

Rudolf Zenker Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität  
Rostock

Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Induktion und Funktion der Wnt-Signaltransduktion bei  
chronischer und akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus -  
eine semiquantitative Analyse**



Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin der Universität Rostock

vorgelegt von

Tim M. Kroemer

Geb. 09.07.1988 in Nashville

Rostock, im Herbst 2020

Meinen Eltern

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch

3. Gutachter: PD Dr. med. Daniel Stange

Verteidigt am: 07.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
1.1 PANKREAS	2
1.1.1. <i>Etymologie und Entdeckungen</i>	2
1.1.2. <i>Anatomie und Histologie</i>	2
1.1.3. <i>Physiologie</i>	3
1.2. DIABETES MELLITUS	4
1.2.1. <i>Epidemiologie</i>	4
1.2.2. <i>Pathophysiologie</i>	5
1.2.3. <i>Risikofaktoren</i>	5
1.3. PANKREATITIS	6
1.3.1 <i>Akute Pankreatitis</i>	6
1.3.2. <i>Chronische Pankreatitis</i>	7
1.4. NEOPLASTISCHE PANKREATIKOPATHIEN	7
1.4.1. <i>Systematik &amp; Epidemiologie</i>	7
1.4.2. <i>Risikofaktoren unter besonderer Berücksichtigung des PDAC</i>	8
1.4.3. <i>Präkanzerosen</i>	9
1.4.4. <i>Azinär-zu-Duktales Metaplasien</i>	11
1.5. WNT-SIGNALTRANSDUKTION	11
1.5.1. <i>Was ist Wnt-Signaltransduktion?</i>	11
1.5.2. <i>Wnt-Signaltransduktion und Neoplasien</i>	13
1.6. ZIELSTELLUNG	15
<b>2. MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1. TIERHALTUNG UND MAUSSTÄMME	16
2.2. EXPERIMENTELLE ANORDNUNGEN	16
2.2.1. <i>Induktion des Diabetes mellitus</i>	16
2.2.2. <i>Induktion der chronischen Pankreatitis</i>	17
2.2.3. <i>Induktion der akuten Pankreatitis</i>	18
2.3. NARKOSE, BLUT- & GEWEBEENTNAHME	19
2.4. BLUT- & PLASMAANALYSE	20
2.4.1. <i>Blutzuckermessungen</i>	20
2.4.2. <i>Lipaseaktivität</i>	20
2.5. HISTOLOGIE	21
2.5.1. <i>Histologische Aufarbeitung</i>	21
2.5.2. <i>Enzymatische Färbungen &amp; Immunhistochemie</i>	22
2.5.3. <i>Histologische Auswertung</i>	24
2.6. PROTEINANALYSE	25
2.6.1. <i>Proteinextraktion und Konzentrationsmessung</i>	25
2.7. STATISTIK	28
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
3.1. MANIFESTATION VON INDUZIERTEM DIABETES MELLITUS UND PANKREATITIS	29
3.1.1. <i>Diabetes mellitus</i>	29
3.1.2. <i>Pankreatitis</i>	31
3.2. DARSTELLUNG DER AKTIVITÄT DER WNT-SIGNALTRANSDUKTION	34
3.2.1. <i>Dünndarmschnitte als Positivkontrollen</i>	34
3.2.2. <i>Fehlende Sensitivität/Spezifität Immunhistochemie</i>	34
3.2.3. <i>Fehlende Sensitivität/Spezifität WesternBlot</i>	37
3.3. AKTIVIERUNG DER WNT-SIGNALTRANSDUKTION BEI CHRONISCHER PANKREATITIS UND DIABETES MELLITUS	38
3.3.2. <i>Wnt-Signalaktivität in ADM bei chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus an d40</i>	39
3.4. AKTIVIERUNG VON WNT-SIGNALTRANSDUKTION BEI AKUTER PANKREATITIS UND DIABETES MELLITUS	40

3.4.1. Wnt-Signalaktivität in ADM bei akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus an d 28...	40
3.4.2. Entwicklung der Wnt-Signalaktivität in ADM bei akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus von d26 bis d28.....	42
3.5. FUNKTION DER WNT-SIGNALTRANSDUKTION BEI AKUTER PANKREATITIS UND DIABETES MELLITUS .....	43
3.5.1. Kein Einfluss von Wnt-Signaltransduktion auf Blutglukosekonzentration .....	43
3.5.2. Funktion aktivierter Wnt-Signaltransduktion bei akuter Pankreatitis .....	44
3.6. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	46
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
4.1. DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN .....	47
4.1.1. $Axin2^{+/lacZ}$ , $Axin2^{lacZ/lacZ}$ als Reportermaus für Wnt-Signalaktivität.....	47
4.1.2. Experimentelle Modelle der Diabetes- und Pankreatitisinduktion .....	48
4.1.3. Verwendung von Metamizol .....	50
4.1.4. X-Gal Färbemethode als zuverlässiger Marker für Wnt-Signalaktivität.....	51
4.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	51
4.2.1. Induktion von Diabetes mellitus und Pankreatitis.....	51
4.2.2. Einfluss von Diabetes und Pankreatitis auf die Induktion von Wnt-Signalaktivität ....	52
4.2.3. Pankreatitis, ADM und PDAC.....	52
4.2.4. Diabetes mellitus als Risikofaktor für Pankreaskarzinom.....	53
4.2.5. Kausaler Zusammenhang zwischen Wnt-Signalaktivität und Pankreaskarzinogenese .....	54
4.2.6. Kausaler Zusammenhang zwischen Wnt-Signalaktivität und ADM.....	55
4.2.7. Einfluss von Wnt-Signalaktivität auf Hyperglykämie und Inflammation.....	56
4.3. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK: .....	57
<b>LITERATURVERZEICHNIS:.....</b>	<b>58</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>69</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>70</b>
<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>72</b>
<b>ORIGINALARBEITEN .....</b>	<b>72</b>
<b>THESEN DER DISSERTATION .....</b>	<b>73</b>
<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>74</b>

## Zusammenfassung

Hintergrund: Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine hochmaligne Erkrankung mit sehr niedriger Fünf-Jahres-Überlebensrate. Trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen stagniert die Entwicklung kurativer Therapiekonzepte. Ein diesbezüglicher Ansatz ist der Versuch, die Entwicklung von PDAC aus Vorläuferläsionen zu verstehen, z.B. azinär-zu-duktales Metaplasien (ADM) als Reaktion auf persistierende Gewebsbelastungen. Pathophysiologisch lassen sich solche Gewebsbelastungen im Rahmen eines Diabetes mellitus oder einer Pankreatitis beobachten. Dazu stellen diese beiden Krankheiten Risikofaktoren für die Entwicklung von PDAC dar. Eine zentrale Bedeutung kommt dabei möglicherweise Signaltransduktionsprozessen zu, z.B. der Wnt-Signaltransduktion. Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Induktion und Funktion der Wnt-Signaltransduktion unter pathophysiologischen Umständen, nämlich akuter und chronischer Pankreatitis sowie Diabetes mellitus, mit besonderer Berücksichtigung von ADM zu untersuchen.

Methodik: Zur Analyse der Wnt-Signalaktivität wurden bei Axin2-Reportermäusen ( $Axin2^{+/lacZ}$ ) Diabetes mellitus und/oder akute bzw. chronische Pankreatitis induziert, und dann der Fokus sowie die Intensität der Wnt-Signalaktivität histologisch analysiert. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde der Einfluss der Wnt-Signaltransduktion auf den Verlauf von Pankreatitis und Diabetes mellitus analysiert, wobei Axin2-Knockoutmäuse ( $Axin2^{lacZ/lacZ}$ ) mit Wildtyp-Tieren verglichen wurden.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen: Prolongierte chronische sowie akute Pankreatitis führen einzeln, und durch Kombination mit Diabetes mellitus verstärkt, zur Entwicklung von ADM mit lokal aktivierter Wnt-Signaltransduktion. Hier konnte ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Induktion von Risikofaktoren für PDAC, der Entstehung von Vorläuferläsionen von PDAC sowie aktiver Wnt-Signaltransduktion hergestellt werden. Im zweiten Versuchsteil konnte kein signifikanter Einfluss der Wnt-Signaltransduktion auf den Verlauf von Pankreatitis und Diabetes mellitus nachgewiesen werden. Diese Schlußfolgerung wurde durch die Analyse der Parameter Blutglukosekonzentration, Lipaseaktivität und das Verhältnis Pankreasgewicht/Körpergewicht verifiziert. Die vorliegenden Daten zeigen somit, dass es durch Risikofaktoren für die Entwicklung eines PDAC zur Entstehung von Vorläuferläsionen eines PDAC mit hoher Wnt-Signalaktivität kommt. Eine Aussage zur genauen Funktion der Wnt-Signaltransduktion in diesem Zusammenhang konnte darüber hinaus jedoch nicht erhoben werden.

# 1. Einleitung

## 1.1 Pankreas

### 1.1.1. Etymologie und Entdeckungen

Die Geschichte der Pankreatologie stellt ein klassisches Beispiel für die unbedingte Notwendigkeit der ständigen Kritik und Erweiterung bestehenden Wissens sowie für den fortschrittshemmenden Charakter dogmatischen Denkens dar. Das von Galenos von Pergamon aufgestellte und bis ins 17. Jahrhundert weitestgehend ungeprüft geltende Postulat, dass das Pankreas ausschließlich Schutz und Stütze für umliegende Gewebe sei [1], verhinderte für ein Jahrtausend die kritische Auseinandersetzung mit einem Organ, dass zahlreiche lebensnotwendige Funktionen und den Ursprung vieler lebensbedrohlicher Krankheiten in sich birgt. Das Wort Pankreas, griechisch πάγκρεας, besteht aus den beiden Teilen pan-, zu Deutsch „alles“, und -kréas, zu Deutsch „Fleisch“, in Anlehnung an das fleischige Aussehen des Organs im Situs.

Die erste Beschreibung einer Verdauungssäfte absondernden Drüse erfolgte ca. 300 v. Chr. durch Eudemos von Alexandria [2], eine eindeutige strukturelle Abgrenzung des Pankreas von umliegenden Lymphknoten wurde durch Rufus von Ephesos im 1. Jahrhundert erkannt. Das Mittelalter brachte, bedingt durch den vom galenischen Dogma verursachten Erkenntnisstillstand, keine bahnbrechenden Erkenntnisse, sondern eher bizarre Theorien hervor. Der französische Physiologie Jean François Fernel meinte gar, im Pankreas den Ursprung von Melancholie, Hypochondrie und wiederkehrendem Fieber gefunden zu haben [2].

Reinier de Graaf konnte 1664 erstmals durch eine von ihm an einem Hund installierte Fistel Pankreassekret auffangen, und erkannte so als erster die exokrine Funktion [3]. 1889 entdeckte Paul Langerhans die später nach ihm benannten inselartigen Zellverbände, konnte jedoch noch nicht ihre endokrine Bedeutung beschreiben [4]. Dies gelang erst 1909 dem russischen Arzt Leonid Sobolew, der den Zusammenhang zwischen den Langerhans'schen Inseln und der Zuckerkrankheit herstellte [2].

### 1.1.2. Anatomie und Histologie

Das Pankreas liegt dorsal des Magens und erstreckt sich von der Konkavität der duodenalen C-Schlinge rechts bis zum Milzhilus links. Es besteht aus den Teilen Processus Uncinatus, Caput (Kopf), Collum (Hals), Corpus (Körper) und Cauda (Schwanz) und ist, bis auf einen kleinen Anteil der Cauda, Teil des sekundären Ret-

roperitoneums [5]. Ausgehend von der Cauda durchzieht als Drainage des exokrinen Pankreas der Ductus Pancreaticus, oder Wirsung-Gang, das gesamte Organ, um sich im Caput mit dem Ductus Choledochus zur Ampulla Hepatopancreatica oder Ampulla Vateri zu vereinigen und in der Papilla Duodeni Major ins Duodenum zu münden. Als Reminiszenz an die Organogenese des Pankreas, welches sich aus einer dorsalen und einer ventralen Knospe entstehend in der 5.-8. Entwicklungswoche des Embryos ausbildet, weisen manche Bauchspeicheldrüsen neben dem Wirsung-Gang einen Ductus Pancreaticus Accesorius oder Santorini-Gang auf [6].

Histologisch und funktionell kann das Pankreas in zwei Teilen betrachtet werden, einem exokrinen und einem endokrinen. Den exokrinen Teil bildet rein seröses Drüsengewebe, bestehend aus den Azinuszellen und einem ausgedehntem Gangsystem. Die Azini sind von variablem Phänotyp, aber typischerweise mit den klassischen Merkmalen einer proteinsezernierenden Drüsenzelle: großer aktiver Kern, reichlich raues Endoplasmatisches Retikulum und apikal gelegene Sekretionsgranula. Als Übergang zwischen Azini und Gangsystem fungieren die sogenannten Schaltstücke, denen eine zentrale Rolle in der Bikarbonatsekretion zukommt. Der endokrine Teil wird von den Langerhans'schen Inseln gebildet, kleinen Ansammlungen aus 2.000-3.000 Zellen unterschiedlichen Typs (Typ A-D). Unter dem Lichtmikroskop nicht zu unterscheiden, bedarf es zur Differenzierung z.B. der Immunhistochemie. Meist scharf begrenzt, liegen die Inseln häufiger in der Cauda als im Caput und machen nur etwa 1-3 % der Masse des adulten Pankreas aus [7].

### 1.1.3. Physiologie

Die exokrine Portion des Pankreas produziert täglich 1-1,5 l Sekret, welches sich aus den Hauptbestandteilen Bikarbonat, zur Neutralisierung der sauren Magenflüssigkeit, und Pankreasenzymen zur Nährstoffspaltung zusammensetzt [8]. Den größten Einfluss auf die Sekretionsleistung des exokrinen Pankreas haben die beiden Hormone Cholecystkinin (CCK) und Sekretin. CCK wird in den I-Zellen des Duodenums und Jejunums gebildet, wobei Lipide, Peptide und Aminosäuren als Sekretionspromotor fungieren und die CCK-Plasmaspiegel um das Fünf- bis Zehnfache steigern. Dies führt zu einer Intensivierung der Proteinsekretion in den Azini. Sekretin wird von den S-Zellen im Duodenum und Jejunum ausgeschüttet, vor allem stimuliert von der



aus dem Magensaft stammenden Salzsäure. In den Ausführungsgängen der Azini bewirkt Sekretin eine erhöhte Flüssigkeits- und Bikarbonatsekretion.

Um eine bereits intrapankreatische Aktivität der ausgeschütteten Enzyme zu verhindern, wird ein Teil als inaktive Vorstufe (Trypsinogene, Proelastasen) sezerniert [9]. Andere, bereits als aktive Enzyme in den Granula vorliegende Verbindungen (Lipase, Amylase) werden durch den lokal sauren pH-Wert gehemmt [7]. Kommt es zu einer Dysfunktion der beschriebenen Schutzmechanismen, so ist eine mögliche Folge die akute Pankreatitis [10].

Die endokrine Portion wird von insgesamt 4 Zelltypen innerhalb der Langerhans'schen Inseln gebildet. Zahlenmäßig am häufigsten sind die B- oder  $\beta$ -Zellen (60-70%), deren Funktion die Produktion von Insulin und Amylin ist. Den zweitgrößten Teil (20%) machen die Glucagon bildenden A- oder  $\alpha$ -Zellen aus, gefolgt von den D- oder  $\delta$ -Zellen, in denen Somatostatin synthetisiert wird [9]. Die sogenannten PP-Zellen (1-2%) sind am seltensten. Sie sezernieren Pankreatisches Polypeptid [7].

Die Sekretion von Insulin unterliegt dem Einfluss der Blutglukosekonzentration sowie des vegetativen Nervensystems. Sobald sich durch erhöhte Konzentration im Blut der Metabolismus von Glukose innerhalb der  $\beta$ -Zellen steigert, wird über eine ATP-abhängige Depolarisation ein Calciumionen-Einstrom verursacht, was wiederum zur Freisetzung von Insulin führt. Das vegetative Nervensystem nimmt über das Prinzip der sogenannten Sollwertführung durch sympathische  $\alpha$ -Adrenozeptoren hemmend und durch parasympathische  $M_3$ -Cholinorezeptoren stimulierend Einfluss auf die Insulinproduktion

Direkter Antagonist des Insulins ist das von den  $\alpha$ -Zellen sezernierte Glucagon. Als Reaktion auf niedrige Blutglukosespiegel kommt es zur erhöhten Synthese dieses Hormons, was vor allem durch gesteigerte hepatische Glukoneogenese die Versorgung der besonders glukoseabhängigen Gewebe wie dem ZNS sicherstellt [9].

## 1.2. Diabetes mellitus

### 1.2.1. Epidemiologie

„Diabetes ist ein furchtbares Leiden, nicht sehr häufig beim Menschen, ein Schmelzen des Fleisches und der Glieder zur Harn...das Leben ist kurz, unangenehm und schmerzvoll, der Durst unstillbar...und der Tod unausweichlich.“ – Aretaios von Kapadozien, 1. Jhr. n. Chr.

Seit dieser Einschätzung aus der Antike haben sich zwei der beschriebenen Paradigmen diametral verändert. Auch wenn die Krankheit Diabetes mellitus nicht mehr zwangsläufig den Tod innerhalb eines kurzen, potentiell qualvollen Zeitraums bedeutet, so hat sich aber ihr Charakter von einer seltenen Pathologie zu einer epidemiologisch äußerst bedeutsamen Erkrankung gewandelt. Laut WHO waren 2014 weltweit 9% der über 18-jährigen Personen an Diabetes erkrankt, wobei 90% dieser Patienten an Diabetes mellitus Typ 2 litten. 2012 war Diabetes die unmittelbare Ursache für 1,5 Millionen Todesfälle, wobei sich diese Zahl bis 2030 in etwa verdoppeln wird [11]. In Deutschland betrugen 2007 die durch Diabetes mellitus verursachten Kosten für die gesetzlichen Krankenkassen etwa 40 Milliarden Euro, was einer Steigerung um 51,1 % seit dem Jahr 2000 entspricht [12].

### 1.2.2. Pathophysiologie

Die Bezeichnung Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe metabolischer Erkrankungen, deren Ursache in einer Störung der Sekretion oder Funktion von Insulin bzw. einer Kombination beider Zustände liegt. Ätiologisch können die meisten Fälle einer von zwei Entitäten zugeordnet werden: Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) oder Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM). Grundlage des T1DM ist ein absolutes Insulindefizit, also die Unfähigkeit des Körpers zur Insulinproduktion. Patienten mit T1DM zeigen häufig serologische Anzeichen eines gegen die  $\beta$ -Zellen gerichteten Autoimmunprozesses [13]. Die Ursache für T2DM ist ein relatives Insulindefizit durch periphere Insulinresistenz in Verbindung mit einer insuffizienten Reaktion auf den dadurch erhöhten Hormonbedarf [14]. Das Defizit ist unter anderem Resultat einer durch Übergewicht bedingten Herabregulierung bestimmter Glucose-Transportmoleküle in der Zellmembran [15]. Die durch Diabetes hervorgerufene Erhöhung der Blutzuckerkonzentration führt zu Langzeitschäden an verschiedensten Organen und Organsystemen, z.B. Augen, Nieren, kardiovaskulärem und Nerven-System [13].

### 1.2.3. Risikofaktoren

Die Entwicklung eines T1DM ist multifaktoriell [16]. Eine besonders große Rolle kommt dabei genetischen Einflüssen zu. In der HLA-Region von Chromosom 6 liegt das wohl wichtigste Suszeptibilitäts-gen des Diabetes mellitus Typ 1. So kommt ein bestimmter Haplotyp dieses Gens bei 40% aller in den USA an T1DM erkrankten Kindern vor, jedoch nur bei 2% der Normalbevölkerung. Trotzdem liegt die Konkor-

danzrate bei eineiigen Zwillingen nur zwischen 30-70%, was eine Abhängigkeit von umweltbedingten Faktoren belegt [17]. Den zugrundeliegenden Autoimmunprozessen wird ein ursächlicher Zusammenhang mit bestimmten Umweltfaktoren nachgesagt, dieses Postulat konnte bis jetzt jedoch nicht konkretisiert werden [16].

Bei der Entstehung von T2DM spielen genetische Prädispositionen ebenfalls eine Rolle, jedoch wahrscheinlich ohne Zusammenhang mit dem HLA-System. Diese Prädispositionen führen allerdings erst zu einer Manifestation, wenn ein auslösender Umweltfaktor oder eine weitere genetische Aberration hinzukommt [17]. Besondere Bedeutung kommt hier sogenannten diabetogenen Lebensbedingungen zu [16]. Im Jahre 2007 versuchte eine deutsche Arbeitsgruppe mögliche Risikofaktoren zu einem Score zusammenzufassen, der die Erkennung von Patienten mit T2DM erleichtern sollte. Für die erhobenen Parameter erhöhter Taillenumfang, fortgeschrittenes Alter, arterieller Hypertonus, übermäßiger Verzehr von rotem Fleisch und Nikotinabusus konnte eine Steigerung des relativen Risikos für T2DM gezeigt werden [18].

## 1.3. Pankreatitis

### 1.3.1 Akute Pankreatitis

Ihrer anatomischen Lage geschuldet ist die Bauchspeicheldrüse einer einfachen und aussagekräftigen klinischen Untersuchung meist nicht zugänglich. Dies und die Ähnlichkeit der Symptome in den frühen Stadien der akuten und chronischen Pankreatitis machen eine unmittelbare Differenzierung oft unmöglich [19].

Die Entwicklung einer akuten Pankreatitis gründet meistens auf einem von drei Umständen: Alkoholismus, dem Auftreten von Gallensteinen und pankreatischer Hyperstimulation. Letzteres spielt allerdings hauptsächlich im experimentellen Kontext eine Rolle.

Durch diese exogenen Noxen kommt es innerhalb des Organs zu einer Außerkräftsetzung intrazellulärer Schutzmechanismen, die im physiologischen Zustand die Aktivität respektive Aktivierung von Pankreasenzymen hemmen. Folge ist eine Autodigestion mit lokaler Inflamationsreaktion [20]. Leitsymptomatisch für die akute Pankreatitis ist der starke, gürtelförmig in den Rücken ausstrahlende Oberbauchschmerz [21]. Die Inzidenz in Europa liegt zwischen 2,1 und 42 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner. Diese große Schwankung liegt in den Unterschieden in Definition und diagnostischen Standards begründet [22].

Im Rahmen des Marseille-Rome-Meetings von 1988 wurde die akute Pankreatitis als eine Erkrankung des Pankreas definiert, deren mögliche Symptome Ödem, Nekrose bzw. hämorrhagische Nekrose bei adäquater Therapie folgenlos reversibel sind und eine restitutio ad integrum erlauben [23].

### 1.3.2. Chronische Pankreatitis

Konträr zur akuten Pankreatitis ist die chronische Pankreatitis ein irreversibler Vorgang, charakterisiert durch eine chronische Inflammation, Fibrose und Vernarbung, was ultimativ in einer Insuffizienz sowohl des endokrinen als auch des exokrinen Pankreas mündet [24]. Auslöser für das Auftreten einer chronischen Pankreatitis sind zwei Ereignisse: als sogenannter „first hit“ setzt eine akute Pankreatitis die Entzündungsreaktion in Gang. Der „second hit“ ist eine pathologische Verlängerung der Entzündungsreaktion mit prolongierter Aktivität pankreatischer Sternzellen und folgender Fibrose. Die Gründe für diese abnorme Reaktion sind multifaktoriell und beinhalten genetische Ursachen genauso wie Nikotin- bzw. Alkoholabusus [25]. Chronische Pankreatitis ist ein bedeutender Risikofaktor in der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms, obgleich die genaue Kausalkette noch nicht vollständig geklärt ist. Vermutlich kommt es aber durch den konstanten Entzündungsreiz zu Veränderungen erst auf genetischer Ebene, dann auf zellmorphologischer Ebene mit der Entwicklung von sogenannten PanINs (pankreatischen intraepithelialen Neoplasien), bevor sich maligne Zellstrukturen ausbilden.

## 1.4. Neoplastische Pankreatikopathien

### 1.4.1. Systematik & Epidemiologie

Die Weltgesundheitsorganisation WHO differenziert bei der Einteilung der Pankreasneubildungen in solide und zystische Tumore. Eine Übersicht dieser Einteilung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Der mit Abstand häufigste und gleichzeitig klinisch bedeutsamste Vertreter dieser Gruppe von Erkrankungen ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC). Es macht über 90% aller neu auftretenden Entartungen der Bauchspeicheldrüse aus [22]. Dabei liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ungefähr 7% [26]. Dies liegt unter anderem an der nach wie vor unzureichenden Frühdiagnostik und der hohen Therapieresistenz sowohl gegen Chemotherapeutika als auch gegen Radiotherapie [27]. In

Deutschland erkranken jedes Jahr ungefähr 11800-13500 Patienten [28], wobei aufgrund der schlechten Prognose Inzidenz und Letalitätsrate fast identisch sind [22]. Ungefähr 65 % aller PDACs liegen im Pankreaskopf, etwa 15% befinden sich in Pankreaskörper und -schwanz. Die verbleibenden 20% können keinem bestimmten Locus zugeordnet werden und verteilen sich diffus über das ganze Organ. Der Ort des Befalls nimmt dabei Einfluss auf die Prognose der Erkrankung: Patienten mit Befall des Körper- bzw. Schwanzbereiches haben eine signifikant schlechtere mittlere Überlebensrate als Patienten mit Karzinomen im Kopfbereich [29].

<b>Tumortyp</b>	<b>Häufigkeit</b>	<b>Prognose</b>
<i>Solide Tumoren</i>		
Duktales Adenokarzinom und Varianten	90%	ungünstig
Azinuszellkarzinom	1%	ungünstig
Pankreatoblastom	<1%	ungünstig
Endokrine Tumoren	2%	intermediär
Nichtepitheliale Tumoren	selten	intermediär
<i>Zystische Tumore</i>		
Intraduktales papillär-muzinöse Neoplasie	2%	gut
Muzinös-zystische Neoplasie	1%	gut
Serös-zystische Neoplasie	1%	gut
Solid-pseudopapilläre Neoplasie	<1%	gut
Andere zystische Tumoren	1%	intermediär
Nichtepitheliale Tumoren	selten	intermediär

Tabelle 1: Einteilung und Häufigkeit verschiedener Pankreastumore

Modifiziert nach Riemann [22]

#### 1.4.2. Risikofaktoren unter besonderer Berücksichtigung des PDAC

Die jährliche Inzidenz des PDAC liegt im europäischen Raum bei ca. 10/100.000 Einwohner [30]. Dabei ist der bedeutendste Risikofaktor ein unbeeinflussbarer: das Alter des Patienten. Eine Erkrankung vor dem 45. Lebensjahr ist sehr unwahrscheinlich, während 80% der Diagnosen zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr gestellt werden. So erhöht sich das Risiko, an einem PDAC zu erkranken, zwischen dem 40. und 80. Lebensjahr um das 40-fache [22]. Das Verhältnis der Geschlechter liegt bei 1:1,5 zu Ungunsten der Männer [30]. Zu den alimentären Risikofaktoren gehören

sowohl eine proteinreiche Diät, als auch ein ausgeprägte Aufnahme gesättigter Fettsäuren [31],[32]. Individuen mit Nikotinabusus sind ebenfalls einem höheren Erkrankungsrisiko ausgesetzt, wobei das Risiko proportional zur Intensität des Abusus steigt [33]. Chronische Pankreatitis steigert das Risiko für das Auftreten von PDAC signifikant [34]. So haben Patienten mit chronischer Inflammation der Bauchspeicheldrüse ein bis zu 20-fach gesteigertes Risiko gegenüber der nicht betroffenen Population, ein PDAC zu entwickeln [30]. Eine besondere Gruppe stellen dabei Patienten mit hereditären Pankreatitiden dar (HP). Patienten mit HP entwickeln bereits in sehr jungen Jahren chronische Pankreatitiden, so dass mit steigendem Alter das relative Risiko an einem PDAC zu erkranken deutlich über dem der Normalpopulation liegt [35]. Es besteht dazu ein linearer Zusammenhang zwischen dem Schweregrad einer Hyperglykämie und dem Auftreten von PDAC [36].

#### 1.4.3. Präkanzerosen

Durch die unzureichenden Möglichkeiten in der Früherkennung von Pankreasneoplasien, besonders des PDAC, ist die Krankheit bei Symptomausbildung meist schon in einem fortgeschrittenen, sehr invasiven Stadium. Dieser Umstand trägt zum großen Teil zu der in den allermeisten Fällen äußerst schlechten Prognose bei [22]. Eine Möglichkeit, diesen Zustand zu beheben, ist die sichere Identifizierung von Vorläuferläsionen intrapankreatischer Gewebsentartungen. Hierbei konzentriert sich das Interesse der Wissenschaft vor allem auf 3 mögliche Vorstufen: PanIN, intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) sowie muzinös-zystische Neoplasien (MCN) [37]. Zu IPMN und MCN muss allerdings gesagt werden, dass bezüglich ihrer eindeutigen Charakterisierung als Vorläuferläsion noch Uneinigkeit herrscht und sie in Teilen der Fachliteratur als eigene Tumorentität beschrieben werden [38].

Die PanIN ist die wichtigste und besterforschtete Vorläuferläsion [37]. In Operationsresektaten von operierten Pankreaskarzinompatienten fanden sich PanIN sowohl in der direkten Umgebung des Tumors als auch verteilt über das übrige Pankreasgewebe. Die Läsionen sind ungefähr 5 mm groß und meist asymptomatisch [39]. Sie liegen charakteristischerweise innerhalb der die Pankreasläppchen drainierenden Ausführungsgänge, und werden anhand ihres Dysplasie-Niveaus in 3 Grade eingeteilt: PanIN-1 zeigt minimale zellmorphologische Veränderungen, PanIN-2 minimal bis moderate Veränderungen, während sich PanIN-3 durch schwere Dysplasien auszeichnet und auch als Carcinoma in Situ bezeichnet wird [37]. Der Vorgang der Kar-

zinogenese wird hier als schrittweise Entwicklung der Dysplasie von leicht nach schwer impliziert, mit gleichzeitiger Anhäufung genetischer Aberrationen wie zum Beispiel Mutationen des KRAS-Signalweges [40].

Die frühzeitige Erkennung der Läsion und damit die Therapie vor Ausbruch des duktaalen Adenokarzinoms wird allerdings durch die Tatsache erschwert, dass bis dato keine radiologische Diagnostik in der Lage ist, PanIN darzustellen [41].

Die IPMN entstammt aus Zellen des Gangepithels, was in Folge von Proliferation und erhöhter Sezernierung von Mucinen zu zystenartiger Dilatation des betroffenen Ganges führt [37]. Histologisch werden IPMN in 4 Subkategorien eingeteilt: intestinal, pankreatobiliär, gastrisch und onkozytär [42]. Strukturell wird einerseits nach Fokus des Befalls zwischen main-duct IPMN, branch-duct IPMN und mixed-type IPMN [43], andererseits nach Ausmaß der Invasivität zwischen leichtgradigen, mittelgradigen und hochgradigen Dysplasien, sowie IPMN mit assoziierten invasiven Karzinomen unterschieden [44]. Zirka ein Drittel aller IPMNs sind karzinomassoziiert [45]. IPMNs zeigen große Bandbreite genetischer Veränderungen, von denen einige den Veränderungen, die im Zuge eines PDAC auftreten, ähneln. Hierzu gehören KRAS, SMAD-4 und TP53 Gene [37]. Epigenetische Veränderungen scheinen ebenfalls eine Rolle in der Entstehung von IPMNs zu spielen. So suggerieren neue Studien einen Zusammenhang zwischen der Anzahl hypermethylierter Gene und dem Schweregrad der Dysplasie der IPMN [46].

MCN sind die seltensten der drei hier beschriebenen Vorläuferläsionen des PDAC [37]. Sie betreffen vor allem das weibliche Geschlecht und sind meist im distalen Bereich des Pankreas lokalisiert [47]. MCNs treten in der Mehrzahl der Fälle solitär auf, sind meist asymptomatisch und daher häufig Zufallsbefunde [39]. Im Gegensatz zu IPMN besteht bei MCN kein struktureller Zusammenhang mit den pankreatischen Ausführungsgängen [45]. Basierend auf dem Grad der Atypie werden nichtinvasive MCN in leichtgradig, mittelgradig und hochgradig dysplastisch eingeteilt. Ungefähr ein Drittel der MCN entartet invasiv und entwickelt sich dann in der Folge meist zu PDAC [48]. Generell ist die Prognose für Patienten mit MCN sehr gut. So ist die 5-Jahres-Überlebensrate bei nicht invasivem MCN beinahe 100%, während Patienten, die sich einer Resektion einer invasiven MCN unterziehen, immer noch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 60% haben.

#### 1.4.4. Azinär-zu-Duktale Metaplasien

Das PDAC ist der häufigste Tumor des Pankreas. Obwohl die Zellen des PDAC morphologische Ähnlichkeiten zu den nicht entarteten Zellen der pankreatischen Ausführungsgänge haben, sind Herkunft und Entstehung des PDAC nicht sicher auf duktales Gewebe zurückzuführen [49]. So suggerieren Ergebnisse von Forschungsarbeiten mit genetisch veränderten Mäusen eher eine azinäre Herkunft [50] im Sinne einer ADM als Vorläuferläsion für Pankreastumore [51]. Der azinäre Ursprung wurde durch Markierung per Cre/loxP-Methode aufgezeigt [52].

Die Azinuszellen des Pankreas besitzen die Fähigkeit zur Plastizität. Das bedeutet, dass sich die Azini unter dem Einfluss von Noxen, z.B. im Rahmen von Entzündungsreaktionen, morphologischen Veränderungen unterziehen können, welche zu einem duktzell-ähnlichen Phänotyp führen. Diese metaplastischen Strukturen tragen aktiv zur Regeneration des Azinusgewebes nach Schädigung bei [53]. In genetisch unveränderten Mäusen, sogenannten Wildtypen, zeigten sich diese azinär-zu-duktales Metaplasien jedoch als nicht permanent, und nahmen nach Beendigung des jeweiligen schädlichen Einflusses wieder ihre ursprüngliche, azinäre Differenzierung an [54]. Die ADM ist im Normalfall also reversibel.

Neben Noxen führt auch die Aktivierung bestimmter Signalwege zur Ausbildung von ADM, z.B. EGF-Rezeptor Signalweg [52], Notch-Signalweg [55] oder die Wnt-Signaltransduktion [54]. Hier besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen der De-regulation einzelner Signalwege und damit verbundener Überaktivität, und dem Auftreten von ADM.

### 1.5. Wnt-Signaltransduktion

#### 1.5.1. Was ist Wnt-Signaltransduktion?

In der Entwicklung von Organismen aus wenigen Zellen zu potenziell hochkomplexen Systemen spielen molekulare Signalwege durch Beteiligung und Beeinflussung diverser Schlüsselereignisse in der Embryogenese eine Rolle von kaum zu überschätzender Wichtigkeit. Zuerst im Rahmen von entwicklungsbiologischen Beobachtungen als Theorien formuliert, kam es durch intensive Forschung in den letzten 3 Dekaden zur Entdeckung mehrerer solcher Signalwege, z.B. Hedgehog, BMP oder dem Wnt-Signaltransduktionsweg [56].

Die Wnt-Signaltransduktion ist ein evolutionsgeschichtlich sehr alter und genetisch hochkonservierter Signalweg, der in viele Kernaspekte der Embryogenese wie Zell-



differenzierung und –migration, Strukturierung des Nervensystems und Organogenese eingreift. Durch die zentrale Rolle in der Organogenese und die katastrophalen Konsequenzen einer Deregulation unterliegt die Wnt-Signaltransduktion erheblicher Kontrolle. Folge einer defekten Wnt-Signaltransduktion können mannigfaltige Pathologien wie skeletale und neuronale Defekte oder diverse Karzinome sein [57].

Unterschiedliche Wnt Proteine können den kanonischen, von  $\beta$ -catenin-abhängigen Wnt-Signaltransduktionsweg oder nicht-kanonische, von  $\beta$ -catenin-unabhängige Wnt-Signaltransduktionswege wie den sogenannten Planar-Cell-Polarity-Signalweg oder den Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg aktivieren [57].

Gegenstand weiterer deskriptiver Betrachtungen soll an dieser Stelle ausschließlich der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg sein.

Das ubiquitär von der Zelle ins Zytoplasma sezernierte Protein  $\beta$ -catenin wird bei Abwesenheit eines Wnt-Liganden von einem Proteinkomplex erkannt, phosphoryliert und proteasomaler Degradation zugeführt. Dieser Komplex setzt sich zusammen aus dem Protein Axin, dem Produkt des Tumor-Suppressor-Gens APC (adenomatöse polyposis coli), Casein Kinase 1 (CK-1) und Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3).  $\beta$ -catenin kann in diesem Zustand nicht akkumulieren und in den Zellkern gelangen. Dort werden die Zielgene der Wnt-Signaltransduktion von DNA-gebundenen Proteinen der TCF-LEF (T-Cell factor/lymphoid enhancer factor)-Familie supprimiert.

Aktiviert wird die Wnt-Signaltransduktion durch Bindung eines Wnt-Liganden an einen mehrfach transmembranös verlaufenden Frizzled (Fz)-Rezeptor und einen seiner Co-Rezeptoren LRP-6 (Low Density Lipoprotein Related Protein Receptor). Der daraus entstehende Proteinkomplex geht eine Verbindung mit dem Strukturprotein Dishevelled (Dvl) ein, was zur Phosphorylierung des LRP-6-Rezeptors führt. Diese Phosphorylierung bedingt nun die Bindung von Axin CK-1 und GSK-3 an den Ligand-Rezeptoren-Komplex, was die Unterbrechung der Phosphorylierung von  $\beta$ -catenin zur Folge hat und so den Prozess der proteasomalen Degradation von  $\beta$ -catenin unterbindet.  $\beta$ -catenin bindet im Nukleus das TCF bzw. LEF-Proteine, was in der Folge zur Aktivierung der Expression vielfältiger Zielgene führt (siehe Abbildung 1) [58].

Beispiele für durch den Wnt Signaltransduktionsweg induzierte Zielgene sind *n-myc*, *Lgr5* oder *Isl1*. *N-myc* ist unter anderem wichtig für die Ausdifferenzierung pluripotenter Stammzellen während der Entwicklung des Bewegungsapparates [59]. In den Krypten des Dünndarms finden sich Zellen, in denen das Wnt-Ziel-Gen *Lgr5* exprimiert wird. Diese Zellen sind Stammzellen des Zylinderepithels und für die Regeneration des Dünndarmepithels verantwortlich. Das Expressionsmuster von *Lgr5* deutet

auch auf eine Beteiligung an Stammzellen multipler weiterer Gewebe hin [60]. Während der Organentwicklung des Herzens reguliert das Gen *Isl1* die Proliferation und Migration kardiovaskulärer Progenitorzellen [61]. Diese Beispiele belegen, dass der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg oft in Stammzellen bzw. Progenitorzellen aktiv ist.

Axin als zentraler Teil des Degradationskomplexes ist ebenfalls ein Ziel-Gen der Wnt-Signaltransduktion. Im Rahmen einer negativen Feedback-Schleife wird die Aktivität von Axin bei aktiver Wnt-Signaltransduktion hochreguliert. Dies dient der Verhinderung unkontrollierter Signalaktivität, welche schwerwiegende Gewebsentartungen zur Folge haben kann [62].

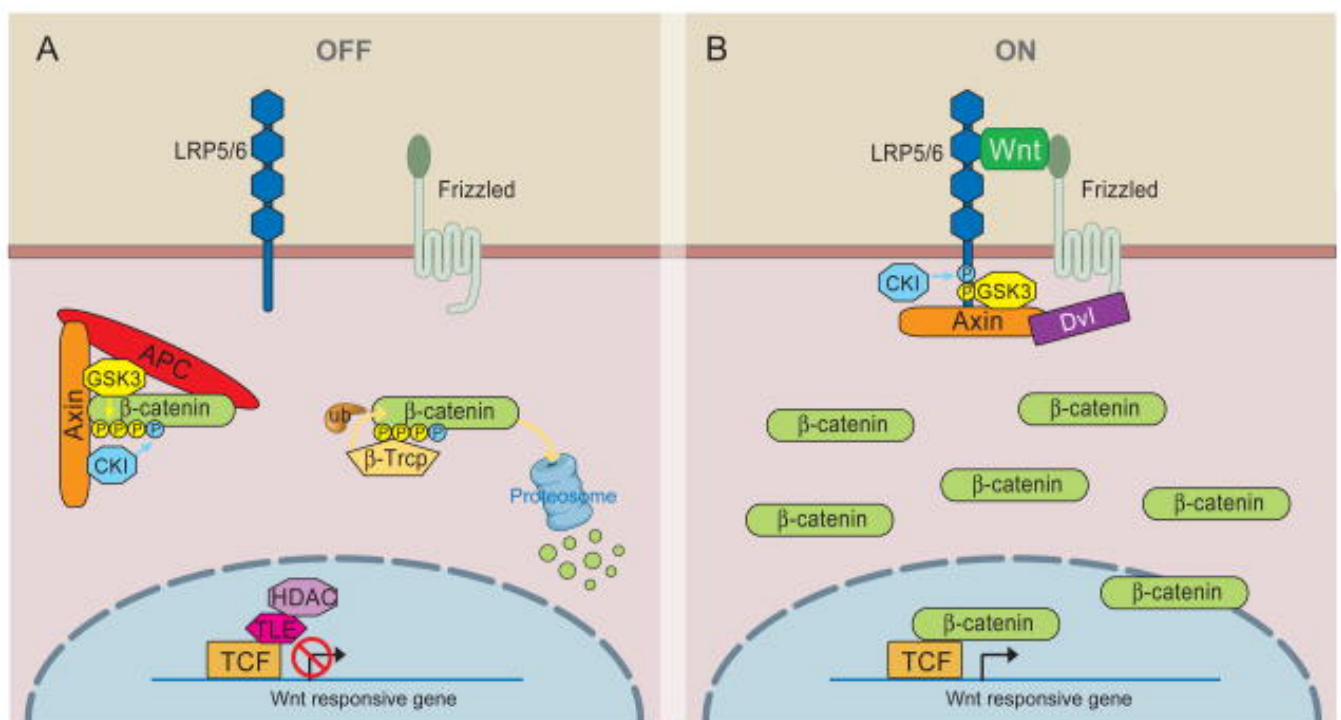


Abbildung 1: MacDonald et al. [58] Schematische Darstellung von inaktiver (A) und aktiver (B) Wnt-Signaltransduktion

### 1.5.2. Wnt-Signaltransduktion und Neoplasien

Durch die schon fast ubiquitäre Beteiligung der Wnt-Signaltransduktion an zentralen Prozessen eines Organismus kann ein Versagen der kontrollierenden Instanzen gravierende Konsequenzen haben.

Im Bereich gastrointestinaler Gewebsentartungen spielt die Wnt-Signaltransduktion eine wichtige Rolle. In der Mehrzahl der Fälle wird die Entwicklung kolorektaler Tumore durch eine Inaktivierung des APC-Tumorsuppressor-Gens initiiert. APC ist ein

im Zytoplasma vorhandenes Protein, welches an  $\beta$ -catenin bindet und dessen Degradation beschleunigen kann [63]. In gesundem kolorektalen Epithelium verhindert APC eine dauerhafte Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion. Im Falle einer Mutation des APC-Gens greift dieser Mechanismus nicht mehr und es kommt zur erhöhten Aktivität von  $\beta$ -catenin. Dieses formt im Nukleus einen Komplex mit Tcf-4, was wiederum zur Expression von c-myc führt [64]. c-myc ist ein Proto-Onkogen, welches Einfluss auf diverse Prozesse, wie Zellwachstum, Proliferation, De-Differenzierung und Apoptose, hat [65]. In normalem Zustand ist die mRNA von c-myc sehr instabil, sodass es nicht zu unkontrollierter Akkumulation kommt. Falls es jedoch durch erhöhte  $\beta$ -catenin-Konzentration zu einer Aktivitätserhöhung kommt, ist die Konsequenz erst ein unkontrollierter Proliferationsreiz und dann ultimativ die Entwicklung eines Tumors [66]. Das für  $\beta$ -catenin codierende Gen ist ebenfalls ein möglicher Ursprung kolorektaler Karzinogenese. Mutationen des Gens führen zu einer Veränderung der Aminosäurestruktur des Proteins, was den Degradationsmechanismus per APC-Anbindung verlangsamt. So zeigen mutierte  $\beta$ -catenin eine bis zu 6-fach erhöhte Aktivität in Anwesenheit von APC im Vergleich zu Wildtyp-Varianten [67].

Cyclin D1 ist ein weiteres Gen, welches gleichzeitig sowohl Ziel-Gen der Wnt-Signaltransduktion als auch Onkogen in der Entwicklung von Kolonkarzinomen ist. Es ist ein integraler Bestandteil der G-Phase des Zellzyklus und damit notwendig für Zellteilung [68]. Bei aktiver Wnt-Signaltransduktion geht das akkumulierende  $\beta$ -catenin im Zellkern eine Bindung mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 ein, was wiederum zur Aktivierung von Cyclin D1 führt. Die Folge ist eine gesteigerte Zellteilungsrate.

Eine durch Ausfall der Kontrollinstanzen bedingte, dauerhaft aktive Wnt-Signalaktivität führt auf diesem Wege zu unkontrolliertem Wachstum und zur Entstehung von Tumoren [69].

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) als eine der weitverbreitetsten Tumorentitäten ist in seiner Entstehung ebenfalls vom Wnt-Signalweg beeinflusst. Etwa 30% aller HCC zeigen Wnt-Signalaktivität [70]. Neuere Forschungsergebnisse suggerieren sogenannte Cancer Stem Cells (CSC) mit stammzellähnlichen Fähigkeiten als Ursache für Karzinome im Allgemeinen und dem HCC im Besonderen [71]. Die Applikation des  $\beta$ -catenin-Inhibitors FH535 an CSC der Leber führt zu einer Verringerung der Proliferationsrate dieser Zellen [70], womit ein kausaler Zusammenhang zwischen aktiver Wnt-Signaltransduktion und der Progression von HCC hergestellt werden

kann. Eine weitere Gruppe von Tumoren, die durch den Wnt-Signalweg beeinflusst werden, sind die Neubildungen der Mamma.

Das Gen LBH (Limb-Bud and Heart) spielt eine große Rolle in der Entwicklung der Extremitäten und des Herzens [72]. Zur Aktivierung dieses Gens bedarf es jedoch der Anbindung von TCF/LEF, was wiederum nur bei aktiver Wnt-Signaltransduktion möglich ist. Eine LBH-Überexpression verhindert allerdings die Differenzierung mammären Epithels. LBH ist pathologisch hoch aktiv in Mamma-Tumoren von MMTV (mouse mammary tumor virus)-Wnt1-transgenen Mäusen sowie in aggressiven Mammakarzinomen vom basalen Subtyp mit Wnt-Hyperaktivität. Die De-Regulation von LBH in Verbindung mit der Entwicklung von Brustkrebs ist daher in Abhängigkeit von Wnt-Signaltransduktion zu sehen [73].

Das PDAC, als Neubildung mit katastrophaler Prognose, ist ebenfalls durch Wnt-Signaltransduktion beeinflusst. So zeigen Resektate von Patienten mit PDAC oder PanIN im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich erhöhte Werte für  $\beta$ -catenin-Aktivität [74]. Dies kann, ähnlich wie beim kolo-rektalen Karzinom auf Mutationen im APC-Gen zurückgeführt werden [75]. Die Behandlung von Adenokarzinom-Zelllinien mit Wnt-Signalweg-Inhibitoren führt sowohl zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität von  $\beta$ -catenin, als auch zu einer signifikanten Verringerung der Proliferationsrate der Zellen sowie einer gesteigerten Apoptose [76]. Es besteht weiterhin ein Zusammenhang zwischen dem Metastasierungsverhalten duktaler Adenokarzinome des Pankreas und erhöhter Wnt-Signalaktivität [77].

Zusammengefasst suggerieren diese Daten einen Zusammenhang zwischen Wnt-Signaltransduktion und dem Auftreten und Verlauf von Krebserkrankungen im Allgemeinen, und dem Auftreten und Verlauf pankreatischer Krebserkrankungen im Besonderen.

## 1.6. Zielstellung

Um die äußerst ungünstige Prognose des PDAC zu verbessern, kommt der Erforschung der Karzinogenese des PDAC eine große Bedeutung zu. Hierzu benötigt man allerdings tiefer greifendes Wissen über die möglichen Vorstufen des PDAC, wie ADM und deren Entstehung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen Wnt-Signaltransduktion und der Entwicklung von

ADM unter dem Einfluss PDAC-begünstigender Risikofaktoren, nämlich Diabetes mellitus und Pankreatitis, zu untersuchen.

## **2. Material & Methoden**

### **2.1. Tierhaltung und Mäusstämme**

Für das Experiment wurden männliche Mäuse vom Stamm C57BL/6 verwendet. Dieser Stamm ist in der Haltung unkompliziert, vermehrt sich ausgezeichnet und gehört zu den am meisten verwendeten Versuchstieren weltweit [78].

Zur Darstellung der Wnt-Signalaktivität per X-Gal-Färbung wurden gentechnisch veränderte C57BL/6-Tiere verwendet, bei denen ein Allel des Axin2-Gens durch ein lacZ-Gen ersetzt wurde ( $Axin2^{+/lacZ}$ ). Dieses Gen produziert bei Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges  $\beta$ -Galaktosidase. Dieser Maus-Stamm wurde uns freundlicherweise von Prof. Walter Birchmeier überlassen, und in der eigenen Versuchstierhaltung weiter gezüchtet. Zur Untersuchung der Funktion der Wnt-Signaltransduktion wurden C57BL/6-Tiere verwendet, bei denen beide Axin2-Allele ausgeknockt wurden ( $Axin2^{lacZ/lacZ}$ ). Diese genetische Variante wurde durch Züchtung in der eigenen Versuchstierhaltung erreicht. Als Kontrollgruppe fungierten für beide Varianten genetisch unveränderte Mäuse ( $Axin2^{+/+}$ ).

Den Tieren wurde freier Zugang zu labor-üblichem Tierfutter in Form von Pellets und Trinkwasser gewährt. Jeder Versuch war durch die deutsche Gesetzgebung im Rahmen des Tierschutzgesetzes legitimiert (TierSchG § 7-9).

### **2.2. Experimentelle Anordnungen**

#### **2.2.1. Induktion des Diabetes Mellitus**

Zur Simulation eines Diabetes mellitus wurde das Modell des STZ -induzierten Diabetes mellitus verwendet. STZ ist ein Stoff aus der Gruppe der Glucosamine und Nitrosoharnstoffe und zeichnet sich durch eine spezifische Toxizität den insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas gegenüber aus. Klinisch kommt es vor allem in der Behandlung von Insulinomen zur Anwendung. Chemisch betrachtet setzt sich STZ aus Methylnitrosoharnstoff und Glukose zusammen. Die spezifische Toxizität ist durch eine hohe Affinität der Substanz zum Glukosetransporter GLUT-2 bedingt, der

in hoher Konzentration in der Zellmembran der  $\beta$ -Zellen vorhanden ist. Innerhalb der Zelle kommt es zur Alkylierung der DNA und damit zur Inhibierung der Zellfunktion. Damit wird ein absoluter Insulinmangel im Sinne eines T1DM erreicht. Die Induktion des Diabetes mellitus erfolgte durch die intraperitoneale Applikation von 50mg/kg Körpergewicht STZ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in Einzeldosen an 5 aufeinander folgenden Tagen. Da STZ in wässriger Lösung sehr schnell zerfällt, wurde die Substanz erst kurz vor Applikation in der Trägerlösung Natriumcitrat aufgelöst. Als Vergleichsgruppen dienten Mäuse ohne induzierten Insulinmangel. Diese Tiere wurden nach demselben Applikations-Schema behandelt, nur dass statt der STZ-Natriumcitrat-Lösung reine Natriumcitrat-Lösung verwendet wurde.

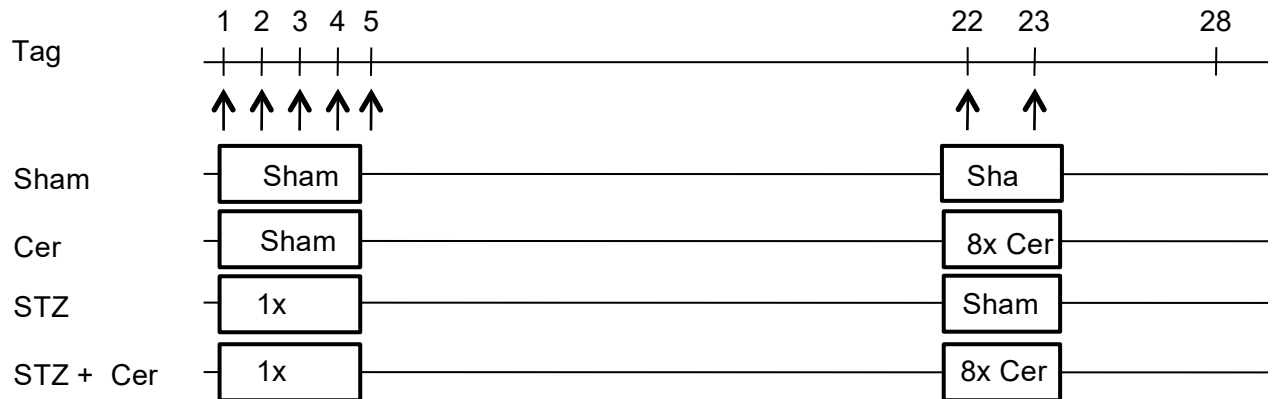
### 2.2.2. Induktion der chronischen Pankreatitis

Die Induktion der chronischen Pankreatitis erfolgte durch das Modell der Cerulein-induzierten Pankreatitis. Cerulein wurde 1967 erstmals auf der Haut seines Namensgebers, des Korallenfinger-Laubfrosches (*Litoria caerulea*), entdeckt. Es ist ein Oligopeptid, welches stimulierend auf gestreifte Muskulatur und die Sekretion von Verdauungssäften wirkt. Damit ist Cerulein analog zum physiologisch vorkommenden Cholezystokinin [88]. Außerdem unterstützt es durch die Hochregulierung des intrazellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten, was die Entzündungsreaktion weiter aggraviert. Üblicherweise in supramaximaler Dosierung verwendet, ist Cerulein ein im tierexperimentellen Kontext häufig verwendeter Induktor von Pankreatitis [88]. Zur Induktion der chronischen Pankreatitis wurde den Tieren der Versuchsgruppe je 1 bzw. 3 Wochen lang 50  $\mu$ g/kg Körpergewicht Cerulein (Sigma Aldrich Chemie GmbH) intraperitoneal injiziert. Dies geschah an 3 Tagen pro Woche, 3- mal täglich in stündlichem Abstand (siehe Fig. 1). Als Vergleichsgruppe fungierten Mäuse, die nach identischem Schema behandelt wurden, nur dass statt Cerulein die Trägerlösung 0,9 % NaCl injiziert wurde. Da chronische Pankreatitis ein Zustand ist, welcher mit großen Schmerzen einhergehen kann, erhielten die im Versuch genutzten Tiere mit Metamizol (Ratiopharm GmbH) versetztes Trinkwasser in der Dosierung 800mg pro Liter. Da Metamizol nach gewisser Zeit einen bitteren Geschmack entwickelt, wurde das Trinkwasser der Tiere täglich gewechselt.

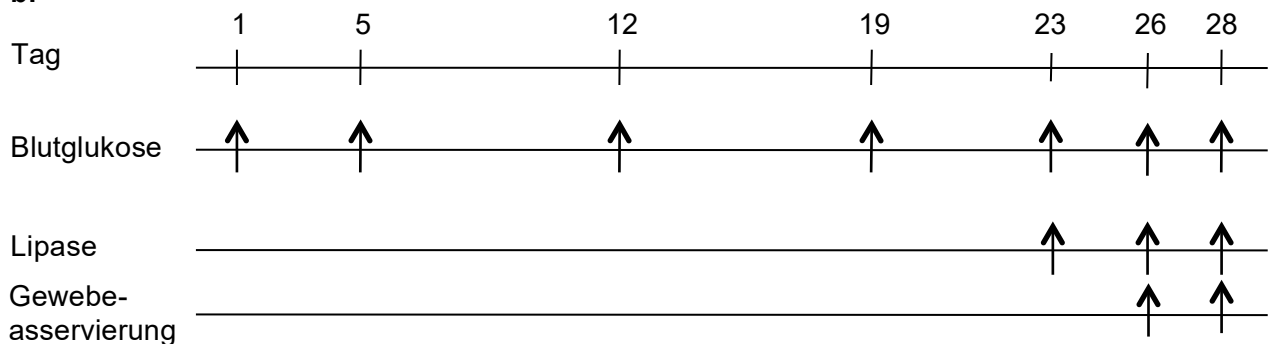


Tiere ebenfalls mit Metamizol versetztes Trinkwasser (800 mg pro Liter). Auch in diesem Versuch wurde wegen des nach einiger Zeit einsetzenden bitteren Geschmacks von Metamizol das Trinkwasser täglich gewechselt.

**a.**



**b.**



**Fig. 2:** Versuchsaufbau akute Pankreatitis. a. Modell der Induktion eines T1DM mittels i.p. Injektion von 50mg/kg KG STZ an Tag 1-5 und Induktion der akuten Pankreatitis mittels 8 repetitiven i.p. Injektionen von Cerulein (Cer) an Tag 22-23. Kontrolltiere wurden mit jeweils relevantem Lösungsmittel behandelt. b. Die Asservierung des Gewebes und des Plasmas erfolgte an Tag 23, 26 und 28.

## 2.3. Narkose, Blut- & Gewebeentnahme

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit 90mg/kg Körpergewicht Ketamin 10% (belapharm) und 7mg/kg Körpergewicht Xylazin 2% (Bayer HealthCare AG). Die Überprüfung der ausreichenden Narkosetiefe erfolgte per Druck auf die Schwanzspitze. Zeigte das anästhesierte Versuchstier daraufhin keinerlei Reaktion, wurde die Narkosetiefe als angemessen angenommen. Die Blutentnahme erfolgte per Glaskapillare (Sarstedt AG&Co) über die Punktion des retrobulbären Venenplexus. Dazu wurde die Kapillare am medialen Rand des Auges unter vorsichtigen Drehbewegun-



gen eingeführt und das gewonnene Blut in einem EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG&Co) aufgefangen.

Zur Entnahme des Gewebes wurde das Versuchstier per Genickbruch euthanasiert und folgend rücklings auf einer Wärmeplatte fixiert. Die Bauchdecke wurde per längsseitiger, großzügig durchgeführter, Laparotomie eröffnet. Die Dünndarmschlingen wurden zur Seite bewegt, um das Pankreas sichtbar zu machen. Da das pankreatische Gewebe äußerst empfindlich ist, wurde zur Exzision als Haltepunkt für die Pinzette die Milz aufgesucht. Anschließend wurde von der Milz nach medial unter äußerster Vorsicht das Pankreas von Magen, Dünndarm- und Dickdarmschlingen frei präpariert. Das entnommene Organ wurde gewogen und in 3 Einzelteile präpariert. Nach einer Teilung entlang der Länge des Organs wurde die obere Hälfte in TissueTek (Sakura Finetek Japan Co, Ltd) eingebettet, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20°C gelagert. Die untere Hälfte wurde entlang der Querachse geteilt, wobei der Bereich des Kopfes in Proberöhren (SarstedtAG&Co) in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert, und der Bereich des Schwanzes in speziellen Kassetten (Leica Microsystems Nussloch GmbH) in Formalin fixiert wurde, um später in Paraffin eingebettet zu werden.

## 2.4. Blut- & Plasmaanalyse

### 2.4.1. Blutzuckermessungen

Zum Monitoring der Entwicklung eines manifesten T1DM wurde die Blutzuckerkonzentration der Versuchstiere am ersten und fünften Tag, danach im wöchentlichen Abstand sowie am Tag der Gewebeentnahme gemessen. Dazu wurde die äußerste Schwanzspitze der Tiere mit einer dünnen Nadel punktiert, und die gewonnenen Tropfen Blut zur Messung mit dem Blutglukosemeter contour (Bayer Vital GmbH) aufgefangen.

### 2.4.2. Lipaseaktivität

Zur Qualitätskontrolle der induzierten Pankreatitis wurde am Tag der ersten Cerulein-Injektion sowie am Tag der Gewebeentnahme die Lipase-Aktivität im Blut der Versuchstiere gemessen. Dazu wurden circa 200 µl Blut, per oben beschriebener Methode, in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Nach 10-minütiger Zentrifugierung bei

1200 G wurde das überstehende Plasma per Pipette extrahiert und bei -20°C eingelagert.

Die Messung der Lipaseaktivität erfolgte per kolorimetrischem Enzymtest: dazu wurden 80 µl von R1-Reagens mit 2 µl der Plasmaprobe sowie 48 µl SR-Reagenz in ein Messröhrchen pipettiert. Durch die Vermischung der einzelnen Reagenzien (siehe Tabelle 2) kommt es zur Abspaltung eines chromogenen Substrates (1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester), welches durch die katalytische Aktivität der Lipase in Anwesenheit von Colipase in einen instabilen Metaboliten (Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester) umgesetzt wird. Dieser Metabolit zerfällt in alkalischer Lösung spontan u.a. in rotes Methylresorufin. Die Absorption wurde bei 583 nm im Cobas c 111 Spektrophotometer (Roche Diagnostics International AG) gemessen. Die Extinktion des Metaboliten ist dabei direkt proportional zur Aktivität der Lipase.

Reagenzien	Inhalt
R1 <i>Roche Diagnostics</i> <i>Best.-Nr.: 05401704 190</i>	N,N-bis(2hydroxyethyl)glycin Puffer: 50mmol/L, pH 8,0; Colipase (Schweinepankreas): ≥0,9mg/L; Na- desoxycholat: 1,6mmol/L; Calciumchlorid: 10mmol/L; Detergenz; Konservierungsmittel
SR <i>Roche Diagnostics</i> <i>Best.-Nr.: 05401704 190</i>	Tartrat-Puffer: 10mmol/L, pH 4,0; 1,2-O- Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6- methylresorufin)-ester: 0,27mmol/L; Taurodesoxycholat: 8,8mmol/L; Detergenz; Konservierungsmittel

Tabelle 2: Reagenzien zur Lipase-Bestimmung

## 2.5. Histologie

### 2.5.1. Histologische Aufarbeitung

Zur Fixierung des Gewebes mit anschließender histologischer Aufarbeitung wurden 2 Techniken verwendet. Die in TissueTek-Gel eingefrorenen Gewebeproben wurden mit dem Leica CM 1850 Cryostat (Leica Microsystems) bei Temperaturen zwischen -

18°C und -25°C in 7 µm dünne Scheiben geschnitten und anschließend auf gläserne Objektträger aufgebracht. Die so gewonnenen Schnitte wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wurde die Schnitte fixiert. Dazu wurden 2ml 25% Glutaraldehyd-Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH) in 98 ml, auf pH 7,2 gepufferter, 4% Formaldehyd-Lösung (Grimm MED Logistik GmbH) gemischt. Diese Lösung wurde anschließend auf 4°C herabgekühlt. Die Schnitte wurden für 2 Minuten in der Fixierlösung und anschließend in 2 PBS (life technologies)-enthaltenden Behältern für jeweils 1 respektive 10 Minuten gebadet. Danach erfolgte erneut ein Trocknungsvorgang bei Zimmertemperatur. Die Objektträger wurden anschließend bei -20°C gelagert und für die Prozessierung mit X-Gal-Färbung verwendet.

Die in Formalin eingelegten Gewebeproben wurden für 2-3 Tage in der Lösung belassen. Formalin stoppt die Autolyse des Gewebes durch Vernetzung und Denaturierung der enthaltenen Proteine, macht die Probe dauerhaft haltbar, und ermöglicht so die Einbettung in Paraffin. Paraffin ist allerdings hydrophob, was einen Austausch des im Gewebe enthaltenen Wassers gegen Ethanol nötig macht. Da sich Ethanol wiederum nicht mit Paraffin mischen lässt, wurde das Ethanol durch X-TRA-Solv (MEDITE GmbH) ersetzt. Anschließend wurden die Proben in flüssiges, heißes Paraffin überführt. Die beschriebenen Prozesse wurden automatisiert von einer Histokinette (Leica TP1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH) ausgeführt. Von den nun entstandenen Paraffinblöcken wurden in einem Mikrotom (Leica RM2145, Leica Biosystems Nussloch GmbH) 4 µm dünne Schnitte abgetrennt. Die entstandenen Schnitte fielen, nach Abtrennung, direkt in ein 40°C warmes Wasserbad, an dessen Oberfläche sie mit Pinzetten faltenfrei gezogen und anschließend auf Objektträger aufgebracht wurden. Zur Trocknung und besseren Anhaftung wurden die Schnitte für 60 Minuten bei 60°C gebacken.

## 2.5.2. Enzymatische Färbungen & Immunhistochemie

### 2.5.2.1. X-Gal-Färbemethode

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) ist ein künstlich hergestelltes Glycosid und gleichzeitig chromogenes Substrat für das Enzym β-Galactosidase. Die β-Galactosidase teilt X-Gal per hydrolytischer Spaltung in Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, was vom in der Luft enthaltenen Sauerstoff zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Diese Eigenschaft macht sich die Forschung

in der Anwendung des lacZ-Reporter-Gens zu nutze. Das lacZ-Gen wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Birchmeier mittels homologer Rekombination in ein Allel des zu untersuchenden Gens, Axin2, eingefügt und produziert nach Aktivierung des Wnt Signaltransduktionsweges und Induktion der Transkription von Axin2 das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Die Intensität der Blaufärbung eines bestimmten histologischen Abschnittes steht so im Verhältnis zum Ausmaß der Aktivität des Wnt Signaltransduktionsweges. Zur Durchführung der X-Gal-Färbung bedarf es zweier Lösungen. Zum einen einer Basislösung, bestehend aus 0,82 g Kaliumferricyanid, 1,05 g Kaliumferrocyanid, 1 ml 1M Magnesiumchlorid und PBS. Das PBS dient hier als Trägerlösung, und wird solange hinzugegeben, bis die Basislösung ein Volumen von 500ml erreicht hat. Zum anderen der eigentlichen X-Gal-Färbelösung, bestehend aus 1 g X-Gal-Pulver (Sigma Aldrich Chemie GmbH) gelöst in 25 ml DMSO (Merck KGaA). Nun wurden 2 ml der X-Gal-Lösung in 78 ml der Basislösung gemischt, und die fixierten, mit dem Cryostaten hergestellten Schnitte für 24-48 h in dieser Lösung gebadet. Anschließend wurden die Schnitte aus der Lösung gehoben, und der überstehende Anteil vorsichtig von den Objektträgern geschüttelt. Es folgten 3 jeweils 3-minütige Wasserbäder zum Abspülen der restlichen Färbeflüssigkeit. Danach wurden die Schnitte 10 Sekunden durch Aqua Dest geschwenkt, bevor sie 3 Minuten in Kern-echtrot-Färbung (Nuclear Fast-Red Stain Kit, Dako, Agilent Technologies Inc.) gefärbt wurden. Anschließend erfolgte eine erneute Spülung durch 10-sekündiges Schwenken in Aqua Dest, gefolgt von einem 10-minütigen Bad in lauwarmem Wasser. Im vorletzten Schritt wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, bevor sie schlussendlich mit Deckgläschen luftdicht abgeschlossen wurden.

#### **2.5.2.2.: Immunhistochemie**

Die Methode der Immunhistochemie basiert auf der selektiven Bindung eines Antikörpers an ein bestimmtes Antigen. Zur Darstellung dieser Bindung muss der Antikörper entweder mit Enzymen zur Bildung eines farbigen Reaktionsproduktes oder fluoreszierenden Farbstoffen markiert sein. Hauptsächlich kommen 2 Techniken zum Einsatz. Zum einen die direkte Immunhistochemie, bei welcher der primär bindende Antikörper an den Farbstoff bzw. das Enzym gekoppelt wird, und zum anderen die indirekte Immunhistochemie, bei der ein sekundärer, mit Farbstoff oder Enzym versehender Antikörper an den Primärantikörper bindet. Der Vorteil der indirekten Im-

munhistochemie ist die Tatsache, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können, und so ein viel stärkeres Signal erzeugen, was die Empfindlichkeit der Methode deutlich erhöht. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mit dem Prinzip der indirekten Immunhistochemie gearbeitet. Um die Immunhistochemie an den Paraffinschnitten durchführen zu können, wurden diese zuerst rehydriert. Da durch das Bad in Formalin die Proteine der Gewebe miteinander vernetzt wurden, kann der Antikörper nicht ohne weiteres binden. Zur sogenannten Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte in der Mikrowelle bei 700 Watt für 7 Minuten in Dako target retrieval solution (Dako GmbH) erhitzt und nach der Abkühlung mit Leitungswasser gespült. Um unspezifische und daher verzerrende Hintergrundsignale zu reduzieren, wurde die Aktivität endogener Peroxidasen via Peroxidase-Blocking solution (Dako GmbH) inhibiert und der Schnitt anschließend nochmals mit Leitungswasser gespült. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an Gewebeproteine zu minimieren, wurden die Schnitte für 30 min mit Protein-Block, Serum-Free (Dako GmbH) behandelt. Danach wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl des primären Antikörpers versetzt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach Abschluss der Bindung des Primärantikörpers wurden die Schnitte je dreimal für 2 Minuten mit Leitungswasser gespült, um überstehende ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden 100 µl des Sekundärantikörpers auf die Schnitte gegeben und für 40 Minute belassen. Danach erfolgten erneut drei 2-minütige Waschgänge unter Leitungswasser. Nach Beendigung der Waschung wurde ein, für die an die Sekundärantikörper gebundenen Enzyme spezifisches, chromogenes Substrat hinzugegeben. Die Suffizienz der Färbereaktion wurde durch optische Kontrolle per Mikroskop eingeschätzt und die Reaktion zum idealen Zeitpunkt durch eine letzte Spülung, wieder dreimal für 2 Minuten, beendet. Als finaler Arbeitsschritt wurde eine Hämalun-Gegenfärbung durchgeführt.

Zwecks Lokalisation des Axin2 Proteins wurden 2 Antikörper verwendet: der Anti-Conductin (sc-8570)-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) und der Anti-Axin2(ab32197)-Antikörper (Abcam).

### 2.5.3. Histologische Auswertung

Alle histologischen Auswertungen wurden am Olympus BX51 Mikroskop durchgeführt. Die in den Abbildungen am jeweils unteren rechten Bildrand aufgeführte quanti-

tative Angabe wurde zur genaueren Aufschlüsselung eingeführt, wobei n/n/n die Anzahl der Versuchstiere einer Behandlungsgruppe mit Ausbildung X-Gal-positiver ADM (n1) zur Gesamtzahl aller Versuchstiere einer Behandlungsgruppe mit Ausbildung von ADM (n2) und Anzahl aller Versuchstiere einer Behandlungsgruppe (n3) ins Verhältnis setzt.

## 2.6. Proteinanalyse

### 2.6.1. Proteinextraktion und Konzentrationsmessung

Zunächst wurden je 30 mg einer Gewebeprobe ausgewogen, anschließend zusammen mit einer Mahlkugel in ein Röhrchen gegeben, um dann mit Hilfe eines Dismembrators pulverisiert zu werden. Im nächsten Schritt wurde 100 µl Lysispuffer je 10 mg Gewebe hinzugegeben und die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert, wobei während der Kühlung die Gefäße mehrfach geschüttelt wurden. Zuletzt wurden die Proben für 10 Minuten bei 10000 U/min in einer vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand mit den extrahierten Proteinen abpipettiert.

Das so gewonnene Material wurde mit Aquat bidest im Verhältnis 1:10 verdünnt, wobei dann 12,5 µl der Verdünnung in je eine Aussparung einer 96-well-Platte eingebracht wurde. Zusätzlich wurden 100 µl eines BCA-CU<sup>2+</sup>-Gemisches (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in jedes well eingebracht, da die Proteinbestimmung im Doppelansatz erfolgte. Sodann wurden die Proben auf einem Schüttler unter Lichtschutz bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Absorptionsmessung wurde bei 563 nm im Sunrise-ELISA-Reader (Tecan Group Ltd.) durchgeführt, die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve.

#### Lysispuffer

Substanz	Konzentration	Menge
Tris [µl] pH 7,5	1 M	100
NaCl [µl]	5 M	20
EDTA [µl]	250 mM	4
Triton-X-100 [µl]	10 %	500
NaN <sub>3</sub> [µl]	4%	50
PMSF [µl]	100 mM	200

Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) [µl]		100
H <sub>2</sub> O [ml] ad 10 ml		9,026

PMSF Stammlösung: 100 mM (0,174 g/10 ml in Ethanol)

Für phosphorylierte Proteinanalysen wird eine Tablette PhosStop (Roche) hinzugegeben.

### 2.6.2. Gel-Elektrophorese und Western Blot

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. In einem ersten Schritt werden die Proben mit Proteinladepuffer versetzt, um in je 40 µl gleiche Teile Protein und Proteinladepuffer zu erreichen. 6-fach Proteinladepuffer besteht dabei aus 3,75 ml Tris pH 6,8, 1,2 g Sodiumdodecylsulfat, 6,85 g Glycerin, 231,3 mg Dithiothreitol, 0,3 ml Bromphenolblau und 10 ml Aqua dest. Um die Proteinlysate zu denaturieren, wurden die Proben auf 95°C erhitzt und dann bei 10000 U/min für 3 Sekunden zentrifugiert.

Die Konzentration von Acrylamid in der Herstellung des Trenngels richtet sich nach dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine. Für Axin2 mit einem Gewicht von 90 kDa wurde ein 10%-iges Gel verwendet. Für das Sammelgel wurde ein 5%-iges Gel verwendet.

Zuerst wurde das Trenngel aus den jeweiligen Bestandteilen (siehe Tabelle) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol abgekippt. Dann wurde das Sammelgel aus den jeweiligen Bestandteilen (siehe Tabelle) gegossen, ein Probenkamm zur Formung der Taschen eingesetzt, und für 30 Minuten polymerisiert. Anschließend wurde der Kamm wieder entfernt und die hergestellten Gele mit den formgebenden Glasplatten in die MiniPROTEAN-Elektrophoreseeinheit (BioRad Laboratories GmbH) eingebaut. Die Elektrophoreseeinheit wurde dann mit Laufpuffer (pH 8,3, Tris 30,3 g, Glycin 144 g, SDS 10 g) befüllt, bis die Taschen ca. 4 mm mit Puffer überschichtet waren. Anschließend wurden die Proben in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert und die Elektrophoreseeinheit an eine Spannung von 20 mA angeschlossen, bis die Proben das Sammelgel passiert hatten. Für die elektrophoretische Auftrennung im Trenngel wurde die Spannung auf 40 mA erhöht. Als Stromquelle diente das Power Pac 300 (BioRad Laboratories GmbH). Zur Darstellung des Längenstandards wurde eine peqGold-Proteinmarker IV (PEQLAB Biotechnologie GmbH) verwendet.

Trenngel (Angaben für 2 Trenngele):

Substanz	Konzentration	6%	10%
H <sub>2</sub> O [ml]		4,05	2,75
Tris pH 8,8 [μl] (Roth)	1 M	3,75	3,75
Acrylamid [ml] (Sigma)	30 %	2	3,3
SDS [μl] (Serva)	10%	100	100
APS [μl] (Serva)	10%	100	100
TEMED [μl] (Appli- chem)			

Sammelgel (Angabe für 2 Sammelgele)

Substanz	Konzentration	Menge
H <sub>2</sub> O [ml]		4,1
Tris pH 8,8 [μl] (Roth)	1 M	0,75
Acrylamid [ml] (Sigma)	30 %	1
SDS [μl] (Serva)	10%	50
APS [μl] (Serva)	10%	50
TEMED [μl] (Appli- chem)		5

Der Transfer der Ergebnisse von Gel auf Papier erfolgte per Semi-Dry Blot. Dazu wurden zunächst drei mmCHR-Blottingpapiere (GE Healthcare Europe GmbH) in Kathodenpuffer (Tris 25 mM, Glycin 40 mM 0,751 g, Methanol 20 % 200 ml), zwei Blottingpapiere in Anodenpuffer I (Tris 300 mM 34,34 g, Methanol 20% 200 ml) und ein Blottingpapier in Anodenpuffer II (Tros 25 mM 34,34 g, Methanol 20% 200 ml) gegeben. Die Transfermembran wurde für einige Sekunden in 100% Methanol getränkt, dann für zwei Minuten in Aqua bidest gewaschen und in einem letzten Schritt für fünf Minuten in Anodenpuffer II equilibriert. Der Zusammenbau des SemiDry-Blotters (PEQLABD Biotechnologie GmbH) geschah wie folgt: zwischen Anode und



Kathode wurden zunächst zwei Blottingpapiere mit Anodenpuffer I, ein Blottingpapier mit Anodenpuffer II und darauf die Membran geordnet. Auf die Membran wurde zunächst das Gel und wiederum darauf die drei Blottingpapiere mit Kathodenpuffer gelegt. Die zum Blotten nötige Spannung von  $2,8 \text{ mA/cm}^2$  wurde über 2 Stunden unter Benutzung eines Standard Power Pack P25 (BioMetra GmbH) erzeugt. Nach erfolgreichem Blot und Dekonstruktion der Vorrichtung erfolgte ein kurzer Waschvorgang in TBST und anschließend die Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran mit 10 mM BSA-Lösung für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ . Nach abgeschlossener Blockade wurden zunächst die Primärantikörper aufgetragen. Zum Nachweis von Axin2 wurde ab32197 der Firma Abcam benutzt. Zum Nachweis von conductin wurde sc8570 der Firma Santa Cruz benutzt. Anschließend wurde die Membran dreimal in TBST für 10 Minuten und danach zweimal in TBS für 15 Minuten gewaschen. Nach erfolgreichem Waschvorgang wurden die Sekundärantikörper aufgetragen.

Danach erfolgte erneut der oben beschriebene Waschgang. Anschließend wurde die Membran mit einer Pierce ECL-2-Reagenz (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG) in Verdünnung 1:50 behandelt und für fünf Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. Die Visualisierung der Proteinexpression erfolgte per luminolverstärkter Chemilumineszenz im ChemiDocXRS-System (Bio-Rad Laboratories), wobei das erzeugte Bild abschließend photographisch dokumentiert wurde. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Tubulin verwendet. Die Wasch- und Entwicklungsprozedur ist mit dem oben bereits beschriebenen Ablauf identisch.

## 2.7. Statistik

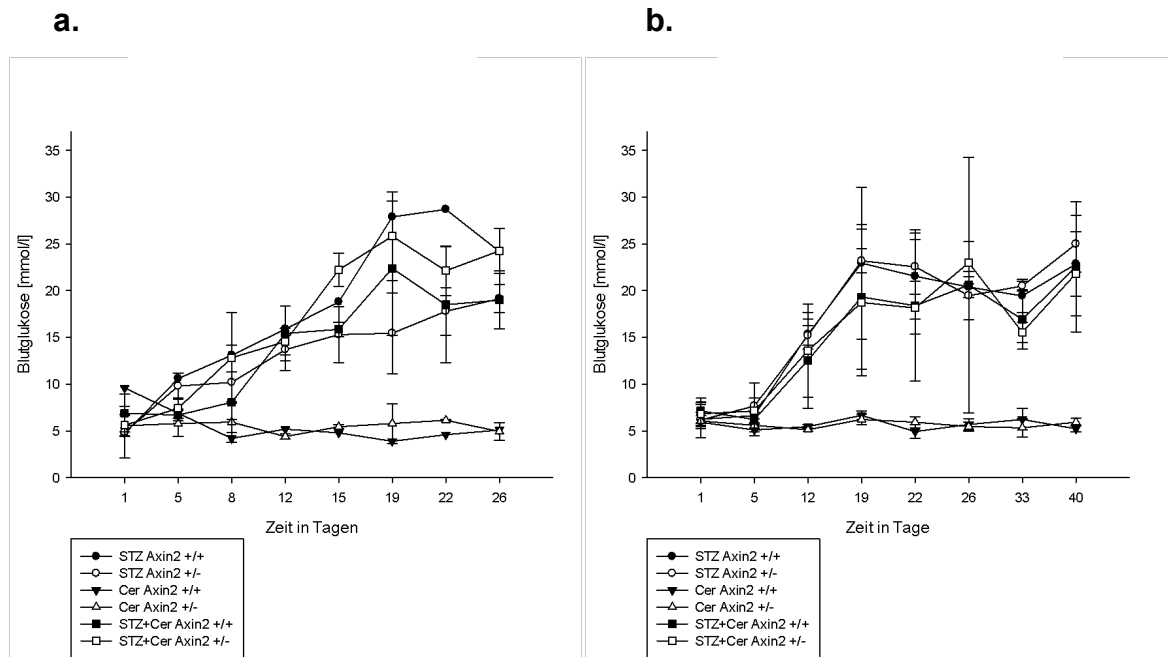
Alle in dieser Arbeit enthaltenen Diagramme und Graphen wurden unter Verwendung der Statistiksoftware SigmaPlot 12 [Systat Software, Inc.] erstellt. Linienstreudiagramme zeigen die Standardabweichung sowie den Mittelwert an. Die Boxplot-Graphen zeigen den Median und das 25. und 75. Quartil, sowie das 10. und 90. Quantil als Whisker. Zur Berechnung möglicher Signifikanzen wurde der Mann-Whitney rank-sum Test verwendet, ebenfalls unter Mithilfe von SigmaPlot 12.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Manifestation von induziertem Diabetes mellitus und Pankreatitis**

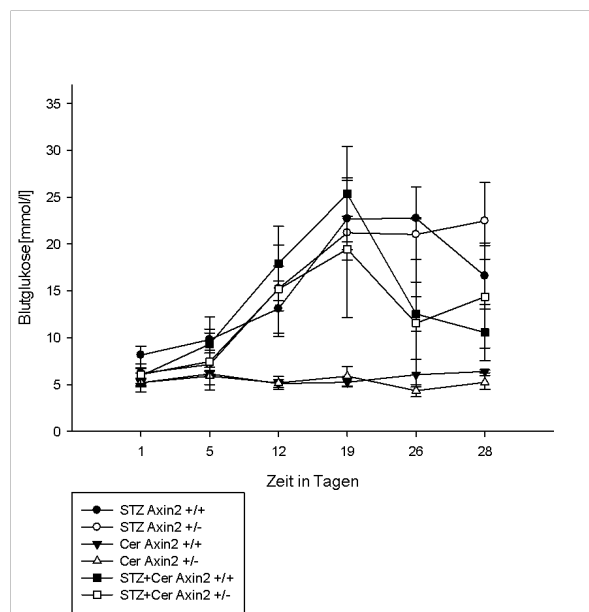
##### **3.1.1. Diabetes mellitus**

Die Induktion eines Diabetes mellitus durch intraperitoneale Injektion von STZ konnte versuchsübergreifend suffizient reproduziert werden. Als Kontrollparameter für die Ausprägung des Diabetes mellitus eignet sich die Blutzuckerkonzentration. In der Versuchsreihe über die Induktion einer chronischen Pankreatitis mit Gewebeentnahme am Tag 26 lagen die Mittelwerte der maximal erreichten Blutglukosekonzentration bei den STZ-behandelten Tieren Genotyp-übergreifend zwischen 19,1 mmol/l und 28,7 mmol/l. Für die Gruppe der STZ+Cer-behandelten Tiere lagen die Mittelwerte der maximalen Blutglukosekonzentrationen zwischen 22,4 mmol/l und 25,8 mmol/l (Fig. 3 a). In der Versuchsreihe über die Induktion einer chronischen Pankreatitis mit Gewebeentnahme am Tag 40 lagen die Mittelwerte der maximalen Blutglukosewerte bei den STZ-behandelten Tieren Genotyp-übergreifend zwischen 23,0 mmol/l und 25 mmol/l (Fig. 3 b). Für die Gruppe der STZ+Cer-behandelten Tiere lagen diese Werte zwischen 22,6 mmol/l und 23 mmol/l. In den Gruppen der Sham- sowie Cer-behandelten Tieren kam es zu keiner Entwicklung einer diabetischen Stoffwechselsituation (Fig. 3 b).



**Fig. 3:** Darstellung der Entwicklung der Blutglukosekonzentration nach STZ- bzw. Sham-Behandlung während der Induktion chronischer Pankreatitis unter Berücksichtigung des Genotyps. Die mit STZ behandelten Tiere entwickelten im Verlauf reproduzierbar eine Hyperglykämie. a. Verlauf des Blutglukoselevels während chronischer Pankreatitis mit Gewebeentnahme an Tag 26. b. Verlauf des Blutglukoselevels während chronischer Pankreatitis mit Gewebeentnahme an Tag 40.

In der Versuchsreihe über die Induktion einer akuten Pankreatitis lagen die Mittelwerte der Blutglukosekonzentration bei den STZ-behandelten Tieren Genotypübergreifend zwischen 22,48 mmol/l und 22,75 mmol/l. Für die Gruppe der STZ+Cer-behandelten Tiere lagen diese Werte zwischen 21,65 mmol/l und 25,36 mmol/l. In den Gruppen der Sham- sowie Cer-behandelten Tiere kam es zu keiner Entwicklung einer diabetischen Stoffwechselsituation (siehe Fig. 4).

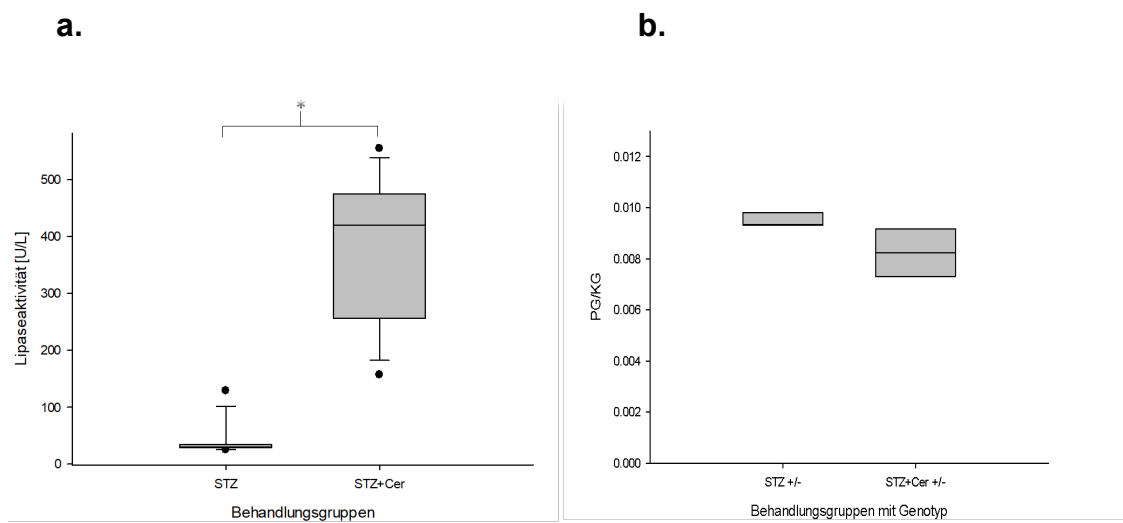


**Fig. 4:** Darstellung der Entwicklung der Blutglukosekonzentration bis zum Tag 28 nach STZ- bzw. Sham-Behandlung während der Induktion akuter Pankreatitis unter Berücksichtigung des Genotyps. Die mit STZ behandelten Tiere entwickelten im Verlauf reproduzierbar eine Hyperglykämie.

### 3.1.2. Pankreatitis

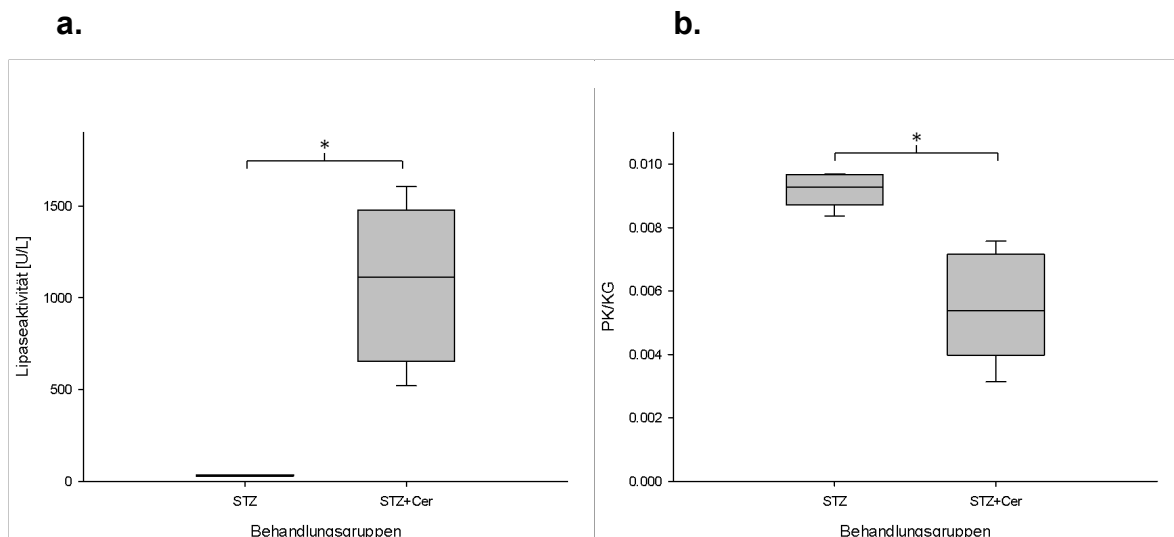
Die Induktion einer chronischen Pankreatitis durch intraperitoneale Injektion von Cerulein-Lösung konnte ebenfalls versuchsübergreifend suffizient reproduziert werden. Als Kontrollparameter für die Ausprägung der chronischen Pankreatitis dienten zwei Werte: einerseits wurde die Konzentration des Pankreasenzym Lipase im Blut gemessen. Lipase ist ein verwendeter Biomarker in der Diagnose von Bauchspeicheldrüsenentzündungen. Zudem wurde zur Darstellung des Ausmaßes der entzündungsbedingten Atrophie das Verhältnis von Pankreasgewicht zu Körpergewicht ermittelt. Im Folgenden sind zur Verdeutlichung beide Parameter der STZ-behandelten Tiere im Vergleich zu den STZ+Cer-behandelten Tieren dargestellt. Die Lipaseaktivität der STZ-behandelten Tiere lagen am Entnahmetag 22 signifikant unter der Lipaseaktivität der STZ+Cer-behandelten Tiere (siehe Fig. 5 a). Das Verhältnis von Pankreasgewicht zu Körpergewicht lag bei den STZ-behandelten Tieren an Tag 40 der

chronischen Pankreatitis zwischen 0,0093 und 0,00997 und bei den STZ+Cer-behandelten zwischen 0,0073 und 0,0092 (siehe Fig. 5 b).



**Fig. 5:** Darstellung der Kontrollparameter für chronische Pankreatitis. a. Lipaseaktivität nach STZ bzw. STZ+Cer Behandlung. n=8 (STZ), n=8 (STZ+Cer) b. Verhältnis von Körpergewicht zu Pankreasgewicht im Vergleich nach STZ bzw STZ+Cer be-handlung. n=3 (STZ], n=2 (STZ+Cer). Statistische Auswertung: Mann-Whitney Rank Sum Test, Signifikante Unterschiede mit \*p<0,01.

Die suffiziente Induktion einer akuten Pankreatitis durch intraperitoneale Injektion von Cerulein wurde mit den gleichen Parametern wie bei chronischer Pankreatitis kontrolliert. Die Lipasewerte der STZ-behandelten Tiere lagen am Entnahmetag 23 signifikant unterhalb der STZ+Cer-behandelten Tiere (siehe Fig. 6 a). Das Verhältnis von Pankreasgewicht zu Körpergewicht lag bei den STZ-behandelten Tieren signifikant über dem der STZ+Cer-behandelten Tiere (siehe Fig. 6 b).

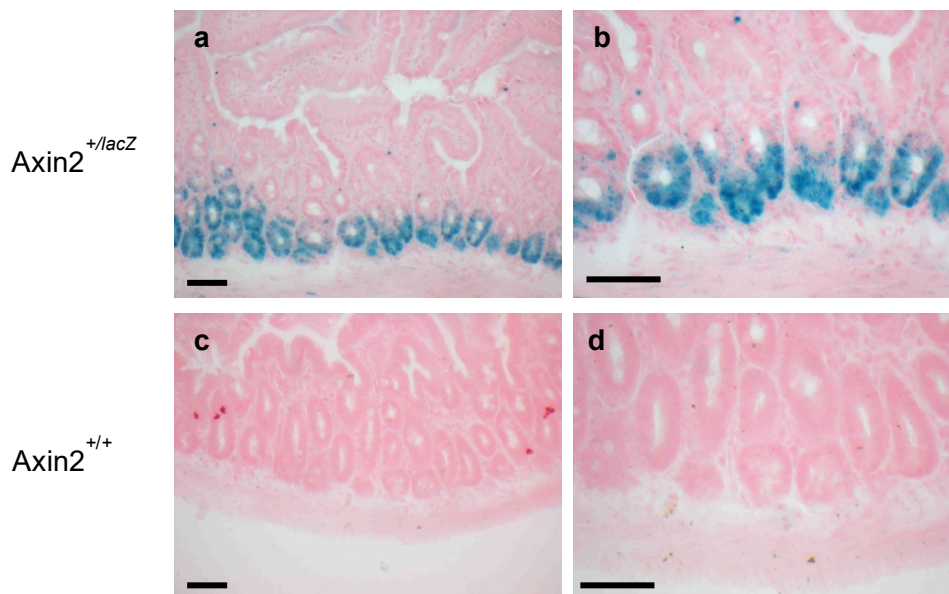


**Fig. 6:** Darstellung der Kontrollparameter für akute Pankreatitis. a. Die Lipaseaktivität von STZ behandelten Mäusen ist signifikant niedriger als bei STZ+Cer behandelten Mäusen. n=3 (STZ), n=11 (STZ+Cer) b. Die Pankreasatrophie ist in der STZ+Cer Gruppe signifikant ausgeprägter als in der STZ Gruppe. n=5 (STZ), n=7 (STZ+Cer). Statistische Auswertung: t-test, Signifikante Unterschiede bei \*p<0,05.

## 3.2. Darstellung der Aktivität der Wnt-Signaltransduktion

### 3.2.1. Dünndarmschnitte als Positivkontrollen

Zur Sicherstellung der Aussagekraft der erzeugten Ergebnisse und der Reproduzierbarkeit der verwendeten Methoden wurden in jeder Versuchsreihe Positivkontrollen mitgeführt. Zur Darstellung der Wnt-Signalaktivität eignet sich Gewebe des Dünndarms. In den Krypten des Dünndarms sind Stammzellen lokalisiert die sich durch konstant hohe Wnt-Signalaktivität auszeichnen. In allen mitgeführten Positivkontrollen waren die Kryptenbereiche stets tiefblau gefärbt. Die dazugehörigen Negativkontrollen blieben ebenfalls stets negativ (siehe Abb. 7 a-d).

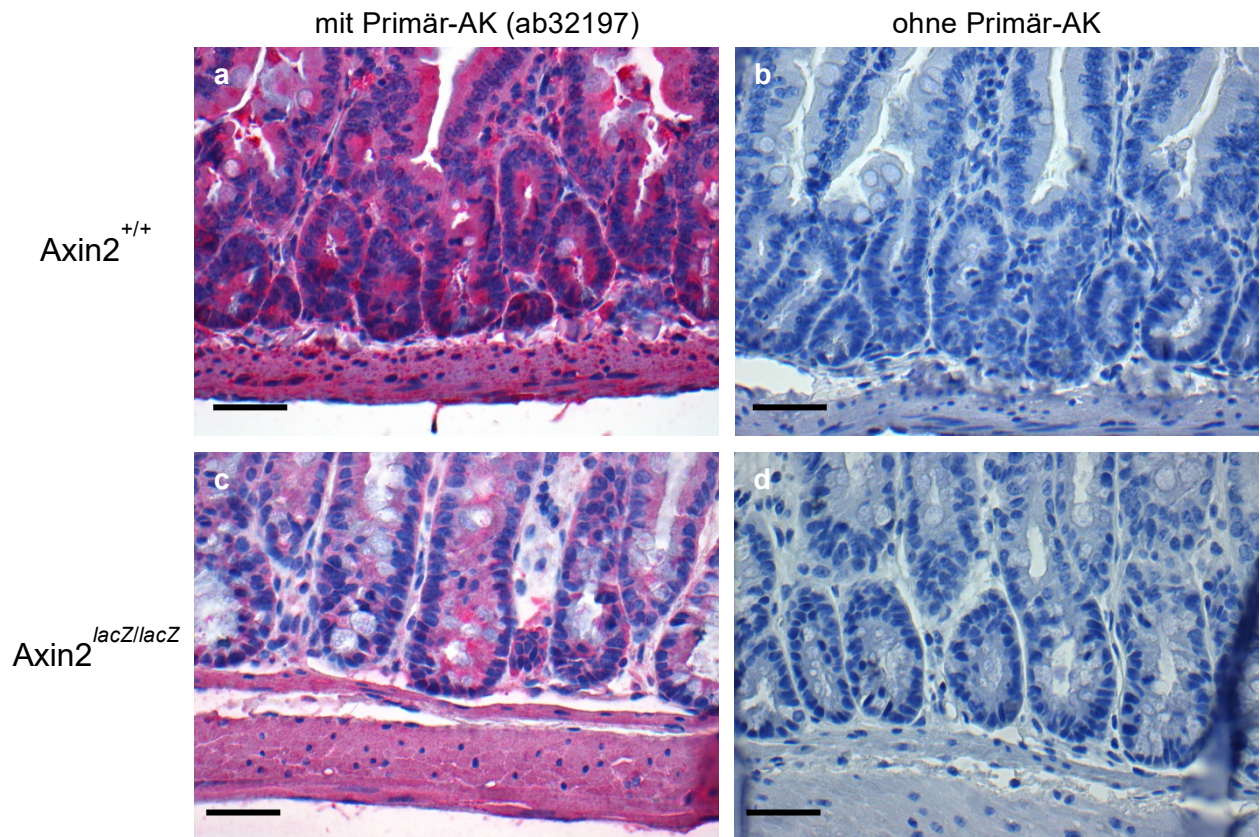


**Fig. 7:** Positiv- und Negativkontrolle der Darstellung der Wnt-Signalintensität per X-Gal-Färbung mittels Darmpräparat einer heterozygoten (*Axin2*<sup>+/lacZ</sup>) bzw. homozygoten (*Axin2*<sup>+/+</sup>) *lacZ*-Maus. Die X-Gal-Färbung zeigt eine suffiziente Spezifität/Sensitivität in der Darstellung von Wnt-Signaltransduktion. a. und b. Positivkontrolle (*Axin2*<sup>+/lacZ</sup> Maus). c und d. Negativkontrolle (*Axin2*<sup>+/+</sup> Maus). Schwarzer Balken entspricht 0.05 mm.

### 3.2.2. Fehlende Sensivität/Spezifität Immunhistochemie

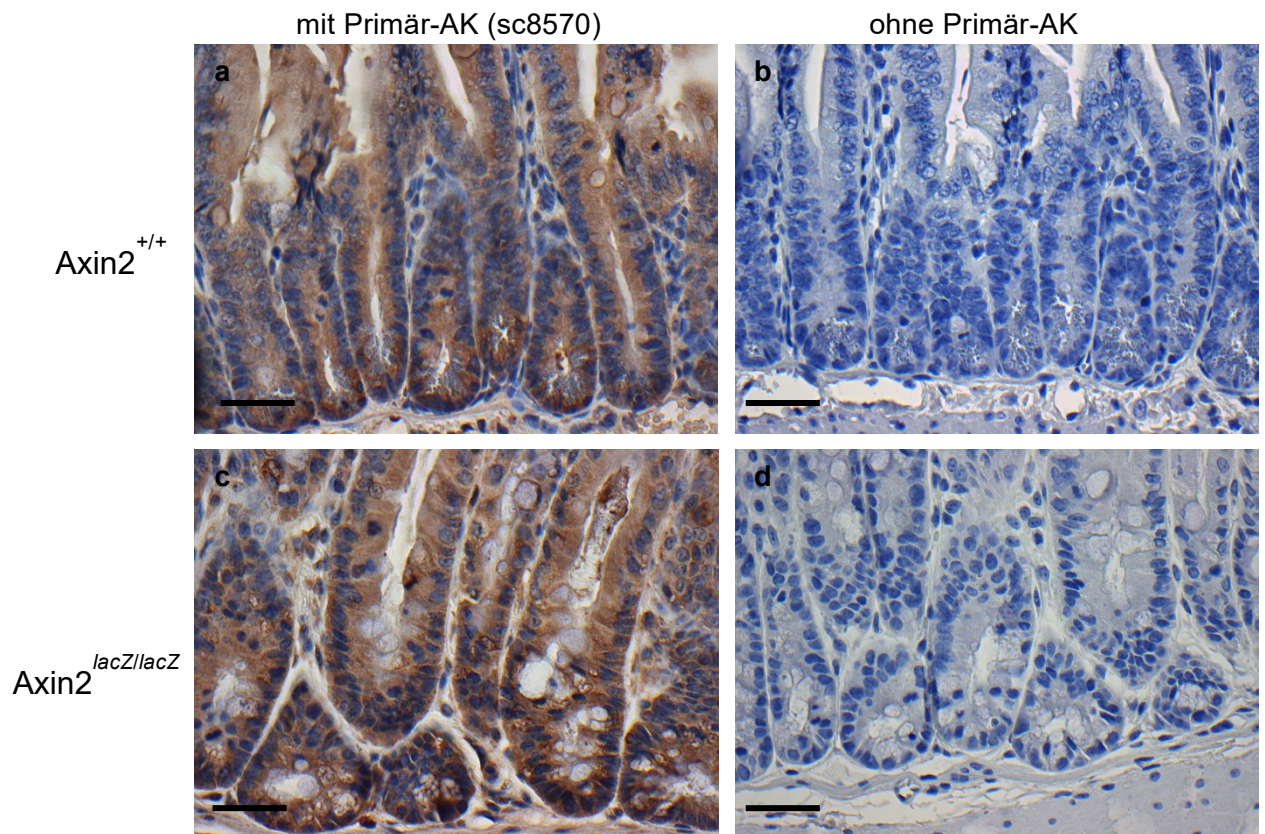
Als alternative Methode zur Darstellung der Wnt-Signalaktivität wurde Axin2 protein mittels Immunhistochemie dargestellt. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei der Behandlung mit Anti-Axin2-Antikörpern (ab32197, Abb. 8 a-d) als auch mit Anti-Conductin-Antikörpern (sc8570 Abb. 9a-d) in der Positiv- sowie in der Negativkontrol-

le die Antikörper mit Gewebeproteinen reagierten. Durch diese Unspezifität erwiesen sich diese Antikörper zur Detektion von Wnt-Signalaktivität als ungeeignet.



**Fig. 8:** Mit Anti-Axin 2-AK behandelte Darmpräparate (von Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup> und Axin2<sup>+/+</sup> Mäusen) zeigen eine unspezifische Bindung des Antikörpers a. Axin2<sup>+/+</sup> mit Primär-AK. b. Axin2<sup>+/+</sup> ohne Primär-AK. c. Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup> mit Primär-AK. d. Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup> ohne Primär-AK. Schwarzer Balken entspricht 0,05 mm.

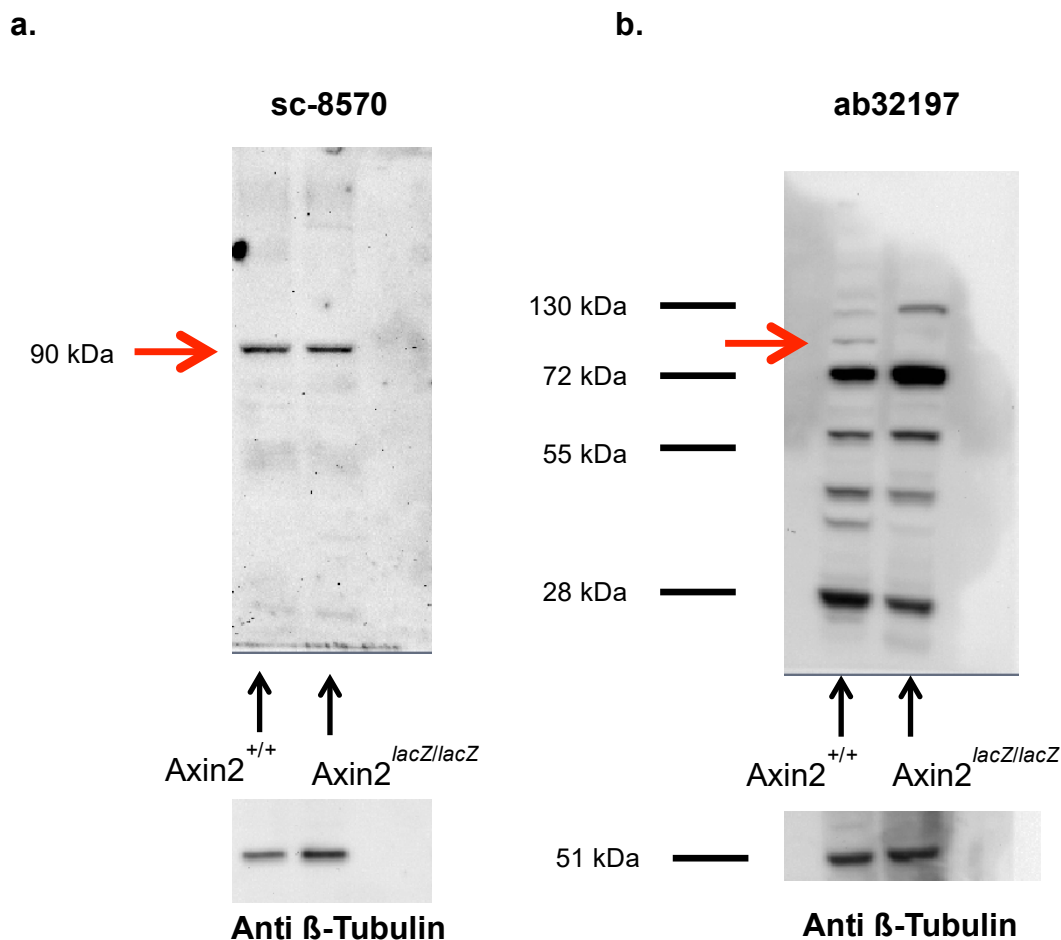




**Fig. 9:** Mit Anti-Conductin-AK behandelte Darmpräparate (von Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup> und Axin2<sup>+/+</sup> Mäusen) zeigen eine unspezifische Bindung des Antikörpers a. Axin2<sup>+/+</sup> mit Primär-AK. b. Axin2<sup>+/+</sup> ohne Primär-AK. c. Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup> mit Primär-AK. d. Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup> ohne Primär-AK. Schwarzer Balken entspricht 0,05 mm.

### 3.2.3. Fehlende Sensitivität/Spezifität WesternBlot

In der Quantifizierung der Wnt-Signalaktivität durch molekularbiologische Methodik wurden zwei Antikörper verwendet. Der Anti-Conductin-Antikörper (sc-8570) reagierte mit den Proteinen sowohl des Wildtyps als auch der als Negativkontrolle fungierenden Knockout-Probe. Der Anti-Axin2-Antikörper (ab32197) zeigte in der Bande für das Axin2-Protein bei circa 95 kDa ein leichtes Signal. Die dazugehörige Negativkontrolle reagierte nicht mit dem Antikörper (siehe Fig. 10a+b). Durch die nicht zufriedenstellende Sensitivität und Spezifität beider Antikörper kam die Darstellung der Wnt-Signaltransduktion per Western Blot im weiteren Verlauf der Doktorarbeit nicht zum Einsatz.



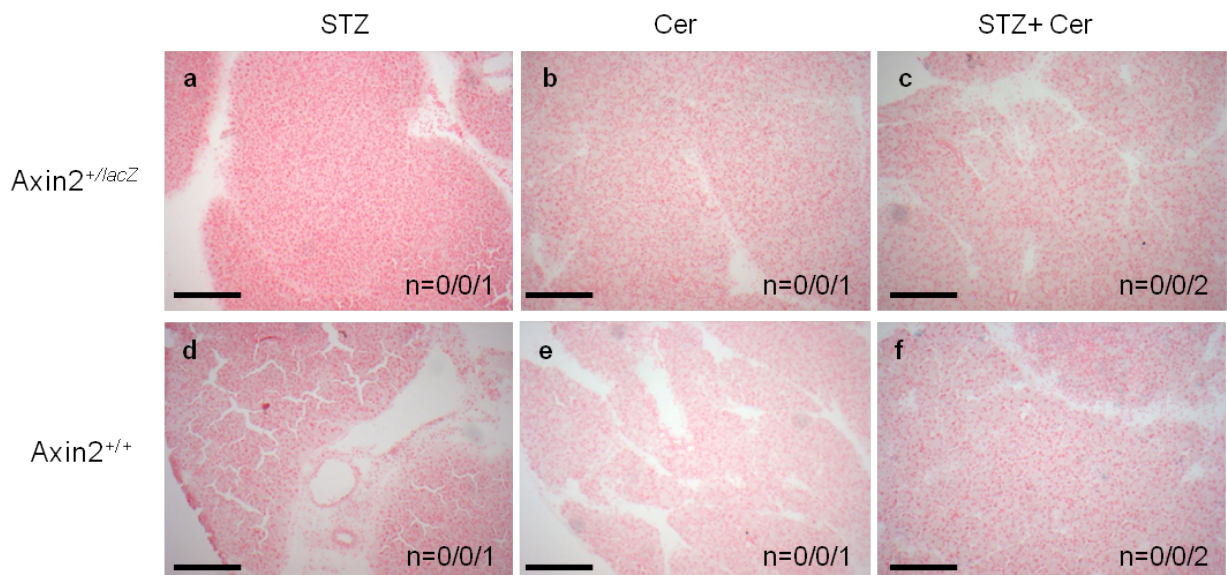
**Fig. 10:** Expression des Axin2-Proteins im Darmgewebe. Der verwendete Anti-Conductin-Ak zeigt ein unspezifisches Bindungsverhalten. Der verwendete Anti-Axin2-Ak zeigt ein unzureichendes Bindungsverhalten an das Axin2-Protein.

a. WesternBlot mit Anti-Conductin-AK im Vergleich der Genotypen Axin2<sup>+/+</sup> und Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup>. b. WesternBlot mit Anti-Axin2-AK im Vergleich der Genotypen Axin2<sup>+/+</sup> und Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup>. Der rote Pfeil markiert die zu erwartende Detektion von Axin2 bei ca. 90 kDa.

### 3.3. Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion bei chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus

#### 3.3.1. Keine Wnt-Signalaktivität bei kurzer chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus an Tag 26

Um den Zeitpunkt der Entstehung von ADM und den Beginn der Wnt-Signalaktivität genauer eingrenzen zu können, führten wir die Gewebeentnahme in der im Folgenden dargestellten Gruppen bereits an Tag 26 der chronischen Pankreatitis durch (siehe Fig. 11 a-f). In der  $Axin2^{+/lacZ}$  STZ- Gruppe zeigten sich keine histologischen Auffälligkeiten und keine Wnt-Signalaktivität. In der  $Axin2^{+/lacZ}$  Cer- Gruppe zeigten sich durch die Inflammation bedingte Veränderungen z.B. Fibrosestraßen und Aufweitungen der Zellzwischenräume. ADM oder Wnt-Signalaktivität wurden nicht detektiert. In der  $Axin2^{+/lacZ}$  STZ+Cer-Gruppe zeigten sich im Vergleich die inflammationsbedingten Veränderungen ausgeprägter. ADM oder eine Induktion der Wnt-Signaltransduktion wurden nicht beobachtet. In den zur Negativ-Kontrolle der X-Gal-Färbung mitgeführten Gruppen vom Genotyp  $Axin2^{+/+}$  zeigten sich die histologischen Veränderungen in gleicher Qualität jedoch ohne Auftreten von X-Gal-Färbung.



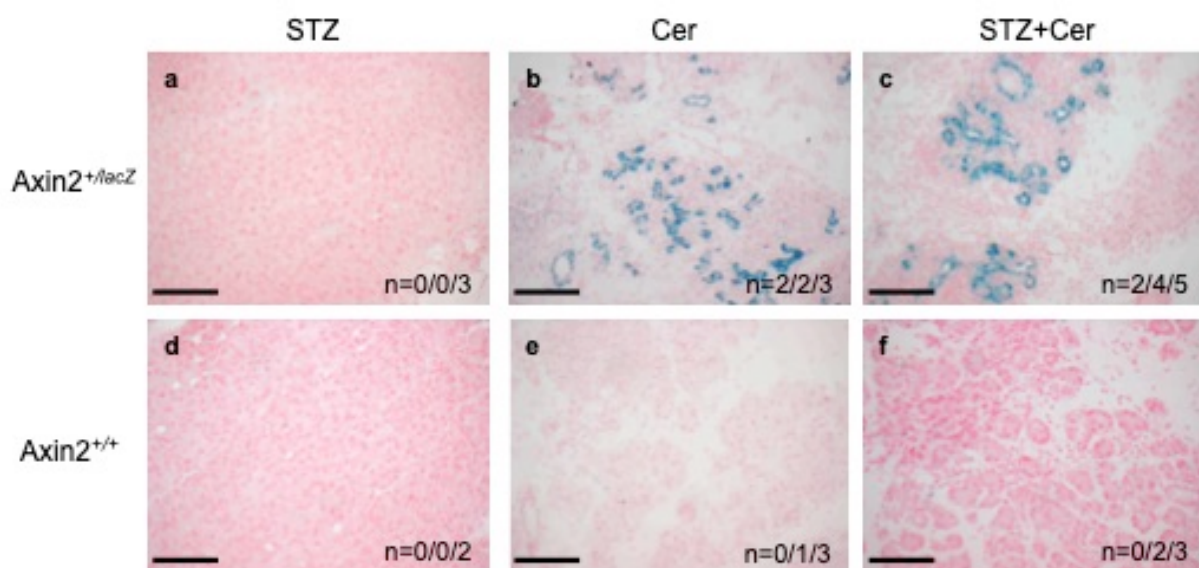
**Fig. 11a-f:** Pankreasgewebe zur Darstellung der Intensität der Wnt-Signaltransduktion an Tag 26 der chronischen Pankreatitis (Vergleich der Behandlungsgruppen STZ, Cer und STZ+Cer). In keiner Behandlungsgruppe kam es zur Ausbildung von ADM oder einer Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion a.  $Axin2^{+/lacZ}$  Maus aus STZ-Gruppe. b.  $Axin2^{+/lacZ}$  Maus aus Cer-Gruppe. c.  $Axin2^{+/lacZ}$  Maus aus STZ+Cer-Gruppe. d.  $Axin2^{+/+}$  Maus aus STZ-Gruppe. e.  $Axin2^{+/+}$  Maus aus Cer-Gruppe. f.  $Axin2^{+/+}$  Maus aus STZ+Cer-Gruppe. n = Zahl der X-Gal positiven ADMs /



Zahl der ADMs / Zahl der analysierten Pankreata. schwarzer Balken entspricht 0,2 mm.

### 3.3.2. Wnt-Signalaktivität in ADM bei chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus an Tag 40

Zur Analyse der Aktivität der Wnt-Signaltransduktion bei länger andauernder chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus erfolgte die Gewebeentnahme mit folgender histologischer Aufarbeitung an Tag 40 (siehe Fig. 11 g-l). In den Gewebeschnitten der  $Axin2^{+/lacZ}$  STZ-Gruppe zeigte sich das Pankreasgewebe histologisch unauffällig ohne Zeichen von Wnt-Signalaktivität. In der  $Axin2^{+/lacZ}$  Cer-Gruppe zeigte das Gewebe ADM als Zeichen entzündlicher Veränderung mit erhöhter Wnt-Signalaktivität, wobei diese vor allem im Bereich der ADM darstellbar war. In der  $Axin2^{+/lacZ}$  STZ+Cer-Gruppe waren ebenfalls entzündliche Veränderungen mit ADM zu sehen, wobei sich diese im mikroskopischen Vergleich zur Cer-Gruppe ausgeprägter darstellten. Die Blaufärbung als Indikator für die Intensität der Wnt-Signalaktivität zeigte sich in der  $Axin2^{+/lacZ}$  STZ+Cer Gruppe ebenfalls ausgeprägter im Vergleich zur  $Axin2^{+/lacZ}$  Cer-Gruppe, wobei sich die Wnt-Signalaktivität ebenfalls auf den Bereich der ADM konzentrierte. In den zur Negativ-Kontrolle der X-Gal-Färbung mitgeführten Gruppen vom Genotyp  $Axin2^{+/+}$  zeigten sich die histologischen Veränderungen in gleicher Qualität jedoch ohne Auftreten von X-Gal-Färbung.



**Fig. 12 a-f** Per X-Gal-Färbung dargestellte Wnt-Signalintensität am Tag 40 der chronischen Pankreatitis (Vergleich von  $Axin2^{+/lacZ}$  Mäusen und  $Axin2^{+/+}$  Mäusen der Behandlungsgruppen STZ, Cer und STZ+Cer). In den Gruppen Cer und STZ+Cer kam es reproduzierbar zu ADM mit aktivierter Wnt-Signaltransduktion a.  $Axin2^{+/lacZ}$  Maus aus STZ-Gruppe. b.  $Axin2^{+/lacZ}$  Maus aus Cer-Gruppe. c.  $Axin2^{+/lacZ}$  Maus aus

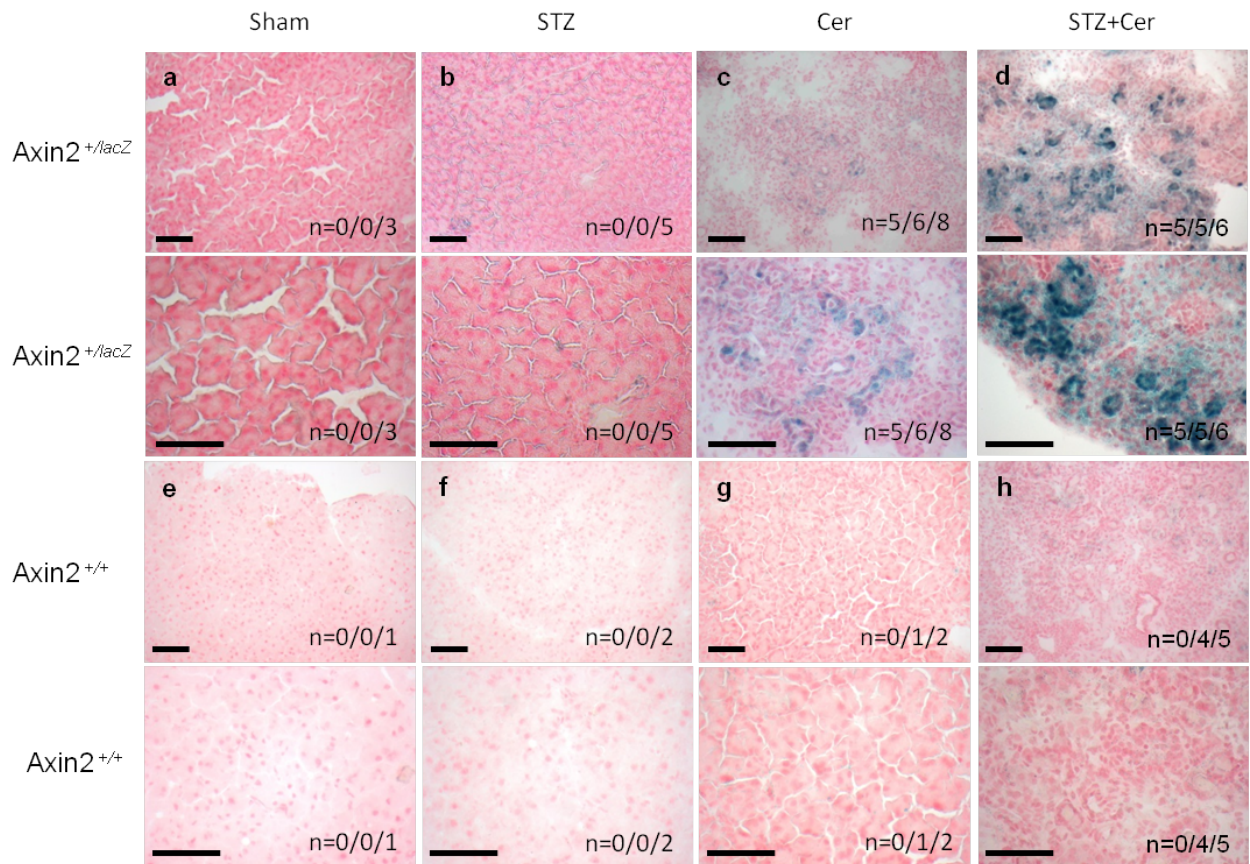
STZ+Cer-Gruppe. d.  $Axin2^{+/+}$  Maus aus STZ-Gruppe. e.  $Axin2^{+/+}$  Maus aus Cer-Gruppe. f.  $Axin2^{+/+}$  Maus aus STZ+Cer-Gruppe. n = Zahl der X-Gal positiven ADMs / Zahl der ADMs / Zahl der analysierten Pankreata. Schwarzer Balken entspricht 0,1 mm

### 3.4. Aktivierung von Wnt-Signaltransduktion bei akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus

#### 3.4.1. Wnt-Signalaktivität in ADM bei akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus an Tag 28

Ausgehend von der in den Experimenten zur chronischen Pankreatitis gewonnenen Erkenntnis, dass die Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion von der kumulativen Stärke des Entzündungsreizes abhängt, führten wir ein Experiment zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Kombination aus akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus, und dem Auftreten von ADM und Wnt-Signalaktivität durch (siehe Fig. 12 a-h). In der  $Axin2^{+/lacZ}$  Sham-Gruppe kam es zu keinen histologischen Veränderungen und zu keiner Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion. In der  $Axin2^{+/lacZ}$  STZ-Gruppe kam es ebenfalls zu keinen histologischen Veränderungen und zu keiner Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion. In der  $Axin2^{+/lacZ}$  Cer-Gruppe kam es zum Auftreten von ADM als Folge der akuten Inflammation. Es zeigte sich weiterhin eine dezente Blaufärbung, vor allem im Bereich der ADM, als Zeichen aktivierter Wnt-Signaltransduktion.

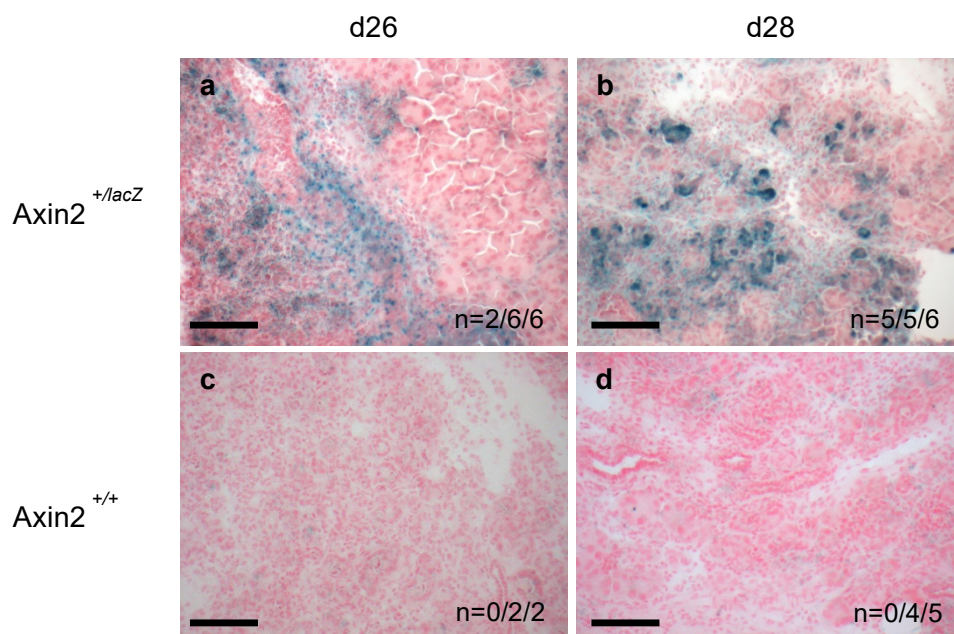
In der  $Axin2^{+/lacZ}$  STZ+Cer-Gruppe kam es zu ausgeprägten histologischen Veränderungen mit ADM und starker Blaufärbung als Zeichen starker Wnt-Signalaktivität, vor allem im Bereich der ADM. In den zur Negativ-Kontrolle der X-Gal-Färbung mitgeführten Gruppen vom Genotyp  $Axin2^{+/+}$  zeigten sich die histologischen Veränderungen in gleicher Qualität, jedoch ohne dass X-Gal gefärbte Gewebeareale detektiert wurden.



**Fig. 13:** Pankreasgewebe zur Darstellung der Intensität der Wnt-Signaltransduktion an Tag 28 der akuten Pankreatitis (Vergleich der Behandlungsgruppen Sham, STZ, Cer und STZ+Cer). In den Behandlungsgruppen STZ+Cer und Cer kam es reproduzierbar zur Ausbildung von ADM mit aktivierter Wnt-Signaltransduktion. Die Veränderungen zeigten sich ausgeprägter als bei chronischer Pankreatitis a. Axin2<sup>+/-lacZ</sup> Maus aus Sham-Gruppe. b. Axin2<sup>+/-lacZ</sup> Maus aus STZ-Gruppe. c. Axin2<sup>+/-lacZ</sup> Maus aus Cer-Gruppe. d. Axin2<sup>+/-lacZ</sup> Maus aus STZ+Cer-Gruppe. e. Axin2<sup>+/+</sup> Maus aus Sham-Gruppe. f. Axin2<sup>+/+</sup> Maus aus STZ-Gruppe. g. Axin2<sup>+/+</sup> Maus aus Cer-Gruppe. h. Axin2<sup>+/+</sup> Maus aus STZ+Cer-Gruppe. n = Zahl der X-Gal positiven ADMs / Zahl der ADMs / Zahl der analysierten Pankreata. Schwarzer Balken entspricht 0,05 mm.

### 3.4.2. Entwicklung der Wnt-Signalaktivität in ADM bei akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus von d26 bis d28

Zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Wnt-Signaltransduktion führten wir ein zusätzliches Experiment durch (siehe Fig. 13a-d). Versuchstiere vom Genotyp  $Axin2^{+/lacZ}$  wurden entsprechend dem Schema der Gruppe STZ+Cer behandelt, wobei die Entnahme der Gewebeproben bereits am Tag 26 der akuten Pankreatitis erfolgte und nach Anfärbung per X-Gal mit den Präparaten der entsprechenden Behandlungsgruppe von Tag 28 verglichen wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl von Präparaten mit ADM am Tag 26, nämlich sechs von sechs insgesamt, der Anzahl von Präparaten mit ADM am Tag 28, nämlich fünf von sechs, ähnlich ist. Allerdings ist die Intensität der Blaufärbung im Bereich der ADM als Zeichen der Intensität der Wnt-Signaltransduktion am Tag 28 im Vergleich zu Tag 26 deutlich höher. In den zur Negativ-Kontrolle der X-Gal-Färbung mitgeführten Gruppen vom Genotyp  $Axin2^{+/+}$  zeigten sich die histologischen Veränderungen in gleicher Qualität, jedoch ohne jegliche X-Gal-Färbung bestimmter Gewebeareale.



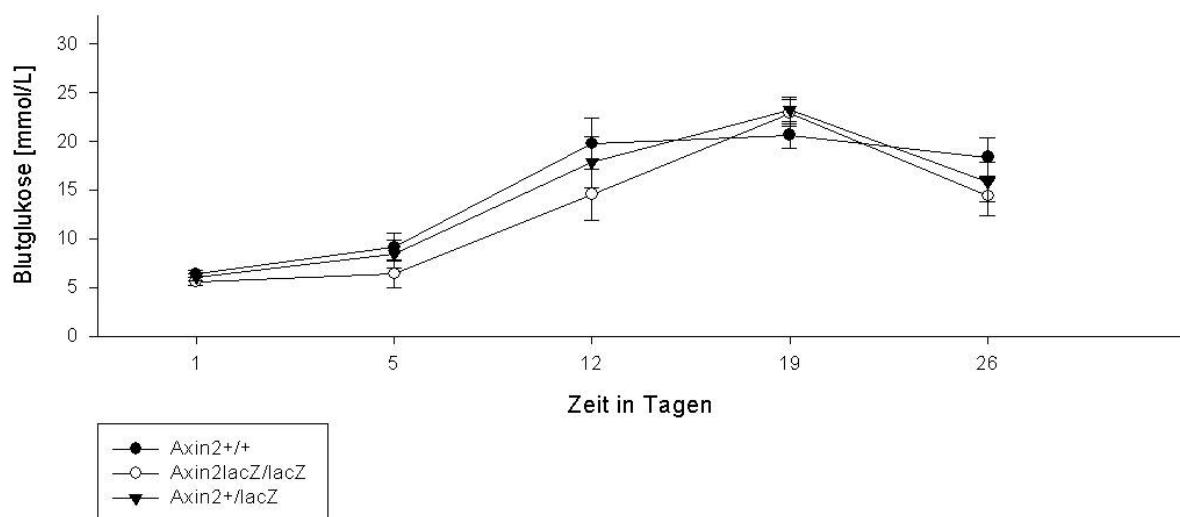
**Fig. 14:** Pankreasgewebe zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Wnt-Signalaktivierung per XGal-Assay von Tag 26 und Tag 28 der Behandlungsgruppe STZ+Cer (Vergleich der Genotypen  $Axin2^{+/lacZ}$  und  $Axin2^{+/+}$ ). Sowohl die Ausbildung von ADM als auch die Wnt-Signalaktivität war an Tag 28 ausgeprägter. a:  $Axin2^{+/lacZ}$  an Tag 26. b:  $Axin2^{+/lacZ}$  an Tag 28. c:  $Axin2^{+/+}$  an Tag 26 d:  $Axin2^{+/+}$  an Tag 28. n = Zahl der X-Gal positiven ADMs / Zahl der ADMs / Zahl der analysierten Pankreata. Schwarzer Balken entspricht 0,1 mm.

## 3.5. Funktion der Wnt-Signaltransduktion bei akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus

### 3.5.1. Kein Einfluss von Wnt-Signaltransduktion auf Blutglukosekonzentration

Zur Analyse des Einflusses der Wnt-Signaltransduktion auf die Blutglukosekonzentration bei akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus verglichen wir die Entwicklung des Parameters unter STZ+Cer-Therapie zwischen den Genotypen  $Axin2^{lacZ/lacZ}$ ,  $Axin2^{+/lacZ}$  und  $Axin2^{+/+}$ .

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verlauf, und damit kein signifikanter Einfluss aktivierter Wnt-Signaltransduktion auf die Entwicklung der Blutglukosekonzentration bei STZ+Cer Behandlung (siehe Fig. 14).



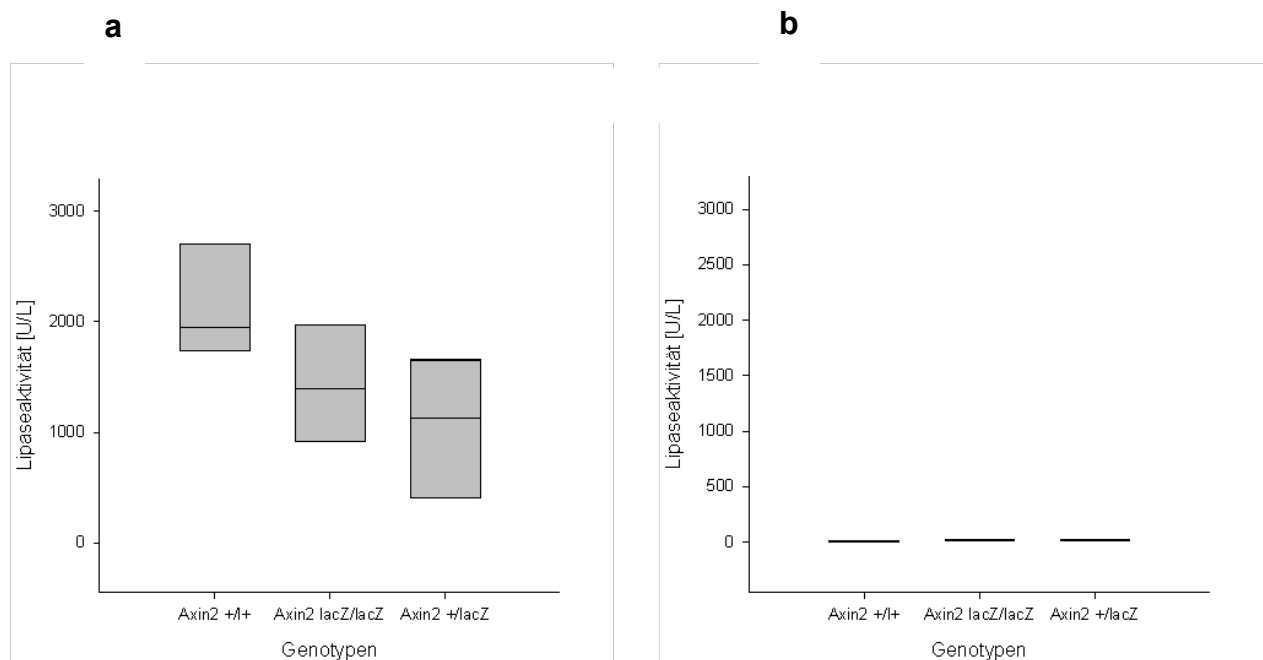
**Fig. 15:** Entwicklung der Blutzuckerkonzentration nach STZ+Cer Therapie (Vergleich der 3 Genotypen  $Axin2^{+/+}$ ,  $Axin2^{lacZ/lacZ}$  und  $Axin2^{+/lacZ}$ ). Ein signifikanter Einfluss von Wnt-Signaltransduktion auf den Verlauf der Hyperglykämie konnte nicht gezeigt werden. Statistische Auswertung: Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, \* $p < 0,05$ ,  $n=4$  ( $Axin2^{+/+}$ ),  $n=3$  ( $Axin2^{lacZ/lacZ}$ ),  $n=5$  ( $Axin2^{+/lacZ}$ ).



### 3.5.2. Funktion aktivierter Wnt-Signaltransduktion bei akuter Pankreatitis

#### 3.5.2.1. Kein Einfluss von Wnt-Signaltransduktion auf Lipaseaktivität

Zur Analyse des Einflusses der Wnt-Signaltransduktion auf die Aktivität des Enzyms Lipase als Verlaufsparemeter der akuten Pankreatitis verglichen wir die Aktivität dieses Enzymes unter STZ+Cer-Behandlung zwischen den Genotypen  $Axin2^{lacZ/lacZ}$ ,  $Axin2^{+/lacZ}$  und  $Axin2^{+/+}$  (siehe Fig. 15 a+b). Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen und damit kein signifikanter Einfluss aktivierter Wnt-Signaltransduktion auf den Verlauf der Lipaseaktivität unter STZ+Cer-Therapie.

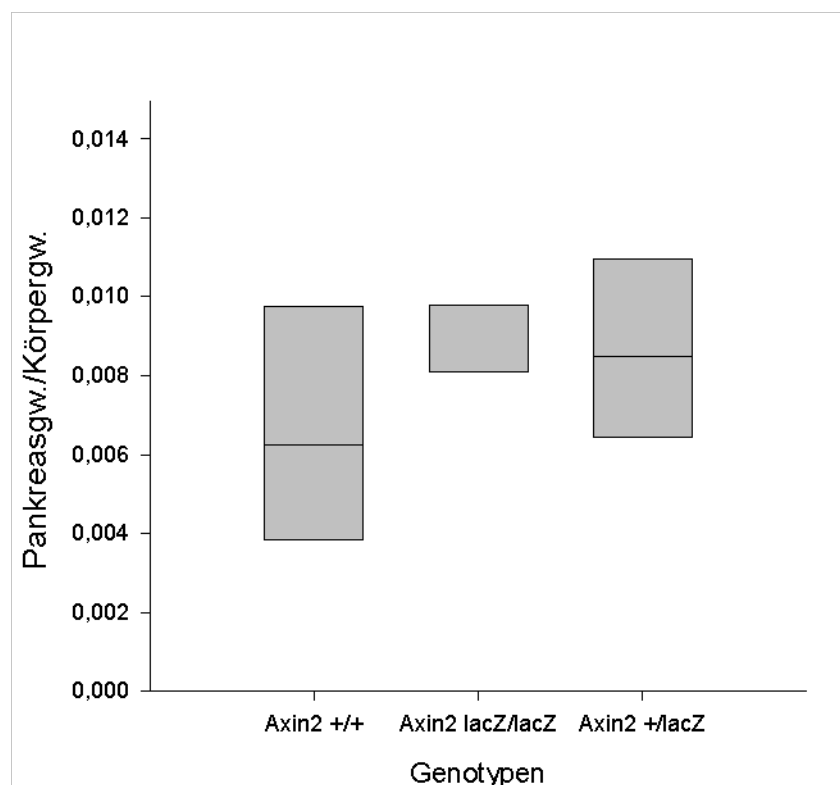


**Fig. 16:** Einfluss von Axin2 auf Lipaseaktivität unter STZ+Cer-Therapie. Eine Beeinflussung der Lipaseaktivität durch Wnt-Signaltransduktion konnte nicht gezeigt werden (Vergleich der 3 Genotypen  $Axin2^{+/+}$ ,  $Axin2^{lacZ/lacZ}$  und  $Axin2^{+/lacZ}$ ). a. Lipaseaktivität an Tag 22. b. Lipaseaktivität an Tag 26. Darstellung: Median, 25% Quartil, 75% Quartil, Statistische Auswertung: Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, \* $p < 0,05$ ,  $n=4$  ( $Axin2^{+/+}$ ),  $n=3$  ( $Axin2^{lacZ/lacZ}$ ),  $n=5$  ( $Axin2^{+/lacZ}$ ).

### 3.5.2.2. Kein Einfluss von Wnt-Signaltransduktion auf PG/KG

Zur Analyse des Einflusses aktivierter Wnt-Signaltransduktion auf das Verhältnis von Pankreasgewicht zu Körpergewicht als Maß der Pankreasatrophie verglichen wir diesen Parameter unter STZ+Cer-Applikation zwischen den Genotypen  $Axin2^{lacZ/lacZ}$ ,  $Axin2^{+/lacZ}$  und  $Axin2^{+/+}$  (siehe Fig. 16)

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen und damit kein signifikanter Einfluss aktivierter Wnt-Signaltransduktion auf die Atrophie des Pankreas unter akuter Pankreatitis und Diabetes mellitus.



**Fig. 17:** Einfluss von Axin2 auf das Verhältnis von Pankreasgewicht zu Körpergewicht unter STZ+Cer-Therapie (Vergleich der 3 Genotypen  $Axin2^{+/+}$ ,  $Axin2^{lacZ/lacZ}$  und  $Axin2^{+/lacZ}$ ). Ein signifikanter Einfluss der Wnt-Signaltransduktion auf das Verhältnis PG/KG konnte nicht gezeigt werden. Darstellung: Median, 25% Quartil, 75% Quartil, Statistische Auswertung: Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, \* $p < 0,05$ ,  $n=4$  ( $Axin2^{+/+}$ ),  $n=3$  ( $Axin2^{lacZ/lacZ}$ ),  $n=5$  ( $Axin2^{+/lacZ}$ ).

### 3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Kombination aus Diabetes mellitus und chronischer Pankreatitis führt an Tag 40 reproduzierbar zur Ausbildung von ADM mit mäßiger Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion. Im Gegensatz dazu zeigten sich an Tag 26 der chronischen Pankreatitis weder ADM noch Aktivität der Wnt-Signaltransduktion.

Die Kombination aus Diabetes mellitus und akuter Pankreatitis führte an Tag 28 reproduzierbar zu ausgeprägter Ausbildung von ADM mit starker Wnt-Signalaktivität. Im Vergleich dazu kommt es an Tag 26 zu geringerer Ausbildung von ADM mit ebenfalls geringerer Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion.

Auf die untersuchten Parameter Blutglukosekonzentration als Indikator für den Verlauf des induzierten Diabetes mellitus sowie Lipaseaktivität und Verhältnis Pankreasgewicht/Körpergewicht als Indikator für den Verlauf der induzierten Pankreatitis hatte der knock out von Axin2 und somit eine evtl. verstärkte Wnt-Signaltransduktion keinen Einfluss.

Die zur Induktion von Diabetes mellitus und chronischer bzw. akuter Pankreatitis ausgewählten Methoden konnten die jeweiligen Zustände zuverlässig reproduzieren. Die X-Gal-Färbung bewährte sich als spezifische Methode zur Darstellung von Wnt-Signalaktivität.

## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion von Material und Methoden

#### 4.1.1. Axin2<sup>+/lacZ</sup>, Axin2<sup>lacZ/lacZ</sup> als Reportermaus für Wnt-Signalaktivität

Zur Erforschung der Induktion und Funktion der Wnt-Signaltransduktion bei akuter und chronischer Pankreatitis und Diabetes mellitus entschieden wir uns zur Nutzung eines Tiermodells.

Zur Darstellung der kanonischen Wnt-Signalaktivität werden hauptsächlich drei unterschiedliche Systeme in Reportermausen verwendet: TOPGAL, BATGAL und Axin2/lacZ, wobei sich die Auswahl der Systeme nach dem jeweiligen Forschungsgegenstand richtet. TOPGAL ist eine weitverbreitete Reportermaus, die besonders in Untersuchungen zur Herabregulation der Wnt-Signaltransduktion verwendet wird. Dabei wird die Aktivierung eines LEF/TCF Transkriptionskomplexes als Marker für die Wnt-Signalaktivität genutzt [79]. BATGAL ist ein zuverlässiger Reporter der Wnt-Signalaktivität, der besonders in der Darstellung der Embryonalentwicklung sowie der Erforschung kolorektaler Karzinome zum Einsatz kommt. Bei diesem Modell wird das Ausmaß aktivierter Wnt-Signaltransduktion über die Expression nukleärer  $\beta$ -Galactosidase dargestellt [79,80]. TOPGAL und BATGAL sind als transgene Mausmodelle mit steigender Anzahl an Generationen von Instabilität bedroht, wohingegen im Vergleich dazu Axin2/lacZ diesen Nachteil nicht aufweist, da hier die Darstellung von Axin2 als Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges über einen stabilen knock in von LacZ realisiert wurde [79].

Darüber hinaus zeigte sich die Axin2/lacZ Maus als ein idealer Reporter in der Untersuchung epithelialer Gewebe [79], was in der Untersuchung des Pankreas als epitheliales Organ von Vorteil ist. Nachteilig ist, dass es in Mäusen mit vollständigem Axin2-Knockout vermehrt zu kraniofaszialen Deformationen kommt [81], was die retroperitoneale Blutentnahme erschweren kann. Außerdem zeigte sich in der Aufzucht sowie im Versuch eine erhöhte Letalität der Axin2-Vollknockoutmäuse, was die Anzahl der verfügbaren Tiere limitierte.

Aufgrund des Einflusses von Östrogenen auf die Insulinsensitivität und Blutglukosekonzentration wurden in den Experimenten ausschließlich männliche Mäuse verwendet [82].

Somit stellen die verwendeten C57BL/6 Axin2 Mäuse ein ideales Modell zur weiteren Untersuchung der Induktion und Funktion der Wnt-Signaltransduktion bei akuter und chronischer Pankreatitis in Kombination mit Diabetes mellitus dar.

#### 4.1.2. Experimentelle Modelle der Diabetes- und Pankreatitisinduktion

##### *4.1.2.1 Modell der Induktion von Pankreatitis durch Cerulein*

Die repetitive Injektion von Cerulein führte im Versuch zuverlässig und reproduzierbar zur Induktion von chronischer und akuter Pankreatitis.

Cerulein ist ein in der Wirkung dem humanen Cholezystokinin ähnliches Peptid, welches über die Stimulation der Sekretion pankreatischer Enzyme sowie der Mobilisation von Neutrophilen zu einer Inflamationsreaktion im Pankreas führt. Die Ähnlichkeit in der Wirkung zum Cholezystokinin in Hinblick auf die Sekretionsstimulation wurde bereits 1969 in Versuchen mit Hunden und Ratten beschrieben [83]. In der Diagnostik der Pankreasinsuffizienz beim Menschen spielt Cerulein in geringer Dosierung im Rahmen des Sekretin-Cerulein-Test eine zentrale Rolle [84].

Im Falle der Applikation einer supramaximalen Dosis, üblicherweise 20 bis 40-fach höher, kommt es jedoch zur Induktion einer Pankreatitis.

Die Induktion einer akuten Pankreatitis durch Cerulein im Tierexperiment ist ein vielfach beschriebenes und charakterisiertes Modell, welches auf morphologischer, biochemischer und pathophysiologischer Ebene Eigenschaften der Pankreatitis des Menschen aufweist [85], wie die Ausbildung interstitieller Ödeme, erhöhter Amylaseaktivität im Plasma und die Infiltration mit inflammatorischen Zellen [86,87]. Dies macht die Applikation von Cerulein zur Induktion einer akuten Pankreatitis zu unserer Methode der Wahl.

Zur Induktion einer chronischen Pankreatitis sind hauptsächlich zwei grundsätzliche Prinzipien beschrieben: einerseits die wiederholte Induktion eines akuten inflammatorischen Reizes, welcher im Verlauf zu einer chronischen Entzündung führt; andererseits eine singuläre schwere Gewebeschädigung, welche im Verlauf chronifiziert. Ersteres wird typischerweise durch die repetitive Injektion von Cerulein, alternativ durch die Gabe von Alkohol in Kombination mit Lipopolysacchariden erreicht [88]. Mäuse weisen jedoch eine bis zu fünffach höhere Metabolisierungsrate von Ethanol

im Vergleich zum Menschen auf, so dass toxische Spiegel nur schwierig erreicht werden [89].

Eine einmalige schwere Gewebeschädigung wird üblicherweise über mechanische Interventionen erreicht. Die Ligatur des Gallengangs simuliert eine Drainagestörung, wie sie beim Menschen durch Gallensteine verursacht wird. Limitierende Faktoren dieses Modells sind einerseits die maximale Dauer des Versuchs. Tiere mit Ligatur überleben selten länger als drei Wochen. Außerdem erhöht der operative Eingriff als zusätzliche Belastung das Risiko eines vorzeitigen Versterbens des Versuchstieres [89].

Ein weiterer offensichtlicher Grund für die Nutzung von Cerulein als Induktor der chronischen Pankreatitis ist die optimale Vergleichbarkeit zum verwendeten Modell der akuten Pankreatitis.

In Summe stellt die Induktion von chronischer und akuter Pankreatitis durch Cerulein-Applikation ein weit etabliertes, einfach anwendbares und zuverlässiges Modell dar.

#### *4.1.2.2 Modell der Induktion von Diabetes mellitus durch STZ*

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, welche sich durch einen absoluten (T1DM) bzw. relativen (T2DM) Insulinmangel auszeichnet. Beide Krankheiten stellen komplexe Entitäten mit Beteiligung unterschiedlicher Organe und Organsysteme dar.

In der experimentellen Induktion eines T1DM finden vor allem zwei Methoden Anwendung: zum einen die Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch ein chemisches Agens. Hier werden Alloxan und STZ genutzt. Alloxan beeinträchtigt die  $\beta$ -Zell-Funktion durch Freisetzung freier Radikale, die ultimativ zum Zelluntergang führen. Nachteilig ist jedoch die geringe therapeutische Breite, in der es ausschließlich zu diabetogener Wirkung kommt. Bei Überdosierung kommt es außerdem rasch zu Vergiftung mit systemischen Schäden, besonders an der Niere [90]. STZ gelangt mittels GLUT2-Transporter ins Innere der  $\beta$ -Zellen, wo es durch Alkylierung der DNA die Zelle schädigt.

Die zweite Methode zur Induktion eines T1DM ist die Nutzung transgener Mausmodelle, z.B. AKITA. Hier kommt es durch eine Mutation im Insulin2-Gen zu mangelnder Prozessierung von Proinsulin zu Insulin [91].

Zur experimentellen Induktion eines T2DM gibt es ebenfalls hauptsächlich zwei Möglichkeiten. Zum einen die Verwendung transgener Mausmodelle, in welchen sich,

ähnlich den Vorgängen beim Menschen, durch Adipositas eine Insulinresistenz einstellt [91]. Zum anderen die Applikation einer hochkalorischen Diät zum Erreichen eines adipösen Zustandes mit folgender Insulinresistenz. Hier gibt es allerdings eine u.a. genetisch bedingte Varianz im Ansprechen auf die Diät mit unterschiedlicher Ausprägung der Adipositas [91], was die Erzeugung einer einheitlichen Mauskoorte erschwert.

Zur Anwendung im vorliegenden Experiment nutzten wir das Modell der Induktion eines Diabetes mellitus mit absolutem Insulinmangel durch Applikation von STZ. Da zur Darstellung der Aktivität der Wnt-Signaltransduktion das Axin2/lacZ-Modell zur Anwendung kommt, hätte die Entscheidung für ein transgenes Mausmodell die Notwendigkeit der Züchtung eines neuen transgenen Mausmodells bedeutet. Dies hätte den kapazitären Rahmen der vorliegenden Arbeit überstiegen.

#### 4.1.3. Verwendung von Metamizol

Durch die repetitive Gabe von Cerulein kommt es, je nach Therapieschema chronisch oder akut, durch Neutrophilenadhäsion und Deregulation der Verdauungsenzyme zu einer Pankreatitis. Da dies einen äußerst schmerzhaften Zustand für die Versuchstiere bedeutet, was sich in einer verminderten Bewegungsfreudigkeit der Tiere zeigt, wurden analgetische Substanzen appliziert. Im vorliegenden Fall wurde das Trinkwasser der Tiere mit Metamizol versetzt und täglich gewechselt.

Metamizol ist als Pirazolonderivat ein stark analgetisches, antipyretisch und spasmolytisch wirkendes Medikament. Seine eigentliche Wirkform besteht in Metaboliten, die schwach basische Eigenschaften aufweisen. Deswegen kommt es nur vermindert zu einer Akkumulation im sauren entzündeten Gewebe [92]. Im Vergleich zu den klassischen NSAID (non-steroidal anti inflammatory drugs) zeigt Metamizol nur eine schwache antiinflammatorische Aktivität [93], was von Vorteil in Hinblick auf das Versuchsdesign ist. Gleichzeitig besitzt Metamizol eine den Opioid-Analgetika vergleichbare Wirkstärke [94].

Die Kombination aus geringer lokaler Anreicherung und gleichzeitig schwacher antiinflammatorischer Wirkung bei hoher analgetischer Potenz machten Metamizol zum idealen Analgetikum für die durchgeführten Versuche.

#### 4.1.4. X-Gal Färbemethode als zuverlässiger Marker für Wnt-Signalaktivität

Die Färbemethode X-Gal ist eine enzymatisch basierte Methode zur Darstellung von Gen-Aktivität. Hierbei wird anstelle eines Genes (wie z.B. dem Wnt Target Gen Axin2) ein lacZ-Gen eingeknockt. Bei Aktivierung der Wnt Signaltransduktion wird nun die Expression der  $\beta$ -Galactosidase induziert. Bei anschließender Zugabe von X-Gal-Lösung spaltet das Enzym das Substrat in Galactose und einen permanenten, indigoblauen Farbstoff. Dies ermöglicht eine lokale Zuordnung der Aktivität der Wnt-Signaltransduktion. Die Vorteile liegen in der einfachen Methodik und Anwendbarkeit, sowie der deutlichen Färbung des entsprechenden Gewebes. Eine semiquantitative Analyse der Wnt-Signaltransduktion war so problemlos möglich. Durch die deutliche Färbung und die damit verbundene Überlagerung einzelner Strukturen im Randbereich der Färbung war eine zweifelsfreie Identifizierung der jeweiligen Zellen jedoch nicht immer möglich.

## 4.2. Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1. Induktion von Diabetes mellitus und Pankreatitis

Nach dem an fünf aufeinanderfolgenden Tagen den Versuchstieren STZ in der Dosierung 50mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert wurde, erfolgte das Monitoring der Blutglukosekonzentrationen an Tag 1, 5, dann im wöchentlichen Abstand sowie final am Tag der Gewebeentnahme. Hierbei zeigte sich, dass sowohl in der Gruppe der STZ-behandelten Tiere als auch in der Gruppe der STZ+Cer behandelten Tiere der Mittelwert der maximalen Blutglukosekonzentrationen der Versuchstiere den Baselinewert um das bis zu Fünffache überschritt. Dies ist konkordant mit Studien, die einen Anstieg der Blutglukosekonzentration nach STZ-Therapie um 408% gegenüber den Sham-Kontrollgruppen beschreiben [95].

Zur Verlaufskontrolle der Pankreatitis erfolgte die Analyse der Lipaseaktivität in Serum, welches den Tieren an Tag 22 der chronischen Pankreatitis sowie an Tag 23 der akuten Pankreatitis entnommen wurde. Hierbei zeigte sich, dass bei chronischer Pankreatitis in der Gruppe der STZ+Cer behandelten Tiere die Lipaseaktivität bis zu 20-fach höher als in der Kontrollgruppe der STZ behandelten Tiere lag. Bei akuter Pankreatitis zeigte sich die Lipaseaktivität in der STZ+Cer behandelten Gruppe bis



zu 50-fach erhöht. Dies ist vergleichbar mit den von anderen Arbeitsgruppen erhobenen Daten [96].

#### 4.2.2. Einfluss von Diabetes und Pankreatitis auf die Induktion von Wnt-Signalaktivität

Die Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage mit absolutem Insulinmangel durch die Injektion von STZ führte im vorliegenden Versuch zu keiner nachweisbaren Wnt-Signalaktivität. Die Entwicklung eines Diabetes mellitus durch STZ-Injektion kann sogar zu einer Reduktion der Wnt-Signaltransduktion führen [97]. Bezüglich der Rolle der Wnt-Signaltransduktion in der Entwicklung und Instandhaltung von  $\beta$ -Zellen liegt eine widersprüchliche Datenlage vor. Einerseits scheint die Unterdrückung von Wnt-Signaltransduktion nur Azinus-Zellen in der Entwicklung einzuschränken, ohne  $\beta$ -Zellen zu beeinflussen [98], andererseits liegt in Tieren mit Wnt-Knockout eine signifikant verminderte  $\beta$ -Zell-Masse und -funktion vor [99].

Die Induktion einer chronischen Pankreatitis führte an Tag 26 zu keinen ausgeprägten histologischen Veränderungen sowie zu keiner nachweisbaren Wnt-Signalaktivität. An Tag 40 hingegen zeigten die mit Cerulein behandelten Tiere histologische Veränderungen mit Ausbildung von ADM mit dort lokalisierter nachweisbarer Wnt-Signalaktivität. Die Induktion einer akuten Pankreatitis führte an Tag 28 ebenso zu deutlichen histologischen Veränderungen mit Ausbildung von ADM und dort lokalisierter nachweisbarer Wnt-Signalaktivität als Folge der lokalen Gewebeschädigung. Dies wiederum unterstützt die Vermutung, dass die Wnt-Signaltransduktion eine Rolle in der Pathophysiologie von azinären Zellen im Pankreas spielt.

#### 4.2.3. Pankreatitis, ADM und PDAC

Es bestehen belastbare Hinweise für den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von chronischer Pankreatitis und der Entwicklung eines PDAC, wobei das kumulative Risiko eines Patienten mit chronischer Pankreatitis, meistens als Folge eines Alkoholabusus, innerhalb von 20 Jahren ein PDAC zu entwickeln, bei vier Prozent liegt [100].

Zu den einzelnen Schritten der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis als Folge von Alkoholabusus existieren mehrere Hypothesen. Ursprünglich wurde angenommen, dass es durch erhöhten Proteingehalt der Verdauungssäfte im Verlauf zur Bil-

dung von Präzipitaten in den Pankreasgängen kommt, welche zu einer Abflussstörung führen, die wiederum eine lokale Inflammation bedingen [101]. Diese Theorie berücksichtigt allerdings nicht die Tatsache, dass Alkohol auch zu einer akuten Pankreatitis führen kann. Logischer erscheint die Annahme, dass die chronische Pankreatitis eine Folge repetitiver Episoden einer akuten Pankreatitis ist [102], die zu Fibrosierung des Gewebes und darüber zu einer Strikturen der Pankreasgänge mit Abflussstörung und folgender chronischer Entzündung führen. Die akute Pankreatitis ist dabei, ähnlich wie die chronische Pankreatitis, gekennzeichnet durch fokalen Gewebefall [103]. Diese Hypothese wird von unserer Studie unterstützt, wobei wir bei chronischer und akuter Pankreatitis eine fokale Gewebsschädigung mit jeweils unterschiedlich schwerer Ausprägung beobachten konnten.

Die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms auf dem Boden einer Pankreatitis erfolgt vermutlich über die Entwicklung von Vorläuferläsionen, nämlich PanIn, MCN und IPMN [104], wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind [100].

Eine mögliche zentrale Rolle in der Entwicklung eines PDAC konnte dabei den Azinuszellen zugeschrieben werden [104]. So sind duktale Zellen des Pankreas refraktär gegenüber onkogener Transformation, wohingegen es in Azinuszellen beispielsweise nach Induktion einer PDAC-initiierenden Kras-Mutation zur Ausbildung von ADM kommt [104]. ADM sind außerdem häufig Folge einer Pankreatitis, welche wiederum die Kras-gesteuerte Entwicklung von PanIn und ultimativ PDAC beschleunigt [105]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Pankreatitis, dem Auftreten von ADM und der Entwicklung von PDAC ist also wahrscheinlich.

#### 4.2.4. Diabetes mellitus als Risikofaktor für Pankreaskarzinom

Die Rolle von Diabetes mellitus als Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung, wobei sich ätiologisch Wechselwirkungen darstellen. So wird vermutet, dass einerseits das Vorhandensein eines Diabetes mellitus die Entwicklung eines PDAC begünstigt. Andererseits gibt es Hinweise, dass das Auftreten eines Diabetes mellitus Folge des Auftretens eines PDAC ist.

In einer Metaanalyse zeigte sich, dass T2DM das Risiko, ein PDAC zu entwickeln, um 80-94% erhöht [106]. Gleichzeitig erhöhen bestimmte Diabetestherapeutika, z.B. Insulin oder Sulfonylharnstoffe das Risiko der Entstehung eines PDAC um ca. 400%

[107]. Gegensätzlich dazu steigert die antidiabetische Therapie mit Metformin signifikant das Gesamtüberleben bei PDAC [108].

Ein neu diagnostizierter Diabetes mellitus ist möglicherweise eine erste klinische Manifestation eines sich entwickelnden PDAC und kann sich bis zu mehrere Monate vor anderen tumorassoziierten Symptomen ausbilden [109]. Zusätzlich zeigte sich im Rahmen klinischer Studien, dass in bis zu 60% aller Patienten mit PDAC eine gestörte Glukosetoleranz bzw. ein Diabetes mellitus vorliegt und dass wiederum 60% dieser Patienten den Diabetes in den 36 Monaten vor der PDAC-Diagnose entwickelten [110]. Interessanterweise ist das relative Risiko, an einem PDAC zu erkranken, um 50 % geringer bei Patienten, die einen Diabetes mellitus seit 5 Jahren oder länger haben im Vergleich zu Patienten mit einer aktuelleren Diagnose [106]. Reziprok dazu entwickelt nur 1% aller Patienten, bei denen nach dem 50. Lebensjahr ein Diabetes mellitus festgestellt wird, ein PDAC [111]. Dazu sei gesagt, dass in anderen Tumorentitäten keine erhöhte Prävalenz eines Diabetes mellitus vorliegt [110].

#### 4.2.5. Kausaler Zusammenhang zwischen Wnt-Signalaktivität und Pankreaskarzinogenese

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die chronische und akute Pankreatitis sowie die Kombination mit Diabetes mellitus zur Induktion von Wnt-Signalaktivität in ADM führt. Bezüglich der Bedeutung der Wnt-Signaltransduktion für eine mögliche Tumorentwicklung gibt es unterschiedliche Ergebnisse und Hinweise. So wurde in einer Studie der Einfluss von  $\beta$ -catenin als Teil der Wnt-Signaltransduktion auf die Re-Programmierung von Azinuszellen in Vorläuferläsionen von PDAC als Folge eines dauerhaft aktiven Kras-Proteins untersucht. Eine durch Mutation dauerhaft aktivierte Kras-Protease kommt in nahezu allen humanen PDAC vor [112]. Sie inhibiert die Regeneration von Azinuszellen nach Pankreatitis und führt stattdessen über eine persistierende Dedifferenzierung zur Entwicklung von ADM oder präkanzerösen Läsionen wie PanIN [113]. Es konnte gezeigt werden, dass in Versuchstieren mit mutiertem Kras-Gen die Konzentration von  $\beta$ -catenin im exokrinen Teil des Pankreas niedriger ist als im entsprechenden Wildtyp [114]. Eine Stabilisierung von  $\beta$ -catenin durch Inhibierung proteasomaler Degradierung [115] führt dagegen zu einer Blockade der durch ein mutiertes Kras-Gen gesteuerten Reprogrammierung azinärer Zellen zu PanIN als Vorläuferläsionen von PDAC [114].  $\beta$ -catenin als Teil der Wnt-Signaltransduktion kann also als Antagonist in der Entwicklung von PDAC interpretiert werden.

Diese Aussage konnte durch die Studie einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt und weiter differenziert werden [116]. Bei alleiniger Aktivität von  $\beta$ -catenin kommt es zur Ausbildung großer Tumore, die morphologisch und immunhistochemisch Eigenschaften von soliden pseudopapillären Neoplasien (SPN) aufweisen. Es zeigte sich unter Stabilisierung von  $\beta$ -catenin und gleichzeitiger dauerhafter Aktivität von Kras eine Hemmung der Entwicklung von PanIN, jedoch ein gehäuftes Auftreten von Neoplasien mit duktaler und cribriformer Struktur [116]. Diese Ergebnisse suggerieren nicht nur eine wichtige Rolle der Wnt-Signaltransduktion in der Induktion von Tumorgenesen im Pankreas, sondern darüber hinaus auch einen Einfluss auf den Phänotyp des entstehenden Tumors.

#### 4.2.6. Kausaler Zusammenhang zwischen Wnt-Signalaktivität und ADM

In der histologischen Auswertung der Versuchstiere zeigte sich, dass die induzierte Wnt-Signalaktivität sich vor allem auf den Bereich von ADM konzentrierte, wobei die Ausprägung der ADM mit der Intensität der Wnt-Signaltransduktion korrelierte und beides von der Stärke des applizierten Entzündungsreizes abhängig war. So zeigte sich in der Gruppe der Versuchstiere mit akuter Pankreatitis in der semiquantitativen Analyse im Vergleich zur chronischen Pankreatitis sowohl eine intensivere Gewebsveränderung als auch eine intensivere X-Gal-Färbung als Zeichen stärker aktiver Wnt-Signaltransduktion. Über eine Wechselwirkung des Auftretens von ADM und Wnt-Signaltransduktion ist bislang wenig bekannt.

Aus der Sicht des Autors führt die Pankreatitis sowohl zur Entstehung der ADM als auch zur Induktion der Wnt-Signaltransduktion, ohne dass eine ursächliche Verbindung oder Wechselwirkung zwischen beiden Prozessen besteht. Für die Annahme spricht, dass in den untersuchten Gewebeproben das Vorhandensein von ADM und die Induktion der Wnt-Signaltransduktion innerhalb der ADM immer gleich ausgeprägt war. Bei chronischer Pankreatitis als etwas schwächerer Noxe kam es zu mäßiger Ausprägung von ADM mit mäßiger Induktion der Wnt-Signaltransduktion. Bei akuter Pankreatitis als starke Noxe mit größerer Gewebeschädigung kam es im Vergleich zu einer deutlicheren Ausprägung von ADM mit deutlicherer Induktion der Wnt-Signaltransduktion.

In einer Studie zur Regeneration des exokrinen Pankreas nach akuter Pankreatitis wird eine erhöhte Aktivität der Wnt-Signaltransduktion in der Regeneration azinärer Zellen beschrieben [117]. Dazu kommt es während der Entzündung zur einer temporären Dedifferenzierung der Azinuszellen zu multipotenten Progenitorzellen [118].

Gleichzeitig spielt die Wnt-Signaltransduktion eine wichtige Rolle in der Organentwicklung des Pankreas [98]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Organismus zur Abwehr gegen die Inflammation neben der beschriebenen Dedifferenzierung zusätzlich Signalwege aus der Embryonalentwicklung aktiviert. Ob diese eine spezifische Wirkung haben, ist allerdings unklar.

#### 4.2.7. Einfluss von Wnt-Signalaktivität auf Hyperglykämie und Inflammation

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass im Vergleich der  $Axin2^{lacZ/lacZ}$  und  $Axin2^{+/+}$  Mäuse die Wnt-Signaltransduktion keinen Einfluss auf den Verlauf eines durch STZ-induzierten Diabetes mellitus hat. In der Organogenese des Pankreas spielt die Wnt-Signaltransduktion eine wichtige Rolle in der Entwicklung der  $\beta$ -Zellen. So führt eine eingeschränkte Wnt-Signaltransduktion zu einer reduzierten Organmasse mit verringerter  $\beta$ -Zell-Proliferation und -funktion [119]. Umgekehrt würde man somit einen positiven Einfluss aktiver Wnt-Signaltransduktion auf die Regeneration nach Schädigung erwarten.

Eine mögliche Erklärung des nichtvorhandenen Einflusses von Wnt-Signaltransduktion auf den Verlauf des Diabetes im vorliegenden Versuch ist die ausgeprägte Reduktion der  $\beta$ -Zell-Masse durch STZ [87]. So ist die Anzahl verbleibender vitaler  $\beta$ -Zellen nach STZ-Applikation eventuell zu gering, um durch Regeneration einen Einfluss auf den Verlauf des Diabetes mellitus zu nehmen.

Ein Einfluss aktiver Wnt-Signaltransduktion auf den Verlauf einer akuten Pankreatitis als Hinweis auf eine spezifische Funktion des Signalwegs konnte im vorliegenden Versuch nicht beobachtet werden. So zeigten die Parameter Lipaseaktivität und Verhältnis Pankreasgewicht/Körpergewicht unabhängig vom Genotyp der Versuchstiere einen ähnlichen Verlauf ohne signifikante Unterschiede. Dies unterstützt die in Abschnitt 4.2.6. formulierte Hypothese, dass die bei Pankreatitis festgestellte Wnt-Signalaktivität lediglich eine unspezifische Aktivierung von eigentlich aus der Embryonalentwicklung stammenden Signalwegen ist, ohne dass diese Aktivierung signifikanten Einfluss auf die Pathophysiologie der Pankreatitis hat.

### 4.3. Schlussfolgerungen und Ausblick:

Zur Rolle der Wnt-Signaltransduktion in der Entwicklung des PDAC und besonders unter Berücksichtigung möglicher Wechselwirkungen ist die Datenlage aktuell äußerst unbefriedigend. Die Mechanismen, welche schließlich zur Ausbildung von Tumoren im Pankreas führen, sind nach wie vor unzureichend bekannt.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte mit der Erkenntnis, dass es durch Risikofaktoren für PDAC, wie Diabetes mellitus und Pankreatitis, zur Induktion von Wnt-Signaltransduktion in ADM kommt, ein deskriptiver Beitrag geleistet werden. Leider ließ sich jedoch keine Aussage bezüglich der genauen Funktion des Wnt-Signaltransduktion in der Entwicklung der ADM und des Einflusses auf die vorliegenden Risikofaktoren ableiten. Zur Untersuchung eines möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen Wnt-Signaltransduktion und dem Auftreten von ADM wären weitere histologische Untersuchungen sinnvoll, in denen Pankreasgewebe von  $Axin2^{lacZ/lacZ}$ -Mäusen und  $Axin2^{+/+}$ -Mäusen nach der Induktion von Pankreatitis und Diabetes mellitus auf das Vorhandensein von ADM überprüft wird.

Wünschenswert wäre die Etablierung eines transgenen Mausmodells, in welchem die Reporterfunktion von  $Axin2^{lacZ}$  mit der Induktion eines T2DM, z.B. über eine Leptin-Mutation, kombiniert wird, da dies im Vergleich zur Induktion mit STZ der Entwicklung eines T2DM beim Menschen ähnlicher ist.

## Literaturverzeichnis:

1. Zimmer K-P. Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.
2. Howard J, Hess W. **History of the Pancreas: Mysteries of a Hidden Organ.**: Springer; 2002.
3. Ragland ER. **Early Science and Medicine.** In Observation and Experiment in Seventeenth-Century Anatomy, vol. 13. pp. 615-664
4. Campbell WR. **Paul Langerhans, 1847-1888.** Canad. med. Ass. J. **79**, 855–856 (1958).
5. Drake RL VW, Mitchell AWM. **Gray's Anatomie für Studenten.** Elsevier; 2007.
6. Bommas-Ebert U TP, Voß R. **Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie.** pp. Thieme Verlag; 2011
7. Welsch U. **Lehrbuch Histologie.** 4. Auflage edition: Urban & Fischer; 2014.
8. Huppelsberg J, Walter K. **Kurzlehrbuch Physiologie.** Dritte Auflage edition: Thieme Verlag; 2009.
9. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. **Physiologie.** 7th edition: Thieme Verlag; 2014.
10. Edmondson HA. **PANCREATITIS AND CARCINOMA OF THE PANCREAS—Some Aspects of the Pathologic Physiology.** Calif Med 1952, **77**:176-179.
11. Organization WH. **Global status report on noncommunicable diseases 2014.** Geneva; 2015.
12. Köster, Huppertz E, Hauner H, Schubert I. **Direct costs of diabetes in Germany - CoDiM 2000-2007.** Exp Clin Endocrinol Diabetes; 2011.
13. Association AD. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care 2014; 37(Supplement 1): S81-S90.
14. Alejandro EU, Gregg B, Blandino-Rosano M, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E. **Natural history of  $\beta$ -cell adaptation and failure in type 2 diabetes.** Molecular Aspects of Medicine Volume 42, 2015, Pages 19-41.
15. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. **Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes.** Nature 2005, **436**:356-362.
16. Renz-Polster H, Krautzig S. **Basislehrbuch Innere Medizin.** Elsevier; 2012:740-741.

17. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JJ. **Harrisons Innere Medizin.** McGraw Hill; 2005:2318-2319.
18. Schulze MB, Hoffmann K, Boeing H, Linseisen J, Rohrmann S, Möhlig M, Pfeiffer AFH, Spranger J, Thamer C, Häring H-U, et al. **An Accurate Risk Score Based on Anthropometric, Dietary, and Lifestyle Factors to Predict the Development of Type 2 Diabetes.** Diabetes Care. 2007;30(3):510-5.
19. Riemann JF, Fischbach W, Galle PR, Mössner J. **Gastroenterologie - Das Referenzwerk für Klinik und Praxis.** vol. Band 2: Leber, Galle, Pankreas. pp. 1804; Thieme-Verlag 2008
20. Frossard J-L, Steer ML, Pastor CM. **Acute Pancreatitis.** vol. 371. pp. 143-152. The Lancet; 2008.
21. Layer P, Rosien U. **Praktische Gastroenterologie.** 4. Auflage edition. pp. 389; Elsevier; 2010.
22. Riemann JF, Fischbach W, Galle PR, Mössner J. **Gastroenterologie - Das Referenzwerk für Klinik und Praxis.** vol. Band 2: Leber, Galle, Pankreas; 2008.
23. Sarles H. **Definitions and Classifications of Pancreatitis.** vol. 6. pp. 470-474. Pancreas; 1991.
24. Thiruvengadam M, Aslanian HR, Farell J, Jamidar PA. **Chronic pancreatitis, a comprehensive review and update. Part I: Epidemiology, etiology, risk factors, genetics, pathophysiology, and clinical features.** vol. 60. pp. 530-550. Disease-a-Month; 2014.
25. Whitcomb DC. **Genetic Risk Factors for Pancreatic Disorders.** vol. 144. pp. 1292-1302. Gastroenterology; 2013.
26. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. **Cancer statistics, 2015.** CA Cancer J Clin 2015, **65**:5-29.
27. Kaur S, Baine MJ, Jain M, Sasson AR, Batra SK. **Early diagnosis of pancreatic cancer: challenges and new developments.** Biomark Med 2012, **6**:597-612.
28. Beger HG, Rau B, Gansauge F, Leder G, Schwarz M, Poch B. **Pancreatic Cancer - Low Survival Rates.** Dtsch Arztebl Int 2008, **105**:255-262.
29. Artinyan A, Soriano PA, Prendergast C, Low T, Ellenhorn JD, Kim J. **The anatomic location of pancreatic cancer is a prognostic factor for survival.** In HPB (Oxford). Volume 10; 2008: 371-376



30. Krejs GJ. **Pancreatic Cancer: Epidemiology and Risk Factors.** Digestive Diseases 2015, **28**:355-358.
31. FARROW DC, DAVIS S. **DIET AND THE RISK OF PANCREATIC CANCER IN MEN.** Am J Epidemiol. 1990;132(3):423-31.
32. Lyon JL, Slattery ML, Mahoney AW, Robison LM. **Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1993 2(6):513-8.
33. Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Brown LM, Greenberg RS, Hayes RB, Swanson GM, et al. **Cigarette Smoking and Pancreas Cancer: a Case–Control Study Based on Direct Interviews.** J Natl Cancer Inst. 1994 ;86(20):1510-6.
34. Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E, Frulloni L, Francesco VD, Vaona B, Bovo P, et al. **Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis.** The American Journal of Gastroenterology 1999, **94**:1253-1260.
35. Weiss FU. **Pancreatic cancer risk in hereditary pancreatitis.** Frontiers in Physiology 2014, **5**.
36. Liao WC, Tu YK, Wu MS, Lin JT, Wang HP, Chien KL. **Blood glucose concentration and risk of pancreatic cancer: systematic review and dose-response meta-analysis.** In BMJ. Volume 349; 2015
37. Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R. **Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN.** Biomed Res Int 2014.
38. Käppeli RM, Müller SA, Hummel B, Kruse C, Müller P, Fornaro J, Wilhelm A, Zadnikar M, Schmied BM, Tarantino I. **IPMN: surgical treatment.** Langenbecks Arch Surg 2013, **398**:1029-1037.
39. Zamboni G, Hirabayashi K, Castelli P, Lennon AM. **Precancerous lesions of the pancreas.** Best Pract Res Clin Gastroenterol 2013, **27**:299-322.
40. Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. **Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis.** Neoplasia 2005, **7**:17-23.
41. Kawada N, Uehara H, Takada R, Yamai T, Fukutake N, Katayama K, Takenaka A, Nagata S, Tomita Y. **Microinvasion of High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia.** In Case Rep Gastroenterol. Volume 7; 2013: 30-36

42. Furukawa T, Klöppel G, Adsay N, Albores-Saavedra J, Fukushima N, Horii A, Hruban R, Kato Y, Klimstra D, Longnecker D, et al. **Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of.** Virchows Archiv 2005, **447**:794-799.
43. Nagai K, Doi R, Kida A, Kami K, Kawaguchi Y, Ito T, Sakurai T, Uemoto S. **Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinicopathologic characteristics and long-term follow-up after resection.** World J Surg 2008, **32**:271-278; discussion 279-280.
44. Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N. **Classification of Tumours of the Digestive System.** Lyon, France: WHO; 2010.
45. Matthaei H, Schulick RD, Hruban RH, Maitra A. **Cystic precursors to invasive pancreatic cancer.** Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011, **8**:141-150.
46. Hong SM, Omura N, Vincent A, Li A, Knight S, Yu J, Hruban RH, Goggins M. **Genome-Wide CpG Island Profiling of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas.** Clin Cancer Res 2012, **18**:700-712.
47. Crippa S, Salvia R, Warshaw AL, Domínguez I, Bassi C, Falconi M, Thayer SP, Zamboni G, Lauwers GY, Mino-Kenudson M, et al. **Mucinous Cystic Neoplasm of the Pancreas is Not an Aggressive Entity: Lessons From 163 Resected Patients.** Ann Surg 2008, **247**:571-579.
48. Baker M, Seeley E, Pai R, Suriawinata A, Mino-Kenudson M, Zamboni G, Klöppel G, Longnecker D. **Invasive mucinous cystic neoplasms of the pancreas.** Experimental and Molecular Pathology 2012, **93**:345-349.
49. Schmid RM. **Acinar-to-ductal metaplasia in pancreatic cancer development.** J Clin Invest. 2002;109(11):1403-4.
50. Wagner M, Greten FR, Weber CK, Koschnick S, Mattfeldt T, Deppert W, Kern H, Adler G, Schmid RM. **A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease.** Genes Dev 2001, **15**:286-293.
51. Wagner M, Lühns H, Klöppel G, Adler G, Schmid RM. **Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice.** Gastroenterology 1998, **115**:1254-1262.
52. Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Robert J. Coffey J, Wright CVE, Stoffers DA, Leach SD. **Pancreatic epithelial plasticity**

- mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates.** Development. 2005;132(16):3767-76.
53. Fendrich V, Esni F, Garay MVR, Feldmann G, Habbe N, Jensen JN, Dor Y, Stoffers D, Jensen J, Leach SD, Maitra A. **Hedgehog Signaling Is Required for Effective Regeneration of Exocrine Pancreas.** Gastroenterology 2008, **135**:621-631.
  54. Morris JP, Wang SC, Hebrok M. **KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma.** Nat Rev Cancer 2010, **10**:683-695.
  55. Sawey ET, Johnson JA, Crawford HC. **Matrix metalloproteinase 7 controls pancreatic acinar cell transdifferentiation by activating the Notch signaling pathway.** In Proc Natl Acad Sci U S A. Volume 104; 2007: 19327-19332
  56. Logan CY, Nusse R. **THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE.** Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:781-810.
  57. Komiya Y, Habas R. **Wnt signal transduction pathways.** In Organogenesis. Volume 4; 2008: 68-75
  58. MacDonald BT, Tamai K, He X. **Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.** Dev Cell 2009, **17**:9-26.
  59. ten Berge D, Brugmann SA, Helms JA, Nusse R. **Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development.** Development 2008, **135**:3247-3257.
  60. Barker N, Es JHV, Kuipers J, Kujala P, Born Mvd, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. **Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5.** Nature 2007, **449**:1003-1007.
  61. Lin L, Cui L, Zhou W, Dufort D, Zhang X, Cai CL, Bu L, Yang L, Martin J, Kemler R, et al.  **$\beta$ -Catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis.** In Proc Natl Acad Sci U S A. Volume 104; 2007: 9313-9318
  62. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. **Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors.** In Mol Cell Biol. Volume 22; 2002: 1184-1193

63. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain S, Masiarz F, Munemitsu S, Polakis P. **Association of the APC gene product with beta-catenin.** Science. 1993 ;262(5140):1731-4.
64. He T-C, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Costa LTd, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. **Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway.** Science. 1998;281(5382):1509-12.
65. Pelengaris S, Khan M, Evan G. **c-MYC: more than just a matter of life and death.** Nature Reviews Cancer 2002, **2**:764-776.
66. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. **c-Myc and Cancer Metabolism.** Clin Cancer Res 2012, **18**:5546-5553.
67. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. **Activation of  $\beta$ -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in  $\beta$ -Catenin or APC.** Science. 1997;275(5307):1787-90.
68. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. **Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1.** Genes Dev. 1993;7(5):812-21.
69. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D' Amico M, Pestell R, Ben-Ze' ev A. **The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway.** In Proc Natl Acad Sci U S A. Volume 96; 1999: 5522-5527
70. Gedaly R, Galuppo R, Daily MF, Shah M, Maynard E, Chen C, Zhang X, Esser KA, Cohen DA, Evers BM, et al. **Targeting the Wnt/  $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Liver Cancer Stem Cells and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines with FH535.** In PLoS One. Volume 9; 2014
71. Yamashita T, Wang XW. **JCI - Cancer stem cells in the development of liver cancer** J Clin Invest. 2013;123(5):1911-8
72. Briegel K, Joyner A. **Identification and Characterization of Lbh, a Novel Conserved Nuclear Protein Expressed during Early Limb and Heart Development.** Dev Biol. 2001 ;233(2):291-304
73. Rieger ME, Sims AH, Coats ER, Clarke RB, Briegel KJ. **The Embryonic Transcription Cofactor LBH Is a Direct Target of the Wnt Signaling Pathway in Epithelial Development and in Aggressive Basal Subtype Breast Cancers  $\nabla \uparrow$ .** In Mol Cell Biol. Volume 30; 2010: 4267-4279

74. Al-Aynati MM, Radulovich N, Riddell RH, Tsao M-S. **Epithelial-Cadherin and  $\beta$ -Catenin Expression Changes in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia.** Clin Cancer Res. 2004;10(4):1235-40.
75. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Ando H, Yanagisawa A, Tsuchiya E, Kato Y, Nakamura Y. **Frequent Somatic Mutations of the APC Gene in Human Pancreatic Cancer.** Cancer Res. 1992;52(23):6696-8.
76. Pasca di Magliano M, Biankin AV, Heiser PW, Cano DA, Gutierrez PJA, Deramaudt T, Segara D, Dawson AC, Kench JG, Henshall SM, et al. **Common Activation of Canonical Wnt Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma.** PLoS One. 2007;2(11):e1155.
77. Jiang H, Li Q, He C, Li F, Sheng H, Shen X, Zhang X, Zhu S, Chen H, Chen X, et al. **Activation of the Wnt pathway through Wnt2 promotes metastasis in pancreatic cancer.** Am J Cancer Res 2014, 4:537-544.
78. Engber D. **The Trouble With Black-6.** www.slate.com 2011 unter [http://www.slate.com/articles/health\\_and\\_science/the\\_mouse\\_trap/2011/11/black\\_6\\_lab\\_mice\\_and\\_the\\_history\\_of\\_biomedical\\_research.html?via=gdpr-consent](http://www.slate.com/articles/health_and_science/the_mouse_trap/2011/11/black_6_lab_mice_and_the_history_of_biomedical_research.html?via=gdpr-consent)
79. Al Alam D, Green M, Tabatabai Irani R, Parsa S, Danopoulos S, Sala FG, Branch J, El Agha E, Tiozzo C, Voswinckel R, Jesudason EC, Warburton D, Bellusci S. **Contrasting expression of canonical Wnt signaling reporters TOPGAL, BATGAL and Axin2(LacZ) during murine lung development and repair.** PLoS One. 2011;6(8):e23139.
80. Maretto S, Cordenonsi M, Dupont S, Braghetta P, Broccoli V, Hassan AB, Volpin D, Bressan GM, Piccolo S. **Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(6):3299-304.
81. Yu HM1, Jerchow B, Sheu TJ, Liu B, Costantini F, Puzas JE, Birchmeier W, Hsu W. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. Development. 2005;132(8):1995-2005.
82. Lindheim SR, Buchanan TA, Duffy DM, Vijod MA, Kojima T, Stanczyk FZ, Lobo RA. **Comparison of estimates of insulin sensitivity in pre- and postmenopausal women using the insulin tolerance test and the frequently sampled intravenous glucose tolerance test.** J. Soc. Gynecol. Investig. 1994; 1:150–154

83. Bertaccini G, Caro G de, Endean R, Erspamer V, Impicciatore M. **The action of caerulein on pancreatic secretion of the dog and biliary secretion of the dog and the rat.** Br. J. Pharmacol. 1969; 37:185–197
84. Hoffmeister A, Mössner J. **Chronische Pankreatitis.** Dtsch. Med. Wochenschr. 2008; 133:415–426
85. Willemer S, Elsässer HP, Adler G. **Hormone-induced pancreatitis.** Eur. Surg. Res. 1992; 24 Suppl 1:29–39
86. Zhou W, Shen F, Miller JE, Han Q, Olson MS. **Evidence for altered cellular calcium in the pathogenetic mechanism of acute pancreatitis in rats.** J. Surg. Res. 1996; 60:147–155
87. Zechner D, Spitzner M, Bobrowski A, Knapp N, Kuhla A, Vollmar B. **Diabetes aggravates acute pancreatitis and inhibits pancreas regeneration in mice.** Diabetologia 2012; 55:1526–1534
88. Lerch MM, Gorelick FS. **Models of acute and chronic pancreatitis.** Gastroenterology 2013; 144:1180–1193
89. Charrier A, Brigstock DR. **Connective tissue growth factor production by activated pancreatic stellate cells in mouse alcoholic chronic pancreatitis.** Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2010;90(8):1179-1188.
90. Szkudelski T1. **The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas.** Physiol Res. 2001;50(6):537-46.
91. King AJ. **The use of animal models in diabetes research.** Br J Pharmacol. 2012 Jun; 166(3): 877–894.
92. Pešák M, Greksáková O, Kopecký F, Čelechovský J. **Ionization constants of antipyrin and its derivatives.** Collect. Czech. Chem. Commun. 1967; 32:2031–2035
93. Elmas P, Ulugol A. **Involvement of cannabinoid CB1 receptors in the antinociceptive effect of dipyron.** J Neural Transm (Vienna). 2013 Nov;120(11):1533-8.
94. Reinhardt N, Jantos R, Sinning C, Imming P. Metamizol. **Renaissance eines Analgetikums.** Pharmazeutische Zeitung, 2006, unter <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=1635>
95. Galán M, Kassan M, Choi S-K, et al. **A Novel Role for Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase and Its Downstream Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiac Damage and Microvascular Dysfunction in**

- Type 1 Diabetes Mellitus.** Hypertension. 2012;60(1):71-80. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.192500.
96. Altavilla D, Famulari C, Passaniti M, Galeano M, Macrì A, Seminara P, Minutoli L, Marini H, Calò M, Venuti FS, Esposito M, Squadrito F. **Attenuated cerulein-induced pancreatitis in nuclear factor-kappaB-deficient mice.** Lab Invest. 2003 ;83(12):1723-32.
  97. Kim D-Y, Jung S-Y, Kim K, Kim C-J. Treadmill exercise ameliorates Alzheimer disease-associated memory loss through the Wnt signaling pathway in the streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Exercise Rehabilitation. 2016;12(4):276-283.
  98. Murtaugh LC, Law AC, Dor Y, Melton DA. **Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development.** Development. 2005;132(21):4663-74.
  99. Dessimoz J1, Bonnard C, Huelsken J, Grapin-Botton A. **Pancreas-specific deletion of beta-catenin reveals Wnt-dependent and Wnt-independent functions during development.** Curr Biol. 2005;15(18):1677-83.
  100. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L. **Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International pancreatitis study group.** N Engl J Med. 1993;328(20):1433–7.
  101. Sarles H, Payan H, Tasso F, et al. **Chronic pancreatitis, relapsing pancreatitis, calcification of the pancreas** In: Bockus HL (ed). Gastroenterology, 2nd edn. WB Saunders: Philadelphia, 1976, pp 1040–1051.
  102. Ammann RW, Heitz PU, Klöppel G. **Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study.** Gastroenterology 1996;111:224–231.
  103. Klöppel G, Maillet B. **The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis.** Virchows Archiv A Pathol Anat (1992) 420:1-4
  104. Kopp JL, von Figura G, Mayes E, et al. **Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma.** Cancer cell. 2012;22(6):737-750..
  105. Carrière C, Young AL, Gunn JR, Longnecker DS, Korc M. **Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing**

- oncogenic Kras.** Biochemical and biophysical research communications. 2009;382(3):561-565.
106. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M. **Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies.** British Journal of Cancer. 2005;92(11):2076-2083.
  107. Currie CJ, Poole CD, Gale EA. **The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes.** Diabetologia. 2009;52(9):1766-77.
  108. Sadeghi N, Abbruzzese JL, Yeung S-CJ, Hassan M, Li D. **Metformin Use is Associated with Better Survival of Diabetic Patients with Pancreatic Cancer.** Clinical Cancer Research. 2012;18(10):2905-2912.
  109. Sah RP, Nagpal SJS, Mukhopadhyay D, Chari ST. **New insights into pancreatic cancer-induced paraneoplastic diabetes.** Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2013;10(7):423-433.
  110. Aggarwal G, Kamada P, Chari ST. **Prevalence of diabetes mellitus in pancreatic cancer compared to common cancers.** Pancreas. 2013;42(2):198-201.
  111. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, De Andrade M, Petersen GM. **Probability of Pancreatic Cancer Following Diabetes: A Population-Based Study.** Gastroenterology. 2005;129(2):504-511.
  112. 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.** Cell. 1988;53(4):549–554.
  113. Guerra C, et al. **Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice.** Cancer Cell. 2007;11(3):291–302.
  114. Morris JP, Cano DA, Sekine S, Wang SC, Hebrok M.  **$\beta$ -catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice.** The Journal of Clinical Investigation. 2010;120(2):508-520.
  115. Kemler R, et al. **Stabilization of beta-catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast.** Development. 2004;131(23):5817–5824.
  116. Heiser PW, Cano DA, Landsman L, et al. **Stabilization of  $\beta$ -catenin induces pancreas tumor formation.** Gastroenterology. 2008;135(4):1288-1300.



117. Siveke JT, Lubeseder-Martellato C, Lee M, Mazur PK, Nakhai H, Radtke F, Schmid RM. **Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis.** Gastroenterology. 2008;134(2):544-55.
118. Ziv O, Glaser B, Dor Y. **The plastic pancreas.** Dev Cell. 2013;15;26(1):3-7.
119. Murtaugh LC. **The what, where, when and how of Wnt/  $\beta$  -catenin signaling in pancreas development.** Organogenesis. 2008;4(2):81-86.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gebührt zunächst Frau Prof. Dr. med. Vollmar für die Möglichkeit, am Rudolf-Zenker-Institut für experimentelle Chirurgie an der Universität Rostock zu promovieren. Ihre herzliche, unkomplizierte Art und ein stets offenes Ohr für Fragen jedweder Art haben in erheblichem Maß zur Vollendung der vorliegenden Dissertation beigetragen.

Ein ebenso herzlicher Dank gebührt meinem Arbeitsgruppenleiter, Herrn PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner. Seine unermüdliche Einsatz- und Arbeitsbereitschaft stellten gleichermaßen Vorbild und Herausforderung dar. Die Durchführung der Experimente und schließlich die Veröffentlichung der vorliegenden Ergebnisse wären ohne sein Engagement undenkbar.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Hilfe im Laufe meiner Zeit am IEC bedanken. Besonders genannt seien hier Berit Blendow, Dorothea Frenz, Maren Nerowski, Eva Lorbeer und Anja Gellert.

Ein letzter und besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung im Laufe des Studiums und der vorliegenden Promotionsarbeit.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Tim Martin Kroemer
Adresse	Alaunstr. 58, 01099 Dresden
Geburtsdatum	09.07.1988
Geburtsort	Nashville/TN/USA
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Verheiratet, 1 Sohn, 1 Tochter

## Schulbildung

09/1994 – 07/1998	Pfaffenwaldgrundschule, Stuttgart
09/1998 – 07/2007	F.-L.-Jahn-Gymnasium, Greifswald

## Studium

10/2008 – 09/2010	Studium der Humanmedizin, Pommer- sche Medizinische Universität zu Stettin mit erstem Abschnitt der ärztlichen Prü- fung
10/2010 – 10/2014	Studium der Humanmedizin, Universi- tät Rostock mit zweitem Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Famulaturen

08/2010 – 09/2010	Famulatur in der Anästhesiologie an der Universität Greifswald
02/2011 – 03/2011	Famulatur in der Pädiatrie an der Uni- versität Jena
08/2012 – 09/2012	Famulatur in der kardiologischen Fach- praxis Eckhardt/Holzhausen in Rostock
01/2013 – 02/2013	Famulatur in der Kardiologie der Uni- versität Rostock

## Praktisches Jahr

08/2013 – 10/2013	Universitätsklinik für Innere Medizin, Abteilung Pneumologie, Universitätskli- nikum Rostock
10/2013 – 12/2013	Universitätsklinik für Innere Medizin, Abteilung Nephrologie, Universitätskli- nikum Rostock
12/2013 – 04/2014	Universitätskliniken für Unfallchirurgie, Orthopädie und Gefäßchirurgie, Univer- sitätsklinik Innsbruck
04/2014 – 07/2014	Universitätsklinikum für Anästhesiologie,

**Berufserfahrung**

Seit 01.10.2015 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Dresden, Leitung Prof. Dr. med. Stefan R. Bornstein

**Promotion**

seit

01.11.2011

Thema

Induktion und Funktion der Wnt-Signaltransduktion bei Pankreatitis und Diabetes mellitus

Institut

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Zechner D, Sempert K, Genz B, Timm F, Bürtin F, **Kroemer T**, Butschkau A, Kuhla A, Vollmar B: Impact of hyperglycemia and acute pancreatitis on the receptor for advanced glycation endproducts. Int J Clin Exp Pathol. 2013; 6:2021-9. IF: 1,8.

Zechner D, **Kroemer T**, Albert AC, Schönrogge M, Radecke T, Vollmar B: Analysis of Axin2 expression and function in murine models for pancreatic cancer. Cell Biosci. 2016; 6(1):49. IF: 3,477.

## Thesen der Dissertation

- Das PDAC ist ein Malignom mit äußerst schlechter Prognose trotz Entwicklung multimodaler Behandlungsansätze.
- Diabetes mellitus und Pankreatitis sind Risikofaktoren, die das Auftreten eines PDAC begünstigen.
- PDAC werden in den meisten Fällen sehr spät in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt.
- Methoden zur Früherkennung sind nur unzureichend etabliert; die Diagnostik über molekulare Signalwege könnte einen wertvollen Beitrag liefern.
- Wnt-Signaltransduktion spielt eine zentrale Rolle in der Tumorgenese unterschiedlicher Gewebe.
- Ziel der Studie war es, die Induktion und Funktion von Wnt-Signaltransduktion bei chronischer und akuter Pankreatitis in Verbindung mit Diabetes mellitus als Risikofaktoren für Pankreastumore zu untersuchen.
- Die Kombination von Diabetes mellitus und Pankreatitis führt zur Ausbildung von ADM.
- Die ausgebildeten ADMs zeigten eine ausgeprägte Wnt-Signalaktivität.
- Erhöhte Wnt-Signalaktivität hat keinen Einfluss auf den Verlauf von Pankreatitis und Diabetes mellitus.
- Weitere Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs von Wnt-Signalaktivität und der Entwicklung von Gewebsveränderungen im Pankreas sind notwendig.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erstellt habe. Die aus anderer Literatur zitierten Inhalte sind als solche kenntlich gemacht. Ich bestätige, dass ich diese Arbeit an keiner anderen Einrichtung als der Universität Rostock zur Erlangung des Grades Doktor der Medizin vorgelegt habe.

Dresden, im November 2020