasien sowie eine Infiltration des umgebenden stark fibrotischen desmoplastischen Bindegewebes.

1.6 Genetische Merkmale des PDAC

Laut genetischer Analysen weisen, je nach Quelle, 80-95% aller PDAC Patienten eine Mutation im Kras Protoonkogen auf (Reid et al., 2013; Yachida et al., 2012; Yan et al., 2005). Bereits unter PDAC Vorläuferläsionen kann ein, nach Grad der Entartung steigender, Prozentsatz als positiv für onkogenes Kras gewertet werden (36% in PanIN IA, 44% in PanIN IB und 87% in PanIN II und III) (Löhr et al., 2005). Die häufigste Lokalisation ist eine Punktmutation am Locus 12 genannt *Kras^{G12D}* (Hruban et al., 2000b). Hierbei wird Glycin durch Asparaginsäure ersetzt (Hingorani et al., 2003). Eine Mutation in der Familie der RAS-Proteine wird in vielen weiteren Krebsformen ebenso als Auslöser angesehen. Diese Familie besteht aus vier weitgehend homologen Varianten, dem Hras, Nras, sowie Kras4A und B. Hras Mutationen finden sich häufig bei Kopf-Hals und Hauttumoren, Nras Mutationen häufig bei hämatopoetischen Neoplasien und Kras Mutationen sind am häufigsten zu finden in Tumoren der Lunge (*Non-small-cell-lung-cancer* NSCLC), in kolorektalen Malignomen und im Pankreaskarzinom (Pylayeva-Gupta et al., 2011).

Weitere Gene die im Falle des menschlichen PDAC häufig Veränderungen aufweisen sind Her2-neu (70%), p16 Mutation oder Promotor Methylierung, Über-Expression von p53 (50-75%), Verlust von DPC4/SMAD4 (deleted in pancreatic carcinoma locus 4) (55%), Mutation von BRCA2 (7-10%) und in weniger als 5% der Fälle Mutationen in den Genen LKB1/STK11, MKK4, TGF β (transforming growth factor beta) und RB1 (Retinoblastom)...(Hruban et al., 2000a; Whitcomb and Pogue-Geile, 2002; Yan et al., 2005). Es wird bis heute davon ausgegangen, dass diese Mutationen so etwas wie eine „Mutationssequenz“ aufweisen, insofern als dass zunächst eine Kras oder Her2-neu Mutation vorzufinden ist, auf die sodann die weiteren Mutationen aufsatteln (siehe Abbildung 2) (Hruban et al., 2000b, 2000a). Insofern gilt die Mutation im Kras-Gen quasi als initialer „Hit“ der die Krebserkrankung auslöst.

1.7 Funktionsweise der Ras-Proteinfamilie

Im gesunden Organismus ist die Ras-Familie eine Gruppe an GTP-asen die als Signaltransduktor zwischen Zelloberfläche und intrazellulären Signalwegen fungiert. Sie oszillieren zwischen einem aktivierten Zustand, in dem sie an GTP gebunden sind und einem inaktiven, an GDP gebundenen Zustand. Hierbei wirken Guanin-Nukleotid Austausch Faktoren (engl.: *guanin-nucleotide exchange factors* (GEF)) aktivierend, indem sie den Austausch von GDP durch GTP vermitteln. Die Signalweiterleitung erfolgt durch eine Konformationsänderung, die die Verbindung von Ras mit der Raf Effektor kinase ermöglicht (Berg et al., 2007). Die neuerliche Inaktivierung von Ras findet zum einen durch die Ras-intrinsische GTPase Funktion, zum anderen durch extrinsische GTPase aktivierende Proteine (GAP), welche die Hydrolyse beschleunigen statt. Hierdurch kann das Ras Signal zeitlich gesteuert dediziert abgeschaltet werden. (Pylayeva-Gupta et al., 2011).

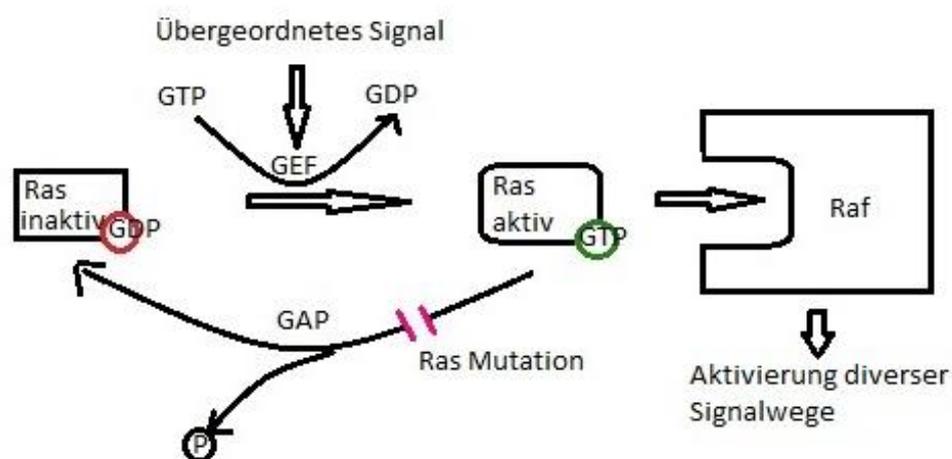


Abbildung 4: Aktivierung und Inaktivierung von Ras-Proteinen: inaktives RAS hat GDP gebunden. Durch Vermittlung von *Guanin nucleotide exchange factors* (GEF) wird GDP zu GTP phosphoryliert und so RAS aktiviert. Dies führt zu einer Raf-gestützten Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Die natürliche Inaktivierung von RAS über *GTPase-aktivierende Proteine* (GAP) wird durch die Mutation vermindert. Hieraus folgt eine dauerhafte Aktivierung.

1.8 Effekt der Mutation im Ras Protoonkogen

Kras Mutationen haben zur Folge, dass sowohl die intrinsische als auch die extrinsische GTPase Funktion, also die Hydrolyse von an Kras gebundenem GTP zu GDP, geschwächt wird (Hingorani et al., 2003). Die Mutation am Locus G12 beispielsweise (98% der im Menschen gefundenen Kras Mutationen im Pankreas) verhindert die Bildung von van der Waals Bindungen zwischen Ras und GAP durch sterische Behinderung. Hierdurch kommt es nicht zum Kontakt der katalytischen Zentren, woraus eine deutlich geschwächte GTPase-Funktion resultiert (Eser et al., 2014; Pylayeva-Gupta et al., 2011). Somit bleibt Kras verlängert an GTP gebunden und der Ras-Signalweg aktiv. Im Endeffekt führt die Ras-Mutation zu einer kontinuierlichen Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, die in ihrer Gesamtheit viele der charakterisierenden Merkmale von Malignität antreiben können. Hierzu gehören die andauernde Proliferation von Zellen, der Apoptose-stopp, die metabolische Umprogrammierung im Sinne des Warbureffekts, die Aktivierung und onkogene Veränderung des Tumorstromas, das Entgehen der körpereigenen Immunantwort, sowie die Zellmigration und Metastasierung (Pylayeva-Gupta et al., 2011).

Trotz der Tatsache, dass die Mutation von Kras offenbar durch Steuerung der genannten Zusammenhänge auslösend für die pankreatische Karzinogenese ist, lässt die bisherige Literatur nicht darauf schließen, dass es tatsächlich Unterschiede im Effekt der Aktivierung von mutiertem Kras zu nicht mutiertem Kras gibt. Genauer ist bisher ungeklärt, ob eine Kras Mutation weitere Signalwege eröffnet, die ohne Mutation nicht aktiviert werden, oder ob vielmehr die verlängerte Aktivierung des intrinsischen Signalweges genügt, um die Karzinogenese anzutreiben.

1.9 Begründung für die Nutzung des Tiermodells

Hypothetisch erfolgt auch im Menschen die PDAC-Karzinogenese nur unter Zusammenspiel von CP und gleichzeitig vorhandener Kras Mutation. Eine wichtige Schwierigkeit in der Erforschung des Zusammenhangs der beiden Faktoren ist die Tatsache, dass im Menschen der Zeitpunkt der frühen Karzinogenese meist "verpasst" wird und somit die Untersuchung der frühen Zeiträume im Menschen nicht stattfindet (Hingorani et al., 2003). Gerade PDAC Patienten kommen in Folge spät einsetzender, unspezifischer Symptome häufig erst im fortgeschrittenen Stadium in ärztliche Behandlung. Häufig infiltriert das PDAC bei Diagnose bereits umliegende Strukturen, wie die Gallengänge oder das Duodenum (Reid et al., 2013). Zudem ist die Gewinnung von menschlichem Pankreasgewebe schwierig und in Gesunden oder Patienten mit Entzündung ohne Verdacht auf ein Karzinom nicht indiziert. Es stellt sich also die Herausforderung ein Modell zu etablieren, in dem diese frühe Phase der Karzinogenese beobachtet und beeinflusst werden kann. Da bisher trotz extensiver Forschungsarbeit auf dem Gebiet keine Möglichkeit der Frühdiagnose, bzw. der Diagnose im

präinvasiven Stadium, entwickelt werden konnte, muss auf andere Modelle zurückgegriffen werden. Dies ist im Tiermodell insofern gegeben, als dass einerseits gezielt einzelne Mutationereignisse durch gentechnische Veränderung, sowie Umweltfaktoren eingebracht werden können und andererseits auch eine pharmakologische Behandlung durchgeführt werden kann. Es lässt sich somit im Tiermodell kontrolliert und voraussehbar die Karzinogenese initiieren und auf diese Weise frühe Zeitpunkte beobachten und manipulieren. Gerade in der Forschung an Säugetieren besteht, aufgrund der relativ hohen genetischen Ähnlichkeit, die Möglichkeit Forschungsergebnisse teilweise auf Ereignisse in der humanen Pathogenese zu übertragen. Demensprechend ist es sinnvoll für die Forschung an der frühen Karzinogenese auf Tiermodelle zurückzugreifen.

1.10 Caerulein-induzierte Pankreatitis

Mit dem Ziel die CP als Tumorinitiierenden Faktor zu erforschen wurden verschiedene Wege der CP-Induktion im Tiermodell eingeführt. Bereits 1896 beschrieb Hans Chiari die Autodigestion durch vorzeitige interstitielle Aktivierung von Zymogenen als Pathogenese für die Pankreatitis im Menschen ein (Chiari, 1896). Lampel und Kern stellten 1977 die Administration des Cholezystokininanalogons Caerulein zur Sekretionsstimulation als Möglichkeit vor, um in Nagetieren eine chemisch induzierte Pankreatitis, die der im Menschen beobachteten akuten interstitiellen Pankreatitis analog zu sehen ist, hervorzurufen (Lampel and Kern, 1977).

Caerulein ist ein künstlich synthetisiertes Decapeptid (Anastasi et al., 1967; Bernardi et al., 1967), welches als Gastrin, Bradykinin und Cholezystokinin-Pankreozymin Analogon die Magensäuresekretion sowie, in diesem Fall ausschlaggebend, die Pankreassekretion stimuliert (Erspamer et al., 1967). In Nagetieren (Maus und Ratte) ist festzustellen, dass eine normale bis maximale Stimulation mit Caerulein zu einer Steigerung der Pankreassekretion von Protease-reichem Sekret führt. Bei supramaximaler Stimulation hingegen kehrt sich die Situation um, die Sekretion von Pankreasflüssigkeit in das Gangsystem wird drastisch reduziert, und es kommt zum Sekretstau, sowie zur Cathepsin B vermittelten interstitiellen Proteasenaktivierung (Trypsinogen), was schließlich zur Autodigestion des Organs und zu extensivem Azinuszellschaden führt (Adler et al., 1982; Halangk et al., 2000). Die Behandlung von Versuchstieren mit Caerulein hat den Vorteil, dass sie relativ wenig invasiv ist, in Mäusen wird das Medikament üblicherweise intraperitoneal injiziert (Adler et al., 1982), des Weiteren ist sie leicht skalierbar durch Variation von Einzeldosis und Applikationsdauer und schließlich sind die Ergebnisse leicht reproduzierbar und inter-individuell wenig variabel. Hier verwendete Protokolle sind die Applikation von acht stündliche Dosen über zwei Tage für das Studium der Regeneration nach akuter Pankreatitis (Jensen et al., 2005). Um die chronische Pankreatitis

zu untersuchen, eignen sich einmal tägliche Injektionen an 5 Tagen pro Woche über mehrere Monate (Guerra et al., 2011, 2007).

In der Maus heilt eine solche chemisch induzierte Pankreatitis nach Absetzen der Caeruleinbehandlung innerhalb von 14 Tagen folgenlos ab. Auch nach längerer Caeruleinapplikation von bis zu 3 Monaten wird eine spontane Remission ohne bleibende Schäden beobachtet (Guerra et al., 2011).

1.11 Regeneration nach Caerulein-induzierter Pankreatitis in Wild Typ Nagetieren

In der Ratte wurde zuerst festgestellt, dass sich im Wildtyp die vollständige Regeneration nach Caerulein induzierter Pankreatitis als Abfolge von azinär zu duktaler Metaplasie (ADM) gefolgt von erneuter Redifferenzierung zum azinären Zelltyp vollzieht (Reid and Walker, 1999). Es kommt zu einer transienten Dedifferenzierung von exokrinen Zellen (Jensen et al., 2005; J. P. Morris et al., 2010). Diese Dedifferenzierung ist gekennzeichnet durch Aktivierung von embryonalen Signalwegen wie Notch (De La O et al., 2008; Miyamoto et al., 2003), Hedgehog (Fendrich et al., 2008) und Wnt (J. Morris et al., 2010; J. P. Morris et al., 2010; Zhang et al., 2013). Hierdurch ergibt sich eine erneute Expression von pankreatischen Stammzellmarkern in azinären Strukturen.

Zu den re-exprimierten Markern gehört unter diversen anderen der HMG-box Transkriptionsmarker Sox9. Im adulten Pankreas ist die Sox9 Expression auf Gangzellen und zentroazinäre Zellen beschränkt (Seymour et al., 2007). Im Rahmen von ADM weitet sich die Sox9 Expression auf ehemals azinäre Zellen aus. Auch PanINs und PDAC sind positiv für diesen Marker (J. P. Morris et al., 2010; Prévot et al., 2012). Während der Embryogenese können Sox9 exprimierende Stammzellen alle drei epithelialen Zelllinien des Pankreas bilden (Furuyama et al., 2011; Solar et al., 2009). Des Weiteren bilden sie auch im gesunden adulten Organ eine Population, die stammzellähnlich, die Fähigkeit besitzt, das exokrine Kompartiment bestehend aus Azinus und Gangzellen zu erneuern (Furuyama et al., 2011). Hierbei ist nicht klar, ob sich diese Kompartimente aus den Sox9 exprimierenden Gangzellen oder aus dedifferenzierten, erneut Sox9 exprimierenden Azinuszellen Gangzellen bilden. Sox9 exprimierende Zellen in Pankreasgängen, sowie die erwähnte residierende Sox9 exprimierende stammzellähnliche Population sind allerdings gegenüber der durch onkogenes Kras induzierten Karzinogenese sehr resistent (Jensen et al., 2005; Kopp et al., 2012). Im Gegensatz hierzu stellen azinäre Zellen, die im Rahmen der Inflammation eine Dedifferenzierung und ADM durchführen, einen Zellpool dar, aus dem sich, durch onkogenes Kras Signal, maligne Vorläuferläsionen bilden (De La O et al., 2008; Habbe et al., 2008; J. P. Morris et al., 2010). Diese Zellpopulation azinären Ursprungs trägt, im Zustand der ADM, gangzelltypische Marker wie Sox9 oder Ck19. Die Expression von Sox9 in azinären Zellen ist

in diesem Zusammenhang von höchster Wichtigkeit, da sie die Bildung der ADMs vorantreibt und für das Entstehen von PanINs notwendig ist (Kopp et al., 2012).

Des Weiteren findet sich eine Re-expression des Transkriptionsfaktors Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1). Das humane homologe Gen ist das Ipf1. In der Maus ist Pdx1 während der Embryogenese einer der frühesten Marker von Pankreaszellen, die in der Folge alle drei epithelialen pankreatischen Zelllinien bilden (Gu et al., 2002; Offield et al., 1996; Ohlsson et al., 1993). Beobachtungen von Pankreasagenesie in Tieren mit Pdx1 Mutation lassen darauf schließen, dass Pdx1 eine Schlüsselfunktion in der allgemeinen Pankreasentwicklung innehat (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). Im adulten Pankreas ist die Pdx1 Expression auf endokrine β -Zellen (Offield et al., 1996; Ohlsson et al., 1993) sowie einen kleinen Teil von exokrinen und Gangzellen beschränkt (Stoffers et al., 1999; Wu et al., 1997). Im Rahmen von Pankreatitis und PDAC findet sich sowohl im Mensch, als auch im Mausmodell eine erneute allgemeine Aktivierung der Pdx1 Expression im azinären Kompartiment (Jensen et al., 2005; Koizumi et al., 2003). Die Expression von Pdx1 in diesen Zellen führt zu ADM.

Im umgebenden Mesenchym zeigt sich bereits eine Stunde nach Caeruleinapplikation ein exzessives interstitielles Ödem (Lampel and Kern, 1977), sowie erhöhte proliferative Aktivität (Jensen et al., 2005). Es kommt zu einer entzündlichen Aktivierung des Mesenchyms. Bei einer verlängerten entzündlichen Reaktion des Pankreas in Form einer chronischen Pankreatitis findet sich schließlich eine narbige Fibrosierung des Organs (Apte et al., 2011). Sowohl Inselzellen als auch duktale Zellen bleiben durch die Caerulein induzierte Pankreatitis unbeeinträchtigt was ihre Proliferationsaktivität angeht (Jensen et al., 2005). Diese Kompartimente sind gleichzeitig refraktär, der onkogenen Kras induzierten Karzinogenese gegenüber (Kopp et al., 2012). Im Falle der Regeneration kommt es im Wild Typ zur Redifferenzierung und Wiederaufnahme des azinären Programms, sowie Reorganisation der Mikrostruktur des Organs. Somit ist auch hier die akute oder chronische Pankreatitis nicht als singulärer Auslöser für PDAC zu identifizieren. Es wurden daher auch in der Maus als Modellorganismus Mutationen des Kras-Gens untersucht.

1.12 Bisher aus dem Tiermodell der Kras Mutation gezogene Schlüsse

Durch künstliches Einbringen einer Kras -Mutation in exokrine Zellen des Pankreas kann die Frequenz mit der Pankreaskarzinome entstehen deutlich erhöht und eine Beobachtung der Karzinogenese in der Maus ermöglicht werden (Guerra et al., 2007; Hingorani et al., 2003; J. Morris et al., 2010). Hierbei ist der in der Maus entstehende Tumor dem menschlichen PDAC sehr gut vergleichbar (Hingorani et al., 2003). Daher kann die Maus als Modellorganismus für diese Krebsart verwendet werden.

Die Kras Mutation führt zu einer stark veränderten Reaktion auf die Caerulein-induzierte Pankreatitis. In diesen Mäusen zeigt sich ein Regenerationsblock mit dauerhafter Aktivierung der oben erwähnten embryonalen Signalwege über die Zeitspanne der WT Regeneration hinaus (J. P. Morris et al., 2010). Nach einer bisher noch nicht genau festgelegten Zeitspanne findet sich ein Progress von ADM und TC und es bilden sich PanINs. Im Verlauf kommt es zu einer Entartung und es entsteht PDAC.

Frühere Untersuchungen konnten beweisen, dass eine Kras Mutation in der Maus nur dann zu PDAC führt, wenn die Expression der mutierten Genversion bereits ab einem frühen embryonalen Entwicklungsstadium stattfindet. Individuen, die mutiertes Kras erst ab Erreichen des Erwachsenenalters exprimieren zeigen keine Tumorentstehung. Hier wird die Karzinogenese hingegen initiiert, wenn zu der Expression von onkogenem Kras eine entzündliche Reaktion im Pankreas hinzukommt. Dabei ist es unerheblich, ob zunächst eine Aktivierung der Expression von onkogenem Kras und im Anschluss die Entzündung induziert wird, oder ob zunächst das entzündliche Milieu geschaffen, und die Expression von mutiertem Kras im Nachhinein induziert wird. Diese Studien belegen ebenso, dass auch verkürzte Perioden der Pankreatitis im Mausmodell unter *Kras*^{G12D} Einfluss zu PDAC führen (Guerra et al., 2011).

Hierzu ist zu erwähnen, dass die Schädigung des Organs und die hiermit vermittelte Ausschüttung von Wachstumsmediatoren (*growth-factors*) ein der Kras-Aktivierung vorgeschaltetes Signal ist (Devita et al., 2012). Es wurde festgestellt, dass niedrige Level von aktivem onkogenem Kras, wie sie im nicht entzündeten Pankreas vorliegen, nicht ausreichend sind eine Metaplasie hervorzurufen (Daniluk et al., 2012; Ji et al., 2009). Eine Pankreatitis hingegen geht einher mit deutlich erhöhter Kras-Aktivierung. Im Falle einer Kras Mutation ist durch den unter Abschnitt 1.8 dargelegten Mechanismus die nachfolgende Inaktivierung von Kras gehemmt und es entsteht über längere Zeiträume ein erhöhtes Signal von onkogenem Kras. Unter diesen Umständen wird wiederum die Formation von präneoplastischen Zellen vermittelt, sodass entzündungsinduzierte erhöhte Spiegel an Kras Aktivierung als karzinogen gelten müssen (Daniluk et al., 2012).

Somit verursacht die Mutation von Kras in der Maus eine Reihe an dauerhaften Veränderungen in deren Folge eine ansonsten harmlose Pankreatitis zu PDAC wird.

1.13 Ziel dieser Arbeit

Der Vorgang der Regeneration aber auch der frühen Karzinogenese ist ein komplexer und dynamischer Prozess, an den es sich lohnt von verschiedenen Betrachtungswinkeln aus eine Näherung zu erreichen. Dies ist unter anderem durch die Betrachtung von Regulationsmechanismen über die Zeit der frühen Regeneration bzw. Karzinogenese auf

Ebene der klassischen Organhistologie, aber auch der Proteinexpression und Proliferationsdynamik in histologischen Schnitten und der biochemischen Analyse von Genexpression zu bewerkstelligen.

In der bisherigen Forschung fehlend ist eine hohe zeitliche Aufschlüsselung der histologischen Ereignisse während der frühen Karzinogenese. Eine Vorarbeit von Sina Fritzsche konnte, Ergebnisse zum zeitlichen Ablauf der Regeneration auf histologischer Ebene und zur allgemeinen Proliferationsdynamik im WT erbringen. Es fehlen bisher aber Vergleichbare Analysen in Tieren mit *Kras* Mutation und ihr Vergleich mit der WT Regeneration. Ebenso fehlen Analysen zur Proliferation in den verschiedenen Zellkompartimenten, die zur Repopulation des Pankreas führen. Mit dem RNA Array kann zudem das gesamte Transkriptom analysiert und so die Veränderungen der Genexpression im Verlauf der Zeit im Vergleich zwischen WT und *Kras*^{G12D} verdeutlicht werden. Aus diesen Daten besteht die Möglichkeit Expressionssignaturen zu erstellen, sowie Regulationsnetzwerke nach ihrer Aktivität zu analysieren und Vergleiche mit bereits vorhandenen Datensätzen aus anderen Spezies oder anderen Krankheitsentitäten anzustellen.

Daher ist die Aufgabe dieser Arbeit der direkte und zeitlich stark aufgegliederte Vergleich der Entzündungsantwort zwischen WT und *Kras*^{G12D}-Tieren. Zusätzlich soll die Evolution des zellulären Umfeldes betrachtet werden und ein Informationspool über die Transkriptionsunterschiede zwischen WT und *Kras*^{G12D} für weitere Forschung bereitgestellt werden, sowie erste Ergebnisse, die sich aus dem Vergleich der Expressionsmuster ergeben, erläutert werden.

In dieser Arbeit soll die häufigste Variante der *Kras* Mutation die Mutation am Genlokus *Kras*^{G12D} untersucht werden. Diese Mutation wird in vielen genetisch veränderten Mausexperimenten verwendet und ist somit bereits sehr gut untersucht (Figura et al., 2014; Guerra et al., 2003, 2007, 2011; Habbe et al., 2008; Ling et al., 2012; J. P. Morris et al., 2010; Morris et al., 2014).

2 Material

Tabelle 1: Laborequipment

Gerät	Hersteller
<i>Flow hood</i> Heraeus®	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
<i>Multifuge</i> Heraeus® 3SR	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Elektrophorese Zubehör	Whatman, Göttingen
Elektrophorese Stromversorgung	Lifetechnologies, Darmstadt
Spectrophotometer NanoDrop® 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
<i>Tissue Lyser</i>	Qiagen, Hilden
UV Transilluminator	VWR, Darmstadt
Trocknungs-ofen	Advantage lab, Schilde (Belgium)
Einbettungs Station EG1160	Leica Microsystems, Nussloch
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop-Camera AxioCam ICc3	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop DM E	Leica microsystems, Wetzlar
Mikroskop Axio Imager M2	Carl Zeiss, Oberkochen
Magnetisches Rührgerät	IKA, Staufen
Mikrotom RM2255	Leica Microsystems, Nussloch
Schüttler	IKA, Staufen
<i>Tissue Float Bath</i>	GFL, Burgwedel
<i>Vacuum Tissue Processor</i> ASP200 S	Leica Microsystems, Nussloch
Autoclave VX75	Systec, Wettenberg
Waage	Sartorius analytic, Göttingen
Zentrifuge 5414 R	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank -20°C	Bosch, München
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Kühlschrank für Ethidiumbromid; <i>Betec personal cooler and warmer</i>	ProTec Germany, Neu-Isenburg
Kühlschrank 4°	KBS, Mainz
<i>Ice flaker</i> AF100	Scotsman, Vernon Hills IL (USA)
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasser-Reinigungs-System Milli-Q	Millipore, Schwalbach
<i>LightCycler</i> 480	Roche Applied Science, Mannheim

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Dulbecco`s PBS	PAA, Pasching (Austria)
30% Wasserstoff Peroxid	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Bovine Serum Albumin</i> (=BSA); Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Zitronensäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Dako EnVision + System- <i>HRP Labelled Polymer Anti-mouse</i>	Dako, Carpinteria CA (USA)
Eosin Y	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (50%, 70%, 96%, 99,8%)	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Hydrochloresäure	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Hematoxylin	Merck, Darmstadt
<i>Liquid DAB + Substrate Chromogen System</i>	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Denmark
Methanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Mounting Medium Vectamount™</i>	Vector Laboratories, Burlingame CA (USA)
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
5-Bromo-2`-Deoxyuridine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Buprenorphin Temgesic®	Essex Pharma, München
Caerulein C9026	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl 0,9% Lösung	B. Braun, Melsungen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
6x <i>Loading dye</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
37% Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethyl Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose <i>Broad Range</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol <i>absolute for analysis</i>	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Oligonukleotid-Primer	Metabion, Martinsried
<i>Rnase away Spray7000TS1</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Flüssiger Stickstoff	Tec-Lab, Königstein
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd 8%	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München

Triton x100	Carl Roth, Karlsruhe
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Fluoreszenz <i>Mounting Medium</i>	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Denmark
Retrievagen A	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid (=EDTA)</i>	Carl Roth, Karlsruhe
DNA Leiter/ <i>GeneRuler</i> 1kb	Fermentas #SM0311/2/3
Taq Mix: <i>jumpStart RED taq Ready Mix</i>	Sigma ,P0982-100RXN

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Reagenzien	Menge	Chemikalie
20x Citrat Puffer	21,09g	Citrat (Zitronensäure)
	500ml	ddH ₂ O
	pH ausgleichen auf 6,0	mit 5N NaOH
1x Citrat Puffer	20ml	Citrat Puffer 20x
	ad 400ml	ddH ₂ O
10x TBS (<i>Tris Buffered Saline</i>)	85g	NaCl
	12,1g	Tris Base
	800ml	ddH ₂ O
	pH ausgleichen auf 7,4	with 5N HCl
	ad 1l	H ₂ O
TBS/0,1% BSA	100ml	TBS 10x
	1g	BSA
	ad 1l	ddH ₂ O
TBS/0,1% BSA T	0,5% Tween20 In TBS/0,1% BSA	
<i>Blocking</i> Puffer	3% BSA in 1xTBS	
Endogene Peroxidase Inaktivierung	100 µl	30% Hydrogen Peroxide
	900 µl	Methanol
Eosin	1,5g	Eosin Y
	300ml	Ethanol 96%
	150 µl	Essigsäure 100%
25x TBE (= Tris Borat EDTA)	605,5g	Tris Base Puffer
	275,14g	Borsäure
	0,6g	EDTA
	add to 2l	ddH ₂ O
1x TBE (=Elektrophorese Puffer)	0,4l	25x TBE
	add to 1l	ddH ₂ O
Elektrophorese Gel	100ml	TBE
	0,8g	Agarose
	1ml	Formalinaldehyd
	3,5µl	Ethidiumbromid
Elektrophorese <i>Master Mix</i>	2µl	Loading dye (6x)
	4µl	Formamin

	2µl	ddH ₂ O
	1µg	Probenmaterial
PCR <i>Master Mix</i>	12,5µl	Taq Mix
	10,5 µl	Millipore Wasser
	1 µl	Primer (sense + antisense)
	1 µl (Zugabe erst später)	gDNA bzw. H ₂ O
	25 µl	Gesamt
Wasch Puffer	0,5% Tween20 in 1xTBS	
20x Elektrophorese Puffer	209,2g	MOPS 1,0M
	121,2g	Tris Base 1,0M
	20g	SDS 69,3mM
	6g	EDTA free acid 20,5mM
	add to 1l	dH ₂ O
Elektrophorese Puffer	30ml	20x Elektrophorese Puffer
	add to 600ml	dH ₂ O
Lyse Puffer	500 mM	Tris pH 8,0
	0,001 M	EDTA
	1 %	SDS
	0,1 mM	NaCl
	20mg/ml	Proteinase K (25µl/500 µl lyse Puffer)
Master Mix	6,25µl	Proben Puffer
	2,5µl	Reducing Agent
	20 µl- Probe in µl) (20 µg	Lysis Puffer
	20 µg in µl	Probenmaterial
PFA 8%; Apotheke Rdl	80g	PFA
	55g	PBS Pulver Biochrom L
	add to 1000ml	dH ₂ O
	pH 7,4	Natronlauge

Tabelle 4: Reagenzien Kits

Kits	Hersteller
<i>LightCycler® 480 Proben Master</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>RNeasy Plus Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Skalpell (steril, zum Einmalgebrauch)	Feather, Osaka (Japan)
Spritzen filter (25mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Deckgläser	Menzel Thermo Scientific, Braunschweig

<i>Dako Pen</i>	Dako Denmark, Glostrup (Denmark)
Einbettungs Kassetten	Carl Roth, Karlsruhe
Mikrotom Klingen Leica 819	Leica, Nussloch
Paraffin Histosec Pastillen, ohne DMSO	Merck, Darmstadt
<i>Securline markerII/superfrost</i>	Aspen surgical, Caledonia MI (USA)
<i>Superfrost® Ultra Plus Slides</i>	Menzel Thermo Scientific, Braunschweig
<i>96-well PCR microplate</i>	Starlab, Hamburg
<i>LightCycler 480 sealing foil</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array</i>	Affymetrix, Santa Clara CA (USA)
Pipettenspitzen	Brand, Essex CT (USA)
Falcon™ Röhrchen (15ml, 50ml)	BD, Heidelberg
Micro-Fine 1 ml (U100) Insulinspritze 0,33 mm (29G) x 12,7 mm	BD, Heidelberg
Micro-Fine 0,3 ml (U100) Insulinspritze 0,30 mm (30G) x 8 mm	BD, Heidelberg
Pipetten	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
<i>Pipetboy</i>	Integra, Fernwald
Serologische Pipetten (10ml, 25ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tabelle 6: Software

Software	Provider
Computer Hardware	Medion
Computer Software	Windows 7
Ascent Software=nanodrop?	Thermo Fisher Scientific
GraphPad Prism	Graphpad Software
Excel	Microsoft
LightCycler™ 480 Software	Roche Applied Science, Mannheim
Word	Microsoft
Mendeley	Mendeley Ltd.
Mousometer für Windows 98/XP	Machart Studios
Windows Paint	Microsoft
Nanodrop 2000 software	Thermo Fisher
Axiovision software	Carl Zeiss AG

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Primärantikörper	Anw.	Wirt	Verdünn.	Hersteller	Ordernum.
Amylase (G-10)	IF	Maus	1:8000	Santa Cruz Biotech., Heidelberg, Germany	sc-46657
BrdU	IF	Ratte	1:50	Santa Cruz Biotech., Heidelberg, Germany	sc-56258

BrdU (Bu20a)	IF, IHC	Maus	1:1400	Cell Signaling Technology, NEB, Frankfurt/Main, Germany	5292
Ck19 / Troma III	IF	Ratte	1:150	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA)	TROMA-III
PDX1	IF	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK	ab47267
SMA-alpha	IF	Maus	1:1000	Dako, Hamburg, Germany	M0851
Sox9	IF	Kaninchen	1:2500	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	AB5535
Vimentin	IF	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, UK	92547

Tabelle 8: Fluoreszenzantikörper und -Farbstoffe

Fuoreszenzantikörper	Verdünnung	Exzitation	Emission	Hersteller	Ordernummer
Chicken anti rabbit IgG	1:200	488	519 grün	Alexa fluor, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	A21441
Goat anti rat IgG 594	1:200	590	617 rot	Alexa fluor, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	A11007
Goat anti mouse IgG 488	1:200	488	520 grün	Dako, Hamburg, Germany	
Fluoreszenzfarbstoff					
DAPI	1:15000	358	461 blau	Dako, Hamburg, Germany	

Tabelle 9: IHC sekundärer Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Amersham ECL Anti-mouse IgG HRP - linked whole Ab	ready to use	GE Healthcare, Freiburg, Germany

3 Methoden

Planung von Experimenten: Dr. Phd. Bo Kong, PD Dr. Christoph Michalski, Prof. Dr. Jörg Kleeff, Nora Behler, Sina Fritzsche, Nataliya Valkovskaya

Mauszucht: Nadja Maeritz, Manja Thorwirth, Janina Schäffer, Irina Fuchs

Tierbehandlung, Organentnahme: Nora Behler, Sina Fritzsche, Nataliya Valkovskaya, Chenjia Tao, Nadja Maeritz

Genotypkontrolle: Irina Fuchs

Färbungen und Quantifizierung/Auswertung:

HE: Nora Behler, Sina Fritzsche, AG Prof. Dr. Esposito

IF: Nora Behler

IHC: Nora Behler

RNA-Isolation und Qualitätskontrolle:

Isolation und Qualitätskontrolle: WT: Nora Behler, Sina Fritzsche, Nataliya Valkovskaya

Isolation und Qualitätskontrolle: Kras: Nora Behler

Array: Wt+Kras: Helmholtzzentrum: AG Prof. Dr. Martin Irmeler, Dr. Philip Bruns

Bioinformatische Analyse: Dr. Philip Bruns

3.1 Experimenteller Aufbau

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass sich die Regeneration nach inflammatorischem Insult in Wild Typ Mäusen innerhalb von 7 Tagen vollzieht (Carrière et al., 2009; Jensen et al., 2005). In Mäusen, die onkogenes *Kras*^{G12D} tragen, vollzieht sich in diesem Zeitraum die frühe Karzinogenese. Daher muss der frühe Zeitraum der Reaktion auf Inflammation kleinschrittig aufgeteilt werden, um den genauen Prozess der Regeneration nachvollziehen zu können. So wurden für WT Mäuse Studien zu den Zeitpunkten 3h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h, Tag 5, 6, 7, 14 und Kontrollen angestellt. Für *Kras*^{G12D} Mäuse wurden die Zeitpunkte 3h, 12h, 24h, 36h, 60h, 84h, Tag 7, 14 und Kontrollen betrachtet. Pro Zeitpunkt wurden jeweils mindestens drei Versuchstiere betrachtet. WT und *Kras*^{G12D} Mäuse wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen je achtmal in stündlichem Abstand mit Caerulein behandelt. Der Zeitpunkt der letzten Caerulein Administration wurde als Stunde 0 und Tag 0 des Experiments

festgelegt. In den festgelegten Abständen (s.o.) zu diesem Zeitpunkt wurden jeweils Organe für die Experimente entnommen und der histologischen und transkriptionellen Analyse zugeführt. Abbildung 5 zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

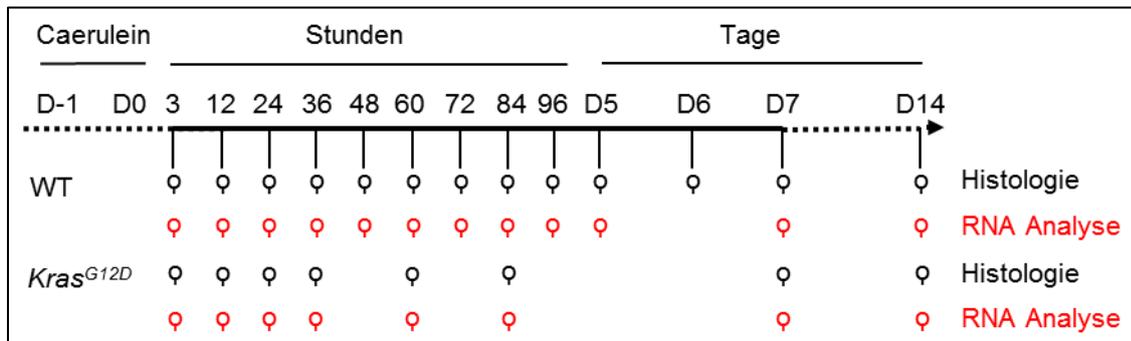


Abbildung 5: Versuchsaufbau

3.2 Mausgenotypen

P48Cre/+;Kras^{G12D} Mäuse mit einem C57BL/6J Hintergrund wurden, in den Mauszuchträumen des Klinikums Rechts der Isar, München in der Arbeitsgruppe unter Herrn Prof. Roland M. Schmidt und JTS (Abteilung Gastroenterologie, Klinikum Rechts der Isar, TU München), durch Kreuzung einer Mauslinie, die das Loxp-STOP-Loxp- *Kras*^{G12D} (LSL-*Kras*^{G12D}; 008179) Gen enthält mit Mäusen, die Genträger der pankreasspezifischen Cre-Rekombinase *Ptf1a*^{Cre/+} (auch *p48*^{Cre/+}) sind, erzeugt. Diese Tiere tragen das *Kras* Gen unter dem Promotor von *Ptf1a*. Die Konjugation mit *Ptf1a*^{Cre/+} aktiviert die Expression von onkogenem *Kras*^{G12D} in fast allen Azini und einem kleinen Anteil von endokrinen und Gangzellen (Heiser et al., 2008). Verpaarung und Aufzucht der Mäuse wurde in den Mauszuchträumen des Klinikums Rechts der Isar durchgeführt. Vor Caeruleinbehandlung wurde bei diesen Tieren eine erste Genotypisierung durchgeführt mit Gewebe aus dem Ohr, die nach demselben Protokoll verlief, wie unter Absatz 3.3.5 beschrieben. Nur ordnungsgemäß transgene Tiere, die den für die weiteren Untersuchungen "richtigen" *P48Cre/+;Kras*^{G12D} Genotyp trugen, wurden für den Fortgang der Experimente vorgesehen. Wildtypmäuse (WT; C57BL/6J) wurden bei Charles River Laboratorien (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Die Tiere wurden zur Eingewöhnung in den Laborräumlichkeiten einen Tag vor Behandlungsbeginn eingesetzt.

3.3 Behandlung

3.3.1 Caerulein

Die Mäuse wurden nach einem bereits etablierten Protokoll mit dem Hormon Caerulein behandelt (Jensen et al., 2005). Tiere im Alter von 8 Wochen (WT) und 8 bis maximal 9 Wochen (*Kras*^{G12D}), bei einem durchschnittlichen Gewicht von 19,1±2,1 g bei WT und 21,5±3,3 g bei *Kras*^{G12D} wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 8 Mal, jeweils im Abstand von 1

h mit einer i.p. Injektion von 2 µg Caerulein in 100 µl 0,9% NaCl-Lösung behandelt. Hierbei wurden die Behandlungen an beiden Tagen zur jeweils selben Uhrzeit begonnen (Abbildung 5). Kontrolltiere wurden nach demselben Protokoll an 2 Tagen mit jeweils 8 i.p. Injektionen von 100 µl NaCl behandelt und eine Stunde nach der letzten Behandlung getötet.

3.3.2 Temgesic

Um Pankreatitis induzierte Schmerzen und die daraus folgende Stressreaktion bei den Versuchstieren zu vermindern, wurde jeweils einmalig an beiden Tagen der Caeruleininjektion im Vorfeld der ersten Injektion ein s.c. Bolus von Temgesic (1 mg/kg KG Buprenorphin) appliziert. Diese Vorgehensweise wurde ebenso für alle Kontrolltiere angewandt.

3.3.3 BrdU

Unter dem Vorhaben der exakten Quantifizierung von proliferierenden Zellen wurde allen Tieren 2 h vor dem Gewinn der Organe eine einmalige Dosis von 2,5 mg (100 µl BrdU-Lösung enthält 25 mg/ml) BrdU in 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung i.p. verabreicht. BrdU fungiert bei der Zellteilung als Thymidinanalogon und wird bei der DNA-Replikation an der Stelle von Thymidin in den entstehenden Strang eingebaut. Es markiert spezifisch Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Injektion in der S-Phase der Zellteilung befinden und erlaubt so die Identifikation dieser Zellen in der Färbung.

3.3.4 Organgewinnung

Zur Gewinnung der Organe wurden die Tiere zunächst mit Hilfe von Isofluran per inhalationem betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Durch einen queren Bauchschnitt wurde das Peritoneum eröffnet und Milz sowie Pankreas en bloc entnommen. Der Pankreas wurde nach Entnahme zerteilt und sowohl zur Bewertung der Histologie als auch zur RNA Analyse verwendet. Bei *Kras^{G12D}* Mäusen wurde zur späteren Kontrolle des Genotyps ein Stück Schwanz entfernt und in flüssigem N₂ eingefroren.

3.3.5 Genotypisierung

Zur Überprüfung der Einbringung von *Kras^{G12D}* sowie *Ptf1a^{Cre/+}* in die Mäusen wurde, nach Entnahme der Organe, vor der weiteren Analyse eine erneute Genotypisierung durchgeführt. Hierzu wurde aus den Schwanzspitzen der *Kras^{G12D}* Mäuse genomische DNA gewonnen.

3.3.5.1 Gewinnung genomischer DNA

Zur Gewinnung von genomischer DNA werden die entnommenen Schwanzspitzen lysiert und DNA isoliert.

In je 500 µl Tail-Lysis-Puffer wurden die Schwanzspitzen bei 55°C und 650rpm über Nacht im Thermoschüttler geschüttelt. Die DNA wurde im Puffer gelöst und die Zellüberreste durch 10 Minuten Zentrifugieren abgesetzt. Im Anschluss wurde die DNA durch Zugabe von Isopropanol

ausgefällt, durch Zentrifugieren isoliert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das gewaschene Pellet bei 37°C luftgetrocknet. Zur Elution der DNA wurde H₂O_{dest} verwendet und bei 55°C für 15 min inkubiert.

3.3.5.2 Vervielfältigung genomischer DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion dient der Vervielfältigung spezifischer bekannter DNA Sequenzen zur Feststellung des Vorhandenseins einer bekannten Gensequenz in einer Probe. Hierbei wird die Probe in mehreren wiederholten Zyklen mit den zur *in vitro*-Replikation nötigen Enzymen, DNA Bausteinen (Basen) und Primer inkubiert. Es werden folgende Schritte im Einzelnen wiederholt: Trennung der beiden DNA-Stränge durch Hitzedenaturierung; Hybridisierung von zugegebenen Primer-Basen-Oligomeren an den Matrizenstrang; Synthese des komplementären Stranges, initiiert durch Primerbindung. Hierdurch kann der gefragte DNA-Abschnitt in mehreren Zyklen exponentiell amplifiziert werden.

Der Mastermix für die PCR Amplifikation wurde wie folgt angesetzt:

Master Mix	Für eine Probe
Taq Mix	12,5µl
Millipore Wasser	10,5 µl
Primer (sense + antisense)	1 µl
gDNA bzw. H ₂ O	1 µl (Zugabe erst später)
Gesamt	25 µl

Die Synthesereaktion wurde mittels Standardprotokoll wie folgt durchgeführt:

Initiale Denaturierung	1min	95°C
Amplifikation 40 Zyklen	30 sec (Denaturierung)	95°C
	30 sec (Hybridisierung)	58°C
	1 min (Elongation)	72°C
Finale Elongation	10 min	72°C

Nach Beendigung der PCR Reaktion wurde die gewonnene DNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Biopsien von transgenen Mäusen zeigen im Gellauf zwei Banden, während Wild Typ Proben eine bilden.

3.3.5.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erlaubt DNA Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufzutrennen. Das Agarosegel bestand in unserem Fall aus 1% Agarose mit 1xTBE Laufpuffer und 5µl Ethidiumbromid. Neben negativ und positiv Kontrollen für die gesuchten DNA Abschnitte (*Kras*^{G12D} bzw. *Ptf1a*^{Cre/+}) und einer DNA Leiter, um die Bandengröße zu detektieren wurde die DNA (Ladepuffer bei diesem Protokoll schon im Mastermix enthalten) in das Gel eingebracht und für 30 min bei einer Spannung von 50-100V aufgetrennt. Große Fragmente wandern langsamer im Gel als kleine Fragmente. bei unterschiedlicher Länge des transgenen (TG) und WT-DNA-Fragments ist so eine Unterscheidung zwischen erfolgter Mutation und WT möglich.

Tabelle 10: erwartete DNA-Fragmentlängen, *Kras* und *Ptf1a*

	WT	TG
<i>Kras</i>	272 bp	192bp
<i>Ptf1a</i>	324 bp	1115 bp

Abschließend wurde das Gel unter UV Transillumination auf Vorhandensein des gewünschten Genotyps untersucht. (Vgl. Abbildung 6).

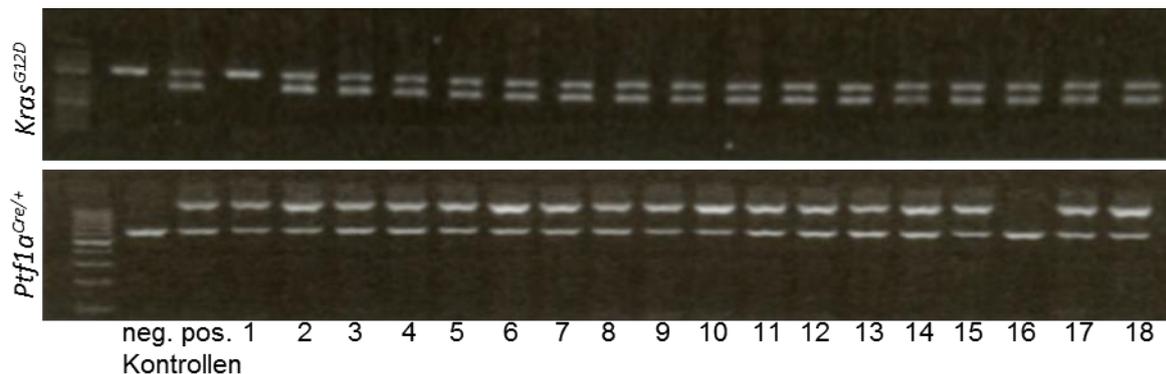


Abbildung 6: Ergebnis der Gelelektrophorese zur Kontrolle des Genotyps von links: DNA-Leiter, negativ Kontrolle (keine heterogene Mutation des gesuchten Genlokus), positiv Kontrolle (heterogene Mutation des gesuchten Genlokus) Nummer 1-18: Tier-Proben. Tier 1 ist negativ für *Kras*^{G12D}Mutation, Tier 16 ist negativ für *Ptf1a*^{Cre/+}Mutation, alle weiteren tragen an beiden Loci die gewünschten heterogenen Mutationen.

3.4 Transkriptionsanalyse

Die Transkriptionslevel wurden im WT zu 13 Zeitpunkten und in *Kras*^{G12D} Mäusen zu 9 Zeitpunkten nach Caeruleingabe bestimmt. Für jeden Zeitpunkt wurden drei Versuchstiere untersucht. Siehe Abbildung 5: Versuchsaufbau

3.4.1 RNA isolation

Ein Stück Pankreas von ca. 2 mm³ angrenzend an die Milz wurde sofort nach Entnahme in 350 µl einer Lösung von 50 µl β-Mercaptopurinol in 1ml RLT Puffer überführt, in den *Tissue Lyser* gegeben. Hier wird das Gewebe innerhalb von 3 Minuten mechanisch durch eine

beigegebene Metallkugel zerschlagen und ein zellfreier Extrakt hergestellt. Die RNA-Isolierung wurde nach Vorgaben des RNeasy-Kits von Quiagen unter strengen Zeit- und Hygienevorgaben durchgeführt. Unmittelbar nach dem RNA-Elutionsschritt in 30 µl H₂O wurde die gewonnene RNA im Verhältnis 2:1 geteilt. Die Hauptfraktion von 20 µl der Probe wurde zur späteren Verwendung im RNA-Array sofort in flüssigem N₂ schockgefroren und im Anschluss auf -80°C gelagert. Mit weiteren 10 µl wurde unmittelbar eine Qualitätskontrolle vorgenommen.

3.4.2 Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle der RNA vor der Auswertung im RNA Array umfasst drei Schritte, von denen zunächst zwei an der kleineren Testfraktion im lokalen Labor vorgenommen wurden.

Zunächst wurde eine Spektrophotometrische Untersuchung der RNA durchgeführt. Hierbei wird die Absorption der in H₂O eluierten RNA gemessen. Betrachtet wurde die Konzentration der RNA in der Probe sowie die Reinheit der RNA über den 260/280 Absorptionswert. Dies dient der Feststellung, inwiefern die RNA bereits degeneriert ist und ob sich Verunreinigungen in der Probe finden. Hierbei diente das H₂O, das zur Elution der RNA verwendet wurde als Kalibrierflüssigkeit. Proben galten bei dieser Methode als verwertbar, wenn die Konzentration der RNA über 100 ng/µl lag und der 260/280 Wert im Bereich über 2,0 lag.

Der zweite Schritt der Qualitätskontrolle erfolgte mittels Gelelektrophorese. Hierbei wandern kurze Fragmente in gleicher Zeit weiter als lange Fragmente. Als Hauptmasse der isolierten RNA stellen die 28S und die 18S Einheit der ribosomalen RNA bei geringem Zersetzungsgrad und somit hoher Qualität der RNA zwei gut demarkierte Banden im Gel dar (Vgl.: Abbildung 7). Nur wenn beide Banden abgrenzbar waren, wurde die RNA zur weiteren Analyse zugelassen. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde, entsprechend der zuvor mit der Nanodrop-Technologie gemessenen Konzentration der RNA in der Probe, 1-10 µl RNA dem Auftragspuffer beigemischt und für 10 min auf 60°C inkubiert.

Auftragspuffer:	Agarosegel:
2 µl H ₂ O	100 ml TBE
4 µl Formamid	0,8 g Agarose
2 µl 6 x Loadingdye	<u>1 ml Formalinaldehyd</u> < Kochen
1-10 µl RNA	3,5 µl Ethidiumbromid beimischen

Anschließend wurde sie in 0,8 % Agarosegel mit Etidiumbromid eingebracht und bei 150 V aufgetrennt. Visualisierung der RNA im Gel wurde erreicht durch UV-Durchleuchtung.

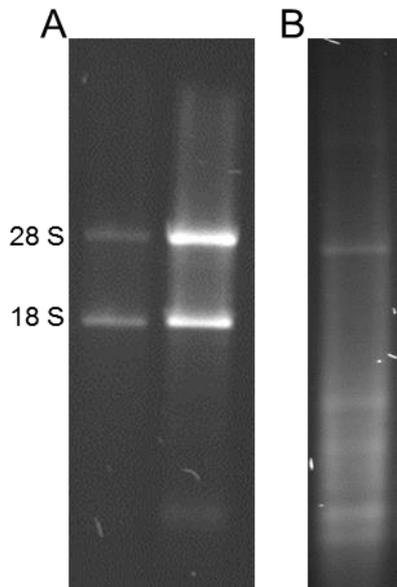


Abbildung 7: RNA Gel-Elektrophorese, (A) sichtbar sind die 28S und die 18S Untereinheit der Ribosomen; (B) degenerierte RNA

3.4.3 Transport

Der Transport der Hauptfraktion in die Labors des Helmholtzzentrums erfolgte unter Kühlung der RNA-Proben auf Trockeneis. Am Bestimmungsort wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung auf -80°C gekühlt.

Der dritte Schritt der Qualitätskontrolle vor der Untersuchung im RNA-Array wurde im Anschluss an den Transport in die Laboratorien des Helmholtzzentrums durchgeführt.

3.4.4 RNA-Arrays und Computeranalyse

Eine ausführliche Beschreibung der Bioinformatischen Methoden findet sich in der Arbeit von P. Bruns (Bruns, 2016).

Der RNA-Array ist eine Technik die die quantitative Analyse der Genexpression des gesamten Transkriptoms erlaubt. Hierbei werden auf einen kleinen Chip mehrere Tausend Gensonden aufgebracht die für bekannte Exons in bestimmten Gensätzen (z.B. Maus) stehen. Durch Zufügen der Probe und eines Fluoreszenzfarbstoffes kann die Intensität des Signals pro Sonde festgestellt und so die Genexpression quantifiziert werden.

Für die Analyse wurden Microarrays vom Typ Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST verwendet. Die im *Affy* Paket enthaltene Software RMA aus dem Programm Bioconductor/R wurde zur Normalisierung der erhaltenen Daten verwendet (Gautier et al., 2004; Ihaka and Gentleman, 1996). Gene ohne signifikante Expressionsschwankung wurden mit der nsFilter Funktion durch vorgegebene Parametrisierung erkannt und verworfen (Gentleman et al.,

2017). Der durch Filterung erhaltene Genpool mit differenzieller Expression wurde für die weiteren Analysen verwendet.

Diejenigen 50% der gefundenen differentiell exprimierten Gene, die die höchste Varianz in allen untersuchten Proben aufwiesen, wurden für die *Principal Component Analyse* (PCA) verwendet. Die PCA kann zur Analyse und visuellen Darstellung des Ablaufes der Regeneration in einem Genotyp auf Ebene der Genexpression benutzt werden. Hierbei erscheint der Messpunkt für das Transkriptionsmuster eines Versuchstiers jeweils an einer korrespondierenden Position eines zweidimensionalen Koordinatensystems, in dem jede mögliche Position für eine Ausprägung des Genexpressionsmusters steht. Benachbarte Punkte zeigen eine Ähnlichkeit im Expressionsmuster an.

Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden untersuchten Genotypen wurde zusätzlich eine PARAFAC Analyse (canonical polyacidic decomposition) des gesamten erhaltenen Datensatzes durchgeführt. Hierzu wurde die Anwendung PTAK, enthalten im R Softwarepaket, eingesetzt (Leibovici and Sabatier, 1998), wobei Zeitpunkte die nur im Wildtyp untersucht worden waren außer Acht gelassen wurden. PARAFAC ist eine Methode die die Dekomposition der Tensoren in einzelne Werte erlaubt und eine lineare Aufzeichnung der Proben ergibt. Bei Darstellung im gleichen Koordinatensystem, bzw. mit gleicher Achsskalierung ermöglicht die PARAFAC-Analyse den direkten Vergleich der Antwort beider Genotypen.

3.5 Färbungen

Entnommene Organe wurden für die Histologie in 4% PFA in PBS für mindestens 12 h, maximal 24 h fixiert und im Anschluss mit dem Leica *Vacuum Tissue Processor* vorbereitet (Protokoll siehe Tabelle 11: Protokoll zur Gewebeentwässerung) und mithilfe der Leica Einbettungsstation in Paraffin gebettet. Es wurden Schnitte von jeweils 3,5 µm Dicke angefertigt, nach Überführung in ein Wasserwärmebecken zur Glättung auf *Glasslides* aufgebracht und bei 37°C über Nacht fixiert.

Tabelle 11: Protokoll zur Gewebeentwässerung

Reagent	Time (h)
Ethanol 70%	0,45
Ethanol 80%	0,45
Ethanol 96%	1,00
Ethanol 96%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Xylene	0,45
Xylene	1,00

Xylene	1,15
Paraffin Wachs	1,00
Paraffin Wachs	1,00
Paraffin Wachs	1,00

3.5.1 H&E

Die H&E Färbung dient der histologischen Begutachtung des Gewebes. Hierbei erscheinen Zellkerne blau und Zytoplasma sowie Zellmembranen rosa. Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

Tabelle 12: Vorgehensweise für die H&E Färbung

1	Deparaffinierung	Roticlear	3x10 min
2	Rehydrierung	Ethanol 100% Ethanol 96% Ethanol 70% Ethanol 50%	3x2 min 2 min 2 min 2 min
3	Waschen	H ₂ O _{dest}	2 min
4	1. Färbeschritt	Hämatoxylin	40 sek
5	Waschen	H ₂ O laufend	15 min
6	2. Färbeschritt	Eosin Y	4-10 sek
7	Waschen	H ₂ O _{dest}	einige Male schwenken
8	Dehydrierung	Ethanol 70% Ethanol 96% Ethanol 100% Roticlear	30 sek 1 min 3x2 min 3x5 min
9	Fixierung	Vectramount Mountingmedium	

3.5.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient der Sichtbarmachung von Proteinen mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen das untersuchte Protein. Hierbei wird der an das Protein gebundene Antikörper (Primärantikörper) mit einem weiteren Antikörper (Sekundärantikörper), der spezifisch auf die Fc-Region des Primärantikörpers reagiert, konjugiert. An den Sekundärantikörper ist eine Peroxidase gebunden, die in Verbindung mit dem im Anschluss hinzugefügten Wasserstoffperoxid gebundenen Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) einen Enzym-Substratkomplex bildet. Es wird hierdurch an der Stelle, wo Primärantikörper an das Gewebe gebunden ist, das Chromogen DAB durch Oxidation in einen braunen Farbstoff umgewandelt. Dieser ist lichtmikroskopisch sichtbar. Mit Hämatoxylin werden zusätzlich die

Zellkerne gegengefärbt. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen finden sich in Abschnitt 2, Tabelle 7 und Tabelle 9

Immunhistochemiefärbungen wurden nach Standardprotokoll durchgeführt, wobei folgende Schritte Anwendung fanden:

Tabelle 13: Vorgehensweise für die Immunhistochemie

1	Deparaffinierung	Roticlear	3x10 min
2	Rehydrierung	Ethanol 100% Ethanol 96% Ethanol 70% Ethanol 50%	3x2 min 2 min 2 min 2 min
3	Waschen	PBS	5 min schütteln
4	Antigendemaskierung	Citratpuffer	15 min (600 W Mikrowelle)
5	Abkühlen	20°C	60 min
6	Waschen	TBS+ 0,1% BSA	2x5 min schütteln
7	Umrandung der Gewebeschnitte	Pap-Pen	
8	Endogene Peroxidase Inaktivierung und Permeabilisierung	Methanol+ 3% H ₂ O ₂	10 min
9	Waschen	TBS+ 0,1% BSA	3x5 min schütteln
10	Blocken	TBS+ 3% BSA	60 min
11	Primärantikörper	Entsprechend verdünnt in TBS+ 3% BSA	Über Nacht bei 4°C
12	Waschen	TBS+ 0,1% BSA	3x5 min
13	Sekundärantikörper	20°C	60 min
14	Waschen	TBS+ 0,1% BSA	3x10 min
15	DAB-Chromogen Reaktion	Unter mikroskopischer Kontrolle und stoppen in H ₂ O	
16	Hämatoxylin		15 sek
17	Waschen	H ₂ O laufend	15 min
18	Dehydrierung	Ethanol 70% Ethanol 96% Ethanol 100% Roticlear	3 min 3 min 3x3 min 3x5 min

19	Fixierung	Vectramount Mountingmedium	
----	-----------	-------------------------------	--

3.5.3 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung funktioniert ähnlich wie die Immunhistochemie mit der Antigen-Antikörper-Reaktion und macht ebenso die spezifisch untersuchten Proteine, hier mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie, sichtbar. Hierbei ist an den Sekundäantikörper bereits ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) gebunden, der bei Anregung mit kurzwelligem Licht sichtbar fluoresziert. Der Nachteil dieser Technik ist die verminderte Sichtbarkeit der umgebenden histologischen Begebenheiten, da nur fluoreszierende Bereiche sichtbar werden. Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit der guten farblichen Unterscheidung von mehreren gleichzeitigen Färbungen unterschiedlicher Antigene mit der Möglichkeit festzustellen, ob die untersuchten Proteine örtlich simultan exprimiert sind. Im Anschluss werden die Nuklei mit dem Chromatinmarker DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindol) gegengefärbt. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen finden sich in Abschnitt 2, Tabelle 7 und Tabelle 8

Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach Standardprotokoll mit folgenden Schritten durchgeführt:

Tabelle 14: Vorgehensweise für die Immunfluoreszenz

1	Deparaffinierung	Roticlear	3x10 min
2	Rehydrierung	Ethanol 100% Ethanol 96% Ethanol 70% Ethanol 50%	3x5 min 8 min 2 min 2 min
3	Waschen	H ₂ O _{dest}	2x5 min schütteln
4	Antigendemaskierung	Citratpuffer	15 min (600 W Mikrowelle)
5	Abkühlen	20°C	30 min
6	Waschen	H ₂ O _{dest} PBS	2x5 min schütteln 5 min schütteln
7	Umrandung der Gewebeschnitte	Pap-Pen	
8	Blocken	PBS+ 3% BSA+ 0,3% Triton X 100 (Blocklösung)	60 min
9	Primäantikörper	Verdünnt in Blocklösung	Über Nacht bei 4°C
10	Waschen	TBS+ 0,05% Tween 20	3x5 min schütteln

	Ab diesem Punkt im dunklen arbeiten		
11	Sekundärantikörper	Verdünnt in Blocklösung	60 min bei 20°C
12	Waschen	TBS	3x5 min schütteln
13	Gegenfärbung mit DAPI		3 min
14	Waschen	TBS	2 min schütteln
15	Fixierung	Alexafluor Mountingmedium	

3.5.4 Mikroskopie

Von jedem Individuum wurden Schnitte angefertigt, die repräsentative Teile des entnommenen Pankreasgewebes und keine Randbezirke des Organs darstellten. Zur Quantifizierung wurden je fünf Bilder in der Vergrößerungsstufe 200x pro Individuum angefertigt. Die jeweiligen Bildausschnitte wurden zufällig aus dem Gesamtgewebe gewählt, wobei darauf geachtet wurde, alle Quadranten des Gewebes darzustellen.

Aufgrund von Neuerungen in der Mikroskopietechnik im Laufe der Arbeit zeigen sowohl die Amylase, als auch die Sox9 Färbung eine geringere Fläche (354,8µm x 262,7µm) an Pankreasgewebe als die weiteren IF Färbungen (697,2µm x 522,3µm). Diese Differenz muss bei der Auswertung und dem Vergleich der jeweiligen Zellanzahlen beachtet werden. Bilder der Amylase und Sox9 Reihen wurden aufgenommen mit einem Axioskop 40 von Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland. Die *Axiovision* Software diente der Bildaufnahme sowie der digitalen Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzkanäle. Bilder der restlichen IF Reihen sowie HE Bilder wurden mit dem Mikroskop Axio Imager M2, und wiederum der *Axiovision* Software bearbeitet. IHC Bilder zur Ermittlung der Proliferation in *Kras^{G12D}* Mäusen wurden ebenso mit dem letzteren Mikroskop und somit vergrößertem Bildausschnitt aufgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit mit Daten, die Proliferation bei Regeneration nach Pankreatitis in WT Mäusen betreffend, wurden diese im Nachhinein mithilfe von *Microsoft Paint* auf die geringere Größe zurechtgeschnitten. Dies hat zur Folge dass die kleinen Bilder im Durchschnitt 400 Zellen zeigen, während man in den großen Bildern im Durchschnitt von 1600 Zellen pro Gesichtsfeld ausgehen kann. Dies hat zur Folge, dass wir für die kleinen Bilder aufgrund der deutlich geringeren Stichprobe von einem größeren Fehler in der Auswertung ausgehen müssen.

3.5.5 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Anzahl für den jeweiligen Marker positiver Zellen wurden histologische Aufnahmen in *Microsoft Paint* aufgerufen. Jede als positiv gewertete Zelle wurde mit einem farbigen Punkt markiert. Hierbei entsprach jede Markierung einem einzelnen Mausklick. Die getätigten Mausklicks wurden maschinell mit Hilfe eines *Freeware* Computerprogramms, dem

*Mousometer*¹,gezählt. Die jeweils zusätzlich zu den Zell-Markierungen getätigten Mausklicks wurden im Nachhinein von dem Ergebnis des Mousometers abgezogen. Alle Bilder der gleichen Färbungsreihe wurden im selben Durchgang quantifiziert, um personen- und tagesabhängige Schwankungen in der Auswertung zu minimieren.

Quantifizierung der verschiedenen Färbungen:

Die Färbung für Amylase reagiert sehr spezifisch und sensibel. Dennoch sind Zellkerne die zu Amylase-positiven Zellen gehören nicht immer eindeutig von Zellkernen umgebender Zellen zu unterscheiden, da Amylase positive Zellen relativ groß sind und in der IF keine gut sichtbare Abgrenzung zu umgebenden Nachbarzellen zeigen. Aus diesem Grund wurden nur solche Zellkerne als Amylase positiv gewertet, die von mindestens drei Seiten eine stark Amylase positive Umrandung zeigten. Aus der Wertung ausgeschlossen wurden BrdU-positive Kerne, die nur vor einem Amylase-positiven Schatten standen sowie Zellkerne die am äußeren Rand einer Amylase-positiven Zelle saßen. Dies geschah in der Annahme, dass sich Zellkerne in Azinuszellen typischerweise zwar randständig aber eindeutig intrazellulär befinden und dass die Wertung von deutlich membran-ständigen BrdU-positiven Kernen als Amylase-positiv, eine fälschliche Wertung von in Wirklichkeit Amylase-negativen Zellen zur Folge hätte.

Als Vimentin positiv wurden Zellen dann gewertet, wenn der BrdU markierte Zellkern eng und spezifisch von Vimentin positiver Membran umgeben war (Vgl. Abbildung 15). Ebenso verhielt es sich mit CK19-positiven, BrdU-positiven Zellen (Vgl. Abbildung 13).

Die Sox9 Färbung wurde als positiv gewertet, wenn der Nukleus der Zelle sich deutlich positiv vom Hintergrund und von der Färbung von Zellkernen abhob, die als negativ zu werten sind, wie in diesem Fall die Zellkerne Langerhans'scher Inseln (Vgl. Abbildung 26, Abbildung 38). Die Pdx1 Färbung wurde als positiv gewertet, wenn der Nukleus der Zelle sich deutlich positiv vom Hintergrund abhob und bei Anwesenheit von Pdx1 positiven Zellen in Langerhans'schen Inseln kein, im Vergleich mit letzteren, deutlich verringertes Ansprechen auf die Färbung aufwies (Vgl. Abbildung 23, Abbildung 35).

3.6 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) oder IBM SPSS 19 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, NY, USA) verwendet. Der Chi-Quadrat Test oder Fisher exakt Test wurden verwendet, um die Verteilung von kategorischen Faktoren verschiedener Gruppen zu vergleichen. Alle Experimente wurden zumindest drei Mal wiederholt. Der T-Test wurde für den Vergleich von Gruppen verwendet.

¹ Mousometer: <http://www.mousometer.de/download/> Version für Windows 98/XP, © 2012 Sven Bader - Alle Rechte vorbehalten, Zugriffsdatum 07.06.2013

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung.

4 Ergebnisse

Teile dieses Abschnitts (Unterabschnitte 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.6 und 0) einschließlich Abbildungen und Graphen wurden adaptiert aus Kong, Bruns, Behler et al., 2016 (Bo Kong et al., 2016). Bioinformatische Analysen wurden durch Dr. P. Bruns durchgeführt. IHC sowie H&E Färbungen im Wildtyp wurden durch S. Fritzsche durchgeführt. Genaue Aufgliederung von Kontributionen siehe Abschnitt 0.

4.1 Histologische Analyse der frühen Karzinogenese

4.1.1 *Kras*^{G12D}

Analysiert wurden H&E-Färbungen von Pankreata *Kras*^{G12D} mutierter Tiere aus dem Zeitraum zwischen 3h und 14 Tagen nach Caeruleininjektion sowie von Kontroll-Tieren. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind zu vergleichen mit Ergebnissen der Regeneration in WT-Tieren (Bo Kong et al., 2016), in Abbildung 8 sind zudem die WT Ergebnisse zur vergleichenden Ansicht dargestellt.

Bei 8 Wochen alten *Kras*^{G12D} Kontrolltieren zeigten sich unterschiedliche Bezirke im Pankreasgewebe. Vorherrschend war ein, dem Wild Typ vergleichbares, normales Organmuster mit deutlich prädominanten Azinuszellen, vereinzelt Pankreasgängen und morphologisch normalen Langerhans'schen Inseln. Im Unterschied zu WT Mäusen zeigte sich jedoch bereits fokal eine Vakuolisierung von Azinuszellen, sowie vereinzelt Metaplasien von azinären zu duktalem Strukturen (ADM) (Vgl.: Abbildung 8 B).

Drei Stunden nach Caerulein-Behandlung fand sich durchgehend eine Vakuolisierung von Azinuszellen, sowie erweiterte bis zystische Pankreasgänge (Vgl.: Abbildung 8 D). Im Verlauf von 24 Stunden zeigten sich Azini mit wachsenden Lumina, zunehmende Entzündung und Ödem sowie initiale TC (Vgl.: Abbildung 8 F). Frühestens nach 12 Stunden waren PanIN I vereinzelt zu finden. Nach 36h kam es zur vollen Manifestation von TC bei abnehmender Entzündung und beginnender Lappchen-Fibrose (Vgl.: Abbildung 8 H). Bis 84 h kam es zu einer Regeneration vereinzelter kleiner Organbereiche mit intakten Azinuszellen. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich jedoch anfängliche atypische flat lesions (AFL) bei weiterhin bestehender Fibrose (Vgl.: Abbildung 8 J,K). Nach 14 Tagen waren Lappchen mit TC, Fibrose und AFL zu finden, teilweise mit soliden AFL die sich als hochgradig karzinomverdächtig darstellten. Allgemein war die Organarchitektur jedoch erhalten bei auffällig erweiterten Pankreasgängen und nur vereinzelter azinärer Regeneration (Vgl.: Abbildung 8 O,P).

Die in im Rahmen der Vorarbeit (Bo Kong et al., 2016) auf Basis der Analysen von Sina Fritzsche durch die Autoren getätigte Einteilung der Regeneration von WT Pankreata in drei Phasen findet in *Kras^{G12D}* Mäusen keine Entsprechung. Die Regeneration hier ist inkomplett und Zonen ohne Regeneration zeigen Zeichen einer frühen Karzinogenese.

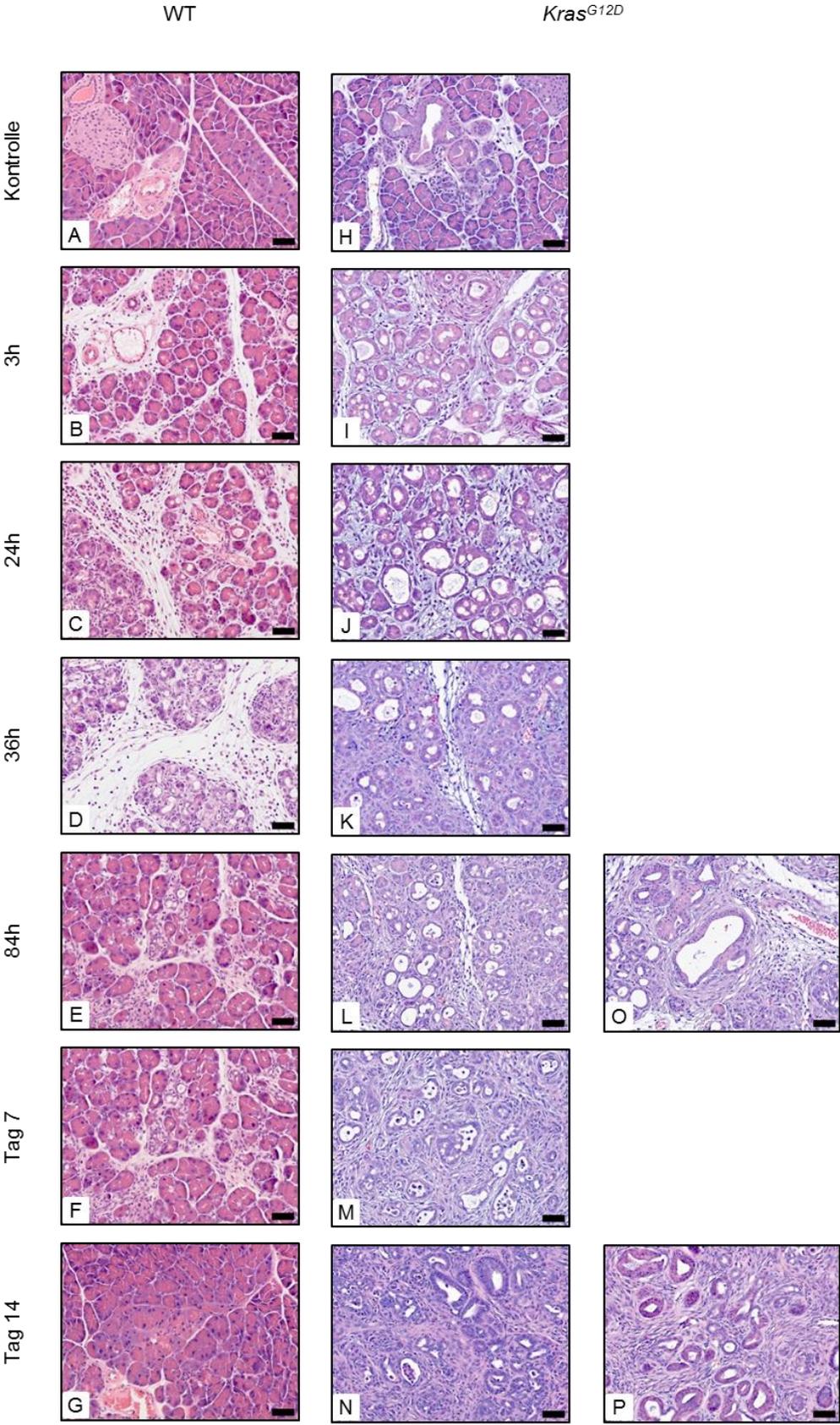


Abbildung 8: A-D, H&E Färbung von Paraffinschnitten von WT Pankreata, zwischen 3h und 36h nach Caeruleinapplikation zeigen sich vakuolisierte Azinuszellen, Apoptosen, Ödem sowie Immunzellinfiltration. Entsprechend wurde dieser Zeitraum als „*Inflammation-Phase*“ bezeichnet. (Maßstabsbalken: 50 µm). E, Die „*Regeneration-Phase*“, zwischen 48h und Tag 5, präsentiert sich mit Regeneration von azinärem Gewebe sowie Rückgang von Apoptose und Ödem F-G, Zwischen Tag 7 und Tag 14 wird das Bild im WT bestimmt vom regenerierten azinären Kompartiment, diese Zeitspanne wurde „*Refinement-Phase*“ genannt. A-G: Färbungen aus Vorarbeit durch Sina Fritzsche. H-K, H&E Färbung von Paraffinschnitten von *Kras^{G12D}* Pankreata, zwischen 3h und 36h nach Caeruleinapplikation zeigen sich vakuolisierte Azinuszellen, Apoptosen, Ödem sowie Immunzellinfiltration und anfängliche Bildung von TCs, L-P, Proben zwischen 48h und Tag 14 werden durch blockierte Regeneration mit Stabilisierung des inflammatorischen Programms und erhöhter Immunzellinfiltration charakterisiert. Zu diesen Zeitpunkten zeigt sich starke TC, ADM und AFL Bildung. Histologische Schnitte teils veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

4.2 Quantitative Analyse der Genexpression

Das bioinformatische *modeling* mittels *Principal Component Analyse* (PCA) mit denjenigen 50% der Gene mit der höchsten Varianz zwischen allen Proben (10,360 Gene), durch Dr. P. Bruns ergab, analog zu den Ergebnissen der histologischen Auswertung, dass im WT die Genexpression einem zyklischen Muster folgt. Hierbei hat jeweils ein Tier ein bestimmtes Genexpressionsmuster. Dieses Muster korrespondiert mit einer Position in einem zweidimensionalen Koordinatensystem. So wird jedem Tier nach Funktion seiner Genexpression eine Position in dem Koordinatensystem zugewiesen, wobei Tiere mit ähnlicher Genexpression sich hier näher beieinander finden, als Tiere mit unterschiedlicher Genexpression. Unbehandelte Kontrolltiere glichen, im Expressionsmuster, Tieren zum Zeitpunkt der *Refinement-Phase* und Tiere in den *Inflammation-* und *Regeneration-*Phasen unterschieden sich voneinander und den beiden anderen Gruppen. Für jede Phase wurde ein Konfidenzellipse berechnet der das Areal anzeigt in dem sich eine Probe, die zu der jeweiligen Phase gehört, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% befinden muss. Die Verbindung der Mittelpunkte der jeweiligen Konfidenzellipse ließ ein geschlossenes zyklisches Muster von Kontrolle zu *Inflammation* und über *Regeneration* zurück zu einer, der Kontrolle ähnlichen, *Refinement-Phase*, genannt „*end-to-end*“ Muster (Vgl. Abbildung 9 A) erkennen. Dies bestätigt einen zeitlich stark kontrollierten und koordinierten Ablauf der Regeneration im WT. Die Phasen, die in der histologischen Auswertung festgelegt wurden, konnten somit in den Genexpressionsmustern rekapituliert werden.

Im *Kras^{G12D}* Pankreas bestätigte die Genexpressionsanalyse ebenso die Erkenntnisse aus der histologischen Auswertung. Hier war auffällig, dass, ähnlich wie im WT, Kontrollproben untereinander eine starke Ähnlichkeit aufwiesen während Proben aus keiner anderen Phase Ähnlichkeit mit der Genexpression unbehandelter Tiere zeigten (Vgl.: Abbildung 9 B). Vielmehr wurde klar, dass die Genexpression bei Regeneration nach Caeruleingabe bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes keine Rückkehr zur Ursprungsexpression erkennen ließ. Dies kann als „*end-to-open*“ Muster bezeichnet werden. Erkennbar ist es ebenso an der Verbindung der Mittelpunkte der sich stark überlappenden Konfidenzellipse. Proben aus allen Stadien der Entzündungsantwort waren heterogen verteilt und es ließ sich keine eindeutige Aufteilung in Phasen vornehmen.

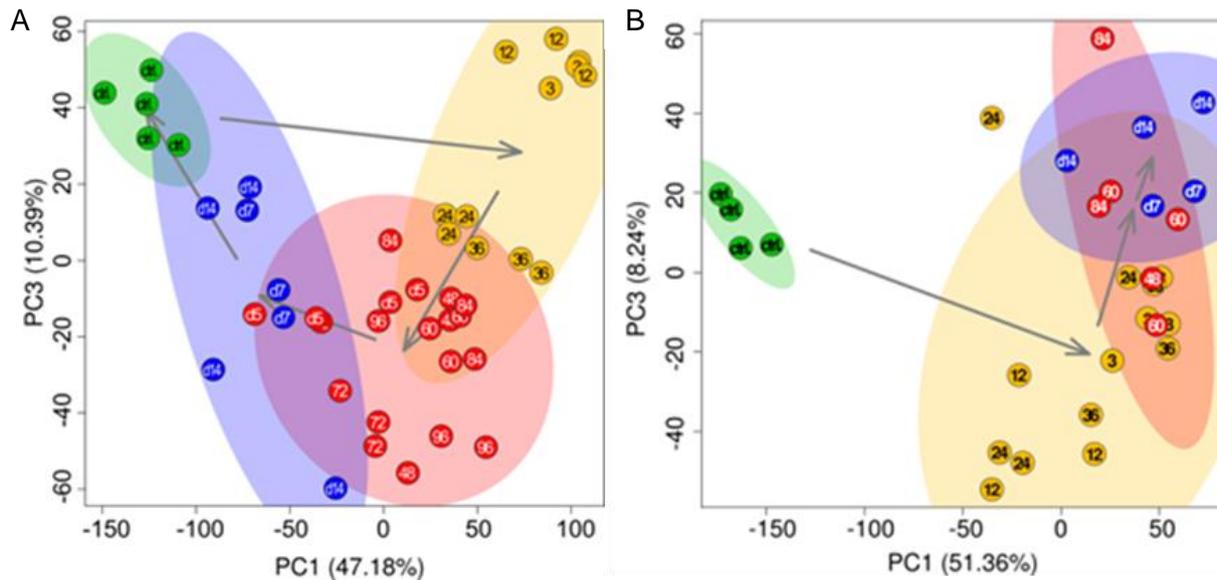


Abbildung 9: PCA der Genexpressionsmuster. Die kleinen Kreise zeigen das Genexpressionsmuster jeweils eines Individuums an, die Farben designieren die Zugehörigkeit des jeweiligen Individuums zu den vorher festgelegten Phasen der Regeneration, Grün=Kontrolle; Gelb=*Inflammation*; Rot=*Regeneration*; Blau=*Refinement*. Die Ellipsoide veranschaulichen ein 95% Konfidenzintervall, in dem Proben der jeweiligen Phase mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% lokalisiert sind. (A) WT Daten; Die Probe von Tag 14, die im Cluster der *Regeneration*-Phase lokalisiert ist wird als Ausreißer angesehen. Die Pfeile indizieren den Zeitlichen Ablauf der transkriptionellen Veränderungen und demonstrieren, dass die *Regeneration* in WT Tieren einen kreisförmigen Verlauf nimmt mit einem „end-to-end“ Muster (B) *Kras*^{G12D} Daten; Hier zeigen die Pfeile die inkomplette *Regeneration* und ein „end-to-open“ Muster. PCA-Plots veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Um den direkten Vergleich von beiden Genotypen auf Ebene der Genexpression zu ermöglichen, wurde im Anschluss eine PARAFAC Analyse verwendet. Diese Anwendung ergibt eine einheitliche lineare Transformation des Datensatzes. Zur besseren Visualisierung wurde dennoch für jeden Genotyp eine eigene Grafik mit jeweils identischer Achsen Skalierung erzeugt (Abbildung 10). Wie zuvor im PCA Plot beschrieben folgte auch hier die *Regeneration* im WT einem kontrollierten Prozess, wobei Proben aus der *Inflammation*-Phase den größten Unterschied zu Kontrollen aufwiesen und Proben aus späteren Phasen schrittweise zu Expressionsmustern ähnlich der Kontrollproben zurückkehrten (Vgl.: Abbildung 10 A).

In *Kras*^{G12D} Mäusen zeigte diese Darstellung erneut keine *Regeneration* im Sinne einer Normalisierung von Genexpressionsmustern (Vgl.: Abbildung 10 B). Alle Proben der Versuchsgruppe bildeten hier einen heterogenen Pool und waren untereinander relativ ähnlich. Die ersten Proben die von den Pendants im WT abwichen waren Proben die zeitlich der *Regeneration*-Phase entsprachen (nach 48h) Interessant war hierbei, dass in der Tat die Genexpression der *Inflammation*-Phase in beiden Genotypen sehr ähnlich war. Erkennbar war dies daran, dass 10 von 12 Proben der *Inflammation*-Phase von *Kras*^{G12D} Tieren innerhalb der Grenzen des 95% Konfidenzellipsoids für Proben des WT lagen. Alle Zeitpunkte des *Kras*^{G12D} Genotyps betrachtet, fanden sich 74% (17/23) aller Caeruleinbehandelten Proben im Konfidenzellipsoid der WT *Inflammation*-Phase. Zusätzlich waren vier der übrigen sechs

Proben, die außerhalb des Ellipsoids lagen, näher am Zentrum des WT *Inflammation*-Phasen Ellipsoids gelegen, als an jedem anderen und zeigten somit eine größere Ähnlichkeit mit dieser als mit jeder anderen Phase. Somit ergab sich dass 91% (21/23) der *Kras*^{G12D} Proben die höchste Ähnlichkeit mit der Genexpression der WT *Inflammation*-Phase haben (Abbildung 10 A).

Hieraus ist zu schließen, dass die Aufteilung der WT Regeneration in drei Phasen auch auf Ebene der Genexpression valide ist. Ebenso stellen wir fest, dass die Inflammationsantwort in *Kras*^{G12D} Pankreata keine solchen Phasen aufweist. Gleichzeitig beweisen wir, dass die Initiale Veränderung der Genexpression in beiden Genotypen sehr gut vergleichbar ist. Somit ist festzustellen dass initial durch die *Kras* Mutation keine Veränderung in der Entzündungsantwort stattfindet. Eine starke Abweichung findet sich erst ab einem Zeitpunkt, wo in WT Tieren die Reparatur des geschädigten Organs einsetzt. Zu diesem Zeitpunkt wird durch onkogenes *Kras* die Normalisierung der Genexpressionsmuster verhindert. Die Tiere werden in einem Inflammatorischen Status gehalten, der der *Inflammation*-Phase im WT gleicht.

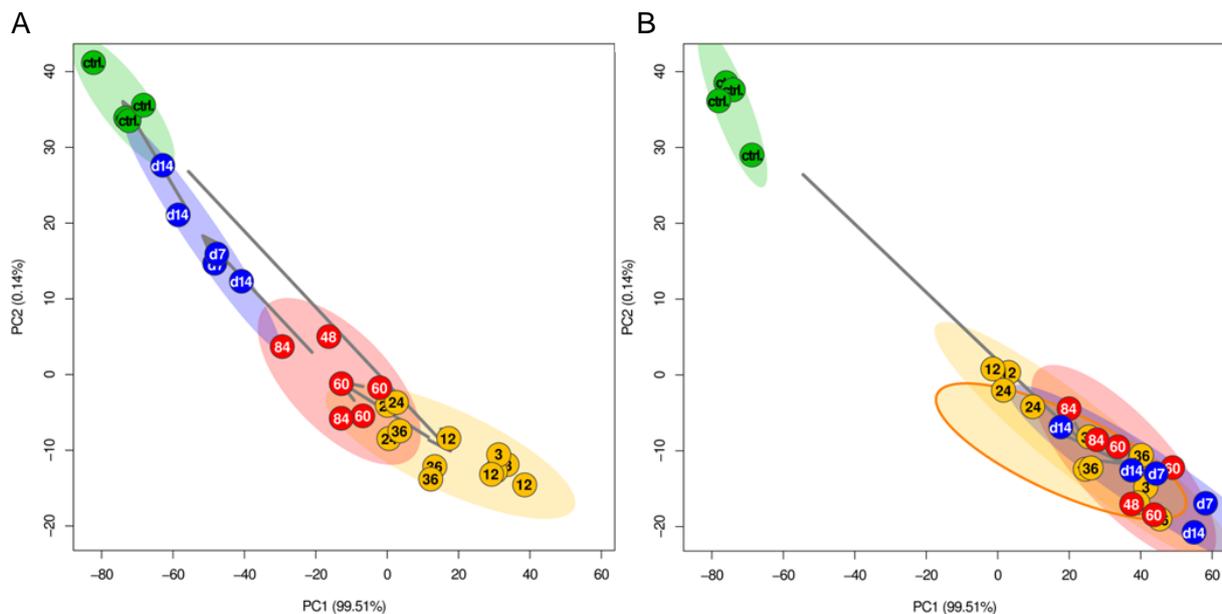


Abbildung 10: die PARAFAC-Analyse, eine 3-fach Faktorisierung der transkriptionellen Profile, erlaubt den direkten Vergleich beider Genotypen. Die farbigen Kreise zeigen wiederum das Genexpressionsmuster jeweils eines Individuums, die Farben designieren die Zugehörigkeit des jeweiligen Individuums zu den vorher festgelegten Phasen der Regeneration (Vgl.: Abbildung 9). Die Ellipsoide veranschaulichen ein 95% Konfidenzintervall, in dem Proben der jeweiligen Phase mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% lokalisiert sind. Zur besseren Übersichtlichkeit finden sich WT Daten im linken und *Kras*^{G12D} Daten im rechten Fenster, wobei im rechten, *Kras*^{G12D} Fenster ein orange umrandeter Ellipsoid das 95% Konfidenzintervall der WT Inflammation anzeigt. Alle Proben von *Kras*^{G12D} Mäusen - Mit Ausnahme der Kontrollen - zeigen große Ähnlichkeit mit WT Proben der *Inflammation*-Phase, sodass davon auszugehen ist, dass die Entzündungsantwort in *Kras*^{G12D} Tieren, auch auf Ebene der Transkription, von einer anhaltenden Entzündung charakterisiert wird. PARAFAC-Analyse veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

4.3 Analyse der allgemeinen Proliferationsdynamik in *Kras*^{G12D} Mäusen

In *Kras*^{G12D} Kontrolltieren zeigte sich ein niedriger Proliferationsindex, von durchschnittlich 1% (Abbildung 11 B), ähnlich dem, der in WT Pankreata beobachtet wird (Bo Kong et al., 2016). Vermehrte Zellteilungen fanden sich gehäuft in den vorbeschriebenen Regionen mit azinärer Vakuolisierung und präformierten ADMs. Drei Stunden nach Caerulein Applikation waren vermehrte Zellteilungen vor allem im mesenchymalen Raum und in geringerer Ausprägung in Zellen erweiterter Azini zu sehen (Abbildung 11 B). Es fand sich ein starker Anstieg des Zellteilungskoeffizienten zwischen Kontrolltieren und Tieren 24 h nach Caeruleingabe, von den im Pankreas üblichen 1 % auf bis zu 13 % (Abbildung 11 A). Nach 36 h konzentrierten sich die Zellteilungen vor allem auf die entstandenen TCs sowie auf Azini mit erweiterten Lumina (Abbildung 11 B). 60 h nach Caeruleingabe fand sich ein Abfall auf ca. 9 %, der jedoch keine signifikante Änderung zu den benachbarten *Peaks* darstellte (24 h zu 36+60 h $p=0,1023$; t-test und 84 h zu 36+60 h $p=0,2303$; t-test). Bis 84 h nach Behandlung zeigte sich ein erneuter tendenzieller Anstieg auf 13 %. In der folgenden Zeit bis Tag 7 fand sich weiterhin eine gesteigerte, jedoch im Vergleich zu Zeitpunkt von 84 h stark abfallende Proliferation von 4,3 %, im Verbund von ADMs und TCs. An Tag 14 war keine signifikant gesteigerte Proliferation mehr zu erkennen (Abbildung 11 A). Der weiterhin vorhandene Zellturnover von 2,7 % konzentrierte sich vor allem auf AFLs, ADMs und TCs. Dieser Proliferationsquotient zeigt allerdings keine signifikante Steigerung zu der Proliferation die in der Vorarbeit im WT festgestellt werden konnte.

Wie in vorherigen Studien beschrieben teilt sich die Proliferation zur Regeneration nach entzündlichem Insult im WT Pankreas in zwei Phasen mit einem klaren Bruch nach 24h der Regeneration (Bo Kong et al., 2016). In *Kras*^{G12D} Mäusen hingegen zeigte sich keine klare Abgrenzung zweier proliferativer Phasen.

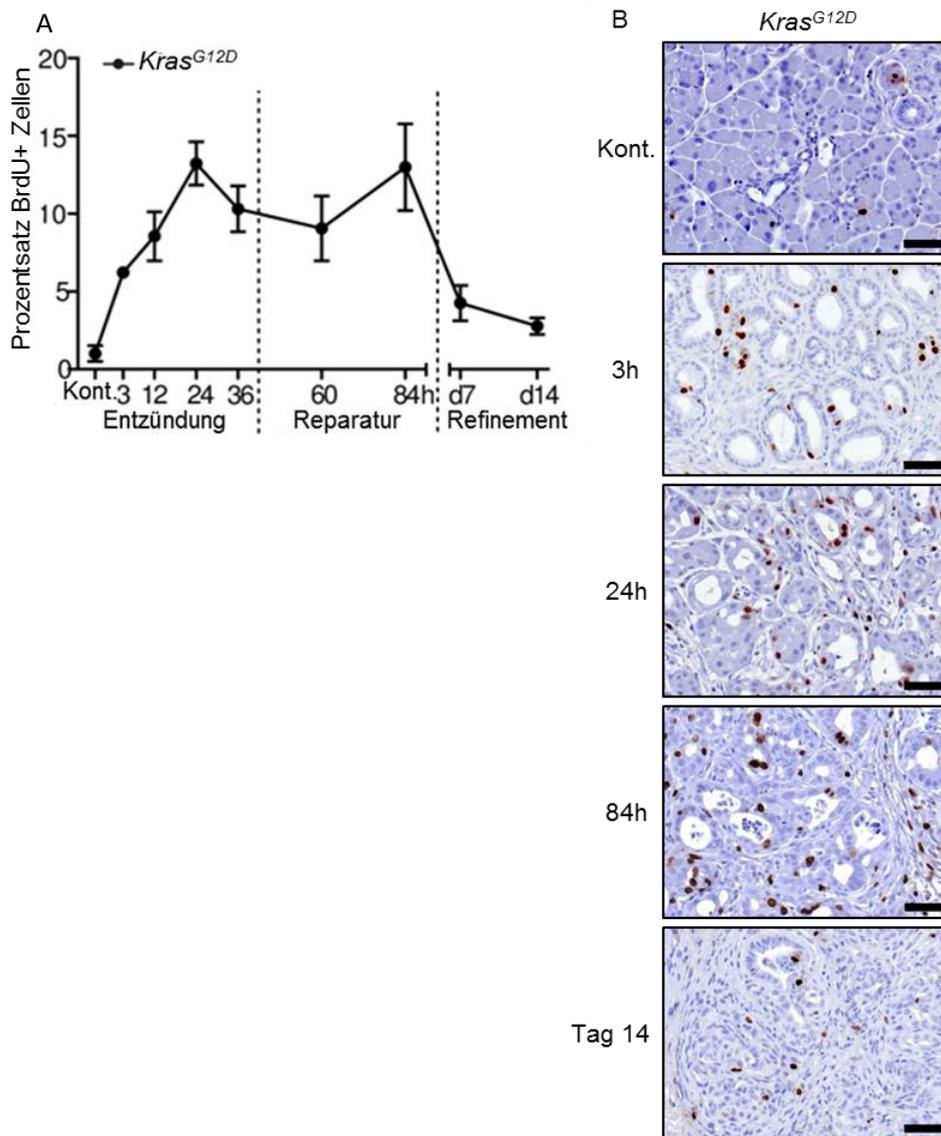


Abbildung 11: Analyse der allgemeinen Proliferationsdynamik in *Kras^{G12D}* Pankreata: (A) Der Graph zeigt den zeitlichen Verlauf des Proliferationsquotienten in *Kras^{G12D}* Mäusen. Daten von Kontrolltieren wurden als Zeitpunkt 0 dargestellt. Die Phasen der Regeneration im WT sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Daten wurden durch Quantifizierung von positiver nukleärer BrdU Färbung und Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin erzeugt. Die Proliferation in *Kras^{G12D}* Tieren zeigt keine Adhärenz an die im WT festgelegten Phasen (B) IHC Bilder von *Kras^{G12D}* Tieren mit Färbung für BrdU (Maßstabsbalken: 50 μ m). IHC und quantitative Analyse veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

4.4 Analyse der Proliferation im azinären Kompartiment

Um festzustellen, ob diese Unterschiede in der Zellproliferation zwischen WT und *Kras^{G12D}* Regeneration der Deregulation von Proliferation in unterschiedlichen Organkompartimenten geschuldet ist, wurde die Zellteilungsrate mit besonderem Augenmerk auf die Proliferationsdynamik der verschiedenen Zellpopulationen analysiert. Hierzu wurde der S-Phase-Marker BrdU in Kombination mit weiteren Zelltyp-spezifischen Markern verwendet um die Teilungsrate in azinären, mesenchymalen, duktaalen und stammzellähnlichen Zellen zu ermitteln. Somit wurden zeitabhängige und zelltypspezifische Proliferationsanalysen inklusive

der Anzahl an proliferierenden Zellen, sowie der jeweiligen Proportion zur allgemeinen Mitoserate für WT und *Kras*^{G12D} Mäuse erzeugt.

Azinuszellen stellen den größten Teil des exokrinen Pankreas und werden spezifisch durch den Einfluss von Caerulein zerstört (Vgl. Abschnitt 1.10). Erwartungsgemäß müsste diese Population den höchsten Proliferationsindex aufweisen, um die Funktion des Organs wiederherzustellen. Als Azinuszellen werden im Folgenden solche Zellen bezeichnet, welche eine positive Färbung für Amylase und somit einen Marker für differenzierte exokrine Pankreaszellen aufweisen.

Die Analyse der azinären Proliferation mittels Co-Färbung von Amylase mit BrdU ergab bis 24 h nach Caeruleingabe eine Konzentration der Proliferation auf Zellen im interstitiellen Raum (Abbildung 12C). Ab Beginn der *Regeneration*-Phase setzte vermehrt die Proliferation in Amylase positiven Zellen ein. 60 h nach Caeruleingabe war sie quasi ausschließlich in diesem Kompartiment lokalisiert. Erwartungsgemäß entsprach das Organbild von WT Mäusen 14 Tage nach Caeruleinadministration wieder nahezu dem eines Kontrolltieres mit geringer Proliferation sowohl im azinären Kompartiment als auch in Zellen des interstitiellen Raums.

In starkem Kontrast hierzu stand die Entwicklung des azinären Kompartiments in *Kras*^{G12D} Pankreata (Abbildung 12 C). Hier zeigte sich nach 36 h eine starke Überproliferation von Amylase negativen Zellen mit zusätzlich schrittweisem Verlust der Amylaseproduktion in Zellen die morphologisch dem azinären Kompartiment angehörten. Diese Entwicklung setzte sich fort, bis ab 60 h nach Caeruleingabe. Zu diesem Zeitpunkt war die Amylaseproduktion auf wenige regenerierte Azini pro GF sowie auf einzelne Zellen in TCs beschränkt. Die Proliferation konzentrierte sich hierbei vor allem auf Amylase negative Zellen. Am Tag 14 waren wenige regenerierte Azini zu erkennen, ebenso fanden sich einige Amylase-positive Zellen die morphologisch jedoch keine Ähnlichkeit mit typischen Azinuszellen hatten. Zellteilungen vollzogen sich jedoch zum größten Teil in Amylase-negativen Zellen.

Es fand sich somit eine stark divergente Entwicklung, was die Proliferation, sowie die Amylaseproduktion und demzufolge die Funktionalität im epithelialen Kompartiment von WT bzw. *Kras*^{G12D} Pankreata nach induzierter Pankreatitis betraf. Zur genaueren Quantifizierung der Unterschiede wurden sowohl die in Teilung begriffenen Zellen gesamt, als auch die Amylase produzierenden, sich teilenden Zellen gezählt und in Relation zu einander betrachtet (Abbildung 12 A,B).

In WT Mäusen waren 2 Phasen der Azinuszellproliferation zu erkennen mit einem ersten Maximum nach 24 h bei durchschnittlich 24 Zellen pro GF und einem zweiten Maximum bei Tag 4 und durchschnittlich 38 Zellen pro GF. Somit war die Anzahl proliferierender differenzierter Azinuszellen während der *Regeneration*-Phase signifikant höher als während

der *Inflammation*-Phase ($p = 0,016$; t-test) (Abbildung 12 A). Ebenso war prozentual der Anteil der Amylase positiven an den proliferierenden Zellen während der *Inflammation*-Phase erniedrigt bei nur 63 % (50,5 % nach 3 h und Steigerung auf 75 % nach 36 h) im Vergleich zu 96 % während der *Regeneration*-Phase ($p < 0,0001$; t-test) (Abbildung 12 B). Diese Zahlen zeigen eine zeitweise Herabregulation der Proliferation in Amylase positiven Zellen während der *Inflammation*-Phase zugunsten der Vermehrung anderer Zelltypen, mit einer zeitlich regulierten Zunahme der azinären Proliferation im Rahmen der Organreparatur ab ca. 24-36 h nach inflammatorischem Insult.

Bei Betrachtung des proliferativen Verlaufs in *Kras*^{G12D} Pankreata fiel auf, dass die Anzahl an proliferierenden Azinuszellen während der ersten 24 h, entsprechend der *Inflammation*-Phase, den Ergebnissen der Wild Typ Tiere vergleichbar war (Abbildung 12 A). Erste Unterschiede zeigten sich ab 36 h, wo in WT Tieren die Anzahl an proliferierenden Azinuszellen auf durchschnittlich $9,5 (\pm 2,5)$ Zellen pro GF absank, während in *Kras*^{G12D} Tieren die Anzahl bei durchschnittlich $26 (\pm 1,2)$ Zellen pro GF ihr Maximum erreichte ($p=0,0033$; t-test). Nach 60 h, entsprechend der *Regeneration*-Phase in WT Pankreata, war die Anzahl an proliferierenden Azinuszellen in *Kras*^{G12D} Mäusen erniedrigt, bei durchschnittlich $7,5 (\pm 1,1)$ pro GF in *Kras*^{G12D} Tieren. Der Unterschied zwischen den Genotypen war bei anteiliger Betrachtung der proliferierenden Azinuszellen an der gesamt Proliferation (Abbildung 12 B) über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant. Er betrug durchschnittlich 31 % aller sich teilenden Zellen und war somit signifikant reduziert im Vergleich zu, sowohl dem Prozentsatz der *Inflammation*-Phase von 63 % (3 h – 36 h), als auch der *Regeneration*- und *Refinement*-Phase von 96 % (48 h bis D 14) bei den untersuchten WT Mäusen. ($p < 0,0001$; t-test).

In der Gesamtschau sprechen diese Daten für eine Überproduktion an nicht azinären Zellen in *Kras*^{G12D} Pankreata, deren Zelluläre Identität bislang ungeklärt ist. Ebenso findet sich eine Überproduktion an nicht azinären Zellen im WT, hier allerdings streng begrenzt auf den Zeitraum der *Inflammation*-Phase. Zur Klärung der Identität der weiteren sich teilenden Zellen wurden Marker für die übrigen Kompartimente ausgewählt und die Proliferation in den selbigen ebenso quantifiziert. Zunächst wurde dies für den Wildtyp vorgenommen.

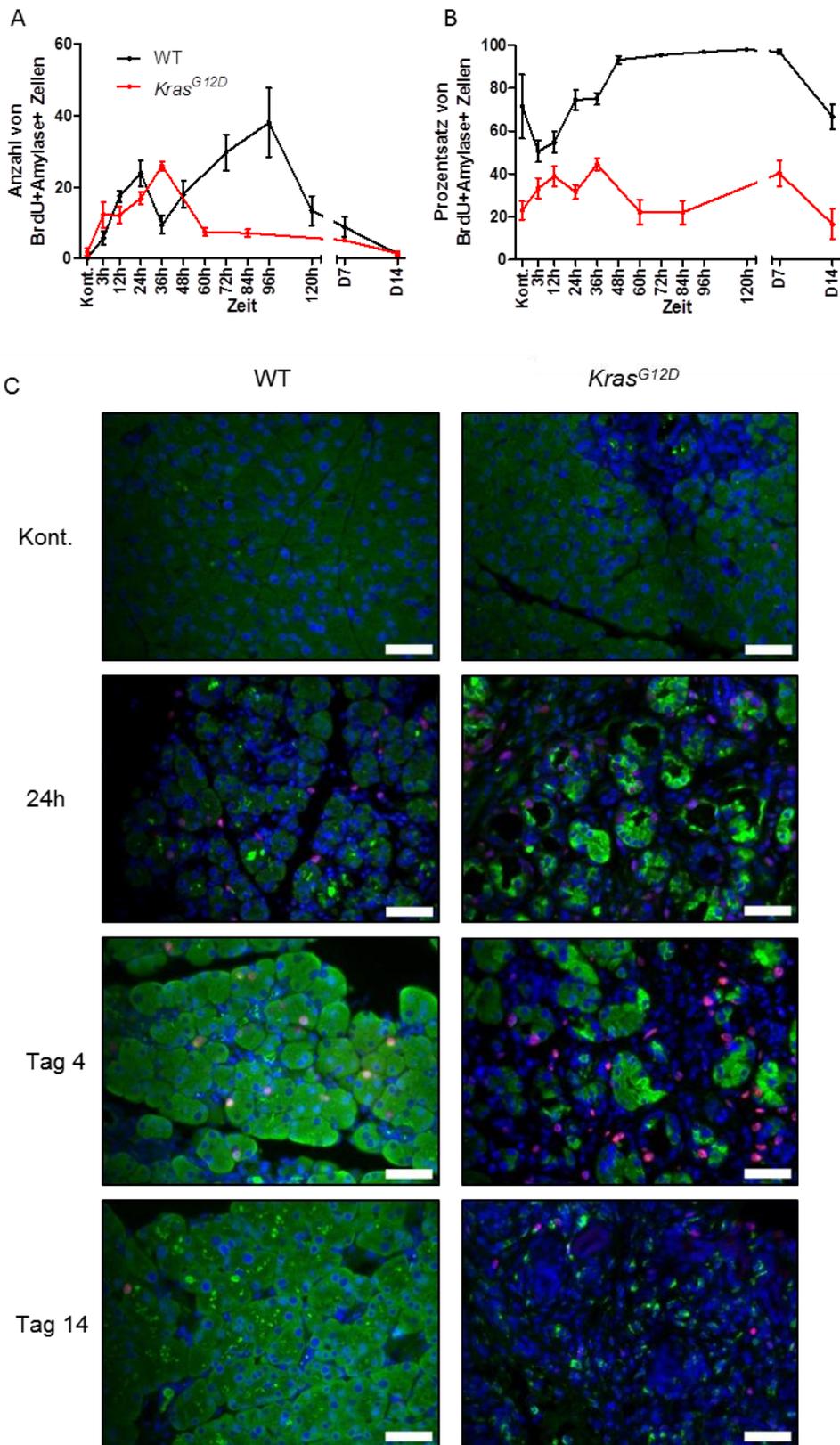


Abbildung 12: Proliferationsdynamik von Amylase positiven Zellen: (A,B) Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Amylase in WT (schwarze Linie) und *Kras*^{G12D}Tieren (rote Linie) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt; (A) Amylase-positive Zellen zeigen im WT eine Proliferation mit zwei Gipfeln jeweils in der *Inflammation* und *Regeneration*-Phase, während in *Kras*^{G12D}Tieren 36 h nach Caeruleingabe ein maximum an Proliferation in diesem Kompartiment zu verzeichnen ist, ohne weiteren Gipfel während der *Regeneration*-Phase. (B) Der Prozentsatz von Amylase-positiven proliferierenden Zellen an der Gesamtheit der proliferierenden Zellen zeigt ab der *Regeneration*-Phase eine fast ausschließliche Proliferation in Amylase positiven Zellen im WT und gleichbleibend niedrigen Anteil dieses

Kompartiments zwischen 20 und 40 % an der Gesamtproliferation in *Kras^{G12D}* Tieren. Die IF-Bilder (C) zeigen repräsentative Schnitte der Amylase (Grün) und BrdU (rot) Co-Färbung in WT (linke Spalte) und *Kras^{G12D}* Mäusen (rechte Spalte). Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) homogene Amylaseproduktion in Azinuszellen beider Genotypen, in *Kras^{G12D}* Tieren zeigen sich Regionen mit präformierten ADMs vermindert Amylase-positiv; (24 h) Proliferation im interstitiellen Raum und Amylase-negativen Zellen; (Tag 4) Die Amylase Expression ist nach Regeneration im WT weitgehend reetabliert (Proliferation findet hauptsächlich in Amylase-positiven Zellen statt). In *Kras^{G12D}* Tieren zeigt sich eine mangelhafte Regeneration von Azinuszellen, wobei diejenigen Azinuszellen die regeneriert sind eine starke Amylase-Produktion aufweisen (Proliferation findet sich hauptsächlich in Amylase-negativen Zellen); (Tag 14) Reduzierte Proliferation in beiden Genotypen, homogene Amylase-Produktion im WT, vereinzelt Amylase-positive Zellen in *Kras^{G12D}* Mäusen, ohne proliferative Aktivität. IF und quantitative Analyse veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

4.5 Analyse der Proliferation in ADM und duktalem Kompartiment

Als Marker für das duktales Kompartiment wurde Cytokeratin 19 (CK19) gewählt.

In WT Tieren war zu jedem Zeitpunkt ein sehr schwaches Ansprechen auf die CK19 Färbung zu erkennen (Abbildung 13). Nach Caeruleinexposition kam es zu einer kurzzeitigen hoch Regulation der Expression welche sich bis zu 4 Tage fand. In diesem Zeitraum kam es nur in vereinzelt Fällen zu Proliferation in CK19 positiven Zellen. In Kontroll Tieren sowie bei Zeitpunkten über 48 h nach Behandlung fand sich CK19 Expression ausschließlich in Pankreasgängen ohne Proliferation in diesen Zellen.

In starkem Kontrast zum WT fand sich die CK19 Expression in *Kras^{G12D}* Pankreata (Abbildung 13). Bei Kontrolltieren zeigte sich, ähnlich dem Wild Typ, eine sehr schwache Expression in Pankreasgängen und Gefäßen. Zusätzlich war eine Hochexpression in vereinzelt Regionen mit ADM zu erkennen. Hier fanden sich vermehrt Zellteilungen in CK19 positiven Zellen. Drei Stunden nach Caeruleinapplikation waren Veränderungen nur sehr schwach ausgeprägt und dem Bild in Wild Typ Mäusen vergleichbar. Beginnend ab zwölf Stunden nach Exposition stieg der Anteil an CK19 positiven Zellen, mit Färbung vor allem der erweiterten Azini. Nach 24 h waren sowohl erweiterte Azini als auch beginnende TCs positiv für CK19 mit zahlreichen Zellteilungen in CK19 positiven Zellen. Gleichbleibend bestand dieses Bild bis zum Ende der Beobachtungsspanne.

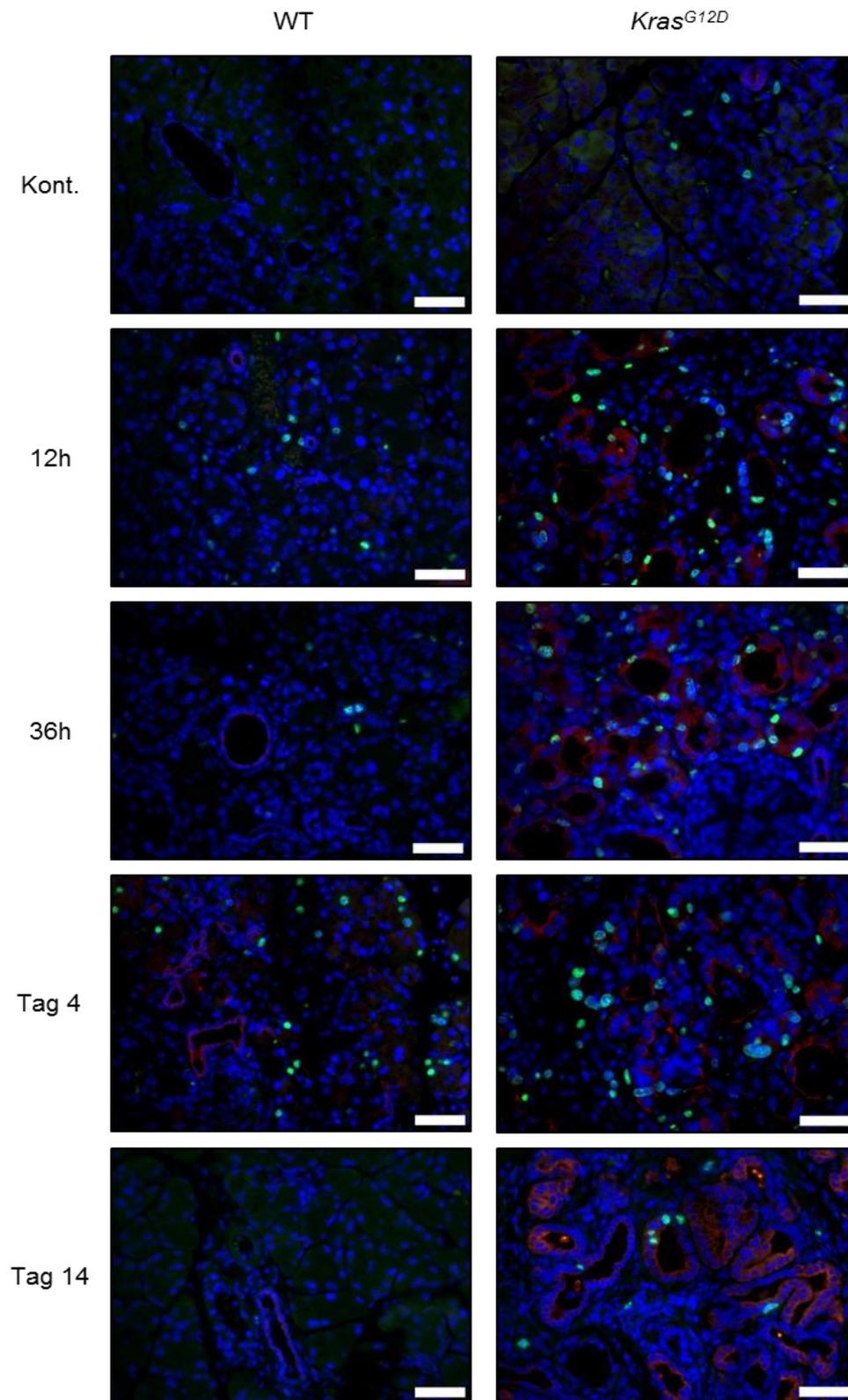


Abbildung 13: IF-Färbung der Proliferation in Ck19 positiven Zellen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der CK19 (Rot) und BrdU (Grün) Co-Färbung in WT (linke Spalte) und *Kras*^{G12D} Mäusen (rechte Spalte). Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Im WT keine Ck19 Expression in Zellen außerhalb von Pankreasgängen, in *Kras*^{G12D} Tieren zeigen Regionen mit präformierten ADMs CK19 Expression in Zellen der ADMs; (12 h, 36 h) Im WT leichte Hochregulation der CK19 Expression, bei nur vereinzelt Teilungen in diesen Zellen, CK19-positive Zellen in *Kras*^{G12D} Tieren proliferieren verstärkt; (Tag 4) Im Laufe der WT Regeneration erneutes Abnehmen der Ck19 Expression und Beschränkung auf Pankreasgangzellen. In *Kras*^{G12D} Tieren im Gegensatz Überproduktion an CK19-positiven Zellen; (Tag 14) unverändertes Bild im WT, in *Kras*^{G12D} Mäusen, weiterhin deutliche CK19-positivität in ADM, TC und AFL mit erhöhter proliferativer Aktivität in dieser Zellpopulation.

Die Quantifizierung aller CK19 positiven proliferierenden Zellen ergab während des gesamten Beobachtungszeitraums eine signifikant gesteigerte Teilungsrate dieser Zellpopulation in *Kras*^{G12D} Pankreata im Vergleich zu WT Pankreata. (Mean WT 3 h bis D 14 0,4 (± 0,15) / GF; Mean *Kras*^{G12D} 3 h bis D 14 7,5 (± 1,3) / GF; p<0,0001; t-test) (Abbildung 14 A). Hier fanden sich durchgehend nach Caeruleinapplikation keine bis maximal 1,6 Zellen pro GF 72 h nach Behandlung. Ebenso war in WT Kontrolltieren keine signifikante Proliferation in CK19 positiven Zellen zu verzeichnen. *Kras*^{G12D} Mäuse zeichneten sich bereits ohne Caeruleinapplikation durch einzelne Ck19 positive ADMs aus in denen durchschnittlich 3,6 Zellen pro GF in Teilung begriffen waren. Die Anzahl an proliferierenden Zellen steigerte sich von 5 Zellen pro GF zum Zeitpunkt von 3 h bis auf maximal 13,3 Zellteilungen pro GF nach 24 h. Diese Anzahl blieb konstant bis 80h nach Behandlung und sank daraufhin bis Tag 14 auf durchschnittlich 3,4 Zellen pro GF.

Prozentual gesehen ergab sich ein ähnliches Bild (Abbildung 14 B). Sowohl Kontrolltiere des WTs als auch Tiere an Tag 14, dem Endpunkt der *Refinement*-phase, zeigten keine Proliferation in Ck19 positiven Zellen. Während der *Inflammation*-Phase, bis zu 24 h, zeigte sich ein Maximum an bis zu 7,9 % der Proliferation, die in Ck19 exprimierenden Zellen stattfand. Während der *Regeneration*-Phase war die Expression von Ck19 in WT Tieren erneut auf Gangstrukturen sowie Gefäße begrenzt, hier betrug der Anteil an Ck19 Zellen durchschnittlich 2,6 % aller proliferierenden Zellen.

Bei *Kras*^{G12D} Mäusen betrug der Ck19 positive Anteil an sich teilenden Zellen in der Kontrollpopulation 19,1 %. In der *Inflammation*-Phase war ein Anstieg von 16,5 % drei Stunden nach Behandlung auf bis zu 34 % nach 36 Stunden zu erkennen. Während der *Regeneration*-Phase machten CK19 positive Zellen eine Fraktion von 28,9 % aus, mit sinkender Tendenz bis Tag 7 auf 16,7 % und erneutem tendenziellem Anstieg auf bis zu 27,4 % 14 Tage nach Caeruleinexposition.

Zusammenfassend ist die CK19 Expression in WT Pankreata deutlich geringer als in *Kras*^{G12D} Pankreata, auch die vorübergehende ADM-Formation in WT Tieren nach Caerulein-induziertem, inflammatorischem Insult zeigt nur geringe CK19 Positivität bei geringer proliferativer Aktivität. Im Gegensatz hierzu zeigt der Pankreas von Tieren mit onkogener *Kras*^{G12D} -Mutation in Reaktion auf Entzündung eine Hochregulation der CK19 Expression in ADM, AFL und PanIN Läsionen mit erhöhter proliferativer Aktivität in diesen Geweben.

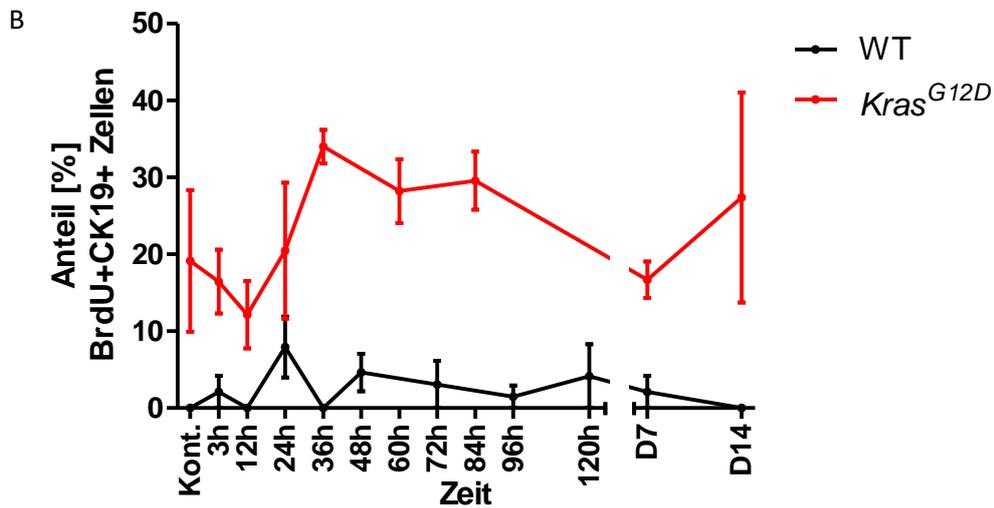
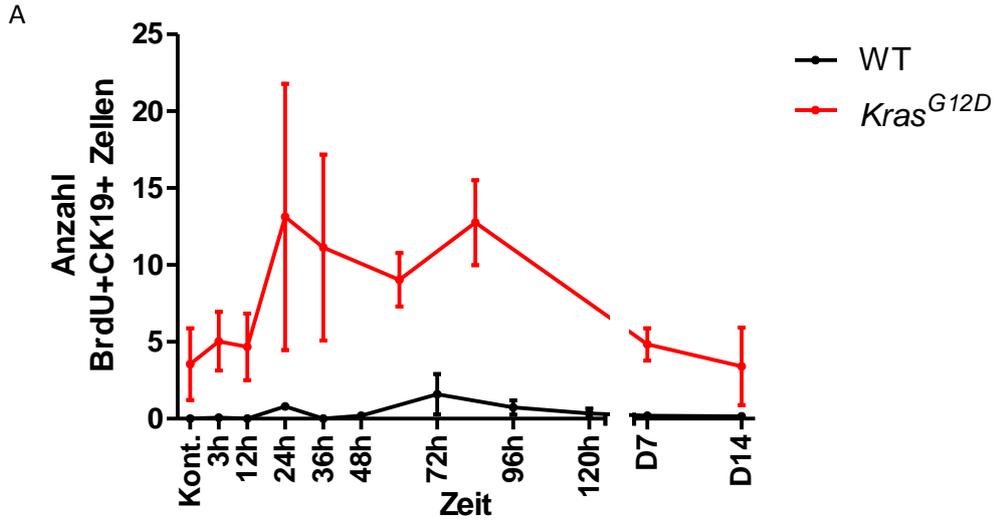


Abbildung 14: Anzahl und Anteil der Ck19 positiven Zellen: (A, B) Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von CK19 in WT (schwarze Linie) und *Kras*^{G12D} Tieren (rote Linie) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt; (A) CK19-positive Zellen zeigen im WT während der gesamten Beobachtungsspanne nahezu keine Proliferation, während in *Kras*^{G12D} Tieren durchgehend eine verstärkte Proliferation in diesem Kompartiment zu verzeichnen ist. (B) Der Prozentsatz von CK19-positiven proliferierenden Zellen an der Gesamtheit der proliferierenden Zellen verdeutlicht diese Erkenntnis weiter.

4.6 Analyse der Proliferationsdynamik in Mesenchym und Stammzellähnlicher Population im WT

4.6.1 Proliferation im Mesenchym

Histologisch sind in den frühen Zeiträumen der Regeneration des WTs viele Zellteilungen im interstitiellen Raum zu erkennen. Zu diesem Ziel wurden die Marker Vimentin und α -SMA gewählt und die Proliferation gewebespezifisch betrachtet.

4.6.1.1 Vimentin

Betrachtung der stromalen Entwicklung anhand einer Färbung für Vimentin ließ erkennen, dass in WT Tieren während der *Inflammation*-Phase ein starker Zuwachs an Mesenchym zu verzeichnen ist, im Vergleich zu Kontrolltieren wo das Stroma nur dünne Trennschichten zwischen verschiedenen Azini und Pankreasläppchen bildete. Während der ersten 36 h der Regeneration zeigte sich eine stark erhöhte Zellteilungsrate in Vimentin positiven Zellen. Im Anschluss hieran, wiederum zeitlich streng reguliert, fand nahezu keine Zellteilung mehr in mesenchymalem Gewebe statt, wobei der vermehrte Anteil an Vimentin positiven Zellen noch bis ca. fünf Tage nach Caeruleinapplikation erhalten blieb. Ab dem siebten Tag war ein erneuter Rückgang der Vimentin positiven Zellen erkennbar (Abbildung 15).

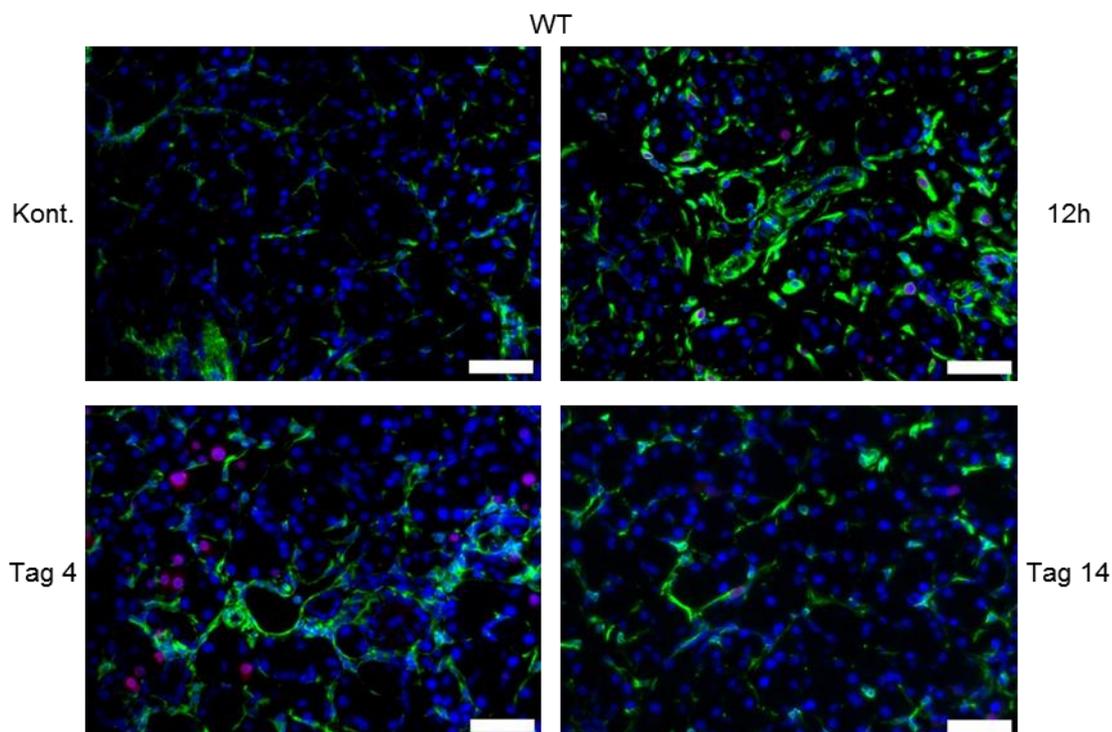


Abbildung 15: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Vimentin-positiven Zellen im WT: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Vimentin (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Vimentin positive Zellen bilden dünne Trennmembranen zwischen Pankreasläppchen; (12 h) deutliche Hochregulation der Vimentin-Expression, bei zahlreichen Teilungen im Vimentin-exprimierenden Mesenchym; (Tag 4) Weiterhin Verdickung der Vimentin-positiven Trennschichten, jedoch Suppression der Proliferation im Mesenchym; (Tag 14) erneut Bild wie in Kontrolltieren mit vereinzelt Proliferation in Vimentin-positiven Zellen.

Die Anzahl an Vimentin positiven proliferierenden Zellen variierte in WT Mäusen zeitlich begrenzt stark (Abbildung 16). In Kontrolltieren war sie sehr niedrig mit durchschnittlich 0,2 Zellen pro GF. Zwischen drei und 24 Stunden, in der *Inflammation*-Phase, stieg diese Anzahl stark an auf durchschnittlich 19,6 Zellen pro GF. Nach 36 h waren nur mehr 1,9 Vimentin exprimierende Zellen pro GF in Teilung begriffen. Diese Anzahl variierte im Anschluss kaum noch bis einschließlich Tag 14 um einen Durchschnitt von 1,7 Zellen pro GF während der *Regeneration*- und *Refinement*-Phase. Es bestand also eine signifikante Hochregulation der Proliferation während der *Inflammation*-Phase mit abruptem Umschwung auf Proliferation in anderen Kompartimenten nach 36 Stunden.

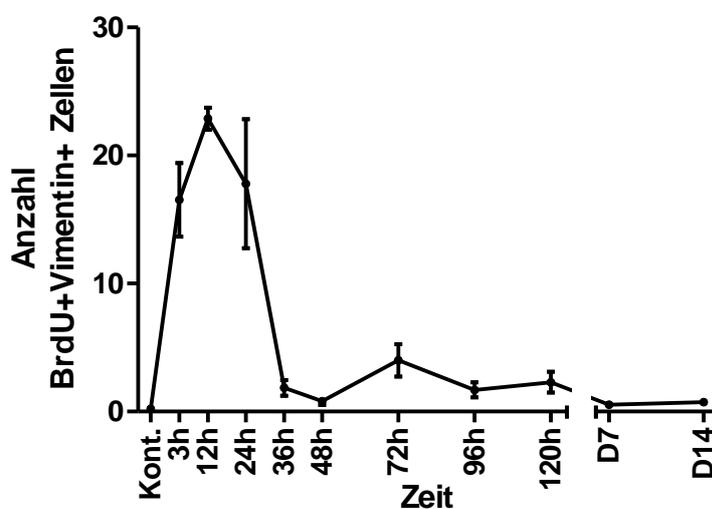


Abbildung 16: Anzahl Vimentin positiver proliferierender Zellen: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Die Proliferation von Vimentin positiven Mesenchymzellen bleibt im WT streng limitiert auf die *Inflammation*-Phase.

Im Folgenden soll wiederum der Anteil an proliferierenden Mesenchymzellen (BrdU und Vimentin-positive) an allen proliferierenden Zellen (BrdU-positive) betrachtet werden (Abbildung 17). Hierbei ist auffällig, dass im gesunden WT Organ ein sehr hoher Anteil von 89 % an proliferierenden Zellen auf das Bindegewebskompartiment entfällt. Während der *Inflammation*-Phase beträgt der Anteil vorübergehend bis zu 97,8 % nach drei Stunden mit einem rapiden Abfall auf nur noch 15,6 % nach 36 Stunden. Zwischen 36 h und Tag 7 bleibt der Prozentsatz an proliferierenden Zellen mit mesenchymaler Identität nahezu konstant um 9,6 % (Mean 36 h bis D 7). Im vollständig regenerierten Organ befinden sich wieder 68,5 % (D 14) aller teilenden Zellen im Bindegewebe.

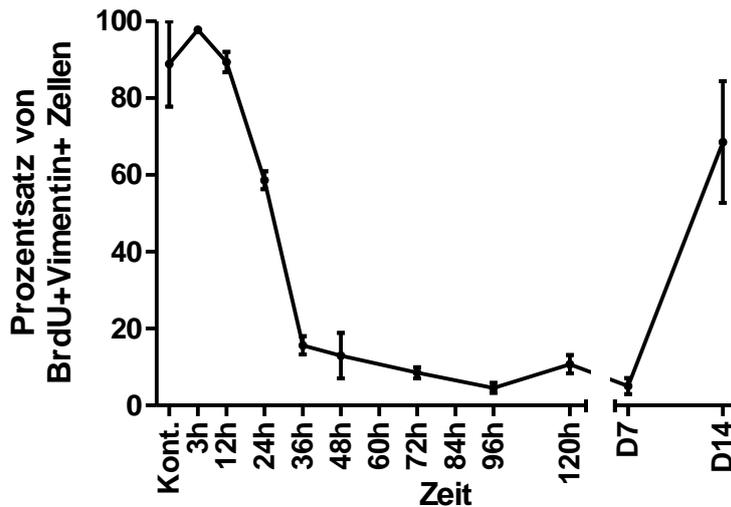


Abbildung 17: Prozentsatz Vimentin positiver Zellen an der Gesamtteilungsrate: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Während der *Inflammation*-Phase stellen mesenchymale Zellen den größten Anteil an der Proliferation, bei Suppression der Proliferation in diesem Kompartiment mit Einsetzen der *Regeneration*-Phase.

4.6.1.2 A-SMA

Alpha smooth muscle actin (α -SMA) ist ein Protein das in glatter Muskulatur, vor allem von Gefäßen, sowie teils in der Darmwand und dem Myometrium vorkommt (Shynlova et al., 2005; Skalli et al., 1989, 1986). Im Pankreas weist α -SMA Expression außerhalb von Zellen der Gefäßwände auf die Aktivierung von pankreatischen Stellatumzellen hin, die sich in myofibroblasten-ähnliche Zellen verwandeln (Apte et al., 1999; Mews et al., 2002; Nagashio et al., 2004) und die Fibrosierung des Pankreas vermitteln. Im gesunden Pankreas ist demnach die α -SMA Expression auf Gefäßwände beschränkt, bei chronischer Pankreatitis finden sich aktivierte α -SMA positive PSCs in fibrotischen Regionen (Nagashio et al., 2004).

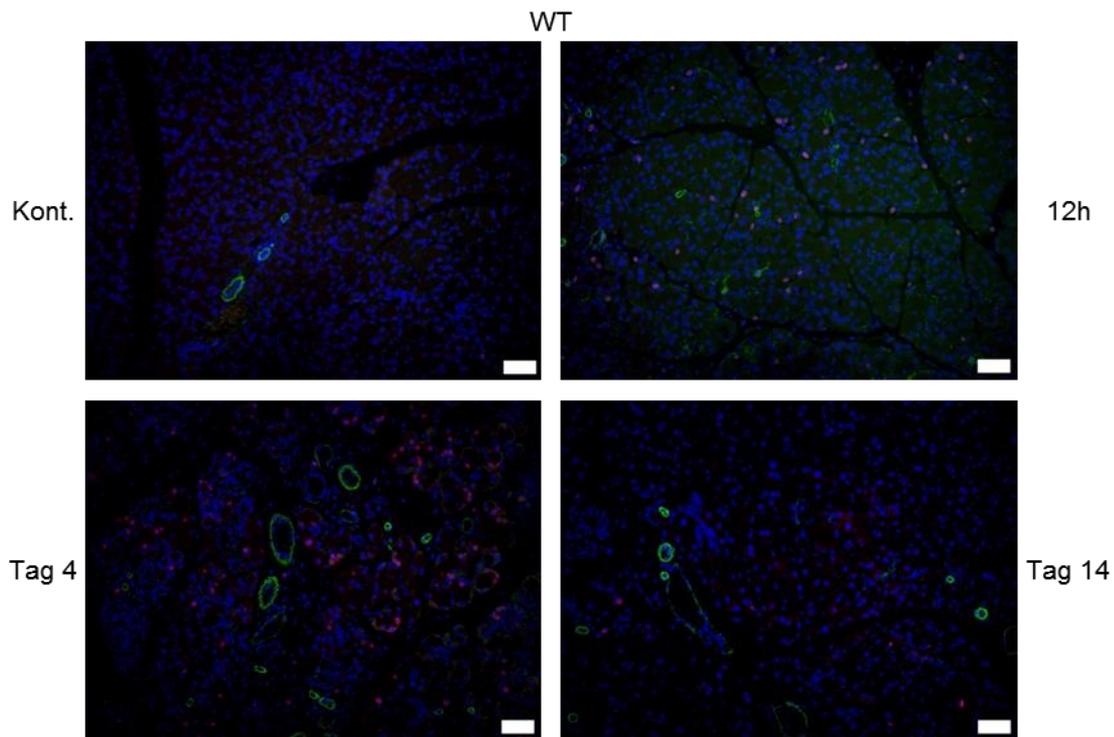


Abbildung 18: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in α -SMA-positiven Zellen im WT: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der α -SMA (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Ausschließlich Zellen in Gefäßwänden zeigen α -SMA Expression, dies ohne Proliferation; (12 h) leichte Aktivierung von pankreatischen Stellatumzellen mit Lokalisation im interstitiellen Raum und gesteigerter Proliferation in dieser Zellpopulation im Rahmen der *Inflammation*-Phase bis 36 h; (Tag 4) deutlicher Verlust an α -SMA positiven Zellen im Vergleich zu Zeitpunkten der *Inflammation*-Phase (Proliferation ausschließlich in Zellen ohne α -SMA Expression); (Tag 14) erneut Bild wie in Kontrolltieren. IF veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Die Betrachtung von WT Kontrolltieren zeigte die erwartete Verteilung von α -SMA positiven Zellen ausschließlich in Blutgefäßwänden (Abbildung 18). Caeruleinapplikation über zwei Tage bewirkte bereits drei Stunden nach Beendigung der Behandlung eine leichte Aktivierung von PSCs mit schwach α -SMA positiven Zellen im Interstitium. Bei WT Tieren war ein Gipfel dieser Entwicklung nach 12 h bis 24 h zu erkennen mit erneutem Rückgang der α -SMA positiven Zellen nach 36 h. In diesem frühen Zeitraum, entsprechend der *Inflammation*-Phase, waren gesteigert Zellteilungen in aktivierten PSCs zu erkennen. Im Anschluss hieran war die α -SMA Färbung wiederum auf glatte Muskelzellen in Gefäßwänden beschränkt.

Die quantitative Analyse illustriert, dass die Proliferation von aktivierten PSCs in WT Tieren auf die *Inflammation*-Phase limitiert war (Abbildung 19). In Kontrolltieren zeigte sich keine Proliferation von α -SMA positiven Zellen, es fand sich nach 12 Stunden ein Maximum an 10,3 teilenden, α -SMA exprimierenden Zellen pro GF mit einem Abfall bis 36 h auf 3,1 Zelle pro GF. Ab Beginn der Organreparatur nach 48 h war keine signifikante Proliferation in α -SMA positiven Zellen mehr zu erkennen, die Anzahl betrug durchschnittlich 0,4 Zellen pro GF (Mean 48 h bis D 14).

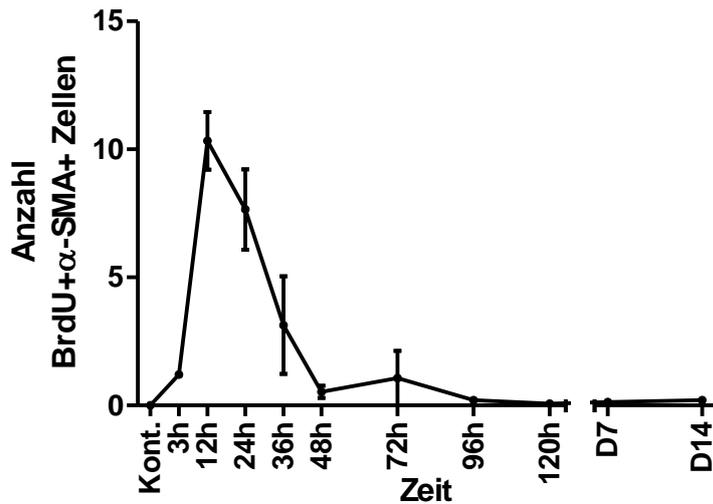


Abbildung 19: Anzahl α-SMA positiver proliferierender Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Die Proliferation von α-SMA positiven Zellen bleibt im WT streng limitiert auf die Inflammation-Phase. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Prozentual gesehen zeigte sich ein vergleichbares Bild mit starker zeitlicher Limitierung der Proliferation in WT Pankreata auf die *Inflammation*-Phase (Abbildung 20). Hier lag der maximale Anteil der α-SMA exprimierenden Zellen an der proliferierenden Zellpopulation 12 Stunden nach Caeruleingabe bei 11,3 %. Nach 48 h entfielen auf die α-SMA positiven Zellen nur noch 1,5 % der Gesamtproliferation. Während des gesamten restlichen Beobachtungszeitraums blieb die Proliferation in diesem Kompartiment auf durchschnittlich 1 % der gesamten Zellteilung beschränkt.

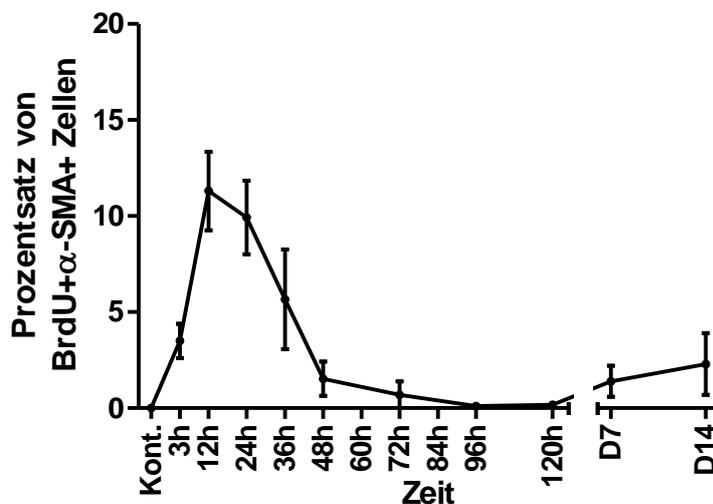


Abbildung 20: Prozentsatz α-SMA positiver Zellen an der Gesamtteilungsrate im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in Funktion der Zeit. Kontrolltiere

wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Ausschließlich während der *Inflammation*-Phase stellt das α -SMA positive Zellkompartiment einen signifikanten Anteil der sich teilenden Zellen von bis zu 11,3 %. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Im gesunden Pankreas des WT ist demnach die α -SMA Expression auf Gefäßwände beschränkt. Unter Einfluss von akutem Organschaden werden kurzfristig im Rahmen der *Inflammation*-Phase in WT Pankreata die PSCs aktiviert und α -SMA in Teilen des Interstitiums exprimiert unter gesteigerter Proliferation in diesem Kompartiment. Zeitlich streng reguliert findet sich eine Beendigung der Proliferation in diesem Kompartiment mit Beginn der *Regeneration*-Phase.

4.6.2 Proliferation in einer Stammzellmarker exprimierenden Zellpopulation

Es wurde vorgeschlagen dass im Rahmen von entzündlichen Prozessen im Pankreas einige Zellen azinären Ursprungs erneut Merkmale von pluripotenten Stammzellen exprimieren können und somit in einen Zustand versetzt werden, das Organ zu repopulieren (Desai et al., 2007; Kong et al., 2011; Strobel et al., 2007a; Yanger and Stanger, 2011). Typische Marker für pankreatische Vorläuferzellen sind Pdx1 und Sox9.

4.6.2.1 Pdx1

Das Pankreasgewebe wurde durch Färbung analysiert auf Koexpression von Pdx1 mit Positivität für BrdU. Im gesunden erwachsenen Pankreas findet sich eine Pdx1 Expression ausschließlich in Beta Zellen der Langerhans'schen Inseln. Während der embryonalen Entwicklung ist Pdx1 in undifferenzierten epithelialen Zellen des Pankreas zu finden. (Jensen et al., 1996; Ohlsson et al., 1993)

Wie vorbeschrieben (Jensen et al., 2005) zeigte sich bei WT Kontrolltieren ohne Caeruleinbehandlung positive Pdx1 Färbung nur in Nuclei der Langerhans'schen Inselzellen. Ebenso wie vorbeschrieben konnten wir zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Proliferation in Zellen feststellen, die morphologisch den Langerhans'schen Inseln zuzurechnen waren. Bereits 3 Stunden nach Caeruleingabe waren allerdings einzelne Zellen mit den Inselzellen vergleichbarer Pdx1 positiver Färbung zu erkennen (Abbildung 21). Diese Zellen befanden sich nicht in morphologisch typischer Anordnung für Betazellen als Zellkonglomerat. Hier ist aufgrund der mangelnden Insulin Co-färbung keine ausreichende Aussage darüber zu treffen ob es sich um versprengte einzelne Betazellen handelt oder in der Tat erste neuerliche Expression von Pdx1 im exokrinen Kompartiment darstellt. Zudem waren selten nach 3 und

nach 24 h auch Gangähnliche Strukturen mit positiver Färbung für Pdx1 zu erkennen (Abbildung 22).

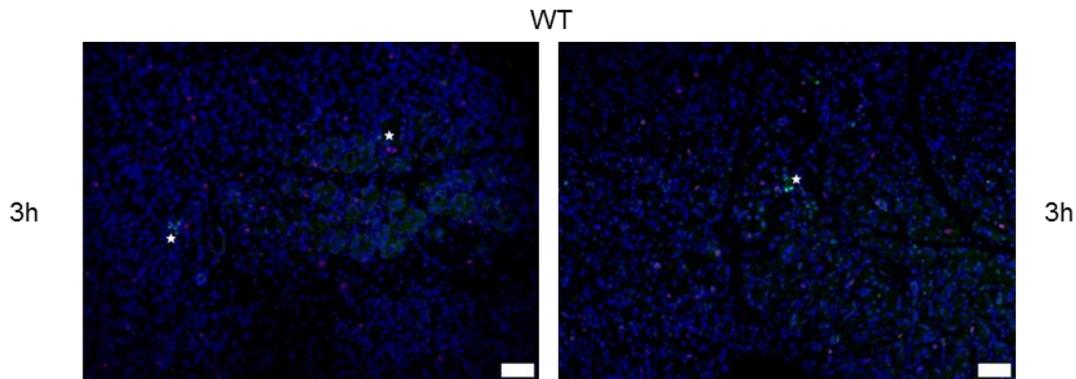


Abbildung 21: IF mit Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuclei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt: Pdx1 pos. Zellen (Asterisken) vereinzelt bereits zu Beginn der Inflammation vorhanden

Ab einem Zeitpunkt von 24 h waren zunehmend auch in azinären Gebilden Zellen mit positiver Pdx1-Färbung zu erkennen (Abbildung 23). Dieser Zustand war stark zunehmend bis 36 h nach Behandlung, wo nahezu alle Epithelialen Zellen den embryonalen Marker exprimierten. Gegensätzlich zu früheren Erkenntnissen konnten wir nach 72 Stunden bereits eine starke Abschwächung der Pdx1 Expression erkennen, die deutlich hinter der von Inselzellen zurückblieb.

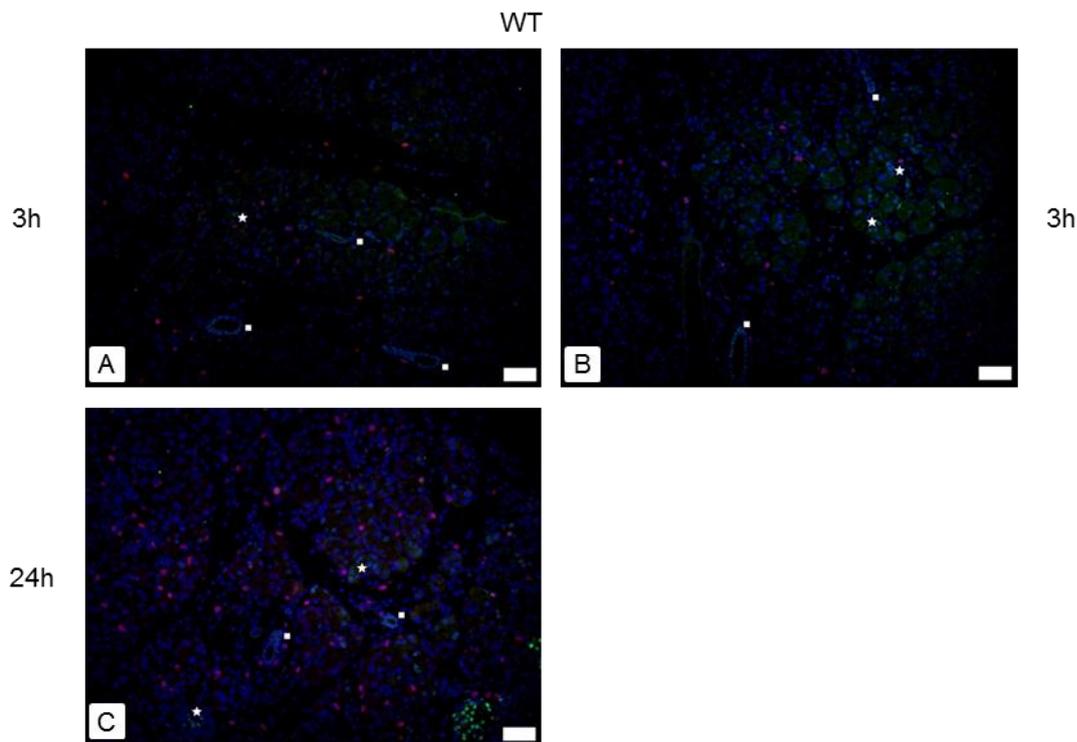


Abbildung 22: IF mit Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuclei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt: Pdx1 pos. Gangähnliche Strukturen (Quadrate) Pdx1 pos. Zellkerne außerhalb von Gangstrukturen (Asterisken)

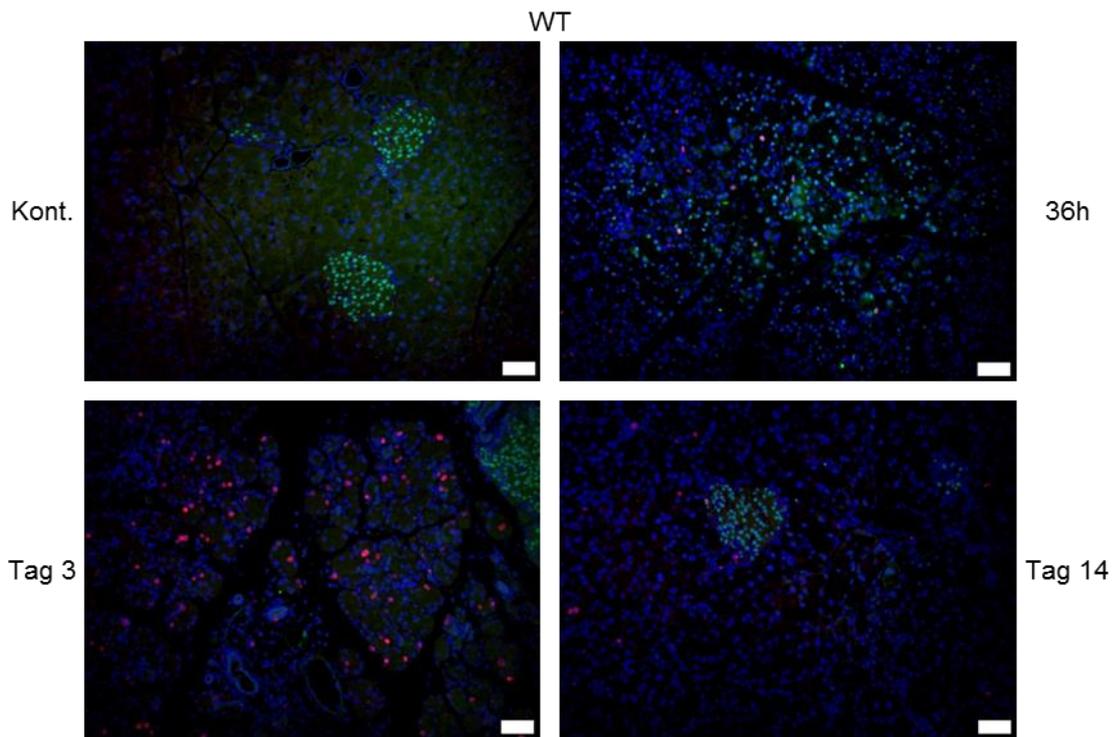


Abbildung 23: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Pdx1-positiven Zellen im WT: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Ausschließlich Zellen in Langerhans'schen Inseln zeigen Pdx1 Expression, dies ohne Proliferation; (36 h) mit fortschreiten der *Inflammation*-Phase präsentiert sich eine große Mehrheit der exokrinen Zellen mit Pdx1 Expression im Zellkern und gesteigerter Proliferation in dieser Zellpopulation; (Tag 3) deutliche Abschwächung der Pdx1-Positivität in exokrinen Zellen mit nur noch vereinzelter Proliferation, bei erhaltener Färbung von Langerhans'schen Inselzellen (wenige Teilungen in der β -Zellpopulation, soweit morphologisch festzustellen); (Tag 14) erneut Bild wie in Kontrolltieren.

Die Betrachtung der Anzahl der zum jeweiligen Zeitpunkt proliferierenden Pdx1 exprimierenden Zellen zeigte, dass in NaCl behandelten WT Tieren nahezu keine Proliferation (0,2 Zellen pro GF) in dieser Zellpopulation stattfand (Abbildung 24). Während der *Inflammation*-Phase bis 36 h nach Behandlungsende fand sich eine tendenziell steigende Anzahl von 2,5 Zellen pro GF nach 12 h, auf 6,1 Zellen pro GF nach 36 h. Diese Anzahl sank auf minimale Werte von durchschnittlich 2,3 pro GF zwischen 48 h und Tag fünf und kehrte nach 14 Tagen erneut auf kontrollwerte von 0,2 Zellen pro GF zurück.

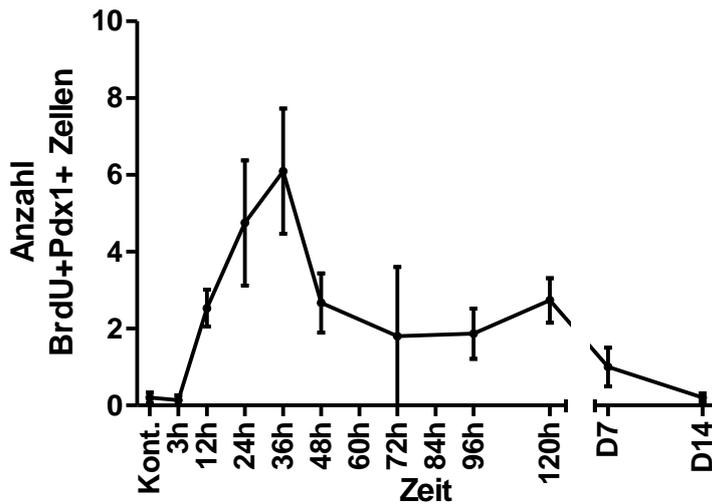


Abbildung 24: Anzahl an Pdx1 positiven proliferierenden Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Pdx1 in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Es findet sich eine geringe Proliferation von Pdx1-positiven Zellen während der gesamten Regeneration, mit leichter Häufung zum Zeitpunkt der ausklingenden *Inflammation*-Phase.

Anteilig an allen jeweils proliferierenden Zellen machte die Pdx1 positive Zellpopulation in gesunden WT Kontrolltieren 8,9 % aus (Abbildung 25). Nach 3 h war ihr Anteil bei vernachlässigbaren 0,3 %. Eine signifikante Erhöhung des Prozentsatzes von Pdx1 positiven Zellen an proliferierenden Zellen zeigte sich nach 36 h wo sie 23,2 % ausmachten. Zwischen Tag 5 und Tag 7 zeigte sich ein weiterer Gipfel von 8,4 % an Tag 5 bzw. 10,6 % an Tag 7. Am Ende des Beobachtungszeitraums machten Pdx1 positive Zellen 3,6 % aller proliferierenden Zellen aus.

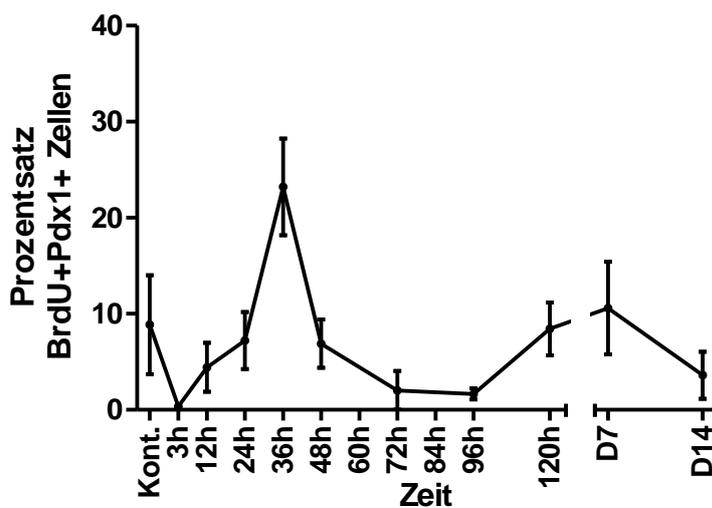


Abbildung 25: Prozentsatz an Pdx1 positiven proliferierenden Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Pdx1 in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Zum Übergang zwischen *Inflammation* und

Regeneration-Phasen findet sich ein Anstieg der Proliferation in Pdx1 positiven Zellen. Im Rahmen der *Refinement*-Phase ist die Proliferation in diesem Kompartiment erneut mit der Proliferation in Kontrolltieren vergleichbar.

4.6.2.2 Sox9

Im Menschen ist Sox9, ein Transkriptionsfaktor der Sry/HMG box, essentiell für eine normale Entwicklung sowohl des exokrinen als auch des endokrinen Pankreas. Haploinsuffizienz führt zu Defekten in beiden Zelllinien. In adulten Mäusen kann Sox9 in Zellen größerer pankreatischer Gänge detektiert werden, sowie in einigen Betazellen in Langerhans'schen Inseln (Lynn et al., 2007). In Antwort auf Caerulein-induzierte Pankreatitis zeigt sich regelmäßig eine erneute Expression von Sox9 in ursprünglich azinären Zellen. Die Formation von PDAC Vorgängerläsionen ist abhängig von ektopter Sox9 Expression (Kopp et al., 2012). Aufgrund dessen wurde des Weiteren Pankreasgewebe auf Proliferation in Sox9 positiven Zellen untersucht.

Im WT-Kontroll-Pankreas beschränkte sich die Expression von Sox9 erwartungsgemäß auf Zellen der exokrinen Gangstrukturen (Abbildung 26). Bereits drei Stunden nach Caeruleingabe zeigte sich in diesen Tieren eine vermehrte Expression von Sox9 in Zellen, die morphologisch nicht eindeutig Gangstrukturen zuzuordnen waren. Zu diesem, sehr frühen Zeitpunkt fanden sich nur vereinzelt Überlappungen der Sox9 und BrdU Färbung. Die positive Sox9 Färbung war nach 24 h maximal und nahm im Anschluss bis 48 h ab. Ab diesem Zeitpunkt war erneut eine Verteilung der Sox9 positiven Zellen wie in Kontrolltieren zu erkennen.

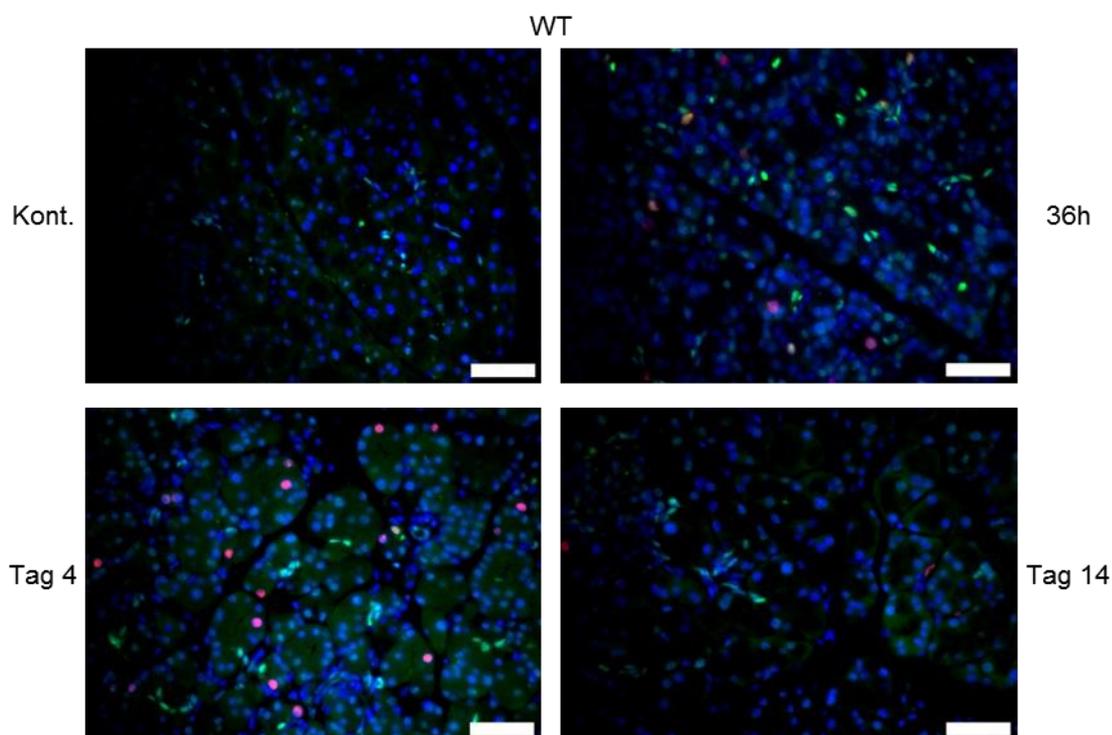


Abbildung 26: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Sox9-positiven Zellen im WT: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Sox9 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung im WT, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Sox9 Expression findet sich in Gangzellen (ohne proliferative Aktivität); (36 h) auch exokrine Zellen zeigen Sox9 Expression, zu diesem Zeitpunkt gehäuft Teilungen in Sox9-positiven Zellen; (Tag 4) Exokrine

Zellen verlieren graduell die Sox9 Expression, Proliferation in diesem Kompartiment findet sich nur noch vereinzelt; (Tag 14) erneut Bild wie in Kontrolltieren. IF veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Die Analyse der Anzahl an Sox9 positiven Zellen ergab einen Anstieg der Proliferation in der *Inflammation*-Phase von nahezu keinen Teilungen in Kontrolltieren (0,1 Zelle pro GF) bis zu einem Maximum an 7,4 Zellen pro GF nach 24 Stunden (Abbildung 27). Im Anschluss zeigte sich eine langsame Abnahme der Zellteilungszahl Sox9 positiver Zellen auf Werte ähnlich der Kontrollpopulation nach Tag 14 (0,2 Zellen pro GF).

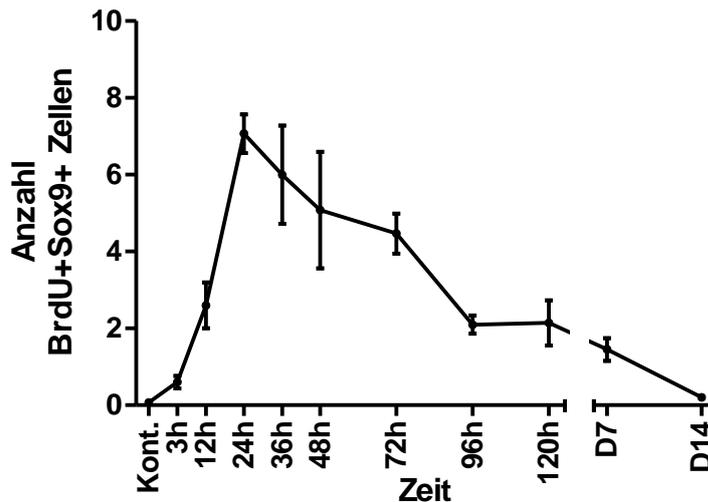


Abbildung 27: Anzahl an Sox9 positiven proliferierenden Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Sox9 in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Es findet sich eine geringe Proliferation von Sox9-positiven Zellen während der gesamten Regeneration, mit leichter Häufung zum Zeitpunkt der ausklingenden *Inflammation*- und beginnenden *Regeneration*-Phase. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Des Weiteren war auffällig, dass Sox9 positive Zellen in Kontrolltieren nur einen Anteil von 5,6% an allen proliferierenden Zellen darstellten (Abbildung 28). Bis 12 h nach Caeruleingabe war dieser Anteil relativ konstant (8,6 %). Im Anschluss ergab sich ab 24 h ein starker Anstieg bis zum Zeitpunkt von 36 h auf 52,7 % der Proliferation in Wild Typ Pankreata. Nach einer erneuten Abnahme auf durchschnittlich 6 % an Tag 4 kam es zu einem zweiten, kleineren Gipfel an Tag 5, an dem Sox9 positive Zellen erneut 20,6 % aller proliferierenden Zellen stellten. An Tag 14 waren noch 13,5 % aller teilenden Zellen Sox9 positiv. Dies zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Proliferation in Kontrolltieren.

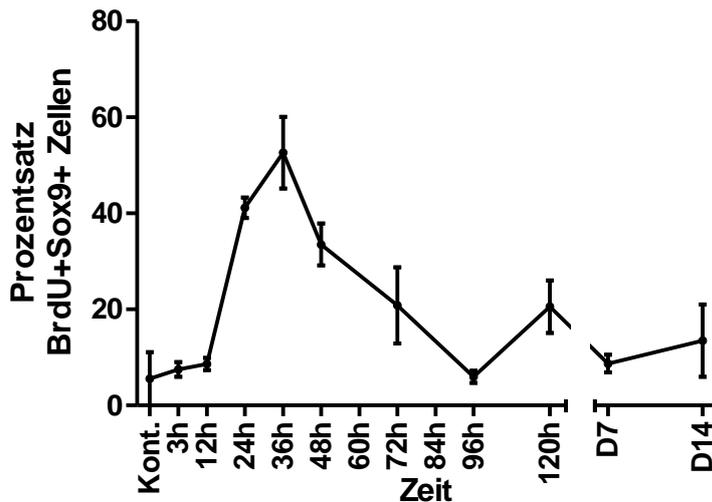


Abbildung 28: Prozentsatz an Sox9 positiven proliferierenden Zellen im WT: Der Graph zeigt Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Sox9 in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Es zeigt sich mit Ende der *Inflammation*- und Beginn der *Regeneration*-Phase ein hoher Prozentsatz von bis zu 52,7 % aller teilenden Zellen mit Sox9 positiver co-Färbung. Im Verlauf ergibt sich ein erneuter Abfall auf Werte um 10% mit Ende der *Regeneration*- und *Refinement*-Phasen.

4.7 Analyse der Proliferationsdynamik in Mesenchym und Stammzellähnlicher Population in *Kras^{G12D}* Tieren

Vergleichend soll im Folgenden die Proliferation in *Kras^{G12D}* Tieren betrachtet werden.

4.7.1 Proliferation im Mesenchym

Das Mesenchym ist bekannt für seine Tumor-verlaufsfördernde Wirkung in verschiedenen Geweben wie der Haut, der Brustdrüse (Kalluri and Zeisberg, 2006; Orimo et al., 2005) und der Prostata (Olumi et al., 1999). Die Vermutung wurde geäußert dass dies auch eine seiner Funktionen im PDAC ist, in Hinsicht darauf, dass das Tumorstroma einen großen Teil von Pankreastumoren ausmacht (Maitra and Hruban, 2008).

4.7.1.1 Vimentin

Eine vorhandene *Kras^{G12D}* -Mutation veränderte die mesenchymale Reaktion auf den Caerulein induzierten Entzündungsreiz grundlegend. Hier fand sich in Kontrolltieren zunächst eine dem WT ähnliche (Abbildung 15) Verteilung von Vimentin exprimierenden Zellen als Stütz- und Bindegewebszellen zwischen morphologisch normalen Azini (Abbildung 29). In Zonen fokaler ADMs fand sich bereits zu diesem Zeitpunkt eine stark vermehrte Vimentin positive Zellpopulation. In diesen Regionen waren Teilungen gesteigert auch in nicht Vimentin positiven Zellen zu verzeichnen. Drei Stunden nach Caeruleinadministration stellte sich der erste Zuwachs an Mesenchym im gesamten Pankreasgewebe dar mit einem großen Anteil an

sich teilenden Zellen im Vimentin positiven Zellkompartiment. Diese Entwicklung war anders als in WT Pankreata über den Zeitpunkt von 36 h anhaltend mit stetigem Zuwachs an Vimentin exprimierendem Bindegewebe und gesteigerter Proliferation in selbigem. Nach 84 Stunden waren große Teile des Gewebes aus Stroma bestehend, das sowohl Regionen mit ADMs und TCs umgab, als auch teilweise regenerierte azinäre Strukturen. An Tag 14 zeigte sich keine Abnahme von Vimentin positivem Mesenchym mit weiterhin Zellteilungen in diesem Gewebe.

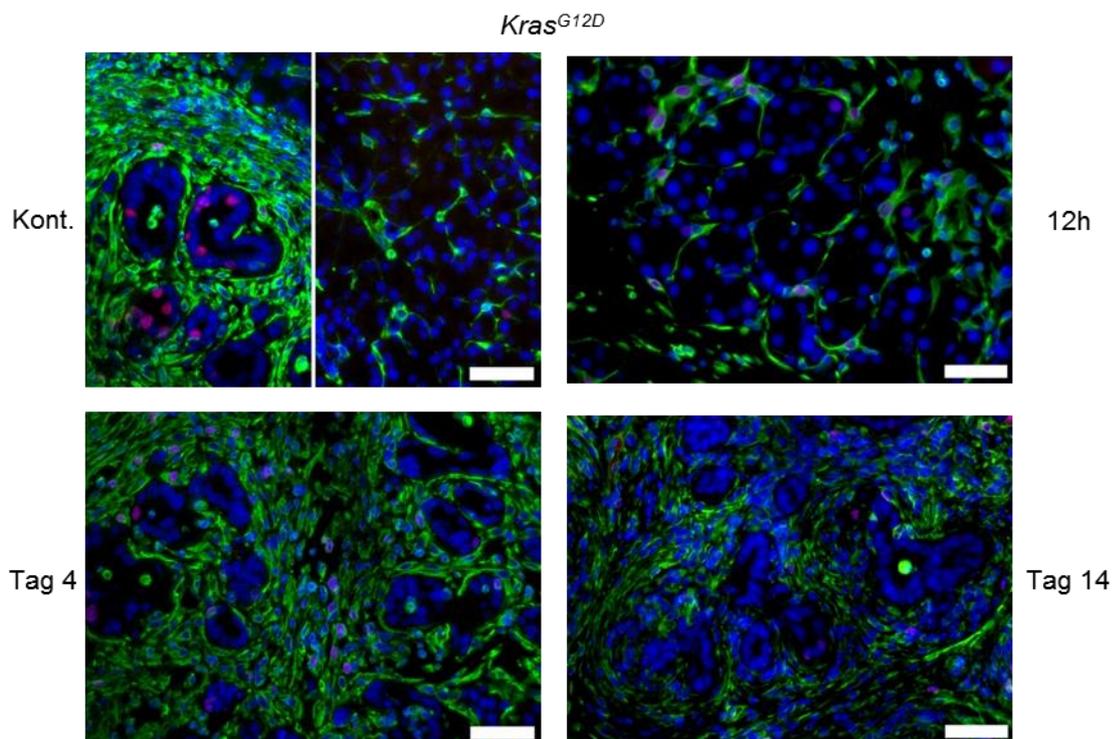


Abbildung 29: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Vimentin-positiven Zellen in *Kras^{G12D}* Mäusen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Vimentin (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung in *Kras^{G12D}* Pankreata, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Es finden sich zwei vorherrschende Bilder, einerseits eine, mit dem WT vergleichbare, Vimentin Expression in mesenchymalen Trennmembranen im regulären Pankreasgewebe (rechts) und im Gegensatz hierzu starke Zunahme an Vimentin-positivem Stroma in Regionen mit präformierten ADMs (hier auch vereinzelt Zellteilungen) (links); (12 h) Zunahme an Vimentin-positiven Zellen sowie deutliche proliferative Aktivität im mesenchymalen Kompartiment; (Tag 4) Weiterhin auch im Vergleich zum WT deutliche Überproduktion an Stroma mit zahlreichen Zellteilungen; (Tag 14) Bild vergleichbar mit Tag 4 unter Abnahme der Proliferation.

In *Kras^{G12D}* Mäusen zeigte sich ein dem WT vergleichbarer Anstieg der Proliferation Vimentin positiver Zellen von unbehandelten Tieren zu Tieren drei Stunden nach Caeruleingabe. Die Werte um 3 h und 12 h waren denen der WT Population nahezu identisch. Nach 24 h Stunden zeigte sich allerdings statt eines diskreten Abfalls von 23 Zellen pro GF auf 17,8 Zellen pro GF, ein weiterer Anstieg auf bis zu durchschnittlich 32,2 proliferierenden Vimentin exprimierenden Zellen pro GF (Abbildung 30). Auch während des Zeitraums nach 36 h entsprechend der WT-Regeneration-Phase fand sich keine Herabregulation der Bindegewebsproliferation in Pankreata mit onkogenem *Kras^{G12D}*. Zwischen 36 und 84 Stunden nach Behandlung fanden sich durchschnittlich 24 Zellen pro GF, mit schließlich nach 7 Tagen fallender Tendenz auf 12,5 pro GF und 3,7 Zellen pro GF nach 14 Tagen. Hiermit zeigte sich

eine gesteigerte Proliferation in mesenchymalen Kompartiment in *Kras^{G12D}* Mäusen, die sich auf den gesamten Beobachtungszeitraum erstreckte.

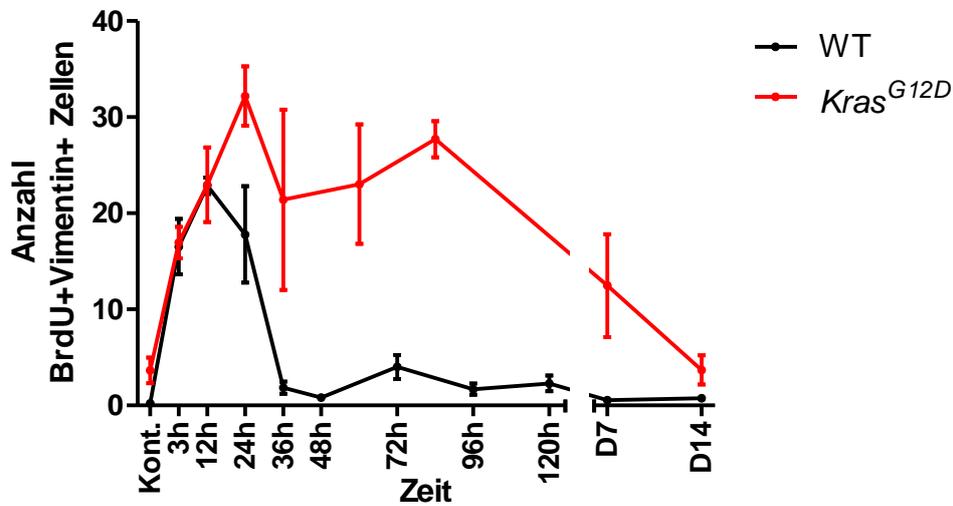


Abbildung 30: Anzahl an Vimentin positiven proliferierenden Zellen in *Kras^{G12D}* im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Zellen mit Expression von Vimentin in WT (schwarz) und *Kras^{G12D}* (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Im Vergleich zur Proliferation im WT, wo Teilungen in Vimentin-positiven Zellen strikt begrenzt auf die Inflammation-Phase erscheinen, zeigt sich in *Kras^{G12D}* Tieren eine deutlich verlängert erhöhte Proliferation von Vimentin-positiven Zellen mit langsamem Abfall erst nach 7 Tagen.

In Kontrolltieren mit mutiertem *Kras^{G12D}* war der Anteil von Vimentin positiven Zellen an der proliferierenden Population tendenziell erniedrigt gegenüber WT Tieren (Abbildung 31). Nach drei Stunden stieg dieser Prozentsatz auf bis zu 83,8 %, um bis 36 h nach Caeruleinbehandlung auf durchschnittlich 48 % abzufallen. Während des gesamten restlichen Beobachtungszeitraums entfiel ein relativ konstanter Anteil von zwischen maximal 68,6 % nach 60 h bis minimal 53,2 % an Tag 14 der proliferierenden Zellen auf das mesenchymale Kompartiment.

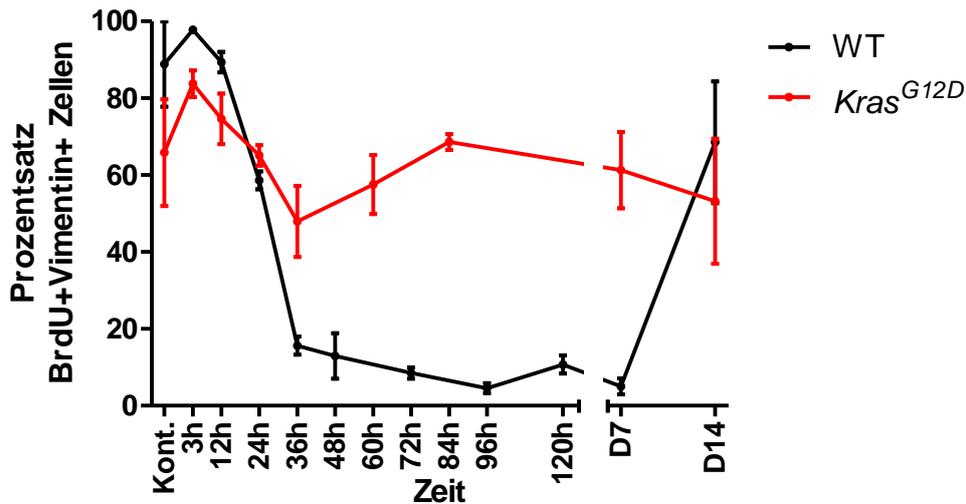


Abbildung 31: Prozentsatz an Vimentin positiven proliferierenden Zellen in *Kras*^{G12D} (rot) im Vergleich zum WT (schwarz): Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der Anteil von in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtheit Proliferierender Zellen. Prozentual stellen in *Kras*^{G12D} Tieren Vimentin-positive Zellen einen dauerhaft hohen Anteil an sich teilenden Zellen um 60 %.

4.7.1.2 α -SMA

Tiere mit Expression von onkogenem *Kras*^{G12D} zeigten, wie oben beschrieben, bereits ohne Caeruleinbehandlung fibrotische Areale mit ADM-formation. In diesen Arealen war auch in Kontrolltieren eine Aktivierung von PSCs mit gesteigerter Proliferation zu finden. Beginnend mit drei Stunden, aber im Vergleich zum WT gesteigert erst nach 12 bis 24h, stellte sich eine starke Aktivierung von PSCs dar mit α -SMA positiven Zellen die sämtliche Azini umgaben und eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate aufwiesen (Abbildung 32, Abbildung 34). Mit zunehmendem fibrotischem Umbau des Pankreasgewebes in *Kras*^{G12D} Mäusen war eine anhaltende α -SMA positive Population an Zellen zu beobachten mit, den gesamten Beobachtungszeitraum umfassender erhöhter, proliferativer Aktivität.

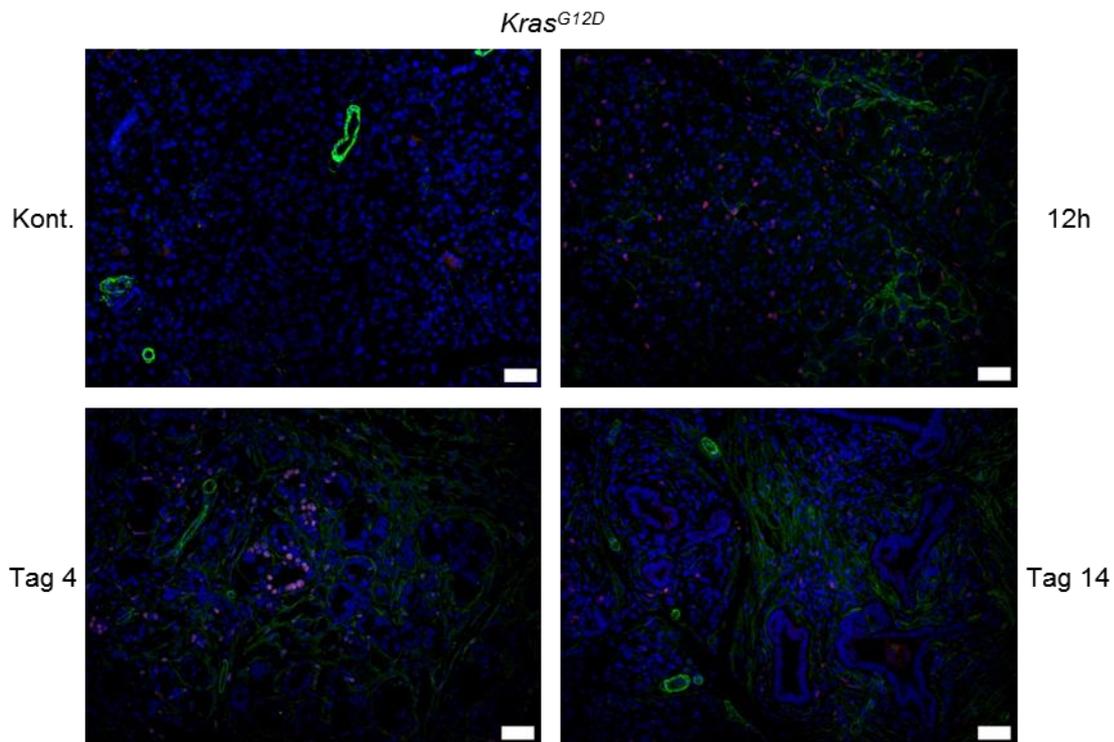


Abbildung 32: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in α -SMA-positiven Zellen in *Kras^{G12D}* Mäusen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der α -SMA (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung in *Kras^{G12D}* Pankreata, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Ausschließlich Zellen in Gefäßen zeigen α -SMA Expression, dies ohne Proliferation; (12 h) erste Aktivierung von pankreatischen Stellatumzellen mit Lokalisation interstitiellen Raum bei, im Vergleich zum WT, steigender und gesteigerter Proliferation in dieser Zellpopulation; (Tag 4) weiterhin deutliche Überproduktion und Proliferation von aktivierten Stellatumzellen mit starker Abweichung zur Präsentation des WT; (Tag 14) ADM, TC und AFL sind eingebettet in eine überschießende Menge an desmoplastischem Stroma bestehend aus α -SMA positivem Mesenchym (es finden sich ebenso weiterhin gesteigert Zellteilungen in aktivierten Stellatumzellen). IF veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Bis 36 h war in *Kras^{G12D}* Tieren ein steiler Anstieg der Proliferation von aktivierten PSCs auf durchschnittlich 50,6 Zellen pro GF zu verzeichnen (Abbildung 33). Im Anschluss kam es zu einem graduellen absinken der Teilungsaktivität in dieser Zellpopulation mit weiterhin im Vergleich zum WT signifikant erhöhten 23,4 Zellen pro GF nach 7 Tagen und final bis zu 3,6 Zellen an Tag 14.

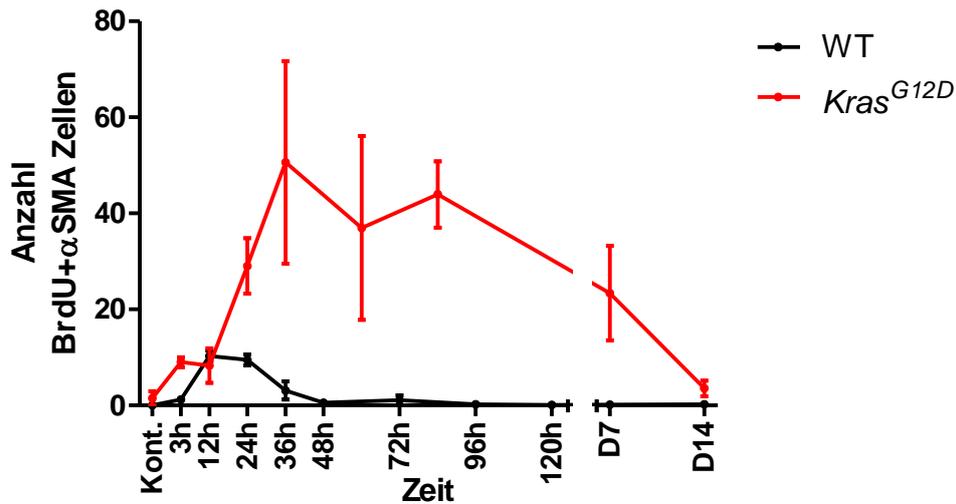


Abbildung 33: Anzahl an α -SMA positiven proliferierenden Zellen in *Kras*^{G12D} im Vergleich zum WT. Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in α -SMA positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras*^{G12D} Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. In *Kras*^{G12D} Tieren zeigt sich eine im Vergleich zum WT deutlich gesteigerte Anzahl an Zellteilungen in α -SMA positiven Zellen, welche erst nach 7 Tagen rückläufig ist und 14 Tage nach Induktion der Pankreatitis erneut vergleichbar ist mit der Proliferation in Kontrolltieren dieses Genotyps. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Bei Betrachtung der prozentualen Proliferation der aktivierten PSCs in *Kras*^{G12D} Pankreata fiel auf, dass schon in Kontrolltieren durchschnittlich 5,6 % der proliferierenden Zellen auf diese Population entfielen (Abbildung 34). Bis drei Stunden nach Caeruleinapplikation ergab sich ein steiler Anstieg dessen auf durchschnittlich 15,9 %. Zum Zeitpunkt der maximalen Proliferation dieses Kompartiments in WT Tieren 12h nach Behandlung waren wiederum die *Kras*^{G12D} Werte mit 9,8 % denen in WT Tieren mit 11,3 % vergleichbar. Bis 24 h steigerte sich der Prozentsatz den die aktivierten PSCs an den proliferierenden Zellen ausmachen auf durchschnittlich 23,8 % und blieb danach wiederum konstant bei durchschnittlich 29 % (Mean 24 h bis D 7). Nach 14 Tagen entfielen weiterhin 16,1 % der proliferierenden Zellen auf die Population der α -SMA positiven Zellen.

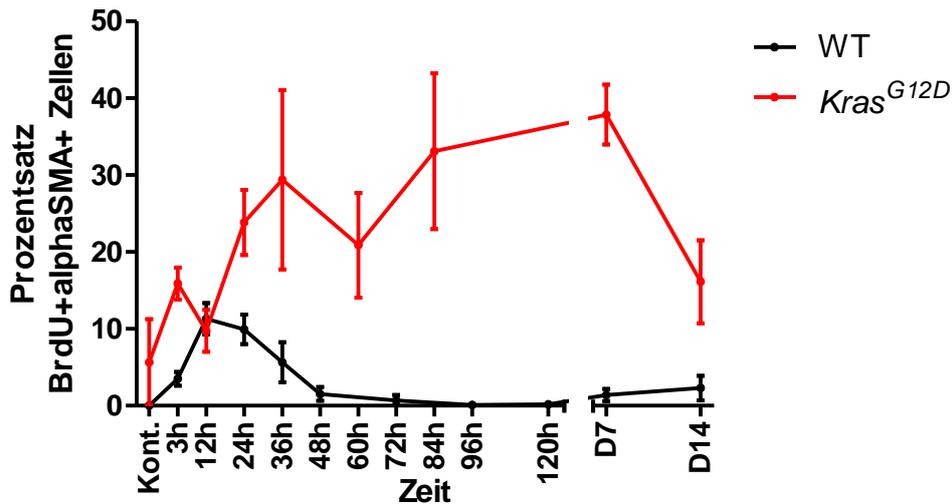


Abbildung 34: Prozentsatz an α -SMA positiven proliferierenden Zellen in *Kras*^{G12D} im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in α -SMA positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras*^{G12D} Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtzahl der in der S-Phase befindlichen Zellen. Prozentual stellen α -SMA positive Zellen einen im Vergleich zum WT deutlich erhöhten Anteil der Teilenden Zellen nach Pankreatitis dar. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Im gesunden Pankreas sowohl in WT als auch unter Einfluss einer *Kras*^{G12D} Mutation im morphologisch gesunden Anteil des Organs ist demnach die α -SMA Expression auf Gefäßwände beschränkt. Unter Einfluss von akutem Organschaden werden kurzfristig im Rahmen der *Inflammation*-Phase in WT Pankreata die PSCs aktiviert und α -SMA in weiten Teilen des Interstitiums exprimiert unter gesteigerter Proliferation in diesem Kompartiment. In *Kras*^{G12D} Pankreata nimmt die initiale Entzündungsreaktion keinen zeitlich regulierten limitierten Verlauf und ebenso bleibt die Proliferation in α -SMA positiven aktivierten PSCs aufrechterhalten, was zu einer dauerhaften, starken Zunahme des interstitiellen Gewebes führt.

4.7.2 Proliferation in einer Stammzellmarker exprimierenden Zellpopulation

4.7.2.1 *Pdx1*

In *Kras*^{G12D} Tieren verlief die Re-Expression von *Pdx1* primär ähnlich der Beobachtungen im WT. In Kontrolltieren war die *Pdx1* Expression limitiert auf Inselzellen (Abbildung 35). Auffälliger Weise waren in Regionen mit ADM-Formation die Zellen in ADMs *Pdx1* positiv (Abbildung 35 Kont. links). Die frühe entzündliche Phase nach 3 h stellte sich den Kontrolltieren ähnlich dar. Nach 12 h fand sich deutliche *Pdx1*-Positivität in epithelialen Zellen. Bis 60 h war diese Entwicklung komplett und in nahezu allen epithelialen Zellen konnte eine *Pdx1* Expression nachgewiesen werden. Im Anschluss nach 84 h erschien die *Pdx1* Expression in teilweise regenerierten Azini abzunehmen, während sie in Regionen von ADM und AFL

Formation weiterhin hoch blieb. Diese Entwicklung setzte sich fort bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes. An Tag 14 konnte weiterhin eine starke Expression von Pdx1 in AFL und ADMs beobachtet werden, während Zellen des Interstitiums sowie mutmaßlich regenerierter Azini keine Färbung mehr offenbarten.

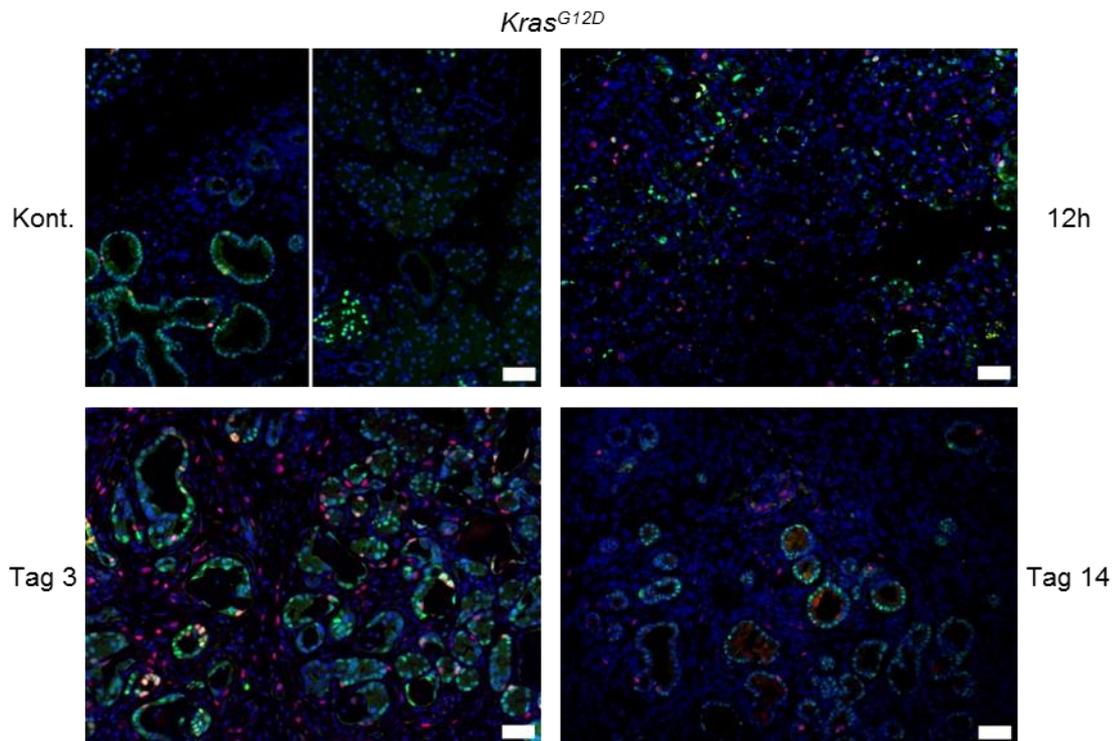


Abbildung 35: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Pdx1-positiven Zellen in *Kras^{G12D}* Mäusen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung in *Kras^{G12D}* Pankreata, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Einerseits starke Pdx1 Expression in Zellen in präformierten ADMs, mit gehäufter Proliferation in diesen Zellen, andererseits in regulärem Pankreasgewebe Pdx1 Expression ausschließlich in Zellen in Langerhans'schen, dies ohne Proliferation; (36h) mit fortschreiten der *Inflammation*-Phase präsentiert sich die große Mehrheit der exokrinen Zellen mit Pdx1 Expression im Zellkern und gesteigerter Proliferation in dieser Zellpopulation; (Tag 3) keine Abschwächung der Pdx1-Positivität in exokrinen Zellen in ADM und TCs mit weiterhin gesteigerter Proliferation, bei erhaltener Färbung von Langerhans'schen Inselzellen (wenige Teilungen in der β -Zellpopulation, soweit morphologisch festzustellen); (Tag 14) Metaplastisches Gewebe sowie TCs und AFLs zeigen starke Pdx1 Expression bei vereinzelter Zellteilungen.

Kontrolltiere mit onkogener *Kras^{G12D}* Mutation zeigten vergleichbare Werte wie WT Kontrolltiere von 1,6 proliferierenden Pdx1 positiven Zellen pro GF. Bereits 3 h nach Caeruleinapplikation fand sich eine im Vergleich zum Wild Typ deutlich erhöhte Proliferation in Pdx1 positiven Zellen (Abbildung 36). Hier stieg die Anzahl von 16 Zellen pro GF nach 3 h kontinuierlich auf bis zu 34,9 Zellen pro GF nach 60 h. Ein signifikanter Abfall war bis 84h zu verzeichnen. Hier waren noch durchschnittlich 17,1 Zellen pro GF proliferativ. Bis Tag 7 zeigte sich wiederum kein Abfall. Nach 14 Tagen kehrte die Proliferation in der Pdx1 positiven Zellpopulation auf nahezu ursprüngliche Werte von 3,8 Zellen pro GF zurück.

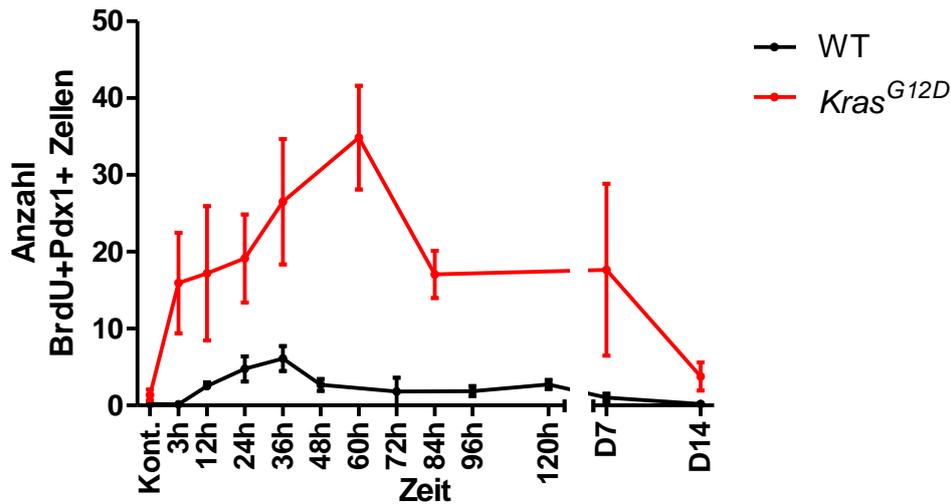


Abbildung 36: Anzahl an Pdx1 positiven proliferierenden Zellen in *Kras*^{G12D} im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Pdx1 positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras*^{G12D} Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. In *Kras*^{G12D} Tieren findet sich bereits zu Beginn der Inflammation eine erhöhte Anzahl an Teilungen von Pdx1 positiven Zellen, dies steigend über die ersten 60h. Ab 84h nach Induktion der Pankreatitis bis Tag 14 zeigt sich eine schrittweise Reduktion auf Werte wie in Kontrolltieren.

In *Kras*^{G12D} Mäusen machten die Pdx1 positiven Zellen einen nahezu konstanten Anteil von durchschnittlich 18,4 % ($\pm 1,3$) über den gesamten Beobachtungszeitraum aus (Abbildung 37). Dieser war somit durchgehend gegenüber dem Wild Typ (7,0 % ($\pm 1,9$)) erhöht ($p=0,0002$; t-test) mit Ausnahme des Zeitpunkts von 36 h wo der Prozentsatz im Wild Typ bei 23,2 %, während er in *Kras*^{G12D} Tieren bei nur 20,9 % lag. Somit stellt sich anteilig an der Gesamtproliferation zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen dar.

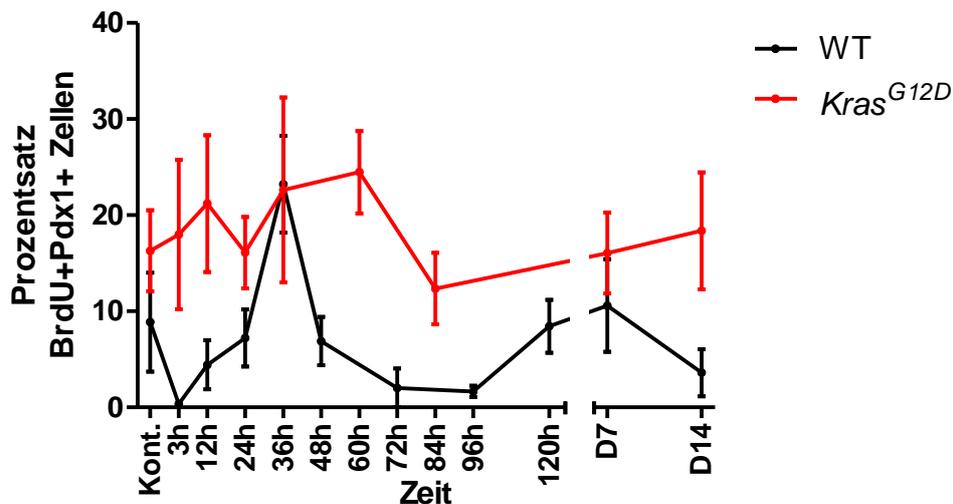


Abbildung 37: Prozentsatz an Pdx1 positiven proliferierenden Zellen in *Kras*^{G12D} im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Pdx1 positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras*^{G12D}

Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtzahl der in der S-Phase befindlichen Zellen. Im WT zeigt sich über den gesamten beobachtungszeitraum eine relativ konstant niedrige Proliferation in Pdx1 positiven Zellen, welche jedoch zum Zeitpunkt von 36h einen signifikanten Anteil an allen teilenden Zellen ausmacht. In *Kras^{G12D}* Tieren zeigt sich bereits in Kontrolltieren ein erhöhter Anteil an Proliferierenden Zellen als Pdx1 positiv, dies relativ konstant um 20 % aller teilenden Zellen.

4.7.2.2 Sox9

Die Verteilung von Sox9 positiven Zellen in Kontrolltieren mit onkogenem *Kras^{G12D}* war der im WT vergleichbar. Im Normalgewebe fanden sich positive Zellen ausschließlich in Pankreasgängen (Abbildung 38). In starkem Kontrast hierzu stellten sich Regionen mit präformierten ADMs dar, hier dehnte sich die Sox9 Expression auf Zellen in ADMs aus. Nach drei Stunden stellte sich ebenso eine Expression von Sox9 in sämtlichen exokrinen Zellen ein, bei fortbestehender Expression in präformierten fortgeschrittenen Läsionen. Beginnend ab 12 h waren gehäuft Zellteilungen in Sox9 positiven Zellen zu erkennen. Nach 84 h war die Sox9 Expression in regenerierenden Azini deutlich vermindert, während sie in vorhandenen ADMs, AFLs sowie Pankreasgängen unverändert hoch erschien. Bis Tag 14 festigte sich dieses Bild. Zu diesem Zeitpunkt fanden Teilungen vornehmlich in Sox9 positiven Zellen statt.

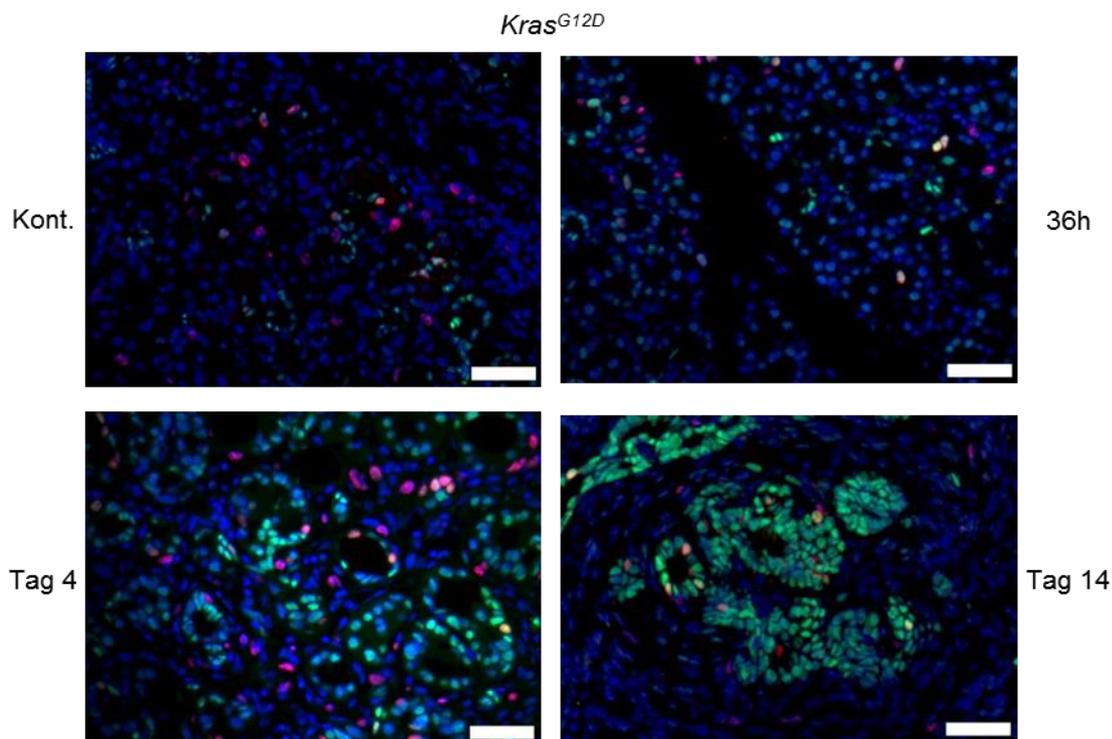


Abbildung 38: IF zur quantitativen Bestimmung der Proliferation in Sox9-positiven Zellen in *Kras^{G12D}* Mäusen: Die Bilder zeigen repräsentative Schnitte der Pdx1 (Grün) und BrdU (Rot) Co-Färbung in *Kras^{G12D}* Pankreata, Nuklei wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt; (Kont.) Sox9 Expression findet sich in Gangzellen (ohne proliferative Aktivität) sowie in Zellen präformierter ADM (mit im Vergleich zum Normalgewebe erhöhter Teilungsrate); (36 h) Sox9 Expression dehnt sich auf nahezu alle Zellen des Exokrinen Kompartiments aus, zu diesem Zeitpunkt eine dem WT vergleichbare Teilungsrate in Sox9-positiven Zellen; (Tag 4) kein Verlust von Sox9 Expression in exokrinen Zellen, Proliferation in diesem Kompartiment bleibt deutlich über das Level des WT erhöht; (Tag 14) Zellen in ADM, TC und AFL zeigen deutliche Sox9 Expression mit weiterhin gesteigerter Proliferation Sox9-positiver Zellen. IF veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

Im Vergleich zum WT hatte die Anzahl an S-phase, Sox9 positiven Zellen in Mäusen mit onkogenem $Kras^{G12D}$ einen ähnlichen Verlauf mit durchschnittlich 1,7 Zellen pro GF in Kontrolltieren. Ein Gipfel der Proliferation ergab sich ebenso nach 36 h (16,7 Zellen / GF). Im weiteren Verlauf hingegen zeigte sich eine erhöhte Proliferation (16 Zellen / GF nach 84 h) sowie ein mangelnder Rückgang auf anfängliche Werte nach Tag 14 (5,2 Zellen / GF). Somit war die Anzahl an proliferierenden Sox9 exprimierenden Zellen in $Kras^{G12D}$ Pankreata kontinuierlich erhöht und erreichte mehr als eine Verdopplung der Werte im Vergleich zu WT Tieren.

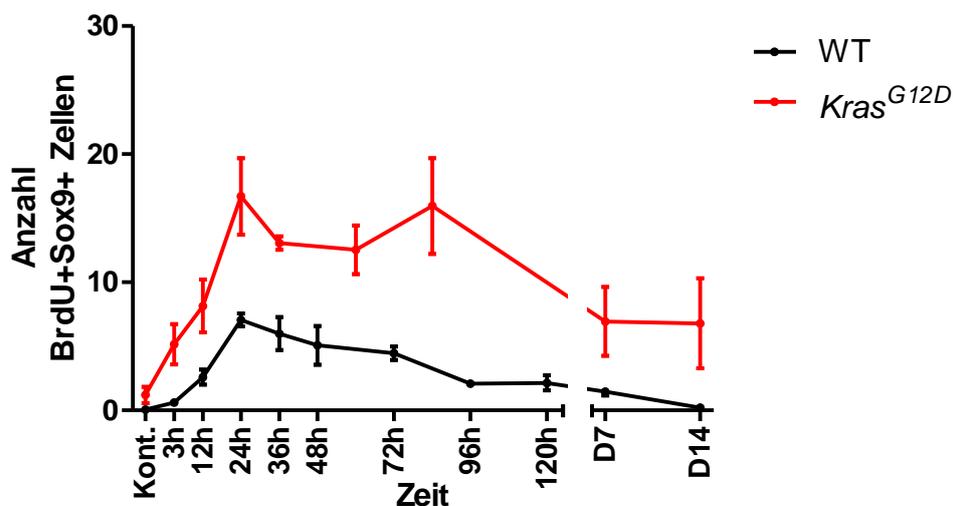


Abbildung 39: Anteil an Sox9 positiven proliferierenden Zellen in $Kras^{G12D}$ im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Sox9 positiven Zellen bei WT (schwarz) und $Kras^{G12D}$ Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier die absolute Anzahl an in der S-Phase befindlichen Zellen mit Expression des Markers. Im Vergleich zum WT zeigen $Kras^{G12D}$ Tiere einen steileren Anstieg der Proliferation von Sox9 positiven Zellen, auch findet sich im starken Kontrast zum WT im Verlauf kein kompletter Rückgang der Proliferation in diesem Kompartiment. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

In $Kras^{G12D}$ Pankreata zeigte sich keine mit dem WT vergleichbare zeitlich koordinierte Schwankung der anteiligen Proliferation von Sox9 positiven Zellen. In Kontrolltieren war diese Population prozentual bereits gesteigert an der Proliferation beteiligt, mit 24,4 %. Ein Gipfel ergab sich ebenso bei 36 h mit 41,9 %, im Anschluss blieb dieser Anteil jedoch deutlich erhöht bis zum Ende des Beobachtungszeitraums mit 33,9 % der teilenden Zellen. Somit war der Anteil an Sox9 exprimierenden, proliferierenden Zellen in $Kras^{G12D}$ Tieren während des gesamten Experiments höher als in der *Regeneration*- und *Refinement*-phase in WT Tieren ($p=0.011$; t-test), jedoch nicht höher als in der *Inflammation*-Phase der WT Tiere. Dies demonstriert, dass Progenitorzellen im WT-Pankreas vornehmlich während der *Inflammation*-Phase, im Pankreas mit mutiertem $Kras^{G12D}$ während der gesamten frühen Karzinogenese proliferieren.

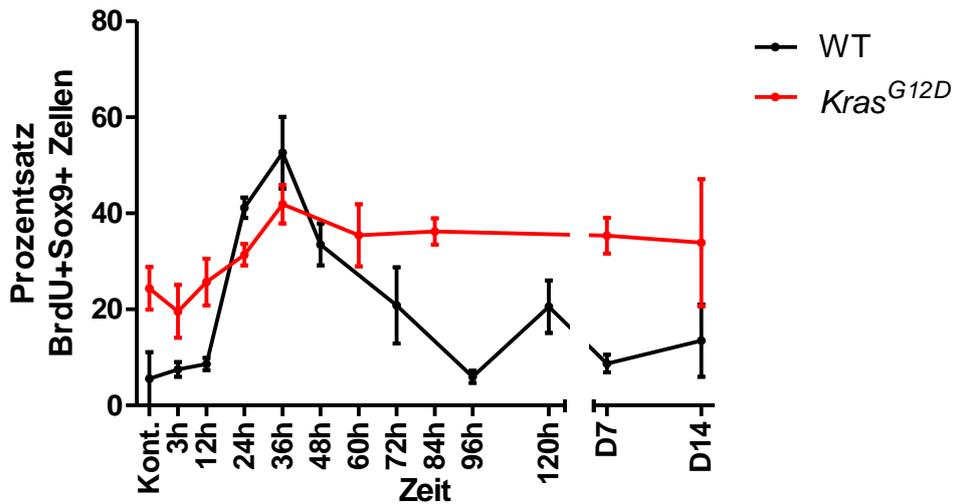


Abbildung 40: Prozentsatz an Sox9 positiven proliferierenden Zellen in *Kras*^{G12D} im Vergleich zum WT: Die Graphen zeigen Daten der quantitativen Auswertung der Proliferation in Sox9 positiven Zellen bei WT (schwarz) und *Kras*^{G12D} Tieren (rot) in Funktion der Zeit. Kontrolltiere wurden als Zeitpunkt 0 angezeigt. Betrachtet wird hier der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen mit Expression des Markers an der Gesamtzahl der in der S-Phase befindlichen Zellen. Im Vergleich zum WT zeigen *Kras*^{G12D} Tiere keine klar zeitlich gesteuerte Proliferation von Sox9 positiven Zellen, ihr Anteil an allen Zellteilungen steigt bis 36h schrittweise an und verbleibt bis zum Ende der Beobachtungsspanne auf erhöhten Werten. Quantifizierung veröffentlicht in (B. Kong et al., 2016).

5 Diskussion

Das PDAC als eine Krebserkrankung mit ausgesprochen niedriger 5 Jahres Überlebensrate entgeht bis dato sowohl einer frühen Diagnose als auch suffizienten Therapiemöglichkeiten. Die Forschung zur frühen Entstehung des PDAC am Menschen ist aus oben (Abs.: 1.9) dargestellten Gründen nicht, oder nur sehr begrenzt möglich. Viele zelluläre Vorgänge sind jedoch nur teilweise verstanden und bedürfen dringend einer detaillierten Klärung. Das Tiermodell der Maus ist hierfür besonders geeignet, da in diesem Modellorganismus über Einbringen der typischen, auch im Menschen gefundenen Mutationen, wie z.B. der onkogenen *Kras* Mutation, ein dem menschlichen Tumor sehr gut vergleichbares Karzinom entsteht. Zur Initiierung der Karzinogenese spielt, in Kombination mit der *Kras* Mutation, die Pankreatitis eine Schlüsselrolle.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind, die Histologie der Regeneration bzw. der frühen Karzinogenese nach dem zeitlichen Verlauf darzustellen. In Ergänzung zu früheren Publikationen, um nur exemplarisch zu zitieren (Guerra et al., 2007, 2011; J. Morris et al., 2010; J. P. Morris et al., 2010; Puri and Hebrok, 2010), ist besonderes Ziel der dargelegten Untersuchungen, die zeitlich kleinschrittige Analyse und die direkte Gegenüberstellung beider Genotypen. Des Weiteren soll die Proliferationsdynamik in Pankreata mit *Kras*^{G12D} Mutation offengelegt und die Proliferationsdynamik aufgeteilt in vorhandene Zellkompartimente untersucht und verglichen werden. Eine weitere Aufgabe ist, eine Datenbank der Genexpression im Pankreas nach Pankreatitis zur Verfügung zu stellen und erste Auswertungen dieser Datenbank darzulegen.

Aufgrund der Menge an erzeugten Daten wurden Teile der hier vorgestellten Ergebnisse in enger Zusammenarbeit mit Kollegen der gleichen und anderer Arbeitsgruppen erhoben und ausgewertet (siehe Material und Methoden: Abschnitt 0). Zudem konnten Teile der erhobenen Daten bereits publiziert werden. Diese sind im Text als solche konkret gekennzeichnet und zitiert.

5.1 Histologische Analyse der Regeneration und frühen Krazinogenese

Erstmalig konnten wir hier vergleichend zwischen WT und *Kras*^{G12D} Tiere den Verlauf nach entzündlicher Schädigung des Pankreas in hoher zeitlicher Auflösung darlegen. Hierzu wurden zu 13 (WT) beziehungsweise 9 (*Kras*^{G12D}) Zeitpunkten Pankreasgewebe der Maus nach Stimulation mit supramaximalen Dosen des Cholezystokininanalogons Caerulein gewonnen und auf histologischem und transkriptions-level analysiert. Hierbei wurde im Rahmen dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf die frühe Karzinogenese in *Kras*^{G12D} transgenen Mäusen gelegt. Wir konnten darlegen, dass die Dreiteilung der Regeneration in *Inflammation*, *Regeneration* und *Refinement*, wie sie im Wildtyp getätigt wurde (B. Kong et al., 2016), in *Kras*-

Tieren keine Entsprechung findet. Vielmehr zeigte sich in diesen Tieren bereits ab 36h nach Stimulation eine Abweichung der Organhistologie weg von einer Rückbildung der entzündlichen Veränderungen und hin zu PDAC Vorläuferläsionen. Aus diesem Grund sollten zukünftige Arbeiten diese sehr frühen Zeitpunkte nach inflammatorischem Insult besonders untersuchen.

Histologisch rekapitulieren die hier vorgelegten Ergebnisse somit den, von anderen Forschungsgruppen bereits beschriebenen, Regenerationsblock in *Kras*^{G12D} Tieren (J. P. Morris et al., 2010).

5.2 Transkriptionsanalysen bestätigen die vollständige Regeneration beim WT und die Perpetuierung der Inflammationsantwort in *Kras*^{G12D} Pankreata

Die Ergebnisse der RNA-Transkriptionsanalyse bestätigen die histologisch getätigte Einteilung in drei Phasen im Wildtyp und zeigen ein Anhalten des inflammatorischen Transkriptionsmusters in Tieren mit onkogener *Kras* Mutation. Zudem spezifizieren sie eine entzündliche „Signatur“ die während der *Inflammation*-Phase des WTs sowie der frühen Karzinogenese unter *Kras*^{G12D} vorhanden ist. Eine ausführliche Diskussion der Daten findet sich bereits in den Vorarbeiten von Bruns und Kong, Bruns, Behler et al. (Bruns, 2016; B. Kong et al., 2016).

Hierbei bleibt die Frage, ob die Aufrechterhaltung dieses inflammatorischen Transkriptionsmusters allein der Verlängerung des aktiven *Kras*-signals bei onkogener Mutation geschuldet ist oder welche anderen molekularen Mechanismen die Divergenz der Regeneration in *Kras*^{G12D} Mäusen bestimmen.

Bekannt ist, dass nach Cholecystokiningabe (CCK) sowie nach Caeruleinapplikation (welches CCK imitiert) sowohl WT *Kras* als auch *Kras*^{G12D} aktiviert werden. Im WT zeigt sich nur eine transiente Aktivierung von einigen Stunden, während in *Kras* Tieren eine permanent gesteigerte Ras-Aktivierung zu finden ist (Daniluk et al., 2012). Gestützt durch die im Rahmen unserer Arbeit durchgeführte RNA-Analyse stellen wir fest, dass *Kras* (sowohl WT wie auch mutiert) durch seine Aktivierung eine Genexpression welche zur Organ-Inflammation führt aktiviert und für den Zeitraum seiner Aktivierung aufrecht erhält. Diese Hypothese stützen auch Ergebnisse von Ji et al., die beschreiben, dass über eine kritische Grenze erhöhte Ras-Aktivitätslevel zu chronischer Entzündung und daneben zur spontanen PanIN und PDAC-Bildung führen (Ji et al., 2009). Ebenso wird diese Feststellung auch im Hinblick auf die Funktionsweise der *Kras* Mutation, die eine Aktivitätsverlängerung ohne sonstige Veränderung des Proteins zur Folge hat gestützt.

Zur Bestätigung dessen sollte in zukünftigen Arbeiten untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt der Kras-Signalweg erstmals aktiviert wird, ob die Beendigung der inflammatorischen Phase im WT nach 36 h mit der Inaktivierung von Kras korreliert und ob in *Kras*^{G12D} Tieren die Kras-Aktivität über den gesamten Beobachtungszeitraum erhöht bleibt.

5.3 Analyse der Proliferationsdynamik

Zur Feststellung, ob die, auf transkriptionsebene gefundenen, Ähnlichkeiten der *Kras*^{G12D} initiierten Karzinogenese mit der WT *Inflammation*-Phase auch auf Ebene der Zellproliferationsmuster übereinstimmt wurden Proliferationsanalysen angestellt. Durch Vorarbeit mit WT Tieren konnte die allgemeine Proliferation nach inflammatorischem Insult im WT in zwei, voneinander eindeutig getrennte Aktivitäts-Peaks geteilt werden (B. Kong et al., 2016). Diese zwei Peaks rekapitulieren die Aufteilung der Regeneration in Phasen. Der erste Peak findet seinen Gipfel während der *Inflammation*-Phase mit maximalem Anstieg während der ersten 12h. Ebenso bestätigt diese Analyse den Zeitpunkt von 36h nach Caeruleingabe als Wendepunkt der Regeneration mit erneut minimalem Proliferationsquotienten. Der hierauf folgende zweite Peak entspricht der *Regeneration*- und *Refinement*-Phase.

5.3.1 Die frühe *Kras*^{G12D} induzierte Karzinogenese beruht nicht primär auf permanent gesteigerter Zellteilung

Auf Boden der Hypothese, dass ein Karzinom dadurch entsteht, dass Zellen die Fähigkeit erlangen autonom zu proliferieren (Hanahan et al., 2000; Hanahan and Weinberg, 2011), bestand die Erwartung, dass in Tieren mit *Kras*^{G12D} Mutation keine Normalisierung der Zellteilungsrate zu finden sei.

Die Ergebnisse der *Kras*^{G12D} Proliferationsanalyse bestätigen, dass sich keine eindeutige Trennung in Phasen vollziehen lässt. Es zeigen sich zwar auch in diesem Genotyp zwei Peaks von Proliferation, diese weisen jedoch keine signifikante Erhöhung im Vergleich zu dem Minimum an 36 und 60h auf (24h zu 36+60h p=0,1023; t-test und 84h zu 36+60h p=0,2303; t-test). Des Weiteren zeigt sich im *Kras*^{G12D} Genotyp eine deutlich erhöhte, bis hin zu verdoppelte Proliferation im Vergleich zum WT. Daher kann man die Proliferation im *Kras*^{G12D} als in geringerem Maße kontrolliert, allgemein gesteigert und prolongiert bezeichnen.

Entgegen der Erwartungen zeigt sich aber in der *Kras*^{G12D} gesteuerten frühen Karzinogenese keine permanent signifikant gesteigerte Proliferation. Vielmehr kehrt die Proliferation nach 14 Tagen auf ein nahezu „normales“ Niveau für den Zellumsatz des gesunden Pankreas zurück.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich innerhalb des beobachteten Zeitraums eine Veränderung in dem Organ abgespielt hat, die eine für die Karzinogenese initiierende Wirkung hatte. Der hohe Prozentsatz an Zellteilungen, der als karzinogen verdächtigt wird, nimmt bereits nach 7-14 Tagen wieder ab. Dennoch entwickelt sich in der Folge Krebs. Somit müssen

die Weichen hierzu bereits 14 Tage nach Caeruleinapplikation gestellt sein. Für diese „Weichenstellung“ gibt es 2 Optionen. Entweder ist es bereits zu diesem Zeitpunkt zur Bildung eines malignen Zellklons gekommen der im Folgenden spezifisch expandiert, oder es wurden im Pankreas Mikroumfeld Veränderungen provoziert die auch ohne Steigerung der Proliferation maligne Zellklone bevorzugen.

5.4 Analyse der Proliferationsdynamik im azinären Kompartiment

In Früheren Publikationen wurde die Vermutung geäußert, dass eine Zellpopulation die als Ursprung für PDAC gewertet werden kann bereits während der frühen Karzinogenese eine herausragende proliferative Aktivität zeigen könnte (Kong et al., 2011). Diese Zellpopulation könnte hypothetisch bei einem Vergleich der Proliferation im WT mit derer in Mäusen die onkogenes *Kras*^{G12D} exprimieren, erkannt und im Folgenden genauer charakterisiert werden. Auf Boden dieser Vermutung wurde die Proliferation in beiden Genotypen unter Betrachtung der einzelnen Organ-Kompartimente: exokrin, duktal, mesenchymal analysiert.

Als derjenige Zelltyp der primär durch die Caerulein-induzierte Pankreatitis zerstört wird (Bhatia, 2004; Bhatia et al., 2005; Gukovskaya et al., 2002) und als vermuteter Zelltyp der am Ursprung von PDAC stehen könnte (Guerra et al., 2007; Kong et al., 2011; Miyamoto et al., 2003), war von primärem Interesse, die Proliferation im azinären Kompartiment zu betrachten. Hierbei betrachtet wurden Zellen, die ihre finale Differenzierung zum azinären Zelltyp vollendet hatten, insofern als dass sie das exokrine Enzym Amylase exprimieren.

Hier zeigte sich die klare Unterteilung der Proliferation im Wildtyp mit geringerem Anteil dieses Kompartiments an der Proliferation von 60% während der *Inflammation*-Phase und klarem Anstieg der Teilungsrate nach 36h bis 48h auf bis zu 100% aller teilenden Zellen. Dies findet in zeitlicher Übereinstimmung mit den histologisch festgelegten Phasen statt.

In verschiedenen Publikationen wird im Rahmen der primären Organ-Regeneration eine Herunterregulation des azinären Programmes, im Sinne einer Dedifferenzierung von adulten Azinuszellen beschrieben (Jensen et al., 2005; J. P. Morris et al., 2010). Zur Begründung für die initiale azinäre Dedifferenzierung sind bisher nur Vermutungen gemacht worden. Es gibt drei Ansätze, die in Erwägung gezogen wurden, wobei auch eine parallele Wirkung dieser Möglichkeiten denkbar ist.

Zum einen könnte die Dedifferenzierung zum Zellschutz der Azinuszellen beitragen, insofern, als dass Zellen im Stammzellprogramm weniger anfällig sind für externe Beschädigung (Stanger and Hebrok, 2013).

Als zweite Erklärung ist vorstellbar, dass Zellen ohne terminale azinäre Differenzierung für umliegende Zellen sowie für den gesamten Organismus weniger gefährlich sind. Unter der

Annahme, dass die Pankreatitis im Allgemeinen in Verbindung steht mit interstitieller Aktivierung von Zymogenen und Autodigestion des Organs (Chiari et al. 1896), wäre nach der hier vertretenen Ansicht eine zumindest transiente Dedifferenzierung der exokrinen Zellen und somit eine Herunterregulation des azinären Programms und der Bildung von Zymogenen selbst ein logischer Schritt zur Deeskalation der Autodigestion. Dies gäbe dem Organ die Möglichkeit Regenerationsprozesse in Gang zu setzen, ohne weitere Schädigung durch gebildete Zymogene zu riskieren (Stanger and Hebrok, 2013).

Für einen dritten Erklärungsansatz ist festzustellen, dass im gesunden adulten Pankreas bisher keine dedizierte Stammzellpopulation identifiziert werden konnte und dass im Rahmen der Regeneration nach Pankreatitis der azinäre Zellpool nur aus ursprünglich azinären Zellen aufgefüllt wird (Strobel et al., 2007a). Hieraus ergibt sich eine weitere mögliche Erklärung für die Dedifferenzierung und Reaktivierung von embryonalen Signalwegen als Weg zur Reetablierung eines Stammzellpools, aus dem die Repopulation des Organs beschleunigt stattfinden kann.

In einem Versuch eine Interpretation für die physiologische Funktion der *Inflammation*-Phase in der Organregeneration zu finden gibt uns diese letzte Theorie Anlass zur Hypothese, dass es sich bei der *Inflammation*-Phase um eine für die Organregeneration essentielle Phase handeln könnte, die quasi zur Vorbereitung der funktionellen Repopulation des Organs dient.

Mit Beendigung der ersten 36h nach Caeruleingabe beginnt die exzessive Proliferation im azinären Kompartiment. Man könnte von einem zeitlich abgestimmten Beenden einer vorbereitenden Phase und Eintreten der eigentlichen funktionellen Repopulation des Organs sprechen. Im Fall der *Kras*^{G12D} Mäuse fällt die zweite Welle der Proliferation im Anschluss an die *Inflammation*-Phase und somit die Reetablierung des adulten Azinuszellpools weg. Hier bleibt während des gesamten Beobachtungszeitraumes die Proliferation im adulten azinären Kompartiment auf einem Niveau zurück die der Proliferation in der *Inflammation*-Phase des WT entspricht.

Die bisherigen Forschungsergebnisse konnten weder die enge zeitliche Begrenzung einer *Inflammation*-Phase während derer diese Herunterregulation stattfindet, noch die funktionelle Interpretation des Prozesses als Vorbereitung auf die Organreparatur liefern. In diesem Zusammenhang von besonderem Interesse ist die während dieser vorbereitenden Phase gesteigerte Proliferation in Zelltypen, die nicht dem differenzierten azinären Kompartiment angehören.

5.5 Analyse der Proliferation in ADM und duktalem Kompartiment

Wie oben beschrieben ist bekannt, dass die während der Regeneration dedifferenzierten Azinuszellen eine duktale Metaplasie untergehen und, im Rahmen dieser, Marker des duktales

Kompartiments exprimieren. Einer dieser Marker ist das Cytokeratin 19 (CK19). Im gesunden adulten Pankreas wird CK19 einzig in Pankreasgängen exprimiert. Zellen des duktales Kompartiments kommen jedoch weder während der Karzinogenese als *cell of origin* des PDAC in Betracht (Kong et al., 2011) noch stellen sie eine Population dar aus der sich das Organ nach Caerulein-induzierter Pankreatitis erneuert (Elsasser et al., 1986; Jensen et al., 2005). Ebenso werden sie im Rahmen der Caerulein-induzierten Pankreatitis nicht signifikant geschädigt (Hyun and Lee, 2014). Aus diesem Grund erwarten wir keine signifikante Proliferation in Zellen mit duktalem Ursprung und positiver CK19 Färbung. Diese Vermutung wird unterstützt durch Ergebnisse von Jensen et al., die feststellen, dass im WT keine Proliferation in duktales Zellen stattfindet (Jensen et al., 2005). Da jedoch auch metaplastische Azinuszellen CK19 exprimieren, kann im Pankreas nach Caeruleinapplikation im Verlauf der Regeneration bzw. der frühen Karzinogenese die CK19 Expression nicht einzig als funktioneller Marker des duktales Kompartiments gelten, sondern kann zudem als Marker für dedifferenzierte Azinuszellen gesehen werden. Es wird somit durch die Proliferationsanalyse im CK19 positiven Kompartiment eine Mischproliferation zwischen Proliferation im duktales Kompartiment und Proliferation in ADMs festgestellt.

Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen einen ersten Hinweis darauf, dass während der *Inflammation*-Phase ein gesteigerter Anteil von bis zu 7,9 % der Proliferation, 24h nach Caeruleingabe, auf CK19 positive Zellen und somit auf dedifferenzierte Azinuszellen und duktales Zellen entfällt. Wiederum finden wir die Unterteilung der Phasen gewahrt, da sich die Proliferation in dieser Zellpopulation streng zeitlich reguliert nach 36h konstant auf unter 2 % reduziert. In *Kras*^{G12D} Pankreata hingegen finden wir bereits in präformierten CK19 positiven ADM eine erhöhte proliferative Aktivität von 20 % aller sich teilenden Zellen. Im Verlauf der frühen *Kras* induzierten Karzinogenese kommt es zu einer duktales Metaplasie nahezu aller Azinuszellen bei konstant deutlich erhöhter proliferativer Aktivität. Diese starken Unterschiede im Vergleich zwischen WT und *Kras* sowie die auffällige zeitliche Regulation der Proliferationsdynamik CK19 positiver Zellen im WT legen nahe, dass die Proliferation in ADM weitere Untersuchung erfordert.

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeit die Proliferation im duktales Kompartiment von einer Proliferation im dedifferenzierten azinären Kompartiment durch eine CK19 Färbung zu unterscheiden werden im Folgenden weitere Ergebnisse von Proliferationsanalysen für Marker azinärer Dedifferenzierung diskutiert.

5.6 Analyse der Proliferationsdynamik in Mesenchym und Stammzellähnlicher Population im WT

Wir stellen die Hypothese auf, dass die *Inflammation*-Phase im WT als Vorbereitungsphase für die darauffolgende Repopulation des Organs mit funktionellen Zellen dienen könnte. Wie

in den vorherigen Abschnitten beschrieben, ist gerade im WT während der *Inflammation*-Phase eine anteilig verminderte Proliferation in demjenigen Kompartiment zu erkennen, das die funktionelle Entität des exokrinen Pankreas darstellt. Während dieser Frühen Phase der Regeneration vermehren sich also in besonderer Menge Zellen die nicht dem adulten Azinären Kompartiment angehören. Zum Teil entfällt die Proliferation wie oben beschrieben auf Zellen mit duktaler Metaplasie, bzw. auf duktale Zellen. Ein weiterer Teil bleibt bisher ungeklärt. Zur besseren Charakterisierung dieser Zellpopulation wurden weitere Marker verwendet. Hier vernachlässigt wurden Marker für endokrine Zelltypen, da diese bereits erwiesenermaßen keine Proliferation im Rahmen der Caerulein induzierten Pankreatitis untergehen (Jensen et al., 2005).

Eine auffällige Regulierung fand sich im WT in zwei untersuchten Kompartimenten, dem Mesenchym, sowie Zellen, die Stammzellmarker exprimieren. Beide Kompartimente zeigten eine signifikante Zunahme ihres Anteils an der Zellteilung um 12 bis 24 h nach Caeruleingabe. Zum Ende der *Inflammation*-Phase fand sich wiederum jeweils eine Mitoserate vergleichbar der von NaCl behandelten Kontrolltieren, sodass die Proliferation in diesen beiden Zellpopulationen als charakterisierend für die *Inflammation*-Phase des WTs angesehen werden muss.

5.6.1 Die Proliferationswelle von Progenitoren im WT dient der beschleunigten Wiederherstellung der exokrinen Funktionalität

Im Pankreas konnte bis dato keine dedizierte residente Stammzellpopulation identifiziert werden, aus der sich das azinäre Kompartiment nach entzündlichem Insult erneuert. Daher muss vermutet werden, dass sich diejenigen Zellen, die während der Regeneration Stammzellmarker exprimieren, aus einem anderen Zelltyp entwickeln. Die derzeitige Lehrmeinung besagt, dass sich der Zellpool von Progenitor-merkmal exprimierenden Zellen durch Dedifferenzierung aus dem azinären Kompartiment bildet (Jensen et al., 2005; J. P. Morris et al., 2010). Hierbei ist jedoch weder eindeutig klar, ob diese Progenitor-ähnlichen Zellen tatsächlich einen Zustand von pankreatischen Stammzellen im Sinne der Embryogenese darstellen (Stanger and Hebrok, 2013), noch ob sie die gleiche Funktion wie embryonale Vorläuferzellen erfüllen. Daher wollen wir diese Zellen nicht per se als Stammzellen bezeichnen.

Frühere Theorien besagen, dass die Regeneration des Pankreas nach toxischer Schädigung die den azinären Zellpool betrifft über vier verschiedene Mechanismen ablaufen könnte (Kong et al., 2011). Erstens könnte es zu einer Proliferation und Differenzierung von Stammzellen oder Progenitorzellen kommen. Zweitens könnte es zu einer Transdifferenzierung von Azinuszell-fremden Zelltypen kommen, wie Zellen des Duktales Kompartiments, eingewanderte Knochenmarkszellen oder Leberzellen. Diese Hypothese wird jedoch widerlegt

durch in vivo *Lineage Tracing* Experimente von Strobel et al., die beweisen, dass sich der azinäre Zellpool nur aus vorher bestehenden Azinuszellen erneuert (Strobel et al., 2007a). Drittens könnte es zu einfacher Replikation von adulten Zellen kommen nach dem Vorbild der Replikation von adulten Hepatozyten nach partieller Hepatektomie (Yanger and Stanger, 2011). Diese Möglichkeit scheint durchaus ihre Berechtigung zu besitzen, da die Inkorporation des S-Phase-Markers BrdU in adulten differenzierten Azinuszellen regelmäßig vorkommt (Strobel et al., 2007a), wie auch die hier vorgestellten Ergebnisse von proliferierenden Amylase positiven Zellen zeigen. Die vierte und letzte Option wird am ehesten von den hier vorliegenden Ergebnissen unterstützt. Gerade im Falle von toxischer Organschädigung führt eine Dedifferenzierung von terminal differenzierten epithelialen Zellen zu einer Etablierung eines Zellpools aus dem die Organrepopulation stattfinden kann. Diese Option ist im Pankreas bisher für die Renovierung des β -Zellpools beschrieben worden (Yanger and Stanger, 2011). Der, z.B. unter entzündlichen Bedingungen, entstehende Zelltyp besitzt hierbei Fähigkeiten (Pluripotenz und Teilung) und Charakteristika (Enzymexpression) einer Stammzelle mit dem Ursprung einer terminal differenzierten Zelle und wird fakultative Stammzelle (FSC) genannt (Kong et al., 2011; Yanger and Stanger, 2011).

In diversen Publikationen wird die Dedifferenzierung von Azinuszellen als transientes Merkmal der WT Regeneration beschrieben (Jensen et al., 2005; Puri and Hebrok, 2010). Häufige erneut exprimierte Marker sind Sox9, Gli1, Pdx1, Hes1 sowie weitere Marker der embryonalen Hedgehog (Fendrich et al., 2008), Wnt (J. P. Morris et al., 2010) und Notchpathways (Siveke et al., 2008). *Lineage tracing* Experimente haben bewiesen, dass der azinäre Zellpool sich nur aus ursprünglich differenzierten azinären Zellen erneuert (Strobel et al., 2007a). Somit ist es wahrscheinlich dass es zunächst zu einer azinären Dedifferenzierung mit darauf folgender Redifferenzierung kommt (J. P. Morris et al., 2010). Im Verlauf dessen findet die Zellproliferation statt und der azinäre Zellpool wird erneuert. Dies wäre konzeptuell am ehesten mit dem letzten beschriebenen Mechanismus, dem Entstehen von FSCs zu vereinbaren.

Unsere Experimente zeigen im WT ausschließlich während der *Inflammation*-Phase eine signifikant gesteigerte Proliferation in einem Zellpool der Stammzellmarker exprimiert. Unter der Annahme, dass diese Stammzellmarker exprimierenden Zellen auf Dedifferenzierung von azinären Zellen beruhen ist dieser Zellpool unter dem Konzept der FSC zu betrachten.

Zur optimal beschleunigten Herstellung einer Organfunktion durch Zellproliferation von Stammzellen gibt es Überlegungen von Itzkovitz et al. zur *optimal Control Theorie*. Diese Theorie beruht auf dem Grundsatz, dass zur (rück-)Gewinnung der Funktionalität eines Organs möglichst schnell möglichst viele adulte Zellen hergestellt werden müssen. Am Beispiel der Etablierung der infantilen Dünndarmepithelschicht in Mäusen erklären die Autoren, dass der Prozesses optimaler Weise in zwei Phasen verläuft (Itzkovitz et al., 2012).

Zunächst kommt es zur symmetrischen Proliferation von Stammzellen in zwei Nachkommen mit Stammzellidentität. In der zweiten Phase hingegen zeigt sich eine asymmetrische Proliferation, während derer sich eine Stammzelle in zwei verschiedene Nachkommen teilt, eine Zelle mit Stammzellidentität und eine zweite, funktionelle Zelle. Nach diesem Konzept könnte die Dedifferenzierung von Azinuszellen zu FSCs der beschleunigten Repopulation des Organs mit funktionellen Zellen dienen. Die *Inflammation*-Phase wäre dementsprechend als erste vorbereitende Phase der symmetrischen Stammzellproliferation zu werten, während die darauffolgenden Phasen der Generierung von funktionstüchtigen adulten Azinuszellen dienen. Diese Vermutung wird durch unsere Ergebnisse im WT gestützt. Es findet sich in einer ersten Phase eine gesteigerte Proliferation in einem Zellpool der Stammzellmarker exprimiert. In einer zweiten Phase entstehen durch Zellteilung adulte exokrine Zellen, wie unter Abschnitt 4.4 und 5.4 beschrieben. Eine direkte Übertragung dieses Modells auf die pankreatische Regeneration verbietet sich in Ermangelung von *lineage tracing* Experimenten, die beweisen könnten, dass aus den beobachteten Stammzellmarker-exprimierenden Zellen erneut Azinuszellen werden. Dennoch ist eine Ähnlichkeit der Proliferationsmuster mit denen der Hypothese zugrundeliegenden Veröffentlichung (Itzkovitz et al., 2012) nicht von der Hand zu weisen.

5.6.2 Die Proliferation von Mesenchym im WT dient der Präparation der Regeneration in Anlehnung an Vorgänge der Embryogenese

Im Pankreas findet sich während einer Entzündung des Organs eine starke Stromareaktion. Diese weitet sich im PDAC zu einer Fibrosierung des Gewebes aus (Maitra and Hruban, 2008). Im Mausexperiment der Caerulein-induzierten Pankreatitis zeigt sich bereits 1 h nach der Behandlung ein exzessives interstitielles Ödem (Hyun and Lee, 2014; Lampel and Kern, 1977). Im Anschluss daran kommt es zu einer Aktivierung von pankreatischen Fibroblasten die gekennzeichnet ist durch die Expression von α -SMA in diesen Zellen (Haber et al., 1999; Helm et al., 2014).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sich diese Reaktion des Mesenchyms im WT ausschließlich auf die erste Phase, die *Inflammation*-Phase, beschränkt. Wir zeigen, durch die Co-Färbung mit Vimentin, dass der hohe Anteil von bis zu 90% der proliferierenden Zellen während der *Inflammation*-Phase nach 36h umschlägt und ab diesem Zeitpunkt während der *Regeneration*- und *Refinement*-Phasen nahezu keine Proliferation in diesem Kompartiment stattfindet.

Die hohen Prozentsätze von Proliferation in diesem Kompartiment in Kontrolltieren und Tieren am Ende der Regeneration könnten auf den sehr niedrigen *Zellturnover* allgemein im Pankreas zurückzuführen sein. Zu diesem Zeitpunkt teilen sich pro GF durchschnittlich nur 1-5 Zellen.

Hierbei ist es vorstellbar, dass das Mesenchym im ruhenden Organ einen höheren *Zellturnover* aufweist als differenzierte Epithelzellen.

Die Analyse im α -SMA positiven Kompartiment, die den aktivierten Anteil der mesenchymalen Zellen widerspiegelt, zeigt im WT einen deutlich flacheren, im Vergleich zu Vimentin leicht verzögerten Anstieg, der zu Beginn der *Regeneration*-Phase auf eine Teilungsrate wie in Kontrolltieren zurückkehrt. Hierdurch kann die Aktivierung von Fibroblasten demonstriert werden. Im Anschluss an das Nachlassen der Proliferation in aktivierten Fibroblasten findet im WT der rapide Anstieg der Proliferation in Amylase positiven Zellen statt. Während der *Regeneration*-Phase wird somit die Proliferation im mesenchymalen Kompartiment zugunsten der Vervielfältigung von adulten Azinuszellen supprimiert. Dies steht im Einklang mit der nicht fibrotischen Regeneration des Pankreas im WT. Es stellt sich, aus diesen Ergebnissen schließend, die Frage welche Rolle die starke initiale Aktivierung des Mesenchyms sowie seine streng auf die *Inflammation*-Phase beschränkte Proliferation spielen.

Hierzu ist zu erwähnen, dass das Mesenchym im Pankreas vor allem während der Embryogenese essentielle Bedeutung hat und kontrovers diskutiert wird. Mesenchymale Signale steuern das Wachstum von Pankreaszellen *in vitro*. Hierbei führt der direkte Zellkontakt mit mesenchymalen Zellen zu Wachstum von exokrinen Zellen, während der enge Kontakt zwischen Mesenchym und endokrinen Zellen zu Wachstumsstagnation letzterer führt (Duvillié et al., 2006; Gittes et al., 1996; Miralles et al., 1999, 1998; Tulachan et al., 2006). Wachstumsfördernd für endokrine Zellen seien im Gegensatz durch mesenchymale Zellen sezernierte Faktoren welche über einen gewissen Zellabstand wirken (Li et al., 2004). Eine neuere Studie konnte nun auch *in vivo* beweisen, dass das Mesenchym während der pankreatischen Embryogenese essentiell ist für Wachstum und Verzweigung des Organs. Hierbei geben Mesenchymale Zellen sowohl für Vorläuferzellen wie auch im späteren Verlauf der Embryogenese für differenzierte Epithelzellen im endokrinen und exokrinen Kompartiment Wachstumssignale ab (Landsman et al., 2011).

Die hier vorgestellten Ergebnisse, mit starker Aktivierung und Proliferation des Mesenchyms während der *Inflammation*-Phase, sowie zeitlich gestaffelt und streng kontrollierter Proliferation in differenzierten Zellen in der *Regeneration*-Phase zeigen eine starke Parallelität zur pankreatischen Embryogenese. Hier zeigt sich ebenso eine Abfolge von proliferativem Mesenchym, Vorläuferzellen und schließlich differenzierten Zellen, die einer strengen zeitlichen und örtlichen Kontrolle unterliegt (Gittes, 2009; Landsman et al., 2011). Es ergibt sich die Hypothese, dass das Mesenchym auch in der Regeneration nach Pankreatitis eine tragende Rolle spielt. Unsere Ergebnisse in Zusammenschau mit der vorbestehenden Literatur bekräftigen die Aussage, dass die *Inflammation*-Phase im WT eine vorbereitende Funktion für die Regeneration besitzt.

Weitere Parallelität zwischen Regeneration und Embryogenese stellt die Aktivierung des Kras Signalweges dar. Dieser spielt in der gesunden Embryonalentwicklung ebenfalls eine wichtige Rolle (Esteban et al., 2001; Johnson et al., 1997; Plowman et al., 2003; Voice et al., 1999). In der Maus ist die Funktion der Kras *Splicing*-Variante 4b sogar essentiell für ein Überleben während der Embryonalphase (Johnson et al., 1997).

Zusammenfassend sehen wir Parallelitäten zwischen der Embryogenese des Pankreas und der Regeneration nach inflammatorischem Insult, insbesondere der ersten inflammatorischen Phase der Regeneration. Die Beobachtung, dass sowohl Progenitorzell-ähnliche, wie mesenchymale Zellen zu einem Zeitpunkt proliferieren, wo im WT ein aktives Kras-Signal vorhanden ist, suggeriert eine prominente Rolle für Kras in Aktivierung der Expansion dieser Kompartimente. Eine exakte zeitliche Korrelation dessen ist jedoch auch hier in Ermangelung der Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf der Kras Aktivierung nicht möglich und sollte Ziel zukünftiger Forschung sein.

5.7 Analyse der Proliferationsdynamik in Mesenchym und Stammzellähnlicher Population in *Kras*^{G12D} Tieren

In der Folge ergibt sich, dass solange das Kras-Signal aktiviert bleibt, wie im Falle einer *Kras*^{G12D} Mutation gegeben, die Signalwege der ersten, vorbereitenden Phase aktiviert bleiben. Es wird ein zunächst stabiler Status erzielt, der der *Inflammation*-Phase im WT ähnelt. Eine Erklärung dafür wie dieser Zusammenhang zur frühen Karzinogenese führen könnte erfordert eine Uminterpretation der zuvor, unter Abschnitt 5.6, im Rahmen der WT Regeneration vorgestellten Funktion der Mesenchym- und Progenitorzell-Proliferation.

5.7.1 Mesenchym als karzinogener Faktor in *Kras*^{G12D} Pankreata

Im PDAC bildet ein komplexes Gefüge aus diversen Zelltypen das desmoplastische Stroma. Hierzu gehören Endothelzellen, Perizyten, eine Vielzahl an verschiedenen Immunzellsubtypen und Myofibroblasten (J. Morris et al., 2010; Stromnes et al., 2014). In diesem Zusammenhang wurde der Begriff *Cancer associated fibroblasts* (CAF) geprägt, als Mesenchymzellen, die selbst nicht neoplastisch sind, aber allgemein durch Beeinflussung der Tumorzellendifferenzierung, des Tumorwachstums, Immunresistenz, sowie des metastatischen Verhaltens des Tumors als die Karzinogenese fördernd gelten (Kalluri and Zeisberg, 2006). Diese CAFs exprimieren häufig α -SMA (Sappino et al., 1990). α -SMA ist ein Marker für aktive Fibroblasten und wird in ruhenden Mesenchymzellen (Stellatumzellen) des Pankreas nicht exprimiert. Frühere Studien konnten beweisen, dass ein aktives Signal von onkogenem *Kras*^{G12D} notwendig ist für die Aufrechterhaltung der Aktivierung des Mesenchyms (Collins et al., 2012).

Wir zeigen mit Quantifizierung der proliferierenden Vimentin positiven Zellen, dass die Proliferation von Mesenchym unter Einfluss von onkogenem *Kras*^{G12D} nicht wie im WT auf die *Inflammation*-Phase beschränkt bleibt. Anteilig an der Gesamtproliferation bleibt sie viel mehr während der gesamten Beobachtungsspanne auf einem Niveau, das dem der *Inflammation*-Phase im WT gleicht. Zahlenmäßig zeigt sich in *Kras*^{G12D} Tieren eine Vervielfältigung der Anzahl an sich teilenden Zellen im Mesenchymalen Kompartiment. Die Veränderungen sind auch im α -SMA positiven Kompartiment der aktivierten Fibroblasten signifikant. Diese machen ebenso während des gesamten Beobachtungszeitraums einen im Vergleich zur WT *Inflammation*-Phase gesteigerten Anteil der proliferierenden Zellen aus. Man kann also in *Kras*^{G12D} Pankreata von einer gesteigerten und verlängerten Reaktion des Mesenchyms mit dauerhafter Aktivierung von Fibroblasten und im Endeffekt einer Vermehrung des Stromas sprechen. Diese dauerhafte Proliferation im Mesenchym ist nicht wie im WT mit der Proliferation anderer Kompartimente koordiniert. Die Ergebnisse unterstreichen, dass die Zeitliche und örtliche Koordination von Stroma-Aktivierung und -Proliferation entscheidend ist für das Ergebnis des Vorgangs von Regeneration gegenüber Karzinogenese.

Im Abschnitt 5.6.2 wird dargelegt, dass im WT die Mesenchymproliferation eine Rolle zur Vorbereitung der Regeneration des Pankreas spielen könnte. Um eine mögliche Interpretation seiner Rolle in der frühen *Kras*^{G12D}-gesteuerten Karzinogenese vorzuschlagen, ist auf Ergebnisse aus der Tumorforschung auch in anderen Organen hinzuweisen. In anderen Tumorentitäten, wie z.B. dem Plattenepithelkarzinom konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von präneoplastischen Zellen mit einer nicht neoplastischen Tumormikroumgebung in einem frühen Stadium der Karzinogenese ausreichend war den malignen Phänotyp umzukehren (Javaherian et al., 1998). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass präneoplastische Zellen ohne favorables Mikroumfeld keine Karzinogenese auslösen. Dies geschieht erst durch den Dialog zwischen Tumorfavorisierendem Stroma und prämaligen Zellen. Zu ähnlichen Ergebnissen haben bisher auch die Forschung auf dem Gebiet des Prostataepithel Karzinoms (Olumi et al., 1999) sowie des Mamma Karzinoms (Orimo et al., 2005) geführt. Auch im Pankreas arbeiten diverse Gruppen an der Aufschlüsselung der Rolle des Tumorstromas in der Entstehung des PDAC. Aus PDAC gewonnene CAFs konnten in Xenotransplant-Systemen das Wachstum von PDAC beschleunigen (Bachem et al., 2005; Hwang et al., 2008; Vonlaufen et al., 2008). Erkan et al. kritisieren an konventionellen Xenograftstudien in Mäusen den häufigen Mangel an Reproduktion des im menschlichen PDAC vorherrschenden komplexen Tumorstromas, welches als aktive Komponente sowie als prognostisch entscheidend in der humanen Karzinogenese gesehen werden muss (Erkan et al., 2012).

Es besteht bereits die Hypothese, dass ein aktives onkogenes *Kras*^{G12D} Signal ein fibrotisch inflammatorisches Umfeld im Pankreasmesenchym schafft, das selektiven Druck auf Epithelzellen ausübt und so zur Karzinogenese beiträgt (Collins et al., 2012; Erkan et al., 2012). Wir konnten nachweisen, dass bereits in den ersten Stunden der frühen *Kras*^{G12D} induzierten Karzinogenese die Proliferation des aktivierten Mesenchyms deutlich über der des WT liegt. Hierbei kommt es zu einem Ausfall der zeitlichen Begrenzung dieser proliferativen Aktivität, sowie seiner Koordination mit anschließender Induktion der Proliferation im funktionellen Kompartiment.

Der genaue Mechanismus der ausgehend von *Kras* Aktivierung zu Mesenchymproliferation führt, sowie deren Auswirkung im Einzelnen auf die frühe Karzinogenese und die Frage ob diese in frühen Stadien tatsächlich suffizient ist die Karzinogenese zu initialisieren bleiben in zukünftigen Studien zu erörtern. Ebenso bleibt zu klären, ob die desmoplastische Reaktion die als eines der Kennzeichen des PDAC gilt auf dieser frühen Mesenchymproliferation fußt. Fraglich ist weiterhin, ob der fibrotische Umbau des Organs im Rahmen einer chronischen Pankreatitis auf demselben Mechanismus der dauerhaften *Kras* Aktivierung, in diesem Fall einer durch die dauerhafte Entzündung perpetuierten Aktivierung von WT *Kras* basiert. Bewiesen ist jedoch, dass der Dialog zwischen aktiviertem Mesenchym und Signalen die im Pankreas normalerweise nur während der Embryogenese aktiv sind, wie beispielsweise das Hedgehog (Hh) Signal, zur PDAC Entwicklung beiträgt. Diesbezüglich entwickeln Morris et al. (J. Morris et al., 2010) in ihrem Review ausführlich ein Modell nachdem ein parakrines Hh Signal als Hauptroute der Kommunikation zwischen Tumorepithel und Stroma fungiert (Bailey et al., 2009; Yauch et al., 2008). Durch Aktivierung von CAFs kommt es zur Hh induzierten Produktion von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin und Kollagen I (Bailey et al., 2008). Kollagen I gilt als fördernd für das Wachstum und die Invasion des PDAC (Armstrong et al., 2004; Koenig et al., 2006; Menke et al., 2001; Shintani et al., 2006). Morris et al. stellen das Modell eines Hh induzierten *Feed-forward-loops* vor, der über die Stimulation von CAFs Faktoren produziert, die wiederum Tumorepithelzellen fördern, woraufhin erneut die Expression der Hh Liganden mit Entwicklung von höhergradigen PanINs zunimmt (J. Morris et al., 2010; Thayer et al., 2003). Dies könnte als Erklärungsansatz gewertet werden, wie die von uns beschriebene frühe und dauerhafte Proliferation und Aktivierung des Mesenchyms in Zusammenhang stehen könnte mit der Transformation von präneoplastischen Zellen.

5.7.2 Dauerhafte Proliferation von Progenitor-ähnlichen Zellen in *Kras*^{G12D} Mäusen

Wie oben beschrieben kommt es zu einer das gesamte azinäre Kompartiment betreffenden, Dedifferenzierung und Reaktivierung von embryonalen Signalwegen über Hh hinaus sowie Stammzellähnlicher Enzymexpression nach Inflammation unter Einfluss von onkogenem *Kras*^{G12D}. Somit wurde als weiteres interessantes Kompartiment der stammzellähnliche

Zellpool identifiziert und die dortige Proliferation untersucht. Hierzu wurden zwei Marker (Sox9 und Pdx1) gewählt, deren Bedeutung für die *Kras*^{G12D} induzierte Karzinogenese des Pankreas bereits in diversen Studien behandelt und bestätigt wurde (Lynn et al., 2007; Seymour et al., 2007).

Unsere Ergebnisse der Proliferationsanalysen in Zellen die Sox9 bzw. Pdx1 exprimieren zeigen im Vergleich zum WT wo die Dedifferenzierung nur transient vorhanden war und Progenitorzellen ausschließlich während der *Inflammation*-Phase proliferierten, in *Kras*^{G12D} Tieren eine vermehrte Proliferation in diesem Kompartiment. Der Anteil von Progenitormarker-positiven Zellen an allen teilenden Zellen blieb während des gesamten Beobachtungszeitraums auf dem Level der Proliferation der *Inflammation*-Phase im WT und es zeigte sich keine zeitliche Koordination mit Proliferation von differenzierten Zellen im Anschluss an Proliferation entdifferenzierter Zellen.

Es liegt nahe zu vermuten, dass die verlängerte unkoordinierte Proliferation in einem Zellpool der durch Dedifferenzierung vulnerabel ist für genetische Veränderungen, den idealen Grundstock für eine Evolution von Tumorzellen bietet, gegeben den Fall, dass ein Umfeld existiert in welchem Zellen mit onkogener Mutation einen Überlebensvorteil haben.

Aus der Analyse der Proliferationsdynamik allein ist nicht zu schließen, ob in der frühen Phase der Karzinogenese in den, zu diesem Zeitpunkt proliferierenden Progenitor-ähnlichen Zellen, eine genetische Instabilität im Sinne von Tumorsuppressorloss bzw. onkogenen Mutationen vorhanden ist. Möglich ist auch, dass sich ausschließlich das favorable Mikroumfeld bildet, welches im Anschluss eine Selektion von transformierten Zellen vorantreibt. Einen Hinweis darauf, dass letzteres zutrifft geben die Studien von Collins et al., die besagen, dass der *Offswitch* von onkogenem *Kras*^{G12D} in niedriggradigen PanINs zu einer Rückbildung zum normalen Phänotyp führt. Demnach ist anzunehmen, dass bis zu diesem Zeitpunkt, der Bildung von Grad I PanINs, noch keine transformierenden Mutationen stattgefunden haben. Erst höhergradige PanINs sind nicht mehr Rückbildungsfähig, was für eine bleibende genetische Veränderung sprechen könnte (Collins et al., 2012). Diese Zellen entwickeln eine *Kras* Abhängigkeit (Weinstein, 2002) und gehen nach *Kras Offswitch* zu Apoptose über. Leider kann im Falle des PDAC nur eine teilweise Abhängigkeit festgestellt werden, da zumindest einzelne Tumorzellen statt Apoptose zu begehren in eine Art Ruhezustand wechseln und bei erneuter *Kras*-aktivierung wieder ein Tumorprogress zu verzeichnen ist (Collins et al., 2012). Es bleibt in zukünftigen Untersuchungen zu klären, ob die unter *Kras*^{G12D}-Einfluss perpetuierte Proliferation in Verbindung mit der durch *Kras*^{G12D} hervorgerufenen Aktivierung und Proliferation des Mikroumfeldes zu einem auf lange Sicht karzinogenen Zusammenspiel führt.

5.8 Limitationen

Als Limitation der hier vorgelegten Arbeit stellt sich die nur teilweise Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Mausmodell auf die humane Karzinomentstehung dar, welche allgemein im Tiermodell zu berücksichtigen ist. Im Rahmen seiner Dissertation, für welche ebenfalls Analysen der hier erhobenen RNA-Transkriptome verwendet wurden, konnte Philipp Bruns jedoch eine zumindest partielle Übertragbarkeit des in der Maus gefundenen inflammatorischen Transkriptionsmusters auf Transkriptionsmuster bei Patienten mit PDAC zeigen (Bruns, 2016).

Des Weiteren können quantitative Analysen von Gewebeschnitten aufgrund mehrerer Punkte als ungenaue Messmethode qualifiziert werden. Zunächst wird in diesem Rahmen nur ein sehr geringer Teil des gesamten Organs betrachtet, welcher nicht repräsentativ für Vorgänge im gesamten Organ sein muss. Dieser Fehler wurde durch Analyse eines Schnittes durch die Mitte des Gesamtpräparates sowie im Anschluss Analyse von jeweils 5 repräsentativen Ausschnitten des Gewebes minimiert. Zudem ergibt sich insbesondere bei Immunfluoreszenzfärbungen das Problem, dass die umliegende Organstruktur in den Aufnahmen nicht beurteilbar ist. Daher ist insbesondere in Färbungen wie Amylase, CK19, α -SMA und Vimentin, welche keine Färbung von Zellkern-Material sondern von umliegenden Zellstrukturen darstellen keine endgültige Sicherheit vorhanden, dass der als BrdU-positiv gewertete Zellkern zu der jeweiligen als Marker-positiv gewerteten Zelle gehört. Eine Färbung von Markern mit Zellkernlokalisierung wie bei Pdx1 und Sox9 erfolgt ermöglicht hier eine deutlich sicherere Bestimmung und sollte für zukünftige Untersuchungen soweit möglich gewählt werden.

Die Durchführung der Experimente an jeweils drei Versuchstieren pro gewähltem Zeitpunkt kann zudem als geringe Fallzahl gewertet werden. Diese wurde aufgrund der ethischen Vertretbarkeit der Tierexperimente sowie der üblichen wissenschaftlichen Praxis der Wiederholbarkeit von Experimenten gewählt und erlaubt dennoch signifikante Unterschiede zwischen beiden Genotypen darzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zudem nur eine geringe Anzahl an Markern untersucht werden. So wurde zum Beispiel die Proliferation von Inselzellen unter der Annahme, dass dieser Zellpool nach Organschädigung durch Caerulein keine Proliferation zeigt, nicht analysiert. Auch konnten nur sehr ausgewählte Marker für dedifferenzierte Zellen analysiert werden. Die Proliferation dieser Zellpopulation sollte in zukünftigen Arbeiten genauer charakterisiert werden.

Um die Aussagekraft der hier vorgelegten Ergebnisse weiterhin zu validieren sollten in Zukunft zudem systemische Entzündungsmarker in beiden Genotypen bestimmt, die Aktivierung des

Kras-Signalweges durch prozentuale Analyse der an GTP gebundenen Kras-einheiten geprüft und deren zeitlicher Verlauf bestimmt werden und die Signifikanz der gewählten Marker für immunhistochemische und Fluoreszenzfärbungen an PDAC-Präparaten der Maus und im Menschen verifiziert werden.

5.9 Zusammenfassung

Unsere Arbeit ermöglicht neue Einsicht in die Vorgänge der Regeneration nach akuter Pankreatitis. Wir demonstrieren, dass die normale Wiederherstellung der Organfunktionalität in einem drei-phasigen Prozess abläuft. Wir benennen diese Phasen nach ihrer dargelegten Funktionalität als *Inflammation*, *Regeneration* und *Refinement*. Wir zeigen, dass die Repopulation des Pankreas nach Schädigung des exokrinen Kompartiments mit einer zeitlich streng regulierten Abfolge von Proliferationswellen erfolgt. Hierbei kommt es während der *Inflammation* Phase zunächst zur Proliferation von Mesenchym und stammzell-ähnlichen Zellen und im Anschluss während der *Regeneration* zu einer massiven Proliferation von funktionellen azinären Zellen.

Des Weiteren bekräftigt diese Arbeit die Rolle von *Kras*^{G12D} als zentralen Faktor der frühen PDAC Karzinogenese. Wir zeigen, dass unter dessen Einfluss die normale Regeneration blockiert wird und das Organ in der Phase der *Inflammation* festgehalten wird. Wir untermauern dieses Ergebnis mit Analysen des RNA-Transkriptoms. Wir beobachten den Verlust der zeitlichen Kontrolle über die oben genannten Proliferationswellen in diesem Genotyp und demonstrieren eine massive Expansion von Zellen mit Stammzeleigenschaften und des Mesenchyms. Wir vermuten hierin eine Veränderung des zellulären Mikroumfeldes, welche zur Entstehung des PDAC beiträgt.

Wir schlagen vor, dass zukünftige Untersuchungen sich genauer mit der Rolle der Interaktion von PDAC und Mikroumfeld sowie mit *downstream* Signalwegen von Kras und deren möglicher Inaktivierung befassen sollten.

Literaturverzeichnis

- Adler, G., Rohr, G., Kern, H.F., 1982. Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Digestive Diseases and Sciences* 27, 993–1002.
- Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P.K., Da Silva-Buttkus, P., Bartsch, D.K., Langer, P., Chiblak, S., Dürr, A., Höfler, H., Klöppel, G., Müller-Decker, K., Brielmeier, M., Esposito, I., 2012. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *The Journal of Pathology* 226, 723–34.
- Anastasi, A., Ersparmer, V., Endean, R., 1967. Isolation and Structure of Caerulein, an Active Decapeptide from the Skin of *Hyla caerulea*. *Experientia* 23, 699–700.
- Apte, M., Pirola, R., Wilson, J., 2011. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 15, 2711–2722.
- Apte, M. V., Haber, P.S., Darby, S.J., Rodgers, S.C., McCaughan, G.W., Korsten, M. a, Pirola, R.C., Wilson, J.S., 1999. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44, 534–41.
- 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. *Clinical Cancer* 10, 7427–7437.
- Bachem, M.G., Schünemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Begler, H., Buck, A., Zhou, S., Schmid-Kotsas, A., Adler, G., 2005. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128, 907–921.
- Bailey, J., Mohr, A., Hollingsworth, M., 2009. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene* 28, 3513–3525.
- Bailey, J., Swanson, B., Hamada, T., Eggers, J.P., Caffery, T., Ouellette, M.M., Hollingsworth, M.A., 2008. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clinical Cancer* 14, 5995–6004.
- Bang, U.C., Benfield, T., Hyldstrup, L., Bendtsen, F., Beck Jensen, J.-E., 2014. Mortality, cancer, and comorbidities associated with chronic pancreatitis: a Danish nationwide matched-cohort study. *Gastroenterology* 146, 989–94.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2007. *Biochemie*, 6. Auflage. ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Bernardi, L., Bosisio, G., De Castiglione, R., Goffredo, O., 1967. Synthesis of caerulein. *Experientia* 23, 700–2.
- Bessède, E., Dubus, P., Mégraud, F., Varon, C., 2014. Helicobacter pylori infection and stem cells at the origin of gastric cancer. *Oncogene* 1–9.
- Bhatia, M., 2004. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 286, G189–G196.
- Bhatia, M., Fei, L.W., Cao, Y., Hon, Y.L., Huang, J., Puneet, P., Chevali, L., 2005. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 5, 132–144.
- Bockman, D., 1997. Morphology of the exocrine pancreas related to pancreatitis. *Microscopy Research and Technique* 519, 509–519.
- Bracci, P.M., 2012. Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular Carcinogenesis* 51, 53–63.
- Bracci, P.M., Wang, F., Hassan, M.M., Gupta, S., Li, D., Holly, E. a, 2009. Pancreatitis and pancreatic cancer in two large pooled case-control studies. *Cancer Causes & Control : CCC* 20, 1723–1731.
- Brune, K., Abe, T., Canto, M., O'Malley, L., Klein, A.P., Maitra, A., Adsay, N.V., Fishman, E.K., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., Goggins, M., Hruban, R.H., 2006. Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. *The American Journal of Surgical Pathology* 30, 1067–1076.
- Bruns, P.E., 2016. In vivo and in silico models of early pancreatic carcinogenesis.
- Carrière, C., Young, A., Gunn, J., Longnecker, D.S., Korc, M., 2009. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382, 1–9.
- Chiari, H., 1896. Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde* 17, 69–96.
- Collins, M., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J.-C., Galbán, S., Galbán, C.J., Rakshit, S., Flannagan, K.S., Adsay, N.V., Pasca di Magliano, M., 2012. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 122, 639–653.
- Cubilla, A.L., Fitzgerald, P.J., 1976. Morphological Lesions Associated with Human Primary

- Invasive Nonendocrine Pancreas Cancer. *Cancer Research* 36, 2690–2698.
- Daniluk, J., Liu, Y., Deng, D., Chu, J., Huang, H., Gaiser, S., Cruz-monserrate, Z., Wang, H., Ji, B., Logsdon, C.D., 2012. An NF- κ B pathway – mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *Journal of Clinical Investigation* 122, 1519–1528.
- De-Las-Heras-Castaño, G., 2014. The study of chronic pancreatitis epidemiology - the big challenge. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva* 106, 237–8.
- De La O, J., Emerson, L.L., Goodman, J.L., Froebe, S.C., Illum, B.E., Curtis, A.B., Murtaugh, L.C., 2008. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *PNAS* 105, 18907–18912.
- Desai, B.M., Oliver-krasinski, J., Leon, D.D. De, Farzad, C., Hong, N., Leach, S.D., Stoffers, D.A., 2007. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell , but not islet β cell , regeneration. *Cell* 117, 971–977.
- Devita, V., Lawrence, T., Rosenberg, S., 2012. *Primer of the Molecular Biology of Cancer*. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer, Philadelphia, USA.
- Dubois, R., 2014. Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in Colorectal Cancer. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 125, 358–373.
- Duell, E.J., 2012. Epidemiology and potential mechanisms of tobacco smoking and heavy alcohol consumption in pancreatic cancer. *Molecular Carcinogenesis* 51, 40–52.
- Duvillié, B., Attali, M., Bounacer, A., Ravassard, P., Basmaciogullari, A., Scharfmann, R., 2006. The Mesenchyme Controls the Timing of Pancreatic β -Cell Differentiation. *Diabetes* 55, 582-589.
- Elkhwaji, J.E., 2012. The role of inflammatory mediators in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Research and Reports in Urology* 5, 1–10.
- Elsasser, H.P., Adler, G., Kern, H.F., 1986. Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 1, 421–429.
- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C.W., Kong, B., Esposito, I., Friess, H., Kleeff, J., 2012. The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Current Molecular Medicine* 12, 288–303.
- Erspamer, V., Bertaccini, G., Caro, G. De, 1967. Pharmacological actions of caerulein.

Experientia 0, 8–9.

- Eser, S., Schnieke, a, Schneider, G., Saur, D., 2014. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 111, 817–822.
- Esposito, I., Seiler, C., Bergmann, F., Kleeff, J., Friess, H., Schirmacher, P., 2007. Hypothetical progression model of pancreatic cancer with origin in the centroacinar-acinar compartment. *Pancreas* 35, 212–217.
- Esteban, L.M., Vicario-abejón, C., Fernández-medarde, A., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., Mckay, R., Ward, J.M., Pellicer, A., Ferna, P., Vicario-abejo, C., Lopez, E.V. a, Kay, R.O.N.M.C., 2001. Targeted Genomic Disruption of H- ras and N- ras , Individually or in Combination , Reveals the Dispensability of Both Loci for Mouse Growth and Development. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1444–1452.
- Fendrich, V., Esni, F., Garay, M., Feldmann, G., 2008. Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology* 135, 621–631.
- Figura, G. von, Morris, J., Wright, C., Hebrok, M., 2014. Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation. *Gut* 63, 656–664.
- Freire, J., Ajona, D., de Biurrun, G., Agorreta, J., Segura, V., Guruceaga, E., Bleau, A.-M., Pio, R., Blanco, D., Montuenga, L.M., 2013. Silica-induced chronic inflammation promotes lung carcinogenesis in the context of an immunosuppressive microenvironment. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 15, 913–24.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J.M., Behringer, R.R., Nakamura, T., Uemoto, S., 2011. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature Genetics* 43, 34–41.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M., Irizarry, R. a, 2004. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics (Oxford, England)* 20, 307–15.
- Gentleman, R., Carey, V., Huber, W., Hahne, F., 2017. Genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments. R package version 1.60.0.
- Gittes, G., Galante, P., Hanahan, D., 1996. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 122, 439–447.
- Gittes, G.K., 2009. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review.

Developmental Biology 326, 4–35.

- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D., 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2457, 2447–2457.
- Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A.J., Hernández-Porras, I., Cañamero, M., Rodriguez-Justo, M., Serrano, M., Barbacid, M., 2011. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 19, 728–39.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., Barbacid, M., 2003. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111–20.
- Guerra, C., Schuhmacher, A., Cañamero, M., 2007. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11, 291–302.
- Gukovskaya, A.S., Gukovsky, I., Jung, Y., Mouria, M., Pandol, S.J., 2002. Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 22595–22604.
- Habbe, N., Shi, G., Meguid, R. a, Fendrich, V., Esni, F., Chen, H., Feldmann, G., Stoffers, D. a, Konieczny, S.F., Leach, S.D., Maitra, A., 2008. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18913–8.
- Haber, P.S., Keogh, G.W., Apte, M. V, Moran, C.S., Stewart, N.L., Crawford, D.H., Pirola, R.C., McCaughan, G.W., Ramm, G. a, Wilson, J.S., 1999. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *The American Journal of Pathology* 155, 1087–95.
- Halangk, W., Lerch, M.M., Brandt-Nedelev, B., Roth, W., Ruthenbuerger, M., Reinheckel, T., Domschke, W., Lippert, H., Peters, C., Deussing, J., 2000. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *The Journal of Clinical Investigation* 106, 773–81.
- Hamada, S., Masamune, A., Shimosegawa, T., 2014. Inflammation and pancreatic cancer: disease promoter and new therapeutic target. *Journal of Gastroenterology* 49, 605–17.

- Hanahan, D., Weinberg, R. a., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanahan, D., Weinberg, R. a, Francisco, S., 2000. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco 100, 57–70.
- Heiser, P., Cano, D., Landsman, L., Kim, G., 2008. Stabilization of β -catenin induces pancreas tumor formation. *Gastroenterology* 135, 1288–1300.
- Helm, O., Mennrich, R., Petrick, D., Goebel, L., Freitag-Wolf, S., Röder, C., Kalthoff, H., Röcken, C., Sipos, B., Kabelitz, D., Schäfer, H., Oberg, H.-H., Wesch, D., Sebens, S., 2014. Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PloS one* 9, e94357.
- Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., Depinho, R. a, 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 20, 1218–49.
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. a, Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B. a, Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. a, Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V.E., Hruban, R.H., Lowy, A.M., Tuveson, D. a, 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–50.
- Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., Kern, S.E., 2000a. Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 6, 2969–2972.
- Hruban, R.H., Wilentz, R.E., Kern, S.E., 2000b. Genetic progression in the pancreatic ducts. *The American Journal of Pathology* 156, 1821–5.
- Hundal, R., Shaffer, E. a, 2014. Gallbladder cancer: epidemiology and outcome. *Clinical Epidemiology* 6, 99–109.
- Hwang, R., Moore, T., Arumugam, T., 2008. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Research* 68, 918–926.
- Hyun, J.J., Lee, H.S., 2014. Experimental models of pancreatitis. *Clinical Endoscopy* 47, 212–216.
- Ihaka, R., Gentleman, R., 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5, 299–314.
- Iovanna, J., 1996. Redifferentiation and apoptosis of pancreatic cells during acute pancreatitis. *International Journal of Pancreatology* 20, 77–84.

- Itzkovitz, S., Blat, I.C., Jacks, T., Clevers, H., van Oudenaarden, A., 2012. Optimality in the development of intestinal crypts. *Cell* 148, 608–19.
- Javaherian, A., Vaccariello, M., Fusenig, N., Garlick, J., 1998. Normal keratinocytes suppress early stages of neoplastic progression in stratified epithelium. *Cancer Research* 58, 2200–2208.
- Jensen, J., Serup, P., Karlsen, C., Nielsen, T.F., Madsen, O.D., 1996. mRNA Profiling of Rat Islet Tumors Reveals Nkx 6.1 as a -Cell-specific Homeodomain Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry* 271, 18749–18758.
- Jensen, J.N., Cameron, E., Garay, M.V.R., Starkey, T.W., Gianani, R., Jensen, J., 2005. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128, 728–741.
- Ji, B., Tsou, L., Wang, H., Gaiser, S., Chang, D., 2009. Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. *Gastroenterology* 137, 1072–1082.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Jacks, T., 1997. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes and Development* 11, 2468–2481.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., Edlund, H., 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606–609.
- Kalluri, R., Zeisberg, M., 2006. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer* 6, 392–401.
- Koenig, A., Mueller, C., Hasel, C., Adler, G., Menke, A., 2006. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Research* 66, 4662–71.
- Koizumi, M., Doi, R., Toyoda, E., Masui, T., Tulachan, S.S., Kawaguchi, Y., Fujimoto, K., Gittes, G.K., Imamura, M., 2003. Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer. *Surgery* 134, 260–6.
- Kong, B., Bruns, P., Behler, N.A., Chang, L., Schlitter, A.M., Cao, J., Gewies, A., Ruland, J., Fritzsche, S., Valkovskaya, N., Jian, Z., Regel, I., Raulefs, S., Irmeler, M., Beckers, J., Friess, H., Erkan, M., Mueller, N.S., Roth, S., Hackert, T., Esposito, I., Theis, F.J., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2016. Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut* gutjnl-2015-310913.
- Kong, B., Michalski, C., Erkan, M., Friess, H., Kleeff, J., 2011. From tissue turnover to the

- cell of origin for pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 8, 467–472.
- Kopp, J., Figura, G. Von, Mayes, E., Liu, F., 2012. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 22, 737–750.
- Kwon, O.-J., Zhang, L., Ittmann, M.M., Xin, L., 2014. Prostatic inflammation enhances basal-to-luminal differentiation and accelerates initiation of prostate cancer with a basal cell origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E592-600.
- Lampel, M., Kern, H.F., 1977. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histology* 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 Biology* 9, e1001143.
- Leibovici, D., Sabatier, R., 1998. A singular value decomposition of a k-way array for a principal component analysis of multiway data, PTA-k. *Linear Algebra and its Applications* 269, 307–329.
- Lévy, P., Barthet, M., Mollard, B.R., Amouretti, M., Marion-Audibert, A.-M., Dyard, F., 2006. Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 30, 838–44.
- Li, D., 2012. Diabetes and pancreatic cancer. *Molecular Carcinogenesis* 51, 64–74.
- Li, Z., Manna, P., Kobayashi, H., Spilde, T., Bhatia, A., Preuett, B., Prasad, K., Hembree, M., Gittes, G.K., 2004. Multifaceted pancreatic mesenchymal control of epithelial lineage selection. *Developmental Biology* 269, 252–63.
- Ling, J., Kang, Y., Zhao, R., Xia, Q., Lee, D., Hung, M., Chiao, P.J., 2012. KrasG12D - Induced IKK2/ β /NF- κ B Activation by IL-1 α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 105–120.
- Liszka, L., Pająk, J., Mrowiec, S., Zielińska-Pająk, E., Gołka, D., Lampe, P., 2011. Precursor lesions of early onset pancreatic cancer. *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology* 458, 439–51.
- Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B., Lüttges, J., 2005. Frequency of K-

- ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* (New York, N.Y.) 7, 17–23.
- Lowe, D., Storkus, W., 2011. Chronic inflammation and immunologic-based constraints in malignant disease. *Immunotherapy* 3, 1265–1274.
- Lynn, F.C., Smith, S.B., Wilson, M.E., Yang, K.Y., Nekrep, N., German, M.S., 2007. Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10500–5.
- Maitra, A., Hruban, R.H., 2008. Pancreatic cancer. *Annual Review of Pathology* 157–188.
- Menke, A., Philippi, C., Vogelmann, R., Seidel, B., 2001. Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Research* 3508–3517.
- Mews, P., Phillips, P., Fahmy, R., Korsten, M., Pirola, R., Wilson, J., Apte, M., 2002. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut* 50, 535–41.
- Miralles, F., Czernichow, P., Scharfmann, R., 1998. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* 1024, 1017–1024.
- Miralles, F., Serup, P., Cluzeaud, F., Vandevallé, A., Czernechow, P., Schafmann, R., 1999. Characterization of β cells developed in vitro from rat embryonic pancreatic epithelium. *Developmental Dynamics* 214, 116–126.
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Christine, A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I.M., Wolfe, M.S., Ralph, H., Ball, D.W., Schmid, R.M., Leach, S.D., 2003. Notch mediates TGF α -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 565–576.
- Morris, J., Wang, S., Hebrok, M., 2010. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer* 10, 683–695.
- Morris, J.P., Cano, D.A., Sekine, S., Wang, S.C., Hebrok, M., 2010. β -catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 120, 508–520.
- Morris, J.P., Greer, R., Russ, H. a, von Figura, G., Kim, G.E., Busch, A., Lee, J., Hertel, K.J.,

- Kim, S., McManus, M., Hebrok, M., 2014. Dicer regulates differentiation and viability during mouse pancreatic cancer initiation. *PLoS one* 9, e95486.
- Nagashio, Y., Ueno, H., Imamura, M., Asaumi, H., Watanabe, S., Yamaguchi, T., Taguchi, M., Tashiro, M., Otsuki, M., 2004. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. *Laboratory investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 84, 1610–8.
- Nøjgaard, C., Bendtsen, F., Becker, U., Andersen, J.R., Holst, C., Matzen, P., 2010. Danish patients with chronic pancreatitis have a four-fold higher mortality rate than the Danish population. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 8, 384–90.
- Offield, M., Jetton, T., Labosky, P., 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983–995.
- Ohlsson, H., Karlsson, K., Edlund, T., 1993. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *The EMBO Journal* 12, 4251–4259.
- Olson, S.H., 2012. Selected medical conditions and risk of pancreatic cancer. *Molecular Carcinogenesis* 51, 75–97.
- Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Epithelium, P., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., Cunha, G.R., 1999. Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium. *Cancer Research* 59, 5002–5011.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., Weinberg, R. a, 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335–48.
- Plowman, S.J., Williamson, D.J., O’Sullivan, M.J., Doig, J., Ritchie, A., Harrison, D.J., Melton, D.W., Arends, M.J., Hooper, M.L., Patek, C.E., 2003. While K-Ras is essential for mouse development , expression of the K-Ras4A splice variant is dispensable. *Molecular and Cellular Biology* 23, 9245.
- Prévo, P., Simion, A., Grimont, A., Colletti, M., 2012. Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Gut* 61, 1723–1732.
- Puri, S., Hebrok, M., 2010. Cellular plasticity within the pancreas—lessons learned from development. *Developmental Cell* 18, 342–356.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D., 2011. RAS oncogenes: weaving a

- tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* 11, 761–774.
- Reid, L.E., Walker, N.I., 1999. Acinar cell apoptosis and the origin of tubular complexes in caerulein-induced pancreatitis. *International Journal of Experimental Pathology* 80, 205–15.
- Reid, M.D., Bagci, P., Adsay, N.V., 2013. Histopathologic assessment of pancreatic cancer: does one size fit all? *Journal of Surgical Oncology* 107, 67–77.
- Risch, H. a, 2012. Pancreatic cancer: Helicobacter pylori colonization, N-nitrosamine exposures, and ABO blood group. *Molecular Carcinogenesis* 51, 109–18.
- Sappino, a P., Masouyé, I., Saurat, J.H., Gabbiani, G., 1990. Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *The American Journal of Pathology* 137, 585–91.
- Seymour, P. a, Freude, K.K., Tran, M.N., Mayes, E.E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., Sander, M., 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1865–70.
- Shintani, Y., Hollingsworth, M. a, Wheelock, M.J., Johnson, K.R., 2006. Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Research* 66, 11745–53.
- Shynlova, O., Tsui, P., Dorogin, A., Chow, M., Lye, S.J., 2005. Expression and localization of alpha-smooth muscle and gamma-actins in the pregnant rat myometrium. *Biology of Reproduction* 73, 773–780.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., 2012. Cancer statistics, 2012. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 62, 10–29.
- Siveke, J.T., Lubeseder-Martellato, C., Lee, M., Mazur, P.K., Nakhai, H., Radtke, F., Schmid, R.M., 2008. Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis. *Gastroenterology* 134, 544–55.
- Skalli, O., Pelte, M.F., Pecllet, M.C., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., Ravazzola, M., Orci, L., 1989. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 37, 315–321.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, a, Benzonana, G., Gillessen, D., Gabbiani, G., 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *The Journal of Cell Biology* 103, 2787–96.

- Solar, M., Cardalda, C., Houbracken, I., Martín, M., Maestro, M.A., De Medts, N., Xu, X., Grau, V., Heimberg, H., Bouwens, L., Ferrer, J., 2009. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Developmental Cell* 17, 849–60.
- Sommers, S.C., Murphy, S.A., Warren, S., 1954. Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Gastroenterology* 27, 629–640.
- Spanier, B.W.M., Bruno, M.J., Dijkgraaf, M.G.W., 2013. Incidence and mortality of acute and chronic pancreatitis in the Netherlands: a nationwide record-linked cohort study for the years 1995-2005. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 19, 3018–26.
- Stanger, B., Hebrok, M., 2013. Control of cell identity in pancreas development and regeneration. *Gastroenterology* 144, 1170–1179.
- Stoffers, D., Heller, R., Miller, C., Habener, J., 1999. Developmental Expression of the Homeodomain Protein IDX-1 in Mice Transgenic for an IDX-1 Promoter/lacZ Transcriptional Reporter 1. *Endocrinology* 140, 5374–5381.
- Strobel, O., Dor, Y., Alsina, J., Stirman, A., Lauwers, G., Trainor, A., Castillo, C.F.-D., Warshaw, A.L., Thayer, S.P., 2007a. In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology* 133, 1999–2009.
- Strobel, O., Dor, Y., Stirman, A., Trainor, A., Fernández-del Castillo, C., Warshaw, A.L., Thayer, S.P., 2007b. Beta cell transdifferentiation does not contribute to preneoplastic/metaplastic ductal lesions of the pancreas by genetic lineage tracing in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4419–24.
- Stromnes, I.M., DelGiorno, K.E., Greenberg, P.D., Hingorani, S.R., 2014. Stromal reengineering to treat pancreas cancer. *Carcinogenesis* 35, 1451–1460.
- Thayer, S., Magliano, M. di, Heiser, P., 2003. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 851–856.
- Tinto, a, Lloyd, D. a J., Kang, J.-Y., Majeed, a, Ellis, C., Williamson, R.C.N., Maxwell, J.D., 2002. Acute and chronic pancreatitis--diseases on the rise: a study of hospital admissions in England 1989/90-1999/2000. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 16, 2097–105.
- Tong, G.-X., Geng, Q.-Q., Chai, J., Cheng, J., Chen, P.-L., Liang, H., Shen, X.-R., Wang, D.-

- B., 2014. Association between pancreatitis and subsequent risk of pancreatic cancer: a systematic review of epidemiological studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* : APJCP 15, 5029–34.
- Treuting, P., Dintzis, M., Liggitt, D., Fervent, C.W., 2012. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*, *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Elsevier Inc.
- Tulachan, S.S., Doi, R., Hirai, Y., Kawaguchi, Y., Koizumi, M., Hembree, M., Tei, E., Crowley, A., Yew, H., McFall, C., Prasad, K., Preuett, B., Imamura, M., Gittes, G.K., 2006. Mesenchymal epimorphin is important for pancreatic duct morphogenesis. *Development, Growth & Differentiation* 48, 65–72.
- Voice, J.K., Klemke, R.L., Le, A., Jackson, J.H., 1999. Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *Journal of Biological Chemistry* 274, 17164–17170.
- Vonlaufen, A., Joshi, S., Qu, C., Phillips, P. a, Xu, Z., Parker, N.R., Toi, C.S., Pirola, R.C., Wilson, J.S., Goldstein, D., Apte, M. V, 2008. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Research* 68, 2085–93.
- Weinstein, I.B., 2002. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science (New York, N.Y.)* 297, 63–4.
- Whitcomb, D.C., Pogue-Geile, K., 2002. Pancreatitis as a risk for pancreatic cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* 31, 663–678.
- Wilson, D.O., Weissfeld, J.L., Fuhrman, C.R., Fisher, S.N., Balogh, P., Landreneau, R.J., Luketich, J.D., Siegfried, J.M., 2008. Common origins of lung cancer and COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178, 956–61.
- Wu, K., Gannon, M., Peshavaria, M., Offield, M.F., Henderson, E.V.A., Ray, M., Marks, A., Gamer, L.W., Wright, C.V.E., Stein, R., 1997. Hepatocyte Nuclear Factor 3 β Is Involved in Pancreatic β -Cell-Specific Transcription of the pdx-1 Gene. *Molecular and Cellular Biology* 17, 6002–6013.
- Xie, F., Xu, X., Xu, A., Liu, C., Liang, F., Xue, M., Bai, L., 2014. Aberrant activation of Sonic hedgehog signaling in chronic cholecystitis and gallbladder carcinoma. *Human Pathology* 45, 513–21.
- Yachida, S., White, C.M., Naito, Y., Zhong, Y., Brosnan, J. a, Macgregor-Das, A.M., Morgan, R. a, Saunders, T., Laheru, D. a, Herman, J.M., Hruban, R.H., Klein, A.P., Jones, S.,

- Velculescu, V., Wolfgang, C.L., Iacobuzio-Donahue, C. a, 2012. Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clinical cancer research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18, 6339–47.
- Yan, L., McFaul, C., Howes, N., Leslie, J., Lancaster, G., Wong, T., Threadgold, J., Evans, J., Gilmore, I., Smart, H., Lombard, M., Neoptolemos, J., Greenhalf, W., 2005. Molecular Analysis to Detect Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in High-Risk Groups. *Gastroenterology* 128, 2124–2130.
- Yanger, K., Stanger, B.Z., 2011. Facultative stem cells in liver and pancreas: fact and fancy. *Developmental dynamics : an Official Publication of the American Association of Anatomists* 240, 521–9.
- Yauch, R.L., Gould, S.E., Scales, S.J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C.P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J.C., Rubin, L.L., de Sauvage, F.J., 2008. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455, 406–10.
- Zhang, Y., Morris, J.P., Yan, W., Schofield, H.K., Gurney, A., Simeone, D.M., Millar, S.E., Hoey, T., Hebrok, M., Pasca di Magliano, M., 2013. Canonical wnt signaling is required for pancreatic carcinogenesis. *Cancer Research* 73, 4909–22.
- Zhu, L., Shi, G., Schmidt, C.M., Hruban, R.H., Konieczny, S.F., 2007. Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American Journal of Pathology* 171, 263–273.

Appendix

Verzeichnis eigener Publikationen

- Bajbouj, M., Aust, S., Spies, J., Herrera-Melendez, A.-L., Mayer, S. V, Peters, M., Plewnia, C., Fallgatter, A.J., Frase, L., Normann, C., Behler, N., Wulf, L., Brakemeier, E.-L., Padberg, F., 2017. PsychotherapyPlus: augmentation of cognitive behavioral therapy (CBT) with prefrontal transcranial direct current stimulation (tDCS) in major depressive disorder-study design and methodology of a multicenter double-blind randomized placebo-controlled trial. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*
- Behler, N., Hantschk, I., Wulf, L., Palm, U., Pogarell, O., Padberg, F., 2017. Nicht-invasive Stimulationsverfahren in der Psychiatrie am Beispiel der Transkraniellen Magnetstimulation (TMS). *Das Neurophysiol.* 39, 141–155.
- Behler, N., Lehmann, A., Malchow, B., Palm, U., 2017. Intravenöser Missbrauch von Bupropion. *Nervenarzt* 88, 1320–1322.
- Kong, B., Bruns, P., Behler, N., Schlitter, A.M., Friess, H., Erkan, M., Theis, F.J., Esposito, I., Michalski, C.W., Kleeff, J., 2016a. Oncogenic Kras promotes early pancreatic carcinogenesis by perpetuating elements of natural inflammatory response. *Pancreatology* 16, S11.
- Kong, B., Bruns, P., Behler, N., Schlitter, M., Regel, I., Raulefs, S., Friess, H., Erkan, M., Esposito, I., Theis, F., Kleeff, J., Michalski, C., 2016a. Histological and molecular landscape of early pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* 16, S33.
- Kong, B.¹, Bruns, P.¹, Behler, N.A.¹, Chang, L., Schlitter, A.M., Cao, J., Gewies, A., Ruland, J., Fritzsche, S., Valkovskaya, N., Jian, Z., Regel, I., Raulefs, S., Irmeler, M., Beckers, J., Friess, H., Erkan, M., Mueller, N.S., Roth, S., Hackert, T., Esposito, I., Theis, F.J., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2016b. Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut* gutjnl-2015-310913. ¹Authors contributed equally
- Kong, B., Wu, W., Cheng, T., Schlitter, A.M., Qian, C., Bruns, P., Jian, Z., Jäger, C., Regel, I., Raulefs, S., Behler, N., Irmeler, M., Beckers, J., Friess, H., Erkan, M., Siveke, J.T., Tannapfel, A., Hahn, S.A., Theis, F.J., Esposito, I., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2016b. A subset of metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas depends quantitatively on oncogenic Kras/Mek/Erk-induced hyperactive mTOR signalling. *Gut* 65.
- Kong, B., Wu, W., Cheng, T., Schlitter, A.M., Bruns, P., Jaeger, C., Regel, I., Raulefs, S., Behler, N., Irmeler, M., Beckers, J., Erkan, M., Theis, F.J., Esposito, I., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2013. Identification and Characterization of an Aldh1a3-Positive Subtype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Mediated by Oncogenic Krasg12d/Erk-Mtor Axis. *Pancreas* 42, 1360-1361
- Kong, B., Behler, N., Bruns, P., Schlitter A.M., N. Valkovska, S. Fritzsche, S. Raulefs, Regel, I., Erkan, M., Theis, F.J., Esposito, I., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2013. Pancreatic Progenitor Expansion, Mesenchymal Cell Proliferation and Inflammation are Required During Early Carcinogenesis. *Pancreas* 42, 1360-1361
- Palm, U., Kumpf, U., Behler, N., Wulf, L., Kirsch, B., Worsching, J., Keeser, D., Hasan, A., Padberg, F., 2017a. Home Use, Remotely Supervised, and Remotely Controlled Transcranial Direct Current Stimulation: A Systematic Review of the Available Evidence. *Neuromodulation.*
- Palm, U., Leitner, B., Kirsch, B., Behler, N., Kumpf, U., Wulf, L., Padberg, F., Hasan, A., 2017b. Prefrontal tDCS and sertraline in obsessive compulsive disorder: a case report and review of the literature. *Neurocase* 00, 1–5.

Schönherr, W., Kong, B., Fritzsche, S., Behler, N., Thorwirth, M., Raulefs, S., Regel, I., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2013. Loss of Ppar-gamma promotes KrasG12D-driven pancreatic ductal adenocarcinoma formation by inhibiting p53 function. *Pancreatology* 13, S57–S58.

Poster: Behler, N., Kong, B., Schlitter, S., Fritzsche, S., Bruns, P., Valkovska, N., Raulefs, S., Regel, I., Friess, H., Esposito, I., Kleef, J., Michalski, C.W., 2012. Oncogenic KrasG12D-mediated "switch-on" in cell proliferation during pancreatic regeneration. 33. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub, Leipzig, 22.-24. November 2012

Kurzvortrag: Bruns P, Kong B, Fritzsche S, Behler N, Valkovska N, Raulefs S, Regel I, Friess H, Theis F, Michalski CW, Kleeff J, 2012. Comparative analysis of the microenvironment switch in early stages of pancreatic carcinogenesis. 33. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub, Leipzig, 22.-24. November 2012

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung bzw. Fakultät für Medizin der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: „Persistenz entzündlicher Proliferations- und Transkriptionsmuster in der Pankreaskarzinogenese unter Einfluss von onkogenem KrasG12D“ in der medizinischen Fakultät des Klinikums Rechts der Isar in München unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Christoph Michalski und PhD Dr. Bo Kong ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt. Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert. Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen eidesstattlichen Erklärung bewusst. Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich einverstanden

München, den 04.11.2018

Nora Behler