

# I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
---	--------------------	---

II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
----	-----------------------	----

1.	Einleitung	1
----	------------	---

1.1.	Pankreaskarzinom	1
------	------------------	---

1.1.1.	Epidemiologie	1
--------	---------------	---

1.1.2.	Risikofaktoren	1
--------	----------------	---

1.1.3.	Pathologie	2
--------	------------	---

1.1.4.	Therapie	3
--------	----------	---

1.2.	Chemoresistenz	4
------	----------------	---

1.3.	Verschiedene Formen von Zelltod	6
------	---------------------------------	---

1.3.1.	Bedeutung und charakteristische Merkmale der Apoptose	7
--------	---	---

1.3.2.	Molekulare Mechanismen der Apoptose-Signalwege	8
--------	--	---

1.3.2.1.	Caspasen	8
----------	----------	---

1.3.2.2.	Extrinsischer Signalweg	9
----------	-------------------------	---

1.3.2.3.	Intrinsischer Signalweg	10
----------	-------------------------	----

1.3.2.4.	Inhibitorische Regulation von Apoptose-Signalwegen	10
----------	--	----

1.3.2.5.	Aktivierung von Apoptose-Signalwegen durch Zytostatika	11
----------	--	----

1.4.	Ziel dieser Arbeit	12
------	--------------------	----

2.	Materialien und Geräte	13
----	------------------------	----

2.1.	Zellen und Zelllinien	13
------	-----------------------	----

2.2.	Materialien und Geräte für die Isolierung und Expansion von murinen Pankreasfibroblasten	13
------	---	----

2.3.	Zellkultur	13
------	------------	----

2.3.1.	Medien und Medienzusätze	13
--------	--------------------------	----

2.3.2.	Sonstige Materialien und Geräte für die Zellkultur	13
--------	--	----

2.4.	Substanzen für die Behandlung der Zellen	14
------	--	----

2.5.	Materialien und Geräte für die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	14
------	---	----

2.6.	Materialien und Geräte für die Proteingewinnung	15
------	---	----

2.6.1.	Materialien und Geräte für die Herstellung von Kernextrakten	15
2.6.2.	Materialien und Geräte für die Herstellung von Ganzzelllysaten	15
2.7.	Materialien und Geräte für die Proteinbestimmung	15
2.8.	Materialien und Geräte für die SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting	16
2.9.	Antikörper für Western Blotting	17
2.9.1.	Primärantikörper	17
2.9.2.	Sekundärantikörper	17
2.10.	Materialien und Geräte für die RNA-Isolierung	17
2.11.	Materialien und Geräte für die Herstellung von cDNA	18
2.12.	Materialien und Geräte für die Realtime-PCR	18
2.13.	Materialien und Geräte für ELISA	19
2.14.	Materialien und Geräte für die Tierhaltung	19
2.15.	Materialien und Substanzen für die Behandlung der Tiere sowie für die Organentnahme	19
2.16.	Materialien und Geräte für die Immunzytologie und Immunhistologie	20
2.17.	Antikörper und Detektionssysteme für die Immunzytologie und Immunhistologie	20
2.17.1.	Primärantikörper und Blockierungspeptide	20
2.17.2.	Sekundärantikörper und immunhistologische Detektionssysteme	21
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
3.1.	Isolierung und Expansion von murinen Pankreasfibroblasten	22
3.2.	Zellkultur	23
3.2.1.	Mono-Kultivierung von humanen Panc89-Zellen und murinen Pankreasfibroblasten	23
3.2.2.	Co-Kultivierung von humanen Panc89-Zellen und murinen Pankreas- fibroblasten, Generierung von „Mono-aus-Co“ (MaC)-Zellen	23
3.3.	Messung der Zellvitalität mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	25
3.3.1.	Prinzip der Methode	25
3.3.2.	Durchführung	26
3.4.	Proteintechniken	26
3.4.1.	Proteingewinnung	26

3.4.1.1.	Herstellung von Kernextrakten	26
3.4.1.2.	Herstellung von Ganzzelllysaten	27
3.4.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung	28
3.4.3.	Proteinnachweis	28
3.4.3.1.	Einstellung der Proben auf identischen Gesamtproteingehalt	28
3.4.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.4.3.3.	Proteintransfer (Western Blotting)	30
3.4.3.4.	Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper	31
3.4.3.5.	Detektion mittels Chemolumineszenz	32
3.5.	RNA-Techniken	33
3.5.1.	RNA-Isolierung	33
3.5.2.	Herstellung von cDNA	33
3.5.2.1.	Prinzip der Methode	33
3.5.2.2.	Durchführung	33
3.6.	DNA-Techniken	34
3.6.1.	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Realtime Polymerase Chain Reaction = Realtime-PCR)	34
3.6.1.1.	Prinzip der Methode	34
3.6.1.2.	Durchführung	35
3.6.1.3.	Relative Quantifizierung des PCR-Produktes	35
3.7.	Enzym-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	36
3.7.1.	Prinzip der Methode	36
3.7.2.	Durchführung	36
3.7.2.1.	NF- $\kappa$ B-ELISA	36
3.7.2.2.	IL1 $\beta$ -ELISA	36
3.8.	Tierexperimentelle Methoden	37
3.9.	Immunzytologie	38
3.9.1.	Charakterisierung von murinen Pankreasfibroblasten mittels Immunzytologie	39
3.10.	Immunhistologie	40
3.10.1.	Durchführung	40
3.10.2.	Antikörper und Detektionssysteme	41
3.10.3.	Auswertung der immunhistologischen Schnitte	41
3.10.3.1.	Pan-Cytokeratin und " $\alpha$ -Smooth Muscle Actin" ( $\alpha$ -SMA)	41

3.10.3.2.	<u><i>“Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling” (TUNEL)</i></u>	42
3.10.3.3.	Ki67	42
3.10.3.4.	Procaspasen	42
3.11.	Statistik	43
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1.	Isolation und Expansion muriner Pankreasfibroblasten	44
4.2.	Charakterisierung der isolierten Pankreasfibroblasten mittels immunzytologischer Färbung	45
4.3.	Versuche in vitro: Vergleich von kokultivierten und monokultivierten Panc89-Zellen	46
4.3.1.	Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	46
4.3.2.	NF- $\kappa$ B Status	50
4.3.3.	IL1 $\beta$ -Sekretion	52
4.3.4.	Procaspase-Expression und Caspase-Aktivierung auf Proteinebene	54
4.3.4.1.	Procaspase-Expression auf Proteinebene	54
4.3.4.2.	Caspase-Aktivierung	56
4.3.4.3.	Expression der Caspase-Inhibitoren cIAP1, cIAP2 und XIAP	58
4.3.4.4.	Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 nach Behandlung der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132	60
4.3.5.	Procaspase-Expression auf RNA-Ebene	62
4.3.6.	Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 auf Proteinebene nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin	67
4.3.7.	Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin	69
4.3.8.	Aktivierung der MAP-Kinasen <i>“Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2”</i> (Erk1/Erk2)	71
4.3.9.	Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059	72

4.3.10.	Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 auf Proteinebene nach Behandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059	74
4.3.11.	Expression des Adhäsionsmoleküls LICAM	76
4.4.	Versuche in vivo: Vergleich von Panc89 Mono- und Co-Tumoren	77
4.4.1.	Tumorstadium	77
4.4.1.1.	Tumorstadium	77
4.4.1.2.	Proliferation (Immunhistologische Färbung Ki67)	78
4.4.2.	Epithelialer und stromaler Anteil der Tumore	79
4.4.2.1.	Cytokeratin	79
4.4.2.2.	$\alpha$ -SMA	82
4.4.3.	Tumorstadium nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung	85
4.4.4.	Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung (Immunhistologische Färbung TUNEL)	86
4.4.5.	Proliferation der Tumore nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung (Immunhistologische Färbung Ki67)	89
4.4.6.	Expression der Procaspasen 9, 3 und 7	90
5.	Diskussion	94
6.	Zusammenfassung	109
7.	Summary	110
8.	Literaturverzeichnis	111
9.	Danksagung	119