

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

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

<u>3.4.1.1.</u>	<u>Herstellung von Kernextrakten</u>	26
<u>3.4.1.2.</u>	<u>Herstellung von Ganzzelllysaten</u>	27
<u>3.4.2.</u>	<u>Proteinkonzentrationsbestimmung</u>	28
<u>3.4.3.</u>	<u>Proteinnachweis</u>	28
<u>3.4.3.1.</u>	<u>Einstellung der Proben auf identischen Gesamtproteingehalt</u>	28
<u>3.4.3.2.</u>	<u>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</u>	29
<u>3.4.3.3.</u>	<u>Proteintransfer (Western Blotting)</u>	30
<u>3.4.3.4.</u>	<u>Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper</u>	31
<u>3.4.3.5.</u>	<u>Detektion mittels Chemolumineszenz</u>	32
<u>3.5.</u>	<u>RNA-Techniken</u>	33
<u>3.5.1.</u>	<u>RNA-Isolierung</u>	33
<u>3.5.2.</u>	<u>Herstellung von cDNA</u>	33
<u>3.5.2.1.</u>	<u>Prinzip der Methode</u>	33
<u>3.5.2.2.</u>	<u>Durchführung</u>	33
<u>3.6.</u>	<u>DNA-Techniken</u>	34
<u>3.6.1.</u>	<u>Echtzeit-Polymerasekettenreaktion</u>	
	<u>(Realtime Polymerase Chain Reaction = Realtime-PCR)</u>	34
<u>3.6.1.1.</u>	<u>Prinzip der Methode</u>	34
<u>3.6.1.2.</u>	<u>Durchführung</u>	35
<u>3.6.1.3.</u>	<u>Relative Quantifizierung des PCR-Produktes</u>	35
<u>3.7.</u>	<u>Enzym-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)</u>	36
<u>3.7.1.</u>	<u>Prinzip der Methode</u>	36
<u>3.7.2.</u>	<u>Durchführung</u>	36
<u>3.7.2.1.</u>	<u>NF-κB-ELISA</u>	36
<u>3.7.2.2.</u>	<u>IL1β-ELISA</u>	36
<u>3.8.</u>	<u>Tierexperimentelle Methoden</u>	37
<u>3.9.</u>	<u>Immunzytologie</u>	38
<u>3.9.1.</u>	<u>Charakterisierung von murinen Pankreasfibroblasten mittels</u>	
	<u>Immunzytologie</u>	39
<u>3.10.</u>	<u>Immunhistologie</u>	40
<u>3.10.1.</u>	<u>Durchführung</u>	40
<u>3.10.2.</u>	<u>Antikörper und Detektionssysteme</u>	41
<u>3.10.3.</u>	<u>Auswertung der immunhistologischen Schnitte</u>	41
<u>3.10.3.1.</u>	<u>Pan-Cytokeratin und “α-Smooth Muscle Actin” (α-SMA)</u>	41

<u>3.10.3.2.</u>	<u>"Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling" (TUNEL)</u>	42
<u>3.10.3.3.</u>	<u>Ki67</u>	42
<u>3.10.3.4.</u>	<u>Procaspasen</u>	42
<u>3.11.</u>	<u>Statistik</u>	43
4.	Ergebnisse	44
<u>4.1.</u>	<u>Isolation und Expansion muriner Pankreasfibroblasten</u>	44
<u>4.2.</u>	<u>Charakterisierung der isolierten Pankreasfibroblasten mittels immunzytologischer Färbung</u>	45
<u>4.3.</u>	<u>Versuche in vitro: Vergleich von cokultivierten und monokultivierten Panc89-Zellen</u>	46
<u>4.3.1.</u>	<u>Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie</u>	46
<u>4.3.2.</u>	<u>NF-κB Status</u>	50
<u>4.3.3.</u>	<u>IL1β-Sekretion</u>	52
<u>4.3.4.</u>	<u>Procaspase-Expression und Caspase-Aktivierung auf Proteinebene</u>	54
<u>4.3.4.1.</u>	<u>Procaspase-Expression auf Proteinebene</u>	54
<u>4.3.4.2.</u>	<u>Caspase-Aktivierung</u>	56
<u>4.3.4.3.</u>	<u>Expression der Caspase-Inhibitoren cIAP1, cIAP2 und XIAP</u>	58
<u>4.3.4.4.</u>	<u>Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 nach Behandlung der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132</u>	60
<u>4.3.5.</u>	<u>Procaspase-Expression auf RNA-Ebene</u>	62
<u>4.3.6.</u>	<u>Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 auf Proteinebene nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin</u>	67
<u>4.3.7.</u>	<u>Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin</u>	69
<u>4.3.8.</u>	<u>Aktivierung der MAP-Kinasen "Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2" (Erk1/Erk2)</u>	71
<u>4.3.9.</u>	<u>Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059</u>	72

<u>4.3.10.</u>	<u>Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 auf Proteinebene nach Behandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059</u>	74
<u>4.3.11.</u>	<u>Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM</u>	76
<u>4.4.</u>	<u>Versuche in vivo: Vergleich von Panc89 Mono- und Co-Tumoren</u>	77
<u>4.4.1.</u>	<u>Tumorwachstum</u>	77
<u>4.4.1.1.</u>	<u>Tumorvolumen</u>	77
<u>4.4.1.2.</u>	<u>Proliferation (Immunhistologische Färbung Ki67)</u>	78
<u>4.4.2.</u>	<u>Epithelialer und stromaler Anteil der Tumore</u>	79
<u>4.4.2.1.</u>	<u>Cytokeratin</u>	79
<u>4.4.2.2.</u>	<u>α-SMA</u>	82
<u>4.4.3.</u>	<u>Tumorvolumen nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung</u>	85
<u>4.4.4.</u>	<u>Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung (Immunhistologische Färbung TUNEL)</u>	86
<u>4.4.5.</u>	<u>Proliferation der Tumore nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung (Immunhistologische Färbung Ki67)</u>	89
<u>4.4.6.</u>	<u>Expression der Procaspasen 9, 3 und 7</u>	90
5.	Diskussion	94
6.	Zusammenfassung	109
7.	Summary	110
8.	Literaturverzeichnis	111
9.	Danksagung	119