

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II

Abteilung für Gastroenterologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Liebe

# **Wirkprinzipien von Histondeacetylaseinhibitoren in pankreatischen Sternzellen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Robin Bülow,

Rostock, den 17. September 2010

**Dekan:** Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster

2. Gutachter: PD Dr. med. Jutta Merkord

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk

Tag der Verteidigung: 08. März 2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom</b>	<b>3</b>
2.1.1	Chronische Pankreatitis	3
2.1.1.1	Epidemiologie der chronischen Pankreatitis	3
2.1.1.2	Ätiologie der chronischen Pankreatitis	3
2.1.1.3	Pathogenese der chronischen Pankreatitis	5
2.1.1.4	Klinik, Therapie und Prognose der chronischen Pankreatitis	6
2.1.2	Pankreaskarzinom	7
2.1.2.1	Epidemiologie des Pankreaskarzinoms	7
2.1.2.2	Ätiologie des Pankreaskarzinoms	7
2.1.2.3	Pathogenese des Pankreaskarzinoms	8
2.1.2.4	Klinik, Therapie und Prognose des Pankreaskarzinoms	18
<b>2.2</b>	<b>Pankreasfibrose</b>	<b>12</b>
2.2.1	Zelluläre und biologische Grundlagen der Pankreasfibrose	12
2.2.2	Aktivierungsmechanismen und Induktoren der Pankreasfibrose	20
2.2.3	Wege der Signaltransduktion in PSZ	15
2.2.4	Bedeutung der Fibrose in der Tumorprogredienz	16
2.2.5	Inhibitorische Ansatzpunkte nach Aktivierung der PSZ	18
<b>2.3</b>	<b>Histonmodifikation als epigenetischer Regulationsmechanismus</b>	<b>19</b>
2.3.1	Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI)	19
2.3.2	Natriumbutyrat, Valproat, Trichostatin A	20
2.3.3	Bedeutung der HDACI bei Tumor und Inflammation	21
2.3.4	Bedeutung der HDACI bei der Fibrose	22
<b>3</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellkulturarbeiten</b>	<b>25</b>
4.1.1	Isolation und Kultivierung von primären PSZ	25
4.1.2	Kultivierung von immortalisierten PSZ	26
4.1.3	Rekultivierung von Zellen	26

4.1.4 Allgemeiner Versuchsaufbau in Gegenwart der HDACI	27
<b>4.2 Zytohistologische Untersuchungen</b>	<b>27</b>
4.2.1 Morphologische Veränderungen der kultivierten PSZ	27
4.2.2 $\alpha$ -SMA Immunfluoreszenz-Färbung	27
4.2.3 Zellzählungen	28
4.2.4 Messung der Proliferation der kultivierten PSZ	28
4.2.5 Apoptose in der SubG1-Peak Analyse	34
4.2.5.1 Stimulation der Zellen	34
4.2.5.2 Probengewinnung	34
4.2.5.3 Messung	35
<b>4.3 Proteinanalytik und posttranslationale Veränderungen</b>	<b>30</b>
4.3.1 Western Blot-Analyse	31
4.3.1.1 Stimulation der Zellen	36
4.3.1.2 Zellernte und Probengewinnung	36
4.3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
4.3.1.4 Proteintransfer	38
4.3.1.5 Immunoreaktion	38
4.3.1.6 Detektion mittels ECL Plus™	38
4.3.1.7 Densitometrische Auswertung der Western Blots	39
4.3.2 Kollagensynthesemessung	35
4.3.2.1 Stimulation der Zellen	40
4.3.2.2 Probenaufarbeitung	40
<b>4.4 Regulation der Genexpression</b>	<b>36</b>
4.4.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	41
4.4.1.1 Stimulation der Zellen	41
4.4.1.2 Gewinnung von Kernextrakten	41
4.4.1.3 Markierung der Oligonukleotid-Sonde	42
4.4.1.4 Bindungsreaktion	43
<b>4.5 Nukleinsäureanalytik</b>	<b>39</b>
4.5.1 Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene	39
4.5.1.1 Präparation der RNA	44
4.5.1.2 Reverse Transkription	44
4.5.1.3 <i>Real-time</i> PCR (Taqman)	45

<b>4.6 Statistische Auswertung</b>	<b>41</b>
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Charakteristika des Aktivierungsprozesses der PSZ <i>in vitro</i></b>	<b>42</b>
5.1.1 Morphologie und Zellzahl der PSZ während der Kultivierung	42
5.1.2 Myofibroblastäre Differenzierung während der Sternzellkultivierung	42
5.1.3 Zusammenfassung	43
<b>5.2 Wirkung der HDACI auf PSZ</b>	<b>44</b>
5.2.1 Einfluss der HDACI auf die Histon-Acetylierung in primären PSZ	44
5.2.2 Einfluss der HDACI auf die Proliferation	46
5.2.2.1 Proliferation von primären PSZ in Gegenwart von HDACI	51
5.2.2.2 Proliferation von immortalisierten PSZ in Gegenwart von HDACI	52
5.2.2.3 Zusammenfassung	53
5.2.3 Einfluss der HDACI auf das Zell-Überleben von primären PSZ	49
5.2.3.1 Zellzahl lebender Zellen in Gegenwart der HDACI	55
5.2.3.2 Einfluss von HDACI auf den Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl	53
5.2.3.3 Apoptose in Gegenwart der HDACI	56
5.2.3.4 Zusammenfassung	56
5.2.4 Nachweis von $\alpha$ -SMA auf Proteinebene	52
5.2.4.1 Western Blot-Analyse zur quantitativen Bestimmung von $\alpha$ -SMA	57
5.2.4.2 Immunfluoreszenz-Analyse zur Expression von $\alpha$ -SMA	58
5.2.4.3 Semiquantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Analyse	59
5.2.4.4 Zusammenfassung	59
5.2.5 Kollagensyntheserate in Gegenwart der HDACI	55
5.2.5.1 Einbau von [ $^3$ H]-Prolin in saure Essigsäure-lösliche Proteine	60
5.2.5.2 Zusammenfassung	60
<b>5.3 Signaltransduktion in PSZ in Gegenwart der HDACI</b>	<b>56</b>
5.3.1 Signaltransduktion unter PDGF-Stimulation	56
5.3.1.1 Phosphorylierung von ERK unter dem Einfluss von PDGF	61
5.3.1.2 Zusammenfassung	62
5.3.2 Bindung von AP-1 an die DNA der PSZ	58
5.3.2.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zu AP-1	63
5.3.2.2 Zusammenfassung	64

<b>5.4 Wirkung der HDACI auf die Genexpression in primären PSZ</b>	<b>60</b>
5.4.1 <i>Real-time</i> PCR zur Expression von $\alpha$ -SMA, ET-1, TGF- $\beta$ 1	60
5.4.1.1 $\alpha$ -SMA-Expression in Gegenwart der HDACI	65
5.4.1.2 ET-1 Expression in Gegenwart der HDACI	66
5.4.1.3 TGF- $\beta$ 1 Expression in Gegenwart der HDACI	67
5.4.2 Zusammenfassung	67
<b>6 Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>6.1 Biologische Effekte der HDACI auf PSZ</b>	<b>63</b>
<b>6.2 Signalwegsaktivierung in PSZ in Gegenwart der HDACI</b>	<b>68</b>
<b>6.3 Genexpressionsprofil der PSZ in Gegenwart der HDACI</b>	<b>70</b>
<b>6.4 HDACI und Pankreaskarzinom</b>	<b>71</b>
<b>6.5 HDACI und chronische Pankreatitis</b>	<b>73</b>
<b>6.6 Ausblick</b>	<b>74</b>
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>9 Thesen</b>	<b>XX</b>
<b>10 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XXII</b>
<b>11 Herstellerverzeichnis</b>	<b>XXV</b>

# 1 Einleitung

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) ist ein Verdauungsorgan mit sowohl exokriner als auch endokriner Drüsenfunktion. Das Pankreas liegt hinter dem Magen teils intra-, teils sekundär retroperitoneal im oberen Bereich der Bauchhöhle. Makroskopisch wird das Pankreas in den Kopf, den Körper und den Schwanz eingeteilt. *In situ* wird dabei der Pankreaskopf vom Zwölffingerdarm umschlossen. Der Pankreaskörper erstreckt sich bis zum Pankreasschwanz entlang der Milzvene bis zum Hilus der Milz.

Die Produktion und Abgabe von Verdauungsenzymen (wie zum Beispiel Amylase, Lipase und Trypsinogen) wird als exokrine Funktion des Pankreas bezeichnet. Die gebildeten Enzyme bzw. aktivierbaren Vorstufen der Enzyme werden in ein weitverzweigtes Gangsystem geleitet, im Pankreasgang (Ductus pancreaticus) gesammelt, um insbesondere nach Nahrungsaufnahme in den Zwölffingerdarm abgegeben zu werden. Die endokrine Funktion der Bauchspeicheldrüse besteht unter anderem in der Freisetzung der Hormone Insulin und Glukagon, die der Aufrechterhaltung und Steuerung des Glukosespiegels im Blut dienen. Durch die Zellen der Langerhans'schen Inseln wird die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in die Zellen bzw. die Mobilisierung des Zuckers aus den Zellen in das Blut bewirkt.

Zu den bedeutenden Erkrankungen des Pankreas gehören die chronische Pankreatitis (CP) und das Pankreaskarzinom, welche mit einer Fibrose des Pankreas und dem Verlust der Organfunktionen einhergehen. Auch die Mukoviszidose, die bereits im Kindesalter zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität führt, ist eine mit der Organfibrose des Pankreas assoziierte Erkrankung.

Die CP verläuft in der Regel schubweise und führt zu einer fortschreitenden Gewebeerstörung und Beeinträchtigung der exokrinen, im weiteren Verlauf auch der endokrinen Funktion. Als häufigste Ursache der Erkrankung gilt (mit ca. 80 %) der chronische Alkoholabusus. Neben der alkoholinduzierten CP gibt es autoimmun, biliär sowie erblich bedingte Formen der CP. Vor allem im Frühstadium stellt der rezidivierende Schmerz in der Tiefe des Oberbauches, der von vielen Patienten als gürtelförmig ausstrahlend beschrieben wird, das Leitsymptom einer CP dar. Mit dem fortschreitenden Untergang der exokrinen Funktion des Organs, kommt es aufgrund der ungenügenden Enzymaktivität im oberen Dünndarm zu einer unzureichenden Nährstoffausnutzung. Typische Symptome wie zum Beispiel Gewichtsabnahme, Fettstühle, Meteorismus und Diarrhö im Sinne einer

Verdauungsstörung sind die Folge. Durch die Zerstörung der hormonproduzierenden Zellen der Langerhans'schen Inseln und somit der endokrinen Funktion des Pankreas kann sich das Krankheitsbild eines Diabetes mellitus mit den entsprechenden Symptomen und Spätfolgen entwickeln.

Das Pankreaskarzinom ist das Malignom mit der schlechtesten Prognose aller häufigen Tumore des Gastrointestinaltraktes und steht inzwischen bei beiden Geschlechtern an vierter Stelle aller Krebstodesursachen in Deutschland. Bei der in der Regel späten Symptomatik und dem damit verbundenem Zeitpunkt der Diagnosestellung ist die Behandlung des Pankreaskarzinoms sehr schwierig und eine kurative Operation nur bei 15 - 20 % der Patienten gegeben. Vor diesem Hintergrund wird die 5-Jahres-Überlebensrate nur mit ca. 5 % angegeben.

Die Fibrosierung der Gewebestrukturen, wie sie für die CP und das Pankreaskarzinom charakteristisch ist, bewirkt neben dem zunehmenden Verlust der exo- und endokrinen Organfunktion wahrscheinlich auch die verminderte Wirksamkeit medikamentöser Therapieansätze. Die zunehmend gebildete extrazelluläre Matrix führt zur Zerstörung des azinären Gewebes und zu unregelmäßigen Veränderungen der Ganglumina. Erst in den vergangenen Jahren wurden pankreatische Sternzellen (PSZ), welche die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix (EZM) im Pankreas sind, als zellbiologisches Korrelat der Fibrose identifiziert. In Gegenwart von profibrogenen Faktoren durchlaufen diese Zellen einen phänotypischen Wandel, der als Aktivierung der Sternzellen beschrieben wird: Die PSZ proliferieren und sezernieren gesteigerte Mengen von EZM-Proteinen (v.a. Kollagen Typ I und III). Bisher gibt es keine Therapieoption, die dem Prozess der Fibrosierung des Pankreas entgegenwirken oder ihn gar umkehren können.

In Forschungsarbeiten zur Leber- und Lungenfibrose konnte eine hemmende Wirkung sogenannter Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI) auf die Aktivität fibroblastärer Zellen in beiden Organen nachgewiesen werden. Die HDACI bewirken durch enzymatische Hemmung eine vermehrte Acetylierung der Histonmoleküle des Chromatins und vermitteln womöglich dadurch ihre antifibrotischen Effekte. Die biologischen und molekularen Wirkungen von HDACI auf pankreatische Sternzellen waren zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit weitgehend unbekannt und bilden den Gegenstand dieser Promotion. Motiviert wurden die Studien dabei durch das Ziel, experimentelle Ansätze für eine zukünftige antifibrotische Therapie zu finden.



## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom

Im folgenden Kapitel wird ein kurzer Überblick zu Ursachen und Verlauf der wichtigsten Erkrankungen des Pankreas gegeben, die durch einen bindegewebigen Umbau des Organs charakterisiert sind. Hinsichtlich der Genese von fibrotischen Umbauvorgängen im Pankreas kommt der chronischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom die größte Bedeutung zu.

#### 2.1.1 Chronische Pankreatitis

##### 2.1.1.1 Epidemiologie der chronischen Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis (CP) gehört mit einer Inzidenz von 8,2 Fällen pro 100.000 Einwohner und einer Prävalenz von 27,4 Fällen pro 100.000 Einwohner zu den häufigen gastrointestinalen Erkrankungen in Deutschland. Die CP geht mit einem ausgeprägten Verlust an Lebensqualität und mit erhöhten Mortalitätsraten im Vergleich zum gleichaltrigen Kontrollkollektiv einher. Die hohen jährlichen Behandlungskosten prägen zudem die sozioökonomische Bedeutung der CP (Mayerle & Lerch, 2007). Diese Hintergründe sind Anlass, das Krankheitsbild der CP weiter zu untersuchen und neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

##### 2.1.1.2 Ätiologie der chronischen Pankreatitis

Die entscheidende Ursache für die Entstehung einer CP ist in ca. 80 % der Fälle ein langjähriger Alkoholabusus. Dieser manifestiert sich in Form von akuten, häufig rezidivierenden Pankreatitiden und im Verlauf oft als CP (Ammann *et al.*, 1994; Ammann & Müllhaupt, 1994). Weiterhin gelten ca. 15 % aller chronischen Pankreatitiden als idiopathisch (Layer *et al.*, 1994). Dank der fortwährenden Charakterisierung genetischer Aspekte und anderer Hintergründe ist der Anteil der idiopathischen CP rückläufig.

##### *Genetische Hintergründe*

Ursache der sehr seltenen hereditären Pankreatitis ist eine Punktmutation im Gen des kationischen Trypsinogen (PRSS1). Die Punktmutation folgt einem autosomal-dominanten Erbgang und stabilisiert aktiviertes Trypsin, das bereits intrapankreatisch alle anderen Verdauungsenzyme in den enzymatisch-aktiven Zustand überführt und dadurch die Pankreatitis auslöst (Whitcomb *et al.*, 1996). Die Theorie der Autodigestion des entzündeten Pankreas wurde bereits im Jahre 1896 von Hans Chiari postuliert (Sachs, 1993). Dem Trypsin kommt demnach eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der CP zu. Es konnte zudem

nachgewiesen werden, dass Genmutationen eines endogenen Trypsin-Inhibitors, des Serinprotease-Inhibitors SPINK1 (Kazal-Typ 1), ebenfalls einen genetischen Risikofaktor der CP darstellen (Witt *et al.*, 2000). Die Mutation von SPINK1 wurde gehäuft bei Patienten mit CP ohne positive Familienanamnese oder andere Risikofaktoren beobachtet. Der Vererbungsweg dieser Mutationen ist bisher nicht eindeutig geklärt (Simon *et al.*, 2002). Andere Mutationen im CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sind die Ursache der Mukoviszidose, die auch als zystische Pankreasfibrose bezeichnet wird (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989). Diese ist in Mitteleuropa die häufigste angeborene Stoffwechselkrankheit und folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Die Manifestation der zystischen Fibrose lässt sich auf die Dysfunktion eines Chloridionenkanaltransporters und eine gestörte duktale Sekretion von Bikarbonat zurückführen (Welsh *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2001). Charakteristisch für diese Veränderungen sind ein deutlich eingedicktes Pankreassekret und die damit einhergehende chronische Inflammation des Organs.

### *Chronische Pankreatitis biliärer Genese*

Die chronisch obstruktive Pankreatitis biliärer Genese wird entweder durch entzündlich-ödematöse Schwellung oder durch Neoplasie bzw. Vernarbung hervorgerufen. Weiterhin können auch okkludierende Konkremente im Bereich des M. sphincter ampullae hepatopancreaticae (Sphincter Oddi) oder in anderen Abschnitten des Gangsystems die CP auslösen. Als Folge der Obstruktion kommt es zum biliären Rückstau in das Pankreasgangsystem und bei weiterhin bestehendem Abflusshindernis zur chronischen Inflammation des Pankreas.

### *Immunoreaktive Hintergründe*

Autoimmune Formen der CP können zu den seltenen chronisch entzündlichen Pankreatitiden gezählt werden. Im Falle einer Autoimmunpankreatitis lassen sich, zumindest bei der für Japan typischen Verlaufsform, erhöhte Konzentrationen von IgG4 nachweisen. Zusätzlich treten häufig Autoantikörper (z.B. Antinukleäre Antikörper; Antikörper gegen Lactoferrin und Carboanhydrase Typ II, Rheumafaktoren) auf (Pickartz *et al.*, 2007). Die Autoimmunpankreatitis kann mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie dem Sjögren-Syndrom und der sklerosierenden Cholangitis, koinzidieren (Ectors *et al.*, 1997).

### *Chronische Pankreatitis im Rahmen anderer Risikofaktoren*

Die Hyperkalziämie, wie sie z.B. im Rahmen eines Primären Hyperparathyreodismus beobachtet wird, gilt als ein möglicher Auslöser einer CP (Goebell, 1976). Eine weitere Ursache für Pankreatitiden stellt die Hypertriglyceridämie dar (Toskes, 1990; Sekimoto *et al.*,

2006). Dabei scheinen die Hyperkalziämie und die Hypertriglyceridämie direkt toxische Effekte auf die Zellen des Pankreas zu haben und chronische Pankreatitiden zu verursachen. Des Weiteren wird in der Literatur das Zigarettenrauchen als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer idiopathischen bzw. Alkohol-induzierten CP angegeben (Morton *et al.*, 2004).

### **2.1.1.3 Pathogenese der chronischen Pankreatitis**

In den vergangenen Jahrzehnten versuchten verschiedene Forschergruppen, die pathogenetischen Hintergründe der Alkohol-induzierten CP zu charakterisieren.

Die Pathogenese wurde daraufhin anhand der folgenden vier Hypothesen diskutiert: Ursprünglich wurde die alkoholische CP auf die „*Protein-Plaque Hypothese*“ (Sarles *et al.*, 1989) zurückgeführt, die eine Störung der Azinuszellfunktion durch Verlegung der kleinen Pankreasgänge postuliert. In zwei weiteren Arbeiten wurde die Schädigung pankreatischer Azinuszellen durch die „*Toxizität von Alkohol und seinen Abbauprodukten*“ (Pitchumoni & Bordalo, 1996) bzw. durch „*Oxidativen Stress und Lipidoxidation*“ (Braganza, 1996) als maßgeblich angesehen. Diese pathogenetischen Konzepte zur Alkohol-induzierten CP konnten jedoch weiterführenden morphologischen und biochemischen Untersuchungen nicht standhalten. Die heutzutage in der Literatur favorisierte vierte Theorie, die „*Nekrose-Fibrose-Sequenz*“ nach Klöppel, beschreibt die Alkohol-induzierte CP als Folge rezidivierender akuter Pankreatitiden (Klöppel & Maillet, 1992; Klöppel & Maillet, 1995).

Im Verlauf der rezidivierenden Entzündungen des Organs kommt es dabei zu fokalen Nekrosen im Rahmen akuter Veränderungen und zur chronischen Infiltration des Pankreasparenchyms. Anhand von morphologischen Befunden aus Pankreasresektaten konnte nachgewiesen werden, dass akute und chronische Veränderungen nebeneinander vorliegen (Klöppel & Maillet, 1991). Zu den akuten Veränderungen zählen kleinere und größere Fettnekrosen sowie deren pseudozystische Residuen. Die chronischen Veränderungen sind durch inter- bzw. perilobuläre Fibrosen gekennzeichnet, die sich vorrangig um die umschriebenen nekrotischen Bereiche verteilen. Die Fibrose ist sehr zellreich und enthält neben Lymphozyten und Makrophagen auch Myofibroblasten. Im Rahmen akuter Entzündungsschübe und weiterer Nekrosen nimmt der fibrotische Umbau des Organs stetig zu. Infolge der Fibrosierung verändern sich interlobuläre Pankreasgänge und zeigen häufig irregulär gestaltete Lumina mit Eiweißniederschlägen und verkalkten Konkrementen. Im fortgeschrittenen Stadium entwickelt sich die interlobuläre Fibrose nach Zerstörung der Azinuszellen weiter zu einer intralobulären Fibrose (Ammann *et al.*, 1996; Klöppel, 1999).

Im weiteren Verlauf lassen sich neben großen fibrotischen Bereichen auch wandverdickte Gefäße und prominente Nervenstrukturen nachweisen. Bei diesen spätentzündlichen Veränderungen werden nur noch vereinzelte Ansammlungen von Granulozyten und eine geringe Anzahl von Makrophagen und lymphozytären Zellen beobachtet. Die Myofibroblasten finden sich in diesem Stadium insbesondere in direkter Nachbarschaft zu geschädigten Gängen, die in einigen Fällen auch hyperplastische Gangepithelveränderungen aufweisen (Klöppel *et al.*, 2005).

### **2.1.1.4 Klinik, Therapie und Prognose der chronischen Pankreatitis**

Die CP stellt sich bei vielen Patienten als ein oligosymptomatisches Krankheitsbild dar. Die Mehrzahl aller Patienten wird durch rezidivierende starke Schmerzen in ihrem Befinden stark beeinträchtigt. Der gürtelförmige Schmerz in der Tiefe des Oberbauches gilt als das Leitsymptom der CP. In der klinischen Versorgung hat die adäquate symptomatische Schmerztherapie daher einen hohen Stellenwert. Ein weiteres Problem für den Patienten mit CP ergibt sich aus dem zunehmenden Verlust der exokrinen Organfunktion. Für den Patienten bestehen die Folgen der Maldigestion in Meteorismus bzw. Diarrhoe infolge der Fettintoleranz und der daraus resultierenden Gewichtsabnahme. Die exokrine Pankreasinsuffizienz wird durch Gabe von Enzympräparaten behandelt, die aus Schweinepankreta gewonnen werden. Der pankreoprive Diabetes mellitus der erkrankten Patienten erfordert stets die Gabe von Insulin. Anhand dieser typischen Symptome der CP und der meist stationären Versorgung wird der nicht umkehrbare Leidensweg der Patienten deutlich. Bei häufig rezidivierenden bzw. anhaltenden Abflusshindernissen und damit einhergehenden Schmerzen konnte in zwei großen Studien zur CP gezeigt werden, dass ein operatives Vorgehen langfristig eine gesteigerte Lebensqualität verschaffen kann (Sakorafas *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2003). Hinsichtlich der Prognose der CP werden die 10-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit ca. 70 % und die 20-Jahres-Überlebensrate mit etwa 45 % angegeben. Insgesamt geht die Erkrankung der CP mit einer 3,6fach gesteigerten Mortalität einher (Lowenfels *et al.*, 1994). In Zusammenhang mit der erhöhten Mortalität steht auch das stark erhöhte Risiko, nach jahrelanger CP an einem Pankreasmalignom zu erkranken. Eine große multizentrische Studie zeigte, dass dieses Risiko mit zunehmender Dauer der Erkrankung steigt (Lowenfels *et al.*, 1993).

## 2.1.2 Pankreaskarzinom

### 2.1.2.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom hat in Deutschland einen Anteil von ca. 3 % aller malignen Tumore und stellt bei beiden Geschlechtern die vierthäufigste Krebstodesursache dar. Der Bauchspeicheldrüsenkrebs hat unter den Männern in Deutschland eine Inzidenz von ca. 12,1 und bei den Frauen von ca. 9,0 pro 100.000 Einwohner (gemäß Altersstandardisierung nach Europastandard). Der Altersgipfel der Häufigkeit liegt dabei für beide Geschlechter zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Das mittlere Erkrankungsalter bei Männern wird mit 69 und bei Frauen mit 76 Jahren angegeben. Von allen Tumoren des Gastrointestinaltraktes handelt es sich bei dem Pankreaskarzinom um das Malignom mit der schlechtesten Prognose. Dabei entspricht die Mortalität des Bauchspeicheldrüsenkrebses nahezu seiner Inzidenz (lt. Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts, 2010).

### 2.1.2.2 Ätiologie des Pankreaskarzinoms

Bestimmte Risiken führen überdurchschnittlich häufig zu einer Erkrankung. Das Zigarettenrauchen wird in der Literatur als ein unabhängiger Risikofaktor angegeben. In einigen Studien konnte für das Zigarettenrauchen sogar eine dosisabhängige Wirkung auf die Erkrankungshäufigkeit an einem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden (Mack *et al.*, 1986; Doll *et al.*, 1994; Silverman *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2002A).

Ein weiterer gut untersuchter Risikofaktor ist die jahrelange Erkrankung an einer CP. Das Risiko, nach 10 bzw. 20 Jahren fortdauernder CP an einem Pankreasmalignom zu erkranken, wird in der Literatur mit etwa 1,8 % bzw. 4 % angegeben (Lowenfels *et al.*, 1993). Insbesondere aber bei hereditärer Pankreatitis besteht ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an einem Pankreaskarzinom. Das Lebenszeitrisiko wird dabei mit 40 % angegeben (Lowenfels *et al.*, 1997) und liegt damit höher als bei der CP ohne familiäre Häufung.

In der Literatur finden sich weitere Umweltfaktoren bzw. Noxen, die mit einem erhöhten Risiko einhergehen. Zu diesen gehören die Adipositas und der Diabetes mellitus, welche unter anderem zu den Parametern des metabolischen Syndroms gezählt werden können. Auch die besonders fett- und fleischreiche Ernährung sowie die chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* scheinen mit einer erhöhten Erkrankungshäufigkeit assoziiert zu sein (Ghadirian *et al.*, 1991; Stolzenberg-Solomon *et al.*, 2001). Andere Risikofaktoren, wie z.B. die Noxe Alkohol, begünstigen die CP und sind damit auch an der Entstehung pankreatischer Karzinome beteiligt. Ein direkter Einfluss von Alkohol auf die Entwicklung des Pankreaskarzinoms ist

bisher jedoch nicht gesichert. Weitere Details zu den Umwelt- bzw. Risikofaktoren sind in **Tabelle 1** zusammengestellt worden.

Ein geringer Anteil der Patienten ist von einer familiär bedingten Risikoerhöhung für Pankreaskarzinome betroffen (Ehrenthal *et al.*, 1987; Rulyak *et al.*, 2003). Das relative Risiko wird mit 18 bis 57fach angegeben, wenn ein Verwandter ersten Grades an einem Pankreasmalignom erkrankt ist (Tersmette *et al.*, 2001). Einige Krankheitssyndrome gehen ebenfalls mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für das Pankreaskarzinom einher. Hierzu zählen unter anderem das Peutz-Jeghers-Syndrom (Su *et al.*, 1999) und das familiäre atypische multiple Muttermal-Melanom-Syndrom (Lynch & Fusaro *et al.*, 1991). Des Weiteren sind das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (Lynch *et al.*, 1993) und die Mukoviszidose (Neglia *et al.*, 1995) mit einem erhöhten Pankreaskarzinomrisiko assoziiert.

Untersuchter Risikofaktor	Relatives Risiko (RR)*	Odds Ratio (OR)**	Literaturquelle
Zigarettenrauchen (>40 Jahre)	-	dosisabhängig <sup>(A)</sup>	Mack <i>et al.</i> , 1986; Doll <i>et al.</i> , 1994; Silverman <i>et al.</i> , 1994 <sup>(A)</sup> ; Lin <i>et al.</i> , 2002A
< 20 Stück/d		1,4 (0,9 - 2,2)	
20-39 Stück/d		2,5 (1,5 - 2,6)	
> 40 Stück/d		3,4 (2,0 - 5,8)	
Chronische Pankreatitis	-	2,23 <sup>(B)</sup> (1,43-3,49)	Lowenfels <i>et al.</i> , 1993; Bansal & Sonnenberg, 1995 <sup>(B)</sup> ; Malka <i>et al.</i> , 2002
Adipositas (BMI >30 kg/m <sup>2</sup> )	-	1,51 <sup>(C)</sup> (1,19 - 1,92)	Silverman <i>et al.</i> , 1998; Calle <i>et al.</i> , 2003; Pan <i>et al.</i> , 2004 <sup>(C)</sup>
Diabetes mellitus (>5 Jahre)	2,0 <sup>(D)</sup> (1,2 - 3,2)	-	Everhart & Wright, 1995 <sup>(D)</sup> ; Gapstur <i>et al.</i> , 2000
fett- und fleischreiche gegrillte Nahrung	-	2,19 <sup>(G)</sup> (1,4 - 3,4)	Ghadirian <i>et al.</i> , 1991; Baghurst <i>et al.</i> , 1991; Bueno de Mesquita <i>et al.</i> , 1991; Anderson <i>et al.</i> , 2002 <sup>(G)</sup>
Helicobacter pylori	-	1,87 <sup>(F)</sup> (1,05 - 3,34)	Stolzenberg-Solomon <i>et al.</i> , 2001 <sup>(F)</sup> ; Nilsson <i>et al.</i> , 2002
Alkohol	inkonstant	inkonstant	Ye <i>et al.</i> , 2002 <sup>(H)</sup> ; Lin <i>et al.</i> , 2002B; Rohrmann <i>et al.</i> , 2009

**Tabelle 1: Überblick zu Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms**

Das 95 %-ige Konfidenzintervall (KI) wurde jeweils bei RR und OR in Klammern gesetzt.

\* RR =  $p(\text{Krank}|\text{Exponiert}) / p(\text{Krank}|\text{Nicht-Exponiert})$

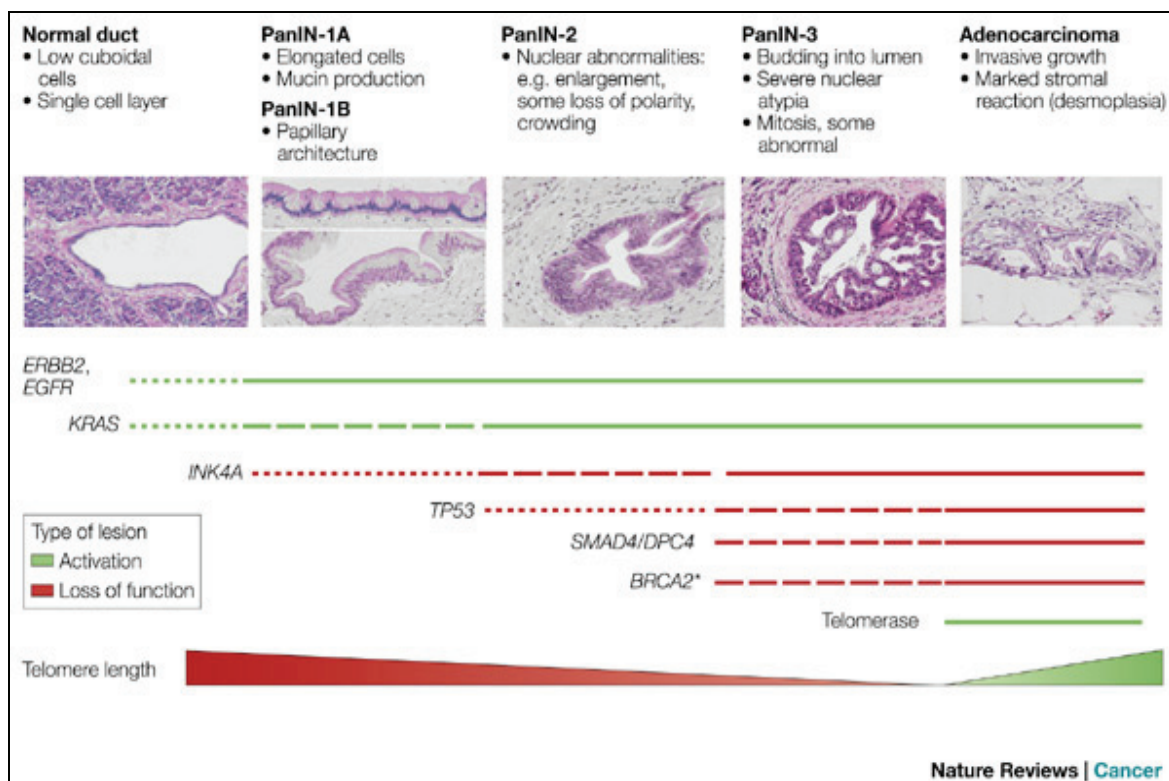
\*\* OR =  $p(\text{Krank}|\text{Exponiert}) / (p(\text{Gesund}|\text{Exponiert}) / p(\text{Krank}|\text{Nicht-Exponiert})) / (p(\text{Gesund}|\text{Nicht-Exponiert}))$

### 2.1.2.3 Pathogenese des Pankreaskarzinoms

In ca. 80 bis 90 % der histologisch gesicherten Pankreaskarzinome handelt es sich um ein duktales Adenokarzinom. Dieses ist zum überwiegenden Teil im Pankreaskopf (70 %) lokalisiert. Lediglich in einem geringen Anteil werden entdifferenzierte Zellen mit Merkmalen der azinären Drüsenendstücke oder anderer Zellentitäten nachgewiesen. Der

eigentliche zelluläre Ursprung des Pankreaskarzinoms ist noch immer Gegenstand kontrovers geführter Diskussionen. Neben der Möglichkeit einer Entartung differenzierter Zellen des Gangsystems oder der Azini findet zunehmend auch die Hypothese Beachtung, dass pankreatische Zellen mit Progenitor- bzw. Stammzeleigenschaften den Ausgangspunkt der Tumorigenese bilden (Kim *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2007; Ischenko *et al.*, 2010).

Beim häufigsten Pankreaskarzinom, dem duktalem Adenokarzinom, wird ein mehrstufiger Prozess hinsichtlich der Pathogenese angenommen. Mithilfe der Nomenklatur der sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) werden die malignitätsverdächtigen Veränderungen nach Ausmaß der Gewebsneubildungen (Neoplasien) voneinander abgegrenzt (Hruban *et al.*, 2001). In seltenen Fällen stellen Intraduktal papillär-muzinöse Neoplasien oder Muzinös-zystische Neoplasien die Vorläuferläsionen eines Pankreaskarzinoms dar (Hruban *et al.*, 2004; Klöppel & Lüttges, 2004). Am Ende des Mehrstufenprozesses der intraepithelialen Neoplasien steht das duktale Adenokarzinom. Eine Vielzahl somatischer Mutationen zeigt sich dabei bereits in den frühen Entartungsstadien (siehe dazu **Abbildung 1**).



**Abbildung 1: Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien** (Abbildung nach Bardeesy & DePinho, 2002); mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Publishers Ltd. (Nature reviews cancer), Copyright 2002: Intraepitheliale Neoplasien (PanINs) zeigen einen Mehrstufenprozess auf, in dem sich genetische Mutationen anhäufen. Obgleich bis jetzt keine eindeutige Korrelation bekannt ist, manifestiert sich am Ende dieses Prozesses häufig das duktale Adenokarzinom. Die gestrichelten Linien deuten den Zeitpunkt des Erstauftretens der Mutationen an.

In den meisten duktaalen Adenokarzinomen (>90 %) finden sich Mutationen im *K-ras* Gen (Almoguera *et al.*, 1988) und eine Überexpression von *HER-2/neu*, welche bereits früh und im weiteren Krankheitsverlauf gehäuft nachweisbar sind (Day *et al.*, 1996). Auch der Amplifikation des *epidermal growth factor*-(EGF)-Rezeptors kommt von Anfang an eine Rolle in der Tumorigenese zu. Gleichzeitig lässt sich im Verlauf der Karzinogenese häufig der Ausfall der Tumorsuppressorgene *p16/INK4A* und *p53* nachweisen. In fortgeschrittenen Stadien des Pankreaskarzinoms trifft man zudem vermehrt auf Mutationen im *BRCA2* und *SMAD4/DPC4* Gen (Hahn *et al.*, 1996A+B; Hahn & Schmiegel, 1998; Wilentz *et al.*, 2000). Beim duktaalen Adenokarzinom finden sich bereits sehr früh eine lokale Invasion und Metastasierung (Ahlgren, 1996). Die histologische Aufarbeitung von Proben in der nahen Umgebung des Tumors zeigt starke desmoplastische Veränderungen mit Zunahme von interstitiellem Bindegewebe. Die Pankreaskarzinome sind häufig stromareich und weisen im Rahmen der desmoplastischen Reaktion in erhöhtem Maße mRNA von Kollagen Typ I, III, IV, Fibronektin und Laminin, sowie Kollagen-Protein auf (Gress *et al.*, 1995). Neben diesen Befunden lassen sich eine erhöhte Neovaskularisierung und eine vermehrte Proliferation von Fibroblasten beobachten (Folkman, 1990; Büchler *et al.*, 2003). Die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix (EZM) im Pankreas sind die sogenannten pankreatischen Sternzellen (PSZ) (Omary *et al.*, 2007). Auch pankreatische Tumorzellen sind, wie *in vitro* und *in vivo* nachweisbar, in der Lage, verschiedene Komponenten der EZM zu produzieren (Löhr *et al.*, 1994).

Das Zusammenspiel beider Zellarten führt zudem über parakrine Stimulation der PSZ durch die Tumorzellen zur Zunahme des Bindegewebes im Pankreaskarzinom (Apte *et al.*, 2004; Bachem *et al.*, 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass sich die Widerstandsfähigkeit der Tumorzellen und PSZ gegen eine Chemotherapie durch das Wechselspiel beider Zellentitäten vergrößert. Dabei spielen die Botenstoffe Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) und Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle, welche mithilfe von NF- $\kappa$ B die Abwehr gegen Chemotherapeutika induzieren (Arlt *et al.*, 2002; Mürköster *et al.*, 2004). Auch einige Bestandteile der EZM, wie Kollagen, Laminin und das Proteoglykan Dekorin, sind von großer Bedeutung für die vermehrte Chemotherapieresistenz der Tumorzellen (Miyamoto *et al.*, 2004; Köninger *et al.*, 2004).

Viele Daten sprechen somit für eine Förderung der Tumorprogression durch die PSZ. Auf weitere Ergebnisse zu diesem Thema wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.



#### 2.1.2.4 Klinik, Therapie und Prognose des Pankreaskarzinoms

Aufgrund der erst spät einsetzenden Symptomatik der Pankreasmalignome kommt es in der Regel erst in fortgeschrittenen Stadien zur Diagnosestellung. Eine frühzeitige Behandlung des Pankreaskarzinoms ist nur selten möglich und eine kurative Operabilität lediglich bei 15 - 20 % der Patienten gegeben (Mancuso *et al.*, 2006). Nach der Operation wird eine adjuvante Chemotherapie mit dem Pyrimidinanalogon Gemzitabin durchgeführt (Oettle *et al.*, 2007). Dabei beträgt auch nach radikaler kurativer Resektion die 5-Jahres-Überlebensrate maximal 30 % (Bogoevski *et al.*, 2007; Garcea *et al.*, 2008).

In vielen Fällen lösen sich die Tumorzellen frühzeitig aus dem Pankreas ab und metastasieren bei den engen anatomischen Gegebenheiten schnell in die umliegenden Organe (z.B. Leber, Gallengang, Magen, Duodenum, Blutgefäße und Nerven). Auch beim lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinom ist die palliative systemische Chemotherapie mit Gemzitabin der Standard (Burris *et al.*, 1997; Berlin *et al.*, 2002). Das mittlere Überleben bei primärer Metastasierung und palliativen Maßnahmen wird mit nur ca. 3 bis 4 Monaten, in Verbindung mit der Chemotherapie mit ca. 6 bis 8 Monaten angegeben (Heinemann *et al.*, 2009). Nach neuester Studienlage kann die Kombination von Gemzitabin mit dem EGF-Rezeptor-Antagonisten Erlotinib die Überlebenszeit bei metastasiertem Pankreaskarzinom geringfügig, aber statistisch signifikant steigern (Moore *et al.*, 2007). Andere Mono- bzw. Kombinationstherapien können aufgrund von hoher Arzneimitteltoxizität, zu spärlicher Studienlage bzw. noch ausstehenden Ergebnissen in der Firstline-Therapie bisher nicht empfohlen werden (Adler *et al.*, 2007). Der mögliche Nutzen von Chemotherapie in Verbindung mit Strahlentherapie beim lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom wird unterschiedlich beurteilt (Neoptolemos *et al.*, 2004; Corsini *et al.*, 2008). Während in den USA die kombinierte Radiochemotherapie zum Therapiestandard gehört, ist die Indikation in Europa bisher nur für solche Patienten gegeben, bei denen ein fraglich resektables Pankreaskarzinom vorliegt. Eine weitere Indikation zur Strahlentherapie bleibt in Europa auf symptomatische Metastasen beschränkt (Adler *et al.*, 2007).

Insgesamt wird die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Männer mit etwa 5 - 7 % und für Frauen mit etwa 3 - 8 % angegeben (lt. Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts, 2010).

## 2.2 Pankreasfibrose

Die Organfibrose des Pankreas ist ein gemeinsames Merkmal sowohl der chronischen Pankreatitis als auch des Pankreaskarzinoms. Bei beiden Krankheitsbildern geht sie mit dem zunehmenden Verlust der exokrinen und auch endokrinen Organfunktion einher.

### 2.2.1 Zelluläre und biologische Grundlagen der Pankreasfibrose

Das zelluläre Korrelat der fibrotischen Umbauvorgänge des Pankreas sind die pankreatischen Sternzellen (PSZ). Bei diesen sternförmigen fibroblastären Zellen wird phänotypisch der ruhende vom aktivierten Zustand unterschieden. Im ruhenden Stadium stellen die PSZ etwa 4 % aller Zellen des gesunden Pankreas dar. In diesem Zustand werden sie durch das Vorhandensein von Lipidtröpfchen, eine niedrige Expression von  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) und eine geringe Proliferationsrate charakterisiert (Apte *et al.*, 1998).

Sowohl *in vitro* (Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.*, 1998) als auch *in vivo* bei Erkrankung oder Verletzung des Organs (Haber *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 2002; Yokota *et al.*, 2002) durchlaufen die PSZ morphologische Veränderungen und gehen in ihren aktivierten Zustand über. Charakteristischerweise sind die aktivierten PSZ stark positiv für das  $\alpha$ -SMA, welches als myofibroblastärer Differenzierungsmarker gilt (Apte *et al.*, 1998; Apte *et al.*, 1999) und intrazellulär in einem Netzwerk von sogenannten *stress fibern* organisiert ist (Masamune *et al.*, 2003B). Sowohl zellmorphologisch als auch funktionell ähneln die PSZ den *hepatischen* Sternzellen (HSZ), welche in Zusammenhang mit fibrotischen Umbauvorgängen in der erkrankten Leber stehen. In beiden Zellentitäten konnten intrazelluläre Lipidtröpfchen, in denen Vitamin A gespeichert wird, nachgewiesen werden (Watari *et al.*, 1982). In aktivierten PSZ kommt es zu einem Verlust der Vitamin A-Speicherung. Zudem zeigen die Zellen eine erhöhte Proliferationsrate und eine starke Expression von  $\alpha$ -SMA. Im aktivierten Zustand synthetisieren die PSZ in gesteigertem Maße extrazelluläre Matrixproteine (Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.*, 1998) und erlangen das Potential zur Migration und Phagozytose (Phillips *et al.*, 2003B; Shimizu *et al.*, 2005).

Bei Leber und Pankreas mehren sich die Hinweise, dass die Sternzellen neben fibroblastären Zellen auch andere organtypische Zellen hervorbringen können (Kordes *et al.*, 2009). Sternzellen können möglicherweise als Zellpopulation mit Progenitor- bzw. Stammzeleigenschaften aufgefasst werden. Jedenfalls scheinen die PSZ, vergleichbar mit den HSZ, eine höhere Plastizität zu besitzen, als bisher angenommen (Mato *et al.*, 2009). Unter der Bedingung von Entzündung oder Tumor manifestiert sich dieses erhöhte regenerative

Potential wahrscheinlich im Sinne einer fehlgesteuerten Wundheilung in der Form des myofibroblastären Sternzellphänotyps. Inwieweit dies auf alle Sternzellen oder nur auf eine Subpopulation im proinflammatorischen Mikromilieu zutrifft, bleibt bisher ungeklärt.

### 2.2.2 Aktivierungsmechanismen und Induktoren der Pankreasfibrose

*In vivo* führt die Organschädigung des Pankreas zu einer Aktivierung von Sternzellen (Zimmermann *et al.*, 2002). Bei anhaltendem Entzündungsreiz könnte die Fehlregulation der aktivierten PSZ den eigentlichen pathologischen Prozess darstellen. Demnach würde eine gestörte Wundheilung im Verlauf zur Organfibrose des Pankreas führen. In den vergangenen Jahren konnte dazu nachgewiesen werden, dass eine dauerhafte Aktivierung der PSZ auf Grundlage von autokrinen Regelkreisen unterhalten wird (Jaster & Emmrich, 2008).

Die bekannten Induktoren der Aktivierung von PSZ können in intra- und extrazelluläre Faktoren differenziert werden: Dabei wird Ethanol mit seinen Abbau- bzw. Folgeprodukten neben einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen als wichtigster Stimulator angesehen. Im klinischen Alltag stellt der Risikofaktor Ethanol die Hauptursache einer CP und der mit ihr einhergehenden Pankreasfibrose dar. Auf zellulärer Ebene stimuliert Ethanol *in vitro* die  $\alpha$ -SMA- und Kollagensynthese sowohl im ruhenden als auch im aktivierten Phänotyp der PSZ (Apte *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte unter dem zytotoxischen Einfluss von Ethanol und seinen Abbauprodukten (v.a. des Azetaldehyds) eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine bei den PSZ nachgewiesen werden (Apte & Wilson, 2003).

Neben den Folge- bzw. Abbauprodukten des Ethanols sind verschiedene mitogene und proinflammatorische Zytokine als Mediatoren der Fibrose identifiziert worden (**Tabelle 2**). Bei entzündlichen Erkrankungen des Pankreas, wie z.B. bei der CP, werden diese profibrotischen Mediatoren in gesteigertem Maße von geschädigten Azinuszellen, Thrombozyten und von einwandernden Entzündungszellen gebildet (Gukovskaya *et al.*, 1997; Luttenberger *et al.*, 2000; Sparmann *et al.*, 1997; Schmid-Kotsas *et al.*, 1999). Auch die Tumorzellen des Pankreaskarzinoms sind in der Lage, durch Bildung der Zytokine *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF) mit den PSZ zu interagieren und deren fibrotische Aktivität zu steigern (Kuniyasu *et al.*, 2001; Löhr *et al.*, 2001; Bachem *et al.*, 2005). Weiterhin wird der Aktivierungsprozess der PSZ durch die Interleukine IL1 $\beta$  und IL6 sowie den proinflammatorischen Faktor *tumor necrosis factor*- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) beschleunigt (Mews *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2001). Andere Interleukine, wie z.B. IL4, führen zu einer vermehrten

Proliferation der PSZ (Brock *et al.*, 2006) oder stimulieren, so wie IL10, die Kollagensynthese (Mews *et al.*, 2002).

Neben den Zytokinen anderer Zellen wirken eine Reihe von autokrinen Mediatoren: Die Sternzellen sind in der Lage, Polypeptide und Wachstumsfaktoren zu synthetisieren, mit denen sie die andauernde Aktivierung der eigenen Zelle bzw. der umgebenden PSZ unterhalten. Zu diesen Mediatoren gehören Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie, speziell TGF- $\beta$ 1 und *Activin A*, welche eine Schlüsselrolle in der konstitutiven Aktivierung der PSZ einnehmen (Kruse *et al.*, 2000; Shek *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2003). Dabei gilt TGF- $\beta$ 1 als stärkster Induktor der Kollagensynthese in PSZ (Bachem *et al.*, 1998; Apte *et al.*, 1999; Luttenberger *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2001).

Induktor		Bsp. für zelluläre Herkunft	Wirkung auf PSZ	Literaturquelle
	Ethanol, bzw. Metabolite	Exogen	Gesteigerte $\alpha$ -SMA- und Kollagen-Expressionsrate	Apte <i>et al.</i> , 2000
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>	Thrombozyten	Gesteigerte Matrixproteinsynthese	Bachem <i>et al.</i> , 1998; Schneider <i>et al.</i> , 2001
TGF- $\beta$ 1	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i>	Makrophagen, Thrombozyten, PSZ	Autokriner Hauptstimulator der Produktion von extrazellulärer Matrix	Bachem <i>et al.</i> , 1998; Apte <i>et al.</i> , 1999; Schmid-Kotsas <i>et al.</i> , 1999; Luttenberger <i>et al.</i> 2000; Kruse <i>et al.</i> , 2000; Schneider <i>et al.</i> , 2001; Shek <i>et al.</i> , 2002
	<i>Activin A</i>	PSZ	Autokriner Mediator der Sternzellaktivierung, Stimuliert Kollagensynthese	Ohnishi <i>et al.</i> , 2003
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>	Thrombozyten	Hauptstimulator der Proliferation, Migration der PSZ	Bachem <i>et al.</i> , 1998; Apte <i>et al.</i> , 1999; Luttenberger <i>et al.</i> , 2000; Schneider <i>et al.</i> , 2001; Phillips <i>et al.</i> , 2003B
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>	Tumorzellen	Gesteigerte Matrixproteinsynthese und Zellproliferation	Bachem <i>et al.</i> , 1998; Schneider <i>et al.</i> , 2001; Löhr <i>et al.</i> , 2001
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>	Azinuszellen	proinflammatorisch, Beschleunigt PSZ-Aktivierung, Stimuliert myofibroblastäre Differenzierung;	Gukovskaya <i>et al.</i> , 1997; Schneider <i>et al.</i> , 2001; Mews <i>et al.</i> , 2002
IL1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$	Azinuszellen, PSZ, Leukozyten	Stimuliert myofibroblastäre Differenzierung, Hemmt Kollagensynthese und Zellproliferation	Norman, 1998; Schneider <i>et al.</i> , 2001; Mews <i>et al.</i> , 2002
IL4	Interleukin 4		Stimuliert PSZ-Proliferation	Brock <i>et al.</i> , 2006
IL6	Interleukin 6	Azinuszellen	proinflammatorisch, Beschleunigt PSZ-Aktivierung, Stimuliert myofibroblastäre Differenzierung, Hemmt Kollagensynthese	Schneider <i>et al.</i> , 2001; Mews <i>et al.</i> , 2002; Yu <i>et al.</i> , 2002
IL10	Interleukin 10	HSZ	Stimuliert Kollagensynthese	Mews <i>et al.</i> , 2002
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>	Fibroblasten, PSZ, Tumorzellen, Azinuszellen, Gangzellen	Autokriner Mediator der Kollagensynthese und Zellproliferation, Migration und Adhäsion	Wenger C <i>et al.</i> , 1999; Moussad & Brigstock, 2000; Gao & Brigstock, 2005; Gao & Brigstock, 2006
ET-1	<i>Endothelin-1</i>	PSZ	Autokriner Mediator der Sternzellaktivierung, Kontraktion und Migration	Kakugawa <i>et al.</i> , 1996A+B; Klonowski-Stumpe <i>et al.</i> , 2003; Masamune <i>et al.</i> , 2005; Jonitz <i>et al.</i> , 2009; Fitzner <i>et al.</i> , 2009

Tabelle 2: Induktoren der PSZ-Aktivierung und ihre Wirkung auf die Zellen

Die aktivierten PSZ produzieren außerdem den sogenannten *connective tissue growth factor* (CTGF) (Gao & Brigstock, 2005). Er ist an einer Vielzahl von biologischen Vorgängen, wie z.B. Apoptose, Angiogenese, Migration, Adhäsion und Fibrose, beteiligt (Perbal, 2004). CTGF zählt dabei zu den wichtigsten autokrinen Stimulatoren der Kollagensynthese und der Sternzellproliferation (Gao & Brigstock, 2006; Karger *et al.*, 2008). Der *connective tissue growth factor* stimuliert auf transkriptioneller Ebene die Expression sowohl von TGF- $\beta$ 1 als auch der proinflammatorischen Interleukine IL1 $\beta$  und IL6. Im erkrankten Pankreas konnte sogar ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten CTGF-Expression und den verschiedenen Dysplasie-Schweregraden des Pankreaskarzinoms sowie der Pankreatitis festgestellt werden (Wenger *et al.*, 1999; diMola *et al.*, 1999; diMola *et al.*, 2002; diMola *et al.*, 2003).

Ein anderer autokriner Regelkreis beinhaltet die Expression von Endothelin-1 (ET-1) und den dazugehörigen Rezeptoren. Bei der CP wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der ET-1-Expression und dem Schweregrad der Fibrose nachgewiesen. ET-1 beeinflusst die Mikrozirkulation bei der chronischen Bauchspeicheldrüsenentzündung und vermittelt morphologische Veränderungen der PSZ während der Fibrosierung (Kakugawa *et al.*, 1996A+B). Die PSZ produzieren ET-1 und sind in der Lage, auf die ET-1-Rezeptorsignale mit Kontraktion und Migration, nicht aber mit Proliferation, zu reagieren (Klonowski-Stumpe *et al.*, 2003; Masamune *et al.*, 2005).

### 2.2.3 Wege der Signaltransduktion in PSZ

Die Signaltransduktionswege werden durch para- bzw. autokrine Mediatoren aktiviert und vermitteln intrazellulär Effekte auf die Genexpression, Proliferation, Differenzierung bzw. das Überleben der Zellen. Bisher konnten in den PSZ bedeutende Signaltransduktionswege der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Familie, konkret *extracellular signal-related kinases* (ERKs), *c-jun* N-terminale Kinase und p38 nachgewiesen werden (Jaster *et al.*, 2002; Masamune *et al.*, 2002B; McCarroll *et al.*, 2003; Masamune *et al.* 2003A; Masamune *et al.*, 2004). Außerdem wurde für die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) eine Beteiligung an intrazellulären PSZ-Signalwegen gezeigt (McCarroll *et al.*, 2004).

In manchen Fällen können den Signalwegen sogar einzelne Funktionen zugeordnet werden. So wurde nachgewiesen, dass der Rho-ROCK-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts in PSZ einnimmt (Masamune *et al.*, 2003B). Aus der Kenntnis der Signalwege und ihrer Funktion für die PSZ ergeben sich potenziell Therapieansätze. Vor diesem Hintergrund ist es von Interesse, dass mithilfe von Inhibitoren der MAPK- und PI3-

Kinase-Signalwege die PSZ-Aktivierung *in vitro* beeinflusst werden kann (Jaster *et al.*, 2002; Masamune *et al.* 2003A; Masamune *et al.*, 2004; McCarroll *et al.*, 2004); *in vivo* steht der Nachweis noch aus.

Die Signalkaskaden der Sternzellaktivierung vermitteln ihre Wirkung mithilfe der Transkriptionsfaktoren: *activator protein 1* (AP-1; aktiviert durch PDGF und andere Zytokine), *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B; stimuliert durch TNF- $\alpha$ ) und Smad (aktiviert durch Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie) (Jaster *et al.*, 2002; Masamune *et al.*, 2002B; Fitzner *et al.*, 2004; Ohnishi *et al.*, 2004). Demgegenüber wurde der Transkriptionsfaktor STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) als ein Inhibitor der Sternzellaktivierung identifiziert, welchem eine Schlüsselrolle bei der Signalvermittlung durch Interferon (IFN) - $\gamma$  zukommt (Fitzner *et al.*, 2007).

### 2.2.4 Bedeutung der Fibrose in der Tumorprogredienz

In der Literatur finden sich Daten, welche die Pankreasfibrose nicht nur als ein Begleitphänomen des Pankreaskarzinoms bzw. der CP darstellen. Vielmehr mehren sich die Belege dafür, dass durch die Fibrose die Progredienz des Pankreaskarzinoms gefördert wird.

Klinische Daten zeigen dazu eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein eines fibrotischen Herds und der damit einhergehenden verkürzten Überlebenszeit der Patienten (Watanabe *et al.*, 2003). Das Verhältnis von  $\alpha$ -SMA zu Kollagen in der Immunhistochemie stellt, vergleichbar mit dem Lymphknotenstatus eines Tumors, einen unabhängigen prognostischen Marker des duktales Adenokarzinoms dar. Der so ermittelte *Activated Stroma Index* korreliert mit dem medianen Überleben der Karzinompatienten (Erkan *et al.*, 2008). Ein hoher Anteil des für die PSZ charakteristischen  $\alpha$ -SMA verkürzt demnach die Überlebenszeit der Erkrankten (Erkan *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2010).

Die subkutane Injektion von humanen Pankreaskarzinomzellen und PSZ induziert in Nacktmäusen das Wachstum von besonders großen und stromareichen Tumoren. Ohne Beigabe von PSZ stellen sich die Tumorumfänge signifikant kleiner dar (Bachem *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse sind auch im Tiermodell mit orthotoper Injektion von humanen Karzinomzelllinien und PSZ gezeigt worden (Vonlaufen *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2008). Dabei konnte bei steigendem Anteil von injizierten PSZ eine entsprechend stärker vermehrte Tumormasse und eine gesteigerte Metastasierungshäufigkeit nachgewiesen werden. Des Weiteren reagieren die Tumorzellen in Gegenwart der Mediatoren humaner PSZ mit

dosisabhängig erhöhter Proliferation, verminderter Apoptose und erhöhter Resistenz gegen die Radio- bzw. Chemotherapie (Hwang *et al.*, 2008).

Infolge der Sternzellaktivierung kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Matrixproteinstoffwechsels. Charakteristischerweise findet sich eine vermehrte Synthese sowohl der Matrixmetalloproteinasen (MMP) als auch der *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP). Im Einzelnen werden vor allem die MMP-1, -2, -9 und -13 sowie die TIMP-1 und -2 durch die PSZ produziert (Yokota *et al.*, 2002; Shek *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2003A). Dabei ist die Sekretion der MMP-2 durch Stromazellen bzw. PSZ mit einer gesteigerten Tumorprogression und Zellinvasion assoziiert (Ellenrieder *et al.*, 2000; Schneiderhan *et al.*, 2007). Des Weiteren verstärkt das von den PSZ produzierte Typ-I-Kollagen den malignen Phänotyp duktaler Adenokarzinomzellen (Armstrong *et al.*, 2004).

TGF- $\beta$ 1 ist nicht nur als autokriner Mediator der Sternzellaktivierung, sondern auch für die Interaktion von Tumor- und Sternzellen von zentraler Bedeutung. So konnte nachgewiesen werden, dass TGF- $\beta$ 1-exprimierende Tumorzellen sowohl Kollagensynthese als auch Proliferation der PSZ verstärken. Zudem führt die orthotope Transplantation dieser TGF- $\beta$ 1-transfizierten Tumorzelllinie in das Pankreas der Nacktmaus zu einer deutlichen Mehranreicherung von pankreatischem Bindegewebe (Löhr *et al.*, 2001). In weiteren Studien zu diesem wichtigen autokrinen Mediator konnte in Karzinomzellen häufig eine defekte anti-proliferative Signalvermittlung nachgewiesen werden (Schneider & Schmid, 2003). Andere Wirkungen von TGF- $\beta$ 1, wie der Verlust von Zell-Zell Verbindungen und die gesteigerte Zellbeweglichkeit, könnten Grundlage der gesteigerten Invasion und Metastasierung von Tumorzellen sein (Akhurst & Derynck, 2001).

Das vor allem von aktivierten PSZ gebildete Protein CTGF scheint dagegen im Tumorgewebe einen prognostisch günstigen Parameter für den Verlauf darzustellen (Hartel *et al.*, 2004). Andererseits waren Antikörper gegen CTGF in der Lage, das Tumorwachstum und die Metastasierung zu hemmen (Aikawa *et al.*, 2006; Dornhöfer *et al.*, 2006). Die Literaturlage deutet bei CTGF somit auf ein ähnlich komplexes Bild, wie bei TGF- $\beta$ 1, hin.

Zusammen legen diese Daten nahe, dass die Pankreasfibrose und die Progression des Tumors an eine Vielzahl von Interaktionen zwischen PSZ und Tumorzellen geknüpft sind. Die Organfibrose des Pankreas geht dabei, wie bereits beim Pankreaskarzinom beschrieben, auch mit einer erhöhten Resistenz gegen Chemotherapeutika einher. Die herausragende Rolle der Fibrose in der Tumorprogression erfordert daher das Bestreben, neuartige antifibrotische Therapien zu entwickeln bzw. bereits bestehende Therapieansätze effizienter zu gestalten.

### 2.2.5 Inhibitorische Ansatzpunkte nach Aktivierung der PSZ

Im verletzten Organ ist die Sternzellaktivierung eine zeitlich limitierte und streng kontrollierte Reaktion. Bei anhaltendem Entzündungsreiz bzw. im Wechselspiel mit den Zellen des Pankreaskarzinoms könnte eine ausbleibende Apoptose der PSZ zu deren anhaltender Aktivierung und daraufhin zur Organfibrose führen. Vor diesem Hintergrund wurde versucht, pro-apoptotische Stimuli zu identifizieren. Dabei gelang es, den programmierten Zelltod der PSZ *in vitro* durch die endogenen Liganden CD95L, TRAIL und durch PK-11195, ein Ligand des peripheren Benzodiazepin-Rezeptors, zu induzieren (Klonowski-Stumpe *et al.*, 2002).

In den vergangenen Jahren wurden in einer Vielzahl experimenteller Studien Substanzen mit antifibrotischer Wirkkomponente identifiziert. Es traten dabei sowohl endogene als auch exogene Antagonisten der Sternzellaktivierung in den Blickpunkt verschiedener Forschungsgruppen. Als ein wichtiger Antagonist der Aktivierung der PSZ konnte bisher *in vitro* das Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) identifiziert werden. Es bewirkt das Verbleiben der PSZ im ruhenden Phänotyp und zeichnet sich durch eine inhibitorische Wirkung auf die Kollagensynthese aus (Baumert *et al.*, 2006; Fitzner *et al.*, 2007). Außerdem werden in der Literatur das Interleukin 10 (Demols *et al.*, 2002) und Liganden des nukleären Hormonrezeptors *peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$*  (PPAR- $\gamma$ ) (Masamune *et al.*, 2002A; Jaster *et al.*, 2005) als mögliche Inhibitoren des Aktivierungsprozesses der PSZ beschrieben. Weitere Wirkstoffe, für die inhibitorische Effekte auf die Sternzellaktivierung postuliert wurden, sind u.a. Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Kuno *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2003), der Cyclooxygenase-II (Aoki *et al.*, 2007), verschiedene Antioxidanzien (de Las Heras-Castano *et al.*, 2005) sowie der orale Trypsininhibitor Camostat (Emori *et al.*, 2005).

Ein weiterer Ansatzpunkt stellt möglicherweise die Beeinflussung der Sternzellaktivierung bzw. des Fibrosierungsgeschehens durch Modulation von epigenetischen Regulationsmechanismen dar. Auf diese Hypothese soll im nachfolgenden Kapitel wie auch im Rahmen dieser Arbeit näher eingegangen werden.



### 2.3 Histonmodifikation als epigenetischer Regulationsmechanismus

Epigenetische Mechanismen modifizieren die Chromatin-Struktur und beeinflussen die Genexpression. Unter dem Begriff „epigenetisch“ werden vererbare Veränderungen der Genfunktion subsumiert, welche nicht durch Veränderungen in der DNA-Sequenz erklärt werden können (Wu & Morris, 2001; Berger *et al.*, 2009). Nach derzeitigem Wissensstand stellen die Acetylierung von Histonmolekülen und die Methylierung von Promotoren die Schlüsselprinzipien der epigenetischen Modifikation des Chromatins dar (Khan & Krishnamurthy, 2005; Fuks, 2005).

Die in der Evolution zwischen Spezies und Zelltypen stark konservierten Histone sind oktamere Makromoleküle (je zwei H2A, H2B, H3, H4), um welche sich ein 146 bp langer Bereich der DNA-Doppelhelix windet. Die so entstandene Struktur wird als Nukleosom bezeichnet und kann an 26 Stellen acetyliert werden. Die DNA-Abschnitte zwischen den Nukleosomen und das dort befindliche H1-Histon werden zu einem Solenoid zusammengefasst. Die Vielzahl der Nukleosomen und Solenoide sowie höhere Organisationsstrukturen bestimmen das Ausmaß der Kondensation des Chromatins (Allan *et al.*, 1982; Wu & Grunstein, 2000).

Die enzymatisch reversible Acetylierung an den N-terminalen Aminosäureenden des Histonoktamers führt zur Auflockerung der Chromatin-Struktur und ermöglicht dadurch prinzipiell die Genexpression (Allan *et al.*, 1982; Hassig & Schreiber, 1997).

#### 2.3.1 Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI)

Das Verhältnis von Acetylierung und Deacetylierung in der Chromatinstruktur wird durch das dynamische Gleichgewicht zwischen Histonacetylasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) bestimmt. Die Hemmung der HDAC durch die Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI) verschiebt das Gleichgewicht zugunsten einer vermehrten Acetylierung der Histone. Die Isoenzyme der HDAC werden aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Genom der Hefe aktuell in vier Klassen eingeteilt. Die **Tabelle 3** gibt einen Überblick zu den HDAC und zeigt eine Auswahl der zum Teil klassenspezifisch hemmenden HDACI.

Infolge der HDAC-Hemmung werden je nach Zelltyp und umgebenden Stimuli bestimmte Lysin-Reste der Histonproteine acetyliert oder auf andere Art und Weise posttranslational modifiziert (Barratt *et al.*, 1994; Bartova *et al.*, 2005). Aufgrund des epigenetischen Angriffspunktes verändert die Hemmung der HDAC die Expression ganzer Cluster von Genen und beeinflusst damit prinzipiell zahlreiche molekulare Stoffwechselfvorgänge.

Klasse der HDAC	Isoenzyme der HDAC-Klassen	Homologes Gen in der Hefe	Vorkommen	Literaturquelle	Wirksame HDACI
I	HDAC1; HDAC2; HDAC3; HDAC8	Rpd3	Ubiquitär	Taunton <i>et al.</i> , 1996	Trichostatin A, SAHA, Natriumbutyrat, Valproat, Benzamide [z.B. Entinostat]
IIa	HDAC4; HDAC5; HDAC7; HDAC9	Hda1	Herz, Hirn, T-Zellen, Skelettmuskel	Rundlett <i>et al.</i> , 1996	Trichostatin A, SAHA, (Natriumbutyrat), (Valproat), (Entinostat)
IIb	HDAC6; HDAC10				Trichostatin A, SAHA, (Entinostat)
III	SIRT 1-7	Sir2	Ubiquitär	Frye, 2000	Nicotinamid, (Splitomicin)
IV	HDAC11	Hos3	Ubiquitär	Gao <i>et al.</i> , 2002	Trichostatin A, SAHA

**Tabelle 3: Aktuelle Klassifikation der Histondeacetylasen (HDAC):** Die Klassifizierung der HDAC wurde anhand der angegebenen Literaturquellen zusammengestellt. Eine Auswahl von HDACI wurde nach ihrer Affinität zu den Isoenzymen bzw. den Klassen der HDAC zugeordnet (Khan *et al.*, 2008; Blackwell *et al.*, 2008).

Auf der Ebene der Genexpression zeigen sich unterschiedliche Effekte, wobei verschiedene Gene sowohl herunter- als auch hochreguliert werden können (Mariadson *et al.*, 2000; Glaser *et al.*, 2003). Wahrscheinlich kann in Gegenwart der HDACI jedoch nur die Expression von ca. 2 - 25 % der Gene verändert werden (Van Lint *et al.*, 1996; Peart *et al.*, 2005).

Weiterhin sind die HDACI in der Lage, Transkriptionsfaktoren bzw. andere Proteine zu modifizieren und damit weitere Effekte auszulösen. In diesem Zusammenhang konnten vermehrt acetylierte Nicht-Histonproteine nachgewiesen werden (Glozak *et al.*, 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass einige HDACI, darunter Valproat und Suberoylanilinhydroxamat (SAHA), nicht nur Inhibitoren der Enzymfunktion sind, sondern bei bestimmten Isoenzymen der HDAC den Ubiquitin- bzw. Sumo-Protein-gesteuerten proteosomalen Abbau initiieren (Krämer *et al.*, 2003; Scognamiglio *et al.*, 2008).

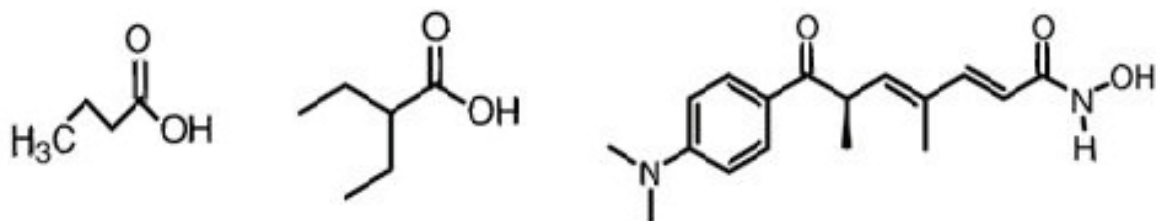
### 2.3.2 Natriumbutyrat, Valproat, Trichostatin A

Aufgrund der sehr heterogenen Molekularstruktur werden HDACI in bis zu sechs verschiedene Gruppen eingeteilt. Zu diesen zählen kleinkettige Fettsäuren, zyklische Tetrapeptide, Benzamide und Hydroxaminsäuren. Weiterhin können die elektrophilen Ketone und eine Gruppe mit sonstigen HDACI unterschieden werden (Bolden *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden die HDACI Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A verwendet (**Abbildung 2**).

Als erster Inhibitor der HDAC konnte Natriumbutyrat (bzw. Sodiumbutyrat, Butyrat, NaBu) identifiziert werden. Butyrat ist eine kurzkettige Fettsäure, welche die HDAC bei Wirkkonzentrationen im *millimolaren* Bereich hemmt (Boffa *et al.*, 1978). Im Dickdarm wird NaBu von Anaerobiern aus Ballaststoffen freigesetzt, teilweise enteral resorbiert und daraufhin größtenteils in der Leber verstoffwechselt (Mortensen & Clausen, 1996). Die pharmakokinetischen Eigenschaften, wie z.B. die kurze Plasmahalbwertszeit, setzen dem Einsatz von NaBu als HDACI *in vivo* enge Grenzen (Miller *et al.*, 1987). Allerdings stellen Butyrat-Quellen, wie z.B. das Prodrug Tributyrin, welche durch die Lipase gespalten wird, interessante therapeutische Alternativen zu NaBu dar (Chen & Breitman, 1994).

Trichostatin A (TSA) gilt als einer der am besten untersuchten HDACI und übernimmt in vielen experimentellen Studien die Funktion einer Referenzsubstanz. Als organischer Vertreter der größten und sehr potenten Gruppe der Hydroxaminsäuren entfaltet TSA seine Wirkung bereits bei Konzentrationen im *nanomolaren* bzw. *mikromolaren* Bereich. TSA kann aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert werden und wurde früher als Antimykotikum gegen Spezies der Gattung Trichophyton angewendet (Tsuji *et al.*, 1976). Erst später wurde die Fähigkeit von TSA entdeckt, die HDAC der Gruppe I und II reversibel zu hemmen (Yoshida *et al.*, 1990). Derzeit ist TSA aufgrund des Nebenwirkungsprofils nicht mehr als Arzneimittel zugelassen.

Valproat (VPA), ein weiterer HDACI aus der Gruppe der kurzkettigen Fettsäuren, zählt dagegen zu den HDACI mit klinischer Zulassung. VPA wird mit inzwischen über 35-jähriger Anwendererfahrung in der Neurologie als Antikonvulsivum eingesetzt. Indikationsbereiche sind neben der Langzeittherapie der Epilepsie auch bipolare Störungen. Interessanterweise hemmt VPA, wie auch NaBu, im *millimolaren* Bereich vorrangig die HDAC der Klasse I, weniger der Klasse II (Phiel *et al.*, 2001; Gottlicher *et al.*, 2001).



**Abbildung 2: Chemische Strukturen der verwendeten HDACI:** Die Abbildung zeigt die molekularen Strukturen von Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A (von links nach rechts).

### 2.3.3 Bedeutung der HDACI bei Tumor und Inflammation

In der Vergangenheit konnte nachgewiesen werden, dass Krebserkrankungen mit Veränderungen der epigenetischen Regulationsmechanismen bzw. mit Modifikationen an Histonen einhergehen (Gayther *et al.*, 2000; Fraga *et al.*, 2005; Gibbons, 2005). So wurde in einer Vielzahl von soliden Tumoren des Gastrointestinaltraktes eine erhöhte Expression der Histondeacetylasen der Gruppe I (mit den HDAC1, 2, 3 und 8) gefunden. Das Biopsiematerial humaner Pankreaskarzinome sowie Pankreaskarzinomzelllinien zeigen sich dabei in 85 bis 100 % der Fälle stark positiv für die verschiedenen HDAC der Gruppe I (Nakagawa *et al.*, 2007). Vor diesem Hintergrund sind HDACI wahrscheinlich in der Lage, insbesondere in Tumorzellen Einfluss auf Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose zu nehmen (Huang, 2006). Zahlreiche andere Erkrankungen sind ebenfalls mit einem veränderten Acetylierungsmuster von Histonen und anderen Proteinen assoziiert. Weiterhin zeigt sich eine veränderte Expression und Aktivität der entsprechend modifizierenden Enzyme. HDACI besitzen daher wahrscheinlich nicht nur ein anti-neoplastisches, sondern auch ein anti-inflammatorisches Potential (Adcock, 2007). Bei vielen Erkrankungen konnte in Gegenwart der HDACI eine Hemmung von Entzündungsmediatoren *in vitro* bzw. eine Verbesserung der Krankheitsaktivität *in vivo* nachgewiesen werden (Leoni *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Wiech *et al.*, 2009). Entsprechende Untersuchungen bei der Pankreatitis sind bisher nicht erfolgt. Aktuellen Studien zufolge besitzen HDACI unter bestimmten Bedingungen jedoch auch eine gewisse proinflammatorische Wirksamkeit. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass bestimmte Konfigurationen des mehrfach acetylierbaren H4-Histons in Zusammenhang mit der Expression von proinflammatorischen Stimuli stehen (Ito *et al.*, 2000).

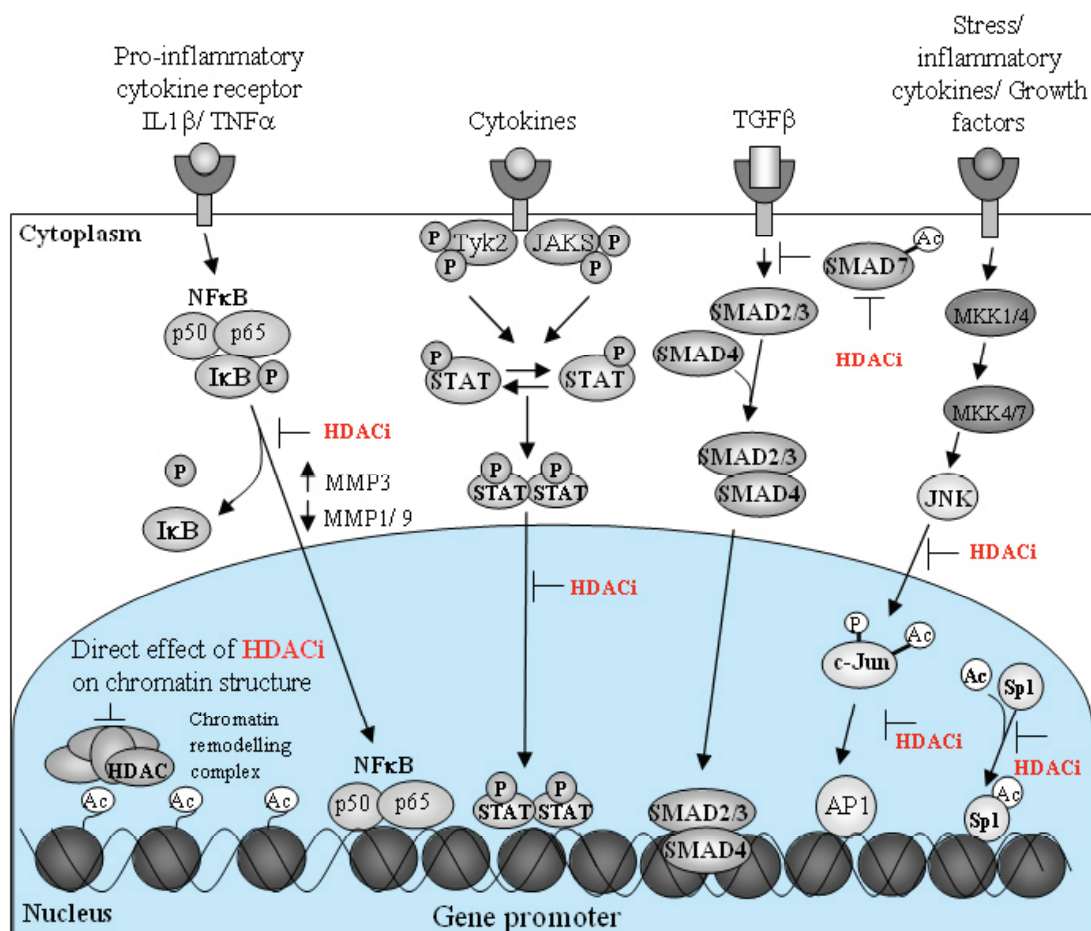
Zusammen legen die Daten nahe, dass eine immunmodulatorische Wirkung besteht und je nach Zelltyp und in Abhängigkeit von einwirkenden Stimuli die pro- bzw. anti-inflammatorische Komponente dominiert. Die Entwicklung isoenzymspezifischer HDACI könnte eine selektive Beeinflussung der Genexpression auf epigenetischer Ebene ermöglichen und Voraussetzungen für eine therapeutische Anwendung der HDACI als Antiphlogistika schaffen.

### 2.3.4 Bedeutung der HDACI bei der Fibrose

Sowohl im Modell der Leber- als auch der Lungenfibrose konnte bisher eine antifibrotische Wirksamkeit von HDACI in Zellkultur-Studien nachgewiesen werden. Die *hepatischen* Sternzellen (HSZ) als Hauptproduzenten der EZM bei der Fibrose in der Leber weisen zahlreiche ähnliche Merkmale in Struktur und Funktion wie die PSZ bei der Pankreasfibrose

auf (Kordes *et al.*, 2009). Die HDACi hemmen die Proliferation und Kollagensynthese der HSZ und vermindern die Expression des myofibroblastären Differenzierungsmarkers  $\alpha$ -SMA (Niki *et al.*, 1999). Weiterhin werden sowohl die Entwicklung des Actin-Zytoskelett in ruhenden HSZ als auch die Differenzierung der *hepatischen* Sternzellen durch HDACi behindert (Rombouts *et al.*, 2002). In kultivierten humanen Lungenfibroblasten verringern HDACi zudem die Expression des Typ-I-Kollagens (Rishikof *et al.*, 2004).

Die vielfältigen Ansatzpunkte der HDACi werden am Beispiel des Matrixproteinstoffwechsels deutlich (**Abbildung 3**) (Clark *et al.*, 2007). Interessanterweise sind die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- $\kappa$ B und Smad von besonderer Bedeutung für die Signalkaskaden der Sternzellaktivierung (siehe Kapitel zur Signaltransduktion in PSZ). Die Modifikation der epigenetischen Regulationsmechanismen durch Hemmung der HDAC könnte auch im Pankreas von klinischem Interesse sein. Der Einfluss von HDACi auf den Aktivierungsprozess und die Funktionen der PSZ ist bisher nicht charakterisiert worden und bildet den Fokus dieser Arbeit.



**Abbildung 3:** Einfluss der HDACi auf die Signalkaskaden (Abbildung nach Clark *et al.*, 2007); mit freundlicher Genehmigung von Oxford Molecular (Frontiers in Bioscience), Copyright 2007: Die Abbildung zeigt molekulare Angriffspunkte der HDACi.

### 3 Zielstellung

Mit der Identifizierung der PSZ wurde ein enormer Fortschritt bei der Erforschung der Pankreasfibrose erzielt. In der Gesamtschau ähneln die Zellveränderungen der PSZ der Aktivierung von *hepatischen* Sternzellen in fibrotisch umgewandeltem Lebergewebe; dies könnte in beiden Organen auf ähnliche Mechanismen bei Entstehung der Fibrose hindeuten. Viele Arbeiten beschäftigten sich inzwischen mit den molekularen Grundlagen der Sternzellaktivierung. Insbesondere beim Pankreaskarzinom mehren sich die Hinweise auf eine Tumorprogression durch die Organfibrose. In den vergangenen Jahren wurden daher zunehmend antifibrotische Therapieansätze postuliert.

Bis zum Abschluss dieser Arbeit gab es jedoch noch keine umfassenden Analysen, ob die Aktivierung der PSZ durch epigenetische Modifikation von Genen beeinflusst werden kann.

Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft stellt die Acetylierung von Histonmolekülen ein Schlüsselprinzip der epigenetischen Regulation dar. Die Hemmung der enzymatischen Deacetylierung der Histone mit Hilfe von sogenannten Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI) zeigte in jüngster Vergangenheit bei verschiedenen Erkrankungen ein anti-neoplastisches, immunmodulatorisches und potenziell antifibrotisches Wirkprofil.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biologischen Effekte von HDACI auf die Aktivierung von PSZ systematisch zu untersuchen. Zudem sollte der Einfluss der HDACI auf Ebene der transkriptionellen Regulation in den aktivierten PSZ näher charakterisiert werden.

Die Aktivierung der PSZ erfolgte *in vitro* durch die Kultivierung der Zellen. Im Einzelnen wurde die Wirkung der HDACI Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A auf die Sternzellaktivierung (u.a. hinsichtlich Kollagensyntheserate,  $\alpha$ -SMA-Expression und Proliferation) untersucht.

Mit der Charakterisierung der verwendeten HDACI verbindet sich die Hoffnung, einen neuartigen Ansatzpunkt zur Therapie der CP und des Pankreaskarzinoms auf Grundlage der Fibrosehemmung zu finden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Zellkulturarbeiten

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator unter wassergesättigter Atmosphäre sowie CO<sub>2</sub>-Begasung (5 % v/v) (Standardbedingungen) an Sterilwerkbänken mit Laminar-Luftstrom. In dem verwendeten *in vitro*-Modell wurde die Aktivierung der PSZ durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart von fetalem Kälberserum (FKS, Invitrogen) erreicht. Dabei wurden für die Untersuchungen ausschließlich adhärente Zellen verwendet. Bis zum Tag vier nach Isolation wurden die PSZ als nicht aktivierte Zellen bezeichnet, da sich in ihnen nur wenig  $\alpha$ -SMA befindet. Ab dem fünften Tag waren sie deutlich  $\alpha$ -SMA-positiv und wurden daher als aktivierte PSZ betrachtet.

Alle Chemikalien, bei denen nicht explizit der Hersteller aufgeführt wurde, stammen von Sigma-Aldrich.

#### 4.1.1 Isolation und Kultivierung von primären PSZ

PSZ wurden aus der gesunden Bauchspeicheldrüse von ausgewachsenen, männlichen LEW.1W Inzuchtratten gewonnen (Apte *et al.*, 1998). Das Pankreas wurde vor der Entnahme aus der narkotisierten Ratte mit einem Gemisch aus Kollagenase P (0,05 %, Roche), Protease IX (0,02 %) und Deoxyribonuklease (0,1 %, Roche) in *Hank's buffered salt solution* (HBSS, PAA) gespült. Daraufhin erfolgten eine grobe Zerkleinerung mit einer Schere sowie eine zehnminütige Inkubation bei 37°C. Die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren mit einer 10 ml Pipette vereinzelt und durch ein Zellsieb (Sigma) mit 150  $\mu$ m Porengröße gegeben. Die anschließende Isolation erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation (Heraeus, Labofuge 400R) mit 12 % Nycodenz (Nycomed) für 20 min bei 2800 rpm (Jaster *et al.*, 2002; Jaster *et al.*, 2003). Infolge des hohen Fettgehalts haben die PSZ eine deutlich geringere Dichte als die übrigen Zellen des Pankreas und sammeln sich oberhalb des Nycodenz. Dieser Zellring wurde abpipettiert und daraufhin noch einmal gewaschen.

Anschließend erfolgte die Kultivierung der primären PSZ auf Zellkulturplatten (Greiner) in Iscove Medium (Biochrome) mit 17 % FKS, 100 U/ml Penizillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Gibco) und mit 1 % einer hundertfachen Stammlösung nichtessentieller Aminosäuren (NEA) (Invitrogen). Mit den ersten beiden Medienwechseln (24 und 48 h nach der Isolierung) wurden fast alle kontaminierenden Zellen entfernt, so dass die PSZ zu über 95 % rein vorlagen. Die Reinheit der Zellpopulation wurde mit Hilfe der Licht-, Phasenkontrast-

und/oder Fluoreszenzmikroskopie (Axiovert 25) überprüft. Ein Mediumwechsel erfolgte bei den Zellen im weiteren Verlauf alle 48 h.

#### **4.1.2 Kultivierung von immortalisierten PSZ**

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jaster standen immortalisierte Tetracyclin-responsive Sternzellen der Ratte zur Verfügung. Ausgangszellen für die Tetracyclin-responsiven Sternzellen waren die zuvor durch SV40 large-T-Antigen Transfer immortalisierten Sternzellen (LTC-7 Zellen) (Sparmann *et al.*, 2004). Mit diesen Zellen erfolgten unter dem Einfluss der HDACI erste Untersuchungen zur vermehrten Acetylierung (Daten nicht gezeigt) sowie verschiedene Proliferationsassays. Der Tetracyclin-Responsivität kam dabei keine weitere Bedeutung zu.

Im Gegensatz zu den primären PSZ wurden die immortalisierten Zellen in IMDM unter Zusatz von 10 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) NEA, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Ansonsten wurden die immortalisierten PSZ, wie auch die primären PSZ, für die einzelnen Experimente unter den Standardbedingungen der Kultivierung aufgearbeitet.

#### **4.1.3 Rekultivierung von Zellen**

Die PSZ proliferieren während der Kultivierung am stärksten zwischen dem dritten und zehnten Tag. Darüber hinaus finden nur noch wenige Zellteilungen statt. Nachdem die PSZ mit ca. 90 %-iger Konfluenz in den Zellkulturschalen angewachsen waren, wurden sie am siebten Tag einmalig passagiert. Neben primären PSZ wurden in einzelnen Versuchen immortalisierte PSZ verwendet, die aufgrund einer raschen Proliferation bereits nach drei Tagen passagiert wurden.

Für die Rekultivierung der Zellen musste das Medium abpipettiert und 0,05 % Trypsin (Gibco) auf die Zellen gegeben werden. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Trypsin entfernt und die Zellen für 4 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Zellkulturmedium (17 % FKS bei primären PSZ; 10 % FKS bei immortalisierten PSZ) konnten die Zellen von den Platten abgespült und zugleich das verbliebene Trypsin inaktiviert werden. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation (Hettich, Rotina 46R) der Zellen für 7 min bei 1400 rpm. Das entstehende Zellpellet wurde in Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen je nach Versuchsaufbau auf frische Zellkulturplatten ausgesät.



#### 4.1.4 Allgemeiner Versuchsaufbau in Gegenwart der HDACI

Die PSZ wurden mit den Konzentrationen der HDACI inkubiert, die in Vorversuchen Effekte auf die Histon-Acetylierung bzw. Proliferation der PSZ bewirkt hatten.

Wenn nicht anders angegeben, wurde Natriumbutyrat und Valproat im *millimolaren* Konzentrationsbereich (1 mM; 4 mM; 10 mM), sowie Trichostatin A in *mikromolaren* Konzentrationen (0,1  $\mu$ M; 0,4  $\mu$ M; 1,0  $\mu$ M) verwendet.

Natriumbutyrat und Valproat wurden in H<sub>2</sub>O gelöst. Bei Trichostatin A erfolgte die Lösung in Ethanol bei einer Endkonzentration von 5 mM (**Tabelle 4**). Die Gewinnung der Proteine, Kernextrakte bzw. der RNA erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach 24-stündiger Inkubation mit den HDACI.

HDACI	Lösungsmittel	Firma
Natriumbutyrat	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Valproat	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trichostatin A	Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

**Tabelle 4:** Verwendete HDACI mit Lösungsmittel.

## 4.2 Zytohologische Untersuchungen

### 4.2.1 Morphologische Veränderungen der kultivierten PSZ

Die PSZ wurden nach der Präparation auf 6-*well* Zellkulturplatten (Greiner) verteilt. Mithilfe des Phasenkontrastmikroskops (Vergrößerung x 200) wurde täglich die Morphologie und das Wachstumsverhalten sowie die Konfluenz der PSZ vor und nach Passagierung beobachtet.

### 4.2.2 $\alpha$ -SMA Immunfluoreszenz-Färbung

Nach Passagierung wurden primäre PSZ auf Deckgläschen am Boden von 12-*well* Zellkulturplatten verteilt. Die Deckgläschen mit den darauf angewachsenen Zellen wurden für 24 h mit den HDACI inkubiert.

Anschließend wurden die PSZ auf den Deckgläschen 1 min mit PBS gewaschen und 10 min lang in eiskaltem Methanol fixiert. Es folgten zwei Waschschrte über je 10 min in PBS sowie das Abblocken unspezifischer Bindungen mit 1 % BSA (Biomol) für 30 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die PSZ in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur mit einem monoklonalen  $\alpha$ -SMA-Antikörper (1:100 verdünnt) aus der Maus inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS erfolgte die Inkubation der Deckgläschen mit einem

FITC-markierten Maus-spezifischen Antikörper (Alexa Fluor® goat anti-mouse IgG, MoBiTec) für weitere 30 min bei Raumtemperatur. Nicht gebundener sekundärer Antikörper wurde mit PBS abgewaschen und das Deckgläschen im Einbettmedium (25 % Glycerin; 10 % Polyvinylchlorid; 0,4 % Phenol; 0,05 M Tris, pH 8,5) auf dem Objektträger fixiert. Die Auswertung der Proben erfolgte dann mithilfe des Fluoreszenzmikroskop und entsprechender Fotodokumentation.

Die  $\alpha$ -SMA-Expression sowie die Strukturierung des Proteins in Form sogenannter *stress fiber* in Gegenwart der HDACI wurde anhand von verblindeten Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Dabei wurden die Ränge 0, 1, 2 und 3 vergeben, wobei „0“ gering oder nicht vorhandenes  $\alpha$ -SMA bzw. die Abwesenheit von *stress fibern* und „3“ eine starke Expression und ausgeprägte *stress fiber* darstellt.

### 4.2.3 Zellzählungen

Mithilfe des Trypanblau-Ausschluss-Tests wurde die Zellzahl lebender und toter Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach Passagierung in gleicher Anzahl auf 6-*well* Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h mit den HDACI inkubiert. Daraufhin wurden das Medium abpipettiert und die Zellen abtrypsiniert.

Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden das Trypsin entfernt, und die Zellen für 4 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Zellkulturmedium mit 17 % FKS wurden die primären PSZ von den Platten abgespült und zugleich das verbliebene Trypsin inaktiviert werden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (Hettich, Rotina 46R) der Zellen für 7 min bei 1400 rpm. Das Zellpellet wurde in 100  $\mu$ l Medium resuspendiert und daraufhin die Anzahl lebender und toter Zellen in Zählkammern des Typs Neubauer bestimmt.

### 4.2.4 Messung der Proliferation der kultivierten PSZ

Die PSZ (je 3000 Zellen/*well*) wurden nach Passage am siebten Tag auf 96-*well* Zellkulturplatten (Greiner) vorgelegt. Daraufhin wurden die PSZ mit den HDACI für 24 h inkubiert (Natriumbutyrat und Valproat: 0,1 mM; 0,4 mM; 1 mM; 4 mM; 10 mM sowie Trichostatin A: 0,01  $\mu$ M; 0,04  $\mu$ M; 0,1  $\mu$ M; 0,4  $\mu$ M; 1,0  $\mu$ M) verwendet.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung der DNA-Synthese der Zellen über den Einbau von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) im BrdU-Zell-Proliferations-ELISA nach Herstellerangaben (Roche Diagnostic GmbH): Das BrdU wurde dazu für weitere 24 h nach Inkubation mit den HDACI im Überschuss (in einer Endkonzentration von 0,2 % oder 10  $\mu$ M) zu den Zellen

gegeben. Bei der weiteren Neusynthese der DNA in den PSZ wurde anstelle von Thymidin BrdU in die DNA eingebaut. Je stärker die Zellen proliferierten, desto mehr BrdU befand sich in der DNA der Zellen.

Nach Fixierung der Zellen auf Mikrotiterplatten und einer teilweisen Denaturierung der DNA wurde die DNA-Synthese dann mithilfe eines BrdU-spezifischen Antikörpers quantifiziert. Der Antikörper war mit einer Peroxidase gekoppelt, welche die enzymatische Umsetzung eines zugegebenen Substrats in ein farbiges Produkt katalysiert. Je mehr Antikörper an die DNA gebunden hatte, umso intensiver war der Farbumschlag und desto höher die gemessene Extinktion. Die Peroxidase-Reaktion wurde dabei durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (in einer Endkonzentration von 0,2 M) beendet und anschließend die Extinktion bei 450 nm photometrisch (Anthos Reader 2001, Anthos Labtec Instruments) bestimmt.

### 4.2.5 Apoptose in der SubG1-Peak Analyse

Die DNA intakter Zellen ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert. In apoptotischen Zellen bewirken aktivierte Endonukleasen eine Fragmentierung des Erbguts in kleinmolekulare DNA-Abschnitte (*low molecular weight-DNA*; LMW-DNA). Während in apoptotischen Zellen der Gehalt an nukleärer DNA (*high molecular weight-DNA*; HMW-DNA) abnimmt, steigt somit die Konzentration der LMW-DNA sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma.

Mithilfe der Durchflusszytometrie kann der DNA-Gehalt in den Zellen nach Anfärbung mit Propidium-Iodid bestimmt werden. Propidium-Iodid interkaliert in die DNA und wird durch einen Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 490 nm angeregt, Licht zu emittieren. Die Fluoreszenz-Intensität des Propidium-Iodids ist dabei direkt proportional zur Menge diploider DNA. Apoptotische und damit subeuploide Zellen erscheinen als sogenannter SubG1-Peak auf der DNA-Achse, da die Zellen in der G1-Phase im Kern diploide DNA enthalten (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

#### 4.2.5.1 Stimulation der Zellen

Die Zellen wurden bis zu 90 %-iger Konfluenz in 6-well-Platten kultiviert und für 24 h wie angegeben mit den HDACI inkubiert. Weiterhin erfolgte die Inkubation einer mitgeführten Probe mit Simvastatin in einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.5.2 Probengewinnung

Für die Probengewinnung wurde der Kulturüberstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, wobei das PBS in den

Probenröhrchen gesammelt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl 10 × Trypsin/EDTA und 300 µl PBS überschichtet und im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen sich ablösten und vereinzelt vorlagen. Diese Zellsuspension wurde, wie auch das PBS eines weiteren Waschvorganges, in die Zentrifugenröhrchen der Proben überführt. Im Anschluss daran wurden die Proben mit 1200 rpm für 5 min (bei 4°C) zentrifugiert, woraufhin der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde dann in 2 ml PBS resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation der dabei entstandene Überstand entfernt. Anschließend wurde den Proben unter anhaltendem Vortexen 2 ml eiskaltes Ethanol (70 %) hinzugefügt. Weiterhin wurden die Proben nun in die definitiven Messröhrchen für die Messung am FACS-Gerät überführt und für mindestens 12 h bei -20°C eingelagert. Im Rahmen der weiteren Aufarbeitung der Proben wurde das Ethanol für 5 min mit 1200 rpm (bei 4°C) abzentrifugiert und verworfen. Es folgten die Spülung des Zellpellet mit 2 ml kalter PBS-Lösung, sowie die erneute Zentrifugation. Nach Entfernung des entstandenen Überstandes wurde das übriggebliebene Zellpellet in 400 µl PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 (Roth) und 1 mg/ml RNase (Roche) resuspendiert und für eine Stunde (bei 8°C) inkubiert. Abschließend erfolgten die Zugabe von 50 µg/ml Propidiumiodid (BD Biosciences) und die Messung sowie Auswertung am FACS-Gerät.

### *4.2.5.3 Messung*

Die Messung der Proben erfolgte mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Biosciences). Dabei wurde die Intensität der orangefarbenen Fluoreszenz im Gate FL2 bestimmt und auf der x-Achse angezeigt, wohingegen auf der y-Achse die Zellanzahl (mit gleichem x-Wert) dargestellt wurde. Die Auswertung erfolgte auf einem Apple PC mit der Software Cell Quest. Es wurden die Anzahl der Zellen im Bereich des SubG1-Peaks und ihr Anteil an der Gesamtmessung bestimmt.

## **4.3 Proteinanalytik und posttranslationale Veränderungen**

Die Expression von Proteinen in den PSZ wurde unter dem Einfluss der HDACI in Western Blot-Analysen untersucht. In den verschiedenen Experimenten wurden dabei das H3-

Histonprotein, das Strukturprotein  $\alpha$ -SMA sowie wichtige Proteine der Signaltransduktion in den PSZ detektiert. Des Weiteren erfolgte die Quantifizierung der Kollagensyntheserate der PSZ durch Messung des Einbaus von 2,3- $^3\text{H}$ -Prolin in Essigsäure-lösliche Proteine.

#### 4.3.1 Western Blot-Analyse

Der Immunoblot eignet sich zum sensitiven und spezifischen Nachweis von Proteinen. Dabei werden die Proteine der Zellen zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose (Amersham) bzw. PVDF-Membran (Roche) transferiert. Anschließend wird, je nach Auswahl des Antikörpers, ein bestimmtes Protein markiert. Der Primärantikörper wird dabei durch einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper kenntlich gemacht. Nach Bandendetektion erfolgt das *Reprobing* der Membran mit weiteren Antikörpern zum Nachweis vergleichbarer Ausgangsproteinmengen in den Proben.

##### 4.3.1.1 Stimulation der Zellen

Nach Passagierung wurden die primären PSZ bis zu einer Konfluenz von mindestens 50 % in serumhaltigem Iscove Medium (17 % FKS) kultiviert und daraufhin mit den untersuchten HDACI für 24 h inkubiert. In einigen Versuchen wurden die PSZ anschließend für 60 min mit PDGF (R&D Systems) (1:1000) stimuliert, um mögliche Effekte auf die Signaltransduktion näher zu charakterisieren.

##### 4.3.1.2 Zellernte und Probengewinnung

Um die Zellen zu ernten, wurde das Medium nach Inkubation mit den HDACI entfernt. Anschließend wurden die PSZ in den 6-*well* bzw. 12-*well* Zellkulturplatten durch gleiche Volumina (6-*well*≅300  $\mu\text{l}$ ; 12-*well*≅150 $\mu\text{l}$ ) eines reduzierenden SDS-Probenpuffer (95°C) denaturiert, so dass Gesamtzelllysate mit gleicher Proteinkonzentration vorlagen. Das anionische Detergenz SDS lagerte sich an die hydrophoben Aminosäuren und neutralisierte so die Eigenladung der Proteine. Das ebenfalls im SDS-Probenpuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol reduzierte die vorhandenen Disulfidbrücken der Proteine. Die so aufgearbeiteten Zelllysate wurden für 5 min auf 95°C erhitzt, abzentrifugiert ( $U_{\text{max}}$  bei 25°C) und bis zur Proteinbestimmung bei -20°C eingelagert. Die hierbei, wie auch im weiteren Verlauf, verwendeten Puffer und Reagenzien sind in **Tabelle 5** dargestellt.

<b>SDS Probenpuffer (reduzierend)</b>	<b>Sammelgelpuffer</b>
2 % (w/v) SDS (Roth)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
10 % Glycerin (Merck)	13,9 mM SDS
5 mM EDTA, pH 8 (Merck)	
62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 (Roth)	<b>Trenngelpuffer</b>

1 Spatelspitze Bromphenolblau	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
5 % 2-Mercaptoethanol	13,9 mM SDS
<b>Laufpuffer SDS-PAGE</b>	<b>Transferpuffer</b>
25 mM Tris-HCl, pH 8,8	192 mM Tris
200 mM Glycin	25 mM Glycin (Roth)
0,1 % (w/v) SDS	
<b>BSA-Blocklösung</b>	<b>Stripping-Probenpuffer</b>
PBS, pH 7,4	2 % (w/v) SDS
0,1 % (v/v) Tween20 (Roth)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7
5 % BSA	100 mM 2-Mercaptoethanol

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Reagenzien.

#### 4.3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zellysate (je nach Größe des Auftragskammes: 25 µg pro Bahn) mit den darin enthaltenen Proteinen wurden auf einer eindimensionalen Gel-Matrix elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die Lysate auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (bestehend aus Sammel- und Trenngel) aufgetragen, um in der Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht getrennt zu werden. Zur Einordnung der ungefähren Proteingröße diente dabei ein farbiger Proteinmarker (New England Biolabs).

Die Elektrophorese fand in Elektrophoresekammern (BioRad) statt, die mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt waren. Je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins wurden unterschiedlich konzentrierte Trenngel verwendet (**Tabelle 6**). Das Einlaufen der Proteine in das Sammelgel begann mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel. Anschließend erfolgte die Auftrennung bei einer Stromstärke von 35 mA (bzw. über Nacht mit 6 mA) bei maximal 300 V, bis das im SDS-Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau die Unterkante des Trenngels erreichte.

<b>Sammelgel:</b>			
H <sub>2</sub> O	5,1 ml		
Sammelgelpuffer	2,1 ml		
40 % (v/v) Acrylamid/Bis-29:1 (BioRad)	1,0 ml		
10 % Ammoniumpersulfat	30 µl		
TEMED	10 µl		
<b>Trenngel:</b>			
	<b>12 %</b>	<b>10 %</b>	<b>8 %</b>
H <sub>2</sub> O	14,7 ml	16,3 ml	17,8 ml
Trenngelpuffer	8,25 ml	8,25 ml	8,25 ml
40 % (v/v) Acrylamid/Bis-29:1 (BioRad)	9,90 ml	8,25 ml	6,70 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl

Tabelle 6: Sammel- und Trenngel der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

#### 4.3.1.4 Proteintransfer

Die Proteine wurden durch die Methode des „Tank-Blottings“ auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham) übertragen. Für den Proteintransfer in den Western Blot-Analysen mit PDGF-Stimulation wurde aufgrund guter Erfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe statt der Nitrozellulose- eine PVDF-Membran verwendet. Diese Membran wurde zunächst für 3 s in Methanol aktiviert und anschließend mit *Aqua dest.* abgespült. Der Proteintransfer fand entweder über 4 h bei 400 mA oder über Nacht bei 200 mA statt.

#### 4.3.1.5 Immunoreaktion

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen in PBS/Tween20 (0,1 %, pH 7,4) gewaschen (3x je 10 min). Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden mit BSA-Blocklösung bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (60 min) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (2 µg/10 ml in 5 % BSA-PBS/Tween20) unter anhaltendem Schütteln über Nacht bei 4°C. Der nicht gebundene primäre Antikörper wurde daraufhin entfernt und die Membranen mehrfach in PBS/Tween20 für je 10 min gewaschen. In einem nächsten Schritt wurden die Membranen für 2 h bei Raumtemperatur mit einem zweiten Antikörper (Anti-mouse-Ig, Amersham oder Anti-rabbit-Ig, Amersham; alle 1 : 5000 in 5 % BSA-PBS/Tween20 verdünnt) inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte in PBS/Tween20 und ein letzter mit PBS (pH 7,4) für jeweils 10 min. Für das *Reprobing* wurden die Membranen für 30 min mit Stripping-Puffer (50 °C) behandelt und anschließend zur weiteren Proteindetektion mit anderen Antikörpern inkubiert. Einen Überblick der verwendeten primären Antikörper gibt **Tabelle 7**.

#### 4.3.1.6 Detektion mittels ECL Plus<sup>TM</sup>

Die enzymatische Aktivität der an den Sekundäantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase katalysiert die sogenannte *enhanced chemoluminescence* (ECL)-Reaktion. Dabei reagieren Peroxide mit dem Substrat *Lumigen PS-3 aridian* zu Acridium-Ester-Zwischenprodukten, die unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart der Peroxidase eine Chemolumineszenz bei 430 nm erzeugen.

Nach dem letzten Waschschrte wurden die Membranen mit einer nach Angaben des Herstellers aufbereiteten *ECL Plus<sup>TM</sup>*-Lösung (Amersham) überschichtet (je 100 µl/cm<sup>2</sup>) und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden Röntgen- (Curix HT.1000, Agfa) bzw. Chemolumineszenz-Filme (Hyperfilm<sup>TM</sup>, Amersham) in speziellen Filmkassetten, je nach Intensität des Lichtsignals, für die Dauer von 1 s bis zu 20 min mit den Membranen exponiert.

#### 4.3.1.7 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Die Chemolumineszenz der Röntgenfilme wurde mithilfe des *imaging* Densitometers (Imaging Station 440 CF, Eastman Kodak Company) quantifiziert. In späteren Experimenten sind die Signale der PVDF-Membranen (Roche) ohne vorherige Entwicklung von Röntgenfilmen mit dem Kodak Imager (Kodak 1D Image Analysis Software, Version 3.5.) detektiert und ausgewertet worden. Abschließend wurde die Intensität des untersuchten Proteins ins Verhältnis zum detektierten Proteingehalt des *Reprobing* gesetzt. Auf diese Weise wurde eine potenziell geringere Proteinbeladung der Proben aus den detektierten Effekten herausgerechnet. Wie Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, ist die Protein-Expression von ERK 1/2 während der Kulturzeit keinen systematischen Veränderungen unterworfen (Jaster *et al.*, 2002). Die Bandenintensitäten von ERK 1 und 2 wurden daher summiert.

Antikörper	Quelle			Katalognummer
Acetyl-H3 (Lys 9)	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling Technology	#9671s
H3	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling Technology	#9715
$\alpha$ -SMA	Maus	monoklonal	Sigma	A 2547
Phospho- ERK 1/2 (Tyr 202/4)	Kaninchen	polyklonal	New England Biolabs	# 9101s
ERK 1/2	Kaninchen	polyklonal	New England Biolabs	# 9102

**Tabelle 7:** Liste und Hersteller der verwendeten primären Antikörper.



### 4.3.2 Kollagensynthesemessung

Aktivierte Sternzellen bilden vermehrt Kollagen (Bachem *et al.*, 1998; Apte *et al.*, 1999). Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der HDACI auf den Aktivierungsprozess und somit auch auf die Kollagensynthese der PSZ zu untersuchen.

#### 4.3.2.1 Stimulation der Zellen

Für das Experiment wurden die Zellen nach Passagierung auf 12-well Zellkulturplatten (Greiner) verteilt. Nach dem Anwachsen der PSZ erfolgte die Inkubation mit den HDACI für 24 h. Daraufhin wurde radioaktiv markiertes [<sup>3</sup>H]-Prolin (2,5 µCi/ml bzw. 48 Ci/mmol) für weitere 24 h in Gegenwart der HDACI zu den Proben gegeben. Gleichzeitig erfolgte die Hinzugabe von β-Aminopropionitril (50 µg/ml) und Ascorbat (50 µg/ml). Anschließend wurde die Kollagensyntheserate durch den Einbau von 2,3-[<sup>3</sup>H]-Prolin (Amersham) in Essigsäure-lösliche Proteine bestimmt (Becker *et al.*, 2002; Jaster *et al.*, 2003).

#### 4.3.2.2 Probenaufarbeitung

Für jeden Messpunkt wurde unter identischen Bedingungen sowie mit gleichen Komponenten eine Probe ohne [<sup>3</sup>H]-Prolin als Kontrolle mitgeführt. Die Zellen dieser Kontrollen wurden abtrypsiniert, mit Trypanblau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop gezählt. Dadurch konnten die Unterschiede in der Kollagensyntheserate herausgerechnet werden, welche mit einer verstärkten Proliferation und der somit gesteigerten Zellzahl einhergehen. Mit dem Zeitpunkt der Zellzählung wurden die mit [<sup>3</sup>H]-Prolin behandelten PSZ mit Essigsäure (50 mM) fixiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die im sauren pH löslichen Proteine wurden am nächsten Morgen mit dem Überstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Daraufhin konnten sie nach Beigabe von NaCl (5 %) und 10 µg *rat tail* Kollagen (Tebu-bio) über 24 h bei 4°C ausgefällt werden. Die unlöslichen Proteine wurden abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit Essigsäure (0,5 M; 5 % NaCl) gewaschen. In einem nächsten Schritt wurden die Proteine in Essigsäure (0,5 M) resuspendiert und über Nacht bei 4°C gelöst. Abschließend wurde der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Prolin in die neu synthetisierten Proteine mittels *liquid scintillation counting* bestimmt.

## 4.4 Regulation der Genexpression

### 4.4.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Aktivierte Transkriptionsfaktoren binden an spezifische Sequenzen der doppelsträngigen DNA. Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist eine relativ sensitive Methode, um die Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA-Bindungsstellen *in vitro* nachzuweisen.

Die Zellkerne werden dazu extrahiert und lysiert. Die Kernproteine werden mit radioaktiv (<sup>32</sup>Phosphor) markierten Oligonukleotiden (Sonden), welche ein spezifisches Bindungsmotiv für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor aufweisen, inkubiert. Anschließend wird das Gemisch in einer nicht denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei die nicht gebundenen Sonden deutlich schneller im Gel migrieren und somit die Bandendetektion nicht stören. Oligonukleotidsonden binden den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor und erzeugen eine spezifische Bande, welche als *Shift* bezeichnet wird. Weiterhin kann der Transkriptionsfaktor durch einen spezifischen Antikörper im Rahmen der sogenannten *Supershift*-Analyse nachgewiesen werden. Dabei können die Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor das Binden der Sonde auch verhindern, so dass sich die spezifische Bande auf dem Röntgenbild abgeschwächt bzw. als nicht erkennbar erweist. Des Weiteren können die Antikörper den Komplex aus Transkriptionsfaktor und Sonde binden, woraufhin durch das erhöhte Molekulargewicht eine neue, höhermolekulare Bande erscheint. Diese wird als *Supershift* bezeichnet. Auf diese Weise lässt sich nicht nur der Transkriptionsfaktor identifizieren, sondern auch die Zusammensetzung seiner möglichen Untereinheiten.

#### 4.4.1.1 Stimulation der Zellen

Um die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wachsen die PSZ nach Passage (von 10<sup>5</sup> Zellen/*well*) auf 6-*well* Zellkulturplatten bis zu einer Konfluenz von ca. 90 %. Ab 12 h vor Inkubation mit den HDACI (für die folgenden 24 h) wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert, um das FKS zu entfernen. Zudem erfolgte in einem der Reaktionsansätze die Stimulation mit PDGF (10 ng/ml) (PDGF-BB von R&D Systems) für 60 min, um die Sensitivität des EMSA zu verifizieren.

#### 4.4.1.2 Gewinnung von Kernextrakten

Zur weiteren Aufarbeitung der Proben wurde das Medium abpipettiert und die PSZ einmal mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Es folgte eine zehnmütige hypotone Lyse der Zellen in Puffer A auf Eis. Anschließend wurden noch nicht lysierte Zellen mittels eines Zellschabers

von der Oberfläche gelöst, die gesamte Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden für 20 s bei  $U_{\max}$  abzentrifugiert. Mit der Zugabe von 25 – 50  $\mu$ l Puffer B begann die hypertone Lyse der Kerne auf Eis für über 20 min. Anschließend wurde die Suspension für 2 min bei  $U_{\max}$  zentrifugiert. Die Protease- und Phosphatase-Inhibitoren waren notwendig, um eine Degradation bzw. Dephosphorylierung der Transkriptionsfaktoren zu verhindern. Der Überstand mit den Kernproteinen wurde von den pelletierten Kernmembranen separiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert. Die hierbei verwendeten Puffer und Reagenzien sind in **Tabelle 8** dargestellt.

<b>Puffer A:</b> 10 mM HEPES 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ (Roth) 0,5 mM DTT 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin (Roche) 1 Tabl. Complete™ (Roche) in 50 ml Endvolumen 1 mM Vanadat 10 mM KCl (Roth)	<b>Puffer B:</b> 20 mM HEPES 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ (Roth) 0,5 mM DTT 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin (Roche) 1 Tabl. Complete™ (Roche) in 50 ml Endvolumen 1 mM Vanadat 25 % Glycerol (Merck) 420 mM NaCl 0,2 mM EDTA
<b>TE-Puffer</b> 1 mM EDTA, pH 8 10 mM Tris-HCl, pH 8 (Roth)	<b>Shift-Puffer:</b> 10 mM Tris, pH 7,5 (Roth) 50 mM NaCl (Roth) 0,1 mM EDTA, pH 8 1 mM DTT 5 % Glycerol (Merck) 0,1 % NP 40 (Roche) 1 mM Pefabloc (Roche)

**Tabelle 8: Verwendete Puffer und Reagenzien.**

#### 4.4.1.3 Markierung der Oligonukleotid-Sonde

Die Oligonukleotidsonde musste als Doppelstrang (ds) vorliegen. Daher war es notwendig, die komplementären Einzelstränge zu hybridisieren. Je 10  $\mu$ l von Sense- und Antisense-Oligonukleotid (je 50  $\mu\text{M}$ , Biotex) wurden mit 80  $\mu$ l *Aqua dest.* gemischt, für 10 min bei  $80^{\circ}\text{C}$  erhitzt und langsam wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde mit *Aqua dest.* auf ein Volumen von 400  $\mu$ l aufgefüllt und konnte dann entweder sofort zur radioaktiven Markierung eingesetzt oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

<b>Reaktionsansatz:</b>	1 $\mu$ l ds Oligonukleotid (2,5 pmol)
	2 $\mu$ l 10x Reaktionspuffer (Roche)
	1 $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase (Roche)
	1,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP (Hartmann Analytik)
	ad. 13 $\mu$ l <i>Aqua dest.</i>

Die radioaktive Markierung der Oligonukleotidsonden erfolgte enzymatisch durch den Austausch der Phosphatgruppen am 5'-Ende mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase. Dazu wurde der Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die eingesetzte AP-1-Sonde ist in **Tabelle 9** näher charakterisiert.

Die Separation der markierten Sonde von freiem  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP erfolgte über *Sephadex G 50* Säulen (Nick-Columns<sup>TM</sup>, Amersham). Die Säulen wurden zuvor mit 3 ml TE-Puffer äquilibriert. Nachdem der Reaktionsansatz auf die Säulen gegeben wurde, erfolgte die Elution der Sonde mit zweimal 400  $\mu\text{l}$  TE-Puffer. In den zweiten 400  $\mu\text{l}$  befand sich die markierte, gereinigte Sonde.

Sonde	Bindungsmotiv	Referenz
AP-1	5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG ATC-3'	Jaster <i>et al.</i> 2002

**Tabelle 9: Verwendete AP-1 Sonde mit Konsensus-Bindungsmotiv.** (Die fett gedruckten Buchstaben markieren das Bindungsmotiv.)

#### 4.4.1.4 Bindungsreaktion

Die Bindung des Transkriptionsfaktors an die Oligonukleotidsonde fand über 30 min bei 27°C in dem folgenden Reaktionsansatz statt:

<b>Reaktionsansatz:</b>	4 $\mu\text{l}$ Shift-Puffer
	2 $\mu\text{l}$ BSA (Stammlösung: 10 mg/ml)
	1 $\mu\text{l}$ Poly-dI-dC (Stammlösung 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Roche)
	3 - 6 $\mu\text{l}$ Kernextrakt
	3 - 6 $\mu\text{l}$ Sonde
	ad 20 $\mu\text{l}$ <i>Aqua dest.</i>

Für die *supershift*-Analyse wurde nach der Bindungsreaktion 1  $\mu\text{l}$  des spezifischen Antikörpers (charakterisiert in **Tabelle 10**) zugegeben und das Gemisch für 30 min auf Eis belassen.

Transkriptionsfaktor	Antikörper	Quelle	Katalognummer
AP-1	Anti-c-Fos	Kaninchen polyklonal Santa Cruz	sc-253X

**Tabelle 10: Verwendeter Antikörper für supershift-Analyse im EMSA.**

Das Reaktionsgemisch wurde direkt nach der Inkubationszeit auf ein nicht denaturierendes 6%-iges Polyacrylamidgel (33 ml H<sub>2</sub>O, 6 ml Acrylamid/Bis (40 %, 29:1), 1 ml 10 X TBE (Invitrogen), 240  $\mu\text{l}$  10 % Ammoniumpersulfat, 80  $\mu\text{l}$  TEMED) überführt. Die Auftrennung erfolgte bei 300 V über 2 – 4 h in Elektrophoresekammern (BioRad) mit 0,25 X TBE-Puffer (pH 8,4). Nachfolgend wurden die getrockneten Gele autoradiographisch ausgewertet.

## 4.5 Nukleinsäureanalytik

### 4.5.1 Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene

Um die Genexpression auf RNA-Ebene mittels quantitativer *Real-time* PCR zu analysieren, wird zunächst die gesamte zelluläre RNA isoliert und dann durch reverse Transkription die mRNA in komplementäre cDNA umgeschrieben.

#### 4.5.1.1 Präparation der RNA

Die PSZ wurden für 24 h mit den HDACI auf 6-well Platten inkubiert. Daraufhin erfolgte die Gewinnung der RNA mit TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers. Nach Entfernung des Mediums wurde den Proben 250 µl TRIzol<sup>®</sup> hinzugegeben. Daraufhin wurde das Gemisch in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem nächsten Schritt wurden die Proben für 15 min bei  $U_{\max}$  zentrifugiert (4°C). Die so entstandene wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit 125 µl Isopropanol versetzt und für 10 min bei 25°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min;  $U_{\max}$ ; 4°C) wurde ein RNA-Pellet sichtbar, welches nach zwei Waschschritten (mit 75 % Ethanol in DEPC-Wasser) unter dem Abzug getrocknet wurde. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl DEPC-Wasser (*Aqua bidest.* versetzt mit 0,1 % v/v Diethylpyrocarbonat) gelöst und für 10 min im Heizblock bei 65°C geschüttelt. Die so isolierte RNA konnte bei -80°C aufbewahrt werden.

#### 4.5.1.2 Reverse Transkription

Die Konzentration der mRNA wurde vor Herstellung der cDNA photometrisch (ULTROSPEC III, Pharmacia) bestimmt. Für alle Ansätze einer Probenserie wurde daraufhin die gleiche Menge RNA (1 µg; gelöst in 50 µl H<sub>2</sub>O) eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte nach dem Prinzip des *Random Hexamer Priming* nach den Angaben des Herstellers Applied Biosystems. Die Besonderheit dieser Methode ist die Verwendung von speziellen Hexamer-Primern, die aus randomisierten Basenfolgen bestehen und je nach Sequenz Teile der mRNA binden. Die Primer wurden in einem Mastermix (50 µl je Probe) gelöst, der zu der RNA hinzugegeben und für 10 min bei 25°C inkubiert wurde. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 120 min bei 37°C. Die so entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

<b>Mastermix:</b>	10x RT Buffer	10 µl
	dNTPs	4 µl
	Hexamer Primer	10 µl
	RNSse Inhibitor	5 µl
	Reverse Transkriptase	5 µl
	<i>Aqua bidest.</i>	16 µl

#### 4.5.1.3 Real-time PCR (Taqman)

In der PCR wird DNA definierter Länge und Sequenz *in vitro* amplifiziert und damit selektiv und zugleich hocheffizient angereichert. Dabei synthetisiert die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase die DNA-Fragmente in einem zyklischen Prozess aus Denaturierung, *Annealing* und *Elongation* mit exponentiellem Reaktionsverlauf. Bei der *Real-time* PCR nach dem sogenannten Taqman-Prinzip enthält das Reaktionsgemisch, welches zu Beginn der PCR zur cDNA gegeben wird, neben den spezifischen Primern Fluoreszenz-markierte Sonden, die mit einem Reporter- und einem Quencherfarbstoff versehen sind. Wird die intakte Sonde durch einen Laser angeregt, kann nur der Quencherfarbstoff Licht emittieren, da die vom Reporter aufgenommene Energie auf den Quencher übertragen wird. Mit Verlängerung der Primer im Verlauf der PCR werden die Sonden durch die 5' Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase abgebaut. Nach Trennung von Reporter und Quencher kann auch der Reporterfarbstoff die von einem Laser übertragene Energie als Licht emittieren. Die Stärke der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ist dabei proportional zur gebildeten Menge an DNA.

Die Quantifizierung der cDNA Proben erfolgte mithilfe von Fluoreszenz-markierten TaqMan™ MGB-Sonden in einem *ABI Prism 7000 sequence detection system* (Applied Biosystems). Dazu wurden in Gegenwart des TaqMan™ Universal PCR Master Mixes spezifische Primer-Sonden-Kombinationen aus dem *Assay-on-Demand™*-Programm von Applied Biosystems verwendet (**Tabelle 11**).

Zur Untersuchung der Expression von  $\alpha$ -SMA, für das kein vorgefertigter Assay verfügbar war, kamen Oligonukleotide zum Einsatz, die ebenfalls von Applied Biosystems designed und synthetisiert wurden. Die Sequenz der Primer war 5'-CAGGATGCAGAAGGAGATCACA-3' für den *forward primer* und 5'-GCCGATCCAGAGAGAATATTTGC-3' für den *reverse primer*. Die Basenreihenfolge der FAM-markierten Sonde lautete 5'-CCATGAAGATCAAGATTATTGCA-3'.

Gen		Funktion	Bestellnummer (Applied Biosystems)
HPRT	<i>Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase</i>	<i>House-keeping-Gen</i>	# Rn01527838_g1
TGF-β1	<i>Transforming growth factor-β1</i>	<i>Targetgen</i>	# Rn00572010_m1
ET-1	<i>Endothelin-1</i>		# Rn00561129_m1
α-SMA	<i>α-smooth-muscle-actin</i>		# 4331348

**Tabelle 11: Assay-on-Demand™ Sonde für TAQMAN Real-time PCR (Applied Biosystems).**

Um quantitative Aussagen über die tatsächliche Änderung der Transkriptmengen treffen zu können, sollte neben den zu untersuchenden Genen die Expression eines konstitutiv exprimierten sogenannten *house-keeping*-Gens, wie Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), gemessen werden. Auf diese Weise können zellspezifische Unterschiede der Gesamt-mRNA in den Proben berücksichtigt werden.

Die PCR-Bedingungen folgten den Empfehlungen von Applied Biosystems und waren für alle Primer-Sonden-Kombinationen gleich:

95 °C	10 min	
95 °C	15 s	50 Zyklen
60 °C	1 min	

(Der 60 °C Schritt verbindet in diesem Fall Annealing und Extension miteinander.)

Die relative mRNA-Expression des zu untersuchenden Gens (Targetgen) wurde nach der  $\Delta C_t$ -Methode mit Hilfe der Gerätesoftware ermittelt. Dabei wurde die Expression des Targetgens nach der Gleichung  $\Delta C_t_{\text{Probe}} = C_t_{\text{Targetgen}} - C_t_{\text{HPRT}}$  zunächst in Beziehung zum *house-keeping*-Gen HPRT gesetzt und dann mittels der Gleichungen  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{Probe}} - \Delta C_t_{\text{Kontrolle}}$  und  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$  auf eine in den Abbildungslegenden definierte Kontrolle bezogen.

#### 4.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Signifikanzen der Ergebnisse wurden mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon ermittelt. Bei Proben, welche voneinander unabhängige Stichproben darstellten, wurden die Signifikanzen durch den U-Test nach Mann-Whitney errechnet. Unterschiede wurden mit einem Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Daten von mindestens 6 Einzelversuchen verwendet. Weiterhin wurden die Standardabweichungen berechnet und als *standard error of the mean* ( $\pm$  S.E.M; Wurzel der Anzahl der Versuche als Dividend der Standardabweichung) in den Diagrammen dargestellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakteristika des Aktivierungsprozesses der PSZ *in vitro*

#### 5.1.1 Morphologie und Zellzahl der PSZ während der Kultivierung

Zur Analyse ihrer Morphologie wurden pankreatische Sternzellen (PSZ) nach der Isolierung aus der Ratte in Zellkulturschalen kultiviert. Mithilfe des Phasenkontrastmikroskops wurden die Morphologie und Konfluenz der PSZ täglich beobachtet. Am siebten Tag der Kultivierung erfolgte eine einmalige Passage der Zellen in die Zellkulturschalen der geplanten Experimente. Neben primären PSZ wurden in einzelnen Versuchen immortalisierte PSZ verwendet, die aufgrund einer raschen Proliferation bereits nach drei Tagen passagiert wurden.

Unmittelbar nach ihrer Isolierung heften sich die PSZ an die Oberfläche und nehmen das charakteristische breitflächige, sternchenförmige Aussehen an. In den ersten Tagen der Kultur beinhalten die Zellen sehr viele Vesikel, die sich um den Zellkern verteilen. Im Verlauf der Kultivierung ändert sich die Morphologie der Zellen zu einer langgestreckten, fibroblastenartigen Form mit nur noch geringer Anzahl an Vesikeln.

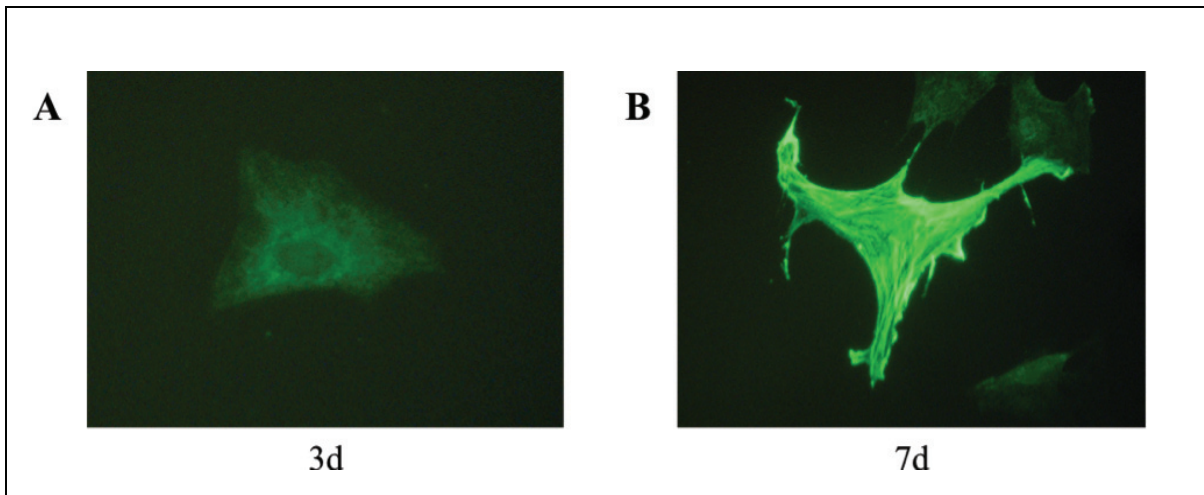
Zu Beginn der Kultur zeigen sich nur vereinzelte Zellen in den Kulturschalen. Ab dem dritten Tag, sowie im weiteren Verlauf, kann eine vermehrte Zellproliferation mit massiver Zunahme der Zellzahl beobachtet werden.

#### 5.1.2 Myofibroblastäre Differenzierung während der Sternzellkultivierung

Charakteristisch für den Aktivierungsprozess der PSZ ist die vermehrte Synthese des myofibroblastären Differenzierungsmarkers  $\alpha$ -SMA. In der Immunfluoreszenz wurden die PSZ nach Fixierung zuerst mit einem spezifischen Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA und dann mit einem sekundären Antikörper mit FITC-Markierung inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigen sich daraufhin die Bereiche, in denen der FITC-markierte sekundäre Antikörper bindet.

In den Sternzellen findet sich nach dreitägiger Kultivierung nur wenig, diffus verteiltes  $\alpha$ -SMA (**Abbildung 4; A**). Im Verlauf der Kultivierung nimmt die Menge an  $\alpha$ -SMA in den PSZ zu, und es zeigt sich eine faserartige Strukturierung dieses Proteins in Form sogenannter *stress fiber* (**B**).





**Abbildung 4: Immunfluoreszenz: Die  $\alpha$ -SMA-Expression nimmt im Zuge der Sternzellkultivierung zu. Weiterhin kommt es zu einer *Stressfiber*-artigen Aggregation dieses Proteins in den PSZ.** Die isolierten Sternzellen wurden auf Zellkulturschalen ausgesät und für die Färbung am siebten Tag einmalig passagiert. Nach Fixierung in Methanol wurden die PSZ mit 1 % BSA geblockt und anschließend mit monoklonalen  $\alpha$ -SMA-Antikörpern inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit FITC markiert und konnte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden. Abbildung **A** zeigt die PSZ am dritten Tag und Abbildung **B** am siebten Tag in Kultur. (Originalvergrößerung: x 630)

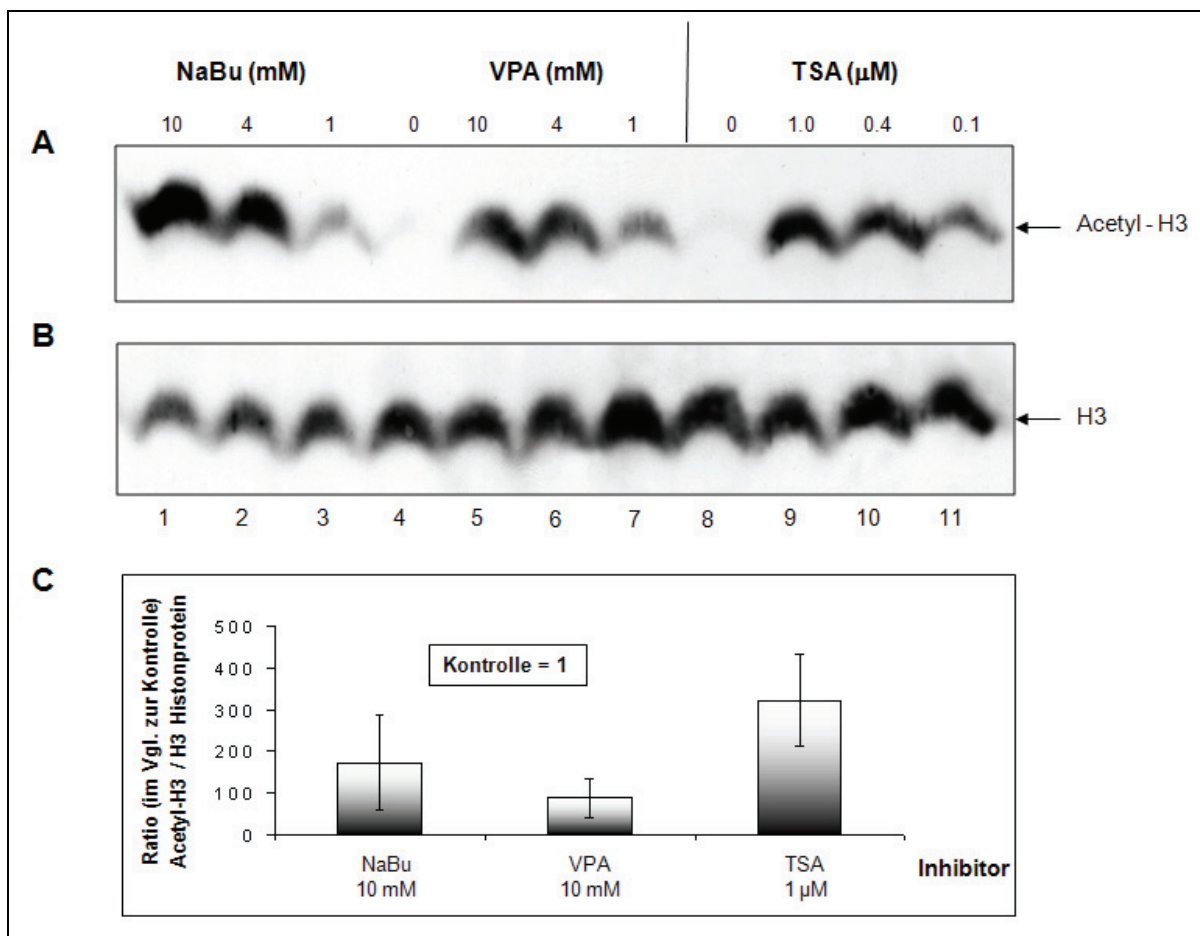
### 5.1.3 Zusammenfassung

Infolge der Kultivierung der PSZ ändert sich ihre Morphologie von dem typischen „sternchenförmigen“ Charakter zu einem fibroblastenartigen Aussehen. Gleichzeitig finden eine massive Zellproliferation sowie eine Differenzierung der PSZ statt, welche mit der vermehrten Expression des myofibroblastären Markers  $\alpha$ -SMA einhergeht. Zusätzlich nimmt die Menge der Vesikel mit gespeicherten Fetten in den Sternzellen ab, die somit ihre charakteristische Funktion als lipidspeichernde Zellen verlieren (siehe Stand der Forschung).

## 5.2 Wirkung der HDACI auf PSZ

In dieser Arbeit wurden die HDACI Natriumbutyrat (NaBu), Valproat (VPA) und Trichostatin A (TSA) verwendet. Die enzymatische Hemmung der Histondeacetylasen durch HDACI verschiebt das dynamische Gleichgewicht zwischen Histonacetylasen und Histondeacetylasen zugunsten einer vermehrten Acetylierung der Histone. Im Folgenden sollen einige Charakteristika des Aktivierungsprozesses der PSZ unter dem Einfluss von HDACI betrachtet werden.

### 5.2.1 Einfluss der HDACI auf die Histon-Acetylierung in primären PSZ



**Abbildung 5: Western Blot-Analyse: Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A bewirken in kultivierten PSZ eine dosisabhängig vermehrte Acetylierung des Histon-H3-Moleküls.** Die isolierten PSZ wurden auf 6-well Platten ausgesät und für 24 h mit den HDACI inkubiert. Das Gesamtzelllysate (25 µg Protein pro Bahn) wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Daraufhin erfolgte der Proteintransfer durch die Methode des „Tank-Blotting“. Abbildung A zeigt das Ergebnis der Immunoreaktion mit dem Acetyl-H3-Antikörper (17 kDa). Der Blot wurde anschließend mit *stripping*-Probenpuffer für 30 min bei 50°C abgewaschen. B stellt das *Reprobing* der Membran mit dem Antikörper gegen H3-Histon (17 kDa) dar. Die Bande 4 zeigt die Kontrolle zu NaBu und VPA, die Bande 8 die Kontrolle zu TSA mit Zusatz von Ethanol (5 mM). C bildet das Verhältnis der in A und B detektierten Banden der jeweils höchsten Konzentration der HDACI als Ratio von Acetyl-Histon-H3 zu Histon-H3 im Vergleich zur Kontrolle ab. Dazu wurden die Mittelwerte (+/- S.E.M.) von drei unabhängigen Einzelversuchen berechnet.

Nach Passagierung wurden die PSZ in Gegenwart der HDACI für 24 h in 6-well Zellkulturschalen inkubiert. Daraufhin wurden Western-Blots mit dem Acetyl-H3-Antikörper durchgeführt. Das *Reprobing* der Membran erfolgte mit dem Antikörper gegen H3-Histon.

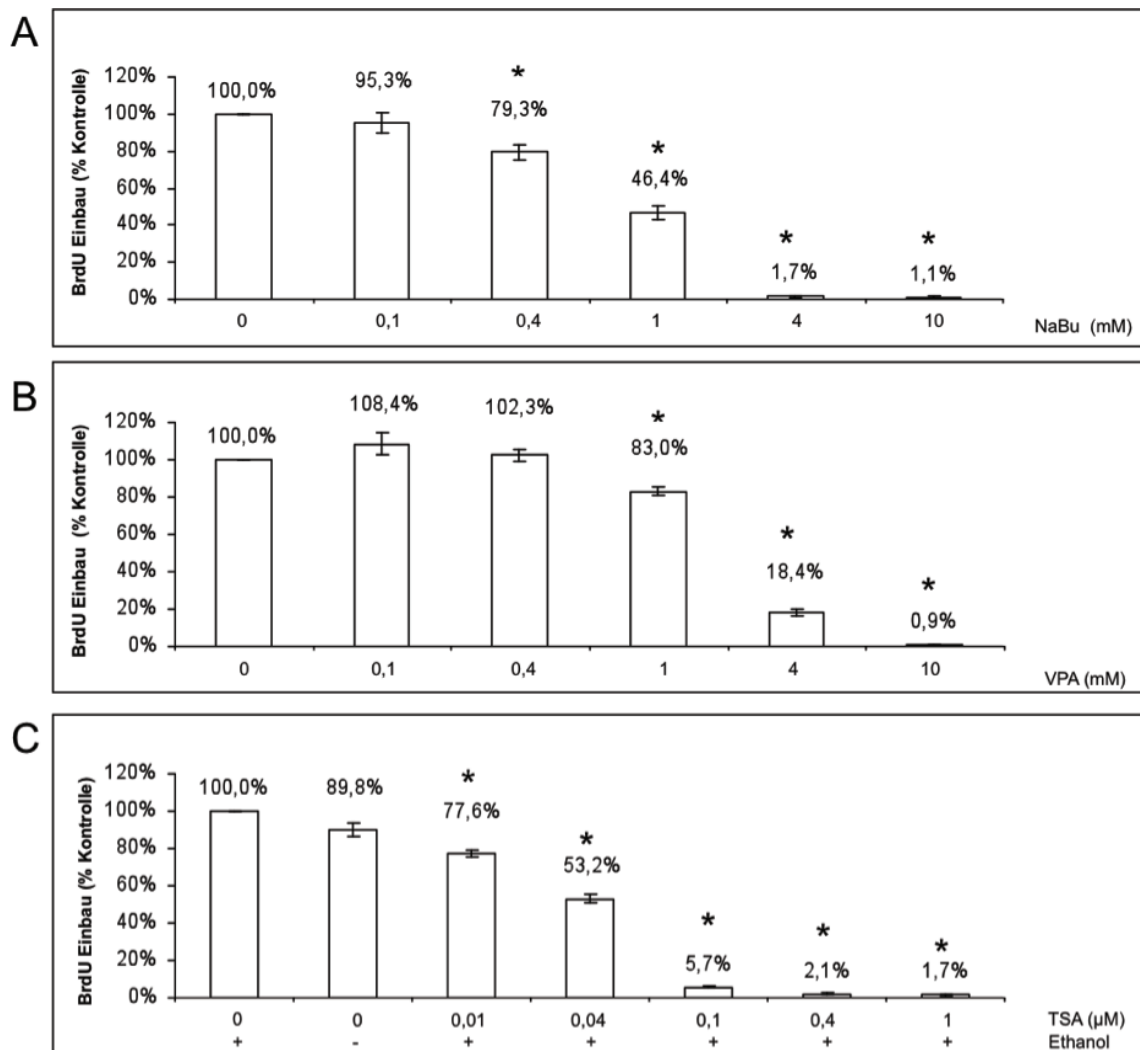
In der Western Blot-Analyse zeigt sich unter dem Einfluss von NaBu und VPA bei Konzentrationen im *millimolaren* Bereich, sowie bei TSA im Bereich von 1  $\mu$ M und darunter, eine dosisabhängig vermehrte Acetylierung des H3-Histons (**Abbildung 5; A**). Im Rahmen des *Reprobing* der Membran mit dem Antikörper gegen H3-Histon wurden vergleichbare Ausgangsproteinmengen detektiert (**B**). Wie die Ratio von Acetyl-Histon-H3 zu Histon-H3 belegt, bewirkt TSA vor NaBu und VPA die ausgeprägteste Acetylierung des H3-Histonmoleküls im Vergleich zur Kontrolle (**C**).

## 5.2.2 Einfluss der HDACI auf die Proliferation

Die primären PSZ durchlaufen *in vitro* einen Aktivierungsprozess, wie er auch *in vivo* bei Erkrankung des Pankreas zu beobachten ist. Immortalisierte PSZ sind langfristig aktivierte Sternzellen mit hoher proliferativer Aktivität.

Sowohl primäre als auch immortalisierte PSZ wurden auf 96-*well* Mikrotiterplatten ausgesät und insgesamt 48 h mit den HDACI inkubiert. Die Proliferation wurde über den Einbau von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in die neu synthetisierte DNA bestimmt.

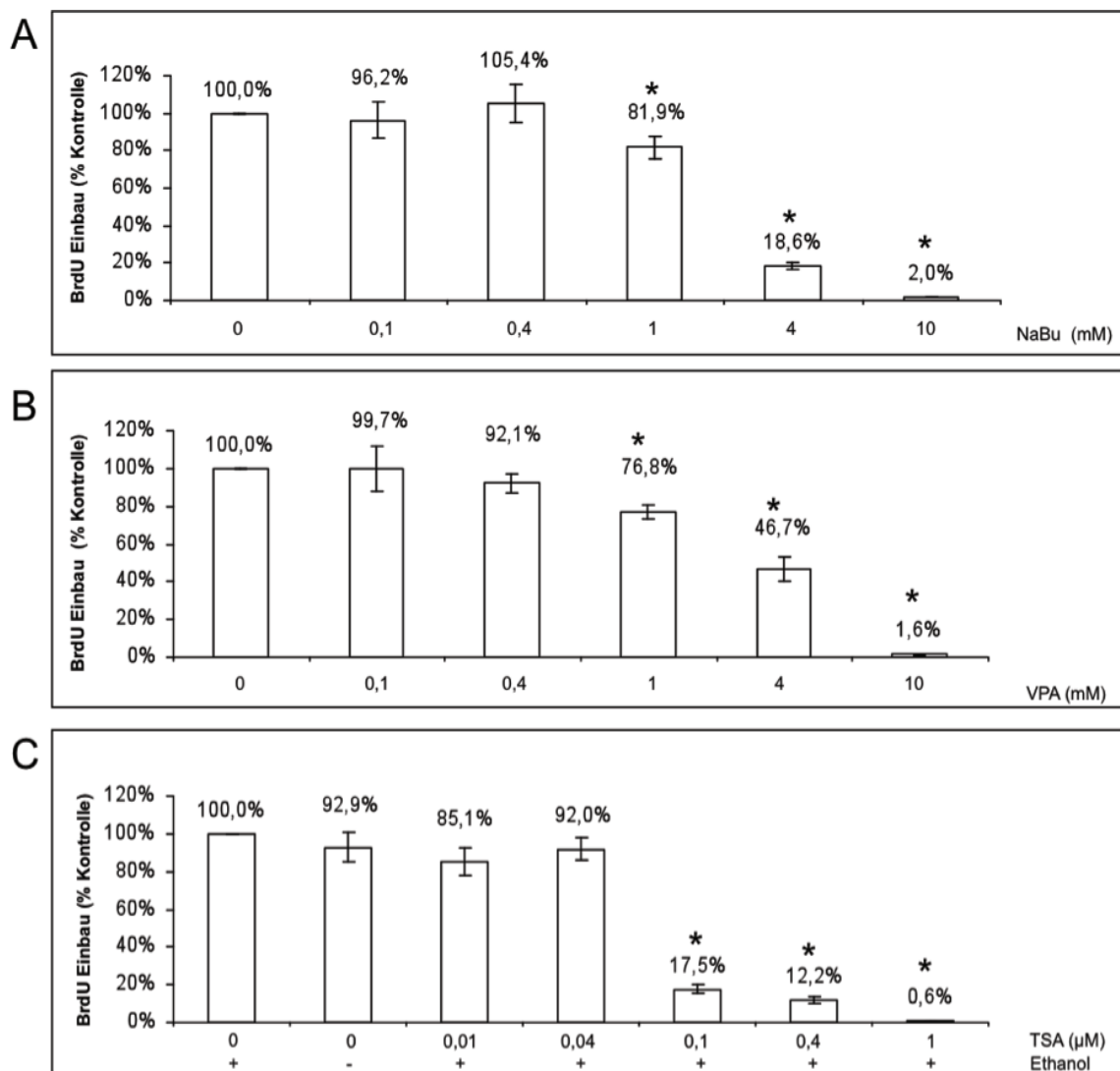
### 5.2.2.1 Proliferation von primären PSZ in Gegenwart von HDACI



**Abbildung 6: Proliferationsassay: Die HDACI hemmen dosisabhängig den Einbau von BrdU in die DNA der primären PSZ.** Die isolierten PSZ wurden auf 96-*well* Platten passagiert (3000 Zellen/*well*) und in Medium mit 17 % FKS kultiviert. Daraufhin erfolgte für 24 h die Inkubation mit den HDACI in den verschiedenen Konzentrationen; nach weiteren 24 h in Gegenwart der Inhibitoren wurde der BrdU-Einbau gemessen. Abbildung **A** zeigt das Ergebnis unter Einfluss von Natriumbutyrat, **B** den Effekt von Valproat, **C** die Wirkung von in Ethanol gelöstem Trichostatin A im Vergleich zur Kontrolle ohne bzw. mit Ethanol (5 mM). Im Diagramm sind die Mittelwerte (+/- S.E.M.) von zwölf unabhängigen Proben in % zur Kontrolle (=100 %) dargestellt. \* $p < 0,05$  (Wilcoxon-Rangsummentest) im Vergleich zur Kontrolle.

Die untersuchten HDACI hemmen dosisabhängig den Einbau von BrdU in die DNA von primären PSZ (**Abbildung 6**). Dabei zeigt sich eine signifikante Hemmung durch NaBu bei Konzentrationen ab 0,4 mM (**A**) und durch VPA ab 1 mM (**B**). Das in Ethanol gelöste TSA hemmt den Einbau von BrdU in primären PSZ signifikant ab Konzentrationen von nur 0,01  $\mu$ M (**C**). Das Lösungsmittel Ethanol in einer Endkonzentration von 5 mM hat dabei keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den BrdU-Einbau.

### 5.2.2.2 Proliferation von immortalisierten PSZ in Gegenwart von HDACI



**Abbildung 7: Proliferationsassay: Die HDACI hemmen dosisabhängig den Einbau von BrdU in die DNA der immortalisierten PSZ.** Der Proliferationsassay wurde wie in Abbildung 6 beschrieben durchgeführt. Anstelle des Zellkulturmediums mit 17 % FKS wurde jedoch Medium mit 10 % FKS verwendet. Abbildung A zeigt das Ergebnis unter Einfluss von Natriumbutyrat, B den Effekt von Valproat, C die Wirkung von in Ethanol gelöstem Trichostatin A im Vergleich zur Kontrolle ohne bzw. mit Ethanol (5 mM). Im Diagramm sind die Mittelwerte ( $\pm$  S.E.M.) von sechs unabhängigen Proben in % zur Kontrolle (=100 %) gezeigt. \* $p < 0,05$  (Wilcoxon-Rangsummentest) im Vergleich zur Kontrolle.

Im Proliferationsassay der immortalisierten PSZ hemmen die untersuchten HDACI den BrdU-Einbau in die DNA ebenfalls dosisabhängig (**Abbildung 7**). Dabei zeigt sich eine signifikante Hemmung durch NaBu (**A**) und VPA (**B**) bei Konzentrationen im *millimolaren* Bereich. TSA (**C**) inhibiert den Einbau von BrdU in immortalisierten PSZ statistisch signifikant ab 0,1  $\mu\text{M}$ . Auch in dieser TSA-Versuchsreihe zeigt Ethanol keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den BrdU-Einbau.

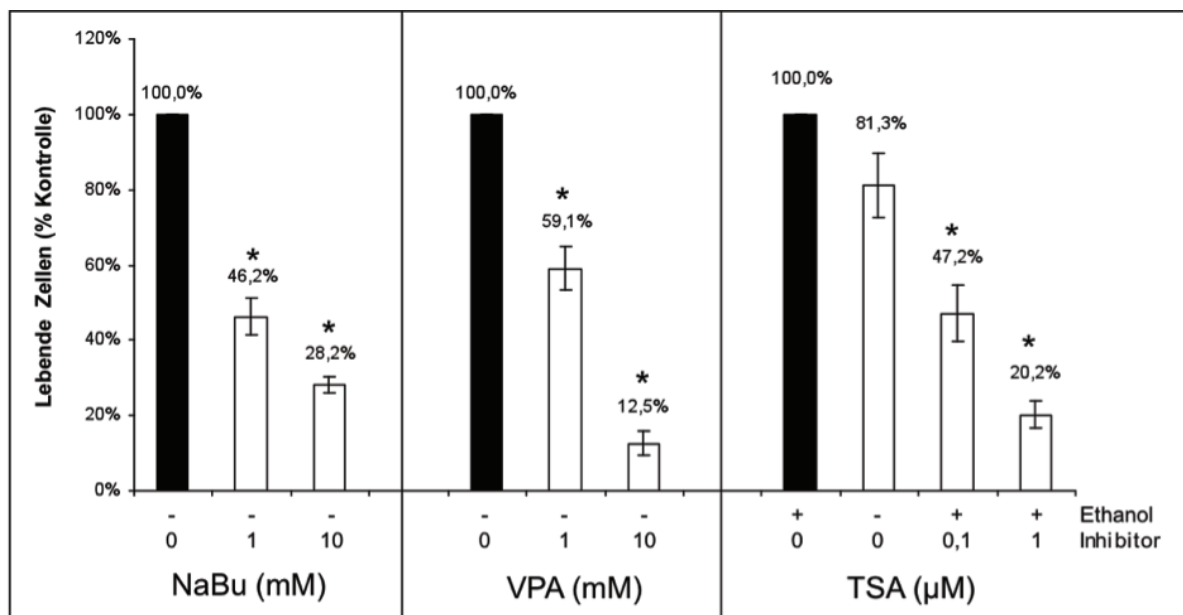
#### 5.2.2.3 Zusammenfassung

Die untersuchten HDACI hemmen dosisabhängig den Einbau von BrdU in die DNA primärer und immortalisierter PSZ. Dabei zeigt sich eine signifikante Hemmung durch NaBu und VPA im *millimolaren*, bei TSA im *mikromolaren* Konzentrationsbereich. Bei den jeweils höchsten Konzentrationen der untersuchten HDACI war in den PSZ nahezu kein BrdU-Einbau mehr möglich.

### 5.2.3 Einfluss der HDACI auf das Zell-Überleben von primären PSZ

In Untersuchungen zum Zell-Überleben sollte geklärt werden, ob sich der verminderte BrdU-Einbau in Gegenwart der HDACI auf eine reine Proliferationshemmung oder auf einen erhöhten Zelltod zurückführen lässt. Dazu wurden primäre PSZ mit den HDACI für 24 h inkubiert. Die Zahl lebender und toter Zellen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop mithilfe des Trypanblau-Ausschluss-Tests erfasst. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zur Apoptose mit der SubG1-Peak Methode.

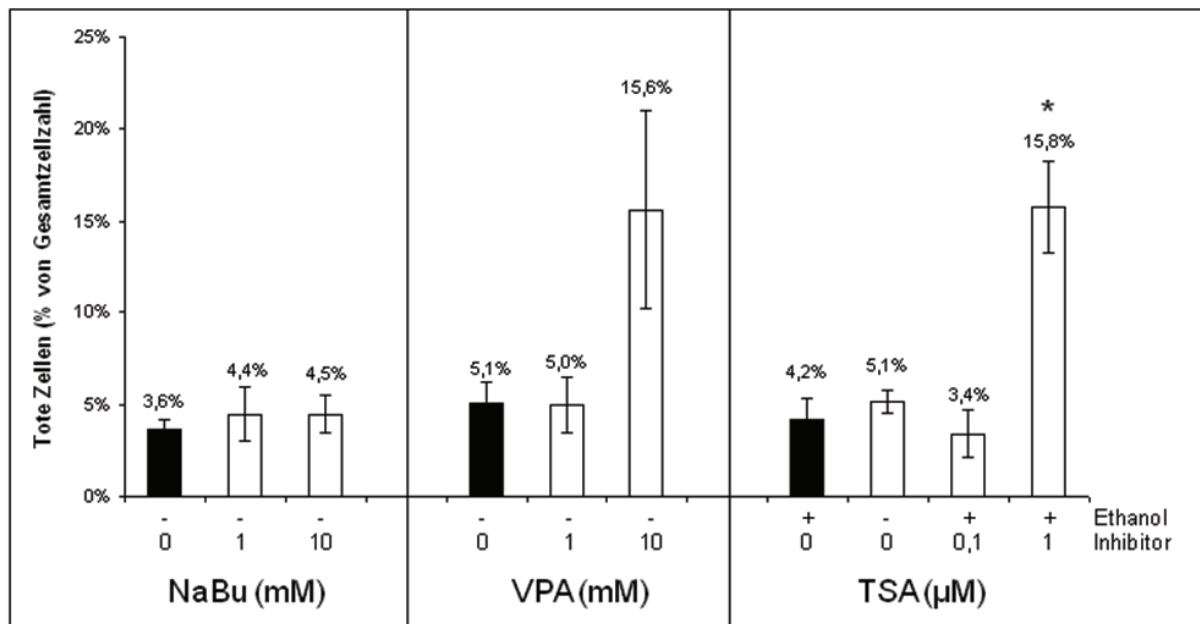
#### 5.2.3.1 Zellzahl lebender Zellen in Gegenwart der HDACI



**Abbildung 8: Zellzählung lebender Zellen mit Hilfe des Trypanblau-Ausschluss-Tests: Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A senken dosisabhängig die Zahl überlebender PSZ.** Die isolierten PSZ wurden auf 6-well Platten ausgesät und in Medium mit 17 % FKS kultiviert. Daraufhin erfolgte für 24 h die Inkubation der PSZ mit den HDACI in den verschiedenen Konzentrationen. Nach Trypanblau-Färbung wurden die lebenden Zellen unter dem Mikroskop gezählt und in Prozent zur Kontrolle angegeben. Beim TSA erfolgte der Vergleich der HDACI gegen die Kontrolle mit Ethanol (5 mM). Im Diagramm sind die Mittelwerte (+/- S.E.M.) von sechs unabhängigen Proben in % zur Kontrolle (=100 %) gezeigt. \* $p < 0,05$  (Wilcoxon-Rangsummentest) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Zahl lebender PSZ wird unter dem Einfluss der HDACI signifikant und zugleich dosisabhängig vermindert (**Abbildung 8**). VPA bewirkt dabei vor TSA und NaBu die stärkste Verminderung der Anzahl lebender Zellen. Die Gegenwart von Ethanol in der TSA-Versuchsreihe zeigt keine statistisch signifikanten Veränderungen.

## 5.2.3.2 Einfluss von HDACI auf den Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl



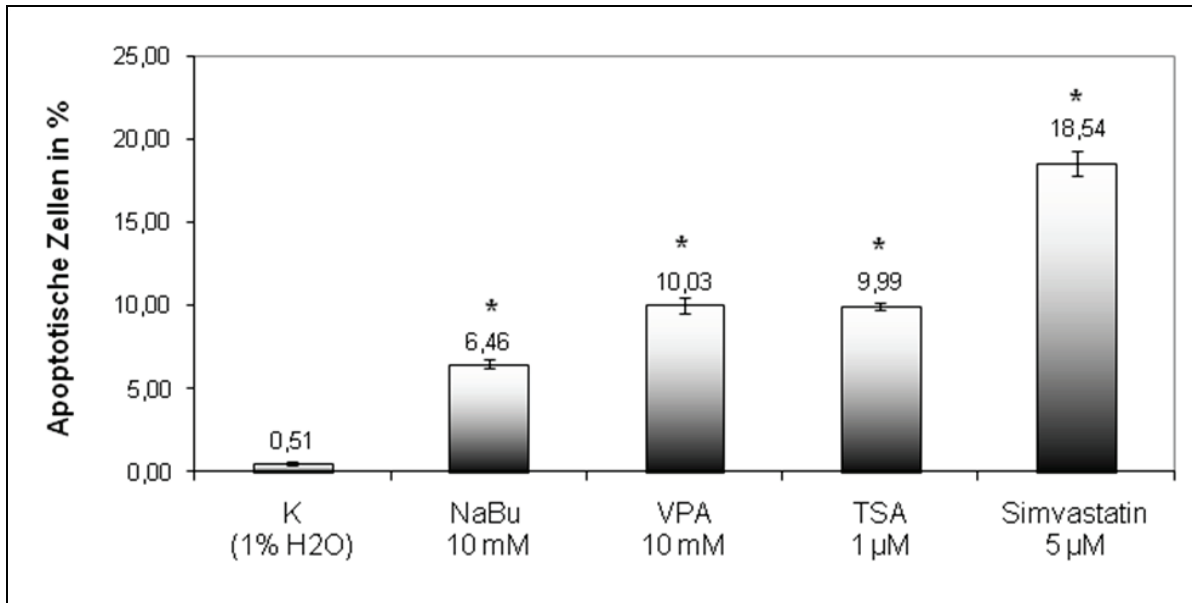
**Abbildung 9: Zellzählung toter Zellen mit Hilfe des Trypanblau-Ausschluss-Tests: Trichostatin A in einer Konzentration von 1,0 µM bewirkt einen signifikant erhöhten Anteil toter PSZ. Unter dem Einfluss von Natriumbutyrat und Valproat ist der Anteil toter PSZ dagegen nicht signifikant verändert.** Die Untersuchung erfolgte wie in Abbildung 8 beschrieben. Im Rahmen der Zellzählung der lebenden PSZ wurde zugleich die Anzahl toter Zellen ermittelt. Die toten Zellen wurden dabei in Prozent der Gesamtzellzahl (Summe von lebenden und toten Zellen) angegeben. Im Diagramm sind die Mittelwerte (+/- S.E.M.) aus sechs unabhängigen Proben im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. \* $p < 0,05$  (U-Test nach Mann-Whitney) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Anzahl toter PSZ im Trypanblau-Ausschluss-Test wurde zur Gesamtzellzahl in den Proben (bestehend aus lebenden und toten Zellen) in Relation gesetzt (**Abbildung 9**). Die Zählung ergab einen signifikanten Anstieg toter Zellen bei Inkubation mit TSA in einer Konzentration von 1 µM. Im gleichen Experiment war der Anteil toter Zellen bei der höchsten Konzentration von NaBu und VPA (jeweils 10 mM) nicht signifikant erhöht. Dabei zeigt VPA im Vergleich zu NaBu einen höheren, jedoch statistisch nicht signifikanten Anteil toter Zellen.



### 5.2.3.3 Apoptose in Gegenwart der HDACI

Die Ursachen des vermehrten Zelltods in Gegenwart von HDACI wurden in Folgeuntersuchungen näher analysiert. Dabei erfolgten Untersuchungen zur Apoptose mit der SubG1-Peak Methode.



**Abbildung 10: SubG1-Peak Methode: Einfluss der HDACI auf die Apoptose.** Die PSZ wurden auf 6-well Zellkulturplatten passagiert und in Medium mit 17 % FKS kultiviert. Daraufhin erfolgte die Inkubation der PSZ mit den HDACI für 24 h. Um die Effekte der HDACI im Vergleich zu einem bekannten pro-apoptotischen Stimulus zu untersuchen, wurden die PSZ einer mitgeführten Probe mit Simvastatin (5 µM) inkubiert. Die Durchflusszytometrie (wie im Methodenteil beschrieben) wurde mithilfe der SubG1-Peak Methode ausgewertet. Die apoptotischen Zellen wurden in Prozent der erfassten lebenden Zellen angegeben. Im Diagramm sind die Mittelwerte (+/- S.E.M.) von sechs unabhängigen Versuchen in % zur Kontrolle gezeigt. \* $p < 0,05$  (U-Test nach Mann-Whitney) im Vergleich zur Kontrolle.

Die untersuchten HDACI induzieren in einem kleinen, aber statistisch signifikanten Anteil von aktivierten PSZ die Apoptose (**Abbildung 10**). Auch das pro-apoptotisch wirkende Simvastatin zeigt (in einer Konzentration von 5 µM) einen statistisch signifikant erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Analyse mit der SubG1-Peak Methode ergibt dabei für die untersuchten HDACI (in ihren höchsten Konzentrationen) einen geringeren Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu Simvastatin.

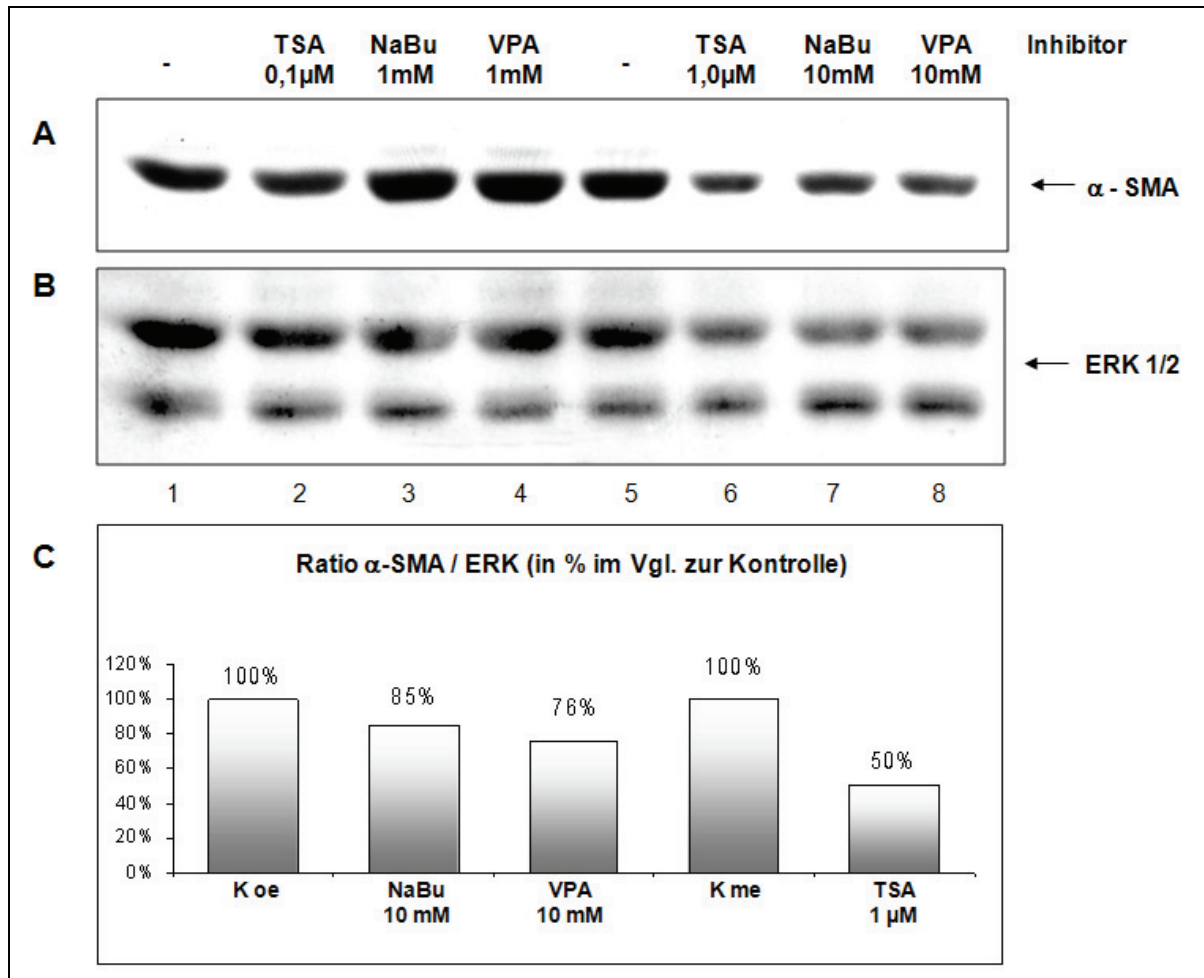
### 5.2.3.4 Zusammenfassung

Die Anzahl lebender Zellen verringert sich unter dem Einfluss der HDACI signifikant und dosisabhängig. Gleichzeitig ist der Anteil toter Zellen nur bei TSA in der höchsten Konzentration (bei 1 µM) signifikant erhöht. Die Auswertung der Durchflusszytometrie mit der SubG1-Peak Methode zeigt, dass HDACI in einem kleinen Anteil der Sternzellen (bis zu ca. 10 %) Apoptose induzieren.

### 5.2.4 Nachweis von $\alpha$ -SMA auf Proteinebene

Die vermehrte Synthese von  $\alpha$ -SMA gilt als charakteristisches Merkmal der myofibroblastären Differenzierung der PSZ. Der Einfluss von HDACI auf die Expression von  $\alpha$ -SMA wurde mittels Western Blot-Analyse und per Immunfluoreszenz untersucht.

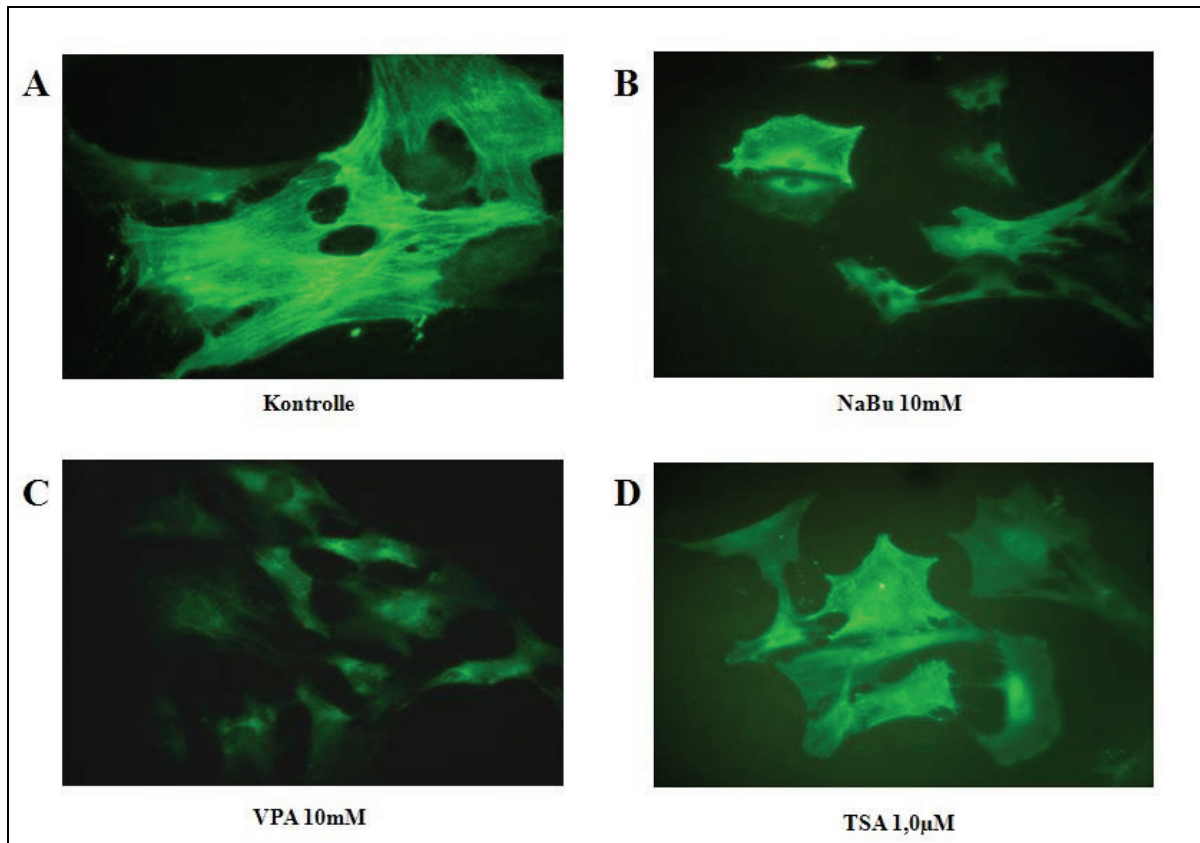
#### 5.2.4.1 Western Blot-Analyse zur quantitativen Bestimmung von $\alpha$ -SMA



**Abbildung 11: Western Blot-Analyse: Hemmeffekte von HDACI auf die  $\alpha$ -SMA Expression.** Die isolierten PSZ wurden auf 12-well Platten ausgesät und für 24 h mit den HDACI inkubiert. Das Gesamtzelllysate (25  $\mu$ g Protein pro Bahn) wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Daraufhin erfolgte der Proteintransfer durch die Methode des „Tank-Blotting“. Abbildung A zeigt das Ergebnis der Immunreaktion mit dem  $\alpha$ -SMA-Antikörper (47 kDa). B: Der Blot wurde anschließend mit *stripping*-Probenpuffer für 30 min bei 50°C abgewaschen, und zum Beladungsabgleich mit einem ERK 1/2-Antikörper (ERK 1: 44 kDa; ERK 2: 42 kDa) inkubiert (*Reprobing* der Membran). Die Bande 1 stellt die Kontrolle zu NaBu und VPA, die Bande 5 die Kontrolle zu TSA nach Zugabe von Ethanol in einer Endkonzentration von 5 mM dar. Die Bandenintensitäten von  $\alpha$ -SMA und ERK wurden anschließend densitometrisch quantifiziert und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Abschnitt C zeigt die Ergebnisse für die jeweils höchsten Konzentration der HDACI in Relation zur jeweiligen Kontrolle (=100 %). Der gezeigte Western Blot ist typisch für drei unabhängige Versuche.

Die Expression von  $\alpha$ -SMA wird durch die untersuchten HDACI auf der Proteinebene leicht (NaBu, VPA) bis moderat (TSA) gehemmt, während die Expression von ERK 1 und 2 unbeeinflusst bleibt (**Abbildung 11; A und B**). Wie die anschließende Quantifizierung der Daten zeigte, hemmt TSA die  $\alpha$ -SMA-Expression auf Proteinebene stärker als VPA und NaBu (**Abbildung 11; C**).

#### 5.2.4.2 Immunfluoreszenz-Analyse zur Expression von $\alpha$ -SMA

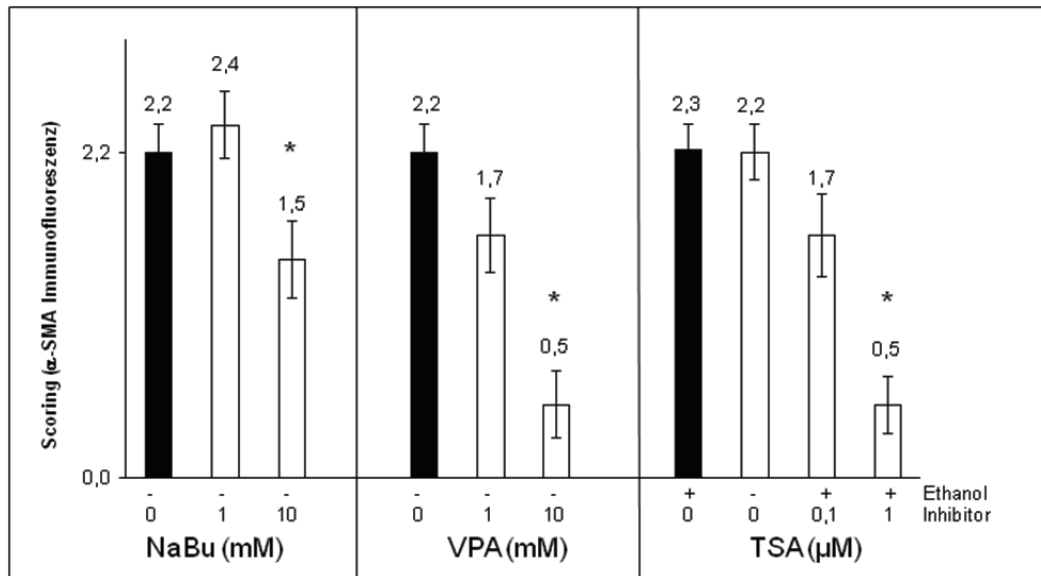


**Abbildung 12:  $\alpha$ -SMA Immunfluoreszenzassay: Einfluss von Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A auf die Expression von  $\alpha$ -SMA und seine Aggregation in Form von Sternzell-typischen *stress fibern*.** Die isolierten PSZ wurden auf 12-well Platten ausgesät und für 24 h mit den HDACI inkubiert. Nach Fixierung in Methanol wurden die PSZ mit 1 % BSA geblockt und anschließend mit monoklonalen  $\alpha$ -SMA-Antikörpern inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit FITC markiert und konnte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden. **Abbildung A** zeigt den Differenzierungsmarker  $\alpha$ -SMA in unbehandelten PSZ und seine typische Anordnung in Form von *stress fibern*; **B, C und D** die Aggregation des  $\alpha$ -SMA nach Inkubation mit den HDACI. (Originalvergrößerung x 630)

Die mikroskopische Auswertung von Immunfluoreszenzassays mit Antikörpern gegen das Strukturprotein  $\alpha$ -SMA ergibt in den Kontrollen den Nachweis von viel  $\alpha$ -SMA und der für aktivierte PSZ typischen *stress fiber* (**Abbildung 12; A**). Demgegenüber zeigt sich in Gegenwart der jeweils höchsten Konzentrationen der HDACI (nach 24 h) wenig  $\alpha$ -SMA pro Zelle sowie eine verminderte bzw. diffuse Aggregation dieses Proteins (**B; C; D**).

### 5.2.4.3 Semiquantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Analyse

Die Bewertung des fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ -SMA erfolgte in der Mikroskopie anhand eines Scoring von verblindeten Proben. Dabei wurden Ränge von 0, für geringe  $\alpha$ -SMA Expression und die Abwesenheit von *stress fibern*, bis 3, für starke  $\alpha$ -SMA Expression und ausgeprägte Aggregation von *stress fibern*, verteilt.



**Abbildung 13: Semiquantitative Auswertung des  $\alpha$ -SMA-Immunfluoreszenzassays anhand verblindeter Proben: Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A hemmen die  $\alpha$ -SMA-Expression und die Aggregation in Form von *stress fibern*.** Es wurden je Probe eine gleiche Anzahl von Zellen für 24 h mit den gegebenen Konzentrationen in 12-well Platten inkubiert. Nach Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -SMA (wie in Abbildung 12 beschrieben) erfolgte die Bewertung der für den Untersucher verblindeten Proben durch Zuordnung der Ränge [0, 1, 2, 3]. Geringe  $\alpha$ -SMA Expression und die Abwesenheit von *stress fibern* wurden als 0 bewertet; hingegen wurden eine starke  $\alpha$ -SMA Expression und ausgeprägte Aggregation von *stress fibern* als 3 gewertet. Im Diagramm sind die Mittelwerte ( $\pm$  S.E.M.) aus zwei unabhängigen Versuchen mit mindestens sechs Proben je Konzentration bzw. Kontrolle bewertet worden. \* $p < 0,05$  (U-Test nach Mann-Whitney) im Vergleich zur Kontrolle.

Die untersuchten HDACI hemmen die Expression von  $\alpha$ -SMA sowie seine Aggregation in Form von *stress fibern*. In der semiquantitativen Auswertung verblindeter Proben weisen die höchsten Konzentration der HDACI statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle auf (**Abbildung 13**). Dabei zeigen insbesondere VPA und TSA eine stark verminderte Expression von  $\alpha$ -SMA im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle.

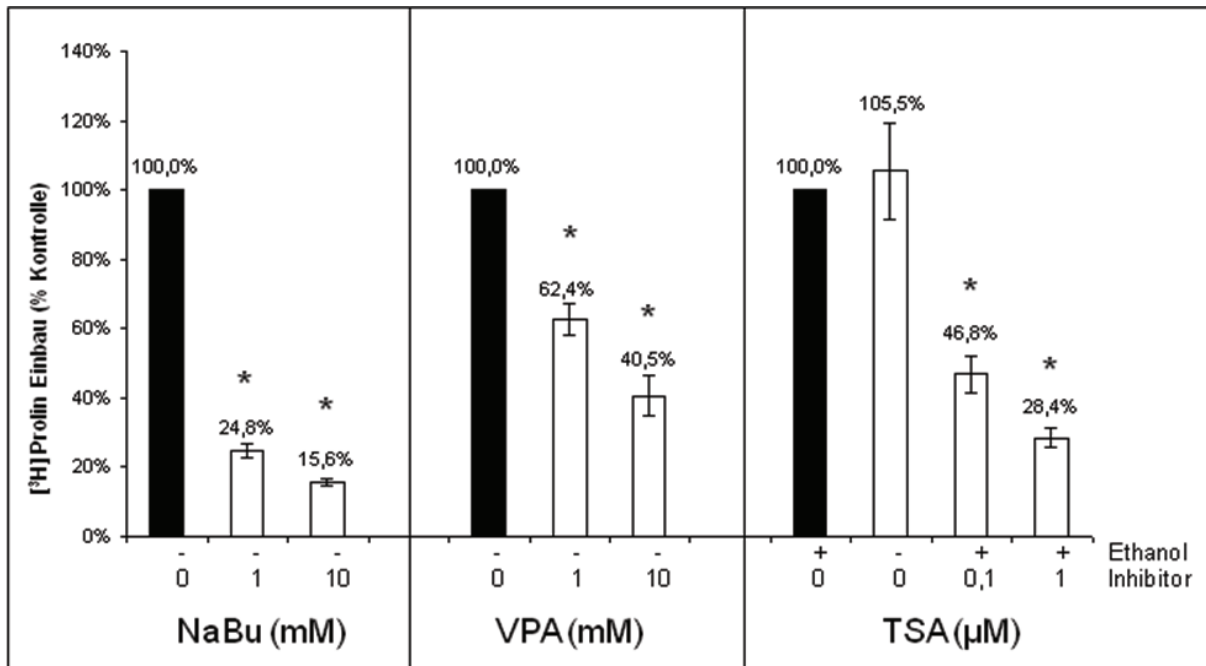
### 5.2.4.4 Zusammenfassung

Sowohl die quantitative Bestimmung von  $\alpha$ -SMA in der Western Blot-Analyse als auch das semiquantitative Scoring des Immunfluoreszenzassays weisen eine geringere  $\alpha$ -SMA-Expression nach. Des Weiteren wird die Aggregation des  $\alpha$ -SMA in Form von *stress fibern* unter dem Einfluss der HDACI in der Mehrzahl der Zellen vermindert.

## 5.2.5 Kollagensyntheserate in Gegenwart der HDACI

### 5.2.5.1 Einbau von [<sup>3</sup>H]-Prolin in saure Essigsäure-lösliche Proteine

Primäre PSZ wurden für 48 h in Gegenwart der HDACI inkubiert. Die Kollagensyntheserate wurde durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Prolin in saure Essigsäure-lösliche Proteine bestimmt. Um dem bereits beschriebenen Einfluss der HDACI auf die Anzahl der Zellen Rechnung zu tragen, wurden die Rohdaten entsprechend der Zellzahl mitgeführter Proben korrigiert.



**Abbildung 14: Quantifizierung der Kollagensyntheserate mittels [<sup>3</sup>H]-Prolineinbau (in % der Kontrolle): Die HDACI bewirken einen dosisabhängig verminderten Einbau des [<sup>3</sup>H]-Prolin.** Es wurden je Probe eine gleiche Anzahl von Zellen in 12-well Platten für 24 h mit den HDACI in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach Zugabe von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Prolin für weitere 24 h in Gegenwart der HDACI erfolgte die Bestimmung des Prolineinbaus in neu synthetisierte Proteine mit Hilfe des *liquid scintillation counting*. Die so ermittelten Rohdaten wurden anhand der Zellzahlen mitgeführter Proben korrigiert, um die Einflüsse der HDACI auf die Anzahl der Zellen herauszurechnen. Im Diagramm sind die Mittelwerte (+/- S.E.M.) von acht unabhängigen Versuchen in % zur Kontrolle (=100 %) gezeigt. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für insgesamt drei Untersuchungen zu jedem HDACI. \*p<0,05 (Wilcoxon-Rangsummentest) im Vergleich zur Kontrolle.

NaBu, VPA und TSA hemmen signifikant und zugleich dosisabhängig den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Prolin in neu synthetisierte Essigsäure-lösliche Proteine in primären PSZ (**Abbildung 14**). Ethanol in einer Endkonzentration von 5 mM bewirkt dagegen keinen signifikanten Einfluss auf den [<sup>3</sup>H]-Prolineinbau.

### 5.2.5.2 Zusammenfassung

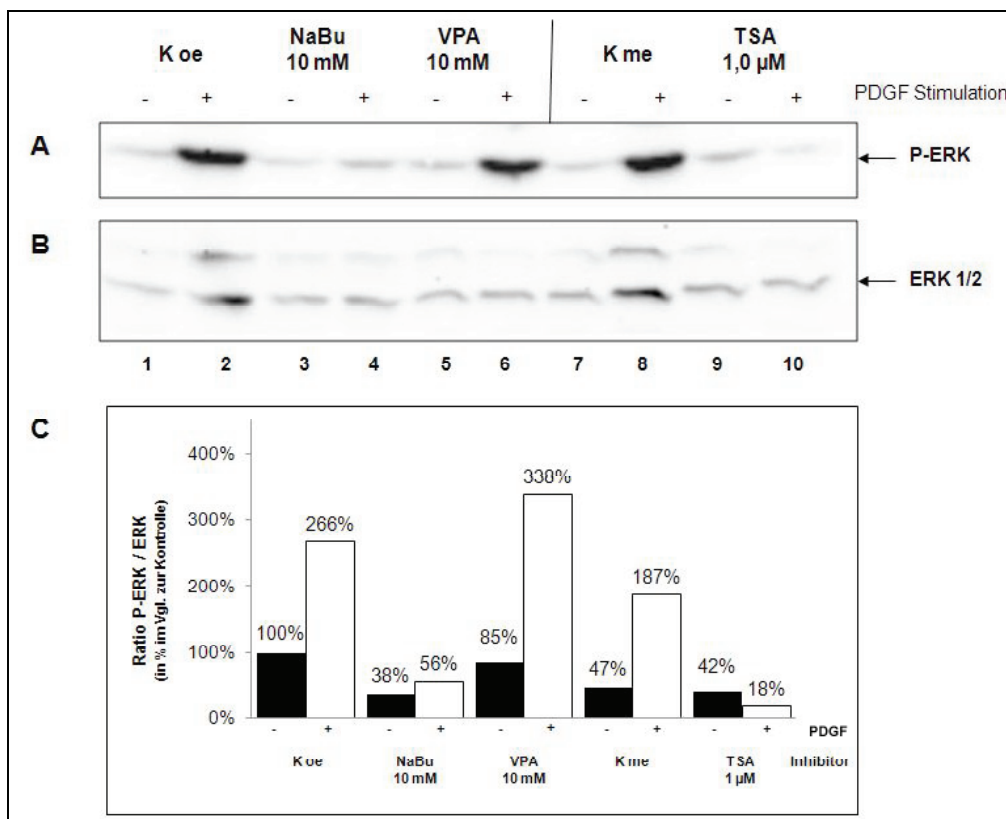
Die untersuchten HDACI hemmen signifikant und zugleich dosisabhängig die Kollagensyntheserate der PSZ.

### 5.3 Signaltransduktion in PSZ in Gegenwart der HDACI

#### 5.3.1 Signaltransduktion unter PDGF-Stimulation

##### 5.3.1.1 Phosphorylierung von ERK unter dem Einfluss von PDGF

Zu den bedeutenden Signaltransduktionswegen der Sternzellaktivierung gehört die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Familie und damit die *extracellular signal-related kinases* (ERK). ERK wird in Gegenwart des *platelet-derived growth factor* (PDGF) in PSZ vermehrt phosphoryliert und damit aktiviert (Jaster *et al.*, 2002). Vor diesem Hintergrund sollte der Einfluss der HDACI auf die Expression von Phospho-ERK mithilfe der Western Blot-Analyse charakterisiert werden.



**Abbildung 15: Western Blot-Analyse: Natriumbutyrat und Trichostatin A bewirken eine verminderte Phosphorylierung des ERK-Signalweges nach PDGF-Stimulation.** Die isolierten PSZ wurden auf 12-well Platten ausgesät und in Gegenwart von 17 % FKS Zellkulturmedium für 16 h mit den HDACI inkubiert. Anschließend wurden die PSZ in den 8 h vor der PDGF-Stimulation, weiterhin unter dem Einfluss der HDACI, in serumfreien Medium kultiviert. Daraufhin erfolgte in der Hälfte der Proben die Stimulation mit PDGF (1:1000) für 60 min. Das Gesamtzelllysate (25 µg Protein pro Bahn) wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Daraufhin erfolgte der Proteintransfer durch die Methode des „Tank-Blotting“. Abbildung A zeigt das Ergebnis der Immunoreaktion mit dem Phospho-ERK-Antikörper (P-ERK: 44 kDa; P-ERK 2: 42 kDa). Der Blot wurde anschließend mit *stripping*-Probenpuffer für 30 min bei 50°C abgewaschen. B zeigt das *Reprobing* der Membran mit dem ERK 1/2-Antikörper (ERK 1: 44 kDa; ERK 2: 42 kDa). Abschnitt C stellt das Verhältnis von Phospho-ERK zu ERK 1/2 ohne (-) bzw. nach (+) PDGF-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle ohne Ethanol (=100 %) dar. Der abgebildete Western Blot ist repräsentativ für zwei durchgeführte Untersuchungen.

TSA und NaBu vermindern die Phosphorylierung von ERK 1/2, welche durch PDGF stimuliert wird (**Abbildung 15; A und C**). VPA beeinflusst dagegen nicht die Bildung von Phospho-ERK. Das *Reprobing* der Membran mit dem Antikörper gegen ERK 1/2 zeigt nahezu vergleichbare Ausgangsproteinmengen (**B**). Die PDGF-stimulierten Kontrollen sowohl ohne ( $K_{oc}$ ) als auch mit Ethanol ( $K_{me}$ ) weisen dabei leicht erhöhte Proteinmengen von ERK 1/2 auf.

#### 5.3.1.2 Zusammenfassung

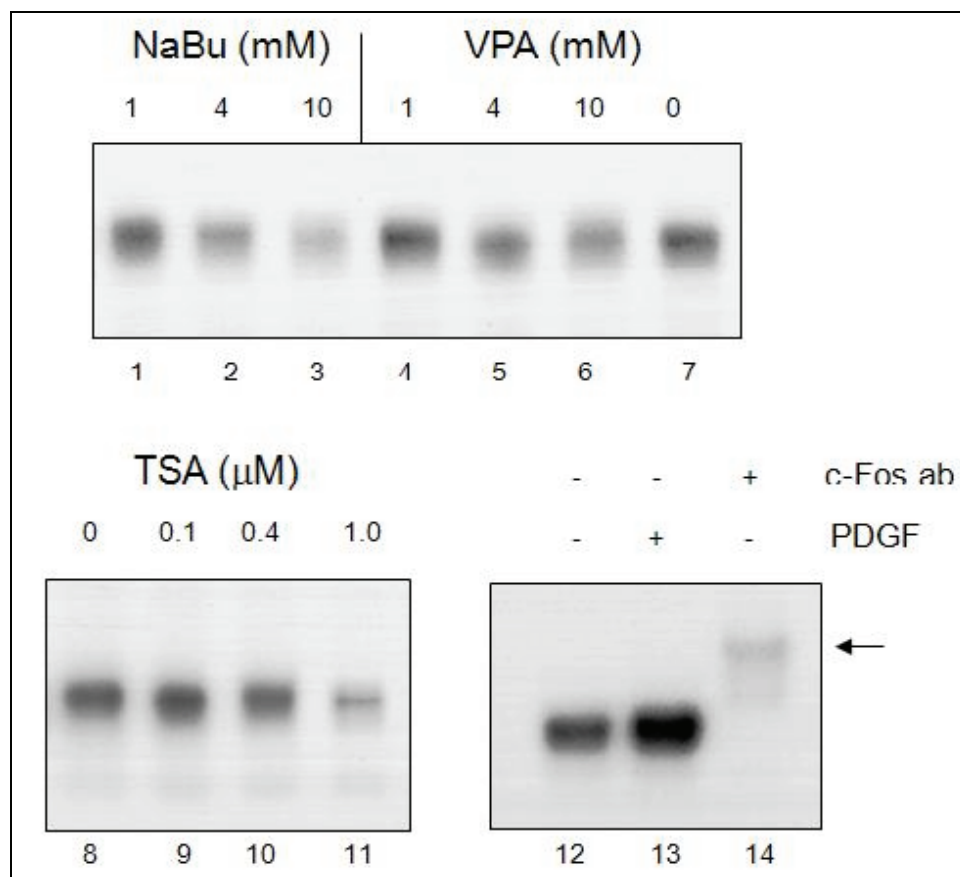
TSA und NaBu sind in der Lage die PDGF-stimulierte Phosphorylierung von ERK 1/2 zu hemmen. VPA hat demgegenüber keinen Einfluss auf die Bildung von Phospho-ERK.

### 5.3.2 Bindung von AP-1 an die DNA der PSZ

#### 5.3.2.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zu AP-1

Das *activator protein 1*, welches seine Wirkung vor allem infolge von PDGF sowie anderen Zytokinen vermittelt, spielt durch Bildung von Transkriptionsfaktor-Komplexen eine bedeutende Rolle in der Aktivierung pankreatischer Sternzellen (Jaster *et al.*, 2002; Fitzner *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ethanol (in Konzentrationen von 50 mM) AP-1 stimuliert (Masamune *et al.*, 2002B).

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden EMSA zum AP-1 durchgeführt. In Vorversuchen dazu hatte Ethanol als Lösungsmittel von TSA (mit einer Endkonzentration von 5 mM) jedoch keinen Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität von AP1 (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 16: Gelshift-Assay: Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A hemmen die Bindung von AP-1 an die DNA.** Die PSZ wurden in den angegebenen Konzentrationen mit den HDACI für 24 h in 6-well Platten inkubiert; zusätzlich wurde ein Reaktionsansatz (siehe Bande 13) für 60 min mit PDGF (10 ng/ml) stimuliert. Es erfolgte die Inkubation der Kernextrakte mittels  $^{32}$ P-markierten Oligonukleotid-Sonden mit AP-1 Motiv. Anschließend wurden die Proben in einem nicht denaturierenden 6 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die spezifische AP-1-Bande wurde mithilfe der *Supershift*-Analyse unter Zugabe des c-Fos-Antikörpers (c-Fos ab; 1mg) identifiziert (siehe Pfeil in Bande 14). Die Daten des Gelshift-Assays konnten unabhängig voneinander in drei Experimenten reproduziert werden. Dabei kann die Intensität der Banden von drei unterschiedlichen Blots aufgrund unterschiedlicher Zeiten der Röntgenfilmmexposition nicht direkt miteinander verglichen werden.



Im EMSA konnte gezeigt werden, dass die untersuchten HDACI die DNA-Bindung von AP-1 dosisabhängig hemmen (**Abbildung 16**). Die mitgeführten Kontrollen zeigen nach Zugabe von PDGF (10ng/ml; 60min) eine Aktivierung von AP-1 durch PDGF (siehe Bande 13) und nach Zugabe des c-Fos-Antikörper (1 mg) einen *Supershift* (siehe Bande 14).

#### 5.3.2.2 Zusammenfassung

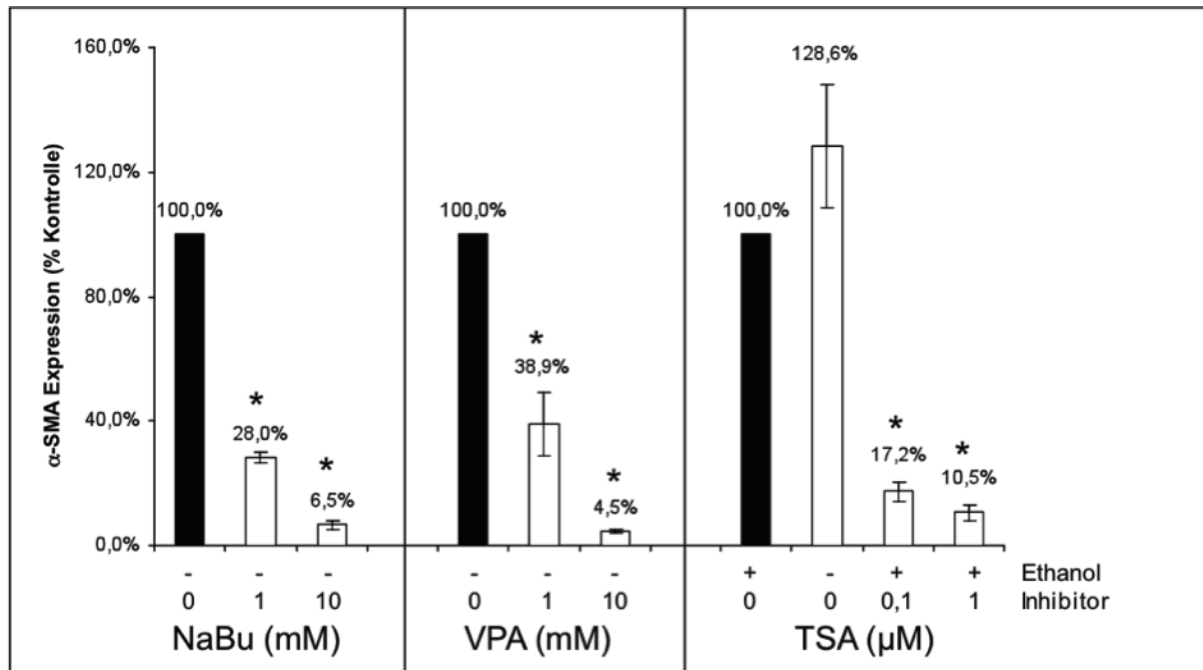
Die untersuchten HDACI hemmen die Bindung von AP-1 an die DNA der PSZ dosisabhängig.

## 5.4 Wirkung der HDACI auf die Genexpression in primären PSZ

### 5.4.1 *Real-time* PCR zur Expression von $\alpha$ -SMA, ET-1, TGF- $\beta$ 1

Primäre PSZ wurden für 24 h mit den HDACI inkubiert. Daraufhin wurde mithilfe der *Real-time* PCR der Einfluss der HDACI auf die Genexpression von  $\alpha$ -SMA, ET-1 und TGF- $\beta$ 1 in den PSZ untersucht.

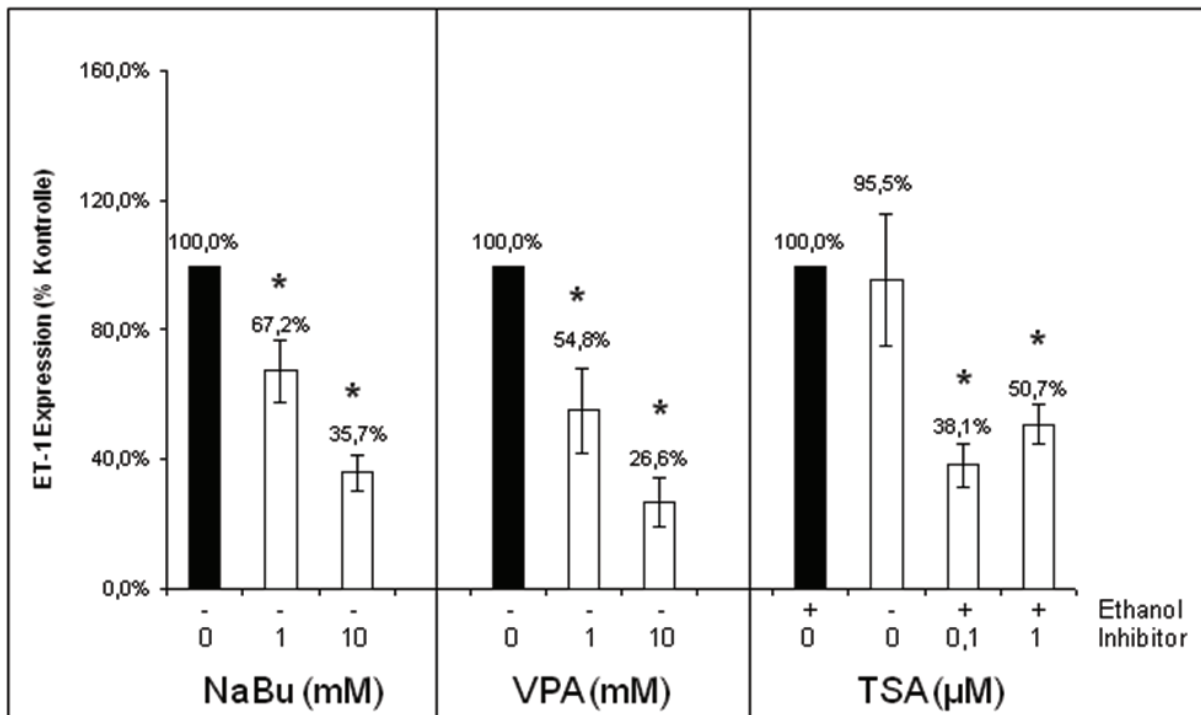
#### 5.4.1.1 $\alpha$ -SMA-Expression in Gegenwart der HDACI



**Abbildung 17:** *Real-time* PCR mit mRNA-Nachweis von  $\alpha$ -SMA: Die HDACI bewirken eine signifikant dosisabhängige Hemmung des  $\alpha$ -SMA auf transkriptioneller Ebene. Aktivierte PSZ wurden für 24 h in 6-well Platten in den angegebenen Konzentrationen mit den HDACI inkubiert. Die gesamte RNA wurde durch Trizol-Reagenz isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Daraufhin erfolgte die *Real-time* PCR mithilfe von spezifischen *Assay-on-Demand*-Sonden für  $\alpha$ -SMA auf einer 96-well-Mikrotiterplatte. In der Analyse durch das *AbiPrism7000 sequence detection system* diente HPRT als *house-keeping gene*. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung (+/- S.E.M.) von fünf unabhängigen Versuchen in % zur Kontrolle (=100 %) gezeigt. \* $p < 0,05$  (Wilcoxon-Rangsummentest) im Vergleich zur Kontrolle.

Auf transkriptioneller Ebene wird die Expression von  $\alpha$ -SMA durch die untersuchten HDACI signifikant und zugleich dosisabhängig gehemmt (**Abbildung 17**). Ethanol hat in der gewählten Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die  $\alpha$ -SMA-Expression.

## 5.4.1.2 ET-1-Expression in Gegenwart der HDACI



**Abbildung 18: Real-time PCR mit mRNA-Nachweis von ET-1: Die HDACI bewirken eine signifikant dosisabhängige Hemmung des ET-1 auf transkriptioneller Ebene.** Die Bestimmung der mRNA-Expression wurde wie in Abbildung 17 beschrieben unter Verwendung von spezifischen *Assay-on-demand*-Sonden für ET-1 durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung ( $\pm$  S.E.M.) von fünf unabhängigen Versuchen in % zur Kontrolle (=100 %) gezeigt. \* $p < 0,05$  (Wilcoxon-Rangsummentest) im Vergleich zur Kontrolle.

Auch die Expression von ET-1 wird durch die untersuchten HDACI signifikant und zugleich dosisabhängig gehemmt (**Abbildung 18**). Ethanol hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die ET-1-Expression.

### 5.4.1.3 TGF- $\beta$ 1 Expression in Gegenwart der HDACI

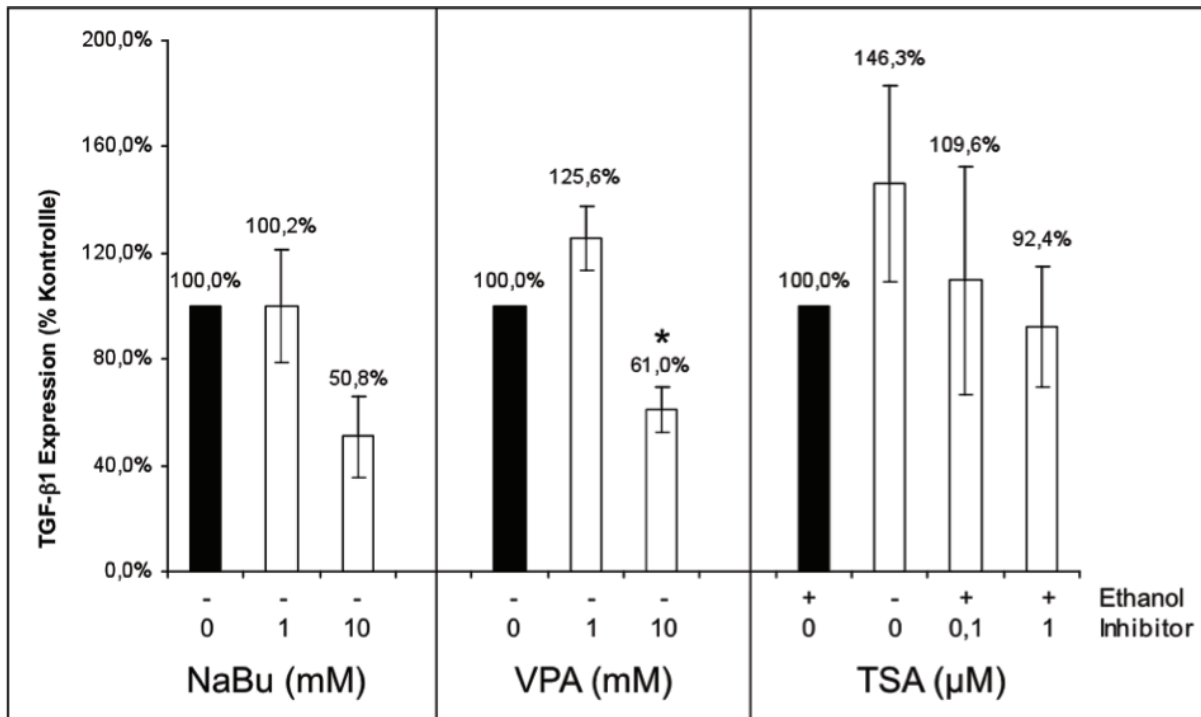


Abbildung 19: *Real-time PCR* mit mRNA-Nachweis von TGF- $\beta$ 1: VPA hemmt auf transkriptioneller Ebene bei Konzentrationen von 10 mM signifikant die TGF- $\beta$ 1 Expression. Bei gleicher Konzentration erreicht die Inhibition durch NaBu keine statistische Signifikanz. TSA scheint keinen Einfluss auf die TGF- $\beta$ 1 Expression zu bewirken. Die Bestimmung der mRNA-Expression wurde wie in Abbildung 17 beschrieben unter Verwendung von spezifischen *Assay-on-demand*-Sonden für TGF- $\beta$ 1 durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung ( $\pm$  S.E.M.) von fünf unabhängigen Versuchen in % zur Kontrolle (=100 %) gezeigt. \* $p < 0,05$  (Wilcoxon-Rangsummentest) im Vergleich zur Kontrolle.

VPA hemmt signifikant die TGF- $\beta$ 1-Expression bei einer Konzentration von 10 mM (Abbildung 19). Weiterhin halbiert NaBu in der höchsten Konzentration die Expression von TGF- $\beta$ 1, erreicht jedoch dabei keine statistische Signifikanz. TSA dagegen hat keinen erkennbaren Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von TGF- $\beta$ 1.

### 5.4.2 Zusammenfassung

Die drei untersuchten HDACI hemmen dosisabhängig die Expression von  $\alpha$ -SMA und von ET-1 auf transkriptioneller Ebene. TGF- $\beta$ 1, welches wie auch ET-1, bei der Sternzellaktivierung eine bedeutende Rolle in autokrinen Regelkreisen einnimmt, zeigt erst bei VPA in der höchsten Konzentration eine statistisch signifikante Hemmung.

## 6 Diskussion

Die Sternzellen bilden die zelluläre Grundlage der Organfibrose von Leber (Friedman, 1993; Gressner & Bachem, 1995) und Pankreas (Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.* 1998; Apte *et al.*, 1999). Im Tiermodell und am humanen Pankreas konnte nachgewiesen werden, dass die Fibrogenese des Pankreas mit der Aktivierung von PSZ assoziiert ist (Haber *et al.*, 1999). Charakteristisch für die Sternzellaktivierung sind neben einer erhöhten Proliferationsrate eine gesteigerte Matrixproteinsynthese und eine starke Expression von  $\alpha$ -SMA (Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.*, 1998). Die Funktion der aktivierten PSZ besteht wahrscheinlich darin, im Rahmen der natürlichen Wundheilung des Pankreas zerstörtes Gewebe durch Bindegewebe zu ersetzen (Zimmermann *et al.*, 2002). Diese Regeneration könnte unter den pathologischen Bedingungen von chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom zu einer Fehlregulation der Sternzellaktivierung führen und dadurch die ausgeprägte Fibrosierung der Bauchspeicheldrüse verursachen. In der Vergangenheit wurden die molekularen Hintergründe der PSZ-Aktivierung intensiv untersucht. Sind die Faktoren der Aktivierung identifiziert, können Therapieansätze entwickelt werden, welche die für die chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom typische Organfibrose positiv beeinflussen. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit die Effekte von HDACI auf PSZ charakterisiert. HDACI bewirken eine vermehrte Acetylierung von Histonen und beeinflussen damit einen epigenetischen Regulationsmechanismus, der sich auf eine Vielzahl zellulärer Funktionen auswirkt. Die Untersuchungen erfolgten mit *in vitro* aktivierten, primären PSZ; zudem wurden in einzelnen Versuchen die Effekte der HDACI auf immortalisierte PSZ charakterisiert.

### 6.1 Biologische Effekte der HDACI auf PSZ

Die Arbeit zeigt, dass HDACI im *millimolaren* (NaBu und VPA) und *mikromolaren* (TSA) Konzentrationsbereich in den aktivierten PSZ eine vermehrte Acetylierung des H3-Histonmoleküls bewirken. In den PSZ führte dabei Trichostatin A vor Natriumbutyrat und Valproat zur ausgeprägtesten Acetylierung des H3-Histons im Vergleich zur Kontrolle. Das TSA-Lösungsmittel Ethanol hatte in der in dieser Arbeit eingesetzten niedrigen Endkonzentration von 5 mM keinen Einfluss auf die Histon-H3-Acetylierung. Ethanolkonzentrationen ab 50 mM können jedoch Literaturdaten zufolge die Acetylierung des Proteins verstärken (Kim & Shukla, 2005).

Charakteristisch für die Stoffklasse der HDACI ist die Hemmung von HDAC-Isoenzymen, wodurch das dynamische Gleichgewicht zwischen HAT und HDAC zugunsten der acetylierten Histone verschoben wird. Die enzymatisch reversible Acetylierung des Histonoktamers führt zur Auflockerung der Chromatin-Struktur und ermöglicht dadurch prinzipiell die Genexpression (Allan *et al.*, 1982; Hassig & Schreiber, 1997).

Potenzielle Wirkunterschiede zwischen den strukturell unterschiedlichen Inhibitoren können mit der Fähigkeit der einzelnen HDACI erklärt werden, die HDAC-Isoenzyme mehr oder weniger spezifisch zu hemmen. Als Vertreter der kurzkettigen Fettsäuren sind NaBu und VPA in der Lage, vor allem die HDAC der Klasse I (mit den HDAC1, 2, 3 und 8) und weniger der Klasse IIa (mit den HDAC4, 5, 7 und 9) zu inhibieren. Aus der Gruppe der Hydroxaminsäuren stellt das TSA dagegen einen eher unspezifischen Hemmstoff dar, der neben den beiden erwähnten HDAC-Klassen auch die Isoenzyme der Klasse IIb inhibiert (Khan *et al.*, 2008; Blackwell *et al.*, 2008).

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, beeinflussen HDACI im untersuchten Konzentrationsbereich biologische Funktionen der PSZ, die mit der Sternzellaktivierung und dem fibrotischen Umbau des Pankreas assoziiert sind.

Die drei untersuchten HDACI waren in der Lage, die Proliferation primärer PSZ dosisabhängig zu hemmen. Auch die hohe proliferative Aktivität immortalisierter PSZ wurde durch HDACI signifikant und dosisabhängig inhibiert, wobei verglichen mit den primären PSZ höhere HDACI-Konzentrationen für eine effiziente Hemmung notwendig waren.

Der BrdU-Einbau in die DNA primärer PSZ wurde durch TSA schon bei sehr geringen Konzentrationen (ab 0,01  $\mu\text{M}$ ) signifikant gehemmt; bei NaBu (ab 0,4 mM) und VPA (ab 1,0 mM) dagegen bei höheren Wirkkonzentrationen. Das Ausmaß der Proliferationshemmung könnte dabei in einem direkten Zusammenhang mit dem Grad der H3-Histon-Acetylierung stehen, welcher sich für jeden der untersuchten HDACI unterschiedlich darstellte.

Zahlreiche Literaturbefunde zu verschiedenen Zellentitäten belegen den Einfluss der untersuchten HDACI auf die Regulation des Zellzyklus (Qiu *et al.*, 2000; Burgess *et al.*, 2001; Warrenner *et al.*, 2003). Es finden sich Hinweise, nach denen geringe Konzentrationen der HDACI einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirken, während hohe Inhibitorkonzentrationen den Zellzyklus auch am G2/M-Restriktionspunkt stoppen (Richon *et al.*, 2000). In jüngster Vergangenheit zeigte sich in verschiedenen Zellentitäten, darunter auch

Fibroblasten, dass die HDAC1 und 2 an der Regulation des Überganges von der G1- zur S-Phase beteiligt sind (Yamaguchi *et al.*, 2010).

Die Zellzählung lebender Zellen im Trypanblau-Ausschlusstest nach Inkubation mit den HDACI ergab eine dosisabhängige Abnahme der Zellzahl.

Allgemein stellte sich daher die Frage, inwieweit der Rückgang des BrdU-Einbaus auf eine echte Proliferationshemmung und nicht auf eine Verminderung der Zellzahl zurückzuführen ist. Unter dem Einfluss der HDACI wäre es möglich, dass in den PSZ die Apoptose induziert und/oder der nekrotische Zelltod initiiert wird. Beide Vorgänge würden den Anteil überlebender PSZ mindern und somit die Zahl der Zellen verringern, die bei der Proliferation mithilfe von BrdU DNA synthetisieren.

In Gegenwart der höchsten Konzentration der HDACI wurde der Anteil lebender PSZ auf ca. 10 - 30 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert, darüber hinaus war nahezu kein BrdU-Einbau in die DNA mehr möglich. Die lebenden Zellen waren unter dem Einfluss der HDACI demnach nicht mehr in der Lage, zu proliferieren.

Die Zellzählung toter PSZ unter dem Phasenkontrastmikroskop ergab lediglich bei der Inkubation mit TSA in der höchsten untersuchten Konzentration (von 1  $\mu\text{M}$ ) einen geringen, aber signifikanten Anteil an toten Zellen (von ca. 15 %).

Die Auswertung der Durchflusszytometrie mit der SubG1-Peak Methode zeigte nach einer Inkubationszeit von 24 h bei den untersuchten HDACI einen geringen Anteil an apoptotischen Zellen (bis zu ca. 10 %).

Zusammen legen die Ergebnisse nahe, dass in den Sternzellen nach Inkubation mit den HDACI die echte Wachstumshemmung gegenüber dem Zelltod dominiert.

Der geringe Anteil an apoptotischen PSZ deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener Studien, nach denen in Gegenwart von HDACI die Apoptose in benignen Zellentitäten verglichen mit Tumorzellen nur leicht erhöht ist (Bolden *et al.*, 2006). Unter dem Einfluss der HDACI wird der programmierte Zelltod vor allem in Tumorzellen durch Aktivierung des extrinsischen Signalweges induziert (Insinga *et al.*, 2005; Nebbioso *et al.*, 2005). In der aktuellen Literatur kommt darüber hinaus der intrinsischen Apoptosekaskade große Bedeutung zu. Weiterführende Studien belegen zudem pro-apoptotische Effekte, die nach isolierter Hemmung von HDAC6 vermittelt werden (Marks & Xu, 2009).

Die PSZ, die bei der Fibrosierung des Pankreas als Hauptproduzenten der EZM gelten (Omary *et al.*, 2007), produzieren nach ihrer Aktivierung in der Zellkultur in gesteigertem Maße Kollagene (Bachem *et al.*, 1998; Apte *et al.*, 1999).

Nach Inkubation mit den HDACI im untersuchten Konzentrationsbereich nahm die Kollagensyntheserate in kultivierten PSZ signifikant und zugleich dosisabhängig ab.

Die HDACI erweisen sich in einer Vielzahl von Literaturbefunden, wenn auch zelltypspezifisch, als wirkungsvolle Inhibitoren des Matrixproteinstoffwechsels (Clark *et al.*, 2007). In Zellkultur-Studien behindert HDAC8-spezifische-siRNA die Organisation von Typ-I-Kollagen und zugleich Kontraktilität von  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen (Waltregny *et al.*, 2005). Darüber hinaus hemmt HDAC7-spezifische-siRNA, wie auch TSA, in Fibroblasten der Systemischen Sklerose die Expression von Kollagen Typ I und III auf transkriptioneller Ebene (Hemmatazad *et al.*, 2009).

In Gegenwart der HDACI verminderte sich die Expression von  $\alpha$ -SMA in den PSZ. In Western Blot-Analysen zeigte sich bei der höchsten untersuchten Konzentration eine leichte (NaBu und VPA) bis moderate Hemmung (TSA) der  $\alpha$ -SMA-Expression auf Proteinebene. Des Weiteren konnte auf transkriptioneller Ebene eine dosisabhängig verminderte Expression von  $\alpha$ -SMA in Gegenwart der HDACI nachgewiesen werden.

Das  $\alpha$ -SMA gilt als myofibroblastärer Differenzierungsmarker der PSZ und ist in aktivierten Sternzellen charakteristischerweise in einem Netzwerk von *stress fibern* angeordnet (Masamune *et al.*, 2003B).

In der Immunfluoreszenz erbrachte die semiquantitative Auswertung verblindeter Proben anhand eines Scorings den Nachweis einer signifikant verringerten Expression von  $\alpha$ -SMA unter dem Einfluss der HDACI. Nach Inkubation mit den HDACI wurden demnach vermehrt PSZ beobachtet, die dem ruhenden Sternzellphänotyp ähneln. Vor allem bei TSA und VPA zeigte sich in der höchsten Konzentration eine starke Verminderung der *stress fiber*-Bildung.

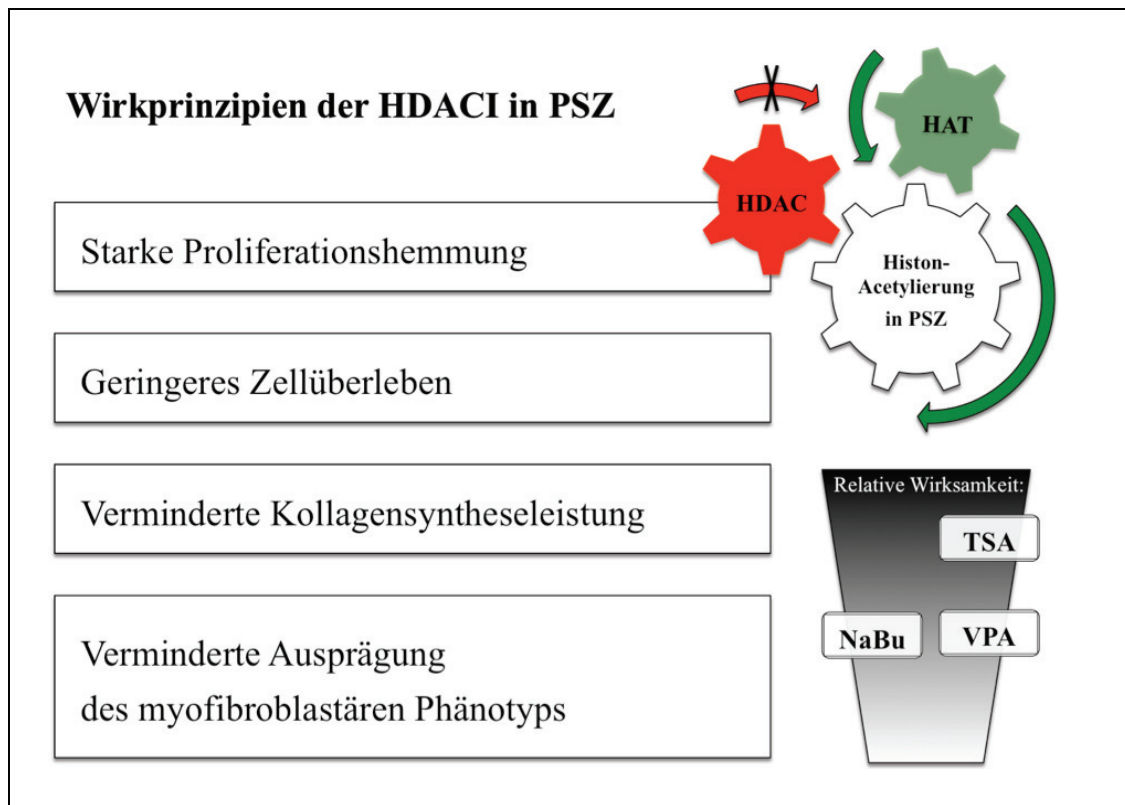
Es mehren sich die Literaturbefunde, nach denen das Zytoskelettprotein  $\alpha$ -SMA in Fibroblasten mit HDAC8 assoziiert ist (Waltregny *et al.*, 2004; Waltregny *et al.*, 2005). In weiterführenden Studien konnte die Expression von  $\alpha$ -SMA vor allem mithilfe von HDAC4-spezifischer-siRNA, weniger durch siRNA gegen HDAC6 und 8, gehemmt werden (Glenisson *et al.*, 2007).



Die untersuchten HDACI zeigten auf Proteinebene unterschiedlich stark ausgeprägte Hemmeffekte auf die  $\alpha$ -SMA-Expression in PSZ. Die ausgeprägten Effekte von TSA können eventuell mit dem gegenüber NaBu und VPA breiteren Wirkungsspektrum auf die HDAC-Isoenzyme erklärt werden. Auch in Studien anderer Arbeitsgruppen war TSA in der Lage, die myofibroblastäre Differenzierung besonders stark zu inhibieren (Glenisson *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009).

Die Daten dieser Arbeit stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Zellkultur-Studien über die antifibrotische Wirkung von HDACI in *hepatischen* Sternzellen (Niki *et al.*, 1999; Rombouts *et al.*, 2002). Die HSZ weisen im Vergleich mit den PSZ zahlreiche ähnliche Merkmale in Struktur und Funktion auf. Darüber hinaus gelten die HSZ, ebenso wie die PSZ bei der Pankreasfibrose, als Hauptproduzenten der EZM bei der Organfibrose der Leber (Kordes *et al.*, 2009). Die HDACI hemmen die Proliferation aktivierter HSZ und vermindern zugleich die Expression des myofibroblastären Differenzierungsmarkers  $\alpha$ -SMA. Des Weiteren zeigt sich in HSZ, dass NaBu und TSA die Expression von Typ-III-Kollagen hemmen und TSA darüber hinaus die Synthese des Typ-I-Kollagens vermindert (Niki *et al.*, 1999). In anderen Untersuchungen behinderte TSA zudem die Entwicklung des Actin-Zytoskelett in ruhenden HSZ sowie die Differenzierung aktivierter HSZ (Rombouts *et al.*, 2002). Auch in einer anderen Zellkultur-Studie mit humanen Lungenfibroblasten verringerten HDACI die Expression von Typ-I-Kollagen auf transkriptioneller Ebene. Dieser Effekt scheint nicht allein mit der vermehrten Acetylierung von Histonen, sondern auch mit einer erhöhten Produktion von cAMP assoziiert zu sein (Rishikof *et al.*, 2004).

In jüngster Vergangenheit belegen erste tierexperimentelle Daten die antifibrotische Wirksamkeit der HDACI. So konnte beispielsweise in einem Tiermodell der renalen interstitiellen Fibrose der Ratte gezeigt werden, dass HDACI die Progression der Fibrosierung vermindern können (Pang *et al.*, 2009; Kinugasa *et al.*, 2010). In einem anderen Tiermodell mit an Hypertonie erkrankten Ratten hemmte der HDACI SAHA das kardiovaskuläre Remodelling und die kardiale Fibrose (Iyer *et al.*, 2010).



**Abbildung 20:** HDACI sind antifibrotisch wirksam, indem sie die Proliferation und das Überleben aktivierter Sternzellen einschränken. Darüber hinaus verringern HDACI die Kollagensyntheseleistung der PSZ und die typische Ausprägung des myofibroblastären Phänotyps nach Sternzellaktivierung. Im gleichen Konzentrationsbereich verschieben HDACI in den PSZ das dynamische Gleichgewicht zwischen HDAC und HAT zugunsten einer vermehrten Acetylierung von Histonen. TSA bewirkt dabei vor NaBu und VPA die ausgeprägteste Acetylierung der Histonmoleküle. Darüber hinaus ist unter dem Einfluss von TSA auch die relative antifibrotische Wirksamkeit höher als bei NaBu oder VPA.

Insgesamt belegen die Daten dieser Promotionsarbeit die Wirksamkeit der HDACI auf mindestens vier Schlüsselfunktionen aktivierter PSZ (siehe dazu **Abbildung 20**). Darüber hinaus beeinflussen HDACI wesentliche Charakteristika von anderen (Myo)Fibroblasten. HDACI sind damit wahrscheinlich in unterschiedlichen Geweben antifibrotisch wirksam. Unter den in dieser Arbeit untersuchten HDACI wies vor allem TSA eine ausgeprägte antifibrotische Wirksamkeit auf. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Literaturbefunden.

## 6.2 Signalwegsaktivierung in PSZ in Gegenwart der HDACI

In den vergangenen Jahrzehnten sind zahlreiche mitogene und proinflammatorische Zytokine, darunter PDGF, CTGF, TNF- $\alpha$  sowie TGF- $\beta$ 1 und ET-1, als Mediatoren der Pankreasfibrose identifiziert und näher charakterisiert worden (Jaster & Emmrich, 2008). Der Wachstumsfaktor PDGF stellt davon das wirksamste Mitogen in PSZ dar (Luttenberger *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2001) und verstärkt darüber hinaus die Migration der Sternzellen

(Phillips *et al.*, 2003B). Unter dem Einfluss von PDGF werden die Proteinkinasen ERK 1 und ERK 2 in Sternzellen vermehrt phosphoryliert und dadurch Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, aktiviert (Jaster *et al.*, 2002).

Die molekularen Grundlagen der antiproliferativen sowie antifibrotischen Aktivität von HDACI sind weitgehend unbekannt. Eine der Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit war, ob die untersuchten HDACI den durch PDGF-stimulierten Signalweg in PSZ beeinflussen.

In dieser Arbeit konnte mithilfe von Western Blot-Analysen nachgewiesen werden, dass TSA und NaBu die PDGF-stimulierte Phosphorylierung von ERK 1/2 in Sternzellen hemmen. Demgegenüber zeigte VPA keinen Einfluss auf die Bildung von Phospho-ERK in den PSZ. NaBu und TSA können demnach die PDGF-induzierte Signaltransduktion in PSZ blockieren und unter anderem auf diesem Wege die Proliferation der Sternzellen einschränken. Beim VPA spielt dieses Wirkprinzip hingegen wahrscheinlich keine Rolle.

Die eigenen Daten unterstützen einen bereits vorhandenen Literaturbefund, nach dem NaBu, TSA und SAHA die PDGF-abhängige Proliferation von Fibroblasten vermindern, ohne dabei das Überleben der Zellen zu beeinflussen. Auf transkriptioneller Ebene hemmen HDACI unter anderem die durch PDGF-stimulierte Expression des Proto-Onkogens *c-myc*, wodurch weniger Zellteilungen möglich sind (Catania *et al.*, 2006).

Vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe zufolge wird die Transduktion des mitogenen PDGF-Signals in den PSZ unter anderem durch den Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt. AP-1 nimmt damit eine zentrale Rolle in der Aktivierung kultivierter Sternzellen ein (Jaster *et al.*, 2002).

Im Gelshift-Assay zeigte sich, dass die drei untersuchten HDACI dosisabhängig die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 an die DNA der Sternzellen vermindern.

Damit könnte die Proliferationshemmung der PSZ in Gegenwart von TSA, NaBu und VPA auf die verminderte DNA-Bindung von AP-1 zurückgeführt werden. Der Nachweis einer Kausalbeziehung steht jedoch noch aus.

Interessanterweise zeigt eine Studie von Catania *et al.*, dass in Gegenwart der HDACI die Expression von *c-jun*, einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1, in den Fibroblasten unbeeinflusst bleibt (Catania *et al.*, 2006). Demgegenüber hemmt TSA in Tumorzellen die Expression von *c-jun* sowie der entsprechenden Zielgene, wie beispielsweise der Cyclooxygenase-2 (Yamaguchi *et al.*, 2005). Auf welche Art und Weise die HDACI einzelne Transkriptionsfaktoren beeinflussen, bleibt bisher noch ungeklärt.

Neben direkten Effekten der HDACI auf die Chromatinstruktur wurden in der Vergangenheit zahlreiche Einflüsse auf Nicht-Histon-Proteine, darunter Moleküle der Signaltransduktion (Glozak *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007) und zudem wichtige Regulatoren des Zellzyklus, nachgewiesen. Wie Literaturbefunde dazu belegen, wird infolge der HDAC-Hemmung die Aktivität der sogenannten *cyclin dependent kinases* (CDK) herabgesetzt. Aktuelle Studien zufolge ist dies auf die Hemmung der Expression von Cyclinen sowie die erhöhte Expression von CDK-Inhibitoren, wie p21<sup>Waf1/CIP1</sup>, zurückzuführen (Mark & Xu, 2009; Zupkovitz *et al.*, 2010). Die genauen molekularen Zusammenhänge bleiben weitgehend ungeklärt und sollten Gegenstand weiterer Studien sein.

### **6.3 Genexpressionsprofil der PSZ in Gegenwart der HDACI**

Nach einem initialen profibrogenen Stimulus wird die anhaltende Sternzellaktivierung wahrscheinlich durch autokrine Regelkreise unterhalten. Die Sternzellen exprimieren z.B. vermehrt TGF- $\beta$ 1, das als Hauptstimulator der EZM-Synthese in den PSZ angesehen wird (Luttenberger *et al.*, 2000; Kruse *et al.*, 2000, Schneider *et al.*, 2001). ET-1, ein weiterer autokriner Mediator, vermittelt die Kontraktion und Migration der PSZ (Klonowski-Stumpe *et al.*, 2003; Masamune *et al.*, 2005).

Auf transkriptioneller Ebene verringern die untersuchten HDACI dosisabhängig die Expression von ET-1 in den Sternzellen. Die Expression von TGF- $\beta$ 1 wird dagegen nur durch VPA in Konzentrationen von 10 mM signifikant gehemmt. NaBu zeigt hinsichtlich des TGF- $\beta$ 1 ein quantitativ ähnliches Bild; der Effekt erreicht jedoch keine statistische Signifikanz.

In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass die Bindung von AP-1 an die DNA mit der Expression von ET-1 und TGF- $\beta$ 1 verknüpft ist (Lee *et al.*, 1991; Matsuda *et al.*, 2006; Dhandapani *et al.*, 2007). Demnach kann der dosisabhängige Rückgang der ET-1-Expression in Gegenwart der HDACI wahrscheinlich auf die verminderte DNA-Bindung von AP-1 zurückgeführt werden. Die Hemmung der Expression von TGF- $\beta$ 1 durch VPA könnte auf einem ähnlichen molekularen Mechanismus beruhen. Unklar bleibt dabei allerdings, warum TSA und NaBu keine signifikante Hemmwirkung auf die TGF- $\beta$ 1 Expression zeigten.

Möglicherweise kann die verbleibende AP-1-Aktivität auch in Gegenwart der HDACI die Expression von TGF- $\beta$ 1 noch aufrechterhalten. Demzufolge hemmt VPA die TGF- $\beta$ 1-Expression womöglich aufgrund von substanzspezifischen Effekten.

Wie andere Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, induzieren Mediatoren wie TGF- $\beta$ 1 und TNF- $\alpha$  in den PSZ die Sekretion von ET-1. Das Endothelin-1 wirkt als positiver Mediator der Sternzellaktivierung sowohl proinflammatorisch als auch profibrotisch. Auf transkriptioneller Ebene induziert ET-1 so beispielsweise neben Interleukinen auch den myofibroblastären Differenzierungsmarker  $\alpha$ -SMA (Jonitz *et al.*, 2009).

Wie bereits beschrieben, konnte in Gegenwart der untersuchten HDACI eine dosisabhängig verminderte Expression von  $\alpha$ -SMA auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden.

Möglicherweise können die verminderten  $\alpha$ -SMA-Transkriptmengen auch auf den dosisabhängigen Rückgang von ET-1 zurückgeführt werden.

Insgesamt legen die erhobenen Daten nahe, dass die Hemmung von autokrinen Regelkreisen wahrscheinlich zu den Wirkprinzipien von HDACI zählt. Daher sollte in weiterführenden Studien der Einfluss der HDACI auf die verschiedenen autokrinen Mediatoren der PSZ näher charakterisiert werden.

#### **6.4 HDACI und Pankreaskarzinom**

Beim Pankreaskarzinom tragen die Progressions-fördernden Interaktionen zwischen aktivierten PSZ und Tumorzellen wahrscheinlich zur schlechten Prognose der Erkrankung bei.

Die PSZ verstärken durch die Synthese des Typ-I-Kollagens den malignen Phänotyp duktaler Adenokarzinomzellen (Armstrong *et al.*, 2004). Die erhöhte Sekretion von MMP-2 durch PSZ steht in Zusammenhang mit einer gesteigerten Tumorprogression und Zellinvasion (Schneiderhan *et al.*, 2007). Andere Bestandteile der EZM, wie z.B. Kollagen, Laminin und das Proteoglykan Dekorin erhöhen die Chemoresistenz der Tumorzellen (Miyamoto *et al.*, 2004; Köninger *et al.*, 2004). In Tiermodellen zum Pankreaskarzinom korrelieren Tumorumfänge und Metastasierungshäufigkeit mit einem steigenden Anteil von PSZ (Hwang *et al.*, 2008). Interessanterweise stellt zudem der *Activated Stroma Index* (ASI), das Verhältnis von  $\alpha$ -SMA zu Kollagen, in der Immunhistochemie von Pankreasresektaten einen unabhängigen prognostischen Marker des dukталen Adenokarzinoms dar (Erkan *et al.*, 2008). Ein hoher Anteil des für die PSZ charakteristischen  $\alpha$ -SMA verkürzt demnach die Überlebenszeit der Karzinompatienten (Erkan *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2010).

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, vermindern HDACI die Anzahl der PSZ und die Ausprägung von wichtigen Charakteristika aktivierter Sternzellen. In Gegenwart der HDACI

könnte sich die verminderte Expression von  $\alpha$ -SMA möglicherweise positiv auf das Überleben von Pankreaskarzinompatienten auswirken.

Wie sich weiterhin zeigte, vermindern HDACI die Kollagensynthesekapazität der Sternzellen und verändern damit auch die zweite Einflussgröße des ASI. Inwieweit der ASI nach Behandlung mit den HDACI noch aussagekräftig ist, sollte daher Gegenstand der weiteren klinischen Evaluation dieses Prognoseparameters sein.

Für potenzielle Therapieansätze mit HDACI ist es erforderlich, die Auswirkungen der HDACI nicht nur auf die PSZ, sondern auch auf die Tumorzellen zu betrachten.

In der Literatur werden bei der Tumorigenese des Pankreaskarzinoms neben somatischen Mutationen auch epigenetische Veränderungen beschrieben. Literaturbefunden zum duktalem Adenokarzinom zufolge korreliert der Mehrstufenprozess der pankreatischen intraepithelialen Neoplasien mit dem Methylierungsstatus der DNA (Sato *et al.*, 2008). Während die DNA-Methylierung die Expression von nachgeschalteten Genen verringert, ermöglicht die Histon-Acetylierung prinzipiell die Genexpression durch Auflockerung des Chromatins. Mit Blick auf inaktivierte Tumorsuppressorgene und aktivierte Proto-Onkogene spielt die Veränderung von epigenetischen Regulationsmechanismen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Genese des Pankreaskarzinoms (Omura & Goggins, 2009).

Interessanterweise zeigen sich Pankreaskarzinomzelllinien sowie das Biopsiematerial humaner Pankreaskarzinome stark positiv für die HDAC1, 2, 3 und 8 (Nakagawa *et al.*, 2007). HDACI wiederum verschieben das dynamische Gleichgewicht zwischen Histonacetylasen (HAT) und HDAC zugunsten einer vermehrten Acetylierung und weisen in einer Vielzahl von Tumoren ein anti-neoplastisches Wirkprofil auf (Huang, 2006).

In Zellkultur-Studien zum Pankreaskarzinom konnten starke antiproliferative sowie ausgeprägte pro-apoptotische Effekte von HDACI nachgewiesen werden (Donadelli *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2004; Garcia-Morales *et al.*, 2005). In Pankreaskarzinomzelllinien verstärken HDACI außerdem synergistisch die Wirkung des Chemotherapeutikums Gemcitabin (Gahr *et al.*, 2007). In jüngster Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass HDAC2-spezifische-siRNA, wie auch der Inhibitor VPA, die Sensibilität von pankreatischen Tumorzelllinien gegenüber anderen Zytostatika und pro-apoptotischen extrinsischen Stimuli (TRAIL) erhöht (Fritsche *et al.*, 2009; Schüler *et al.*, 2010).

Insgesamt sprechen die erhobenen Daten dafür, dass HDACI die Progression des Pankreaskarzinoms über zwei primär unabhängige Mechanismen inhibieren können: (1)

antifibrotische Effekte durch eine Hemmung der Sternzellaktivierung, und (2) eine direkte anti-neoplastische Wirksamkeit durch Effekte auf die Tumorzellen selbst. Darüber hinaus sind HDACI Wirkstoffe, welche potenziell die Effekte von Zytostatika verstärken können. Allerdings mangelt es derzeit noch an aussagekräftigen Daten aus *in vivo*-Studien.

### **6.5 HDACI und chronische Pankreatitis**

Bei der CP führt die fortschreitende Bildung von fibrotischem Gewebe zu morphologischen und funktionellen Veränderungen des Pankreas. Die heutzutage in der Literatur favorisierte *Nekrose-Fibrose-Sequenz* beschreibt die CP als Folge rezidivierender akuter Pankreatitiden (Klöppel & Maillet, 1992; Klöppel & Maillet, 1995). Betrachtet man die Aktivierung der PSZ als Teil der Wundheilung des Pankreas, (Zimmermann *et al.*, 2002) könnten die aktivierten Myofibroblasten nach Beseitigung eines akuten Gewebeschadens durch Apoptose eliminiert werden, und/oder wieder in den Ruhestand zurückkehren (Manapov *et al.*, 2005). Unter den pathologischen Bedingungen der chronischen Entzündung hält die Aktivierung der PSZ fortwährend an. Favorisiert wird diese Hypothese aufgrund von Belegen, nach denen eine dauerhafte Aktivierung der PSZ durch autokrine Regelkreise unterhalten wird (Jaster & Emmrich, 2008).

Wie die Daten dieser Arbeit zeigen, wird in Gegenwart der HDACI die Proliferation der aktivierten Sternzellen gehemmt und zudem in einem geringen Anteil der PSZ die Apoptose induziert. Darüber hinaus werden unter dem Einfluss der HDACI vermehrt PSZ beobachtet, die dem ruhenden Sternzellphänotyp ähneln. Weiterhin zeigte sich auf transkriptioneller Ebene, dass die untersuchten HDACI in den PSZ die Expression des autokrinen Mediators ET-1 hemmen.

ET-1 vermittelt während der Fibrosierung morphologische Veränderungen der PSZ und beeinflusst die Mikrozirkulation im Rahmen der CP. Interessanterweise wurde darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der ET-1-Expression bei der CP und dem Schweregrad der Fibrose nachgewiesen (Kakugawa *et al.*, 1996A+B).

Möglicherweise kann der epigenetische Angriffspunkt der HDACI den autokrinen Regelkreis von ET-1 in den PSZ durchbrechen und dadurch das Ausmaß der Fibrose bei der CP begrenzen.

Die Entzündung des Pankreas, sowie der Aktivierungsprozess der PSZ, wird weiterhin durch die Interleukine IL1 $\beta$  und IL6 sowie den proinflammatorischen Faktor Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) beschleunigt (Mews *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2001). Zahlreiche profibrotische

Mediatoren werden dabei nicht nur von PSZ, sondern auch von geschädigten Azinuszellen, Thrombozyten und von einwandernden Entzündungszellen gebildet (Gukovskaya *et al.*, 1997; Luttenberger *et al.*, 2000; Sparmann *et al.*, 1997; Schmid-Kotsas *et al.*, 1999).

In der Literatur finden sich Belege, nach denen HDACI die Synthese von Zytokinen und die Proliferation von T-Zellen hemmen und darüber hinaus das Überleben der Lymphozyten vermindern (Moreira *et al.*, 2003; Leoni *et al.*, 2005). Bestimmte HDACI, darunter die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren und SAHA, hemmen *in vitro* wie auch *in vivo* die Synthese von Entzündungsmediatoren und können die Krankheitsaktivität von entzündlichen und sogar autoimmunen Erkrankungen verbessern. Da in Gegenwart der HDACI auch proinflammatorische Effekte beobachtet werden, scheinen die HDACI je nach Zelltyp und umgebenden Stimuli eine immunmodulatorische Wirksamkeit zu entfalten (Wiech *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Wie die Daten dieser Arbeit belegen, sind HDACI in kultivierten PSZ antifibrotisch wirksam. Es stellt sich daher die Frage, ob HDACI das Ausmaß des Fibrosierungsgeschehens bei der CP beschränken können. Bisher fehlen entsprechende *in vivo*-Daten an einem Modell der CP. Darüber hinaus könnte in weiterführenden Studien untersucht werden, ob HDACI die anhaltende Immunantwort bei der CP positiv beeinflussen und den Zeitpunkt für den exokrinen bzw. endokrinen Funktionsverlust der Bauchspeicheldrüse hinauszögern.

## **6.6 Ausblick**

Die HDACI sind vielversprechende „Biomodulatoren“, welche durch ihren epigenetischen Angriffspunkt und die Modifikation von Nicht-Histonproteinen die transkriptionelle Regulation von Genen verändern.

Aus den Daten dieser Promotionsarbeit zu den biologischen und molekularen Wirkprinzipien von HDACI in PSZ haben sich verschiedene Ansatzpunkte für weitere Arbeiten ergeben.

Die HDACI sind antifibrotisch wirksam, indem sie das Überleben und die Proliferation aktivierter PSZ einschränken und darüber hinaus die Ausprägung typischer Charakteristika aktivierter Sternzellen hemmen. Die Proliferationshemmung kann dabei wahrscheinlich auf die Hemmung des PDGF-Signals und die verminderte Bindung von AP-1 an die DNA zurückgeführt werden. Die genauen molekularen Hintergründe bleiben im Rahmen dieser Arbeit jedoch weitgehend ungeklärt und sollten Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Dabei sind möglicherweise auch HDACI-Effekte auf Nicht-Histonproteine von besonderem Stellenwert.



Wie die Ergebnisse dieser Arbeit nahelegen, können autokrine Regelkreise, wie z.B. von ET-1, mithilfe der HDACI unterbrochen werden. Möglicherweise könnte die konstitutive Sternzellaktivierung unter pathologischen Bedingungen gezielt durch HDACI beeinflusst werden. Die weitere Charakterisierung von autokrinen Mediatoren unter dem Einfluss von HDACI ist daher wünschenswert.

Die antifibrotische Wirksamkeit der HDACI könnte das Fibrosierungsgeschehen beim Pankreaskarzinom und bei der CP möglicherweise positiv beeinflussen. Nach dem derzeitigen Wissenstand zeichnen sich HDACI nicht nur durch eine antifibrotische Wirkung, sondern auch durch ein immunmodulatorisches und anti-neoplastisches Wirkprofil aus. Möglicherweise können HDACI die Konzentration an proinflammatorischen Mediatoren bei der CP vermindern. HDACI wirken zudem direkt auf maligne Zellen, wobei sie auch die Effekte von Zytostatika verstärken können. Zur Überprüfung dieser *in vitro*-Befunde und Hypothesen sind jedoch *in vivo*-Studien an geeigneten Tiermodellen erforderlich.

Infolge des vielversprechenden Wirkprofils von HDACI stellt sich die Frage nach der klinischen Anwendbarkeit der untersuchten Inhibitoren.

TSA wurde ursprünglich als Antimykotikum entwickelt, ist jedoch derzeit aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit und dem ausgeprägten Toxizitätsprofil nicht mehr als Arzneimittel zugelassen. Aktuelle experimentelle Studien zum Pankreaskarzinom belegen das ausgeprägt anti-neoplastische Wirkpotenzial der Substanz, welche zur stark wirksamen Gruppe der Hydroxamat-Inhibitoren gehört. Möglicherweise können andere nebenwirkungsarme Hydroxaminsäuren, wie SAHA, die bisherige Therapie des Pankreaskarzinoms in Zukunft erfolgreich ergänzen.

Die klinische Anwendung von NaBu wird durch eine kurze Serum-Halbwertszeit und eine insgesamt ungünstige Pharmakokinetik limitiert. Das Butyrat-Prodrug Tributyrin stellt jedoch ersten tierexperimentellen Studien zufolge ein vielversprechendes Arzneimittel in der Chemoprävention von Tumoren dar (Kuroiwa-Trzmielina *et al.*, 2008).

VPA wird bisher unter anderem als Antikonvulsivum eingesetzt und eignet sich aufgrund des gut charakterisierten Nebenwirkungsspektrums und der langjährigen klinischen Erfahrungen für die mittel- bis langfristige Therapie von Erkrankungen. Da VPA in Tumorgeweben zudem relevante Wirkkonzentrationen erreicht (Chavez-Blanco *et al.*, 2005; Münster *et al.*, 2007), könnte mit diesem HDACI potenziell ein neuer therapeutischer Ansatz in der Behandlung des Pankreaskarzinoms ausgearbeitet werden.

Neben den untersuchten HDACI stehen zunehmend mehr oder weniger spezifische Inhibitoren zur Verfügung, von denen bereits viele in pharmakologischen Zulassungsverfahren evaluiert worden sind. Wie HDAC-siRNA-Studien verschiedener Arbeitsgruppen nahelegen, könnte durch Entwicklung von Isoenzym-spezifischen HDACI möglicherweise gezielt die Zytostatika-Empfindlichkeit von Tumorzellen erhöht werden.

Die präklinische Evaluation von HDACI sollte sorgfältig und kritisch fortgesetzt werden, um mehr belastbare Daten zur Eignung dieser Substanzen in der Behandlung des Pankreaskarzinoms zu erheben.

## 7 Zusammenfassung

Die Organfibrose der Bauchspeicheldrüse stellt ein gemeinsames Charakteristikum des Pankreaskarzinoms und der chronischen Pankreatitis (CP) dar. Als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix (EZM) spielen die pankreatischen Sternzellen (PSZ) eine wesentliche Rolle bei der Fibrogenese des Pankreas. Die PSZ liegen in der gesunden Bauchspeicheldrüse in einem ruhenden Phänotyp vor. Unter dem Einfluss profibrogener Mediatoren oder bei Schädigung des Organs differenzieren aktivierte PSZ zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen. Der aktivierte Sternzell-Phänotyp wird durch vermehrte Proliferation, die Expression von  $\alpha$ -smooth-muscle-actin ( $\alpha$ -SMA) und die verstärkte Kollagensynthese charakterisiert. Unter pathologischen Bedingungen sezernieren PSZ vermehrt Zytokine, welche die konstitutive Sternzellaktivierung wahrscheinlich auf Grundlage von autokrinen Regelkreisen unterhalten. Infolge der zunehmenden Fibrosierung kommt es zum Verlust der exokrinen und endokrinen Organfunktion des Pankreas. Beim Pankreaskarzinom steht das Fibrosierungsgeschehen außerdem im Zusammenhang mit der Progression der Erkrankung.

Bisher gibt es keine effektive Therapiemöglichkeit, um die Entwicklung der Pankreasfibrose bei den genannten Erkrankungen aufzuhalten.

Die Aktivierung der PSZ ähnelt den Zellveränderungen von *hepatischen* Sternzellen in fibrotisch umgewandeltem Lebergewebe; dies könnte in beiden Organen auf ähnliche Mechanismen bei der Fibrogenese hindeuten. Interessanterweise belegen Studien an Modellen der Leber- und Lungenfibrose eine antifibrotische Wirksamkeit von sogenannten Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI). HDACI beeinflussen ein wichtiges Schlüsselprinzip der epigenetischen Regulation von Genen. In Gegenwart der HDACI wird das dynamische Gleichgewicht zwischen Histonacetylasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) zugunsten der vermehrten Acetylierung von Histonen verschoben. Infolge der Histon-Acetylierung wird die Chromatin-Struktur aufgelockert und die Expression ganzer Cluster von Genen verändert.

Bis zum Abschluss dieser Promotionsarbeit gab es keine Analysen, ob die epigenetische Modifikation des Chromatins die Aktivierung der PSZ beeinflusst. In dieser Arbeit sollten biologische und molekulare Wirkprinzipien von HDACI in aktivierten PSZ charakterisiert werden. Die Sternzellaktivierung erfolgte durch Kultivierung der Zellen *in vitro*.

Als Vertreter aus der Stoffgruppe der HDACI wurden Trichostatin A (TSA), Natriumbutyrat (NaBu), und Valproinsäure (VPA) verwendet. Während die Hydroxaminsäure TSA bereits in *nanomolaren* bzw. *mikromolaren* Konzentrationen wirksam ist, hemmen die kurzkettigen

Fettsäuren NaBu und VPA die HDAC im *millimolaren* Konzentrationsbereich. Das Ausmaß der Histon-Acetylierung konnte mithilfe von Western-Blot-Analysen quantifiziert werden. Weiterhin erfolgten BrdU-Proliferationsassays mit primären und immortalisierten PSZ. Nach Trypanblau-Färbung wurden lebende und tote PSZ unter dem Mikroskop gezählt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde in der Durchflusszytometrie mithilfe der SubG1-Peak-Analyse bestimmt. Die Kollagensyntheserate der PSZ konnte durch [<sup>3</sup>H]-Prolineinbau in saure Essigsäure-lösliche Proteine quantifiziert werden. Im Weiteren wurde die  $\alpha$ -SMA-Expression in Western-Blot-Analysen und durch semiquantitative Auswertung von Immunfluoreszenz-Analysen näher charakterisiert. Um die Signaltransduktion in Gegenwart der HDACI nach Stimulation mit dem *platelet-derived growth factor* (PDGF) zu untersuchen, erfolgten Western-Blot-Analysen zur quantitativen Bestimmung der Phosphorylierung von *extracellular signal-related kinases* (Phospho-ERK 1/2). Die Bindung des Transkriptionsfaktors *activator protein-1* (AP-1) an die DNA der PSZ wurde in Gelshift-Assays charakterisiert. Die Analyse des Genexpressionsprofils erfolgte mithilfe der *Real-time* PCR für  $\alpha$ -SMA, *Endothelin-1* (ET-1) und den *transforming growth factor*- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, vermindern HDACI die Proliferation und in geringerem Maße das Überleben von aktivierten PSZ. Des Weiteren hemmen HDACI die Kollagensyntheserate der Sternzellen und die Expression des myofibroblastären Differenzierungsmarkers  $\alpha$ -SMA. Dabei wird die Anordnung des  $\alpha$ -SMA in Form von Sternzell-typischen *stress fibern* unterdrückt. Nach PDGF-Stimulation zeigte sich, dass TSA und NaBu die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung von ERK 1/2 vermindern. Des Weiteren hemmen die untersuchten HDACI dosisabhängig die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1, der eine zentrale Stellung in der Transduktion des mitogenen PDGF-Signals einnimmt. Die Genexpressions-Analyse ergab, dass HDACI die Transkriptmengen von  $\alpha$ -SMA und ET-1 dosisabhängig reduzieren. Die Expression des TGF- $\beta$ 1, welcher wie ET-1 zu den wichtigen autokrinen Mediatoren der PSZ zählt, wird dagegen nur bei VPA in der höchsten Konzentration signifikant gehemmt.

Zusammen legen die erhobenen Ergebnisse nahe, dass HDACI die PDGF-stimulierte Signaltransduktion inhibieren und wahrscheinlich dadurch das Wachstum der Zellen vermindern. Wie die Daten zu ET-1 und TGF- $\beta$ 1 zeigen, beeinflussen HDACI auch die autokrine Regulation der Sternzellen. HDACI reduzieren die ET-1-Expression und durchbrechen so wahrscheinlich einen wichtigen autokrinen Regelkreis in aktivierten PSZ. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit für eine antifibrotische Wirkung

von HDACI im Sinne einer Hemmung von Schlüsselfunktionen aktivierter PSZ. Dabei ist die relative antifibrotische Wirksamkeit von TSA höher als bei NaBu oder VPA. Eine starke Wirksamkeit von HDACI kann, wie bei TSA, wahrscheinlich auf eine breite Hemmung von HDAC-Isoenzymen zurückgeführt werden.

Die erhobenen Daten stehen in Einklang mit den antifibrotischen Effekten von HDACI in den Zellkulturstudien zur Leber- und Lungenfibrose sowie aktuellen tierexperimentellen Studien an weiteren Fibrose-Modellen. Zudem weisen HDACI ein immunmodulatorisches und anti-neoplastisches Wirkprofil auf. In vielen Studien wirken HDACI selektiv gegen maligne Zellen; beeinflussen dagegen weniger die vitalen Funktionen gutartiger Zellentitäten.

Gerade im Hinblick auf die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms besteht die Notwendigkeit, neuartige Therapieansätze zu entwickeln und zu etablieren. HDACI können die Progression des Pankreaskarzinoms möglicherweise über zwei primär unabhängige Mechanismen inhibieren: den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge, (1) über antifibrotische Effekte durch Hemmung der Sternzellaktivierung und (2) über eine direkte anti-neoplastische Wirksamkeit auf Tumorzellen, wie in der Literatur beschrieben. Weiterhin sind HDACI potenzielle Wirkstoffe, welche die Effekte von Zytostatika verstärken können. Die genannten Hypothesen sollten mithilfe von geeigneten Tiermodellen überprüft werden, da aussagekräftige *in vivo*-Daten bisher noch fehlen.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Adcock IM. HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents. *Br J Pharmacol.* **2007** Apr;150(7):829-831.
- 2 Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs H, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I. [S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007]. *Z Gastroenterol.* **2007** Juni;45(6):487-523.
- 3 Ahlgren JD. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer [abstract]. *Semin Oncol.* **1996** Apr;23(2):241-250.
- 4 Aikawa T, Gunn J, Spong SM, Klaus SJ, Korc M. Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth, metastasis, and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* **2006** Mai;5(5):1108-1116.
- 5 Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* **2001** Nov;11(11):S44-51.
- 6 Allan J, Harborne N, Rau DC, Gould H. Participation of core histone "tails" in the stabilization of the chromatin solenoid. *J Cell Biol.* **1982** Mai;93(2):285-297.
- 7 Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes [abstract]. *Cell.* **1988** Mai;53(4):549-554.
- 8 Ammann RW, Muellhaupt B. Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. *Gut.* **1994** Apr;35(4):552-556.
- 9 Ammann RW, Muellhaupt B, Meyenberger C, Heitz PU. Alcoholic nonprogressive chronic pancreatitis: prospective long-term study of a large cohort with alcoholic acute pancreatitis (1976-1992). *Pancreas.* **1994** Mai;9(3):365-373.
- 10 Ammann RW, Heitz PU, Klöppel G. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study. *Gastroenterology.* **1996** Juli;111(1):224-231.
- 11 Anderson KE, Sinha R, Kulldorff M, Gross M, Lang NP, Barber C, Harnack L, DiMagno E, Bliss R, Kadlubar FF. Meat intake and cooking techniques: associations with pancreatic cancer. *Mutat Res.* **2002** Sep;506-507:225-231.
- 12 Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Shinozaki S, Kita H, Osawa H, Yamamoto H, Sato K, Tamada K, Sugano K. Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to proinflammatory cytokines. *Am J Physiol, Cell Physiol.* **2007** Jan;292(1):C259-268.
- 13 Apte MV, Wilson JS. Stellate cell activation in alcoholic pancreatitis. *Pancreas.* **2003** Nov;27(4):316-320.
- 14 Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.* **1998** Juli;43(1):128-133.

- 15 Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*. **1999** Apr;44(4):534-541.
- 16 Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Naidoo D, Wilson JS. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*. **2000** Apr;118(4):780-794.
- 17 Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*. **2004** Okt;29(3):179-187.
- 18 Arlt A, Vorndamm J, Mürköster S, Yu H, Schmidt WE, Fölsch UR, Schäfer H. Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res*. **2002** Feb;62(3):910-916.
- 19 Armstrong T, Packham G, Murphy LB, Bateman AC, Conti JA, Fine DR, Johnson CD, Benyon RC, Iredale JP. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. **2004** Nov;10(21):7427-7437.
- 20 Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*. **1998** Aug;115(2):421-432.
- 21 Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*. **2005** Apr;128(4):907-921.
- 22 Baghurst PA, McMichael AJ, Slavotinek AH, Baghurst KI, Boyle P, Walker AM. A case-control study of diet and cancer of the pancreas. *Am J Epidemiol*. **1991** Juli;134(2):167-179.
- 23 Bansal P, Sonnenberg A. Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology* [abstract]. **1995** Juli;109(1):247-251.
- 24 Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*. **2002** Dez;2(12):897-909.
- 25 Barratt MJ, Hazzalin CA, Cano E, Mahadevan LC. Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1994** Mai;91(11):4781-4785.
- 26 Bártová E, Pacherník J, Harnicarová A, Kovarík A, Kovaríková M, Hofmanová J, Skalníková M, Kozubek M, Kozubek S. Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci*. **2005** Nov;118(Pt 21):5035-5046.
- 27 Baumert J, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Inhibitory effects of interferons on pancreatic stellate cell activation. *World J Gastroenterol*. **2006** Feb;12(6):896-901.
- 28 Becker D, Geissler U, Hempel U, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, Wenzel K. Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J Biomed Mater Res*. **2002** März;59(3):516-527.

- 29 Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* **2009** Apr;23(7):781-783.
- 30 Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol.* **2002** Aug;20(15):3270-3275.
- 31 Blackwell L, Norris J, Suto CM, Janzen WP. The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of the histone deacetylases. *Life Sci.* **2008** Mai;82(21-22):1050-1058.
- 32 Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem.* **1978** Mai;253(10):3364-3366.
- 33 Bogoevski D, Strate T, Yekebas EF, Izbicki JR. Pancreatic cancer: a generalized disease--prognostic impact of cancer cell dissemination. *Langenbecks Arch Surg.* **2008** Nov;393(6):911-917.
- 34 Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* **2006** Sep;5(9):769-784.
- 35 Braganza JM. The pathogenesis of chronic pancreatitis. *QJM* **1996** Apr;89(4):243-250.
- 36 Brock P, Sparmann G, Ritter T, Jaster R, Liebe S, Emmrich J. Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 into pancreatic stellate cells promotes interleukin-10 expression. *J. Cell. Mol. Med* **2006** Dez;10(4):884-895.
- 37 Büchler P, Reber HA, Ullrich A, Shiroiki M, Roth M, Büchler MW, Lavey RS, Friess H, Hines OJ. Pancreatic cancer growth is inhibited by blockade of VEGF-RII [abstract]. *Surgery.* **2003** Nov;134(5):772-782.
- 38 Bueno de Mesquita HB, Maisonneuve P, Runia S, Moerman CJ. Intake of foods and nutrients and cancer of the exocrine pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands [abstract]. *Int J Cancer.* **1991** Juni;48(4):540-549.
- 39 Burgess A, Ruefli A, Beamish H, Warrenner R, Saunders N, Johnstone R, Gabrielli B. Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene.* **2004** Sep;23(40):6693-6701.
- 40 Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* **1997** Juni;15(6):2403-2413.
- 41 Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* **2003** Apr;348(17):1625-1638.
- 42 Catania A, Iavarone C, Carlomagno SM, Chiariello M. Selective transcription and cellular proliferation induced by PDGF require histone deacetylase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **2006** Mai;343(2):544-554.



- 43 Chavez-Blanco A, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Cetina L, Candelaria M, Cantu D, Gonzalez-Fierro A, Garcia-Lopez P, Zambrano P, Perez-Plasencia C, Cabrera G, Trejo-Becerril C, Angeles E, Duenas-Gonzalez A. Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study. *Mol Cancer*. **2005**;4(1):22.
- 44 Chen ZX, Breitman TR. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. *Cancer Res*. **1994** Juli;54(13):3494-3499.
- 45 Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature*. **2001** März;410(6824):94-97.
- 46 Clark IM, Swingler TE, Young DA. Acetylation in the regulation of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression. *Front Biosci*. **2007**;12:528-535.
- 47 Corsini MM, Miller RC, Haddock MG, Donohue JH, Farnell MB, Nagorney DM, Jatoi A, McWilliams RR, Kim GP, Bhatia S, Iott MJ, Gunderson LL. Adjuvant radiotherapy and chemotherapy for pancreatic carcinoma: the Mayo Clinic experience (1975-2005). *J Clin Oncol*. **2008** Juli;26(21):3511-3516.
- 48 Dani R, Mott CB, Guarita DR, Nogueira CE. Epidemiology and etiology of chronic pancreatitis in Brazil: a tale of two cities. *Pancreas*. **1990** Juli;5(4):474-478.
- 49 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry [abstract]. *Cytometry*. **1992**;13(8):795-808.
- 50 Day JD, Diguseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, Kern SE, Hruban RH. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol*. **1996** Feb;27(2):119-124.
- 51 de Las Heras-Castaño G, García-Unzueta MT, Domínguez-Diez A, Fernández-González MD, García-de la Paz AM, Mayorga-Fernández M, Fernández-Fernández F. Pancreatic fibrosis in rats and its response to antioxidant treatment. *JOP*. **2005** Juli;6(4):316-324.
- 52 Demols A, Van Laethem J, Quertinmont E, Degraef C, Delhay M, Geerts A, Deviere J. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **2002** Juni;282(6):G1105-1112.
- 53 Dhandapani KM, Khan MM, Wade FM, Wakade C, Mahesh VB, Brann DW. Induction of transforming growth factor-beta1 by basic fibroblast growth factor in rat C6 glioma cells and astrocytes is mediated by MEK/ERK signaling and AP-1 activation. *J Neurosci Res*. **2007** Apr;85(5):1033-1045.
- 54 di Mola FF, Friess H, Martignoni ME, Di Sebastiano P, Zimmermann A, Innocenti P, Graber H, Gold LI, Korc M, Büchler MW. Connective tissue growth factor is a regulator for fibrosis in human chronic pancreatitis. *Ann Surg*. **1999** Juli;230(1):63-71.
- 55 di Mola FF, Friess H, Riesle E, Koliopanos A, Büchler P, Zhu Z, Brigstock DR, Korc M, Büchler MW. Connective tissue growth factor is involved in pancreatic repair and tissue remodeling in human and rat acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg*. **2002** Jan;235(1):60-67.

- 56 di Mola FF, Di Sebastiano P, Gardini A, Hartel M, Büchler MW, Friess H, Innocenti P. [Expression of connective tissue growth factor (CTGF) in pancreatic cancer] [abstract]. *Tumori*. **2003** Aug;89(4 Suppl):58-59.
- 57 Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ*. **1994** Okt;309(6959):901-911.
- 58 Donadelli M, Costanzo C, Faggioli L, Scupoli MT, Moore PS, Bassi C, Scarpa A, Palmieri M. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells. *Mol Carcinog*. **2003** Okt;38(2):59-69.
- 59 Dornhöfer N, Spong S, Bennewith K, Salim A, Klaus S, Kambham N, Wong C, Kaper F, Sutphin P, Nacamuli R, Nacalumi R, Höckel M, Le Q, Longaker M, Yang G, Koong A, Giaccia A. Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. **2006** Juni;66(11):5816-5827.
- 60 Ectors N, Maillet B, Aerts R, Geboes K, Donner A, Borchard F, Lankisch P, Stolte M, Lüttges J, Kremer B, Klöppel G. Non-alcoholic duct destructive chronic pancreatitis. *Gut*. **1997** Aug;41(2):263-268.
- 61 Ehrental D, Haeger L, Griffin T, Compton C. Familial pancreatic adenocarcinoma in three generations. A case report and a review of the literature [abstract]. *Cancer*. **1987** Mai;59(9):1661-1664.
- 62 Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, Wagner M, Wilda M, Friess H, Büchler M, Adler G, Gress TM. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*. **2000** Jan;85(1):14-20.
- 63 Emori Y, Mizushima T, Matsumura N, Ochi K, Tanioka H, Shirahige A, Ichimura M, Shinji T, Koide N, Tanimoto M. Camostat, an oral trypsin inhibitor, reduces pancreatic fibrosis induced by repeated administration of a superoxide dismutase inhibitor in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. **2005** Juni;20(6):895-899.
- 64 Erkan M, Michalski CW, Rieder S, Reiser-Erkan C, Abiatari I, Kolb A, Giese NA, Esposito I, Friess H, Kleeff J. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. **2008** Okt;6(10):1155-1161.
- 65 Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis [abstract]. *JAMA*. **1995** Mai;273(20):1605-1609.
- 66 Fitzner B, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Involvement of AP-1 proteins in pancreatic stellate cell activation in vitro. *Int J Colorectal Dis*. **2004** Sep;19(5):414-420.
- 67 Fitzner B, Brock P, Nechutova H, Glass A, Karopka T, Koczan D, Thiesen H, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Inhibitory effects of interferon-gamma on activation of rat pancreatic stellate cells are mediated by STAT1 and involve down-regulation of CTGF expression. *Cell Signal*. **2007** Apr;19(4):782-790.
- 68 Fitzner B, Brock P, Holzhüter S, Nizze H, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Synergistic growth inhibitory effects of the dual endothelin-1 receptor antagonist bosentan on pancreatic stellate and cancer cells. *Dig Dis Sci*. **2009** Feb;54(2):309-320.
- 69 Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev*. **1990** Nov;9(3):171-174.

- 70 Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* **2005** Apr;37(4):391-400.
- 71 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies [abstract]. *N Engl J Med.* **1993** Juni;328(25):1828-1835.
- 72 Fritsche P, Seidler B, Schüler S, Schnieke A, Göttlicher M, Schmid RM, Saur D, Schneider G. HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut.* **2009** Okt;58(10):1399-1409.
- 73 Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* **2000** Juli;273(2):793-798.
- 74 Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Cui L, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M. alpha-Smooth Muscle Actin Expressing Stroma Promotes an Aggressive Tumor Biology in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma [Internet] [abstract]. *Pancreas.* **2010** Mai;[zitiert 2010 Aug 10 ]
- 75 Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev.* **2005** Okt;15(5):490-495.
- 76 Gahr S, Ocker M, Ganslmayer M, Zopf S, Okamoto K, Hartl A, Leitner S, Hahn EG, Herold C. The combination of the histone-deacetylase inhibitor trichostatin A and gemcitabine induces inhibition of proliferation and increased apoptosis in pancreatic carcinoma cells. *Int J Oncol.* **2007** Sep;31(3):567-576.
- 77 Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem.* **2002** Juli;277(28):25748-25755.
- 78 Gao R, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor. *Gastroenterology.* **2005** Sep;129(3):1019-1030.
- 79 Gao R, Brigstock DR. A novel integrin alpha5beta1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells. *Gut.* **2006** Juni;55(6):856-862.
- 80 Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu K, Colangelo L, Dyer A. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *JAMA.* **2000** Mai;283(19):2552-2558.
- 81 Garcea G, Dennison AR, Pattenden CJ, Neal CP, Sutton CD, Berry DP. Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *JOP.* **2008**;9(2):99-132.
- 82 García-Morales P, Gómez-Martínez A, Carrato A, Martínez-Lacaci I, Barberá VM, Soto JL, Carrasco-García E, Menéndez-Gutierrez MP, Castro-Galache MD, Ferragut JA, Saceda M. Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther.* **2005** Aug;4(8):1222-1230.
- 83 Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Sowter HM, Delhanty JD, Ponder BA, Kouzarides T, Caldas C. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet.* **2000** März;24(3):300-303.

- 84 Ghadirian P, Thouez JP, PetitClerc C. International comparisons of nutrition and mortality from pancreatic cancer [abstract]. *Cancer Detect Prev.* **1991**;15(5):357-362.
- 85 Gibbons RJ. Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Hum Mol Genet.* **2005** Apr;14 Spec No 1:R85-92.
- 86 Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther.* **2003** Feb;2(2):151-163.
- 87 Glenisson W, Castronovo V, Waltregny D. Histone deacetylase 4 is required for TGFbeta1-induced myofibroblastic differentiation. *Biochim Biophys Acta.* **2007** Okt;1773(10):1572-1582.
- 88 Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* **2005** Dez;363:15-23.
- 89 Goebell H. The role of calcium in pancreatic secretion and disease. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* [abstract]. **1976** Apr;23(2):151-161.
- 90 Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **2001** Dez;20(24):6969-6978.
- 91 Gress TM, Müller-Pillasch F, Lerch MM, Friess H, Büchler M, Adler G. Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer [abstract]. *Int J Cancer.* **1995** Aug;62(4):407-413.
- 92 Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis--a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion.* **1995**;56(5):335-346.
- 93 Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest.* **1997** Okt;100(7):1853-1862.
- 94 Guo W, Shan B, Klingsberg RC, Qin X, Lasky JA. Abrogation of TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2009** Nov;297(5):L864-870.
- 95 Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol.* **1999** Okt;155(4):1087-1095.
- 96 Hahn SA, Schmiegel WH. Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. *Digestion.* **1998** Aug;59(5):493-501.
- 97a Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science.* **1996** Jan;271(5247):350-353.
- 98b Hahn SA, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Schutte M, Rozenblum E, Seymour AB, Weinstein CL, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **1996** Feb;56(3):490-494.

- 99 Hartel M, Di Mola FF, Gardini A, Zimmermann A, Di Sebastiano P, Guweidhi A, Innocenti P, Giese T, Giese N, Büchler MW, Friess H. Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World J Surg*. **2004** Aug;28(8):818-825.
- 100 Hassig CA, Schreiber SL. Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol*. **1997** Okt;1(3):300-308.
- 101 Heinemann V, Philip PA, Pelzer U. Accomplishments in 2008 in the treatment of metastatic pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer Res*. **2009** Sep;3(5 Supplement 2):S43-47.
- 102 Hemmatazad H, Rodrigues HM, Maurer B, Brentano F, Pileckyte M, Distler JHW, Gay RE, Michel BA, Gay S, Huber LC, Distler O, Jüngel A. Histone deacetylase 7, a potential target for the antifibrotic treatment of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. **2009** Mai;60(5):1519-1529.
- 103 Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*. **2001** Mai;25(5):579-586.
- 104 Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJA, Shimizu M, Yonezawa S. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*. **2004** Aug;28(8):977-987.
- 105 Huang L. Targeting histone deacetylases for the treatment of cancer and inflammatory diseases. *J Cell Physiol*. **2006** Dez;209(3):611-616.
- 106 Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res*. **2008** Feb;68(3):918-926.
- 107 Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, Altucci L, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med*. **2005** Jan;11(1):71-76.
- 108 Ischenko I, Seeliger H, Kleespies A, Angele MK, Eichhorn ME, Jauch K, Bruns CJ. Pancreatic cancer stem cells: new understanding of tumorigenesis, clinical implications. *Langenbecks Arch Surg*. **2010** Jan;395(1):1-10.
- 109 Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*. **2000** Sep;20(18):6891-6903.
- 110 Iyer A, Fenning A, Lim J, Le GT, Reid RC, Halili MA, Fairlie DP, Brown L. Antifibrotic activity of an inhibitor of histone deacetylases in DOCA-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. **2010** Apr;159(7):1408-1417.
- 111 Jaster R, Emmrich J. Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. **2008**;22(1):17-29.
- 112 Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut*. **2002** Okt;51(4):579-584.

- 113 Jaster R, Hilgendorf I, Fitzner B, Brock P, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-trans retinoic acid. *Biochem Pharmacol.* **2003** Aug;66(4):633-641.
- 114 Jaster R, Lichte P, Fitzner B, Brock P, Glass A, Karopka T, Gierl L, Koczan D, Thiesen H, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med.* **2005** Sep;9(3):670-682.
- 115 Jonitz A, Fitzner B, Jaster R. Molecular determinants of the profibrogenic effects of endothelin-1 in pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* **2009** Sep;15(33):4143-4149.
- 116a Kakugawa Y, Giaid A, Yanagisawa M, Baynash AG, Melnyk P, Rosenberg L, Duguid WP. Expression of endothelin-1 in pancreatic tissue of patients with chronic pancreatitis. *J Pathol.* **1996** Jan;178(1):78-83.
- 117b Kakugawa Y, Paraskevas S, Metrakos P, Giaid A, Qi SJ, Duguid WP, Rosenberg L. Alterations in pancreatic microcirculation and expression of endothelin-1 in a model of chronic pancreatitis. *Pancreas.* **1996** Juli;13(1):89-95.
- 118 Karger A, Fitzner B, Brock P, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells. *Cell Signal.* **2008** Okt;20(10):1865-1872.
- 119 Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* **1989** Sep;245(4922):1073-1080.
- 120 Khan AU, Krishnamurthy S. Histone modifications as key regulators of transcription. *Front Biosci.* **2005** Jan;10:866-872.
- 121 Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J.* **2008** Jan;409(2):581-589.
- 122 Kim JH, Ho SB, Montgomery CK, Kim YS. Cell lineage markers in human pancreatic cancer [abstract]. *Cancer.* **1990** Nov;66(10):2134-2143.
- 123 Kim J, Shukla SD. Histone h3 modifications in rat hepatic stellate cells by ethanol. *Alcohol Alcohol.* **2005** Okt;40(5):367-372.
- 124 Kinugasa F, Noto T, Matsuoka H, Urano Y, Sudo Y, Takakura S, Mutoh S. Prevention of renal interstitial fibrosis via histone deacetylase inhibition in rats with unilateral ureteral obstruction. *Transpl. Immunol.* **2010** Mai;23(1-2):18-23.
- 125 Klonowski-Stumpe H, Fischer R, Reinehr R, Lüthen R, Häussinger D. Apoptosis in activated rat pancreatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **2002** Sep;283(3):G819-826.
- 126 Klonowski-Stumpe H, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Lüthen R, Häussinger D. Production and effects of endothelin-1 in rat pancreatic stellate cells. *Pancreas.* **2003** Juli;27(1):67-74.
- 127 Klöppel G. Progression from acute to chronic pancreatitis. A pathologist's view. *Surg. Clin North Am.* **1999** Aug;79(4):801-814.

- 128 Klöppel G, Lüttges J. The pathology of ductal-type pancreatic carcinomas and pancreatic intraepithelial neoplasia: insights for clinicians. *Curr Gastroenterol Rep.* **2004** Apr;6(2):111-118.
- 129 Klöppel G, Maillet B. Pseudocysts in chronic pancreatitis: a morphological analysis of 57 resection specimens and 9 autopsy pancreata. *Pancreas.* **1991** Mai;6(3):266-274.
- 130 Klöppel G, Maillet B. The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* **1992**;420(1):1-4.
- 131 Klöppel G, Maillet B. [Development of chronic pancreatitis from acute pancreatitis: a pathogenetic concept] [abstract]. *Zentralbl Chir.* **1995**;120(4):274-277.
- 132 Klöppel G, Sipos B, Lüttges J. [Spectrum of chronic pancreatitis. On the way to etiological classification]. *Pathologe.* **2005** Feb;26(1):59-66.
- 133 Köninger J, Giese NA, di Mola FF, Berberat P, Giese T, Esposito I, Bachem MG, Büchler MW, Friess H. Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action. *Clin Cancer Res.* **2004** Juli;10(14):4776-4783.
- 134 Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus. *Biol Chem.* **2009** Okt;390(10):1003-1012.
- 135 Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Göttlicher M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.* **2003** Juli;22(13):3411-3420.
- 136 Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Fölsch UR, Schmidt WE. TGFbeta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul Pept.* **2000** Juni;90(1-3):47-52.
- 137 Kuniyasu H, Abbruzzese JL, Cleary KR, Fidler IJ. Induction of ductal and stromal hyperplasia by basic fibroblast growth factor produced by human pancreatic carcinoma [abstract]. *Int J Oncol.* **2001** Okt;19(4):681-685.
- 138 Kuno A, Yamada T, Masuda K, Ogawa K, Sogawa M, Nakamura S, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Shirai T, Itoh M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Gastroenterology.* **2003** Apr;124(4):1010-1019.
- 139 Kuroiwa-Trzmielina J, de Conti A, Scolastici C, Pereira D, Horst MA, Purgatto E, Ong TP, Moreno FS. Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Int J Cancer.* **2009** Juni;124(11):2520-2527.
- 140 Layer P, Yamamoto H, Kalthoff L, Clain JE, Bakken LJ, DiMagno EP. The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology.* **1994** Nov;107(5):1481-1487.
- 141 Lee ME, Dhadly MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T. Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J Biol Chem.* **1991** Okt;266(28):19034-19039.

- 142 Leoni F, Fossati G, Lewis EC, Lee J, Porro G, Pagani P, Modena D, Moras ML, Pozzi P, Reznikov LL, Siegmund B, Fantuzzi G, Dinarello CA, Mascagni P. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of proinflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med.* **2005** Dez;11(1-12):1-15.
- 143 Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* **2007** Feb;67(3):1030-1037.
- 144a Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, Kurosawa M. A prospective cohort study of cigarette smoking and pancreatic cancer in Japan. *Cancer Causes Control.* **2002** Apr;13(3):249-254.
- 145b Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, Kurosawa M, Ohno Y. Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffee consumption and medical history: findings from the Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk. *Int J Cancer.* **2002** Juni;99(5):742-746.
- 146 Lin H, Hu C, Chan H, Liew Y, Huang H, Lepescheux L, Bastianelli E, Baron R, Rawadi G, Clément-Lacroix P. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol.* **2007** Apr;150(7):862-872.
- 147 Löhr M, Trautmann B, Göttler M, Peters S, Zauner I, Maillet B, Klöppel G. Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins. *Br J Cancer.* **1994** Jan;69(1):144-151.
- 148 Löhr M, Schmidt C, Ringel J, Kluth M, Müller P, Nizze H, Jesnowski R. Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* **2001** Jan;61(2):550-555.
- 149 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, DiMagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med.* **1993** Mai;328(20):1433-1437.
- 150 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, DiMagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L, Di Francesco V. Prognosis of chronic pancreatitis: an international multicenter study. International Pancreatitis Study Group [abstract]. *Am J Gastroenterol.* **1994** Sep;89(9):1467-1471.
- 151 Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK, Perrault J, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst.* **1997** März;89(6):442-446.
- 152 Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, Grünert A, Bachem MG. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest.* **2000** Jan;80(1):47-55.
- 153 Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review [abstract]. *Gastroenterology.* **1993** Mai;104(5):1535-1549.
- 154 Lynch HT, Fusaro RM. Pancreatic cancer and the familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome. *Pancreas.* **1991** März;6(2):127-131.



- 155 Mack TM, Yu MC, Hanisch R, Henderson BE. Pancreas cancer and smoking, beverage consumption, and past medical history [abstract]. *J Natl Cancer Inst.* **1986** Jan;76(1):49-60.
- 156 Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Lévy P, Ruzzniewski P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut.* **2002** Dez;51(6):849-852.
- 157 Manapov F, Muller P, Rychly J. Translocation of p21(Cip1/WAF1) from the nucleus to the cytoplasm correlates with pancreatic myofibroblast to fibroblast cell conversion. *Gut.* **2005** Juni;54(6):814-822.
- 158 Mancuso A, Calabrò F, Sternberg CN. Current therapies and advances in the treatment of pancreatic cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2006** Juni;58(3):231-241.
- 159 Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res.* **2000** Aug;60(16):4561-4572.
- 160 Marks PA, Xu W. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem.* **2009** Juli;107(4):600-608.
- 161a Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma block activation of pancreatic stellate cells. *J Biol Chem.* **2002** Jan;277(1):141-147.
- 162b Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh A, Shimosegawa T. Alcohol activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002** Juli;302(1):36-42.
- 163a Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase blocks activation of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003** Jan;304(1):8-14.
- 164b Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh K, Shimosegawa T. Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells. *Br J Pharmacol.* **2003** Dez;140(7):1292-1302.
- 165 Masamune A, Kikuta K, Suzuki N, Satoh M, Satoh K, Shimosegawa T. A c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor SP600125 (anthra[1,9-cd]pyrazole-6 (2H)-one) blocks activation of pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **2004** Aug;310(2):520-527.
- 166 Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Endothelin-1 stimulates contraction and migration of rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* **2005** Okt;11(39):6144-6151.
- 167 Mato E, Lucas M, Petriz J, Gomis R, Novials A. Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *Biochem J.* **2009** Juli;421(2):181-191.
- 168 Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, Tahira Y, Ayame H, Zhang W, Bando T, Sugiyama H, Saito S, Matsumoto K, Mugishima H, Serie K. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting the TGF-beta1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol.* **2006** Feb;17(2):422-432.
- 169 Mayerle J, Lerch MM. Is it necessary to distinguish between alcoholic and nonalcoholic chronic pancreatitis? *J Gastroenterol.* **2007** Jan;42 Suppl 17:127-130.

- 170 McCarroll JA, Phillips PA, Park S, Doherty E, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cell activation by ethanol and acetaldehyde: is it mediated by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway? *Pancreas*. **2003** Aug;27(2):150-160.
- 171 McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-kinase) pathway. *Biochem Pharmacol*. **2004** März;67(6):1215-1225.
- 172 Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, Apte M. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut*. **2002** Apr;50(4):535-541.
- 173 Miller AA, Kurschel E, Osieka R, Schmidt CG. Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia [abstract]. *Eur J Cancer Clin Oncol*. **1987** Sep;23(9):1283-1287.
- 174 Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*. **2004** Jan;28(1):38-44.
- 175 Moore PS, Barbi S, Donadelli M, Costanzo C, Bassi C, Palmieri M, Scarpa A. Gene expression profiling after treatment with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A reveals altered expression of both pro- and anti-apoptotic genes in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*. **2004** Sep;1693(3):167-176.
- 176 Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*. **2007** Mai;25(15):1960-1966.
- 177 Moreira JMA, Scheipers P, Sørensen P. The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A modulates CD4+ T cell responses. *BMC Cancer*. **2003** Nov;3:30.
- 178 Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease [abstract]. *Scand J Gastroenterol Suppl*. **1996**;216:132-148.
- 179 Morton C, Klatsky AL, Udaltsova N. Smoking, coffee, and pancreatitis [abstract]. *Am J Gastroenterol*. **2004** Apr;99(4):731-738.
- 180 Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab*. **2000** Okt;71(1-2):276-292.
- 181 Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse M, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res*. **2004** Feb;64(4):1331-1337.
- 182 Münster P, Marchion D, Bicaku E, Schmitt M, Lee JH, DeConti R, Simon G, Fishman M, Minton S, Garrett C, Chiappori A, Lush R, Sullivan D, Daud A. Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *J Clin Oncol*. **2007** Mai;25(15):1979-1985.

- 183 Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima S, Yao T, Hosoi F, Basaki Y, Ono M, Kuwano M, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep.* **2007** Okt;18(4):769-774.
- 184 Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P, Alvarez R, Schiavone EM, Ferrara F, Bresciani F, Weisz A, de Lera AR, Gronemeyer H, Altucci L. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med.* **2005** Jan;11(1):77-84.
- 185 Neglia JP, FitzSimmons SC, Maisonneuve P, Schöni MH, Schöni-Affolter F, Corey M, Lowenfels AB. The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. *N Engl J Med.* **1995** Feb;332(8):494-499.
- 186 Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* **2004** März;350(12):1200-1210.
- 187 Niki T, Rombouts K, De Bleser P, De Smet K, Rogiers V, Schuppan D, Yoshida M, Gabbiani G, Geerts A. A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology.* **1999** März;29(3):858-867.
- 188 Nilsson H, Stenram U, Ihse I, Wadström T. Re: Helicobacter pylori seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* **2002** Apr;94(8):632-633.
- 189 Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis [abstract]. *Am J Surg.* **1998** Jan;175(1):76-83.
- 190 Ohnishi N, Miyata T, Ohnishi H, Yasuda H, Tamada K, Ueda N, Mashima H, Sugano K. Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis. *Gut.* **2003** Okt;52(10):1487-1493.
- 191 Ohnishi H, Miyata T, Yasuda H, Satoh Y, Hanatsuka K, Kita H, Ohashi A, Tamada K, Makita N, Iiri T, Ueda N, Mashima H, Sugano K. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. *J Biol Chem.* **2004** März;279(10):8873-8878.
- 192 Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest* **2007** Jan;117(1):50-59.
- 193 Omura N, Goggins M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* **2009**;2(4):310-326.
- 194 Pan SY, Johnson KC, Ugnat A, Wen SW, Mao Y. Association of obesity and cancer risk in Canada. *Am J Epidemiol.* **2004** Feb;159(3):259-268.
- 195 Pang M, Kothapally J, Mao H, Tolbert E, Ponnusamy M, Chin YE, Zhuang S. Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* **2009** Okt;297(4):F996-F1005.
- 196 Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **2005** März;102(10):3697-3702.

- 197 Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet*. **2004** Jan;363(9402):62-64.
- 198 Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem* **2001** Sep;276(39):36734-36741.
- 199 Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu M, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*. **2003** Feb;52(2):275-282.
- 200 Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, Doherty E, McCarroll JA, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut*. **2003** Mai;52(5):677-682.
- 201 Pickartz T, Mayerle J, Lerch MM. Autoimmune pancreatitis [abstract]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. **2007** Juni;4(6):314-323.
- 202 Pitchumoni CS, Bordalo O. Evaluation of hypotheses on pathogenesis of alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. **1996** Apr;91(4):637-647.
- 203 Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG. Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell*. **2000** Juni;11(6):2069-2083.
- 204 Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **2000** Aug;97(18):10014-10019.
- 205 Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. **1989** Sep;245(4922):1066-1073.
- 206 Rishikof DC, Ricupero DA, Liu H, Goldstein RH. Phenylbutyrate decreases type I collagen production in human lung fibroblasts. *J Cell Biochem*. **2004** März;91(4):740-748.
- 207 Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). „Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.“ (7. überarbeitete Auflage), **2010**
- 208 Rohrmann S, Linseisen J, Vrieling A, Boffetta P, Stolzenberg-Solomon RZ, Lowenfels AB, Jensen MK, Overvad K, Olsen A, Tjonneland A, Boutron-Ruault M, Clavel-Chapelon F, Fagherazzi G, Misirli G, Lagiou P, Trichopoulou A, Kaaks R, Bergmann MM, Boeing H, Bingham S, Khaw K, Allen N, Roddam A, Palli D, Pala V, Panico S, Tumino R, Vineis P, Peeters PHM, Hjärtåker A, Lund E, Redondo Cornejo ML, Agudo A, Arriola L, Sánchez M, Tormo M, Barricarte Gurrea A, Lindkvist B, Manjer J, Johansson I, Ye W, Slimani N, Duell EJ, Jenab M, Michaud DS, Mouw T, Riboli E, Bueno-de-Mesquita HB. Ethanol intake and the risk of pancreatic cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) [abstract]. *Cancer Causes Control*. **2009** Juli;20(5):785-794.
- 209 Rombouts K, Knittel T, Machesky L, Braet F, Wielant A, Hellemans K, De Bleser P, Gelman I, Ramadori G, Geerts A. Actin filament formation, reorganization and migration are impaired in hepatic stellate cells under influence of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. *J Hepatol*. **2002** Dez;37(6):788-796.

- 210 Rulyak SJ, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Brentnall TA. Risk factors for the development of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Gastroenterology*. **2003** Mai;124(5):1292-1299.
- 211 Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M. HDAC1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1996** Dez;93(25):14503-14508.
- 212 Russell RCG, Theis BA. Pancreatoduodenectomy in the treatment of chronic pancreatitis. *World J Surg.* **2003** Nov;27(11):1203-1210.
- 213 Sachs M. [Study of the pancreas and its inflammatory diseases from the 16th-19th century] [abstract]. *Zentralbl Chir.* **1993**;118(11):702-711.
- 214 Sakorafas GH, Farnell MB, Nagorney DM, Sarr MG, Rowland CM. Pancreatoduodenectomy for chronic pancreatitis: long-term results in 105 patients. *Arch Surg.* **2000** Mai;135(5):517-523; discussion 523-524.
- 215 Sarles H, Bernard JP, Johnson C. Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis. *Annu Rev Med.* **1989**;40:453-468.
- 216 Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol.* **2008** März;21(3):238-244.
- 217 Schmid-Kotsas A, Gross HJ, Menke A, Weidenbach H, Adler G, Siech M, Beger H, Grünert A, Bachem MG. Lipopolysaccharide-activated macrophages stimulate the synthesis of collagen type I and C-fibronectin in cultured pancreatic stellate cells. *Am J Pathol.* **1999** Nov;155(5):1749-1758.
- 218 Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenerberger J, Grünert A, Bachem MG. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol, Cell Physiol.* **2001** Aug;281(2):C532-543.
- 219 Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer.* **2003** Jan;2:15.
- 220 Schneiderhan W, Diaz F, Fundel M, Zhou S, Siech M, Hasel C, Möller P, Gschwend JE, Seufferlein T, Gress T, Adler G, Bachem MG. Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. *J Cell Sci.* **2007** Feb;120(Pt 3):512-519.
- 221 Schüler S, Fritsche P, Diersch S, Arlt A, Schmid RM, Saur D, Schneider G. HDAC2 attenuates TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer.* **2010**;9:80.
- 222 Scognamiglio A, Nebbioso A, Manzo F, Valente S, Mai A, Altucci L. HDAC-class II specific inhibition involves HDAC proteasome-dependent degradation mediated by RANBP2. *Biochim Biophys Acta.* **2008** Okt;1783(10):2030-2038.
- 223 Sekimoto M, Takada T, Kawarada Y, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, Hirota M, Kimura Y, Takeda K, Isaji S, Koizumi M, Otsuki M, Matsuno S. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* **2006**;13(1):10-24.
- 224 Shek FW, Benyon RC, Walker FM, McCrudden PR, Pender SLF, Williams EJ, Johnson PA, Johnson CD, Bateman AC, Fine DR, Iredale JP. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol.* **2002** Mai;160(5):1787-1798.

- 225 Shimizu K, Kobayashi M, Tahara J, Shiratori K. Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*. **2005** Juni;128(7):2105-2118.
- 226 Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Brown LM, Greenberg RS, Hayes RB, Swanson GM. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst*. **1994** Okt;86(20):1510-1516.
- 227 Silverman DT, Swanson CA, Gridley G, Wacholder S, Greenberg RS, Brown LM, Hayes RB, Swanson GM, Schoenberg JB, Pottern LM, Schwartz AG, Fraumeni JF, Hoover RN. Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst*. **1998** Nov;90(22):1710-1719.
- 228 Simon P, Weiss FU, Zimmer KP, Rand S, Brinkmann B, Domschke W, Lerch MM. Spontaneous and sporadic trypsinogen mutations in idiopathic pancreatitis. *JAMA*. **2002** Nov;288(17):2122.
- 229 Sparmann G, Merkord J, Jäschke A, Nizze H, Jonas L, Löhr M, Liebe S, Emmrich J. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology*. **1997** Mai;112(5):1664-1672.
- 230 Sparmann G, Hohenadl C, Tornøe J, Jaster R, Fitzner B, Koczan D, Thiesen H, Glass A, Winder D, Liebe S, Emmrich J. Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **2004** Juli;287(1):G211-219.
- 231 Stolzenberg-Solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, Perez-Perez G, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Helicobacter pylori seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. **2001** Juni;93(12):937-941.
- 232 Su GH, Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, Westerman AM, Entius MM, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol*. **1999** Juni;154(6):1835-1840.
- 233 Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*. **1996** Apr;272(5260):408-411.
- 234 Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, Falatko FC, Brune KA, Goggins M, Rozenblum E, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. **2001** März;7(3):738-744.
- 235 Toskes PP. Hyperlipidemic pancreatitis [abstract]. *Gastroenterol Clin North Am*. **1990** Dez;19(4):783-791.
- 236 Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot*. **1976** Jan;29(1):1-6.
- 237 Van Lint C, Emiliani S, Verdin E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr*. **1996**;5(4-5):245-253.
- 238 Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. **2008** Apr;68(7):2085-2093.

- 239 Waltregny D, De Leval L, Glénisson W, Ly Tran S, North BJ, Bellahcène A, Weidle U, Verdin E, Castronovo V. Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. *Am J Pathol.* **2004** Aug;165(2):553-564.
- 240 Waltregny D, Glénisson W, Tran SL, North BJ, Verdin E, Colige A, Castronovo V. Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *FASEB J.* **2005** Juni;19(8):966-968.
- 241 Wang L, Tao R, Hancock WW. Using histone deacetylase inhibitors to enhance Foxp3(+) regulatory T-cell function and induce allograft tolerance. *Immunol Cell Biol.* **2009** Apr;87(3):195-202.
- 242 Warren R, Beamish H, Burgess A, Waterhouse NJ, Giles N, Fairlie D, Gabrielli B. Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints. *FASEB J.* **2003** Aug;17(11):1550-1552.
- 243 Watanabe I, Hasebe T, Sasaki S, Konishi M, Inoue K, Nakagohri T, Oda T, Mukai K, Kinoshita T. Advanced pancreatic ductal cancer: fibrotic focus and beta-catenin expression correlate with outcome. *Pancreas.* **2003** Mai;26(4):326-333.
- 244 Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn.* **1982** März;58(4-6):837-858.
- 245 Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* **1993** Juli;73(7):1251-1254.
- 246 Wenger C, Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Menke A, Hameister H, Wilda M, Iwamura T, Beger HG, Adler G, Gress TM. Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* **1999** Jan;18(4):1073-1080.
- 247 Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* **1996** Okt;14(2):141-145.
- 248 Wiech NL, Fisher JF, Helquist P, Wiest O. Inhibition of histone deacetylases: a pharmacological approach to the treatment of non-cancer disorders. *Curr Top Med Chem.* **2009**;9(3):257-271.
- 249 Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* **2000** Apr;60(7):2002-2006.
- 250 Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* **2000** Juni;25(2):213-216.
- 251 Wu Ct, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science.* **2001** Aug;293(5532):1103-1105.
- 252 Wu J, Grunstein M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci.* **2000** Dez;25(12):619-623.

- 253 Yamada T, Kuno A, Masuda K, Ogawa K, Sogawa M, Nakamura S, Ando T, Sano H, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M. Candesartan, an angiotensin II receptor antagonist, suppresses pancreatic inflammation and fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003** Okt;307(1):17-23.
- 254 Yamaguchi K, Lantowski A, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. Histone deacetylase inhibitors suppress the induction of c-Jun and its target genes including COX-2. *J. Biol Chem.* **2005** Sep;280(38):32569-32577.
- 255 Yamaguchi T, Cubizolles F, Zhang Y, Reichert N, Kohler H, Seiser C, Matthias P. Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression [abstract]. *Genes Dev.* **2010** März;24(5):455-469.
- 256 Ye W, Lagergren J, Weiderpass E, Nyrén O, Adami H, Ekblom A. Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut.* **2002** Aug;51(2):236-239.
- 257 Yokota T, Denham W, Murayama K, Pelham C, Joehl R, Bell RH. Pancreatic stellate cell activation and MMP production in experimental pancreatic fibrosis. *J Surg Res.* **2002** Mai;104(2):106-111.
- 258 Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* **1990** Okt;265(28):17174-17179.
- 259 Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells [abstract]. *Lab Invest.* **2002** Okt;82(10):1359-1368.
- 260 Zimmermann A, Gloor B, Kappeler A, Uhl W, Friess H, Büchler MW. Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans. *Gut.* **2002** Okt;51(4):574-578.
- 261 Zupkovitz G, Grausenburger R, Brunmeir R, Senese S, Tischler J, Jurkin J, Rembold M, Meunier D, Egger G, Lagger S, Chiocca S, Propst F, Weitzer G, Seiser C. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is a crucial target for histone deacetylase 1 as a regulator of cellular proliferation. *Mol Cell Biol.* **2010** März;30(5):1171-1181.



## 9 Thesen

### These 1

Als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix sind die aktivierten pankreatischen Sternzellen (PSZ) von zentraler Bedeutung für die Fibrosierung der Bauchspeicheldrüse bei chronischer Pankreatitis und beim Pankreaskarzinom.

### These 2

Bei chronischer Pankreatitis führt die Fibrose zum Verlust der exo- und endokrinen Organfunktion; beim Pankreaskarzinom steht sie außerdem im Zusammenhang mit der Progression und der schlechten Prognose der Erkrankung.

### These 3

Die Hemmung der Fibrose könnte in der Behandlung der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms einen effektiven Therapieansatz darstellen. Da Histondeacetylaseinhibitoren (HDACI) in anderen Fibrose-Modellen antifibrotische Effekte vermitteln, sollten die Wirkprinzipien der Inhibitoren in aktivierten PSZ charakterisiert werden.

### These 4

HDACI sind wirksame Inhibitoren der Sternzellproliferation sowie der myofibroblastären Differenzierung aktivierter PSZ.

### These 5

HDACI vermindern dosisabhängig die Kollagensyntheseleistung der PSZ sowie in geringem Maße auch das Überleben der Sternzellen.

### These 6

HDACI inhibieren die Transduktion des mitogenen Signals von *platelet-derived growth factor* und vermindern dadurch das Wachstum der Zellen.

### These 7

Die Hemmung der *activator protein-1* DNA-Bindung ist ein Hauptmechanismus der HDACI-Wirkung.

**These 8**

Die konstitutive Sternzellaktivierung wird unter pathologischen Bedingungen durch autokrine Regelkreise unterhalten. HDACI hemmen die Expression autokriner Mediatoren, wie *Endothelin-1* (und den *transforming growth factor-β1*), und wirken so der Autoaktivierung der PSZ entgegen.

**These 9**

HDACI hemmen Schlüsselfunktionen aktivierter PSZ und sind dadurch antifibrotisch wirksam. Bei chronischer Pankreatitis und beim Pankreaskarzinom könnten die HDACI der Fibrosierung der Bauchspeicheldrüse entgegenwirken.

**These 10**

Trichostatin A ist als Inhibitor der Sternzellaktivierung wirksamer als Natriumbutyrat oder Valproat. Eine starke Wirksamkeit von HDACI kann, wie bei Trichostatin A, wahrscheinlich auf eine breite Hemmung von HDAC-Isoenzymen zurückgeführt werden.

**These 11**

HDACI sind vielversprechende „Biomodulatoren“. Literaturangaben zufolge, sind HDACI immunmodulatorisch sowie anti-neoplastisch wirksam und können potenziell die Effekte von Zytostatika verstärken. Prinzipiell sind HDACI damit für die Behandlung zahlreicher Krankheitsbilder aus dem autoimmunen, entzündlichen oder malignen Formenkreis von Interesse.

**These 12**

HDACI können die Progression des Pankreaskarzinoms möglicherweise über zwei primär unabhängige Mechanismen inhibieren: (1) über antifibrotische Effekte durch Hemmung der Sternzellaktivierung und (2) über eine direkte anti-neoplastische Wirksamkeit auf Tumorzellen.

**These 13**

Die Wirkungen von HDACI bei der chronischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom sollten an Tiermodellen beider Erkrankungen evaluiert werden.

## 10 Abkürzungsverzeichnis

ab	<i>antibody</i> ; Antikörper
AP-1	<i>activator protein-1</i>
ASI	<i>Activated Stroma Index</i>
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BRCA2	<i>breast cancer gene 2</i>
BrdU	5-Bromo-2`-Deoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	<i>cyclisches Adenosinmonophosphat</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin dependant kinases</i>
CD95L	CD 95 Ligand
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
c-Fos	<i>c-fos gene</i>
CP	chronische Pankreatitis
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DPC4	<i>deleted in pancreatic carcinoma</i>
ds	Doppelstrang bzw. doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ET-1	<i>Endothelin-1</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum

FU	5-Fluorouracil
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HDACI	Histondeacetylaseinhibitoren
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HER-2/ <i>neu</i>	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMW-DNA	<i>high molecular weight-DNA</i>
HPRT	<i>hypoxanthin phosphoribosyl transferase</i>
HSZ	hepatische Sternzellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's modified Dulbecco's medium
K- <i>ras</i>	Kirsten-Ras
LMW-DNA	<i>low molecular weight-DNA</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NABU	Natriumbutyrat (bzw. Sodiumbutyrat, Butyrat)
NEA	nichtessentielle Aminosäuren
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien
PBS	<i>phosphate bufferd saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRSS1	Kationisches Trypsinogen Gen
PSZ	pankreatische Sternzelle
RT	<i>reverse Transkription</i>
SAHA	Suberoylanilinhydroxamat
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SPINK1	<i>serine protease inhibitor, Kazal-Typ 1</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tertamethylethylenediamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> (bzw. Tumornekrosefaktor- $\alpha$ )
TRAIL	<i>TNF-<math>\alpha</math>-related apoptosis-inducing ligand</i>
TSA	Trichostatin A
VPA	Valproat

## 11 Herstellerverzeichnis

Agfa-Gevaert AG	München	Deutschland
Amersham Biosciences Europe GmbH	Freiburg	Deutschland
Anthos Labtec Instruments GmbH	Wals-Siezenheim	Österreich
Applied Biosystems	Foster City	CA, USA
BD Biosciences Clontech	Heidelberg	Deutschland
Biochrome KG	Berlin	Deutschland
Biomol GmbH	Hamburg	Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH	München	Deutschland
BioTez Berlin-Buch GmbH	Berlin-Buch	Deutschland
Eastman Kodak Company	Rochester	NY, USA
Eppendorf Deutschland GmbH	Hamburg	Deutschland
GE Healthcare	Freiburg	Deutschland
Gibco Life Technologies GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Hartmann Analytik	Braunschweig	Deutschland
Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen	Deutschland
Invitrogen GmbH	Carlsbad	CA, USA
Merck Biosciences GmbH	Darmstadt	Deutschland
MoBiTec GmbH	Göttingen	Deutschland
New England Biolabs GmbH	Frankfurt (Main)	Deutschland
Nycomed	Oslo	Norwegen
PAA Laboratorys GmbH	Cölbe	Deutschland
Quiagen GmbH	Hilden	Deutschland

R&D Systems GmbH	Wiesbaden – Nordenbach	Deutschland
Roche Diagnostic GmbH	Mannheim	Deutschland
Roth	Karlsruhe	Deutschland
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Santa Cruz	CA, USA
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen	Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis	MO, USA
Tebu-bio GmbH	Offenbach	Deutschland

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht genutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Rostock, 17. September 2010

Robin Bülow