

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität
Marburg, Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie
und Stoffwechsel,
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Gress



**Der Effekt von volatilem Tabakrauch auf die
Karzinogenese des Adenokarzinoms des
Pankreas im P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}-
Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)
Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Ruth Pohlkamp
aus Soest in Westfalen

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
05.12.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Michl

1. Korreferent: PD Dr. Koczulla

Für meine Familie

„Die gefährlichste Weltanschauung ist die Weltanschauung derer,
die die Welt nie angeschaut haben.“

Alexander von Humboldt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Prognose	1
1.1.2 Risikofaktoren.....	1
1.1.3 Pathologie.....	2
1.1.4 Symptomatik und Diagnostik.....	5
1.1.5 Therapie	6
1.2 Rauchen als Risikofaktor	7
1.3 Tabakrauch und Karzinogenese	8
1.4 Effekte von Tabakrauch auf zellulärer Ebene	10
1.4.1 DNA-Schaden.....	10
1.4.2 Proliferation	11
1.4.3 Angiogenese.....	12
1.5 P48 ^{+Cre} ; LSL-KRAS ^{G12D} -Mausmodell	13
2. Zielsetzung der Arbeit	15
3. Material und Methode	16
3.1 Material	16
3.1.1 Laborgeräte	16
3.1.2 Laborbedarf	17
3.1.3 Chemikalien.....	18
3.1.4 Reagenzien-Sets	19
3.1.5 Lösungen.....	20
3.1.6 Antikörper	24
3.1.7 Mausmodell	25
3.1.8 Software	25

3.2 Zellkultur.....	26
3.2.1 Zelllinie	26
3.2.2 Subkultivierung	26
3.2.3 Zellzahlbestimmung.....	27
3.2.4 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	27
3.2.5 Herstellung des Rauchmediums	27
3.2.6 Exposition der Zellen mit Rauch	28
3.3 Proteinchemische Methode	29
3.3.1 Herstellung des Gesamtproteins.....	29
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	29
3.3.3 Diskontinuierliche SDS – Page	29
3.3.4 Western-Blot.....	31
3.4 Mausmodell	32
3.4.1 Rauchexposition	33
3.4.2 Aufbereitung der Organe	35
3.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	35
3.6 Immunhistologie	36
3.6.1 Streptavidin-Peroxidase Methode	36
3.6.2 p-ATM.....	38
3.6.3 Ki-67	39
3.6.4 CD31	39
3.7 Statistik.....	40
4. Ergebnisse.....	41
4.1 Letalität im Mausmodell	41
4.2 Histopathologische Untersuchung	42
4.2.1 Histologie der WT-Mäuse	42
4.2.2 Histologie der K/C-Mäuse	42
4.3 Analyse des DNA-Schadens in vitro	54
4.4 Analyse des DNA-Schadens in vivo.....	55
4.4.1 DNA-Schaden der WT-Mäuse	55
4.4.2 DNA-Schaden der K/C-Mäuse	55

4.5 Analyse der Zellproliferation in vivo	58
4.5.1 Zellproliferation der WT-Mäuse	58
4.5.2 Zellproliferation der K/C-Mäuse	59
4.6 Analyse der Angiogenese in vivo	62
4.6.1 Angiogenese der WT-Mäuse	62
4.5.2 Angiogenese der K/C-Mäuse	63
5. Diskussion.....	65
5.1 Effekt der Rauchexposition auf die Histologie des Pankreas	65
5.1.1 Effekt der Rauchexposition auf die Histologie der WT-Mäuse.....	66
5.1.2 Effekt der Rauchexposition auf die Progression von Vorläuferläsionen der K/C-Mäuse	68
5.2 Effekt der Rauchexposition auf die DNA-Reparatur-Kaskade in vivo und in vitro	74
5.3 Effekt der Rauchexposition auf die Proliferation	79
5.4 Effekt der Rauchexposition auf die Angiogenese.....	82
6. Zusammenfassung	86
7. Abstract	87
8. Literaturverzeichnis.....	88
9. Anhang.....	108
9.1 Abbildungen und Tabellen	108
9.2 Abkürzungen und Einheiten.....	110
9.3 Auswertung mit ImageJ	112
9.4 Statistische Analysen	113
9.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	118
9.6 Danksagung	119

1. Einleitung

1.1 Das Adenokarzinom des Pankreas

1.1.1 Epidemiologie und Prognose

Tumorerkrankungen sind der modernen Medizin nach wie vor eine Herausforderung. Bei vielen Krebserkrankungen ist es in den letzten 30 Jahren zu einem deutlichen Anstieg der Überlebensraten gekommen - allerdings nicht beim Adenokarzinom des Pankreas (im Folgenden als Pankreaskarzinom bezeichnet) (Siegel et al. 2012), das im fortgeschrittenen Stadium noch immer eine infauste Prognose aufweist. Trotz der relativ geringen Inzidenz des Pankreaskarzinoms im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen (prozentualer Anteil an allen Tumorerkrankungen im Jahr 2010: 3,6 % bei Männern und 3,2 % bei Frauen) (RKI 2013), stellt es aufgrund der schlechten Prognose sowohl in Deutschland als auch global die vierthäufigste Krebstodesursache dar (RKI 2012; Siegel et al. 2012).

Nach Studien des Robert-Koch-Instituts (RKI) lag die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) im Zeitraum 2009/2010 nur bei 8 % (RKI 2013). Die schlechte Prognose ist darauf zurückzuführen, dass das Karzinom meist erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium klinisch auffällig wird und ein schlechtes Therapieansprechen auf konventionelle Radio- und Chemotherapie zeigt (Olive et al. 2009).

Ab dem 60. Lebensjahr steigt die Erkrankungsrate stetig an (Iodice et al. 2008; RKI 2013). Es findet sich eine gering höhere Erkrankungsrate bei Männern (RKI 2013) und Menschen afrikanischer Herkunft (National Cancer Institute 2012). Weniger Pankreaskarzinomfälle sind dagegen bei Menschen asiatischer Abstammung beschrieben (National Cancer Institute 2012).

1.1.2 Risikofaktoren

Der etablierte Hauptrisikofaktor zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms ist der Tabakkonsum. Dieser ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation und wird unter Kapitel 1.2 noch einmal genauer betrachtet. Die meisten Studien konnten einen zweifachen Anstieg des Risikos durch den regelmäßigen Konsum von Zigaretten nachweisen (Bosetti et al. 2012; Iodice et al. 2008).

Weitere Risikofaktoren sind hoher Alkoholkonsum (Duell 2012), fettreiche Ernährung und hoher Body-Mass-Index (Berrington Gonzalez et al. 2003; Gong et al. 2010). Darüber hinaus ist eine positive familiäre Anamnese (Pankreaskarzinom bei mindestens zwei Verwandten 1. Grades) risikosteigernd (Odds Ratio = 1,76) (Jacobs et al. 2010). Genetische Prädispositionen zur Entwicklung maligner Neubildungen des Pankreas sind außerdem das Peutz-Jeghers-Syndrom (Hearle et al. 2006; Su et al. 1999), die hereditäre Pankreatitis (Lowenfels et al. 1997), das familiäre Mammakarzinom (Noh et al. 2012) und das FAMMM-Syndrom (familiäres atypisches multiples Muttermal und Melanom) (Lynch et al. 2008).

Die chronische Pankreatitis gilt ebenfalls als Risikofaktor des Pankreaskarzinoms (Duell et al. 2012; Lowenfels et al. 1993). Dagegen wird die akute Pankreatitis als Frühsymptom des Karzinoms diskutiert (Munigala et al. 2014). Ob es sich beim Diabetes mellitus um einen Risikofaktor oder ein Frühsymptom handelt, ist nicht geklärt (Elena et al. 2012; Li 2012; RKI 2013).

1.1.3 Pathologie

Mehr als 90 % der Neubildungen des Pankreas sind Adenokarzinome des exokrinen Anteils (Klimstra 2007). Die Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms wird seit 1994 mit pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) in Verbindung gebracht (Klimstra und Longnecker 1994).

Wie auch in der Pathologie des Cervix- und des Kolonkarzinoms wird beim Pankreaskarzinom eine Dysplasie-Karzinom-Sequenz vermutet, bei dem die fortschreitende Dysplasie der präkanzerösen Läsionen durch Akkumulation bestimmter molekularer Veränderungen letztlich zum Vollbild eines Adenokarzinoms führt (s. Abbildung 1.1)(Maitra et al. 2003). Bei diesen molekularen Veränderungen handelt es sich um Mutationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturgenen. Diese führen zu einer Progression von gesundem Gewebe, hin zu maligner Entartung mit unkontrolliertem Zellwachstum.

In 90 % der Fälle von Pankreaskarzinomen lassen sich Mutationen im K-Ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) Protoonkogen nachweisen (Almoguera et al. 1988; Hingorani et al. 2003; Smit et al. 1988; Wood und Hruban 2012). Ras gehört zur Familie der G-Proteine und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion in der Zelle. Die G-Proteine haben im inaktiven Zustand GDP gebunden. Durch den Austausch von GDP gegen GTP mithilfe des guanine nucleotide-exchange factors (GEF) wird das Protein aktiv (Vetter und Wittinghofer 2001). Das GTP-bindende Ras

kann weiterhin folgende Signalmoleküle und Kaskaden aktivieren: Raf-MEK-ERK, PIK3-Akt, RalGEF, PLC-PKC, Nore1 und Tiam1. Diese Kaskaden regulieren letztlich den Zellzyklus, das Überleben und die Differenzierung der Zelle (Cox und Der 2010).

Der aktive Zustand des Ras-Proteins (GTP) wird normalerweise über die intrinsische GTPase-Aktivität wieder in den inaktiven überführt (GDP) (Vetter und Wittinghofer 2001). Durch eine aktivierende Punktmutation, meist im Codon 12 des K-ras-Gens ist dieser Mechanismus gestört und das Protein liegt dauerhaft im aktivierten Zustand vor (Hruban et al. 1993). Es kommt dadurch zu unkontrolliertem Wachstum der Zelle. Hier liegt das onkogene Potential der Mutation, welches im Rahmen der Versuche dieser Dissertation in einem Mausmodell genutzt wurde. Im Laufe der Progression zum Pankreaskarzinom steigt die Wahrscheinlichkeit einer K-ras Mutation innerhalb der Vorläuferläsionen von 36 %, über 44 %, auf 87 % in PanIN-1a, -1b, und -2, -3-Läsionen (Lohr et al. 2005).

Neben einer K-ras-Mutation lässt sich ein Verlust der p16 Funktion in ungefähr 95 % der Pankreaskarzinome nachweisen (Attri et al. 2005; Li et al. 2011; Wood und Hruban 2012). Ein Verlust des Wild-Typ Allels für p53 ist in circa 75 % der Karzinome nachweisbar (Redston et al. 1994; Scarpa et al. 1993; Wood und Hruban 2012). Darüber hinaus werden die Dysplasien von Mutationen im DPC4-Gen und BRCA begleitet (Hahn et al. 1996; Hahn et al. 2003).

Die derzeit gängige Klassifikation der PanIN-Läsionen geht auf Hruban et al. zurück. In einem Artikel von 2001 beschreibt diese Arbeitsgruppe Diagnosekriterien zur Einteilung von PanIN-1a bis PanIN-3 (Hruban et al. 2001). Eine schematische Darstellung der verschiedenen Stadien ist in Abbildung 1.1 zu sehen.

Ein normaler Dukt hat nach Hruban et al. kuboide Zellen und uniforme, runde Zellkerne. Eine PanIN-1a besitzt dagegen zylindrische Zellen und der Zellkern liegt basal. Wenn sich die zylindrischen Zellen papillär in das Lumen vorwölben, spricht man von einer PanIN-1b. Hierbei ist die Polarität noch erhalten. In der PanIN-2 kommt es zum Verlust der Polarität. Die Kerne stehen nicht mehr basal, sondern pseudomehrreihig (Hruban et al. 2001). Auch nukleäre Polymorphien sind geringfügig zu finden. Die Proliferationsrate in PanIN-2-Läsionen ist nur leicht erhöht (Sipos und Henopp 2011).

PanIN-3-Läsionen repräsentieren das In-situ-Karzinom des Pankreas und werden auch als high-grade-Läsionen bezeichnet. Sie weisen sowohl Kernatypien als auch einen kompletten Verlust der Polarität auf (Hingorani et al. 2003). Sehr häufig sind hier Mitosen zu erkennen (Sipos und Henopp 2011).

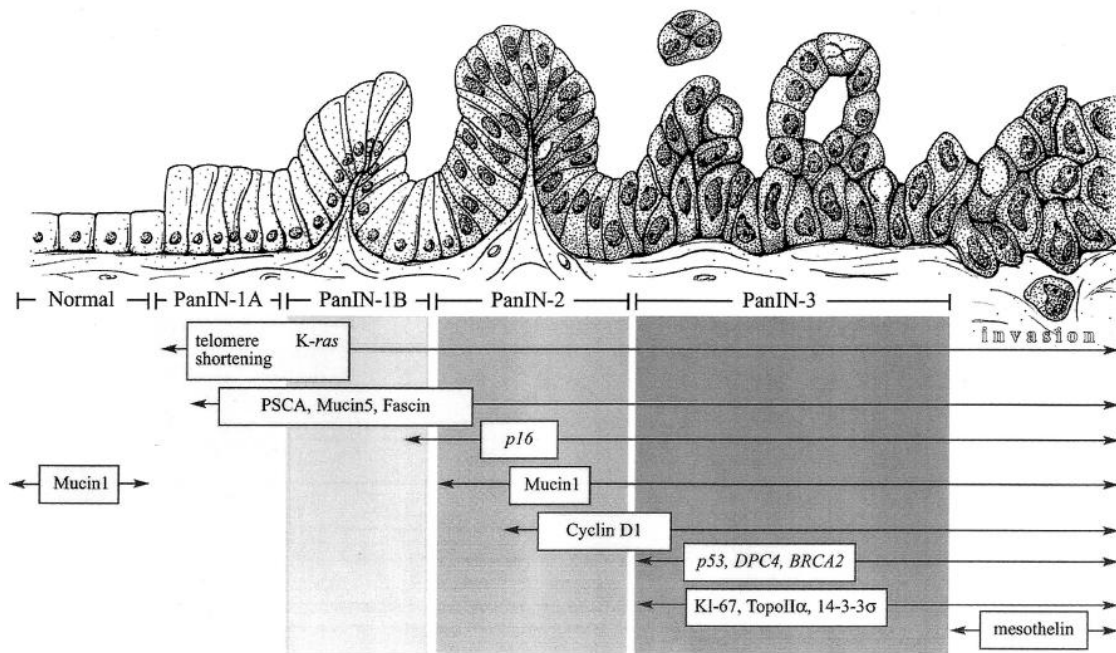


Abbildung 1.1: Dysplasie-Karzinom Sequenz des Pankreas.

Aus regelhaften Zellen des Pankreasganges entwickeln sich PanIN-Läsionen. Diese werden zu verschiedenen Zeitpunkten von bestimmten Mutationen der genetischen Information begleitet. Bereits früh kommt es zu einer Mutation von K-ras. Darstellung mit freundlicher Genehmigung aus: (Maitra et al. 2003).

Es ist noch immer unklar, ob sich PanIN-Läsionen aus dukталen Zellen entwickeln. So stellen einige Studien die Vermutung auf, dass sich PanIN-Läsionen aus Azinus-Zellen entwickeln könnten. Die azinären Zellen verändern sich dabei metaplastisch zu gangartigen Zellen. Dieser Vorgang wird azino-duktales Metaplasie (ADM) genannt. Ob diese ADM weiter zu PanIN-Läsionen fortschreiten, oder ob es sich um eine separat zu betrachtende Läsionsart handelt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

So zeigten beispielsweise Zhu et al. in ihrer Studie von 2007, dass als früheste Veränderung im P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}-Mausmodell (s. Kapitel 1.3) ADM-Läsionen auftraten (Zhu et al. 2007). Im Gegensatz zu den dukталen Zellen waren diese stark proliferativ. Darüber hinaus wiesen sie azinäre Zellen in PanIN-Läsionen nach und zeigten, dass frühe PanINs und ADMs ein ähnliches Expressionsmuster an Wachstumsrezeptoren ausbildeten (Zhu et al. 2007). Aichler et al. wiesen in PanIN-Läsionen eine positive Reaktion auf Trypsin-Marker nach, was ein Zeichen einer azinären Herkunft sein könnte (Aichler et al. 2012, S. 727).

1.1.4 Symptomatik und Diagnostik

Das Pankreas liegt retroperitoneal und zeigt daher eine eher unspezifische Symptomatik wie Gewichtsverlust, Erschöpfung, abdominale Schmerzen sowie Rückenschmerzen (Porta et al. 2005). Ikterus und Cholestase treten, durch eine Stenosierung des Ductus choledochus, vermehrt beim Pankreaskopftumor auf (Porta et al. 2005). Außerdem kann als Symptom des Pankreaskarzinoms eine Neigung zu Phlebothrombosen und Thrombophlebitiden vorliegen (Porta et al. 2005).

Wie bereits unter 1.1.2. beschrieben könnte es sich bei einem neuauftretenden Diabetes mellitus und einer akuten Pankreatitis um Frühsymptome des Pankreaskarzinoms handeln (Chari et al. 2005; Duell et al. 2012; Munigala et al. 2014). Die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF) empfiehlt in der Leitlinie zum Pankreaskarzinom von 2013 jeden neu aufgetretenen schmerzlosen Ikterus und jeden Oberbauch- oder Rückenschmerz bei Patienten über 50 Lebensjahren, (bzw. bei Patienten unter 50 Lebensjahren mit persistierenden Schmerzen oder weiteren Symptomen eines Pankreaskarzinoms) sonographisch abzuklären. Ebenfalls sollte eine akute Pankreatitis unklarer Genese über dem 50. Lebensjahr eine weitere Diagnostik auslösen. Die aktuelle Studienlage zum Thema Diabetes mellitus und Pankreaskarzinom wird als nicht eindeutig bewertet, sodass ein neu aufgetretener Diabetes mellitus keine Pankreaskarzinom-Diagnostik nach sich ziehen soll (AWMF 2013).

Zur Diagnose und Staging eines Pankreaskarzinoms sind die Ultraschall-, CT-, MRT- und ERCP-Untersuchung sehr gut geeignet (AWMF 2013; Bronstein et al. 2004; Karlson et al. 1999). Dabei ist die Ausbreitung des Tumors nach TNM-Klassifikation in Bezug auf die Organgrenzen, die Beteiligung von Lymphknoten und das Auftreten von Fernmetastasen zu beschreiben (Sobin et al. 2009). Eine Biopsie zur histologischen Sicherung der Tumorentität erfolgt mittels endosonographisch-gesteuerter Feinnadelbiopsie, wenn es differentialdiagnostisch das geplante Vorgehen ändern könnte. Bei primär resektablen tumorverdächtigen Raumforderungen wird die primäre Resektion angestrebt (AWMF 2013). Der Tumormarker CA 19-9 ist als Verlaufsparemeter während der Therapie aussagekräftig (Goggins 2005).

1.1.5 Therapie

Die einzige Therapieoption mit dem Ziel der Kuration ist derzeit die komplette chirurgische Resektion des Tumors. Allerdings sind nur ungefähr 20 % der Tumore lokal auf das Pankreas begrenzt und operabel (Rosewicz und Wiedenmann 1997).

Standard bei Tumoren im Pankreaskopf ist die partielle Duodenopankreatektomie (mit oder ohne Pyloruserhalt) und bei Tumoren im Pankreasschwanz die Pankreaslinksresektion (AWMF 2013).

Trotz einer kompletten R-0 Resektion ist die Prognose schlecht. Nach einem solchen Eingriff liegt die 5-JÜR bei circa 17 – 18 % (Cameron et al. 2006; Sohn et al. 2000; Winter et al. 2006). Dabei ist die Prognose abhängig vom Lymphknotenstatus (Riediger et al. 2009). Nach Cameron et al. liegt die 5-JÜR bei einem Lymphknotenbefall bei 14 %, ohne diesen bei 32 % (Cameron et al. 2006).

Um das Überleben zu verbessern, wird nach der Operation eine adjuvante Therapie angeschlossen. Sie zeigt signifikante Steigerungen der Überlebensrate und der rezidivfreien Monate (Neoptolemos et al. 2004; Oettle et al. 2007). Dabei zeigen die Chemotherapeutika 5-Fluoruracil (5-FU) und Gemcitabin ähnliche Ergebnisse (mediane Überlebenszeit nach OP plus Chemotherapeutikum ca. 23 Monate) (Neoptolemos et al. 2010).

Ein möglicher Nutzen einer neoadjuvanten Therapie ist bisher nicht ausreichend belegt (Andriulli et al. 2012) und Gegenstand laufender Studien (AWMF 2013).

Ist der Pankreastumor bereits über die Organgrenzen fortgeschritten, kommen palliative Maßnahmen zum Einsatz. Patienten in gutem Allgemeinzustand profitieren von einer intensivierten Chemotherapie mit 5-FU, Leucovorin, Oxaliplatin und Irinotecan (FOLFIRINOX) (Conroy et al. 2011). Gangobstruktionen oder Magenausgangsstenosen können mit Stents gelindert werden (Adler und Baron 2002; Moss et al. 2006; Moss et al. 2007). Bei starken Tumorschmerzen kann, neben der medikamentösen Therapie nach dem WHO-Stufenschema (World Health Organisation 2014) auch ein Plexus-Block Linderung verschaffen (Wong et al. 2004).

1.2 Rauchen als Risikofaktor

Nach neusten Zahlen der Europäischen Kommission sind ein Drittel der europäischen Bevölkerung Raucher (European Commission 2010). Dabei liegt Deutschland mit 25 % im Mittelfeld. Selbst als Nichtraucher ist ein Viertel der Bevölkerung durch passives Rauchen belastet (European Commission 2010).

Die Bedeutung dieses vermeidbaren Risikofaktors ist immens: 16 % der Todesfälle über dem 30. Lebensjahr in den USA und Europa sind durch eine Erkrankung bedingt, welche durch das Rauchen ausgelöst wurde (World Health Organisation 2012).

Die WHO stuft Tabakrauch als Karzinogen ein und geht aktuell davon aus, dass 25 % der Todesfälle durch maligne Tumore mit Rauchen assoziiert sind (IARC Working Group 2012).

Der Zusammenhang zwischen Rauchen und Lungentumoren ist dabei besonders groß. 9 von 10 Bronchialkarzinomen bei Männern sind auf den Konsum von Tabak zurückzuführen (RKI 2013). Darüber hinaus erhöht Rauchen auch das Risiko von Ösophagus-, Cervix-, Nieren-, Blasen-, Magen- und Pankreaskarzinomen (RKI 2013).

Eine Metaanalyse aus dem Jahre 2008 von Iodice et al. verglich 82 Risikostudien von 1950 bis 2007 (Iodice et al. 2008). Die Arbeitsgruppe fand ein 75 % höheres Risiko für Raucher als Nichtraucher am Pankreaskarzinom zu erkranken (Iodice et al. 2008). Einige Studien sprechen Rauchern gar ein zweifaches Risiko zu (Bosetti et al. 2012; Duell 2012; Lowenfels und Maisonneuve 2005).

Dabei ist das Risiko abhängig von der Menge des Tabakkonsums. Es steigt mit Anzahl der gerauchten Zigaretten am Tag und Jahren des Nikotinabusus an (Bosetti et al. 2012; Lynch et al. 2009). Ungefähr 15 bis 20 Jahre nach Beendigung des Rauchens sinkt das Risiko so weit ab, dass es ein Niveau wie bei Nichtrauchern erreicht (Bosetti et al. 2012; Lynch et al. 2009). Insgesamt sind 20 – 30 % der Pankreaskarzinome auf das Rauchen von Tabak zurückzuführen (Iodice et al. 2008).

Nicht nur der direkte Konsum von Tabak gilt als Risikofaktor. Auch das Kauen oder Schnupfen von Tabak (Boffetta et al. 2008), sowie die Exposition mit Passivrauch konnte als risikosteigernd für maligne Entartungen des Pankreas nachgewiesen werden (Vrieling et al. 2010).

1.3 Tabakrauch und Karzinogenese

Über 4000 verschiedene chemische Substanzen konnten bisher im Tabakrauch identifiziert werden (National Toxicology Program 2011). Darunter befinden sich neben dem psychisch wirksamen und abhängig machenden Nikotin (Pontieri et al. 1996) 70 wichtige karzinogene Stoffe wie Nitrosamine, polyzyklische Aromate, aromatische Stickoxide, Amine, Aldehyde, Phenole und weitere organische und anorganische Verbindungen (IARC Working Group 2012). Auch beim Kau- oder Schnupftabak sind neben dem Nikotin verschiedene Karzinogene nachweisbar (IARC Working Group 2007). Über die Lunge gelangt der inhalierte Rauch in den Kreislauf, wird metabolisiert und erzielt somit eine systemische Wirkung (Benowitz et al. 2002; Hecht 1999). Auch im Pankreas sind die karzinogenen Stoffe nachweisbar (Prokopczyk et al. 2002).

Der Weg von einer normalen zu einer eindeutig malignen Zelle benötigt die Mutation mehrerer Protoonkogene bzw. Tumorsuppressorgen (Vogelstein et al. 1988). Wie unter Kapitel 1.1.3 erläutert, wird angenommen, dass auch in der Malignomentstehung des Pankreas mehrere Veränderungen in der Zelle zusammentreffen müssen, um ein invasives Karzinom zu induzieren (Maitra und Hruban 2008).

Hanahan und Weinberg stellen in ihrem Review „Hallmarks of cancer“ von 2011 (Hanahan und Weinberg 2011) die Eigenschaften von malignen Tumorzellen zusammen (s. Abbildung 1.2). Neben ungehemmter Proliferation, Resistenz gegen Apoptose-Signale und wachstumsbeschränkende Faktoren, führen sie Induktion von Angiogenese und Metastasierung als Kennzeichen für Krebszellen an.

Wie unter 1.4.1 erklärt wird, führt Tabakkonsum zu Veränderungen in der DNA. Wenn Mutationen den Bereich eines Protoonko- oder Tumorsuppressorgens betreffen, kann es zu einer Induktion des oben beschriebenen malignen Verhaltens kommen (Hanahan und Weinberg 2011). Neben der Interaktion mit der DNA werden auch Rezeptoren, und letztlich deren Signalkaskaden, malignen Eigenschaften durch Tabakkonsum stimuliert (s. 1.4.2 und 1.4.3).

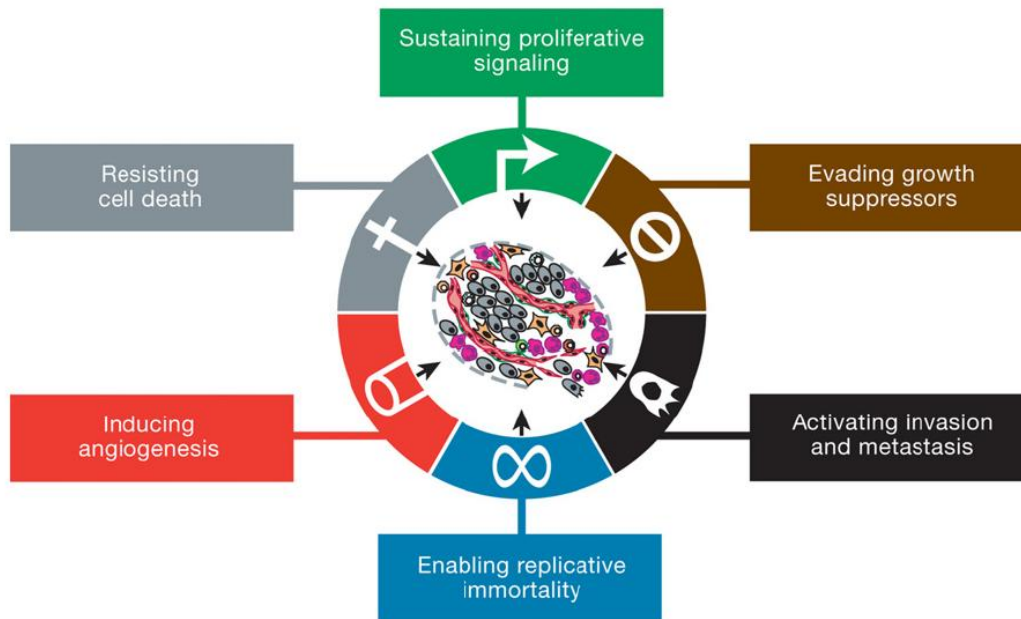


Abbildung 1.2: Eigenschaften von maligne entarteten Tumorzellen.

Sogenannte „Markenzeichen“ von malignen Zellen sind das Bestehen dauerhafter Proliferationssignale, die Resistenz gegen Apoptose- und wachstumshemmenden-Signale, Immortalität und die Induktion von Angiogenese und Metastasierung. Darstellung mit freundlicher Genehmigung aus: (Hanahan und Weinberg 2011).

Bisher haben einige Studien die Initiation eines Tumors durch hohe Mengen karzinogener Stoffe des Tabakrauches untersucht. Die starken kanzerogenen Substanzen DMBA und Nitrosamine wurden in Ratten und Mäuse direkt implantiert bzw. über das Trinkwasser verabreicht. Diese Tiere zeigten eine Tumorinduktion (Bersch et al. 2009; Dissin et al. 1975; Osvaldt et al. 2006; Rivenson et al. 1988; Rivera et al. 1997). Nach einem Review von Wittel et al. aus dem Jahr 2008 liegen die in diesen Modellen erreichten Konzentrationen der Karzinogene jedoch weit über den Mengen, die über das Rauchen aufgenommen werden können (Wittel et al. 2008). Um die Pankreas-Tumorinduktion unter Zigarettenrauch im Menschen realitätsnäher im Mausmodell abbilden zu können, exponierten Wittel et al. 2006 Wildtyp-Mäuse 3 Monate lang mit volatiltem Tabakrauch (Wittel et al. 2008). Die Arbeitsgruppe fand fibrotische und entzündliche Veränderungen aber keine Vorläuferläsionen im Sinne einer Tumorinduktion (Wittel et al. 2006; Wittel et al. 2008).

1.4 Effekte von Tabakrauch auf zellulärer Ebene

1.4.1 DNA-Schaden

Die Nitrosamine 4-Methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone werden durch das Cytochrom-P450-System verstoffwechselt (Hecht 1999; Momi et al. 2012a). Dabei kommt es zu einer α -Hydroxylierung, wodurch Zwischenprodukte entstehen, die methylierend und pyridyloxobutylierend auf die DNA wirken (Hecht 1999; Thomson et al. 2003). Diese Addukte verändern die Struktur der DNA, sodass der genetische Code vom ursprünglichen Aufbau abweicht. Diese Mutationen sind bei Rauchern sowohl in der Lunge (Phillips und Goodman 2009) als auch im Pankreas nachweisbar (Blackford et al. 2009; Momi et al. 2012a; Tang et al. 2013; Wang et al. 1998).

Neben der Methylierung kommt es durch Radikale im Tabakrauch auch zu Einzelstrangbrüchen der DNA (DeMarini 2004). Wenn auf jedem der zwei gegenüberliegenden Stränge eine Bruchstelle entsteht, können Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen (Jeggo und Löbrich 2007; Kastan und Bartek 2004; Toyooka und Ibuki 2009). Dadurch können ebenfalls Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene mutagen verändert werden (Hussain et al. 2003). DSB können außerdem entstehen, wenn während der Reparatur oder Replikation eines geschädigten DNA-Stranges die Transkriptionsgabel kollabiert (Jeggo und Löbrich 2007).

Blackford et al. betonen in ihrer Analyse der Rauch-induzierten Mutationen am Pankreas, dass die Mutationen der Proben keinem bestimmten Muster entsprachen, sondern in verschiedensten Genen auftreten konnten (Blackford et al. 2009). Bereits 1989 beschrieben Belinsky et al., dass die Methylierung der DNA auch das bedeutsame Protoonkogen K-Ras betreffen kann (Belinsky et al. 1989; Belinsky et al. 1990). Auch Hruban und Fryzek beschreiben diesen epidemiologischen Zusammenhang von Raucherstatus und K-Ras Mutation im Pankreaskarzinom (Fryzek et al. 2006; Hruban et al. 1993). Hruban fand in einer Untersuchung einen höheren Anteil K-Ras positiver Karzinome bei Rauchern. Fryzek bestätigte, dass Pankreaskarzinom-Patienten ohne K-Ras Mutation meist Nichtraucher seien. Eine Schädigung der DNA kann ebenso das p53-Gen betreffen, welches, wie unter 1.1.3 beschrieben, ebenfalls ein wichtiger Punkt der Tumorentstehung im Pankreas ist (Pfeifer et al. 2002).

Ein DNA-Schaden in Form eines DSB führt zur Autophosphorylierung der Serin-Proteinkinase Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) (Bakkenist und Kastan 2003). Das dimere Protein zerfällt dadurch in Monomere und aktiviert über Phosphorylierung unter

anderem die Proteine p53, NBS1 BRCA1 und SMC1 (Bakkenist und Kastan 2003; Kastan und Bartek 2004). Dies führt letztlich zur Aktivierung der DNA-Reparaturmechanismen, zum Zellzyklusarrest und Einleitung der Apoptose (Bakkenist und Kastan 2003; Kastan und Bartek 2004; Lee und Paull 2007; Oleson et al. 2014; Shiloh 2006).

Das Protein ATR wird durch alle Stressfaktoren der Zelle aktiviert, die ein Fortschreiten der Replikationsgabel verhindern (Kastan und Bartek 2004). Dabei ist ATR auch in der Reaktion auf DSB involviert, indem sich ATM und ATR teilweise beeinflussen und über parallele Signalkaskaden funktionieren (Kastan und Bartek 2004; Shiloh 2006). So führen p-ATM wie auch p-ATR zur Phosphorylierung des Histon-Protein H2AX (Shiloh 2006). Das aktivierte Histon-Protein Phospho-Histon-H2AX (γ -H2AX) zeigt die Position des DNA-Schadens an und dient dadurch als Wegweiser für DNA-Reparaturproteine (Nakamura et al. 2010; Paull et al. 2000). Die Arbeitsgruppen Albino et al. und Toyoka et al. zeigten, dass in pulmonalen Zellen die Exposition mit Tabakrauch zur Phosphorylierung von H2AX führt (Albino et al. 2004; Toyooka und Ibuki 2009).

1.4.2 Proliferation

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass es unter Einfluss von Inhaltsstoffen des Tabakrauchs zu einer gesteigerten Proliferation exponierter Zellen kommen kann. So zeigten beispielsweise implantierte Lungentumorzellen unter Nikotin-Injektionen ein höheres Tumorgewicht und mehr Metastasen (Davis et al. 2009) und Kolonkarzinomzellen unter Nitrosamin-Exposition ein gesteigertes Wachstum (Wu et al. 2005). Ungehemmtes Wachstum ist das grundlegende Zeichen für Malignität und wird durch vermehrte Aktivität der Wachstumssignalkaskaden, aber auch durch eine Resistenz gegenüber Apoptose-Signalen ausgelöst (Hanahan und Weinberg 2011).

Nikotin und Nitrosamine aktivieren Wachstumssignalkaskaden über den α -7-nicht-neuronalen-nikotinergeren-Acetylcholin-Rezeptor (α 7-nAChR) (Jull et al. 2001). Die Aktivierung des Rezeptors führt über den Raf/ERK/MAP-Kinase-Weg letztlich zu einer Phosphorylierung von weiteren Protoonkogenen wie c-myc und somit zur gesteigerten Proliferation der Zelle (Dasgupta et al. 2006; Jull et al. 2001; Shi et al. 2012; Upham et al. 2008).

Auch der β 2-Rezeptor steht in Verdacht durch den Tabakkonsum aktiviert zu werden. So zeigten Wu et al., dass Nitrosamine über den β 2-Rezeptor die cAMP-Konzentration in Lungenkarzinomzellen steigerten und somit die Proliferation der Zelle induzierten (Wu et al. 2005). Eine Resistenz gegenüber Apoptose-Signalen kann ebenfalls durch

Nikotin ausgelöst werden. So berichten Tsurutani et al., dass Nikotin das NF κ B-abhängige Überleben von Lungentumorzellen fördert (Tsurutani et al. 2005).

1.4.3 Angiogenese

Im adulten, gesunden Organismus ist die Angiogenese weitgehend inaktiv. Während der Wundheilung oder dem Zyklus der Frau wird sie wieder aktiviert (Hanahan und Folkman 1996). Kennzeichen einer neoplastischen Veränderung ist neben autonomem Wachstum auch die vermehrte Blutversorgung des Tumors (Folkman 1990; Hanahan und Weinberg 2011). Schon recht früh in der Tumorentstehung kommt es zu einer gesteigerten Angiogenese mit Bildung und Einsprossung neuer Mikrogefäße (Kapillaren, Arteriolen, Venolen) (Hanahan und Folkman 1996; Raica et al. 2009). Nur so kann ein Tumor eine ausreichende Nährstoff- und Sauerstoff-Versorgung für das starke Wachstum sicherstellen (Hanahan und Weinberg 2011).

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Nikotin sowohl in Tumor-, als auch in gesundem Gewebe die Angiogenese aktivieren kann. Eine der ersten Studien, die Nikotin erfolgreich in Verbindung mit einer gesteigerten Angiogenese brachte, war eine *in vitro* Analyse pulmonaler Endothelzellen von Rindern der Arbeitsgruppe Villablanca et al. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Nikotin, über nACh-Rezeptoren Endothelzellen zum Wachstum anregt (Villablanca 1998).

In einer Untersuchung von Heeschen und Kollegen wiesen sie nach, dass Lungentumore *in vivo* unter Einfluss von Nikotininjektionen mehr Kapillaren ausbilden und eine größere Tumormasse erreichen (Heeschen et al. 2001). Für die Ausbildung neuer Gefäße werden Endothelzellen und Fibroblasten benötigt. Nikotin aktiviert über den bereits unter 1.4.2 erwähnten $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor (Heeschen et al. 2002) die Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF) (Carty et al. 1996; Inamine et al. 2012; Ng et al. 2007; Shin et al. 2005; Shi et al. 2012) und somit die Vaskulogenese. Darüber hinaus lassen sich unter Nikotinexposition vermehrt endotheliale Vorläuferzellen im Knochenmark und im Gewebe nachweisen (Heeschen et al. 2006; Natori et al. 2003; Sugimoto et al. 2007).

Weiterhin steigert Nikotin über eine Aktivierung der Cyclooxygenase 2 die Prostacyclinsynthese (Boutherin-Falson und Blaes 1990; Shin et al. 2005) und die Freisetzung des gefäßerweiternden Stickstoffmonoxids (Clouse et al. 2000).

Eine zusammenfassende schematische Darstellung, der in dieser Arbeit untersuchten Effekte von Tabakrauch auf die Zelle, findet sich in Abbildung 1.3.

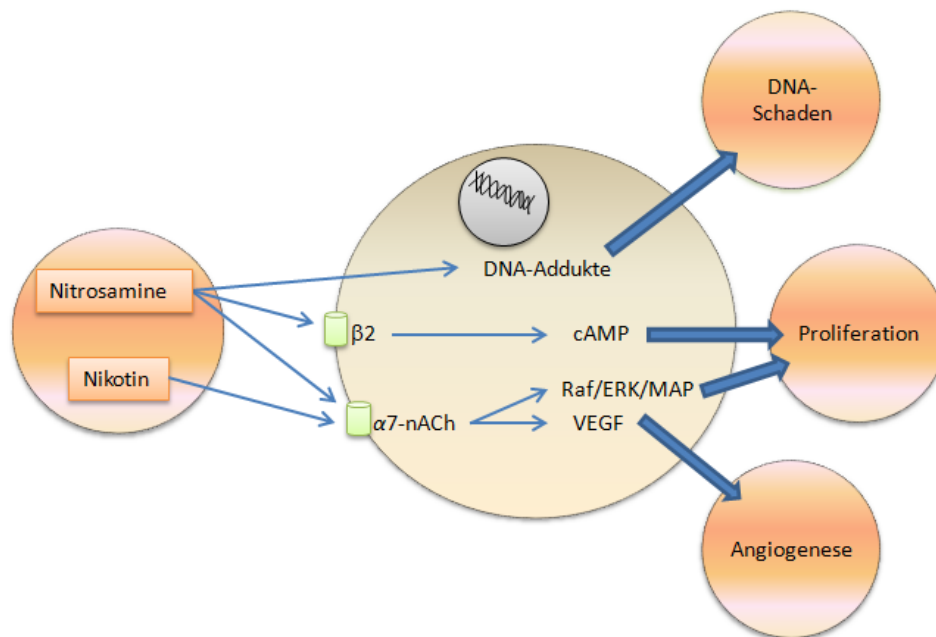


Abbildung 1.3: Effekte von Tabakrauch auf zellulärer Ebene.

Dargestellt sind die Effekte von Tabakrauch, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden. Nitrosamine führen zu Addukten in der DNA. Über den β 2-Rezeptor aktivieren sie die Bildung von cAMP und somit die Proliferation. Der α 7-nACh-Rezeptor wird durch Nitrosamine und Nikotin angeregt. Dies führt über die Aktivierung des Raf/ERK/MAP-Kinase-Weg zur Proliferation und über die Bildung von VEGF zur Angiogenese.

1.5 P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}-Mausmodell

Für die Untersuchungen dieser Dissertation wurde als etabliertes Modell der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms, das P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}-Mausmodell herangezogen. Wie unter 1.1.3 bemerkt, liegt eine Mutation im Codon 12 des Onkogens KRAS in über 90 % der Pankreaskarzinom-Fälle vor. Eine Veränderung dieses Protoonkogens wird als früher Schritt in der Pankreaskarzinom-Entstehung angesehen (Maitra et al. 2003). Um die Tumorentstehung und -progression des Pankreaskarzinoms zu untersuchen, entwickelten Hingorani et al. ein Mausmodell, in welchem ein verändertes, onkogenes K-ras Protein pankreasspezifisch exprimiert wird (Hingorani et al. 2003). Zugrunde liegt diesem Protein ein KRAS-Gen, welches im Codon 12 die Base Adenin anstatt Guanin enthält. Folglich wird in der Translation die Aminosäure Aspartat anstatt Glycin in das ras-Protein eingebaut. Mit Hilfe eines Vektors wird das Stoppcodon Lox-STOP-Lox (LSL) dem mutierten KRAS vorgeschaltet, sodass die Expression zuerst unterbunden wird. Diese Mäuse werden

mit Wildtyp-K-ras P48^{+Cre}-Mäusen (zur Vereinfachung ab nun als WT-Mäuse bezeichnet) gekreuzt, welche die Cre-Recombinase unter Kontrolle des pankreasspezifischen Transkriptionsfaktors p48 exprimieren. P48 ist entwicklungsbiologisch dafür verantwortlich, dass sich die Zellen der Chorda dorsalis zu Pankreaszellen differenzieren. Fehlt dieser Faktor werden, die Zellen zu Duodenalzellen (Kawaguchi et al. 2002). Ab Tag 9.5 der Embryonalentwicklung wird p48 in den späteren epithelialen Zellen exprimiert (Hingorani et al. 2003; Tuveson et al. 2004). Die Nachkommen haben den genetischen Hintergrund P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D} (im Folgenden als K/C-Mäuse bezeichnet). Das Stoppcodon vor K-ras wird durch die Recombinase (die über p48 in den pankreatischen Zellen exprimiert wird) ausgeschnitten (s. Abbildung 1.4). Durch die Expression des onkogenen K-ras in den Pankreaszellen werden die ras-abhängigen Signalwege aktiviert.

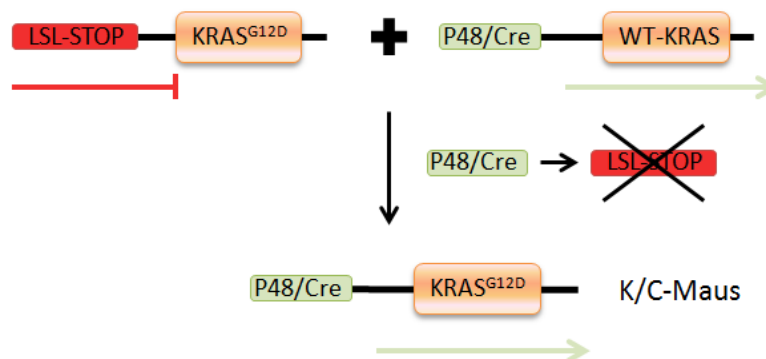


Abbildung 1.4: Restriktion des Stopcodons LSL durch die Cre-Recombinase.

Mäuse mit KRAS^{G12D} und vorgeschaltetem LSL-STOP werden mit Wildtyp-K-ras P48^{+Cre}-Mäusen gekreuzt. Die Nachkommen haben den genetischen Hintergrund P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D} (K/C). Die Expression der Cre-Recombinase, unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors p48, führt zum Wegfallen des Stopcodons und somit zur Expression des mutierten KRAS-Gens im Pankreas. Angelehnt an: (Hingorani et al. 2003).

Hingorani beschreibt, dass sich ab der zweiten Woche PanIN-1a-Läsionen entwickeln und Stroma mit Fibroblasten und Immunzellen das gesunde azinäre Gewebe verdrängt. Dies entspricht der Reaktion von humanen pankreatischen Neoplasien entspricht (Hingorani et al. 2003). Alle Stufen der PanIN-Läsionen treten in diesem Mausmodell auf. Einzelne Mäuse entwickeln ein Karzinom (Aichler et al. 2012; Hingorani et al. 2003). Eine extrapankreatische Pathologie konnte in der Studie von Hingorani et al. nicht gezeigt werden (Hingorani et al. 2003).

2. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist, im Mausmodell die Wirkung einer realitätsnahen Rauchexposition auf eine mögliche Tumorinduktion und Progression des Pankreaskarzinoms in vivo zu untersuchen.

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das unter 1.5 beschriebene $P48^{+/Cre}; LSL-KRAS^{G12D}$ -Mausmodell herangezogen. K/C- und WT-Tiere wurden mithilfe einer Rauchexpositions-kammer mit standardisiertem Tabakrauch exponiert. Die WT-Tiere mit nicht-mutiertem K-ras wurden zur Untersuchung einer möglichen Induktion von präkanzerösen Veränderungen herangezogen. K/C-Tiere zeigen bereits neoplastische Veränderungen aufgrund des aktivierten Onkogens KRAS. Durch die Exposition dieser Tiere mit Tabakrauch sollte der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Progression des Pankreaskarzinoms untersucht werden. Beide Gruppen wurden mit Kontrolltieren (Nichtraucher) des gleichen genetischen Hintergrundes verglichen. Zum Zeitpunkt der Versuche wurde der karzinogene Effekt von Rauch in einem solchen K-ras-Mausmodells des Pankreas noch nicht evaluiert. In der Arbeit sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Führt die Exposition von WT-Mäusen mit Tabakrauch zu präkanzerösen Läsionen?
- Schreiten präkanzeröse Läsionen im transgenen K-ras-Mausmodell im Sinne der Dysplasie-Karzinom-Sequenz unter Rauchexposition voran?
- Lässt sich DNA-Schaden durch Tabakrauch in vitro an humanen dukta-len Pankreaszellen nachweisen?
- Ist dieser DNA-Schaden auch im Mausmodell erkennbar und mit einer Initiation oder Progression in Verbindung zu bringen?
- Sind weitere Effekte von Tabakrauch (gesteigerte Angiogenese und Proliferation) nach einer volatilen Exposition im Mausmodell nachweisbar?

3. Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Gerät	Firma	Firmensitz
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Instruments	Osterode, GER
Dampfgarer Multi Gourmet	Braun	Kronberg, GER
Drahtbügel für Färbegestell	Kobe	Marburg, GER
Entwickler Curix 60	AGFA	Mortsel, B
Erlenmeyerkolben	Roth	Karlsruhe, GER
Färbegestell	Kobe	Marburg, GER
Färbekasten	Kobe	Marburg, GER
Feinwaage AE163	Mettler Toledo	Greifensee, CH
Gefrierschrank	Liebherr	Bulle, CH
Hämocytometer	Marienfeld	Königshofen, GER
Heizplatte	Medax	Kiel, GER
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, GER
Histoturm (Spezialanfertigung)	Kobe	Marburg, GER
Kryocontainer „Mr. Frosty“ 5100	Nalgene Labware	Wiesbaden, GER
Kühlschrank Minicoldlab 2023	LKB	Dresden, GER
Magnetrührer mit Heizplatte MR2000	Heidolph	Schwabach, GER
Mikroskope: Olympus BH-2 Leica LM 50 Zeiss Scope-A1	Olympus Leica Zeiss	Hamburg, GER Wetzlar, GER Oberkochen, GER
Mikrotom RM 2155	Leica	Wetzlar, GER
Mini-Protean Tetra System: Gelelektrophoresekammer + Glasplatten + Gel-Halterung, Klammern + 10-Taschen-Kamm	Bio-Rad	München, GER

Ph-Meter MR301	Heidolph	Schwabach, GER
Photometer Multiskan FC	Thermo Scientific	Waltham, USA
Pipetboy acu	Integra Biosciences	Fernwald, GER
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, GER
Rüttler Unimax 2010	Heidolph	Schwabach, Ger
Spannungsquelle Feather Volt 500	Stratagene	Cedar Creek, USA
Sterilbank LaminAir HBB2448	Heraeus Instruments	Osterode, GER
Stoppuhr	Oregon Scientific	Neu-Isenburg GER
Vortexer MS1 Minishaker	IKA	Staufen
Wärmeschrank	Memmert	Schwabach, GER
Wasserbad	Medax	Kiel, GER
Zentrifugen: Zentrifuge 5415C Kühlzentrifuge Micro 200R Megafuge 1.0	Eppendorf Hettich Heraeus	Hamburg, GER Tuttlingen

3.1.2 Laborbedarf

Laborbedarf	Firma	Firmensitz
96-Well Platten für BrdU	Perkin-Elmer	Rodgau
6-Well Gewebekulturplatte	Thermo Scientific	Waltham, USA
Blotting-Papier; 0,4 mm dick; mittlere Saugfähigkeit	Kobe	Marburg, GER
Dako Pen	Dako	Glostrup, DK
Deckgläschen	Menzel-Gläser	Braunschweig, GER
Einmalhandschuhe Nobaglove Latex	Noba	Wetter, GER
Eppendorf-Cups (0,5ml; 1,5ml und 2ml)	Eppendorf	Hamburg, GER
Falcon in verschiedenen Größen	Eppendorf	Hamburg, GER
Objektträger	Menzel-Gläser	Braunschweig, GER
Objektträger Super Frost Plus	Thermo Scientific	Waltham, USA
Parafilm	Greiner Bio-One	Kremsmünster, A
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µl	Gilson	Middleton, USA

PVDF-Membran, Immobilon-P	Millipore	Billerica, USA
Reagiergefäß 1,5 und 2 ml	Thermo Scientific	Waltham, USA
Reagenz – und Zentrifugenröhre (14 und 50 ml)	Sarstedt	Nürnberg, GER
Röntgenfilm	GE Health Care	München, GER
Sterile Einmal-Glas-Pipetten	Greiner Bio-one	Kremsmünster, A
Zellkulturflaschen (250, 500 ml)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, A
Zellschaber	Sarstedt	Nürnberg, GER

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Firmensitz
Acrylamid (Rotiphorese Gel)	Roth	Karlsruhe, GER
Agar-Agar	Roth	Karlsruhe, GER
APS	Serva	Heidelberg, GER
AMPUWA® Reinstwasser	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, GER
Bromphtonblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
BSA	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DAB	Roth	Karlsruhe, GER
DMSO	Roth	Karlsruhe, GER
DTT	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
ECL	GE Health Care	München, GER
EDTA	Roth	Karlsruhe, GER
EGTA	Roth	Karlsruhe, GER
Eosin G-Lösung 1%	Roth	Karlsruhe, GER
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
FCS	PAA	Pasching, A
Glycerin	Roth	Karlsruhe, GER
Glycerol	Roth	Karlsruhe, GER
Glycin	Roth	Karlsruhe, GER
30% H ₂ O ₂	Roth	Karlsruhe, GER
Hämatoxylin Lösung nach Mayer	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
HEPES	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt, GER
Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, GER
Methanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, GER
Natriumchlorid	Riedel-de Haen	Seelze, GER
Na-Fluorid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, GER
Natrium-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Propranolol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Protease Inhibitor, Protease Arrest [100x]	G-biosciences	Houston, USA
Rotclear	Roth	Karlsruhe, GER
Rotimount Eindeckel Gel	Roth	Karlsruhe, GER
SDS	Roth	Karlsruhe, GER
Streptavidin Peroxidase "Horseradish"	Vector Laboratories	Burlingame, USA
TEMED	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Triton X-100	Boehringer	Mannheim, GER
Tris/HCl	Roth	Karlsruhe, GER
Tris-Base	Roth	Karlsruhe, GER
Trypsin/EDTA	PAA	Pasching, A
Trypsin-Inhinitor von Soja Bohnen	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Xylol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

3.1.4 Reagenzien-Sets

Reagenzien-Sets „Kits“	Firma	Firmensitz
Bradford-Reagenz	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Mouse on Mouse (M.O.M.) Elite Peroxidase Kit	Vector Laboratories	Burlingame, USA
VECTASTAIN ABC Kit (Rat IgG)	Vector Laboratories	Burlingame, USA
VECTASTAIN ABC Kit (Rabbit IgG)	Vector Laboratories	Burlingame, USA

3.1.5 Lösungen

3.1.5.1 Zellkultur

Alle Lösungen und Verdünnungen wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, mit AMPUWA® Reinstwasser (Fresenius Kabi) hergestellt (folgend H₂O). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte unter Verwendung des pH-Meters MR301 Heidolph durch Zugabe von Natriumhydroxid oder Salzsäure.

Außerdem wurde Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca²⁺ & Mg²⁺ (1 x) (PAA, Pasching, A) verwendet.

Kulturmedium KSFM für HPDE Zellen:

5 ml	Pen/strep (Penicillin und Streptomycin) (100x Stock)	PAA (Pasching, A)
5 ml	L-Glutamin (100x Stock)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
6 ml	Sodium Pyruvat (100x Stock)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
10 µl	Recombinantes humanes EGF (10ng/µl Stock)	R & D Systems (Minneapolis, USA)
1 ml	Growth Supplement	Life Technologies (Carlsbad, USA)
500 ml	Gibco® KSFM	Life Technologies (Carlsbad, USA)

Medium für das Rauchkondensat:

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)

Einfrierlösung:

9 ml	KSFM
1 ml	DMSO

3.1.5.2 SDS Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Puffer für Gesamtproteinextrakt – Lysepuffer:

50 ml	1M HEPES (pH = 7,5)
30 ml	5M NaCl
5 ml	200mM EGTA
100 ml	10% Glycerin
10 ml	1% Triton x-100
4,2 g	100mM Na-Fluorid
4,5 g	10 % Natrium-Pyrophosphat x 10 H ₂ O
80 µl	Proteinase-Inhibitoren pro 2 ml Ansatz frisch hinzugeben

Lämmli-Probenpuffer 5x:

2,25 ml	225 mM Tris/HCl (pH = 6,8)
5 ml	50 % Glycerol
2,5 ml	5 % SDS
1 ml	100 mM DTT
	0,02 % Bromphenolblau

Trenngelpuffer (pH = 8,8):

90,85 g/ 500 ml	Tris Base
10 ml	0,4 % SDS

Trenngel:

10 %	15 %	
4,1 ml	2,5 ml	H ₂ O
2,6 ml	2,6 ml	Trenngelpuffer
3,3 ml	5,0ml	30 % Acrylamid
0,1 ml	0,1ml	10 % SDS
50 µl	50 µl	10 % APS
10 µl	10 µl	TEMED

Sammelgelpuffer (pH = 6,8):

30,275 g/ 500 ml	Tris Base
10 ml	0,4 % SDS

Sammelgel:

3 ml	H ₂ O
1,3 ml	Sammelgelpuffer
750 µl	30 % Acrylamid
50 µl	10 % SDS
30 µl	10 % APS
10 µl	TEMED

SDS-Laufpuffer:

0,2 M	Glycin
15,14 g/ 500 ml	Tris-Base
10 ml	0,4 % SDS

3.1.5.3 Western-Blot

Transfer-Puffer 10x:

30,28 g/l	Tris-Base
144,13 g/l	Glycin

Trans-Blot-Puffer:

100 ml	10x Trans Blot Puffer
200 ml	Methanol
700 ml	H ₂ O

TBS-Puffer (pH = 7,6):

121,4 g/5 l	Tris Base
400,31 g/3 l	Natriumchlorid

TBS-T:

100 ml	10 x TBS-Puffer
900 ml	H ₂ O
1 ml	Tween 20

Blocking-Puffer:

50 ml	TBS-T
5 %	Milchpulver

3.1.5.4 Immunhistochemie

PBS-Puffer 10x (pH = 7,4):

80 g/l	Natriumchlorid
2 g/l	Kaliumchlorid
2,4 g/l	Kaliumhydrogenphosphat
14,44 g/l	Natriumhydrogenphosphat

PBS-Puffer 1x (pH = 7,4):

100 ml	PBS 10x
900 ml	H ₂ O

TBS-HCl 10x 0,5M (pH = 7,6):

60,57g/l	Tris-HCL
87,33g/l	Natriumchlorid

TBS-T 1x (pH = 7,6):

100 ml	TBS-HCL 10x
900 ml	H ₂ O
1 ml	Tween 20

Citrat-Puffer (pH = 6,1):

10 ml	Dako Target Retrieval Solution pH 6,1 (10x)
90 ml	H ₂ O

TE-Puffer 10x (pH = 9):

12,1 g/l	Tris Base
3,7 g/l	EDTA

TE-Puffer 1x (pH=9):

100 ml	TE-Puffer 10x
900 ml	H ₂ O

Blocking-Puffer:

20 µl	Serum gleicher Herkunft wie der benutzte 2.AK (Kits von Vector Laboratories)
980 µl	PBS

DAB-Stock-Lösung:

1 g	DAB
40 ml	PBS

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Antikörper Western-Blot

1. und 2. Antikörper wurden in 5 % Trockenmilchpulver/PBS gelöst. Der 2. Antikörper war mit HRP gekoppelt.

Primäre Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti-β-Aktin	Maus	Sigma-Aldrich	1:1000
Anti-γ-H2AX	Kaninchen	Millipore	1:500
Anti-p-ATR	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
Sekundäre Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti-Rabbit IgG	Esel	GE-Healthcare	1:5000

3.1.6.2 Antikörper Immunhistochemie

Die 1. Antikörper wurden in Dako Diluent, die 2. Antikörper in PBS gelöst. Der 2. Antikörper Anti-Mouse wurde in dem dafür vorgesehenen Proteinpuffer aus dem „Mouse on Mouse (M.O.M.) Elite Peroxidase Kit“ von Vector Laboratories verdünnt.

Alle 2. Antikörper waren biotinyliert.

Primäre Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti-CD31 (PECAM-1)	Ratte	Dianova	1:20
Anti-Ki-67	Kaninchen	Thermo Scientific	1:600
Anti-p-ATM	Maus	Abcam	1:400
Sekundäre Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti-Rabbit	Ziege	Vector Laboratories	1:200
Anti-Rat	Kaninchen	Vector Laboratories	1:200
Anti-Mouse		Vector Laboratories	1:200

3.1.7 Mausmodell

Es wurden Mäuse mit dem genetischen Hintergrund P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D} von der Arbeitsgruppe Tuveson in Cambridge bezogen. Die Mäuse dieses unter 1.5 beschriebenen Modells exprimieren pankreasspezifisch dauerhaft aktives K-ras (Tuveson et al. 2004).

Die Exposition mit Tabakrauch wurde in Kooperation mit der AG Bals, Klinik für Pulmologie der Philipps-Universität, durchgeführt. Zur Berauchung benutzte die Arbeitsgruppe eine Rauchexpositions-kammer von Teague Enterprises und 3R4F Forschungs-Zigaretten der University of Kentucky.

3.1.8 Software

- ImageJ: Version 1.44p, Open Source Bildbearbeitungsprogramm von Wayne Rasband entwickelt (National Institutes of Health, USA)
- Microscop Imaging Software: LM 50, Leica Microsystems (GER)
- SPSS Statistics: Version 19, IBM (USA)

3.2 Zellkultur

Um zu überprüfen, ob sich DNA-Schaden durch Tabakrauch auch als DSB *in vitro* an humanen duktafen Pankreaszellen (HPDE) nachweisen lässt, wurden HPDE-Zellen kultiviert und einem speziell angefertigten „Rauchmedium“ (s. Kapitel 3.2.5) ausgesetzt. Dieses enthielt die Inhaltstoffe einer handelsüblichen Zigarette. Zur Detektion von DSB im Genom der Zelle wurden die Proteine γ -H2AX und p-ATR, mithilfe eines Western-Blots detektiert. Beide Proteine werden durch das Vorkommen von DSB aktiviert (s. Kapitel 1.4.1).

3.2.1 Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HPDE Zellen benutzt, die aus immortalisierten duktafen Pankreaszellen generiert wurden. Die Zelllinie wurde von der Kooperationspartnerin Frau Schwarte-Waldhoff der Universität Bochum zur Verfügung gestellt. Ursprünglich entwickelt wurde die Zellreihe durch die Arbeitsgruppe Ouyang et al. (Ouyang et al. 2000).

3.2.2 Subkultivierung

Alle Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer sterilen Arbeitsbank sowie mit sterilen Lösungen und Materialien durchgeführt.

Die HPDE-Zellen wurden mit dem Medium KSFM kultiviert. Zweimal in der Woche wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und neu aufgetragen.

Bei Erreichen einer ausreichenden Zelldichte von 50 - 80 % der Fläche, wurden die Zellen gesplittet und in neue Kulturflaschen umgesetzt. Um den Zellrasen abzulösen, wurden nach Absaugen des Mediums je 3 ml Trypsin/EDTA pro 175 T Flasche für 12 min im Wärmeschrank inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 ml Trypsin-Inhibitor gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann in ein 50 ml Falcon überführt und 3 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit KSFM resuspendiert. Als nächstes wurden die Zellen gezählt (s. 3.2.3) und je nach Bedarf weiter kultiviert oder ausgesät. Zur Weiterzucht wurden ca. 2 – 3 Millionen Zellen in 20 ml KSFM in eine neue Einweg-Zellkulturflasche gegeben. Anschließend wurden die HPDE Zellen im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gezüchtet.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Nach Verwendung eines Hämocytometers nach Neubauer wurde die Zellzahl der HPDE Kultur bestimmt. Vor dem Gebrauch wurde die Zählkammer mit Ethanol gereinigt. Dann wurden 10 µl der Zellsuspension an die Kante des aufgelegten Deckplättchens pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in vier Großquadranten mäanderförmig ausgezählt. Aus den vier Werten wurde der Mittelwert gebildet. Die Fläche in einem Kästchen betrug $1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$. Durch das Multiplizieren des Mittelwertes mit dem Faktor 10.000 erhielt man die Anzahl der Zellen in $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$. Aufgrund dieser Angabe war es möglich, eine bestimmte Anzahl von Zellen pro Well bzw. pro Kulturflasche auszusäen.

3.2.4 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Konservierung von Zellen diente dazu, die immortalisierten Zellen für künftige Versuchsreihen aufzubewahren.

Zuerst wurde wie unter 3.2.2 beschrieben ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde mit einer Lösung aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90 % KFSM resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Cups aliquotiert.

Über Nacht wurden die Aliquots in einen Container mit 100 % Propanol in den $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ -Kühlbehälter gegeben, wodurch es zu einer schrittweisen Abkühlung der Proben um $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ bis auf $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ kam. Anschließend wurden die Proben in $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ kalten flüssigen Stickstoff überführt. Die Wirkung des DMSO beruht auf der vollständigen Penetration in die Zelle (Schmitz 2009). Es bilden sich beim Einfrieren nur kleine Eiskristalle, welche die Zellmembran nicht beschädigen. Der hohe Gehalt an Proteinen in der Konservierungslösung hält die Proteinkonzentration intra- und extrazellulär gleich.

Um Zellen erneut zu kultivieren, wurden die Proben aus dem Stickstoff entnommen und in einem $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Wasserbad aufgetaut. In ausreichender Menge KFSM wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche gegeben, wobei das Medium direkt am nächsten Tag gewechselt wurde, um Rückstände des DMSO zu beseitigen.

3.2.5 Herstellung des Rauchmediums

Die Apparatur zur Gewinnung des Rauchmediums ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Eine glühende Zigarette wurde auf eine abgeschnittene blaue Pipettenspitze, die als Verbindung zum angeschlossenen Silikonschlauch diente, gesteckt. Durch den Sog einer Wasserstrahlpumpe wurde das Ziehen an einer Zigarette nachgestellt. Der

Wasserstrahl wurde so eingestellt, dass die Zigarette in ca. 1 ½ min abbrannte. Auf diese Weise gelangten die Inhaltsstoffe, die beim Rauchen einer Zigarette frei werden in einen nachgeschalteten, abgedichteten Erlenmeyerkolben.

Eine 10 ml Glaspipette leitete den Rauch dann in ein 50 ml Falcon-Gefäß. In diesem befanden sich bereits 10 ml DMEM Medium pro Zigarette. Das Medium DMEM wurde gewählt da das Medium KSFM zu Präzipitation geführt hätte.

Das gewonnene Medium wurde nicht filtriert, sondern zur Exposition der Zellen in entsprechenden Verdünnungen direkt auf die Zellen aufgetragen.

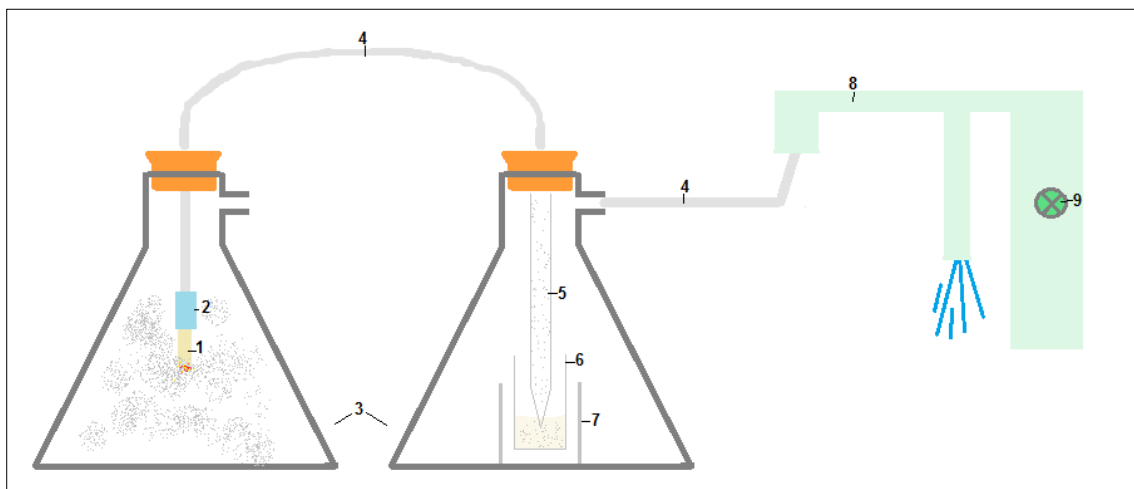


Abbildung 3.1: Apparatur-Schema zur Gewinnung des Rauchmediums.

1 = Zigarette, 2 = abgeschnittene blaue Pipettenspitze, 3 = Erlenmeyerkolben, 4 = Silikonschlauch, 5 = 10 ml Pipette, 6 = 50 ml Falcon, 7 = Glas als Halterung für Falcon, 8 = Wasserstrahlpumpe, 9 = Wasserhahn zur Geschwindigkeitseinstellung

3.2.6 Exposition der Zellen mit Rauch

Zur Proteingewinnung wurden je 200.000 Zellen in 1 ml KSFM pro Well einer 6-Well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Rauchmedium in den Verdünnungen 1 : 50, 1 : 100 und 1 : 200 in KSFM gelöst aufgetragen. Parallel wurden Kontroll-Proben belassen, welche nicht dem Rauchmedium ausgesetzt wurden, sondern weiterhin mit reinem KSFM. Nach 48 h wurden die Proteine geerntet.

3.3 Proteinchemische Methode

3.3.1 Herstellung des Gesamtproteins

Um das Gesamtprotein der HPDE-Zellen analysieren zu können wurde ein Zell-Lysat hergestellt. Hierzu wurde das Kulturmedium aus den 6-Well-Platten abgesaugt und 1 ml PBS zum Waschen aufgetragen. Nach dem Absaugen des PBS wurde angemessen viel Lysepuffer pro Well zugegeben und mithilfe eines Zellschabers der Inhalt des Wells abgelöst. Dieses Lysat wurde in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde die Probe für 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Dadurch setzten sich Zellmembranbestandteile ab und das proteinhaltige Lysat wurde in Eppendorf-Cups überführt und bis zur weiteren Benutzung eingefroren.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Konzentration von Proteinen in einer Probe zu bestimmen, wurde eine Extinktionsmessung bei 595 nm durchgeführt. Wenn der Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine bindet, so verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm (Rehm und Letzel 2010). Dies bedeutet, dass eine höhere Proteinkonzentration zu einer höheren Extinktion in diesem Bereich führt.

Eine 96-Well-Elisa-Platte wurde dazu mit je 500 µl Bradford-Vergleichslösung bzw. 500 µl Bradford + 200 µl Proteinprobe befüllt. Zwei Wells wurden als Nullwerte belassen. Um einen Mittelwert der Extinktion bilden zu können, wurde jede Probe als Doppelansatz pipettiert. Je 1 µl Probe wurde in 500 µl Bradford gegeben. Als Vergleichslösung mit bekannter Konzentration 1 µg/µl diente 10 % BSA. 0,5 µl, 1 µl und 2 µl wurden in je 500 µl Bradford Reagenz pipettiert. Am automatischen Multiscan-Photometer wurden die Proben analysiert. Die ermittelten Werte dienten zum Ansetzen von konzentrationsgleichen Proteingemischen aus Lämmli-Puffer + H₂O + Protein. Der Lämmli-puffer diente an dieser Stelle zur Entionisation der Proben.

3.3.3 Diskontinuierliche SDS – Page

Im nächsten Schritt wurde das unter 3.3.2 beschriebene Proteingemisch mithilfe einer diskontinuierlichen SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt. Der Bestandteil SDS im Gel ist ein anionisches Detergenz und unterbindet durch diese Eigenschaft die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Proteine. Als Folge liegen die Proteine negativ geladen und in ihrer linearen Form vor (Luttmann

et al. 2009). Die negative Ladung führt dazu, dass es unter Anlage einer elektrischen Spannung zur Wanderung der Proteine durch das Gel Richtung Anode kommt. Dabei können kleinere Proteine die aus Polyacrylamid gebildete dreidimensionale Netzstruktur im Gel schneller durchwandern als Proteine mit großer Molekülmasse (Luttmann et al. 2009). Ein mitlaufender Marker ermöglicht das Auffinden der gesuchten Masse. Durch Wahl des Acrylamidgehalts im Gel kann man die Gewichtung auf einen bestimmten Trennbereich legen (Rehm und Letzel 2010).

Im nachfolgend beschriebenen Versuch wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese nach dem Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffer durchgeführt. Hierbei wird auf das Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8 ein Sammelgel geschichtet, welches wiederum einen pH von 6,8 und einen geringeren Acrylamidgehalt ausweist (Rehm und Letzel 2010). Durch die vorgeschaltete Fokussierung der Proteinbande im Sammelgel und anschließende Auftrennung im Trenngel wird die Schärfe der Bandentrennung gesteigert.

3.3.3.1 Gießen der Gele

Zum Gießen der Gele wurden zwei Glasplatten mit Ethanol gesäubert und anschließend mit Klammern aneinander fixiert. 4 % Argarose wurde durch Erwärmen verflüssigt und diente der Abdichtung der unteren Öffnung.

Nach dem Protokoll unter 3.1.5.2 wurde das 8 % bzw. 15 % Trenngel mit Ammoniumpersulfat (APS) sowie dem Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyendiamin (TEMED) in einem 50 ml Falcon angesetzt und an einer Ecke der Glasplatten zügig in die Öffnung gegeben. Da das Trenngel nur in einem luftdichten Raum polymerisiert, wurde anschließend 1 ml Isopropanol auf die Trenngelschicht pipettiert. Nach 15 – 20 min war das Trenngel polymerisiert und das Isopropanol wurde verworfen. Folgend wurde das Sammelgel wie unter 3.1.5.2 beschrieben angesetzt und über das Trenngel geschichtet. Als Platzhalter für die späteren Taschen wurde abschließend ein Kamm in das Gel gesteckt. Nach weiteren 20 min war auch diese Phase polymerisiert.

3.3.3.2 Vorbereitung und Auftragen der Proben

Um die Tertiärstruktur der Proteine zu unterbinden und mögliche Proteasen zu inaktivieren wurde ein 5-facher-Lämmli-Puffer den Lösungen zugefügt (Rehm und Letzel 2010). Die Proteingemische mit Lämmli-Puffer wurden für 5 min auf 95 C° erhitzt.

Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurden 20 µl einer Probe in eine Geltasche aufgetragen. Weiterhin wurde pro Gel eine Tasche mit 5 µl Proteinstandard geladen. Nachfolgend wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Nach Durchlaufen des Sammelgels wurde diese Spannung auf 160 V erhöht.

3.3.4 Western-Blot

Bei einem Western-Blot handelt es sich um die elektrophoretische Übertragung der nach Größe aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Blottingmembran. Auf dieser Membran sind die Proteine fixiert und die gesuchten Epitope können durch Antikörper detektiert werden.

3.3.4.1 Blotting

Im Versuch wurde ein Nass-Transfer (Wet-Blot) durchgeführt. Dafür wurde die Membran mit 100 % Methanol aktiviert und mit dem Gel zusammen geschichtet. Gel und PVDF-Membran wurden sandwichartig von je zwei Blättern Filterpapier und einem Schaumstoffschwamm umrahmt, welche vorher mit Transferpuffer getränkt wurden. Es war darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten eingeschlossen wurden, da dies den Transfer hätte beeinträchtigen können (Luttmann et al. 2009). Der komplette Aufbau wurde in einer Gelkassette verriegelt und in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt.

Unter Eiskühlung erfolgte der Transfer der Proteinbanden auf die Membran bei 400 mA für 120 min. Aufgrund der negativen Ladung der Proteine durch SDS wanderten diese Richtung Anode und somit in Richtung der Membran.

3.3.4.2 Immunoblot

Um gesuchte Proteine spezifisch zu detektieren wurde ein Immunoblot durchgeführt. Antikörper bestehen aus Polypeptidketten und binden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip mit ihrer variablen Region an Epitope des gesuchten Antigens. Dabei werden elektrostatische Wechselwirkungen eingegangen, wie Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen (Luttmann et al. 2009).

Um diese Bindung sichtbar zu machen werden bestimmte Detektionssysteme angewendet. Die Antikörper werden dazu entweder direkt oder indirekt (durch Zwischenschaltung eines weiteren Antikörpers) mit einem Enzym-Komplex (in diesem Fall Peroxidase) verbunden. Dieser katalysiert die Umsetzung eines Substrats, das nach Ablauf der Reaktion farblich oder lumineszierend erscheint.

Da Antikörper durch Hydrophobizität und ihrer Möglichkeit zu elektrostatischen Bindungen ein unspezifisches Bindungsvermögen besitzen (Luttmann et al. 2009) kann es zu späteren Hintergrundfärbungen kommen.

Um dies zu reduzieren wurden zunächst mögliche unspezifische Bindungsstellen mit konkurrierendem Protein gesättigt. Dies geschah unter Durchführung eines einstündigen Blocks der Membran mit 5 % Trockenmilch-Blockpuffer bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde die Membran mit dem spezifischen Antikörper für das gesuchte Epitop über Nacht bei 4 C° inkubiert. Der Antikörper für γ -H2AX wurde 1 : 500, der Antikörper für p-ATR 1 : 1000 in 5 % Trockenmilch-Blockpuffer verdünnt.

Am folgenden Tag wurde die Membran 3 x 15 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Erstantikörpers wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter 2. Antikörper in der Konzentration 1 : 1000 hinzugefügt. Dieser wurde ebenfalls in 5 % Trockenmilch-Blockpuffer gelöst. Folgend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde die Membran entwickelt und somit die Bindung des Erstantikörpers sichtbar gemacht. Dazu wurde Enhanced Chemiluminescence Reagenz (ECL) auf die Membran aufgetragen.

Das Enzym Peroxidase des Zweitantikörpers katalysiert die Oxidation des ECL und bildet so eine Chemilumineszenz aus, die über einen Röntgenfilm detektiert werden kann (Rehm und Letzel 2010). Die Entwicklung des Filmes erfolgte in einer automatischen Entwicklermaschine.

Abschließend wurde zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinkonzentration eine β -Aktin-Ladungskontrolle durchgeführt. Dabei wurde die Membran für eine Stunde in einem direkt mit Peroxidase konjugierter β -Aktin Antikörper inkubiert und erneut entwickelt.

3.4 Mausmodell

Um den Einfluss von volatiltem Tabakrauch auf die Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms zu untersuchen wurde das unter Kapitel 1.5 beschriebene Mausmodell mit dem genetischen Hintergrund P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D} (abgekürzt mit K/C) für die folgenden Versuche gewählt.

In Zusammenarbeit mit der AG Bals der Klinik für Pneumologie wurden P48^{+Cre} Mäuse mit den LSL-KRAS^{G12D} Tieren gekreuzt. Die so gezeugten Nachkommen exprimierten

das mutierte, konstitutiv aktive K-ras (s. Kapitel 1.5). Neben diesen doppeltransgenen Mäusen wurden auch die einfachtransgenen P48^{+Cre} Mäuse (WT-Tiere) mit Wildtyp K-ras untersucht.

Alle Untersuchungen wurden vorab ordnungsgemäß nach § 8 Abs. 2 des Tierschutzgesetzes bekanntgemacht und durch das Veterinärdezernates des Regierungspräsidiums Gießen genehmigt.

In diesen genetisch unterschiedlichen Kohorten wurden jeweils Tiere mit Rauch exponiert, während einige als sogenannte „Nichtraucher“-Kontrollen nicht weiter behandelt wurden. Die Exposition wurde im Alter von 2 Monaten begonnen und für 3 bzw. 6 Monate durchgeführt. Die Kontrollen wurden entsprechend lange gehalten.

Insgesamt wurden 49 Mäuse in den Versuchsaufbau eingeschlossen. Bei diesen handelte es sich um 20 WT- und 29 K/C-Tiere (s. Tabelle 3.1). Nicht alle Tiere erreichten den Endpunkt des Experiments bzw. waren histologisch auswertbar (s. Ergebnisse 4.1). Tabelle 3.2 zeigt die Tiere, welche der histologischen Untersuchung zugeführt wurden.

Tabelle 3.1: Aufbau des Mausmodells nach genetischem Hintergrund und Expositionsstatus

	Nichtraucher	Raucher	insgesamt
WT-Mäuse	11	9	20
K/C-Mäuse	13	16	29

Tabelle 3.2: Histologisch ausgewertete Tiere nach ihrem genetischen Hintergrund, Expositionsstatus und Dauer der Exposition

	Nichtraucher		Raucher		insgesamt
	3 Monate	6 Monate	3 Monate	6 Monate	
WT-Mäuse	6	4	6	3	19
K/C-Mäuse	5	8	6	6	25

3.4.1 Rauchexposition

In Kooperation mit der AG Bals wurden die K/C- und WT-Mäuse mit Rauch exponiert. Die Arbeitsgruppe hat bereits Erfahrung bezüglich dieser Methodik. Das Protokoll, welches angewandt wurde, ist identisch mit dem zur Bronchialkarzinom-Forschung der Arbeitsgruppe.

Die Tiere wurden mit ihren Käfigen in die vorgefertigte Rauchexpositions-kammer von Teague Enterprises gesetzt (s. Abbildung 3.2). Es wurden drei Forschungszigaretten 3R4F der Universität Kentucky parallel verbrannt. Dies geschah für 3 h pro Tag bei einem negativen Druck von 0,4 Inches der Wassersäule. Diese Flussrate konnte auf der Rückseite der Maschine eingestellt werden. Durch diese Einstellungen wurde eine Rauchkonzentration von 100 - 120 mg/m³ TSP (total suspended particles) in den Expositions-kammern erreicht.

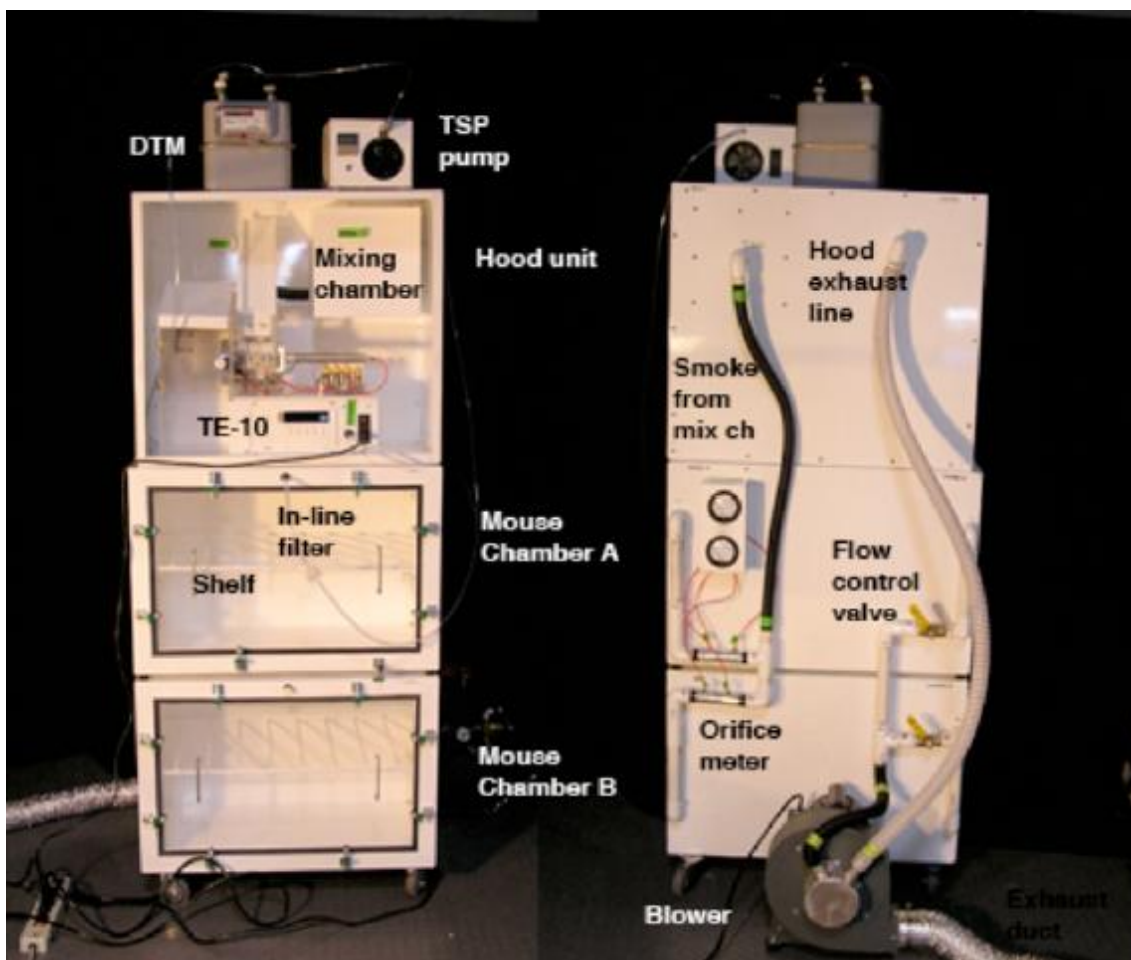


Abbildung 3.2: Rauchexpositions-kammer von Teague Enterprises.

In der TE-10 Rauchmaschine wurden Forschungszigaretten verbrannt und über die „Mixing Chamber“ in die verschiedenen Käfige geleitet. Zur genauen Bestimmung der TSP diente das „dry test meter“ (DTM), eine TSP-Pumpe mit Ventil und Zähler. Das Lüftungssystem ist auf der Rückseite (rechtes Bild) angebracht (Teague Enterprises).

3.4.2 Aufbereitung der Organe

Die Organentnahme wurde nach Betäubung mit Ketamin/Xylazin i.m. (Dosierung Xylazin: 6 - 8 mg/kg; Ketamin: 90 – 120 mg/kg) von Mitarbeitern der AG Baals durchgeführt. Nach Einleitung der tiefen Narkose wurde der Thorax eröffnet und eine Tötung durch Ausbluten vorgenommen.

Die Organe wurden ebenfalls von der AG Baals fixiert. Dazu wurden sie 24 h in 3 % Formalin fixiert und anschließend mit einer Ethanolreihe entwässert und in Paraffin eingebettet.

Um eine bestmögliche Schnittqualität zu erreichen, wurden die Paraffinblöcke vor dem Schneiden auf -18 °C gekühlt. Mit einem Mikrotom erfolgte die Anfertigung von 4 µm dicken Schnitten, die in einem 30 %-Ethanol-Bad aufgefangen wurden. Diese Schnitte wurden dann für einige Sekunden in ein 37 °C warmes Wasserbad übertragen um sich dort zu entfalten.

Da sich die Schnitte auf einfachen SuperFrost-Gläsern während des Demaskierungsschritts (s. unten) ablösten, wurden als Objektträger SuperFrost-plus-Gläser verwendet. Die Schnitte wurden aus dem Wasserbad auf die Objektträger überführt und auf einer 37 °C warmen Heizplatte für 20 min getrocknet. Es folgte die weitere Trocknung über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank.

3.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbungen der Pankreata wurden angefertigt um pathologische Veränderungen im Gewebe zu erkennen.

Zunächst wurden die Schnitte deparaffiniert, indem sie für 4 x 5min in Xylol gebadet wurden. Danach erfolgte die absteigende Alkoholreihe für je 4 min in 100 %, 96 %, 80 %, 70 % und 50 % Ethanol bis hin zu H₂O. Daraufhin wurden die Proben für 5 min in Hämalun umgesetzt. Es folgte für 30 sek die Färbung mit Eosin und ein kurzes Eintauchen in H₂O. Nach kurzer Inkubation in der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte eingedeckelt. Für die Auswertung der K/C-Tiere wurde ein beispielhafter Schnitt gefärbt. Um die WT-Tiere zu beurteilen wurden je drei Schnitte angefertigt, die mindestens 40 µm auseinander lagen.

Die angefertigten HE-Färbungen wurden in Kooperation mit dem Pathologen Prof. Dr. Sipos von der Universität Tübingen ausgewertet. Dazu wurden die Schnitte verblindet und komplett durchgemustert. Veränderungen im Gewebe wie Fibrose, Entzündung, Duktektasie sowie die Neoplasien PanINs und ADMs wurden mit Rängen von „0“

(keine), „0/1“ (vereinzelt), „1“ (in ca. 10 % des Gewebes), „2“ (vermehrt aufzufinden, 20 – 40 % des Gewebes betreffend) bis „3“ (sehr stark ausgeprägt, über 50 % des Gewebes betreffend) versehen. Darüber hinaus wurde der Anteil aller Neoplasien am Gesamtschnitt geschätzt.

Anschließend wurden die HE-Färbungen der 6-Monats-K/C-Raucher und -Nichtraucher in Kollaboration mit dem Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) in Madrid computerbasiert ausgewertet. Die AG Heeschen verfügt über ein Scanner-System (Mirax Scan von Zeiss), welches das Einscannen eines kompletten histologischen Schnittes ermöglicht. Mithilfe der Analyse-Software Panoramic Viewer (3D Histech) wurde die genaue Anzahl der PanIN-Läsionen im Pankreasgewebe bestimmt. Die Auswertung erfolgt verblindet durch eine erfahrende Pathologin.

3.6 Immunhistologie

Die Immunhistologie ermöglicht die Identifikation bestimmter Zellstrukturen im Gewebeschnitt durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern. Diese Untersuchung hatte zum Ziel in den WT- und K/C-Tieren mögliche Effekte von Rauch zu beschreiben. Mithilfe dieser Methode wurden DNA-Schäden, proliferierende Zellen und Gefäße quantifiziert. Die paraffinierten Schnitte wurden mit der Streptavidin-Peroxidase Methode gefärbt, deren Durchführung in ihren Grundzügen im Folgenden erklärt wird. Besonderheiten der einzelnen Färbeserien werden ab Kapitel 3.6.3 erläutert.

3.6.1 Streptavidin-Peroxidase Methode

3.6.1.1 Antigen Demaskierung

Die Paraffin-fixierten Schnitte wurden für 4 x 5 min in Xylol gebadet und dadurch deparaffiniert. Darauf folgte die Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe für je 5 min in 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol und zuletzt H₂O. Die Fixierung mit Paraffin führt zu Querverbindungen führen, welche die Antigenität der Proteine im Gewebe stört (Luttmann et al. 2009). Um diese Verbindungen aufzubrechen, war es in den meisten Fällen nötig einen Demaskierungsschritt in die Färbung einzufügen.

In einem Dampfgarer, der feuchte Hitze erzeugt, wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH = 6) oder TE-Puffer (pH = 9) für 15 min gekocht. Die Reaktion wurde mit kaltem Leitungswasser gestoppt und die Schnitte anschließend noch einmal mit TBST gewaschen.

3.6.1.2 Blocking

Der Antigennachweis erfolgte mithilfe des Enzyms Peroxidase. Um endogene Peroxidase zu blockieren wurden die Präparate für 15 min in 3 % H₂O₂ inkubiert.

Nach einem weiteren Waschgang folgte der Serumblock. Hierbei wurden mit konkurrierendem Protein mögliche unspezifische Antikörperbindungsstellen in den Geweben überdeckt. Dafür wurde Normalserum verwendet, das aus der gleichen Spezies stammte wie der 1. Antikörper. Die Schnitte wurden mit je 100 µl 2 %-Serum (gelöst in PBS) aus dem entsprechenden Peroxidase Kit für eine halbe Stunde in der Feuchtekammer bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Auftragen des Serums zu erleichtern, wurden die Präparate auf den Objektträgern mit einem Dako Pen umrandet, welcher eine hydrophobe Barriere bildete.

3.6.1.3 Antigen Detektion

Der primäre Antikörper wurde in entsprechenden Konzentrationen (s. 3.1.6.2) in Antikörper Diluent von der Firma Dako gelöst. Die Schnitte wurden mit jeweils 100 µl Antikörperlösung benetzt und über Nacht bei 4 °C in der Feuchtekammer inkubiert.

In jeder Färbereihe wurde je eine Kontrolle ohne Inkubation des primären Antikörpers eingefügt, um unspezifische Färbungen zu detektieren.

Zur Detektion des 1. Antikörpers wurde je ein Zweiantikörper gewählt, der spezifisch die Fc Region des 1. Erkante. Der 2. Antikörper war mit Biotin konjugiert, was als spezifische Bindungsstelle für das Proteine Streptavidin dient (Luttmann et al. 2009).

Nach der Inkubation über Nacht wurden die Schnitte nach einstündigem Aufwärmen wiederholt in TBST gewaschen. Der Zweitantikörper wurde aus dem entsprechenden Peroxidase Kit entnommen und 1 : 200 in PBS gelöst. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte erneut 2 x 5 min Waschen in TBST.

3.6.1.4 Streptavidin-Peroxidase Komplex

Streptavidin wurde in diesem Fall als Komplex mit dem Enzym Peroxidase benutzt.

Streptavidin wurde gewählt, da das Protein Avidin zu vermehrt unspezifischen Färbungen geführt hatte. Dies liegt daran, dass Avidin aufgrund eines Kohlenhydratanteils und eines hohen isoelektrischen Punktes zur Assoziation mit biologischen Strukturen neigt. Streptavidin hat keine solchen Kohlenhydratanteile (Luttmann et al. 2009).

Für die Untersuchung wurde eine Verdünnung von 1 : 400 Streptavidin-Peroxidase in PBS benutzt. Die Präparate wurden für 30 min. bei Raumtemperatur mit 100 µl der Lösung inkubiert und dann in TBST gewaschen.

3.6.1.5 Visualisierung

Zur Visualisierung wurde das Substrat Diaminobenzidin (DAB) zugegeben. Jeweils 1 ml der DAB Stock-Lösung wurde im Dunkeln in 50 ml PBS gelöst. Unter Zugabe von H_2O_2 wurde das Substrat zu einem braunen Präzipitat oxidiert. Die vom primären Antikörper markierten Zellstrukturen erscheinen durch dieses Verfahren braun.

Diese Reaktion wurde mit der Zugabe von 20 μ l H_2O_2 in den Färbetrog gestartet. Zügig wurden die Schnitte für die entsprechende Dauer (s. 3.6.3 ff.) in den Trog eingetaucht und anschließend für 2 x 5 min in H_2O gewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Präparate für 15 sek in Hämalauin getaucht und unter laufendem Leitungswasser 3 min gebläut. Um die Schnitte haltbar zu machen, wurden sie in der aufsteigenden Alkoholreihe 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol dehydriert und für 2 x 5 min in Roticlear gebadet. Eingedeckt wurde mit Rothi Mount.

3.6.2 p-ATM

Um den schädlichen Effekt von Rauch auf die DNA im volatilen Mausmodell zu bestimmen, wurden Pankreasgewebsschnitte auf das oben beschriebene Protein p-ATM gefärbt. P-ATM wird aktiviert wenn es in der DNA zu DSB kommt (Bakkenist und Kastan 2003).

Da der p-ATM-Antikörper aus der Spezies Maus stammte, stellte dies eine Schwierigkeit für den Anti-Maus-Zweitantikörper dar, zwischen endogenen Mausantikörpern und dem zugefügten Detektionsantikörper unterscheiden zu können. Aus diesem Grund mussten in dieser Färbereihe besondere Proteinblockierungen eingefügt werden. Für 15 min wurde ein Demaskierungsschritt in pH = 9 durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte in 1 % Triton bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Als Proteinblockierung wurde neben dem Normalserum-Blocking mit Ziegenerum ein zusätzlicher endogener Maus-IgG-Block durchgeführt. Dazu wurde unkonjugiertes AffiniPure-Fab Fragment Ziege anti-Maus IgG(H+L) von Jackson Immuno Research in PBS 1 : 20 verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Außerdem wurden sowohl der Erst- als auch der Zweitantikörper in speziellem MOM Diluent der Firma Vectorlabs verdünnt. Dabei wurde der Primärantikörper 1 : 400 verdünnt und der Sekundärantikörper 1 : 200. DAB wurde anschließend für 2 min aufgetragen.

Zur Auswertung wurden verblindet zehn zufällige Bildausschnitte neoplastisch-aktiver Regionen der K/C- (mit 40-facher Vergrößerung) fotografiert. Unter Verwendung des Analyseprogramms ImageJ wurde die Anzahl der Zellen nachträglich am Computer ausgezählt. Eine beispielhafte Auswertung mit diesem Programm ist im Anhang zu

finden (s. 9.3). Es wurden alle Zellen je Neoplasie und deren positiv gefärbten Zellen gezählt und die Prozentzahl der positiven Zellen bestimmt. Dabei wurde zwischen ADM und PanIN unterschieden. Die WT-Tiere wurden nicht weiter ausgewertet, da sich alle Inselzellbereiche positiv zeigten.

3.6.3 Ki-67

Zur Analyse, ob die volatile Tabak-Exposition im Mausmodell zu einer Veränderung der Proliferationsfraktion im Pankreasgewebe führt wurde der Marker Ki-67 herangezogen. Das nukleäre Protein Ki-67 ist in jeder Phase des Zellzyklus aller proliferierenden Zelltypen nachweisbar (Gerdes et al. 1983; Scholzen und Gerdes 2000). In ruhenden Zellen wird es nicht exprimiert (Gerdes et al. 1983).

Zur Demaskierung wurde TE-Puffer (pH = 9) gewählt. Da der primäre Antikörper aus der Spezies Kaninchen stammt wurde das sogenannte „Rabbit Peroxidase Kit“ angewendet. In diesem enthalten ist ein Block aus Ziegen Serum.

Der primäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1 : 600 angewendet. Der sekundäre Antikörper ist ein Ziegenantikörper gegen den primären Kaninchenantikörper. Die Schnitte wurden für 17 min in DAB getaucht.

In den Schnitten der K/C-Tieren wurden zufällige Neoplasie-Regionen in 40-facher Vergrößerung verblindet fotografiert (je 10 Bilder pro Maus) und getrennt ADMs und PanINs mit ImageJ ausgewertet. Dadurch erhielt man die spezifische Proliferationsrate der Läsionstypen, aus der die Gesamtproliferation aller Neoplasien berechnet werden konnte. Die Bildausschnitte der einfach transgenen WT-Mäuse waren frei von Neoplasien. Es wurden daher alle positiven Zellen in zufällig fotografierten Bildern (je 10 Bilder pro Maus) in 20-facher Vergrößerung gezählt und der Mittelwert gebildet.

3.6.4 CD31

Um der Frage nachzugehen, ob es in den exponierten Mäusen zu einer gesteigerten Angiogenese im Vergleich zu den Kontrolltieren kommt wurden CD31-Färbungen durchgeführt. Dieses Antigen ist auf der Oberfläche von Endothelzellen zu finden (Albelda et al. 1991). CD31 wurde mithilfe eines Rattenantikörpers nachgewiesen. Die Demaskierung erfolgt durch Citrat-Puffer. Der Peroxidase Block wurde erweitert. Anstatt eine 3 % Lösung H_2O_2 mit PBS herzustellen wurde Methanol gewählt. Da der Normalserum-Block des Kits ausschließlich mit Kaninchen-Serum zuviel Hintergrund auslöste wurde ein zusätzlicher 10 % FCS Block (in PBST) für 20 min durchgeführt. Der Primäantikörper hatte die Konzentration 1 : 20. Die Reaktion des DAB dauerte 18

min. Für die Auswertung der K/C-Mäusen wurden zehn neoplastische Regionen zufällig bei 20-facher Vergrößerung verblindet fotografiert. Mit ImageJ wurden die positiv gefärbten Mikrogefäße pro Bildausschnitt gezählt. Es wurden jene Strukturen als positiv gewertet, die ein Lumen aufwiesen oder langgezogene positive Strukturen, die ein längsgeschnittes Gefäß vermuten ließen. Größere Gefäßstrukturen mit muskulären Anteilen wurden nicht mit gezählt. Über die Anzahl in allen Fotos je Maus wurde der Mittelwert gebildet. Die WT-Tiere wurden in fünf zufällig gewählten Bereichen in 20-facher Vergrößerung verblindet fotografiert. Auch hier wurden die positiv gefärbten Kapillaren mit ImageJ fotografiert und pro Maus gemittelt.

3.7 Statistik

Die verblindet ermittelten Werte der histologischen Untersuchungen wurden in eine SPSS-Maske eingegeben und analysiert. Zur Auswertung der metrischen Werte wurden zunächst die deskriptiven Lageparameter Mittelwert und Standardabweichung der verschiedenen Gruppen (3- bzw. 6-Monats-Raucher und -Nichtraucher) ermittelt. Die Verteilung der ordinal-skalierten Messwerte und die Messwerte des Kooperationspartners CNIO wurden durch den jeweiligen Median beschrieben.

Um die Hypothese, dass Expositionsgruppe und Kontrollgruppe sich unterscheiden zu überprüfen wurden statistische Tests angewandt. Für die Untersuchung der metrischen Messgrößen wurde eine multilineare Regression herangezogen. Die lineare Regressionsanalyse ist ein Verfahren zur Analyse des Einflusses von einer oder mehreren unabhängigen Variablen (Raucherstatus und Dauer), die ein beliebiges Messniveau aufweisen können, auf eine metrische, abhängige Variable. So konnten sowohl die 3-Monats-Tiere als auch die 6-Monats-Tiere in einem statistischen Test betrachtet werden. Um zu untersuchen, ob zwischen den ordinal verteilten Ergebnissen der Raucher und Nichtraucher ein signifikanter Unterschied besteht wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Da dieser den Einflussfaktor Dauer (=Alter) nicht mit betrachtet hat wurden die 3- bzw. 6-Monatsgruppe getrennt auf den Einfluss des Rauchens untersucht. Auch die Werte des Kooperationspartners in Madrid wurden mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet. Hier wurden nur die 6-Monats-Tiere betrachtet. Die jeweilige Nullhypothese (kein Unterschied zwischen Expositions- und Kontrollgruppe) wurde mit einem Signifikanzniveau von 5 % abgelehnt, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ betrug. Die von SPSS ausgegebenen Ergebnisse der statistischen Analyse sind zusätzlich zum Ergebnisteil im Anhang (Kapitel 9.4) aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Letalität im Mausmodell

Um die Wirkung von Rauch auf die Tumorprogression des Pankreas zu untersuchen, wurde das Mausmodell P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D} herangezogen. Insgesamt wurden 49 Tiere in den Versuchsaufbau eingeschlossen. Davon handelte es sich bei 20 um WT-Tiere und bei 29 um K/C-Tiere, welche das mutierte K-ras exprimierten.

Aus diesen Gruppen wurden Mäuse in einer speziellen Rauchkammer für 3 bzw. 6 Monate mit Rauch exponiert (=Raucher). Kontrollen (=Nichtraucher) aus den jeweiligen genetischen Gruppen wurden ohne weitere Behandlung für denselben Zeitraum weiter gehalten. Anschließend wurden die Tiere geopfert und histologisch aufgearbeitet. Aus den Pankreaspräparaten wurden HE-Färbungen angefertigt.

Nicht alle Tiere erreichten den Endpunkt des Experiments. Die Letalität der doppeltransgenen Raucher war gegenüber den anderen Gruppen erhöht. In der Gruppe der K/C-Raucher verstarben drei von ursprünglich 16 Mäusen. Die Letalität betrug in dieser Gruppe folglich 18,75 %. Eine weitere Maus verstarb in der Gruppe der einfachtransgenen WT-Nichtraucher. Die Gruppe bestand aus 11 Mäusen. Somit lag die Letalität in dieser Gruppe bei 9 % (s. Tabelle 4.1). Informationen zur Todesursache der Tiere waren von der AG Baals in Homburg nicht erhältlich.

In der Gruppe der doppeltransgenen Nichtraucher und den einfachtransgenen Rauchern kam es zu keinen Todesfällen.

Tabelle 4.1: Letalität im Mausmodell

	WT-Mäuse	K/C-Mäuse
Nichtraucher	9 % (n = 1)	0 %
Raucher	0 %	18,75 % (n = 3)

Neben der Tatsache, dass einzelne Mäuse verstarben, konnte die Bauchspeicheldrüse einer Maus aufgrund mangelnder Fixierung nicht in die Auswertung mit aufgenommen werden, sodass letztlich 44 Tiere den histologischen Auswertungen zugeführt wurden (s. Tabelle 3.2 Kapitel 3.4).

4.2 Histopathologische Untersuchung

Die einfachtransgenen WT-Mäuse zeigten einen regelhaften Aufbau. Pathologische Auffälligkeiten fanden sich nur in den doppeltransgenen K/C-Mäusen.

4.2.1 Histologie der WT-Mäuse

In der Gruppe der einfachtransgenen Mäuse zeigten sowohl die Nichtraucher als auch die Raucher in je drei HE-Färbungen nach 3 und 6 Monaten einen regulären Drüsenaufbau (s. Abbildung 4.1). Es fanden sich läppchenartige Strukturen, welche durch bindegewebige Septen getrennt wurden. Das Bindegewebe enthielt regelhaft Blutgefäße, große Ausführungsgänge und wenige Fettvakuolen.

Der exokrine Anteil aus tubulo-aziniäre Endstücken zeigte regulär basale Zellkerne. Die Ausführungsgänge bestanden aus kubischen Zellen. Im Parenchym ließen sich endokrine Langerhanssche-Inseln finden. Die alleinige Rauchexposition der WT-Mäuse führte zu keiner Neoplasie Bildung im Pankreas.

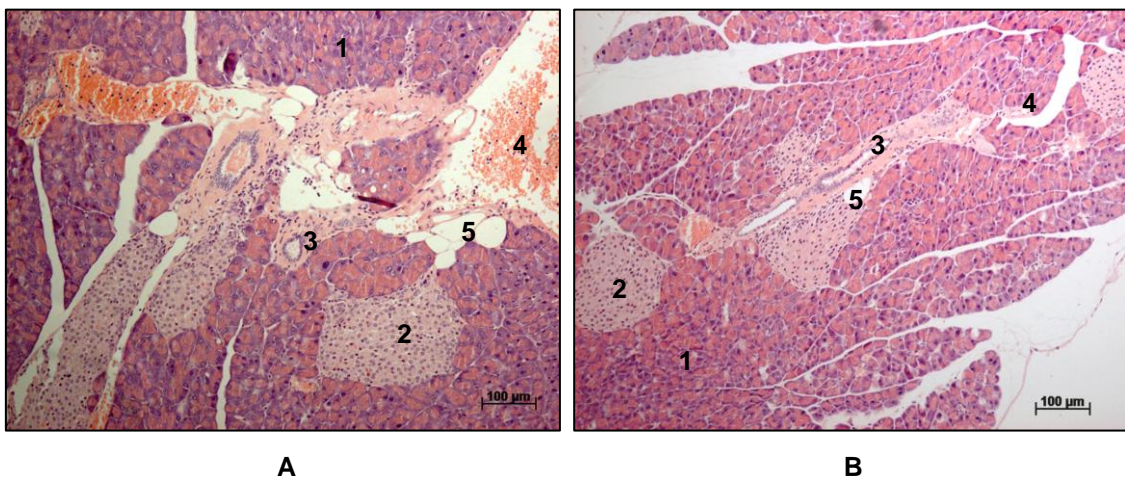


Abbildung 4.1: HE-Färbung des gesunden Pankreasgewebes der WT-Mäuse.

A) 6-Monats-WT-Nichtraucher, **B)** 6-Monats-WT-Raucher in 10-facher Vergrößerung.

1 = Azini, 2 = endokrine Insel, 3 = Dukti, 4 = Gefäß, 5 = Fettvakuole.

4.2.2 Histologie der K/C-Mäuse

Alle K-ras mutierten Mäuse zeigten wie erwartet pathologische Veränderungen einschließlich Entzündung, Fibrose, Duktectasien und Neoplasien wie PanIN-1-, -2- und ADM-Läsionen (s. Abbildung 4.2). PanIN-3-Läsionen oder Karzinome wurden in keiner Maus gefunden.

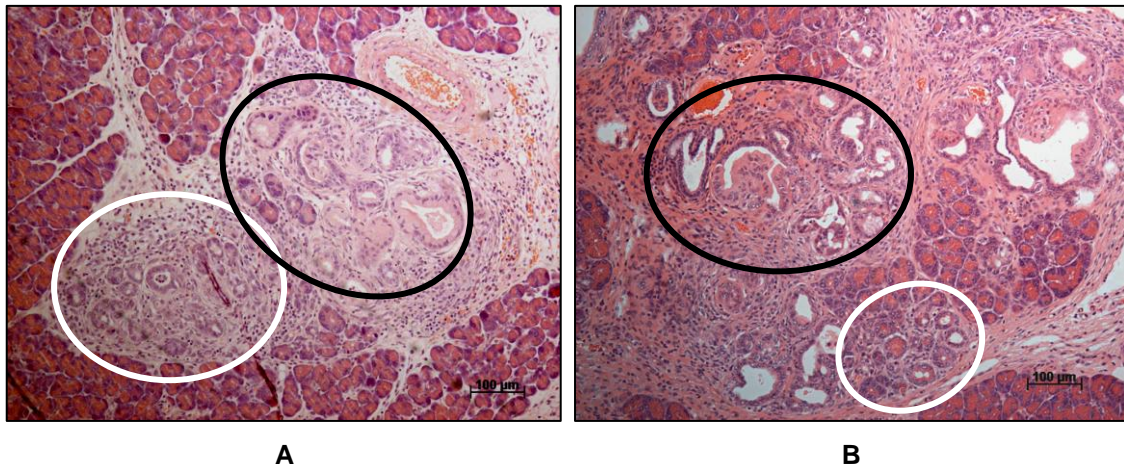


Abbildung 4.2: HE-Färbung der neoplastischen Regionen der K/C-Mäuse.

A) 3-Monats-K/C-Nichtraucher, **B)** 3-Monats-K/C-Raucher in 10-facher Vergrößerung. Die unterschiedlichen Neoplasie-Arten treten nebeneinander auf. Beispielhafte PanIN-Regionen = **schwarzer Kreis**, beispielhafte ADM-Regionen = **weißer Kreis**.

Die Auswertung des Gewebes erfolgte zusammen mit dem Pathologen Prof. Dr. Sipos aus Tübingen. Zuerst wurde verblindet der prozentuale Anteil der Läsionen am Gesamtgewebe geschätzt und mithilfe der multilinenen Regressionsanalyse statistisch untersucht. Darauf folgte eine genauere Untersuchung der einzelnen pathologischen Veränderungen PanIN-1, PanIN-2, ADM, Fibrose, Entzündung und Duktectasie. Das Ausmaß der jeweiligen pathologischen Veränderung wurde mit Werten von „0“ bis „3“ versehen (s. Kapitel 4.3.2.2-6). Die Veränderungen traten nicht (zugeordneter Wert = „0“), vereinzelt (= „0/1“), in 10 % (= „1“), in 20 – 40 % (= „2“) oder in über 50 % des Gewebes (= „3“) auf. Ob ein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen besteht wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Die Ergebnisse der statistischen Analyse finden sich, wie auch für die folgenden Untersuchungen, zusätzlich im Anhang (s. 9.4).

4.2.2.1 Anteil der pathologischen Veränderungen am Gesamtgewebe

Es wurden PanIN- und ADM-Regionen mit der sie umgebenden Fibrose betrachtet und ihr Flächenanteil am Gesamtgewebe verblindet geschätzt. Aus der Prozentzahl lässt sich rückschließen, wie viel Fläche des Pankreasschnittes noch aus gesunden Azini besteht. Sowohl die Expositions- als auch die Kontrollgruppe wiesen eine große Streuung der Werte auf, wobei dies stärker in den 6-Monats- als in den 3-Monats-Tieren zu beobachten war. In der 6-Monats-Gruppe schwankten die Werte der Nichtraucher zwischen 10 – 90 % und die der Raucher zwischen 30 – 100 %.

Abbildung 4.3 ist je eine Übersichtsaufnahme der maximal veränderten Raucher- bzw. Nichtraucher-Pankreata zu sehen. Die Rauchergruppe der 3- bzw. 6-Monats-Tiere enthielt jeweils den Maximalwert des veränderten Gewebes: In der 3-Monats-Kategorie erreichte eine Raucher-Maus einen Wert von 70 %. Unter den 6-Monats-Tieren bildete eine Raucher-Maus das Maximum mit einem Wert von 100 % verändertem Gewebe.

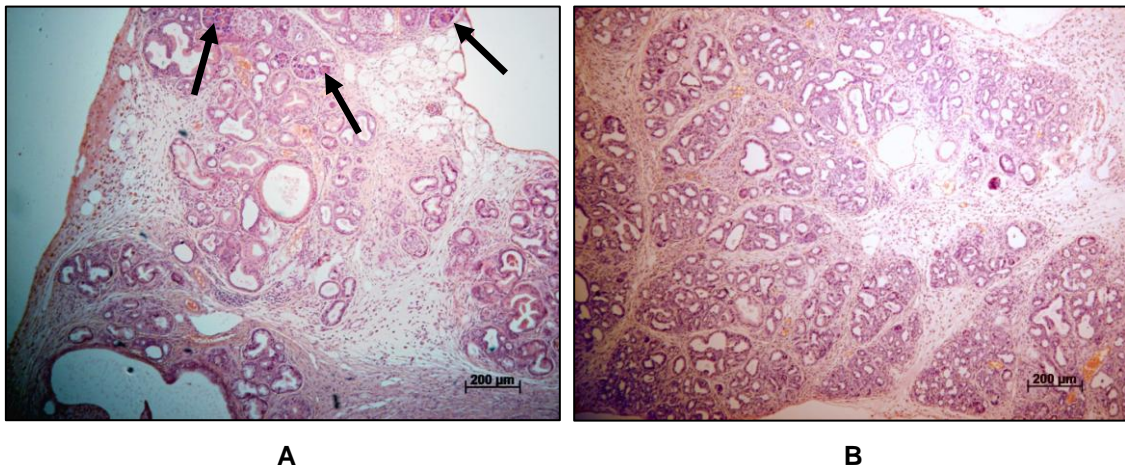


Abbildung 4.3: HE-Färbung der maximal neoplastisch veränderten K/C-Pankreata.
A) 6-Monats-K/C-Nichtraucher **B)** 6-Monats-K/C-Raucher 5-facher Vergrößerung. In A) sind noch vereinzelt intakte azinäre Strukturen zu erkennen (**schwarze Pfeile**). B) zeigt ein zu 100 % verändertes Gewebe.

Wie unter 3.7 beschrieben wurden die metrischen Werte gleichermaßen ausgewertet. Zuerst erfolgte die rein deskriptive Beschreibung der Lagemaße Mittelwert und Standardabweichung. Daraufhin wurde eine multilineare Regression als statistischer Test angelegt.

Der Mittelwert des prozentualen Anteils des veränderten Gewebes der 3-Monats-Nichtraucher betrug $34 \pm 13,4$ %. Die Vergleichsgruppe der 3-Monats-Raucher zeigte eine ähnliche Verteilung ($31,7 \pm 23,2$ %).

Die 6-Monats-Tiere wiesen erwartungsgemäß sowohl in der Gruppe der Nichtraucher als auch der Raucher statistisch signifikant mehr neoplastische Veränderungen auf als die entsprechenden jüngeren 3-Monats-Tiere. Der Mittelwert der Nichtraucher lag hier bei $58,8 \pm 25,9$ % verändertem Gewebe. Die Raucher erreichten einen Mittelwert von $77,5 \pm 27,2$ %. Eine graphische Darstellung der Verteilung ist in Form eines Boxplot-Diagramms in Abbildung 4.4 zu sehen. Tabelle 4.2 zeigt die genannten Werte der 3- und 6-Monats-Gruppe.

Die multilinere Regressionsanalyse zeigte, dass das Alter des Tieres einen signifikanten Einfluss ($p = 0,001$) auf den Anteil des neoplastisch veränderten Gewebes am Gesamtgewebe hatte. Der Regressionskoeffizient lag bei 35,15. Der Einfluss des Rauchstatus auf den Anteil der Neoplasie erreichte in der Regressionsanalyse einen p -Wert von 0,3337 und somit keine ausreichende Signifikanz.

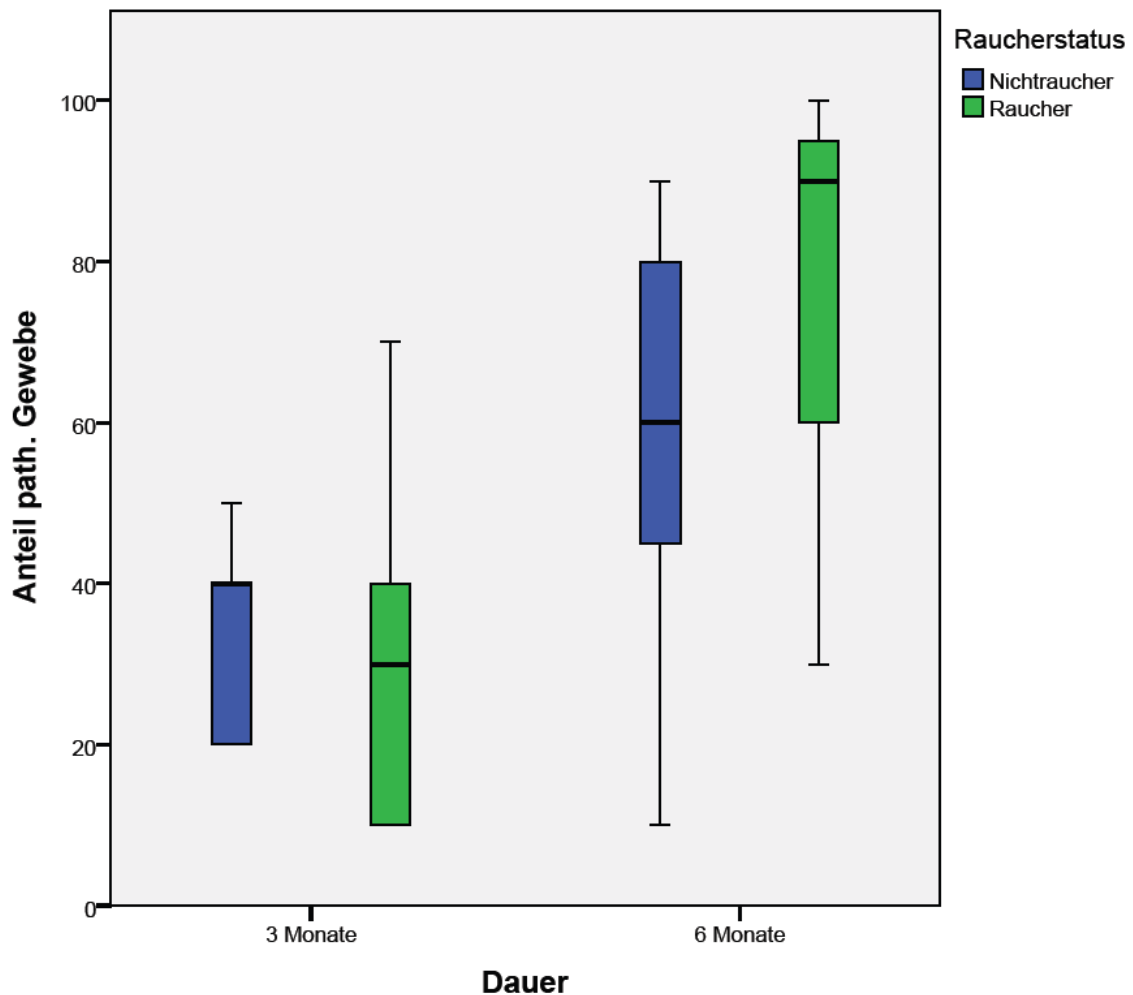


Abbildung 4.4: Boxplot – Prozentualer Anteil des pathologisch veränderten Gewebes im Pankreas der K/C-Tiere.

Beide 6-Monats-Gruppen (rechts) erreichten signifikant höhere Werte, als die jeweiligen 3-Monats-Tiere ($p = 0,001$). Die jeweilige Raucher-Gruppe (grüner Balken) zeigte höhere Maximal-Werte als die Nichtraucher-Gruppe (blauer Balken) ohne statistische Signifikanz (kein signifikanter Einfluss des Raucherstatuts auf den Anteil des pathologischen Gewebes).

Tabelle 4.2: Prozentualer Anteil der pathologischen Veränderungen am Gesamtpankreas der 3- und 6-Monats-K/C-Tiere

3-Monats-Tiere	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Nichtraucher (n = 5)	34,0	13,4	20	50
Raucher (n = 6)	31,7	23,2	10	70
6-Monats-Tiere	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Nichtraucher (n = 8)	58,8	25,9	10	90
Raucher (n = 6)	77,5	27,2	30	100
Multilineare Regressionsanalyse: Raucherstatus p = 0,3337; Alter p = 0,001				

4.3.2.2 PanIN-1

PanIN-1a-Läsionen, mit zylindrischen Zellen und basalständigem Zellkern, fanden sich in jedem Pankreas der K-ras mutierten Tiere. Papillär ins Lumen einwachsende PanIN-1b-Läsionen erschienen sporadisch mit den PanIN-1a und wurden daher unter der Kategorie PanIN-1 zusammen mit den 1a-Läsionen betrachtet. Beide Läsions-Typen sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

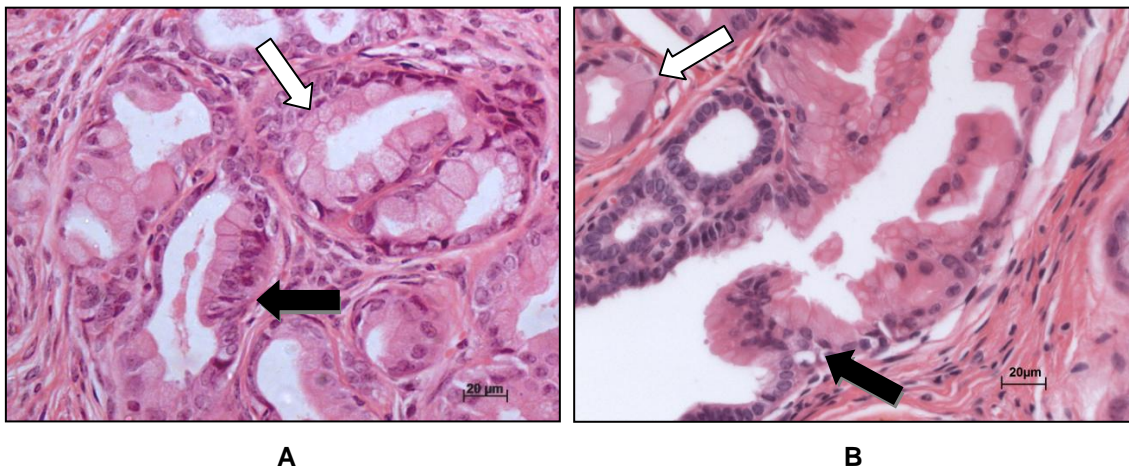


Abbildung 4.5: PanIN-1a- und 1b-Läsionen im Pankreas der K/C-Tiere.

HE-Färbung: **A)** 3-Monats-K/C-Nichtraucher, **B)** 3-Monats-K/C-Raucher in 40-facher Vergrößerung. Beispielhafte PanIN-1a- = **weißer Pfeil** und beispielhafte PanIN-1b-Läsion = **schwarzer Pfeil**.

Jeder Maus wurde ein Wert von „0“ – „3“ (s. Kapitel 4.2.2) zugeordnet, um die Stärke der PanIN-1-Belastung im Pankreas zu beschreiben. Eine Auflistung der PanIN-1-Werte für die 3- und 6-Monats-K/C-Tiere findet sich in Tabelle 4.3.

Ein 3-Monats-Raucher wies mit dem Wert „3“ die höchste PanIN-1 Belastung zu diesem Zeitpunkt auf. Diese Maus besaß unter den 3-Monats-Tieren auch insgesamt den höchsten Anteil von verändertem Gewebe. Als Lagemaß für die ordinal skalierten Messwerte wurde der Median bestimmt und als statistischer Test der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Sowohl in der 3-Monats-Raucher- als auch Nichtraucher-Gruppe lag der Median für die PanIN-1 Belastung bei „1“. Entsprechend der insgesamt höheren Neoplasie-Belastung der 6-Monats-Tiere gegenüber den 3-Monats-Tieren (s. 4.2.2.1) wurden bei den 6-Monats-Tieren stärkere PanIN-1-Ausprägungen festgestellt. Eine sehr starke PanIN-1 Ausprägung („3“) ließ sich bei drei von 6 Rauchern bzw. drei von 8 Nichtrauchern feststellen. Der Median der Raucher lag bei „2,5“, der der Nichtraucher bei „2“. Die statistische Analyse durch den Mann-Whitney-U-Test zeigte zu beiden Zeitpunkten (3 und 6 Monate) keinen signifikanten Unterschied bezüglich der PanIN-1-Belastung zwischen Rauchern und Nichtrauchern (s. Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: PanIN-1-Belastung in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren

Ausprägung	3-Monats-Tiere		6-Monats-Tiere	
	Nichtraucher n = 5	Raucher n = 6	Nichtraucher n = 8	Raucher n = 6
0/1	2 (40 %)	1 (16,7 %)	-	-
1	3 (60 %)	4 (66,7 %)	3 (37,5 %)	2 (33,4 %)
2	-	-	2 (25 %)	1 (16,7 %)
3	-	1 (16,7 %)	3 (37,5 %)	3 (50%)
Mann-Whitney-U-Test	p = 0,429		p = 0,755	

Im Rahmen der anschließenden Kollaboration mit der AG Heeschen war es möglich per Scanner-System die genaue Anzahl der PanIN-Läsionen im gesamten Gewebe zu bestimmen. Hierbei wurden die 6-Monats-K/C-Tiere ausgewertet und zwischen PanIN-1a und -1b unterschieden. Es zeigt sich in der Gruppe der Nichtraucher ein Median von 18,5 PanIN-1a-Läsionen. In der Gruppe der Raucher lag der Median bei 60,5 PanIN-1a-Läsionen (s. Tabelle 4.4). Die anschließende statistische Untersuchung mit dem Mann-Whitney-U-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Expositions-

und Kontroll-Gruppe ($p = 0,0110$). Somit zeigten die volatil exponierten K/C-Tiere eine höhere Anzahl von PanIN-1a-Läsionen.

Tabelle 4.4: Anzahl der PanIN-1a im Gesamtpankreas der 6-Monats-K/C-Tiere

6-Monats-Tiere	Median	Minimum	Maximum
Nichtraucher (n = 8)	18,5	3	44
Raucher (n = 6)	60,5	19	102
Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,0110$			

Die mediane Anzahl der PanIN-1b-Läsionen lag in der Gruppe der Nichtraucher bei 8 und in der Gruppe der Raucher bei 11 Läsionen (s. Tabelle 4.5). Eine statistische Analyse dieser Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,2744$).

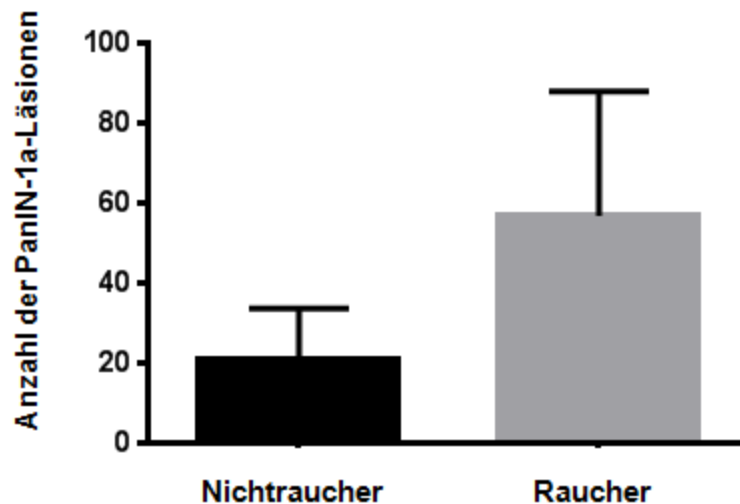


Abbildung 4.6: Boxplot – Anzahl der PanIN-1a im Gesamtgewebe der 6-Monats-K/C-Tiere.

Die Gruppe der exponierten Raucher zeigt eine signifikant höhere Anzahl an PanIN-1a-Läsionen als die Gruppe der Nichtraucher ($p = 0,0110$). Ausreißer sind nicht dargestellt. (Mit freundlicher Unterstützung der AG Heeschen).

Tabelle 4.5: Anzahl der PanIN-1b im Gesamtpankreas der 6-Monats-K/C-Tiere

6-Monats-Tiere	Median	Minimum	Maximum
Nichtraucher (n = 8)	8,0	2	20
Raucher (n = 6)	11,0	1	31
Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,2744$			

4.3.2.3 PanIN-2

PanIN-Läsionen, die einen Verlust der Polarität und pseudomehrreihig stehende Kerne zeigten, wurden als PanIN-2-Neoplasie eingestuft (beispielhafte PanIN-2-Läsionen s. Abbildung 4.7).

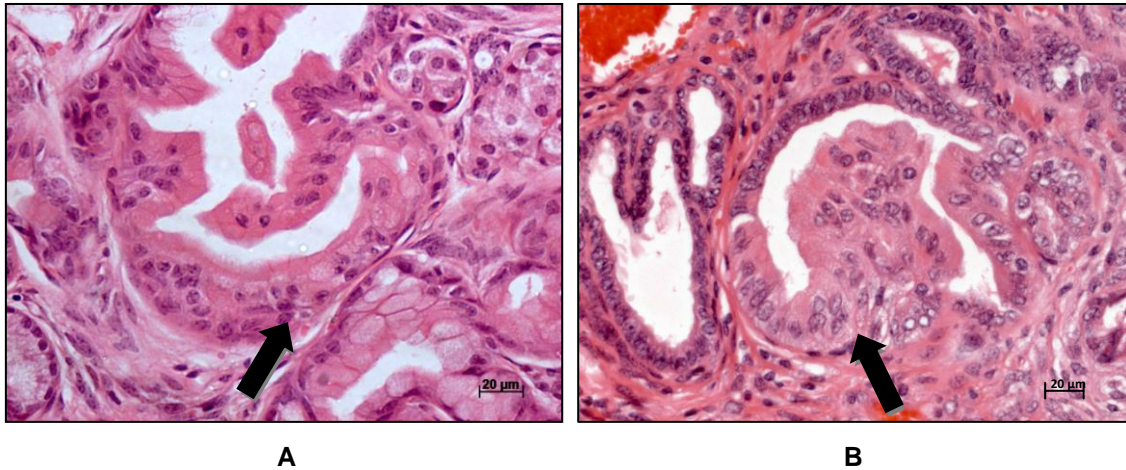


Abbildung 4.7: PanIN-2-Läsionen im Pankreas der K/C-Tiere.

HE-Färbung: **A)** 6-Monats-K/C-Nichtraucher, **B)** 3-Monats-K/C-Raucher in 40-facher Vergrößerung. Beispielhafte PanIN-2-Läsion = **schwarzer Pfeil**.

Tabelle 4.6 zeigt die gefundenen Ausprägungen. Unter den 3-Monats-Tieren zeigte nur eine Maus PanIN-2-Läsionen. Bei dieser handelte es sich um ein mit Rauch exponiertes Tier und der Wert der PanIN-2-Belastung lag bei „1“. Eine beispielhafte PanIN-2-Läsion dieses Tieres zeigt die Abbildung 4.7 B. Der Median lag in beiden Gruppen bei „0“. In der 6-Monats-Kohorte kam es bei mehr Mäusen zu PanIN-2-Läsionen. Auch die nichtexponierten Mäuse entwickelten zu diesem Zeitpunkt PanIN-2-Läsionen (s. Abbildung 4.7 A). Die stärkste Ausprägung lag bei „1“ und wurde von je drei Rauchern bzw. Nichtrauchern gezeigt. Der Median lag in der Gruppe der Nichtraucher bei „0,5“, bei den Rauchern bei „0,75“. Die statistische Analyse durch den Mann-Whitney-U-Test zeigte in der PanIN-2-Belastung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Expositionsgruppen (3-Monats-Gruppe $p = 0,662$; 6-Monats-Gruppe $p = 0,755$).

Aufgrund der sehr geringen Anzahl an PanIN-2-Läsionen wurde diese Läsionsart von unserem Kooperationspartner in Madrid nicht weiter ausgewertet.

Tabelle 4.6: PanIN-2-Belastung in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren

Ausprägung	3-Monats-Tiere		6-Monats-Tiere	
	Nichtraucher n = 5	Raucher n = 6	Nichtraucher n = 8	Raucher n = 6
0	5 (100 %)	5 (83,3 %)	3 (37,5 %)	2 (33,4 %)
0/1	-	1 (16,7 %)	2 (25 %)	1 (16,7 %)
1	-	-	3 (37,5 %)	3 (50 %)
Mann-Whitney-U-Test	p = 0,662		p = 0,755	

4.3.2.4 ADM

ADM-Läsionen waren in jeder der untersuchten K/C-Mäuse zu finden. In Abbildung 4.8 sind beispielhafte ADM-Läsionen von Rauchern und Nichtrauchern zu sehen. Diese Läsionsart geht auf azinäre Zellen zurück, welche sich metaplastisch zu gangartigen Zellen verändern.

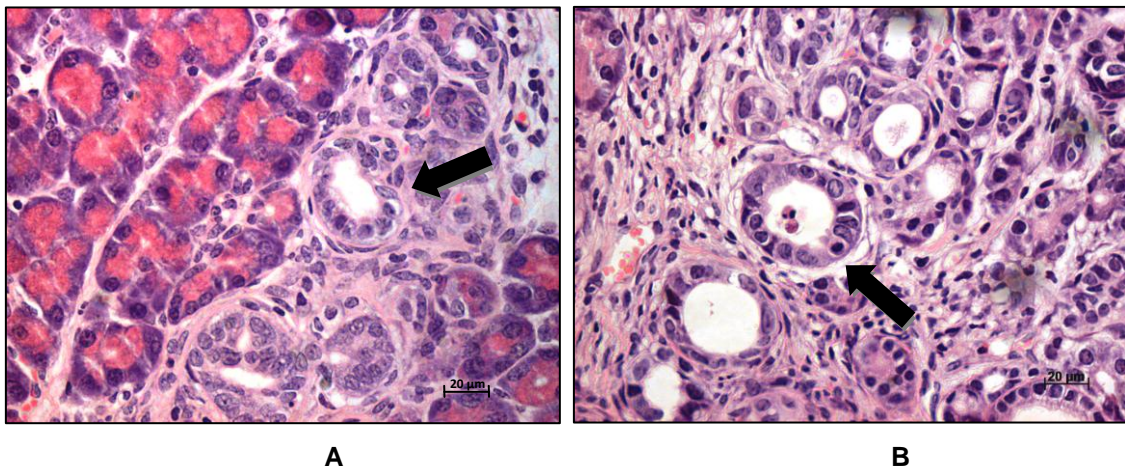


Abbildung 4.8: ADM-Läsionen im Pankreas der K/C-Tiere.

HE-Färbung: **A)** 3-Monats-K/C-Nichtraucher, **B)** 6-Monats-K/C-Raucher in 40-facher Vergrößerung. Beispielhafte ADM-Läsion = **schwarzer Pfeil**. Die gesunden Azini stellen sich in der HE-Färbung rot dar.

Die ADM Belastung in den Pankreata der K/C-Tiere ist der Tabelle 4.7 zu entnehmen. In der Gruppe der 3-Monats-Tiere wurde eine ähnliche Verteilung in Rauchern und Nichtrauchern gefunden. Der Median lag in beiden Gruppen bei dem Wert „1“ ohne statistischen Unterschied ($p = 0,662$).

Die 6-Monats-Mäuse zeigten ebenfalls eine ähnliche Verteilung der Werte bei insgesamt höherer Ausprägung der ADM-Belastung. Der Großteil der Mäuse lag in beiden Gruppen bei „3“. So liegt auch der Median in beiden Gruppen bei dem Wert „3“ und der Mann-Whitney-U-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,852$). Eine der mit Rauch exponierten Mäuse fiel durch ihre besonders starke ADM-Belastung auf. Das Pankreas dieser Maus wurde bereits unter dem Punkt 4.2.2.1 als 100% neoplastisch verändert beschrieben. Bei erneuter Betrachtung war zu erkennen, dass es sich bei dem veränderten Gewebe fast ausschließlich um ADM-Läsionen handelte. PanIN-Läsionen tauchten nur vereinzelt auf. Die Abbildung 4.3 B unter dem Punkt 4.2.2.1 zeigt einen Bildausschnitt dieser Maus.

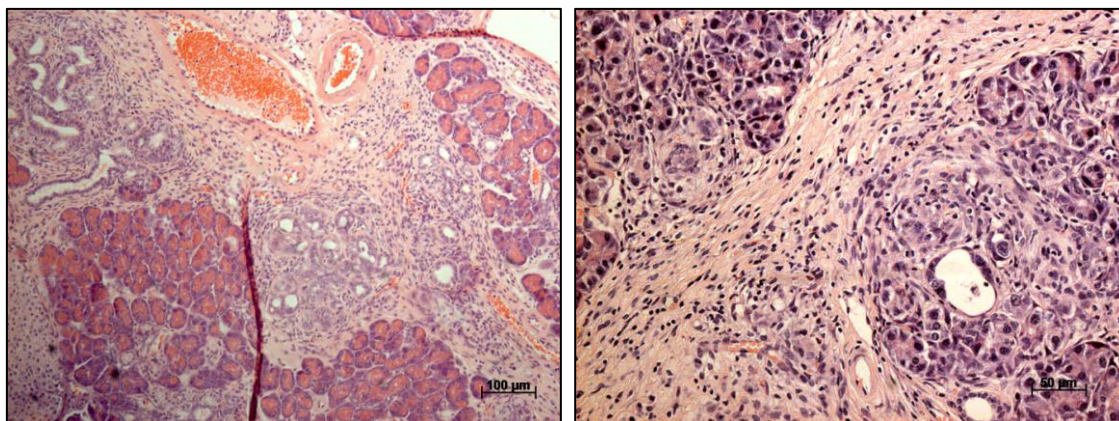
Tabelle 4.7: ADM-Belastung in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren

Ausprägung	3-Monats-Tiere		6-Monats-Tiere	
	Nichtraucher n = 5	Raucher n = 6	Nichtraucher n = 8	Raucher n = 6
0/1	-	1 (16,7 %)	-	-
1	3 (60 %)	3 (50 %)	1 (12,5 %)	1 (16,7 %)
2	2 (40 %)	2 (33,3%)	1 (12,5 %)	1 (16,7 %)
3	-	-	6 (75 %)	4 (66,7 %)
Mann-Whitney-U-Test	p = 0,662		p = 0,852	

4.3.2.5 Fibrose und Entzündung

In den Pankreata der K/C-Tiere bildeten sich neben den oben beschriebenen neoplastischen Veränderungen Stromareaktionen in Form von Fibrose und Entzündung aus. Abbildung 4.9 zeigt zwei Beispielaufnahmen einer starken Stromareaktion.

Mit zunehmendem Alter konnte eine zunehmende Fibrose festgestellt werden. Tabelle 4.8 zeigt die Auflistung der Fibrose-Belastung aller K/C-Tiere. So zeigten die 3-Monats-Tiere in 3 von 6 Rauchern und 2 von 5 Nichtrauchern einen leichten Anteil von fibrotischem Gewebe („1“). Ein Nichtraucher zeigte bereits eine stärkere Fibrose mit dem Wert „2“. Der Median lag in dieser Gruppe bei „1“, in der Gruppe der Raucher bei „0,5“ ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,545$). Unter den 6-Monats-Tieren zeigten die meisten Tiere eine Fibrose des Grades „2“. Der Median lag in beiden Gruppen bei „2“ ohne feststellbaren Unterschied ($p = 0,950$).



A

B

Abbildung 4.9: Stromareaktion im Pankreas der K/C-Tiere.

HE-Färbung: **A)** 6-Monats-K/C-Nichtraucher in 10-facher Vergrößerung, **B)** 6-Monats-K/C-Raucher in 40-facher Vergrößerung. Die rosa gefärbten Bindegewebsstränge sind vermehrt (Fibrose) und mit Immunzellen durchsetzt (Entzündung).

Tabelle 4.8: Ausprägung der Fibrose in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren

Ausprägung	3-Monats-Tiere		6-Monats-Tiere	
	Nichtraucher n = 5	Raucher n = 6	Nichtraucher n = 8	Raucher n = 6
0	2 (40 %)	3 (50 %)	-	-
1	2 (40%)	3 (50 %)	1 (12,5 %)	1 (16,7 %)
2	1 (20 %)	-	7 (87,5 %)	5 (83,3 %)
Mann-Whitney-U-Test	p = 0,662		p = 0,950	

Auch die Infiltration des Gewebes mit Immunzellen (=Grad der Entzündung) war in beiden Gruppen ähnlich verteilt. In den 3-Monats-Tieren waren sowohl keine („0“), leichte („1“) und starke („2“) Entzündungen zu finden (s. Tabelle 4.7). Der Median lag in Expositions- und Kontroll-Gruppe bei „1“ und die Nullhypothese wurde beibehalten ($p = 0,247$).

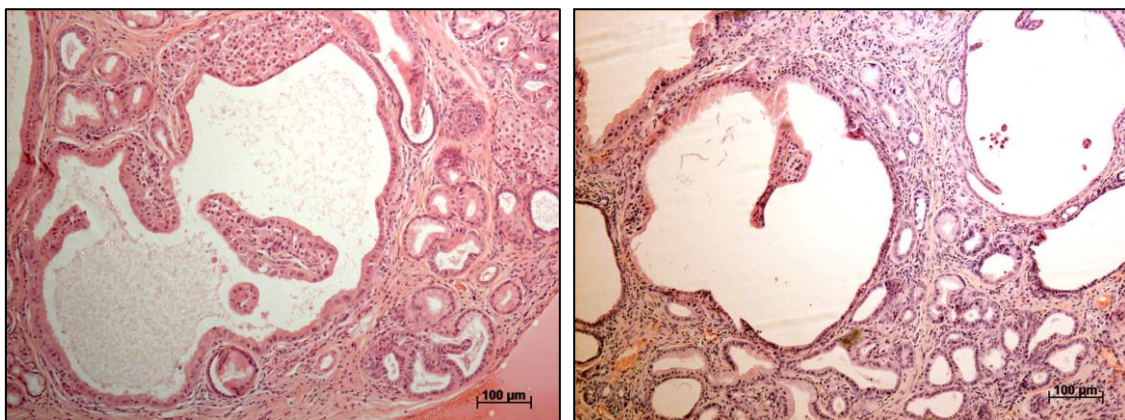
In den 6-Monats-Tieren fand sich, wie in der Fibrose Auswertung, bei den meisten Tieren eine Entzündung des Grades „2“. Der Median lag hier bei Rauchern und Nichtrauchern bei „2“. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Expositions-Gruppen bezüglich der Entzündung ($p = 0,950$).

Tabelle 4.9: Ausprägung der Entzündung in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren

Ausprägung	3-Monats-Tiere		6-Monats-Tiere	
	Nichtraucher n = 5	Raucher n = 6	Nichtraucher n = 8	Raucher n = 6
0	-	2 (33,3 %)	-	-
1	3 (60%)	3 (50 %)	1 (12,5 %)	1 (16,7 %)
2	2 (40 %)	1 (16,7 %)	7 (87,5 %)	5 (83,3 %)
Mann-Whitney-U-Test	p = 0,247		p = 0,950	

4.3.2.6 Duktectasie

Duktectasie bezeichnet die starke Erweiterung des Pankreasgangsystems durch eine Stauung des Sekretes (s. Abbildung 4.10).



A

B

Abbildung 4.10: Duktectasie im Pankreas der K/C-Tiere.

HE-Färbung: **A)** 6-Monats-K/C-Nichtraucher, **B)** 6-Monats-K/C-Raucher in 10-facher Vergrößerung.

In Tabelle 4.10 findet sich eine Auflistung der gefundenen Ausprägungen der Duktectasie. In den 3-Monats-Tieren lag der Median in der Gruppe der Nichtraucher bei „0“, in der Gruppe der Raucher bei „0,25“. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,537$). In der Gruppe der 6-Monats-Tiere lag der Median der Nichtraucher bei „1“ und der Median der Raucher bei „1,5“ ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,573$).

Tabelle 4.10: Ausprägung der Duktectasie in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren

Ausprägung	3-Monats-Tiere		6-Monats-Tiere	
	Nichtraucher n = 5	Raucher n = 6	Nichtraucher n = 8	Raucher n = 6
0	4 (80 %)	3 (50 %)	1 (12,5 %)	1 (16,7 %)
0/1	-	1 (16,7 %)	5 (62,5 %)	2 (33,3 %)
1	1 (20 %)	2 (33,3 %)	2 (25 %)	3 (50 %)
Mann-Whitney-U-Test	p = 0,537		p = 0,573	

4.3 Analyse des DNA-Schadens in vitro

Parallel zu den in vivo Versuchen sollte der Effekt der Zigarettenrauch-Exposition auf Pankreaszellen in vitro untersucht werden. Dazu wurde ein Rauchmedium hergestellt, das die Rauchinhaltsstoffe einer Zigarette enthielt. Immortalisierte duktale Pankreasepithelzellen (HPDE-Zellen) wurden mit verschiedenen Konzentrationen dieses Rauchmediums für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und der Rauchexpositions-Effekt auf Proteine der DNA-Reparatur-Kaskade mithilfe einer SDS-PAGE untersucht.

Hierbei wurde die Wirkung des Rauchmediums auf die DNA mithilfe zweier Proteine untersucht: γ -H2AX (15 - 17 kDa) und p-ATR (250 kDa). Abbildung 4.11 zeigt je einen repräsentativen Immunoblot von drei unabhängigen Versuchsreihen mit Nachweis von γ -H2AX und p-ATR. Zusätzlich ist die β -Aktin-Bande (42 kDa) des entsprechenden Western-Blot mit aufgeführt. Sie zeigt eine gleichmäßige Beladung an.

Nach 48 h wurde in den Proben der exponierten Zellen sowohl für p-ATR als auch γ -H2AX eine stärkere Bande gefunden als in der Kontrolle. Als Kontrolle dienten ebenfalls HPDE-Zellen die jedoch nur mit reinem Nährmedium behandelt wurden. In diesen Kontrollzellen liesen sich p-ATR und γ -H2AX schwach nachweisen.

Je geringer die Verdünnung des Rauchmediums in den exponierten Zellen war, desto ausgeprägter zeigten sich die Banden. Somit waren mit steigendem Anteil des Rauchmediums (in der Abbildung von links nach rechts) die Proteine der DNA-Reparatur-Kaskade in den Zellen vermehrt nachweisbar.

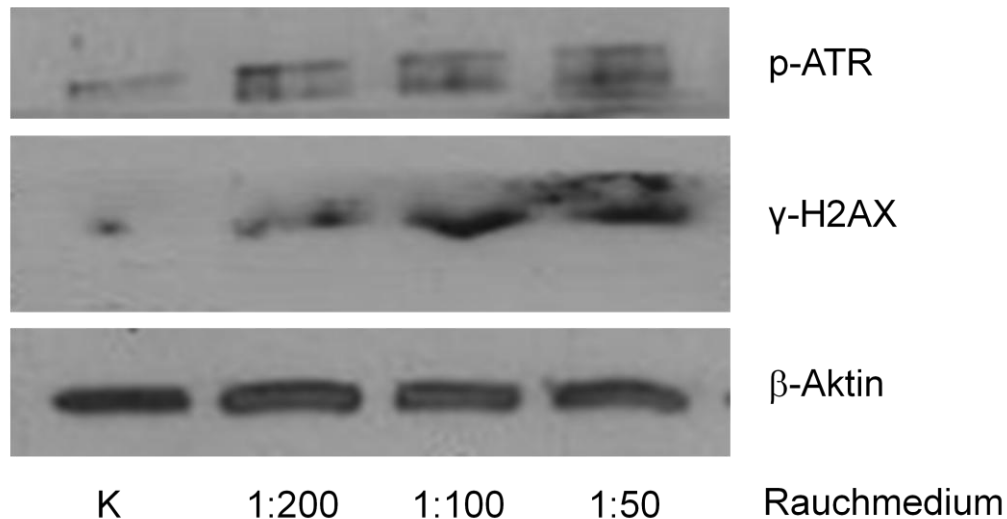


Abbildung 4.11: Beispielhafter Immunoblot mit Nachweis der DNA-Reparatur-Kaskade in HPDE-Zellen nach 48 h Exposition.

K = Kontrolle. γ -H2AX und p-ATR dienen als Marker der DNA-Reparatur-Kaskade. β -Aktin wurde gleichmäßig beladen.

4.4 Analyse des DNA-Schadens in vivo

Um den DNA-Schaden im Gewebe zu quantifizieren, wurden die Schnitte immunhistochemisch auf p-ATM gefärbt. Wie unter Kapitel 3.6.2 erläutert liegt das aktivierte p-ATM in Zellen vor, die auf einen DNA-Strangbruch reagieren. Zellen, die p-ATM enthielten stellten sich in der immunhistologischen Färbung dunkelbraun dar.

4.4.1 DNA-Schaden der WT-Mäuse

In der p-ATM-Färbung der einfachtransgenen WT-Mäuse kam es sowohl in den Expositions- als auch den Kontrolltieren zu keinem wesentlichen Signal. Es zeigte sich eine leichte zytoplasmatische Hintergrundfärbung der Azinus- und Inselzellen.

4.4.2 DNA-Schaden der K/C-Mäuse

Die K-ras mutierten Mäuse zeigten spezifisch angefärbte Zellen in den Neoplasien. Dabei wurde p-ATM vorwiegend im Zytoplasma und geringfügig im Zellkern detektiert. In wenigen Fällen erschien die gesamte Zelle positiv. Dabei lässt sich schwer beurteilen, ob in diesen Fällen der Kern stark positiv ist oder ob dieser nicht angeschnitten wurde.

Wie in Abbildung 4.12 zu sehen ist, waren nur einzelne Zellen der Läsionen positiv. Neben diesen spezifisch angefärbten Zellen kam es, wie in der Gruppe der WT-Tiere, zu einer zytoplasmatischen Hintergrundfärbung der Azinus- und Inselzellen.

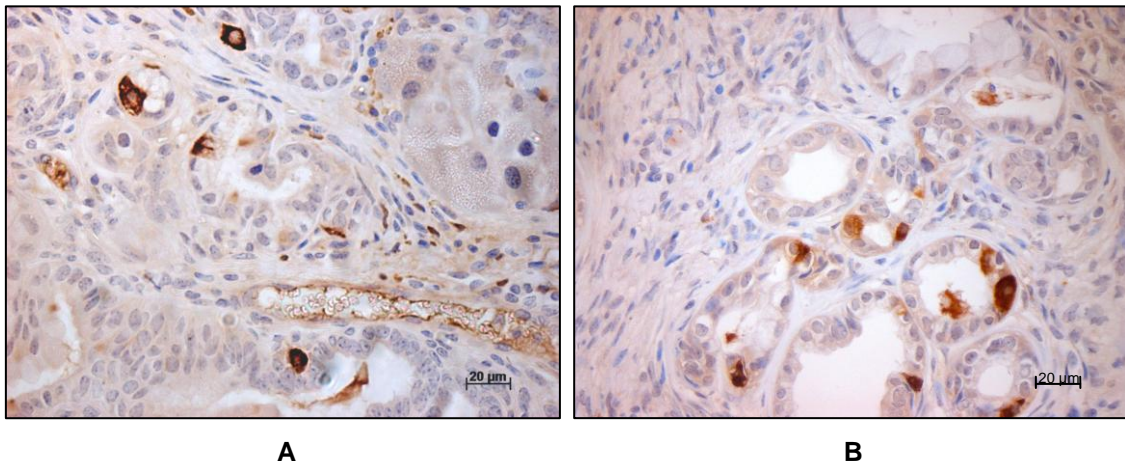


Abbildung 4.12: p-ATM-Färbung der K/C-Tiere.

A) 6-Monats-K/C-Nichtraucher **B)** 6-Monats-K/C-Raucher in 40-facher Vergrößerung. Die p-ATM positiven Zellen stellen sich dunkelbraun dar.

Für die Auswertung wurden 10 neoplastische Areale des Pankreas in 40-facher Vergrößerung ohne Kenntnis über den Expositionsstatus der jeweiligen Maus fotografiert. Jeweils alle Zellen der verschiedenen neoplastischen Veränderungen und die p-ATM positiven Zellen wurden mit ImageJ gezählt. Eine beispielhafte Auswertung mit diesem Program ist im Anhang (s. 9.3) zu finden. Dabei wurde zwischen ADM- und PanIN-Strukturen unterschieden. So erhielt man den prozentualen Anteil der p-ATM positiven Zellen jeder Läsionsart bzw. beider Neoplasien zusammen. Die Anzahl der ausgezählten Zellen variierte von 600 – 2000 Zellen pro Maus.

Betrachtet man die p-ATM positiven Zellen aller Läsionen aufgeteilt nach Rauchern und Nichtrauchern, so zeigen sich annähernd identische Werte. In der Auswertung der 3-Monats-Mäuse ergab sich für die Nichtraucher ein Anteil von $2,2 \pm 1,8 \%$ und für die Raucher $2,1 \pm 0,7 \%$ p-ATM positiver Zellen in neoplastischen Läsionen (s. Tabelle 4.11). Aufgeteilt nach PanIN- und ADM-Läsionen zeigten die beiden Gruppen (Raucher und Nichtraucher) ebenfalls keinen statistischen Unterschied. Die PanIN-Werte der Nichtraucher lagen bei $2,1 \pm 1,4 \%$ und die der Raucher bei $2,0 \pm 0,7 \%$. Der Mittelwert der Nichtraucher für den Anteil p-ATM positiver Zellen in ADM-Läsionen lag bei $1,8 \pm 2,4 \%$. Die ADM-Läsionen der Raucher zeigten $2,6 \pm 1,3\%$ positive Zellen.

Die älteren 6-Monats-Tiere erreichten signifikant höhere Werte bezüglich der p-ATM positiven Zellen als die 3-Monats-Mäuse (s. unten). Expositions- und Kontrollgruppe erreichten ähnliche Verteilungen. Eine Auflistung der Lageparameter ist ebenfalls in Tabelle 4.9 dargestellt.

Der mittlere Anteil p-ATM positiver Zellen aller Neoplasien lag in der Gruppe der Nichtraucher bei $3,5 \pm 1,8$ %. Die Gruppe der Raucher zeigte mit $3,2 \pm 1,5$ % einen ähnlichen Mittelwert. In den PanIN-Läsionen erreichten die Nichtraucher $2,9 \pm 1,1$ % und die Raucher $3,0 \pm 13,1$ % positive Zellen. Die ADM-Läsionen der Nichtraucher zeigten im Mittel $4,0 \pm 2,2$ %, die der Raucher $3,8 \pm 1,9$ % positive Zellen.

Zur Signifikanzprüfung wurde eine multilineare Regression durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Anteil p-ATM-positiver Zellen in den Neoplasien insgesamt nicht durch den Raucherstatus beeinflusst wurde ($p = 0,755$). Ein signifikanter Einfluss konnte für die Dauer (Alter) mit $p = 0,048$ und einem Regressionskoeffizienten = 1,273 nachgewiesen werden.

Betrachtete man die Läsionen einzeln war der Einfluss der Exposition in den ADM- ($p = 0,765$) und PanIN-Läsionen ($p = 0,978$) ebenfalls nicht signifikant. Ein signifikanter Einfluss des Alters zeigte sich in den ADM-Läsionen ($p = 0,045$, Regressionskoeffizienten = 1,710) nicht aber in den PanIN-Läsionen ($p = 0,061$).

Tabelle 4.11: Anteil p-ATM-positiven Zellen der PanINs, ADMs und beiden Neoplasiearten (insgesamt) in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren

3-Monats-Tiere		Anteil p-ATM-positiver Zeller in %		
		PanIN	ADM	insgesamt
Nichtraucher n = 5	Mittelwert	2,1	1,8	2,2
	Standardabweichung	1,4	2,4	1,8
Raucher n = 6	Mittelwert	2,0	2,6	2,1
	Standardabweichung	0,7	1,3	0,7
6-Monats-Tiere		Anteil p-ATM-positiver Zeller in %		
		PanIN	ADM	insgesamt
Nichtraucher n = 7	Mittelwert	2,9	4,0	3,5
	Standardabweichung	1,1	2,2	1,8
Raucher n = 6	Mittelwert	3,0	3,8	3,3
	Standardabweichung	1,3	1,9	1,5
Multilineare Regressionsanalyse	Raucherstatus	$p = 0,978$	$p = 0,765$	$p = 0,755$
	Alter	$p = 0,061$	$p = 0,045$	$p = 0,048$

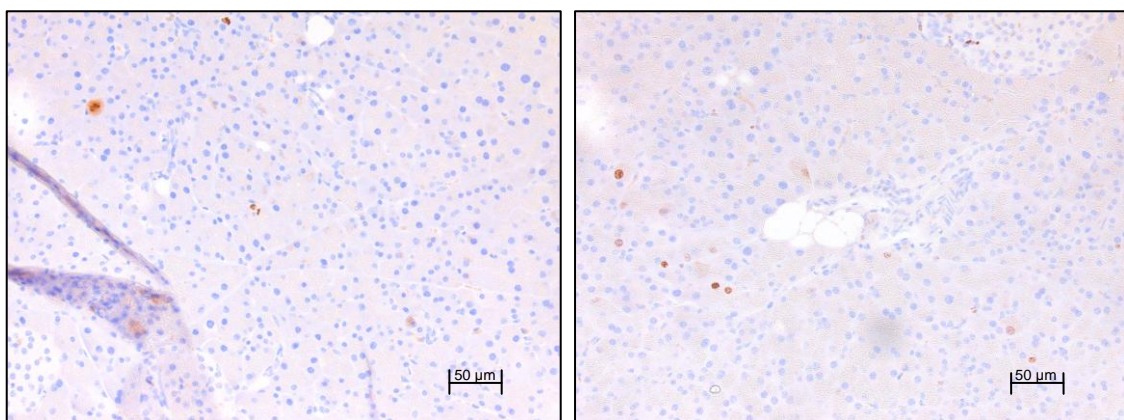
4.5 Analyse der Zellproliferation in vivo

Ki-67 diente im Rahmen dieser Arbeit als Marker zur Bestimmung der Wachstumsfraktion. Es ist während der Interphase im Zellkern zu finden und ein gängiger Marker um die Wachstumsfraktion eines Gewebes zu bestimmen (s. 3.6.3). Daher wurden alle Zellen mit positiv gefärbtem Zellkern (braun) als proliferativ aktiv gewertet.

4.5.1 Zellproliferation der WT-Mäuse

Wie bereits beschreiben, wiesen die Pankreata der einfachtransgenen WT-Mäuse keine pathologischen Veränderungen auf. Es wurden 5 beliebige Bereiche eines Pankreas in 20-facher Vergrößerung fotografiert und alle positiven Zellen mit dem Programm ImageJ ausgezählt. Anschließend wurde der Mittelwert an Zellen pro Bildausschnitt gebildet.

Sowohl die Raucher als auch die Nichtraucher zeigten einzelne proliferierende azinäre, duktale, Insel- und Stromazellen wie in der Abbildung 4.13 beispielhaft zu sehen ist.



A

B

Abbildung 4.13: Ki-67-Färbung der WT-Tiere.

A) 3-Monats-WT-Nichtraucher **B)** 3-Monats-WT-Raucher in 20-facher Vergrößerung.

Die Ki-67 positiven Zellen stellen sich braun dar.

Die Spannweite der Werte stellte sich mit 0,8 bis 18,6 gemittelte Zellen pro Bildausschnitt vergleichsweise groß dar. Der Mittelwert der Raucher lag zu beiden Untersuchungs-Zeitpunkten über dem der Nichtraucher, allerdings ohne einen statistisch signifikanten Unterschied der Gruppen.

In der 3-Monats-Kohorte erreichten die Nichtraucher einen Mittelwert von $6,4 \pm 5,5$ positiver Zellen pro Bildausschnitt. Die exponierten Tiere wiesen einen Wert von $10,8 \pm 8,0$ positiver Zellen auf. Die 6-Monats-Nichtraucher zeigten gemittelt $3,6 \pm 2,8$ proliferierende Zellen und die entsprechenden Raucher $8,7 \pm 8,6$ Zellen pro Bildausschnitt. Eine Übersicht dieser Werte ist in der Tabelle 4.12 zu sehen.

Zur Überprüfung der Nullhypothese wurde erneut die multilinerare Regression herangezogen. Ein Einfluss des Alters ($p = 0,43$) und des Raucherstatus ($p = 0,156$) auf die Proliferationsfraktion erreichte keine ausreichende Signifikanz. Somit wurde die Nullhypothese beibehalten.

Tabelle 4.12: Ki-67-positive Zellen pro Bild der 3- und 6-Monats-WT-Tiere

3-Monats-Tiere	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Nichtraucher (n = 5)	6,4	5,5	1,2	14,6
Raucher (n = 4)	10,8	8,0	0,8	17,8
6-Monats-Tiere	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Nichtraucher (n = 4)	3,6	2,8	1,0	6,0
Raucher (n = 3)	8,7	8,6	3,6	18,6
Multilineare Regressionsanalyse: Raucherstatus $p = 0,156$; Alter $p = 0,43$				

4.5.2 Zellproliferation der K/C-Mäuse

Wie unter 4.2.2 beschrieben, präsentierten sich die K/C-Tiere mit pathologischen Neoplasien vom Typ PanIN und ADM.

Um die Proliferation der verschiedenen Läsionen zu bestimmen, wurden zehn neoplastisch aktive Areale verblindet fotografiert und mithilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Dabei wurde, wie in der p-ATM Auswertung, zwischen ADM- und PanIN-Strukturen unterschieden. Auch in dieser Auswertung wurden zwischen 600 und 2000 Zellen pro Maus ausgezählt.

Es fanden sich PanIN-Läsionen, die proliferativ inaktiv waren und solche, die einige positive Zellen enthielten. Unter den ADM-Läsionen waren ebenfalls ruhende Läsionen zu finden, aber auch sehr stark proliferierende mit bis zu 100 % proliferierenden Zellen. Abbildung 4.14 zeigt sowohl proliferierende PanIN- als auch ADM-Läsionen.

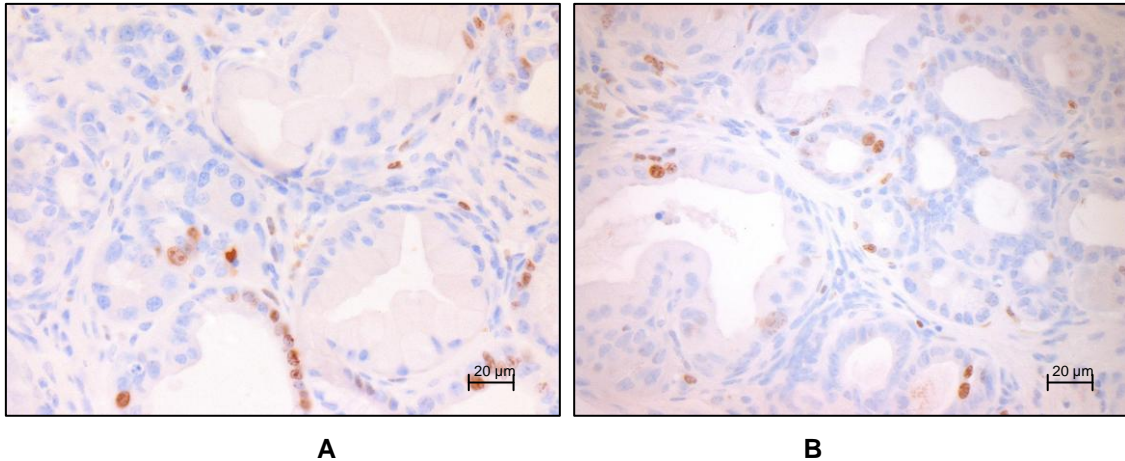


Abbildung 4.14: Ki-67-Färbung der K/C-Tiere.

A) 6-Monats-K/C-Nichtraucher **B)** 6-Monats-K/C-Raucher in 40-facher Vergrößerung. Die Ki-67 positiven Zellen stellen sich braun dar.

Aus den ausgezählten Zellen von PanIN- und ADM-Läsionen ließen sich die Proliferationsraten der einzelnen Läsionen und der Neoplasien insgesamt berechnen. Tabelle 4.13 zeigt die resultierenden Werte der K/C-Tiere. Dabei war festzustellen, dass der Mittelwert der 3-Monats-Raucher mit $11,1 \pm 8,8 \%$ ohne statistische Signifikanz (s. unten) unter der neoplastischen Proliferationsrate der Nichtraucher mit $15,9 \pm 8,4 \%$ lag. Einzeln betrachtet zeigten die ADM-Läsionen in den Nichtrauchern in eine Proliferationsrate von $21,1 \pm 12,7 \%$ und die Raucher von $14,6 \pm 13,1 \%$. In den PanIN-Läsion lag die Rate der Nichtraucher bei $11,9 \pm 4,9 \%$, die der Raucher bei $9,6 \pm 6,2 \%$.

Betrachtet man in den 6-Monats-Tieren die Proliferationsrate der neoplastischen Läsionen insgesamt, befand sich auch hier der Mittelwert der Nichtraucher ($14,7 \pm 5,2 \%$) ohne statistische Signifikanz (s. unten) über dem Mittelwert der Raucher ($11,0 \pm 6,2 \%$). Die beiden Werte lagen außerdem in einem ähnlichen Bereich wie die Proliferation der 3-Monats-Tiere (s. oben). In den PanIN-Proliferationsraten erreichten die Nichtraucher einen Mittelwert von $15,5 \pm 4,9 \%$, die Raucher einen Wert von $11,8 \pm 7,9 \%$. Die ADM-Läsionen zeigten in der Raucher-Kohorte einen Mittelwert von $13,5 \pm 9,2 \%$ und die Nichtraucher-Kohorte $12,0 \pm 8,1 \%$.

Es galt zu überprüfen, ob der Raucherstatus einen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate hat. Es wurden dazu drei Regressionsanalysen durchgeführt, die erneut auch den Einfluss des Alters der Tiere mit berücksichtigten.

Die multilineare Regression ergab, dass weder das Alter ($p = 0,756$), noch der Raucherstatus ($p = 0,185$) einen signifikanten Einfluss auf die der neoplastischen Proliferation insgesamt hatte.

Ebenso erzielte die genauere Analyse des Einflusses auf die PanIN-Läsionen keine Signifikanz. Die Wirkung des Alters auf die Proliferationsrate zeigte einen p-Wert von 0,254 und die des Raucherstatus einen p-Wert von 0,228. Auch die Wachstumsfraktion der ADM-Läsionen wurde durch das Alter oder den Expositionsstatus nicht signifikant beeinflusst (Alter $p = 0,262$; Raucherstatus $p = 0,619$).

Tabelle 4.13: Anteil der Ki-67-positiven Zellen der PanINs, ADMs und beiden Neoplasiearten (insgesamt) in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren

3-Monats-Tiere		Anteil Ki-67-positiver Zellen in %		
		PanIN	ADM	insgesamt
Nichtraucher n = 5	Mittelwert	11,9	21,1	15,9
	Standardabweichung	4,4	12,7	8,4
Raucher n = 6	Mittelwert	9,6	14,6	11,1
	Standardabweichung	6,2	13,1	8,8
6-Monats-Tiere		Anteil Ki-67-positiver Zellen in %		
		PanIN	ADM	insgesamt
Nichtraucher n = 7	Mittelwert	15,4	12,0	14,7
	Standardabweichung	4,9	8,1	5,2
Raucher n = 6	Mittelwert	11,8	13,5	11,0
	Standardabweichung	7,8	9,2	6,2
Multilineare Regressionsanalyse	Raucherstatus	$p = 0,228$	$p = 0,619$	$p = 0,185$
	Alter	$p = 0,254$	$p = 0,262$	$p = 0,756$

4.6 Analyse der Angiogenese in vivo

Der Einfluss der Rauchexposition auf die Angiogenese im Gewebe wurde durch die immunhistologische Färbung von CD31 bestimmt. Dieses Antigen ist auf der Oberfläche von embryonalen und adulten Endothelzellen zu finden (s. 3.6.4). Durch die Reaktion mit DAB stellten sich die Oberflächen der Gefäße als feine braune Strukturen dar, die einen Hohlraum umgaben.

4.6.1 Angiogenese der WT-Mäuse

Die einfachtransgenen WT-Mäuse zeigten ein, wie in Abbildung 4.15 dargestelltes, homogenes Verteilungsmuster der Mikrogefäße. Um die Angiogenese zu quantifizieren, wurden 5 beliebige Bilder je Maus in 20-facher Vergrößerung verblindet aufgenommen. Anschließend erfolgte die Auswertung am Computer. Alle gefäßartigen Strukturen ohne muskuläre Wandanteile wurden gezählt.

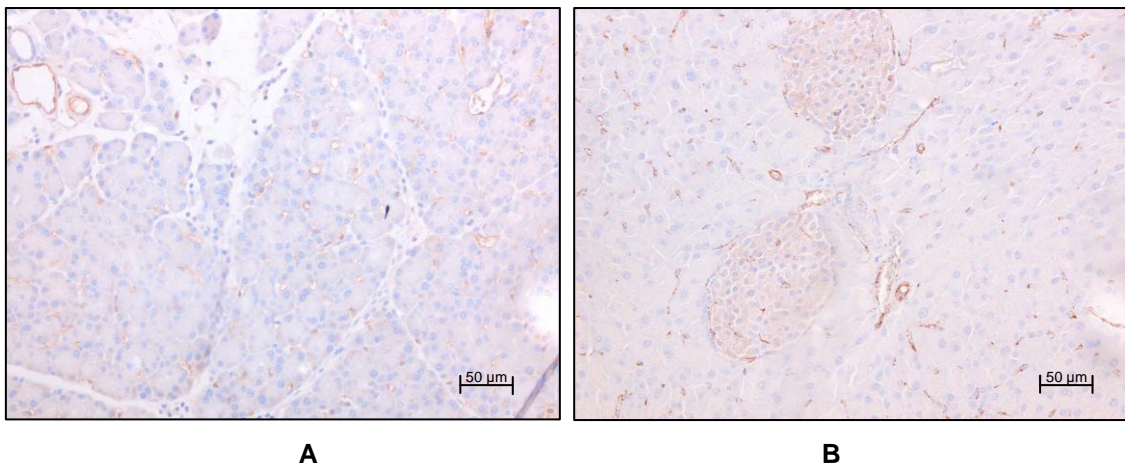


Abbildung 4.15: CD31-Färbung der WT-Tiere.

A) 6-Monats-WT-Nichtraucher **B)** 6-Monats-WT-Raucher in 20-facher Vergrößerung. Die CD31 positiven Zellen stellen sich braun dar.

Die Raucher zeigten in den WT-Tieren eine größere Spannweite der Messwerte. So zeigten die Raucher in den 3-Monats-Tieren Werte von 15 bis 66,6 Gefäßen (26,6 - 46,2 bei den Nichtrauchern) und in den 6-Monats-Tieren 22,4 - 50,6 Gefäßen (22,4 - 43,4 bei den Nichtrauchern) pro Feld.

Zu beiden Untersuchungs-Zeitpunkten zeigten die Raucher einen statistisch nicht signifikant höheren Mittelwert als die Nichtraucher (s. Tabelle 4.14). In der 3-Monats-Gruppe errechnete sich ein Mittelwert von $39,3 \pm 8,2$ für die Nichtraucher und

44,9 ± 21,7 Mikrogefäßen pro Bild für die Raucher. Der Mittelwert an Mikrogefäßen pro Feld lag in der Kohorte der 6-Monats-Nichtraucher bei 33,0 ± 10,50 und bei den Rauchern bei 37,1 ± 11,2 Gefäßen.

Um zu überprüfen, ob zwischen den Expositionsgruppen ein Unterschied besteht wurde die multivariate Regression durchgeführt. Diese Analyse ergab keinen signifikanten Einfluss der Faktoren Alter ($p = 0,463$) und Raucherstatus ($p = 0,316$) auf die Anzahl der Mikrogefäße.

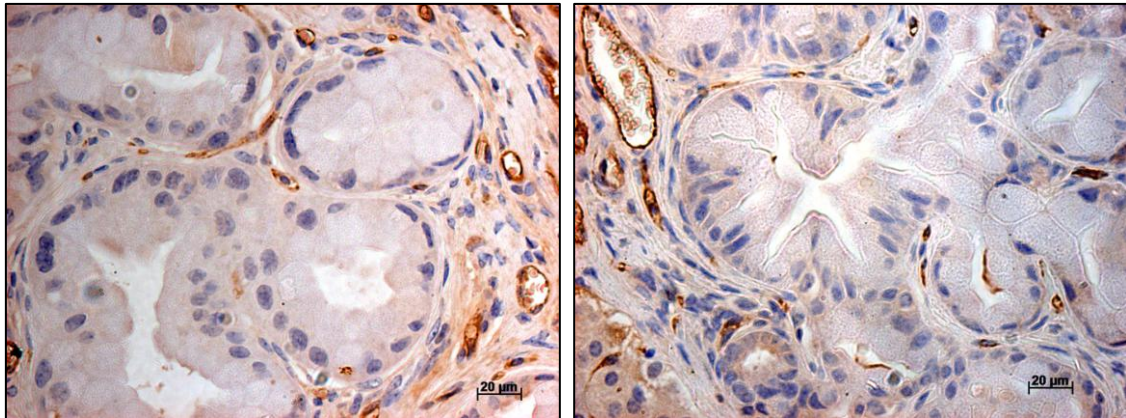
Tabelle 4.14: Anzahl der Mikrogefäße pro Bild der 3- und 6-Monats-WT-Tiere

3-Monats-Tiere		Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Nichtraucher (n = 6)		39,3	8,2	26,6	46,2
Raucher (n = 5)		44,9	21,7	15,0	66,6
6-Monats-Tiere		Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Nichtraucher (n = 4)		33,0	10,5	22,4	43,4
Raucher (n = 3)		37,1	11,2	22,4	50,6
Multivariate Regressionsanalyse: Raucherstatus $p = 0,316$; Alter $p = 0,463$					

4.5.2 Angiogenese der K/C-Mäuse

In den doppeltransgenen Mäusen wurden, ebenso wie in den WT-Tieren, Bilder in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Aufgrund des inhomogeneren Verteilungsmusters der Blutgefäße in den Neoplasie-Gebieten wurden zehn beliebige Areale aufgenommen, fünf mehr als bei den einfachtransgenen-Mäusen. Eine stärkere Vergrößerung (40-fach) dieser Areale ist in Abbildung 4.16 zu sehen.

Eine Übersicht der Werte findet sich in Tabelle 4.15. Die Spannweite der Mikrogefäße pro Bildausschnitt war sowohl in den 3- als auch den 6-Monats-Tieren beinahe identisch. In den 3-Monats-Tieren lagen die Werte der Nichtraucher zwischen 29,1 - 65,6 und die der Raucher bei 33,0 - 60,3. Die Werte der 6-Monats-Tiere schwankten zwischen 30,9 - 57,9 (Nichtraucher) und 32,6 - 59,1 (Raucher) Gefäßen pro Bildausschnitt.



A

B

Abbildung 4.16: CD31 Färbung der K/C-Tiere.

A) 6-Monats-WT-Nichtraucher **B)** 6-Monats-WT-Raucher in 20-facher Vergrößerung. Die CD31 positiven Zellen stellen sich braun dar.

Bei den 3-Monats-Nichtrauchern ergab sich ein Mittelwert von $46,9 \pm 12,9$ Mikrogefäßen pro Blickfeld. Die Raucher erreichten einen Mittelwert von $44,5 \pm 12,1$ Gefäßen. In der Gruppe der 6-Monats-Tiere wurde eine deutlichere Differenz der Mittelwerte festgestellt ohne dabei eine ausreichende Signifikanz zu erreichen (s. unten). Die Nichtraucher zeigten $48,3 \pm 8,9$ und die Raucher $41,3 \pm 9,6$ Mikrogefäße pro Blickfeld.

Als statistischer Test wurde erneut eine multilineare Regression herangezogen. Weder das Alter ($p = 0,861$) noch der Raucherstatus ($p = 0,254$) zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Gefäße. Die Nullhypothese wurde somit beibehalten.

Tabelle 4.15: Anzahl der Mikrogefäße pro Bild der 3- und 6-Monats-K/C-Tiere

3-Monats-Tiere	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Nichtraucher (n = 5)	46,9	12,9	29,1	65,2
Raucher (n = 5)	44,5	12,1	33,0	60,3
6-Monats-Tiere	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Nichtraucher (n = 8)	48,3	8,8	30,9	57,9
Raucher (n = 6)	41,3	9,6	32,6	59,1
Multilineare Regressionsanalyse: Raucherstatus $p = 0,254$; Alter $p = 0,861$				

5. Diskussion

Laut Robert-Koch Institut verstarben in Deutschland im Jahr 2010 15.487 Menschen am Pankreaskarzinom (RKI 2013). Trotz Forschung und moderner Medizin liegt die 5-JÜR noch immer sehr ungünstig, bei 8 % (RKI 2013). Es ist daher notwendig das Verständnis der Entstehung diese Tumorentität weiter voranzutreiben um somit neue Wege der Prävention, Früherkennung oder Therapie zu entwickeln.

In dieser Arbeit wurde der Hauptrisikofaktor der Pankreaskarzinombildung untersucht: der Tabakrauch (Iodice et al. 2008, S. 535; RKI 2012, 2013). Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob volatiler Tabakrauch als realitätsnahes Modell einerseits eine Tumorinduktion und andererseits eine Progression bereits induzierter Vorläuferläsionen auslösen kann. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die vermuteten tumorfördernden Wirkungen von Tabakrauch wie DNA-Schaden, Proliferation und Angiogenese in diesem volatilen Modell nachweisbar sind.

5.1 Effekt der Rauchexposition auf die Histologie des Pankreas

Um die Wirkung von volatiltem Tabakrauch auf die Tumorentstehung und -progression im Pankreas zu untersuchen wurde das P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}-Mausmodell (s. 1.5) herangezogen. In den wildtyp-ähnlichen WT-Tieren sollte überprüft werde, ob volatiler Zigarettenrauch zur Induktion von Neoplasien führt. In der Gruppe der K/C-Tiere galt es zu klären, ob die Rauchexposition die Progression von Vorläuferläsionen vorantreibt. Nach der entsprechenden Tabakrauchexposition wurden HE-Färbungen der jeweiligen Pankreata angefertigt und auf mögliche Neoplasien (PanIN-, ADM-Läsionen und Karzinome) und weitere pathologische Veränderungen (Fibrose, Entzündung und Duktektasie) untersucht.

Ein ähnlicher Versuchsaufbau wurde zum Zeitpunkt der Experimente nur in der Lungenforschung durchgeführt (Takahashi et al. 2010) und noch nicht in Bezug auf das Pankreas. Um eine mögliche Progression durch volatilen Zigarettenrauch im Pankreaskarzinom zu untersuchen, wurde auf das P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}-Modell zurückgegriffen, da es der menschlichen Pankreaskarzinom-Entstehung sehr nahe kommt und alle Stadien von Vorläuferläsionen bis hin zum Karzinom aufzeigen kann (Aichler et al. 2012; Hingorani et al. 2003).

Außerdem ist die Exposition mit volatillem Rauch als Vorteil des Modells zu betonen. Die Tiere inhalierten die Inhaltsstoffe einer typischen Zigarette in einer standardisierten Konzentration von 100 mg/m³ TSP. Die Inhalation der Stoffe kommt der Realität einer Rauchexposition näher als Modelle der Nikotin-Injektion (Bersch et al. 2009) oder der Implantation von Karzinogenen in das Pankreas (Osvoldt et al. 2006; Rivera et al. 1997; Wittel et al. 2008).

Die einzelnen Pankreas-Schnitte wurden zusammen mit dem erfahrenen Pathologen Prof. Sipos von der Universität Tübingen verblindet ausgewertet. Als Nachteil der Methodik ist zu nennen, dass die Berauchung durch eine kooperierende Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Demzufolge konnte keine Kontrolle über die Behandlung der Mäuse vorgenommen werden.

5.1.1 Effekt der Rauchexposition auf die Histologie der WT-Mäuse

Für die Auswertung der WT-Tiere wurden drei Schnitte des Pankreas angefertigt, die mindestens 30 µm voneinander entfernt lagen. Dies hatte zum Ziel mehrere Gebiete des Pankreas auf pathologische Veränderungen zu untersuchen, um mögliche Schäden nicht zu verpassen.

In je drei HE-Färbungen zeigten die zehn nicht-exponierten WT-Tiere erwartungsgemäß eine unauffällige Zellarchitektur. Auch die neun mit Rauch exponierten Tiere waren pathologisch unauffällig: Sie zeigten keine Entzündung, Fibrose oder Duktectasie und weder PanIN- noch ADM-Läsionen im Sinne einer präkanzerösen Läsion.

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis führt die direkte Applikation des im Tabakrauch enthaltenen Karzinogens 7,12-Dimethylbenzanthrazen (DMBA) in das Pankreas von Ratten oder Mäusen zu einer Tumorinduktion (Bersch et al. 2009). Dabei zeigten sich unter dem direkten Einfluss des Karzinogens PanIN-Läsionen und in 8 – 16 % der Tiere ein Pankreaskarzinom (Bersch et al. 2009; Dissin et al. 1975; Rivera et al. 1997; Osvoldt et al. 2006). Rivenson et al. untersuchten 1988 die karzinogene Wirkung der im Tabakrauch enthaltenen Nitrosamine in Wildtyp-Ratten. Über das Trinkwasser wurde das Karzinogen den Ratten verabreicht und führte zu multiplen Karzinomen (Rivenson et al. 1988). Das karzinogene Potential der Inhaltsstoffe von Rauch wurde dadurch bestätigt. Die erreichten Konzentrationen der Karzinogene liegen in diesen Modellen jedoch weit über der Menge, die über das Rauchen aufgenommen werden kann (Wittel et al. 2008). Die hohe Menge an Karzinogenen und die direkte Implantation

entsprechen daher nicht der Tumorentstehung im menschlichen Pankreas unter Rauchexposition und somit nicht dem vorliegenden Maus-Modell der volatilen Exposition.

Wittel und Kollegen führten an Wildtyp-Ratten eine volatile Rauchexposition durch, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurde (Wittel et al. 2006). Zur Berauchung der Tiere benutzten Wittel et al. 1R4F Zigaretten mit 9.2 mg Teer und 0.8 mg Nikotin pro Zigarette (Simmermacher 2012) und exponierten die Tiere mit 100 und 160 mg/m³ TSP für 2 x 70 min am Tag über 3 Monate.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit vergleichbaren Forschungszigaretten 3RF4 der University of Kentucky gearbeitet. Diese enthalten 9,4 mg Teer und 0,726 mg Nikotin pro Zigarette (KTRDC 2008). Bei Wittel und Kollegen zeigten die Tiere, welche mit der höheren Belastung von 160 mg/m³ TSP exponiert wurden eine Schädigung des pankreatischen Gewebes. Die Arbeitsgruppe beschreibt, dass es in dieser Gruppe zu einer Verminderung des azinären Gewebes gekommen war und zu einer Entzündung, die sich durch vermehrtes Infiltrat bemerkbar machte (Wittel et al. 2008). In der mit 100 mg/m³ TSP berauchten 3-Monats-Gruppe, die dem Versuchsaufbau dieser Dissertation entsprechen, fanden auch Wittel et al. keine Entzündung. Weder in der 100 mg/m³ noch 160 mg/m³ TSP fand die Arbeitsgruppe pankreatische Vorläuferläsionen (Wittel et al. 2008). Auch Takahashi et al. exponierten Wildtyp-Mäuse über 5 Monate mit 3R4F-Zigarettenrauch. Sie untersuchten die Tumorentstehung der Lunge und fanden keinen Anhalt für eine Tumorinduktion. Dies entspricht insgesamt dem Ergebnis, dass es zu keiner Tumorinduktion in den untersuchten WT-Tieren unter volatiler Exposition kam.

Die Arbeitsgruppe um Jianyu-Hao untersuchte ebenfalls den Effekt einer volatilen Rauchexposition im Tiermodell. Die Ratten wurden mit 0,7 mg/L TSP (= 700 mg/m³) für 3 Monate 2 x 30min am Tag beraucht (Jianyu-Hao et al. 2009). Es wurden Zigaretten mit einem höheren Gehalt an Teer (14 mg) und Nikotin (1,2 mg) pro Zigarette gewählt. Auch in dieser Arbeit wurde eine Entzündungsreaktion beobachtet, welche sich durch einen signifikant höheren Level an Interleukin-6 zeigte (Jianyu-Hao et al. 2009). Außerdem zeigten 3 von 6 exponierten Tieren eine duktale Hyperplasie (Jianyu-Hao et al. 2009). Wenn es im Pankreasgewebe zu entzündlichen Reaktionen kommt, kann es zu reaktiven Hyperplasien des duktales Systems kommen, welche allerdings nicht mit PanIN-Läsionen verwechselt werden sollten (Hruban et al. 2001). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei den duktales Hyperplasien in der Studie von Jianyu et

al. um diese reaktiven Hyperplasien handelt und nicht um neoplastische Veränderungen.

Das Wittel et al. und Jianyu et al. eine inflammatorische Reaktion im Gewebe nachweisen konnten, könnte an der erhöhten Partikelkonzentration liegen, mit der die Tiere geraucht wurden. Im Rahmen der Untersuchungen dieser Dissertation wurden die Tiere mit 100 mg/m^3 TSP exponiert. Bei Wittel et. al. lag der Wert, bei dem eine Entzündung beobachtet wurde bei 160 mg/m^3 TSP (Wittel et al. 2008). In der Studie von Jianyu et al. lag die Konzentration sogar bei 700 mg/m^3 TSP was neben der Entzündung und Fibrose zu einer reaktiven Hyperplasie führte (Jianyu-Hao et al. 2009). Da auch in den 6-Monats-Rauchern keine pathologischen Veränderungen gefunden wurden ist anzunehmen, dass eine Entzündungsreaktion nicht von der Dauer, sondern von der Höhe der TSP abhängig ist.

Die Induktion präkanzeröser Läsionen des Pankreas durch Tabakrauch ist in realitätsnahen Modellen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, bisher nicht beobachtet worden. Eine mögliche Fehlerquelle ist die Distanz bzw. die Anzahl der Schnitte könnte zu gering gewählt worden sein. Es ist denkbar, dass man mögliche Veränderungen des Pankreas in anderen Gebieten übersehen haben könnte.

Zusammenfassend führt die volatile Exposition mit Tabakrauch einer sonst gesunden Maus bei einer Konzentration von 100 mg/m^3 weder nach 3 noch nach 6 Monaten zu einer entzündlichen oder fibrotischen Reaktion und zu keiner Induktion von Vorläuferläsionen im Pankreas. In diesem realitätsnahen Modell konnte somit kein Effekt von Tabakrauch auf eine Tumorinduktion nachgewiesen werden.

Zur weiteren Untersuchung einer Tumorinduktion durch volatilen Rauch sollte die Höhe der TSP gesteigert werden (z.B. 160 mg/m^3) und die Versuchstiere länger geraucht werden. Weiterhin sollten mehr Schnitte herangezogen werden, sodass mehr Bereiche des Pankreas auf pathologische Veränderungen hin untersucht werden können.

5.1.2 Effekt der Rauchexposition auf die Progression von Vorläuferläsionen der K/C-Mäuse

Um zu überprüfen, ob unter volatiler Tabakrauch-Exposition die stufenweise Progression hin zum Pankreaskarzinom voranschreitet, wurden in den HE-Färbungen der Pankreata der K/C-Tiere die neoplastischen Läsionen qualifiziert und quantifiziert. Es wird angenommen, dass die Dysplasie-Karzinom-Sequenz durch verschiedene molekulare Veränderungen begleitet wird (Maitra et al. 2003). Dies führt letztlich zur Progression der präkanzerösen Läsionen hin zum Vollbild eines Karzinoms. Eine

weitere mögliche präkanzeröse Läsion ist die ADM. Einige Studien vermuten, dass sich diese azinären Metaplasien weiter zu PanIN-Läsionen entwickeln könnten (Aichler et al. 2012; Maitra und Hruban 2008; Zhu et al. 2007). Da noch nicht ausreichend geklärt ist, welche Rolle die ADM-Läsionen in der Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Pankreas spielen, stellte sich die Frage, ob sich eine Rauchexposition verschieden auf diese beiden Läsionsarten auswirkt. Aus diesem Grund wurden sowohl die PanIN- als auch die ADM-Läsionen der K/C-Tiere beurteilt.

Im $P48^{+/Cre}; LSL-KRAS^{G12D}$ -Mausmodell wird das mutierte K-ras pankreasspezifisch exprimiert und es bilden sich präkanzeröse Läsionen aus. Mit der Zeit ist mehr und mehr Gewebe dysplastisch verändert (Hingorani et al. 2003). Zum einen wurde der Anteil des neoplastisch aktiven Gewebes am Gesamtgewebe geschätzt und zum anderen wurde geschätzt, wie stark die einzelnen Läsionsarten im Pankreasgewebe vertreten sind. Dazu wurde den Läsionsarten (PanIN-1, PanIN-2, ADM) und den pathologischen Veränderungen (Fibrose, Entzündung, Duktektasie) ein ordinal-skaliertes Wert zugeordnet (0-3). Im Anschluss erfolgte eine computergestützte Auswertung der Anzahl der PanIN-Läsionen durch unseren Kooperationspartner, der AG Heeschen.

Wie alle folgenden metrischen Messwerte wurde auch der Anteil des pathologischen Gewebes durch eine multilineare Regression analysiert. Dieser Test wurde in Absprache mit dem Institut für medizinische Biometrie der Philipps-Universität als besonders geeignet für den Versuchsaufbau dieser Dissertation angesehen. Die multilineare Regression hat den Vorteil, dass sowohl der Einfluss des Faktors Alter (und somit „Wirkdauer“ der K-ras Mutation), als auch der des Faktors Rauchen betrachtet werden kann. Wenn beide unabhängigen Variablen einbezogen werden, kann eine höhere Fallzahl eingeschlossen werden und der Test erhält eine höhere Teststärke. Die Teststärke gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Signifikanztest zu Gunsten einer konkreten Alternativhypothese H_1 entschieden wird, falls diese auch richtig ist (Weiß und Rzany 2010).

Die ordinal-skalierten Messwerte und die Ergebnisse der AG Heeschen wurden durch einen Mann-Whitney-U-Test statistisch untersucht. Dieser Test setzt keine Symmetrie oder Normalverteilung der Werte voraus, da es sich um einen Rangsummentest handelt. Es werden zwei Mediane unabhängiger Stichproben miteinander verglichen. Somit kann dieser Test auch für die Analyse ordinal-skalierten Messwerte benutzt werden (Weiß und Rzany 2010).

Jedes der K/C-Tiere entwickelte präkanzeröse Läsionen (ADM und PanIN-1, PanIN-2-Läsionen traten nicht bei allen Tieren auf). Auch Hingorani et al., auf die das Modell zurückgeht, beschreiben, dass es zu einer 100% Penetranz des mutierten K-ras-Genotyps kommt (Hingorani et al. 2003).

Das Vollbild eines Karzinoms wurde in keinem der im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Tiere gefunden. Weder die K/C-Nichtraucher noch die Raucher zeigten nach 3 bzw. 6 Monaten einen malignen Prozess. Die Exposition der Mäuse begann im Alter von 2 Monaten. Somit waren die Tiere am Endpunkt 5 bzw. 8 Monate alt. Hingorani et al. beschreiben nach 8,5 Monaten die ersten Karzinome einer K/C-Maus (Hingorani et al. 2003). Aichler et al. dagegen fanden Karzinome bereits bei einer K/C-Maus im Alter von 4 Monaten (Aichler et al. 2012). Es wurde daher angenommen, dass wenn Tabakrauch die Progression fördert, sich nach 6-monatiger Exposition ein Karzinom zeigen könnte. Das fehlende Auftreten von Karzinomen muss jedoch kritisch betrachtet werden, da drei der K/C-Tiere, die mit Tabakrauch exponiert wurden und ein Wildtyp-Nichtraucher während des Untersuchungszeitraums starben. Da die Tiere nicht mehr für eine histologische Analyse zugänglich waren, konnte nicht beurteilt werden, ob die drei berauchten Tiere aufgrund einer toxischen Einwirkung oder eines Karzinoms starben.

Es ließ sich sowohl in der Expositions- als auch in der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Einfluss des Alters auf den Anteil des pathologisch veränderten Gewebes nachweisen. Unabhängig von der Exposition zeigten die älteren K/C-Mäuse einen höheren Anteil an neoplastischen Läsionen. Eine über die Zeit zunehmende Neoplasie-Bildung beschreiben auch Hingorani et al. (Hingorani et al. 2003).

3-Monats-Raucher und -Nichtraucher zeigten in der Auswertung ähnliche Prozentzahlen an verändertem Gewebe. Die Gruppe der Raucher erreichte einen höheren Maximalwert als die Nichtraucher-Gruppe. Das Ausmaß der pathologischen Veränderungen zeigt in den 6-Monats-Tieren eine große Spannweite und der Mittelwert der Raucher liegt deutlich über dem der Nichtraucher. Ein Unterschied in den Gruppen lässt sich statistisch jedoch nicht bestätigen.

Die Arbeitsgruppe Aichler et al. fand in ihrer Untersuchung an P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}-Mäusen nach 52 Wochen eine Veränderung in 77% des Gewebes (Aichler et al. 2012). Auch Hingorani et al. fanden nach 9 Monaten noch 20% funktionsfähige Azini (Hingorani et al. 2003). Das Maximum an pathologischen Veränderungen der mit Tabakrauch exponierten 6-Monats-Gruppe liegt damit über den gefundenen Vergleichswerten von Hingorani und Aichler.

In der genaueren Untersuchung der neoplastischen Veränderungen zeigten sich in Expositions- und Kontrollgruppe ähnliche Verteilungen der ordinal-skalierten Ausprägungen. PanIN-1 und ADM-Läsionen fanden sich in allen 3-Monats und 6-Monats-Tieren und traten in ähnlicher Verteilung auf. Die PanIN-2-Läsionen traten in den älteren 6-Monats-Tieren in 2/3 der Fälle auf und waren zwischen Rauchern und Nichtrauchern ähnlich verteilt. In den jüngeren 3-Monats-Tieren wurden PanIN-2-Läsionen nur in einer einzigen exponierten Maus gefunden. Interessanterweise handelte es sich bei dieser Maus um das bereits beschriebene 3-Monats-Tier mit dem höchsten Anteil pathologisch veränderten Gewebes zu diesem Zeitpunkt.

In der Analyse mit Prof. Sipos, welche die Belastung des Gewebes mit den verschiedenen Veränderungen geschätzt wurde, zeigte weder in der Ausprägung der PanIN-1, PanIN-2 noch ADM-Läsionen einen signifikanten Unterschied zwischen Expositionsgruppe und Kontrollgruppe. Ebenso zeigten die geschätzten Ausprägungen von Fibrose, Entzündung und Duktectasie keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

In der Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Christopher Heeschen vom CNIO in Madrid wurden die Schnitte der 6-Monats-Tiere zusätzlich ausgewertet. Mithilfe des dort vorhandenen Scanner-Systems war es möglich einen histologischen Schnitt vollständig einzuscannen und am Computer die einzelnen Läsionsfelder exakt auszumessen. So wurde die Anzahl der PanIN-1- und -2-Läsionen im gesamten Gewebeschnitt genau bestimmt. Bei dieser Untersuchung konnte ein signifikanter Einfluss der Tabakrauchexposition auf die Anzahl der PanIN-1a-Läsionen gefunden werden. Die Exposition führt also zu einer stärkeren Umwandlung von gesundem in neoplastisches Gewebe. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es unter Tabakrauchexposition zu einem Fortschreiten der Karzinogenese im Pankreas kommt.

In einer Arbeit von Takahashi et al. wurde ebenfalls ein K-ras-Mausmodell mit volatiltem Tabakrauch exponiert (Takahashi et al. 2010). Diese Arbeit kommt dem Versuchsaufbau der vorliegenden Dissertation sehr nahe. Auch hier wurden sowohl K-ras-mutierte- als auch Wildtyp-Mäuse mit 3R4F-Zigarettenrauch exponiert und mit Kontrollen verglichen. Allerdings sollte hier die Induktion bzw. Progression des Adenokarzinoms der Lunge unter Rauchexposition getestet werden.

Nach einer Expositionsdauer von 5 Monaten zeigten sich in der Gruppe der exponierten K-ras-Tiere mehr und größere Lungenkarzinome als in der K-ras-Kontrollgruppe. Die Progression wurde somit durch die Exposition mit Tabakrauch vorangetrieben (Takahashi et al. 2010).

Eine weitere Arbeitsgruppe die sich mit dem Thema Tabakrauch und Tumorprogression beschäftigt ist die Gruppe Bersch et al (Bersch et al. 2009). In ihrer Untersuchung wurde Mäusen das sehr starken Karzinogen DMBA implantiert. Dies führt zur Tumorinduktion. Eine Gruppe wurde zusätzlich mit volatiltem Rauch exponiert, einer anderen wurde zusätzlich Nikotin injiziert. Es wurde gezeigt, dass sowohl Nikotin-Injektionen, als auch die volatile Rauchexposition in diesem Modell zu mehr Adenokarzinomen führen.

Eine Arbeit von Momi et al. aus dem Jahr 2012 untersucht den Einfluss von volatiltem Tabakrauch auf die weitere Progression bereits maligner Karzinomzellen. Die Arbeit betrachtet somit einen späteren Schritt des malignen Geschehens als die vorliegende Dissertation. In dieser Studie wurden Pankreaskarzinomzellen in gesunde Mäusen implantiert. Anschließend wurden die Tiere ebenfalls mit 3R4F-Forschungszigaretten geraucht. Es konnte eine signifikante Steigerung des Tumorgewichts und der Metastasierung nachgewiesen werden.

Kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit veröffentlichten Kumar et al. eine Arbeit, die dem Versuchsaufbau dieser Dissertation sehr nahe kommt (Kumar et al. 2014). Bei der Arbeit handelt es sich um die erste veröffentlichte Studie, die ebenfalls ein K-ras-Mausmodell des Pankreas (K-ras^{G12D}; Pdx-1cre) unter volatiler Rauchexposition auf die Progression der neoplastischen Läsionen untersucht. Die Exposition der Tiere wurde ebenfalls mit einem System von Teague Enterprises und 3R4F-Forschungszigaretten durchgeführt. Dabei wurde allerdings eine höhere Konzentration TSP gewählt (150 mg/m³) und die Tiere wurden über insgesamt 6 h am Tag geraucht. Untersucht wurde die Anzahl der PanIN-Läsionen pro high-power-field. Anders als im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde also nicht das gesamte Gewebe betrachtet. Weiterhin wurden sowohl PanIN-1 und -2-Läsionen gezählt. Dadurch kann keine Aussage über die einzelnen Läsionen getroffen werden. Die Arbeitsgruppe fand in ihrer Analyse ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der PanIN-Läsionen pro High-Power-Field zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Kumar et al. 2014).

Die vier angeführten Arbeiten von Takahashi et al., Bersch et al., Momi et al. und Kumar et al. zeigen alle einen fördernden Einfluss auf die Karzinogenese im Pankreas durch eine Exposition mit Inhaltsstoffen von Tabakrauch auf. Somit bestätigen diese Arbeiten das Ergebnis im Rahmen dieser Dissertation.

Die Auswertung der K/C-Expositions- und Kontrolltiere im Rahmen dieser Arbeit wurde zwar in Zusammenarbeit mit dem erfahrenen Pathologen Prof. Dr. Sipos aus Tübingen verblindet durchgeführt, jedoch wurde der Anteil des veränderten Gewebes zunächst

nur geschätzt, was eine mögliche Fehlerquelle darstellt. Zudem wurden die einzelnen Läsionsarten und pathologischen Veränderungen nur nach einer ordinalen Skala von 0 - 3 beurteilt und ausgewertet. Diese Beurteilung ist sehr subjektiv und geringe Unterschiede in der Ausprägung könnten übersehen worden sein. Die Kollaboration mit der Arbeitsgruppe um Dr. Heeschen konnte per Einscannen der kompletten Gewebsschnitte nachträglich die PanIN-Bereiche sehr viel genauer auswerten. Dabei wurde keine Relation zur Gesamtgröße des Gewebes hergestellt. Diese wurde bei gleich alten Tieren als annähernd gleich groß angenommen.

Eine weitere Fehlermöglichkeit, die auch für die weiteren immunhistologischen Untersuchungen gilt, ist die unterschiedliche Anzahl der Versuchstiere. Dieses ist auf die falsche Genotypisierung und die Todesfälle zurückzuführen.

Als Nachteil der hier dargestellten Versuche ist außerdem erneut die Berauchung durch eine andere Arbeitsgruppe zu nennen. Die verstorbenen Tiere wurden nicht aufbereitet. Die Todesursache ist somit ungeklärt und man kann nicht mehr zurückverfolgen, ob gerade diese Mäuse an einer Progression der präkanzerösen Läsionen litten.

Letztlich wurde ein signifikanter Anhalt gefunden, dass es in den K/C-Tieren unter Rauchexposition vermehrt zu PanIN-1a-Läsionen kommt. In der Kooperation mit dem CNIO konnte nur ein Teil der Tiere ausgewertet werden. Daher wurde nur die Gruppe der älteren K/C-Tiere (Raucher und Nichtraucher) und nur die Anzahl der PanINs ausgewertet. Es ist deshalb sinnvoll eine erneute Versuchsreihe anzuschließen, die ebenfalls die ADM Läsionen betrachtet und eine Relation zum Gesamtgewebe herstellt, um dies als mögliche Fehlerquelle auszuschließen.

Für eine folgende Versuchsreihe sollten die Tiere vor Ort mit Tabakrauch exponiert, kontrolliert und versorgt werden, um mögliche Todesfälle genau untersuchen zu können. Um eine mögliche Progression der präkanzerösen Läsionen hin zum Karzinom zu beobachten, sollte eine weitere Gruppe eingeführt werden, welche länger exponiert wird. Das Ausmaß der neoplastischen Veränderung und die Untersuchung der einzelnen pathologischen Veränderungen sollten über das Einscannen eines Gewebeschnitts und Auswertung am Computer exakt bestimmt werden.

5.2 Effekt der Rauchexposition auf die DNA-Reparatur-Kaskade in vivo und in vitro

Tabakrauch und die metabolisch entstehenden Zwischenprodukte wirken karzinogen (methylierend und pyridyloxobutylierend auf die DNA) (Hecht 1999; Thomson et al. 2003). Über die Inhaltsstoffe können Mutationen in der DNA entstehen, welche auch im Pankreas nachweisbar sind (Blackford et al. 2009; Wang et al. 1998). Es sollte daher überprüft werden, ob mit volatiltem Tabakrauch exponierte WT- und K/C-Tiere, mehr DNA Schaden (in Form von DSB) aufweisen, als die nicht exponierten Tiere.

DSB sind ein Zeichen genomischer Instabilität (Mills et al. 2003). Sie entstehen indirekt z.B. durch nahe liegende Einzelstrangbrüche, während der Reparatur von DNA-Schäden oder wenn die geschädigten Stränge repliziert werden und die Transkriptionsgabel kollabiert (Jeggo und Löbrich 2007). DSB können somit von vielfältigen Schäden induziert werden (Jeggo und Löbrich 2007) und gelten somit als guter Marker für den DNA-Schaden, der durch das vielfältige Gemisch „Tabakrauch“ entstehen kann (Garcia-Canton et al. 2012).

Zunächst wurde ein Versuch an HPDE-Zellen durchgeführt. Das Rauchmedium enthielt die über ein Pumpsystem eingesogenen Inhaltsstoffe von Zigaretten. Dies sollte das Inhalieren einer Zigarette nachahmen. HPDE-Zellen zeigen Eigenschaften wie gesunde Pankreaszellen, sind jedoch immortalisiert (Ouyang et al. 2000) und wurden als Modell verwendet, das repräsentativ für präneoplastische Pankreaszellen ist.

Mögliche DSB wurden im Westernblot analysiert, indem die Zellproteine γ -H2AX und p-ATR detektiert wurden. In der darauf folgenden in vivo Analyse der Pankreata der WT- und K/C-Tiere wurde der Marker p-ATM immunhistologisch gefärbt.

P-ATM wird durch das Vorliegen von DSB aktiviert, p-ATR durch eine Behinderung des Fortschreitens der Replikationsgabel (Kastan und Bartek 2004). P-ATM und p-ATR agieren teils über identische, teils über parallele Signalkaskaden (Lee und Paull 2007; Shiloh 2006) und phosphorylieren unter anderem das Histon-Protein H2AX am C-Terminus (γ -H2AX) (Garcia-Canton et al. 2012; Jeggo und Löbrich 2007; Paull et al. 2000; Rogakou et al. 1998). Das aktivierte Histon-Protein fungiert als Signal für die DNA-Reparatur (Nakamura et al. 2010; Paull et al. 2000).

Die in vitro Untersuchung zeigte nach Exposition mit Tabakrauchmedium eine vermehrte Expression von γ -H2AX und p-ATR in HPDE-Zellen. Dies bedeutet, dass die Aussetzung der Zellen gegenüber dem Rauchmedium zu DNA-Schäden in Form von DSB geführt hat, welche die Kaskade p-ATM/p-ATR/ γ -H2AX in Gang gesetzt haben. In

einer ähnlichen Untersuchung an pulmonalen Zellen fanden auch Albino et al. vermehrt γ -H2AX in exponierten Zellen (Albino et al. 2004). Sie setzten pulmonale Zellen ebenfalls einem in Kulturmedium gelöstem Rauchkondensat aus. Toyooka et al. wiesen in volatil berauchten Lungenzellen eine vermehrte γ -H2AX Gehalt nach und bestätigten somit, dass Tabakrauch DSB auslösen kann (Toyooka und Ibuki 2009).

Weiterhin wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass je höher der Gehalt an Tabakrauch im Medium war, desto mehr Markerproteine für DSB konnten gefunden werden. Folglich führt die höhere Menge an Zigarettenrauch im Medium zur vermehrten Bildung von DSB in der DNA.

Sedelnikova et al. zeigten ebenfalls, dass je größer der DNA Schaden ist, desto mehr γ -H2AX wird exprimiert (Sedelnikova et al. 2002). Eine weitere Arbeit von Albino et al. unterstützt den Zusammenhang (Albino et al. 2009). Sie wiesen in pulmonalen Zellen nach, dass je größer der Teergehalt im Medium ist, desto mehr γ -H2AX lässt sich in den exponierten Zellen nachweisen.

Bemerkenswert ist, dass auch in den Kontroll-HPDE-Zellen eine leichte Expression der Proteine γ -H2AX und p-ATR zu beobachten war. In einer Untersuchung von Fernandez et al. wurden Urothel-Karzinom-Patienten nach Bestrahlung und gesunde Probanden auf DBS in Lymphozyten getestet. Auch in den Zellen der Gesunden wurde eine γ -H2AX-Expression festgestellt (Fernández et al. 2013). Eine Arbeit von Toyooka et al. beschreibt ebenso eine dezente Expression von γ -H2AX in den Kontrollzellen, welche nicht mit Tabakrauch exponierten wurden (Toyooka und Ibuki 2009).

Der in vitro Versuch zeigt somit die zu erwartende Reaktion, dass Tabakrauch in Pankreaszellen DNA-Schäden auslöst und die Zellen auf die Exposition mit der Aktivierung der p-ATR, γ -H2AX-Kaskade reagieren.

Aktuelle in vivo Analysen an Mäuse-Lungen bestätigen, dass Tabakrauch zu einer Aktivierung der γ -H2AX- und somit der DNA-Reparatur-Kaskade kommt (Itoh et al. 2014; Yao et al. 2013). Für die in vivo Untersuchung des DNA-Schadens im Rahmen dieser Dissertation wurde repräsentativ das Protein p-ATM immunhistologisch nachgewiesen. In der p-ATM-Färbung der WT-Mäuse zeigte sich sowohl in der Raucher als auch Nichtraucher-Kohorte eine zytoplasmatische Färbung der Inselzellregionen. Auch die azinären Zellen stellten sich dezent positiv im Zytoplasma dar. Wenn ein Schnitt komplett durchfokussiert wurde, konnte nur sehr selten ein positiv gefärbter Zellkern gefunden werden. Somit scheint in Abwesenheit von aktiviertem K-ras keine wesentliche Antwort auf DNA-Schäden vorzuliegen, auch nicht nach Rauchexposition.

Die K/C-Tiere hingegen zeigten deutlich p-ATM-positive Zellen. Dabei war besonders das Zytoplasma positiv gefärbt. Die Zellkerne erschienen dezent positiv. Auch in den doppeltransgenen Mäusen waren die Inselzellregionen deutlich positiv und die azinären Zellen dezent positiv auf das Protein p-ATM. Alle Zellen der präkanzerösen Läsionen und alle positiv gefärbten Zellen wurden nachträglich am PC mithilfe des Programms ImageJ ausgezählt. Bei der Auszählung wurde zwischen ADM- und PanIN-Läsion unterschieden, um zu überprüfen, ob eine Rauchexposition verschieden auf diese beiden Läsionsarten wirkt.

Der prozentuale Anteil p-ATM-positiver Zellen in neoplastischen Läsionen der K/C-Tiere zeigte bei den exponierten und nicht-exponierten Tieren fast identische Werte. Weiterhin zeigt die Exposition mit Rauch keinen Einfluss auf die Zahl an p-ATM positiven Zellen in den spezifischen Läsionstypen ADM und PanIN. Die mit Tabakrauch exponierten Tiere wiesen somit nicht mehr DSB als die unberauchten Tiere auf. Aufgrund des Ergebnisses des oben beschriebenen *in vitro* Versuches und der oben genannten Studien wurde erwartet, dass auch durch eine volatile Rauchexposition vermehrt DNA-Schaden in Form von DSB ausgelöst wird. Dies konnte jedoch nicht bewiesen werden. Als Nebenbefunde konnte jedoch ein signifikanter Einfluss des Alters auf den Anteil der p-ATM positiven Zellen gefunden werden.

In den Pankreata der Nichtraucher- und Raucher-WT-Mäuse wurden sehr vereinzelt positive Zellen gesehen. Dies passt damit überein, dass auch in gesunden Zellen die Reparaturkaskade der DNA *in vitro* aktiv sein kann (Fernández et al. 2013; Toyooka und Ibuki 2009). Gegensätzliches berichten Ismail et al. (Ismail et al. 2011) und Bartkova et al. (Bartkova et al. 2005). Beide Arbeiten beschreiben, dass es im gesunden Gewebe zu keiner Aktivierung der DNA-Reparaturkaskade kommt. Da es sich in 5 Bildausschnitten um maximal 3 positive Zellen handelte und diese nicht deutlich einem Zelltyp zuzuordnen waren ist fraglich, ob es sich dabei nicht auch um Artefakte handeln könnte.

Überraschend war die sehr spezifische Färbung aller Inselzellregionen, wobei die Färbung eher cytoplasmatisch betont war. Auch in den K/C-Mäusen waren sowohl die Zellkerne als auch das Cytoplasma positiv gefärbt. Da p-ATM als Protein der Reparaturkaskade der DNA im Zellkern erfüllt, stellt sich die Frage warum auch das umgebene Zellplasma p-ATM enthält. Einige Studien haben sich bereits mit dieser Thematik beschäftigt: Die Arbeitsgruppe Tanaka et al. untersuchte ebenfalls den Effekt eines Tabakrauchkonzentrats auf die Proteine γ -H2AX und p-ATM (Tanaka et al. 2007). Dabei fanden sie das aktivierte ATM im Nukleoplasma, wo es seine Aufgabe in

der DNA-Reparaturkaskade erfüllt. In frühen präkanzerösen Läsionen der Harnblase, der Brust, der Lunge und des Kolons ist es ebenfalls im Zellkern nachweisbar (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005; Ismail et al. 2011). Die ATM/ATR-Kaskade ist ein wichtiger Schritt um frühzeitig entartete Zellen zu eliminieren, indem über die Zellzyklus-Kontrollpunkte die Zelle in den Zellarrest gebracht wird (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005). Bartkova et al. beschreiben, dass je weiter eine Läsion voranschreitet, umso schwächer wird die Expression von p-ATM im Zellkern (Bartkova et al. 2005). In einer Arbeit von Ismail et al. wird berichtet, dass im kutanen Plattenepithelkarzinom mit fortschreitender Progression die nukleäre Expression von p-ATM sinkt und die zytoplasmatische steigt (Ismail et al. 2011). Die Arbeitsgruppe geht davon aus, dass die sinkende Expression von p-ATM im Zellkern auf eine Reduktion der zellulären Antwort auf DNA-Schäden im Laufe der Tumorprogression hindeutet (Ismail et al. 2011).

Das ansteigende zytoplasmatische Signal von p-ATM könnte mit dessen Aufgaben im intrazellulären Transport und in der Autophagie zusammenhängen. Watters et al., sowie Lim et al. fanden das Protein vermehrt in Vesikeln (z.B. Peroxisomen) und vermuteten, dass ATM am intrazellulären Transport von Proteinen und Vesikeln beteiligt ist (Lim et al. 1998; Watters et al. 1999). Diese Aufgabe könnte die deutlich zytoplasmatisch gefärbten Inselzellareale und auch die dezente zytoplasmatische Färbung der azinären Zellen erklären. Denn azinäre Zellen haben eine exokrine Eigenschaft, Inselzellen eine endokrine und somit eine große Anzahl von zytoplasmatisch gelegenen Vesikeln. Darüber hinaus wird zytoplasmatisches p-ATM in Verbindung mit der ROS vermittelten Autophagie der Zelle in Verbindung gebracht (Alexander und Walker 2010). Dauerhafter Stress auf die Zelle z.B. durch DNA-Schaden führt, ebenfalls vermittelt über p-ATM zu Autophagie und Seneszenz bzw. Apoptose (Singh et al. 2012).

Der signifikante Einfluss der Dauer bzw. des Alters auf den Anteil p-ATM positiver Zellen in präkanzerösen Läsionen der K/C-Mäuse scheint daher nicht auf einen vermehrten DNA-Schaden in den älteren Tieren zurückzugehen. Vielmehr könnte dies daran liegen, dass die älteren Tiere höhergradige Läsionen ausbilden und die Autophagie initiiert wird.

Es war nicht leicht in den K/C-Tieren zwischen zytoplasmatischer und nukleärer Färbung zu unterscheiden. Daher wurden alle deutlich braun gefärbten Zellen als positiv gewertet. Aufgrund der schlechten Differenzierung zwischen zytoplasmatischen und nukleären p-ATM ist das Ergebnis, dass der Raucherstatus keinen Einfluss auf

den Anteil positiver Zellen hat, kritisch zu sehen. Ob wirklich ein vermehrter DNA-Schaden vorliegt, ist nur zu beantworten, wenn man genau zwischen der zytoplasmatischen und nukleären Färbung unterscheidet. Außerdem muss die Stärke der Färbung in den verschiedenen Teilen der Zelle bestimmt werden, so wie auch in einer Arbeit von Ismail et al. (Ismail et al. 2011). Wenn die nukleäre Färbung der Raucher verstärkt wäre, müsste angenommen werden, dass die Zellen adäquat auf einen vorliegenden DNA-Schaden reagieren. Wenn in den Zellen der Rauchern die nukleäre Färbung schwächer und die zytoplasmatische stärker ist, kann angenommen werden, dass die Reparaturfähigkeit der Zellen im Rahmen der Tumorprogression abnimmt. Eine solche Aussage ist aufgrund der Auswertung allerdings nicht möglich. Es wurden alle positiven Zellen gezählt. Eine nachträgliche Unterscheidung zwischen den Kompartimenten ist nicht möglich.

Eine mögliche Fehlerquelle, die auch für die Auswertung der Proliferation und der Angiogenese zählt, ist die Verzerrung durch eine nicht verblindete Auswertung. Die ausgewerteten Bilder wurden verblindet aufgenommen. Die letztliche Auswertung per ImageJ erfolgte dann unter Wissen des jeweiligen Expositionsstatus. Für eine folgende Untersuchungsreihe sollte man ein umfassenderes System der Verblindung einführen, um eine mögliche Verzerrung zu vermeiden.

Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass die Exposition von Pankreaszellen mit Rauchmedium *in vitro* zu einem DNA-Schaden führt, welcher sich über DSB nachweisen lässt. In der *in vivo* Untersuchung der WT- und K/C-Tiere konnte keine Induktion von DSB durch die volatile Rauch-Exposition belegt werden. Dieses Ergebnis ist jedoch aufgrund der oben beschriebenen Problematik kritisch zu sehen und sollte erneut überprüft werden. Mithilfe eines erfahrenen Pathologen oder durch mehrere unabhängige, verblindete Auswerter sollte die Stärke der jeweiligen zytoplasmatischen und nukleären Färbung der präkanzerösen Läsionen bestimmt werden.

5.3 Effekt der Rauchexposition auf die Proliferation

Es sollte weiterhin überprüft werden, ob eine volatile Tabakrauchbelastung in WT- und K/C-Tieren zu mehr proliferativ aktiven Pankreaszellen bzw. Neoplasien führt und dieser Effekt somit Ursache der Progression der K/C-Tiere sein könnte.

Eine ungehemmte Proliferation ist Zeichen von Malignität und Grundeigenschaft entarteter Zellen (Hanahan und Weinberg 2011). Im Laufe der Progression von einer zu postulierenden Tumorstammzelle über PanIN-Läsionen hin zum Karzinom steigt die Anzahl der proliferierenden Zellen an (Hermanova et al. 2004; Klein et al. 2002). Hermanova et al. beschreiben folgende Proliferationsraten: Normaler Duktus 0.41 %, PanIN-1A 0.69 %, PanIN-1B 2.33 %, PanIN-2 14.08 %, PanIN3 22.01 % und invasives duktales Adenokarzinom 36.99 % proliferierende Zellen. Lässt sich also im Mausmodell eine höhere Rate an proliferierenden Zellen im Gewebe bzw. in den präkanzerösen Läsionen erkennen, kann dies auf eine voranschreitende Progression hindeuten.

In vitro Studien zeigten, dass Nikotin und Nitrosamine den $\alpha 7$ -nAChR und $\beta 2$ -Rezeptor aktivieren und somit Proliferation induzieren (Jull et al. 2001; Wu et al. 2005). Zum Zeitpunkt der Versuche lagen keine Studien zur Proliferation im K/C-Mausmodell des Pankreas unter Rauchexposition vor. Daher wurden die Pankreata Versuchstiere im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf das Protein Ki-67 gefärbt.

Ki-67 ist ein Protein, welches in allen Phasen der Zellteilung exprimiert wird, nicht aber in ruhenden Zellen (Gerdes et al. 1984; Gerdes et al. 1991). Aufgrund dieser Eigenschaften ist die Detektion des Proteins eine gängige Methode um proliferierende Zellen zu identifizieren (Jakobsen und Sorensen 2013; Scholzen und Gerdes 2000).

Jakobsen beschreibt in seiner Arbeit von 2013, dass in verschiedenen Literaturstellen Ki-67 als prognostischer Faktor sehr unterschiedlich ausgewertet wird (Jakobsen und Sorensen 2013). Ziel ist immer die Bestimmung des Anteils der proliferierenden Zellen, die Proliferationsfraktion. Dafür werten einige Studien nur Hotspots aus, also Bereiche hoher Proliferation, andere betrachten das gesamte Gewebe (in diesem Fall der Lunge) und werten beliebige Bildausschnitte aus. Welche der beiden Methoden besser ist wird laut Jakobsen noch immer kontrovers diskutiert (Jakobsen und Sorensen 2013).

Für die vorliegende Arbeit wurde entschieden, beliebige Bildausschnitte auszuwerten. Zum einen wurde dies als sichere Methode gesehen, da in der Bestimmung von Hotspots eine Verzerrung hätte eintreten können. Zum anderen war es das Ziel, den

Effekt der Tabakrauchexposition auf das gesamte Pankreas der WT-Tiere bzw. alle Läsionstypen des Pankreas der K/C-Tiere auszuwerten. Die Proliferationsfraktion der Neoplasien wurde sowohl insgesamt, als auch separat für die PanIN- und ADM-Läsionen bestimmt. Dafür wurde die Zellzahl der jeweiligen neoplastischen Läsionen und die Anzahl Ki-67 positiver Zellen bestimmt.

Die auf Ki-67 gefärbten Schnitte zeigten Zellen mit deutlich nukleären Färbungen. Bei der Auswertung der verschiedenen Proliferationsraten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern; weder in den WT-noch K/C-Tieren.

Dass die Inhaltsstoffe von Zigaretten wachstumssteigernd auf Zellen wirken können wurde bereits durch in vitro Studien untersucht (He et al. 2014; Jull et al. 2001; Shi et al. 2012). In einigen Studien wurde die Auswirkung von Tabakrauch auf die Proliferation in vivo auf gesundes Gewebe analysiert. Sowohl im Pharynx (Oliveira Semenzati et al. 2012), in der Lunge (Lee et al. 2001) und im Urothel (Ohnishi et al. 2007) ist eine stärkere Ki-67-Expression und somit stärkere Proliferation unter Rauchexposition nachweisbar.

Im Mausmodell untersuchten Momi et al. ebenfalls die Auswirkung einer Berauchung von Mäusen mit 3R4F-Zigaretten (Momi et al. 2012b). Sie implantierten Pankreaskarzinomzellen in gesunde Mäuse und exponierten diese anschließend mit Tabakrauch. Es konnte eine signifikante Steigerung des Tumorgewichts und der Metastasierung über die JAK2/STAT3-Kaskade nachgewiesen werden (Momi et al. 2012b). Auch nicht entartete Pankreaszellen reagieren auf Tabakexposition mit erhöhter Zellteilung. So zeigen Song et al. in ihrer Arbeit, dass Tabak im Trinkwasser zu einer höheren Proliferation (ebenfalls in einer Ki-67 Färbung) in duktalem Gewebe von Mäusen führt (Song et al. 2010).

Es wäre daher zu erwarten gewesen, dass sich eine vermehrte Proliferationsfraktion auch in den exponierten Tieren der vorliegenden Dissertation zeigt.

Ohnishi et al. untersuchten ebenfalls den Effekt von volatilen Tabakrauch, allerdings auf das Urothel (Ohnishi et al. 2007). Die Arbeitsgruppe exponierte Mäuse ebenfalls in der Expositionskammer von Tegau Enterprise. Die Expositionsdosis lag bei 150 mg/m^3 für 2 h am Tag. In der Gruppe der 3-Monats-Tiere zeigte sich eine deutliche Steigerung der Proliferation unter Rauchexposition. Dieser Effekt war zu den nachfolgenden Zeitpunkten (6, 9 und 12 Monate) nicht mehr nachweisbar. Die Arbeitsgruppe geht davon aus, dass die Proliferation eine Reaktion auf zytotoxischen Stress ist, welche durch Regeneration abgeschwächt wird (Ohnishi et al. 2007).

Zwei Studien in der Lungenforschung zeigen einen gegenläufigen Effekt von Tabakrauch, als den bisher beschriebenen Effekt der Proliferationssteigerung. In einer Arbeit von Nyunoya aus dem Jahr 2006 wird beschrieben, dass pulmonale Fibroblasten unter Einfluss von Tabakrauch in ihrer Proliferation gestoppt werden (Nyunoya et al. 2006). Außerdem sind die Signalkaskaden der Seneszenz (p53 und p16) aktiviert und es zeigt sich eine höhere Expression von p-ATM (Nyunoya et al. 2006). Weitere aktuelle Studien bestätigen diesen Effekt von Rauch auf pulmonale und hautständige Fibroblasten (Nyunoya et al. 2013; Salem et al. 2013; Yang et al. 2013). Dies ist eine mögliche Erklärung, warum unter Tabakrauchexposition die Proliferation geringer ausfällt. Um dies im K-ras Mausmodell zu verifizieren wären weitere Untersuchungen auf Veränderungen der Seneszenz nötig.

Wie oben bereits beschrieben, zeigen PanIN-Läsionen höherer Stufe auch eine höhere Proliferation (Hermanova et al. 2004). Interessant war jedoch, dass sowohl im Gewebe der Nichtraucher als auch der Raucher Läsionen auftraten, die bis zu 100% aus proliferierenden Zellen bestanden und weit über dem durchschnittlichen Wert von PanIN-Läsionen lagen. Diese wurden meist als ADM-Läsionen gewertet, da sie sehr wenig Zytoplasma und eher mittelständige Kerne zeigten.

Aichler et al. beschreiben ein ähnliches Phänomen in einer Untersuchung des K-ras-Modells des Pankreas (Aichler et al. 2012). Sie berichten bei 52 Wochen alten K/C-Mäusen ebenfalls über auffällige Läsionen welche in einer Ki-67-Färbung eine Proliferation von bis zu 80% zeigen. Alle anderen Läsionsarten (PanIN) beschreiben sie als gering proliferierend (unter 10%). Ob diese Läsionen zu den ADM-Läsionen zu zählen sind oder nicht scheint fraglich.

Die gewählte Methode dieser Dissertation wertet den Durchschnitt an proliferierenden Zellen aus. Daher ist nicht zu bestimmen, ob die stark proliferierenden Läsionen in der Raucher-Gruppe vermehrt auftreten, denn der unterschiedliche Anteil an nicht proliferierenden PanIN-Läsionen verzerrt die Proliferationsrate der sehr aktiven Läsionen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Anhalt für eine gesteigerte Proliferation des Pankreasgewebes in WT- und K/C-Tieren gefunden. Eine erneute Versuchsreihe sollte mithilfe einer parallelen Färbung von p53 eine mögliche Induktion der Seneszenz überprüfen. Weiterhin sollte in der Auswertung der Ki-67-Färbung der K/C-Tiere eine Betrachtung der sogenannten „Hotspots“ stattfinden, um zu untersuchen, ob die oben beschriebenen stark proliferierenden Areale durch eine Tabakexposition beeinflusst werden.

5.4 Effekt der Rauchexposition auf die Angiogenese

Es galt zu klären, ob eine volatile Rauch-Exposition eine gesteigerte Angiogenese auslöst und ob diese für ein mögliches Tumorfortschreiten verantwortlich sein könnte. Angiogenese ist ein wichtiger Faktor der Tumorentstehung, insbesondere der Progression (Hanahan und Folkman 1996). Nur über vermehrte Einsprossung von Mikrogefäßen, in denen die Mikrozirkulation stattfindet, kann eine ausreichende Sauerstoffversorgung bei autonomem Wachstum sichergestellt werden (Folkman 1990; Hanahan und Folkman 1996).

Auch in der frühen Progression scheint Angiogenese eine wichtige Rolle zu spielen. Criscimanna et al. untersuchten ein K-ras-Mausmodell mit zusätzlich ausgeschaltetem Hypoxie-induziertem Faktor. Das Gewebe konnte somit nicht auf Hypoxie reagieren. Interessant ist, dass in dieser Arbeit die low-grade PanIN-Läsionen nicht weiter voranschritten. (Criscimanna et al. 2013) Es scheint also auch in der frühen Progression des Pankreas nötig eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes zu gewährleisten.

In Studien konnte gezeigt werden, dass Nikotin Endothelzellen, über den $\alpha 7nACh$ -Rezeptor, zum Wachstum anregt (Heeschen et al. 2001; Heeschen et al. 2002; Heeschen et al. 2003; He et al. 2014; Villablanca 1998). Über diesen Rezeptor steigert Nikotin die VEGF-, FGF- und Prostacyclinsynthese, was als Wachstumssignal für die Endothelzellen dient. (Boutherin-Falson und Blaes 1990; Carty et al. 1996; Inamine et al. 2012; Ng et al. 2007; Shin et al. 2005; Shi et al. 2012; Shin et al. 2005).

Mithilfe der immunhistologischen Färbung des Oberflächenproteins CD31 wurde dieser Effekt in den WT- und K/C-Tieren überprüft. Das Zell-Adhäsionsmolekül CD31 ist ein etablierter Marker für embryonale und adulte Endothelzellen (Albelda et al. 1991). Auch Monozyten, Thrombozyten und spezielle T-Zellen bilden auf ihrer Zelloberfläche CD31 aus (Albelda et al. 1991; Kishuku et al. 2009). Für die Auswertung der Gewebsschnitte wurden daher nur Strukturen als Mikrogefäße gewertet und gemittelt, welche ein Lumen oder eine längliche Struktur aufwiesen. Größere Gefäße mit muskulärem Wandanteil wurden nicht mitgezählt.

Die Bestimmung der Microvessel Density (MVD) ist eine häufige Methode um die angiogenetische Aktivität eines Gewebes zu beschreiben (Hemmerlein et al. 2001). Dort wo eine höhere Aktivität des Wachstumsfaktors VEGF herrscht findet man auch eine höhere Anzahl an Mikrogefäßen (Koh et al. 2013). Die MVD ist laut Halatky et al. im Grunde ein Maß für die interkapilläre Distanz, also die Dichte des Kapillarnetzes

(Hlatky et al. 2002). Folglich kann man die MVD als sogenanntes Surrogat-Kriterium der Angiogenese eines Tumors heranziehen (Byrne und Bundred 2000).

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe von CD31 die Dichte der Kapillare als Maß der Angiogenese bestimmt. Auch VEGF wurde als Marker getestet. Allerdings zeigten sich hier Schwierigkeiten in der Quantifizierung. VEGF war in den meisten neoplastischen Läsionen vorhanden. Um die Färbung auswerten zu können, hätte man die Intensität der positiven Zellen bestimmen müssen (wie zum Beispiel in einer Arbeit von Han et. al Han et al. 2001). Dies ist jedoch schwierig zu objektivieren und wurde daher verworfen. Statistisch sicherer zu verwerten ist dagegen die Färbereihe mit Antikörpern gegen CD31. Die einzelnen Kapillaren sind auf einem Bildausschnitt klar zu erkennen und das Programm ImageJ erhöhte die Sicherheit der richtigen Zählung. Auch Heeschen et al. bestimmten die Zahl an Gefäßen mithilfe von CD31 (Heeschen et al. 2001; Heeschen et al. 2006).

Weidner et al. etablierten eine Methode der MVD-Bestimmung im Tumorgewebe. Sie färbten ebenfalls immunhistologisch Endothelzellen an. Anschließend suchten sie drei Regionen der höchsten Vaskularität im Gewebe auf und zählten in diesen Gebieten die Mikrogefäße aus (Weidner et al. 1993). Das Gebiet der höchsten Vaskularität konnte dabei überall im Tumorgewebe liegen (Weidner et al. 1993). Diese Art der MVD-Bestimmung ist sehr subjektiv, da es auf die Erfahrung des Auswerters ankommt zu bestimmen, welche Region als sogenannter „hot spot“ der Angiogenese ausgezählt wird (Vermeulen et al. 1997). Oh et al. färbten ebenfalls CD31 zur Darstellung von Mikrogefäßen. Jedoch wählte die Arbeitsgruppe 8 zufällige Gebiete eines Tumorgewebes aus um die Anzahl der Gefäße zu bestimmen (Oh et al. 2001).

Da die WT-Tiere homogene Verteilungen der Gefäße zeigten, wurden wie in der Arbeit von Oh et al. beliebige Bildausschnitte ausgewertet. In den K/C-Rauchern und Nichtraucherern zeigten sich die positiv gefärbten Mikrogefäße stärker in den Regionen der präkanzerösen Läsionen. Nur Gewebe, welches von einem Mikrogefäß nicht mehr als 110 µm entfernt liegt wird auch von diesem versorgt (Hlatky et al. 2002). Um also eine Aussage darüber treffen zu können, ob die neoplastischen Läsionen unter Rauchexposition besser versorgt werden und ob dies eine Ursache der möglichen Progression ist, muss man die Mikrogefäße in unmittelbarer Umgebung der Läsionen betrachten.

Sowohl in der Gruppe der WT- als auch K/C-Tiere bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der Mikrogefäße pro Blickfeld zwischen der Expositions- und

Kontrollgruppe. Folglich ist kein Unterschied in der Angiogenese-Aktivität des Pankreasgewebes durch volatile Tabakexposition nachweisbar.

Nach aktueller Studienlage hätte man erwartet, dass es in den exponierten WT- und K/C-Tieren zu einer im Pankreas nachweisbaren Steigerung der Gefäßanzahl kommt. In vitro Analysen haben gezeigt, dass Nikotin das Wachstum von Endothelzellen fördert (Shi et al. 2012; Villablanca 1998). Auch in vivo Studien fanden einen angiogenetischen Effekt von Nikotin. Heeschen et al. untersuchten den Effekt von Nikotin-Injektionen auf die Angiogenese von Lungenkarzinomen. In ihrer Arbeit beschreiben sie, dass Lungentumore unter Nikotineinfluss stärker wachsen und führen dies auf eine höhere Angiogenese in den exponierten Tieren zurück (Heeschen et al. 2001). Auch in anderen Organen lässt sich dieser Effekt nachweisen. So ist im Cervix einer Raucherin eine höhere Expression des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF nachweisbar (Inamine et al. 2012) und im Mausmodell des Magenkarzinoms führen Nikotin-Injektionen zu einer gesteigerten Angiogenese (Shin et al. 2005).

In der bereits erwähnten Untersuchung von Momi et al. implantierte die Arbeitsgruppe Pankreaskarzinomzellen in Mäuse und exponierten diese Tiere ebenfalls mit volatiltem Rauch. Sie beschreiben, dass die volatile Tabakexposition zu einer Aktivierung des $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors führt (Momi et al. 2012b). Die Angiogenese wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Es ist allerdings anzunehmen, dass wenn der Rezeptor aktiv ist, auch die Angiogenese im Pankreas durch den volatilen Rauch gesteigert sein könnte.

Es stellt sich also die Frage, warum dieser Effekt nicht im volatilen Mausmodell dieser Dissertation nachweisbar war. Die oben beschriebenen Arbeiten beziehen sich auf den fördernden Effekt von Nikotin auf die Angiogenese. Jedoch scheint Tabakrauch auch eine hemmende Komponente auf die Angiogenese zu haben (Magers et al. 1995). Er enthält reaktive Oxide, welche toxisch auf das Endothel wirken können und die Grundlage arteriosklerotischer Veränderungen bilden (Hossain et al. 2011; Powell 1998). Der inhalierte Tabakrauch stört die VEGF-vermittelte Migration der Endothelzellen und die Formation zu neuen Mikrogefäßen (Michaud et al. 2006).

Die MVD ist das Ergebnis von pro- sowie anti-angiogenetischen Faktoren (Hlatky et al. 2002). Das kein Unterschied in der Anzahl der Mikrogefäße gefunden wurde könnte somit darin liegen, dass sich die fördernde Wirkung des Nikotins und die hemmende der Oxide auf die Angiogenese aufheben.

Darüber hinaus zeigen weit fortgeschrittene hypoxische und nekrotische Tumorgewebe eine geringere MVD bei hoher VEGF-Expression (Hemmerlein et al. 2001). Auch das maligne Pankreaskarzinom zeigt eine schlechte Durchblutung (Olive et al. 2009).

Zusammenfassend ist im P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}-Mausmodell nach volatiler Exposition wider Erwarten weder im Pankreasgewebe der WT-Tiere, noch der K/C-Tieren ein signifikanter Anhalt für eine gesteigerte Angiogenese zu finden. Es sollte versucht werden, neben der CD31-Färbung auch die Färbereihe mit VEGF auszuwerten.

6. Zusammenfassung

Epidemiologische Studien belegen, dass regelmäßiger Tabakkonsum ein Hauptrisikofaktor des Adenokarzinoms im Pankreas ist. Es gibt jedoch nur vereinzelte in vivo Studien, welche die Tumorentstehung unter diesem Risikofaktor abbilden. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Karzinogenese unter Tabakrauchexposition in einem realitätsnahen in vivo Mausmodell zu untersuchen. Dazu wurden sowohl Wildtyp-K-ras- (WT-) als auch P48^{+Cre}; LSL-KRAS^{G12D}- (K/C-) Mäuse in einer speziellen Expositionskammer 3 bzw. 6 Monate gegenüber volatiltem Tabakrauch exponiert.

In der Gruppe der WT-Tiere zeigte die Exposition keine Auswirkung auf die Histologie im Sinne einer Tumorinduktion. In allen K/C-Tieren war die Karzinogenese bereits durch die Mutation des ras-Gens induziert: es zeigten sich die Vorläuferläsionen PanIN und ADM. Es wurde die Ausprägung der Vorläuferläsionen und anderer Pathologika in den K/C-Tieren beurteilt. Hierbei zeigte sich bei manueller Quantifizierung kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der exponierten und nicht exponierten Mäuse. Eine in Kooperation durchgeführte computergestützte Quantifizierung der histologischen Vorläuferläsionen wies eine signifikant höhere Zahl PanIN-1a-Läsionen in den Pankreata der Raucher nach.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Effekte von Tabakrauch wie DNA-Schaden, Proliferation und Angiogenese nach einer volatilen Exposition immunhistologisch über Markerproteine nachweisen lassen. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass es nach Exposition mit einem speziell angefertigten Rauchmedium in humanen duktalem Pankreasepithelzellen (HPDE) zu einer vermehrten Expression von Markern der DNA-Schädigung (γ -H2AX und p-ATR) kommt. In der immunhistologischen Auswertung (p-ATM) der volatil berauchten Mäuse konnte dies jedoch nicht festgestellt werden. In der Expositions- und Kontrollgruppe zeigte sich außerdem kein Unterschied der Proliferationsraten (Ki-67) und der Angiogenese (CD31).

In der in Kooperation durchgeführten computergestützten Auswertung wurde eine vermehrte Bildung von Vorläuferläsionen nach volatiler Exposition und somit ein Voranschreiten der Karzinogenese gezeigt. Um zu untersuchen, ob es letztlich unter volatiler Tabakrauchexposition im K-ras-Mausmodell zu vermehrten Karzinomen kommt, sollte eine erneute Versuchsreihe angeschlossen werden, in der die

Versuchstiere erst in höherem Alter untersucht werden. Die Auswertung sollte auch hier computergestützt erfolgen.

7. Abstract

Epidemiological studies show that regular consumption of tobacco is a major risk factor of pancreatic adenocarcinoma. However, there are only a few *in vivo* studies that investigate tumor development under the influence of this risk factor. Therefore, the aim of this study was to investigate carcinogenesis following exposure to tobacco smoke in a realistic *in vivo* mouse model. For this purpose, wild-type K-ras (WT) and P48^{+cre}; LSL-KRAS^{G12D} (K/C) mice were exposed to volatile tobacco smoke in a special experimental chamber for 3 or 6 months.

In the WT group no histological effect on tumor induction was found. In all K/C mice carcinogenesis was induced by the mutation of *ras* before exposure to smoke: they showed development of the precursor lesions PanIN and ADM. In cooperation with an expert pathologist the expression of precursor lesions and other pathologies in the K/C mice were assessed. No significant differences between the groups of exposed and unexposed mice were seen after manual quantification. A computer-assisted evaluation of the histology, however, found a significantly higher number of PanIN-1a lesions in the pancreata of smokers.

Furthermore, the effects of tobacco smoke such as DNA damage, cell proliferation, and angiogenesis were investigated immunohistochemically by marker proteins after volatile exposure. *In vitro*, an increased expression of the DNA-damage cascade (γ -H2AX and p-ATR) after exposure to a specially designed “smoke-exposed medium“ was detected in HPDE cells. However, in the immunohistochemical analysis of the smoke-exposed mice no significantly increased DNA damage (p-ATM) was detected. Furthermore, the exposure and control groups showed no difference in cell proliferation rate (Ki-67) and in angiogenesis (CD31).

After automated quantification, an increased formation of precursor lesions and thus a progression of carcinogenesis after volatile smoke exposure was detected. To investigate whether volatile tobacco smoke exposure ultimately results in increased cancer in the K-ras mouse, a new series of experiments should be carried out in which the test animals are analyzed at a mature age.

8. Literaturverzeichnis

Adler, Douglas G.; Baron, Todd H. (2002): Endoscopic palliation of malignant gastric outlet obstruction using self-expanding metal stents: experience in 36 patients. In: *Am. J. Gastroenterol.* 97 (1), S. 72–78.

Aichler, Michaela; Seiler, Christopher; Tost, Monica; Siveke, Jens; Mazur, Pawel K.; Da Silva-Buttkus, Patricia et al. (2012): Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. In: *J. Pathol.* 226 (5), S. 723–734.

Albelda, S. M.; Muller, W. A.; Buck, C. A.; Newman, P. J. (1991): Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. In: *J. Cell Biol.* 114 (5), S. 1059–1068.

Albino, A. P.; Huang, X.; Jorgensen, E.; Yang, J.; Gietl, D.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z. (2004): Induction of H2AX phosphorylation in pulmonary cells by tobacco smoke: a new assay for carcinogens. In: *Cell Cycle* 3 (8), S. 1062–1068.

Albino, Anthony P.; Jorgensen, Ellen D.; Rainey, Patrick; Gillman, Gene; Clark, T. Jeffrey; Gietl, Diana et al. (2009): gammaH2AX: A potential DNA damage response biomarker for assessing toxicological risk of tobacco products. In: *Mutat. Res.* 678 (1), S. 43–52.

Alexander, Angela; Walker, Cheryl L. (2010): Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. In: *Cell Cycle* 9 (18), S. 3685–3686.

Almoguera, C.; Shibata, D.; Forrester, K.; Martin, J.; Arnheim, N.; Perucho, M. (1988): Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. In: *Cell* 53 (4), S. 549–554.

Andriulli, Angelo; Festa, Virginia; Botteri, Edoardo; Valvano, Maria R.; Koch, Maurizio; Bassi, Claudio et al. (2012): Neoadjuvant/preoperative gemcitabine for patients with localized pancreatic cancer: a meta-analysis of prospective studies. In: *Ann Surg Oncol* 19 (5), S. 1644–1662.

Attri, Jyotika; Srinivasan, Radhika; Majumdar, Siddhartha; Radotra, Bishan; Wig, Jaidev (2005): Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. In: *BMC Gastroenterol* 5 (1), S. 22.

- AWMF (2013): S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. Hg. v. Leitlinienprogramm Onkologie. Online verfügbar unter <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-010OL.html>, zuletzt geprüft am 18.08.2014.
- Bakkenist, Christopher J.; Kastan, Michael B. (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. In: *Nature* 421 (6922), S. 499–506.
- Bartkova, Jirina; Horejsí, Zuzana; Koed, Karen; Krämer, Alwin; Tort, Frederic; Zieger, Karsten et al. (2005): DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. In: *Nature* 434 (7035), S. 864–870.
- Belinsky, S. A.; Devereux, T. R.; Anderson, M. W. (1990): Role of DNA methylation in the activation of proto-oncogenes and the induction of pulmonary neoplasia by nitrosamines. In: *Mutat. Res.* 233 (1-2), S. 105–116.
- Belinsky, S. A.; Devereux, T. R.; Maronpot, R. R.; Stoner, G. D.; Anderson, M. W. (1989): Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the K-ras protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines. In: *Cancer Res.* 49 (19), S. 5305–5311.
- Benowitz, Neal L.; Perez-Stable, Eliseo J.; Herrera, Brenda; Jacob, Peyton 3rd (2002): Slower metabolism and reduced intake of nicotine from cigarette smoking in Chinese-Americans. In: *J Natl Cancer Inst* 94 (2), S. 108–115.
- Berrington Gonzalez, A. de; Sweetland, S.; Spencer, E. (2003): A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. In: *Br. J. Cancer* 89 (3), S. 519–523.
- Bersch, Vivian P.; Osvaldt, Alessandro B.; Edelweiss, Maria Isabel A.; Schumacher, Rita de Cassia A.; Wendt, Luiz Roberto R.; Abreu, Lais P. et al. (2009): Effect of nicotine and cigarette smoke on an experimental model of intraepithelial lesions and pancreatic adenocarcinoma induced by 7,12-dimethylbenzanthracene in mice. In: *Pancreas* 38 (1), S. 65–70.
- Blackford, Amanda; Parmigiani, Giovanni; Kensler, Thomas W.; Wolfgang, Christopher; Jones, Sian; Zhang, Xiaosong et al. (2009): Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. In: *Cancer Res* 69 (8), S. 3681–3688.
- Boffetta, Paolo; Hecht, Stephen; Gray, Nigel; Gupta, Prakash; Straif, Kurt (2008): Smokeless tobacco and cancer. In: *Lancet Oncol.* 9 (7), S. 667–675.

- Bosetti, C.; Lucenteforte, E.; Silverman, D. T.; Petersen, G.; Bracci, P. M.; Ji, B. T. et al. (2012): Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). In: *Annals of Oncology* 23 (7), S. 1880–1888.
- Boutherin-Falson, O.; Blaes, N. (1990): Nicotine increases basal prostacyclin production and DNA synthesis of human endothelial cells in primary cultures. In: *Nouv Rev Fr Hematol* 32 (4), S. 253–258.
- Bronstein, Yulia Lisenko; Loyer, Evelyne M.; Kaur, Harmeet; Choi, Haesun; David, Cynthia; DuBrow, Ronelle A. et al. (2004): Detection of small pancreatic tumors with multiphasic helical CT. In: *AJR Am J Roentgenol* 182 (3), S. 619–623.
- Byrne, G. J.; Bundred, N. J. (2000): Surrogate markers of tumoral angiogenesis. In: *Int. J. Biol. Markers* 15 (4), S. 334–339.
- Cameron, John L.; Riall, Taylor S.; Coleman, Joann; Belcher, Kenneth A. (2006): One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. In: *Ann. Surg.* 244 (1), S. 10–15.
- Carty, C. S.; Soloway, P. D.; Kayastha, S.; Bauer, J.; Marsan, B.; Ricotta, J. J.; Dryjski, M. (1996): Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. In: *J. Vasc. Surg.* 24 (6), S. 927-34; discussion 934-5.
- Chari, Suresh T.; Leibson, Cynthia L.; Rabe, Kari G.; Ransom, Jeanine; Andrade, Mariza de; Petersen, Gloria M. (2005): Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. In: *Gastroenterology* 129 (2), S. 504–511.
- Clouse, W. D.; Yamaguchi, H.; Phillips, M. R.; Hurt, R. D.; Fitzpatrick, L. A.; Moyer, T. P. et al. (2000): Effects of transdermal nicotine treatment on structure and function of coronary artery bypass grafts. In: *J. Appl. Physiol.* 89 (3), S. 1213–1223.
- Conroy, Thierry; Desseigne, Françoise; Ychou, Marc; Bouché, Olivier; Guimbaud, Rosine; Bécouarn, Yves et al. (2011): FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 364 (19), S. 1817–1825.
- Cox, Adrienne D.; Der, Channing J. (2010): Ras history: The saga continues. In: *Small GTPases* 1 (1), S. 2–27.
- Criscimanna, Angela; Duan, Li-Juan; Rhodes, Julie A.; Fendrich, Volker; Wickline, Emily; Hartman, Douglas J. et al. (2013): PanIN-specific regulation of Wnt signaling by

HIF2alpha during early pancreatic tumorigenesis. In: *Cancer Res* 73 (15), S. 4781–4790.

Dasgupta, Piyali; Rastogi, Shipra; Pillai, Smitha; Ordonez-Ercan, Dalia; Morris, Mark; Haura, Eric; Chellappan, Srikumar (2006): Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. In: *J Clin Invest* 116 (8), S. 2208–2217.

Davis, Rebecca; Rizwani, Wasia; Banerjee, Sarmistha; Kovacs, Michelle; Haura, Eric; Coppola, Domenico et al. (2009): Nicotine Promotes Tumor Growth and Metastasis in Mouse Models of Lung Cancer. In: *PLoS ONE* 4 (10), S. e7524.

DeMarini, David M. (2004): Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. In: *Mutat Res* 567 (2-3), S. 447–474.

Dissin, J.; Mills, L. R.; Mains, D. L.; Black, O.; Webster, P. D. (1975): Experimental induction of pancreatic adenocarcinoma in rats. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 55 (4), S. 857–864.

Duell, E. J.; Lucenteforte, E.; Olson, S. H.; Bracci, P. M.; Li, D.; Risch, H. A. et al. (2012): Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). In: *Annals of Oncology* 23 (11), S. 2964–2970.

Duell, Eric J. (2012): Epidemiology and potential mechanisms of tobacco smoking and heavy alcohol consumption in pancreatic cancer. In: *Mol Carcinog* 51 (1), S. 40–52.

Elena, Joanne W.; Steplowski, Emily; Yu, Kai; Hartge, Patricia; Tobias, Geoffrey S.; Brotzman, Michelle J. et al. (2012): Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. In: *Cancer Causes Control*.

European Commission (2010): Special Eurobarometer 332 Tobacco. European Commission. Online verfügbar unter http://ec.europa.eu/health/tobacco/docs/ebs332_en.pdf, zuletzt aktualisiert am 04.05.2010, zuletzt geprüft am 28.11.2012.

Fernández, Mario I.; Gong, Yilei; Ye, Yuanqing; Lin, Jie; Chang, David W.; Kamat, Ashish M.; Wu, Xifeng (2013): γ -H2AX level in peripheral blood lymphocytes as a risk predictor for bladder cancer. In: *Carcinogenesis*.

Folkman, J. (1990): What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? In: *J Natl Cancer Inst* 82 (1), S. 4–6.

Fryzek, Jon P.; Garabrant, David H.; Schenk, Maryjean; Kinnard, Margaret; Greenson, Joel K.; Sarkar, Fazlul H. (2006): The association between selected risk factors for pancreatic cancer and the expression of p53 and K-ras codon 12 mutations. In: *Int J Gastrointest Cancer* 37 (4), S. 139–145.

Garcia-Canton, Carolina; Anadon, Arturo; Meredith, Clive (2012): gammaH2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: applications for the assessment of the in vitro genotoxicity of cigarette smoke. In: *Toxicol In Vitro* 26 (7), S. 1075–1086.

Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch, H.; Wacker, H. H.; Schwab, U.; Stein, H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. In: *J Immunol* 133 (4), S. 1710–1715.

Gerdes, J.; Li, L.; Schlueter, C.; Duchrow, M.; Wohlenberg, C.; Gerlach, C. et al. (1991): Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. In: *Am. J. Pathol.* 138 (4), S. 867–873.

Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Stein, H. (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. In: *Int. J. Cancer* 31 (1), S. 13–20.

Goggins, Michael (2005): Molecular markers of early pancreatic cancer. In: *J. Clin. Oncol.* 23 (20), S. 4524–4531.

Gong, Zhihong; Holly, Elizabeth A.; Wang, Furong; Chan, June M.; Bracci, Paige M. (2010): Intake of fatty acids and antioxidants and pancreatic cancer in a large population-based case-control study in the San Francisco Bay Area. In: *Int. J. Cancer* 127 (8), S. 1893–1904.

Gorgoulis, Vassilis G.; Vassiliou, Leandros-Vassilios F.; Karakaidos, Panagiotis; Zacharatos, Panayotis; Kotsinas, Athanassios; Liloglou, Triantafillos et al. (2005): Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. In: *Nature* 434 (7035), S. 907–913.

Hahn, S. A.; Hoque, A. T.; Moskaluk, C. A.; da Costa, L. T.; Schutte, M.; Rozenblum, E. et al. (1996): Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. In: *Cancer Res.* 56 (3), S. 490–494.

Hahn, Stephan A.; Greenhalf, Bill; Ellis, Ian; Sina-Frey, Mercedes; Rieder, Harald; Korte, Birgit et al. (2003): BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (3), S. 214–221.

Han, H.; Silverman, J. F.; Santucci, T. S.; Macherey, R. S.; d'Amato, T. A.; Tung, M. Y. et al. (2001): Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. In: *Ann Surg Oncol* 8 (1), S. 72–79.

Hanahan, D.; Folkman, J. (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. In: *Cell* 86 (3), S. 353–364.

Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674.

He, Zhi-Hui; Chen, Ping; Chen, Yan; Zhu, Ying-Qun; He, Sheng-Dong; Ye, Ji-Ru et al. (2014): Dual effects of cigarette smoke extract on proliferation of endothelial progenitor cells and the protective effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on EPCs against the damage caused by CSE. In: *Biomed Res Int* 2014, S. 640752.

Hearle, Nicholas; Schumacher, Valérie; Menko, Fred H.; Olschwang, Sylviane; Boardman, Lisa A.; Gille, Johan J. P. et al. (2006): Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. In: *Clin. Cancer Res.* 12 (10), S. 3209–3215.

Hecht, S. S. (1999): DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. In: *Mutat Res* 424 (1-2), S. 127–142.

Heeschen, C.; Jang, J. J.; Weis, M.; Pathak, A.; Kaji, S.; Hu, R. S. et al. (2001): Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. In: *Nat Med* 7 (7), S. 833–839.

Heeschen, Christopher; Chang, Edwin; Aicher, Alexandra; Cooke, John P. (2006): Endothelial progenitor cells participate in nicotine-mediated angiogenesis. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (12), S. 2553–2560.

Heeschen, Christopher; Weis, Michael; Aicher, Alexandra; Dimmeler, Stefanie; Cooke, John P. (2002): A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In: *J. Clin. Invest.* 110 (4), S. 527–536.

Heeschen, Christopher; Weis, Michael; Cooke, John P. (2003): Nicotine promotes arteriogenesis. In: *J Am Coll Cardiol* 41 (3), S. 489–496.

Hemmerlein, B.; Kugler, A.; Ozisik, R.; Ringert, R. H.; Radzun, H. J.; Thelen, P. (2001): Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. In: *Virchows Arch* 439 (5), S. 645–652.

Hermanova, M.; Nenutil, R.; Kren, L.; Feit, J.; Pavlovsky, Z.; Dite, P. (2004): Proliferative activity in pancreatic intraepithelial neoplasias of chronic pancreatitis resection specimens: detection of a high-risk lesion. In: *Neoplasma* 51 (5), S. 400–404.

Hingorani, Sunil R.; Petricoin, Emanuel F.; Maitra, Anirban; Rajapakse, Vinodh; King, Katrina; Jacobetz, Michael A. et al. (2003): Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. In: *Cancer Cell* 4 (6), S. 437–450.

Hlatky, Lynn; Hahnfeldt, Philip; Folkman, Judah (2002): Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (12), S. 883–893.

Hossain, Mohammed; Mazzone, Peter; Tierney, William; Cucullo, Luca (2011): In vitro assessment of tobacco smoke toxicity at the BBB: do antioxidant supplements have a protective role? In: *BMC Neurosci* 12, S. 92.

Hruban, R. H.; Adsay, N. V.; Albores-Saavedra, J.; Compton, C.; Garrett, E. S.; Goodman, S. N. et al. (2001): Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. In: *Am. J. Surg. Pathol.* 25 (5), S. 579–586.

Hruban, R. H.; van Mansfeld, A. D.; Offerhaus, G. J.; van Weering, D. H.; Allison, D. C.; Goodman, S. N. et al. (1993): K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. In: *Am. J. Pathol.* 143 (2), S. 545–554.

Hussain, S. Perwez; Hofseth, Lorne J.; Harris, Curtis C. (2003): Radical causes of cancer. In: *Nat. Rev. Cancer* 3 (4), S. 276–285.

IARC Working Group (2007): Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines. Volume 89. Online verfügbar unter <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol89/mono89.pdf>, zuletzt geprüft am 11.12.2012.

IARC Working Group (2012): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100E. Online verfügbar unter

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100E/mono100E.pdf>, zuletzt geprüft am 05.12.2012.

Inamine, Morihiko; Nagai, Yutaka; Mitsuhashi, Akira; Nagase, Satoru; Yaegashi, Nobuo; Yoshikawa, Hiroyuki; Aoki, Yoichi (2012): Cigarette smoke stimulates VEGF-C expression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1 and 2 lesions. In: *Int. J. Clin. Oncol.* 17 (5), S. 498–504.

Iodice, Simona; Gandini, Sara; Maisonneuve, Patrick; Lowenfels, Albert B. (2008): Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. In: *Langenbecks Arch Surg* 393 (4), S. 535–545.

Ismail, Ferina; Ikram, Mohamed; Purdie, Karin; Harwood, Catherine; Leigh, Irene; Storey, Alan (2011): Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) and the DNA damage response: pATM expression patterns in pre-malignant and malignant keratinocyte skin lesions. In: *PLoS One* 6 (7), S. e21271.

Itoh, Masayuki; Tsuji, Takao; Nakamura, Hiroyuki; Yamaguchi, Kazuhiro; Fuchikami, Jun-ichi; Takahashi, Maki et al. (2014): Systemic effects of acute cigarette smoke exposure in mice. In: *Inhalation Toxicology* 26 (8), S. 464–473.

Jacobs, Eric J.; Chanock, Stephen J.; Fuchs, Charles S.; Lacroix, Andrea; McWilliams, Robert R.; Steplowski, Emily et al. (2010): Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). In: *Int. J. Cancer* 127 (6), S. 1421–1428.

Jakobsen, Jan Nyrop; Sorensen, Jens Benn (2013): Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. In: *Lung Cancer* 79 (1), S. 1–7.

Jeggo, P. A.; Löbrich, M. (2007): DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? (56), zuletzt geprüft am 28.01.2013.

Jianyu-Hao; Guang-Li; Baosen-pang (2009): Evidence for cigarette smoke-induced oxidative stress in the rat pancreas. In: *Inhal Toxicol* 21 (12), S. 1007–1012.

Jull, B. A.; Plummer, H. K.; Schuller, H. M. (2001): Nicotinic receptor-mediated activation by the tobacco-specific nitrosamine NNK of a Raf-1/MAP kinase pathway, resulting in phosphorylation of c-myc in human small cell lung carcinoma cells and pulmonary neuroendocrine cells. In: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127 (12), S. 707–717.

Karlson, B. M.; Ekblom, A.; Lindgren, P. G.; Källskog, V.; Rastad, J. (1999): Abdominal US for diagnosis of pancreatic tumor: prospective cohort analysis. In: *Radiology* 213 (1), S. 107–111.

Kastan, Michael B.; Bartek, Jiri (2004): Cell-cycle checkpoints and cancer. In: *Nature* 432 (7015), S. 316–323.

Kawaguchi, Yoshiya; Cooper, Bonnie; Gannon, Maureen; Ray, Michael; MacDonald, Raymond J.; Wright, Christopher V. E. (2002): The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. In: *Nat. Genet.* 32 (1), S. 128–134.

Kishuku, Masatoshi; Nishioka, Yasuhiko; Abe, Shinji; Kishi, Jun; Ogino, Hirokazu; Aono, Yoshinori et al. (2009): Expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in human monocyte-derived mature dendritic cells contributes to their antiangiogenic property. In: *J Immunol* 183 (12), S. 8176–8185.

Klein, Walter M.; Hruban, Ralph H.; Klein-Szanto, Andres J. P.; Wilentz, Robb E. (2002): Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression. In: *Mod Pathol* 15 (4), S. 441–447.

Klimstra, D. S.; Longnecker, D. S. (1994): K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. In: *Am. J. Pathol.* 145 (6), S. 1547–1550.

Klimstra, David S. (2007): Noductal neoplasms of the pancreas. In: *Mod. Pathol.* 20 Suppl 1, S. S94-112.

Koh, Young Wha; Park, Chansik; Yoon, Dok Hyun; Suh, Cheolwon; Huh, Jooryung (2013): Prognostic significance of COX-2 expression and correlation with Bcl-2 and VEGF expression, microvessel density, and clinical variables in classical Hodgkin lymphoma. In: *Am J Surg Pathol* 37 (8), S. 1242–1251.

KTRDC (2008): 3R4F Preliminary Analysis. Online verfügbar unter <http://www.ca.uky.edu/refcig/3R4F%20Preliminary%20Analysis.pdf>, zuletzt aktualisiert am 21.03.2008, zuletzt geprüft am 28.11.2012.

Kumar, S.; Torres, M. P.; Kaur, S.; Rachagani, S.; Joshi, S.; Johansson, S. L. et al. (2014): Smoking accelerates pancreatic cancer progression by promoting differentiation of MDSCs and inducing HB-EGF expression in macrophages. In: *Oncogene*.

Lee, J. J.; Liu, D.; Lee, J. S.; Kurie, J. M.; Khuri, F. R.; Ibarguen, H. et al. (2001): Long-term impact of smoking on lung epithelial proliferation in current and former smokers. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (14), S. 1081–1088.

Lee, J-H; Paull, T. T. (2007): Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. In: *Oncogene* 26 (56), S. 7741–7748.

Li, Donghui (2012): Diabetes and pancreatic cancer. In: *Mol Carcinog* 51 (1), S. 64–74.

Li, Junan; Poi, Ming Jye; Tsai, Ming-Daw (2011): Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16 INK4A and Their Relevance to Cancer. In: *Biochemistry* 50 (25), S. 5566–5582.

Lim, D. S.; Kirsch, D. G.; Canman, C. E.; Ahn, J. H.; Ziv, Y.; Newman, L. S. et al. (1998): ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (17), S. 10146–10151.

Lohr, Matthias; Kloppel, Gunter; Maisonneuve, Patrick; Lowenfels, Albert B.; Luttges, Jutta (2005): Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. In: *Neoplasia* 7 (1), S. 17–23.

Lowenfels, A. B.; Maisonneuve, P.; Cavallini, G.; Ammann, R. W.; Lankisch, P. G.; Andersen, J. R. et al. (1993): Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. In: *N. Engl. J. Med.* 328 (20), S. 1433–1437.

Lowenfels, A. B.; Maisonneuve, P.; Dimagno, E. P.; Elitsur, Y.; Gates, L. K.; Perrault, J.; Whitcomb, D. C. (1997): Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (6), S. 442–446.

Lowenfels, Albert B.; Maisonneuve, Patrick (2005): Risk factors for pancreatic cancer. In: *J. Cell. Biochem.* 95 (4), S. 649–656.

Luttmann, Werner; Bratke, Kai; Küpper, Michael; Myrtek, Daniel (2009): *Der Experimentator: Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Lynch, Henry T.; Fusaro, Ramon M.; Lynch, Jane F.; Brand, Randall (2008): Pancreatic cancer and the FAMMM syndrome. In: *Fam Cancer* 7 (1), S. 103–112.

Lynch, Shannon M.; Vrieling, Alina; Lubin, Jay H.; Kraft, Peter; Mendelsohn, Julie B.; Hartge, Patricia et al. (2009): Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled

analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. In: *Am. J. Epidemiol.* 170 (4), S. 403–413.

Magers, T.; Talbot, P.; DiCarlantonio, G.; Knoll, M.; Demers, D.; Tsai, I.; Hoodbhoy, T. (1995): Cigarette smoke inhalation affects the reproductive system of female hamsters. In: *Reprod. Toxicol.* 9 (6), S. 513–525.

Maitra, Anirban; Adsay, N. Volkan; Argani, Pedram; Iacobuzio-Donahue, Christine; Marzo, Angelo de; Cameron, John L. et al. (2003): Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. In: *Mod. Pathol.* 16 (9), S. 902–912.

Maitra, Anirban; Hruban, Ralph H. (2008): Pancreatic cancer. In: *Annu Rev Pathol* 3, S. 157–188.

Michaud, Sophie Elise; Dussault, Sylvie; Groleau, Jessika; Haddad, Paola; Rivard, Alain (2006): Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. In: *J Mol Cell Cardiol* 41 (2), S. 275–284.

Mills, Kevin D.; Ferguson, David O.; Alt, Frederick W. (2003): The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. In: *Immunol Rev* 194, S. 77–95.

Momi, N.; Kaur, S.; Ponnusamy, M. P.; Kumar, S.; Wittel, U. A.; Batra, S. K. (2012a): Interplay between Smoking-induced Genotoxicity and Altered Signaling in Pancreatic Carcinogenesis. In: *Carcinogenesis* 33 (9), S. 1617–1628.

Momi, N.; Ponnusamy, M. P.; Kaur, S.; Rachagani, S.; Kunigal, S. S.; Chellappan, S. et al. (2012b): Nicotine/cigarette smoke promotes metastasis of pancreatic cancer through $\alpha 7nAChR$ -mediated MUC4 upregulation. In: *Oncogene*.

Moss, A. C.; Morris, E.; Mac Mathuna, P. (2006): Palliative biliary stents for obstructing pancreatic carcinoma. In: *Cochrane Database Syst Rev* (1), S. CD004200.

Moss, Alan C.; Morris, Eva; Leyden, Jan; MacMathuna, Padraic (2007): Malignant distal biliary obstruction: a systematic review and meta-analysis of endoscopic and surgical bypass results. In: *Cancer Treat. Rev.* 33 (2), S. 213–221.

Munigala, Satish; Kanwal, Fasiha; Xian, Hong; Scherrer, Jeffrey F.; Agarwal, Banke (2014): Increased risk of pancreatic adenocarcinoma after acute pancreatitis. In: *Clin Gastroenterol Hepatol* 12 (7), S. 1143-1150.e1.

Nakamura, Asako J.; Rao, V. Ashutosh; Pommier, Yves; Bonner, William M. (2010): The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. In: *Cell Cycle* 9 (2), S. 389–397.

National Cancer Institute (2012): Surveillance Epidemiology and End Results - SEER Stat Fact Sheets: Cancer of the Pancreas. Online verfügbar unter <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>, zuletzt aktualisiert am 13.04.2012, zuletzt geprüft am 11.12.2012.

National Toxicology Program (2011): Report on Carcinogens, Twelfth Edition. Online verfügbar unter <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/TobaccoRelatedExposures.pdf>, zuletzt geprüft am 05.12.2012.

Natori, Takeshi; Sata, Masataka; Washida, Miwa; Hirata, Yasunobu; Nagai, Ryozi; Makuuchi, Masatoshi (2003): Nicotine enhances neovascularization and promotes tumor growth. In: *Mol. Cells* 16 (2), S. 143–146.

Neoptolemos, John P.; Stocken, Deborah D.; Bassi, Claudio; Ghaneh, Paula; Cunningham, David; Goldstein, David et al. (2010): Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 304 (10), S. 1073–1081.

Neoptolemos, John P.; Stocken, Deborah D.; Friess, Helmut; Bassi, Claudio; Dunn, Janet A.; Hickey, Helen et al. (2004): A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. In: *N Engl J Med* 350 (12), S. 1200–1210.

Ng, Martin K. C.; Wu, Jenny; Chang, Edwin; Wang, Bing-yin; Katzenberg-Clark, Regina; Ishii-Watabe, Akiko; Cooke, John P. (2007): A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (1), S. 106–112.

Noh, Jae Myoung; Choi, Doo Ho; Baek, Hyejin; Nam, Seok Jin; Lee, Jeong Eon; Kim, Jong Won et al. (2012): Associations between BRCA Mutations in High-Risk Breast Cancer Patients and Familial Cancers Other than Breast or Ovary. In: *J Breast Cancer* 15 (3), S. 283–287.

Nyunoya, Toru; Mebratu, Yohannes; Contreras, Amelia; Delgado, Monica; Chand, Hitendra S.; Tesfaigzi, Yohannes (2013): Molecular Processes That Drive Cigarette Smoke-Induced Epithelial Cell Fate of the Lung. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.*

Nyunoya, Toru; Monick, Martha M.; Klingelutz, Aloysius; Yarovinsky, Timur O.; Cagley, Jeffrey R.; Hunninghake, Gary W. (2006): Cigarette smoke induces cellular senescence. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 35 (6), S. 681–688.

Oettle, Helmut; Post, Stefan; Neuhaus, Peter; Gellert, Klaus; Langrehr, Jan; Ridwelski, Karsten et al. (2007): Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 297 (3), S. 267–277.

Oh, J.; Takahashi, R.; Kondo, S.; Mizoguchi, A.; Adachi, E.; Sasahara, R. M. et al. (2001): The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. In: *Cell* 107 (6), S. 789–800.

Ohnishi, Takamasa; Arnold, Lora L.; He, Jun; Clark, Nicole M.; Kawasaki, Shin; Rennard, Stephen I. et al. (2007): Inhalation of tobacco smoke induces increased proliferation of urinary bladder epithelium and endothelium in female C57BL/6 mice. In: *Toxicology* 241 (1-2), S. 58–65.

Oleson, Bryndon J.; Broniowska, Katarzyna A.; Schreiber, Katherine H.; Tarakanova, Vera L.; Corbett, John A. (2014): Nitric oxide induces ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein-dependent γ H2AX protein formation in pancreatic β cells. In: *J. Biol. Chem.* 289 (16), S. 11454–11464.

Olive, Kenneth P.; Jacobetz, Michael A.; Davidson, Christian J.; Gopinathan, Aarthi; McIntyre, Dominick; Honess, Davina et al. (2009): Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. In: *Science* 324 (5933), S. 1457–1461.

Oliveira Semenzati, Graziela de; Souza Salgado, Breno de; Rocha, Noeme Sousa; Michelin Matheus, Selma Maria; Carvalho, Lidia Raquel de; Garcia Martins, Regina Helena (2012): Histological and immunohistochemical study of the expression of p53 and ki-67 proteins in the mucosa of the tongue, pharynx and larynx of rats exposed to cigarette smoke. In: *Inhal Toxicol* 24 (11), S. 723–731.

Osvoldt, Alessandro B.; Wendt, Luiz R.; Bersch, Vivian P.; Backes, Ariane N.; Cassia A Schumacher, Rita de; Edelweiss, Maria I. A.; Rohde, Luiz (2006): Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. In: *Surgery* 140 (5), S. 803–809.

Ouyang, H.; Mou, Lj; Luk, C.; Liu, N.; Karaskova, J.; Squire, J.; Tsao, M. S. (2000): Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. In: *Am. J. Pathol.* 157 (5), S. 1623–1631.

Paull, T. T.; Rogakou, E. P.; Yamazaki, V.; Kirchgessner, C. U.; Gellert, M.; Bonner, W. M. (2000): A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. In: *Curr Biol* 10 (15), S. 886–895.

Pfeifer, Gerd P.; Denissenko, Mikhail F.; Olivier, Magali; Tretyakova, Natalia; Hecht, Stephen S.; Hainaut, Pierre (2002): Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. In: *Oncogene* 21 (48), S. 7435–7451.

Phillips, Jennifer M.; Goodman, Jay I. (2009): Inhalation of cigarette smoke induces regions of altered DNA methylation (RAMs) in SENCAR mouse lung. In: *Toxicology* 260 (1-3), S. 7–15.

Pontieri, F. E.; Tanda, G.; Orzi, F.; Di Chiara, G. (1996): Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. In: *Nature* 382 (6588), S. 255–257.

Porta, Miquel; Fabregat, Xavier; Malats, Núria; Guarner, Luisa; Carrato, Alfredo; Miguel, Ana de et al. (2005): Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. In: *Clin Transl Oncol* 7 (5), S. 189–197.

Powell, J. T. (1998): Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall. In: *Vasc Med* 3 (1), S. 21–28.

Prokopczyk, Bogdan; Hoffmann, Dietrich; Bologna, Matthew; Cunningham, A. John; Trushin, Neil; Akerkar, Shobha et al. (2002): Identification of tobacco-derived compounds in human pancreatic juice. In: *Chem Res Toxicol* 15 (5), S. 677–685.

Raica, Marius; Cimpean, Anca Maria; Ribatti, Domenico (2009): Angiogenesis in pre-malignant conditions. In: *Eur. J. Cancer* 45 (11), S. 1924–1934.

Redston, M. S.; Caldas, C.; Seymour, A. B.; Hruban, R. H.; da Costa, L.; Yeo, C. J.; Kern, S. E. (1994): p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. In: *Cancer Res.* 54 (11), S. 3025–3033.

Rehm, Hubert; Letzel, Thomas (2010): *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.

Riediger, Hartwig; Keck, Tobias; Wellner, Ulrich; Zur Hausen, Axel; Adam, Ulrich; Hopt, Ulrich T.; Makowiec, Frank (2009): The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer. In: *J. Gastrointest. Surg.* 13 (7), S. 1337–1344.

Rivenson, A.; Hoffmann, D.; Prokopczyk, B.; Amin, S.; Hecht, S. S. (1988): Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and Areca-derived N-nitrosamines. In: *Cancer Res.* 48 (23), S. 6912–6917.

Rivera, J. A.; Graeme-Cook, F.; Werner, J.; Z'graggen, K.; Rustgi, A. K.; Rattner, D. W. et al. (1997): A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting chemical carcinogens. In: *Surgery* 122 (1), S. 82–90.

RKI (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. Berlin. Online verfügbar unter http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile, zuletzt aktualisiert am 08.02.2012, zuletzt geprüft am 30.11.2012.

RKI (2013): Krebs in Deutschland 2009/2010. Berlin. Online verfügbar unter http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Doc/krebs_in_deutschland_2009_2010.pdf, zuletzt geprüft am 24.07.2014.

Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *J Biol Chem* 273 (10), S. 5858–5868.

Rosewicz, S.; Wiedenmann, B. (1997): Pancreatic carcinoma. In: *Lancet* 349 (9050), S. 485–489.

Salem, Ahmed F.; Al-Zoubi, Mazhar Salim; Whitaker-Menezes, Diana; Martinez-Outschoorn, Ubaldo E.; Lamb, Rebecca; Hult, James et al. (2013): Cigarette smoke metabolically promotes cancer, via autophagy and premature aging in the host stromal microenvironment. In: *Cell Cycle* 12 (5), S. 818–825.

Scarpa, A.; Capelli, P.; Mukai, K.; Zamboni, G.; Oda, T.; Iacono, C.; Hirohashi, S. (1993): Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. In: *Am. J. Pathol.* 142 (5), S. 1534–1543.

Schmitz, Sabine (2009): Der Experimentator: Zellkultur. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.

Scholzen, T.; Gerdes, J. (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. In: *J Cell Physiol* 182 (3), S. 311–322.

Sedelnikova, Olga A.; Rogakou, Emmy P.; Panyutin, Igor G.; Bonner, William M. (2002): Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. In: *Radiat. Res.* 158 (4), S. 486–492.

Shi, Dingbo; Guo, Wei; Chen, Wangbin; Fu, Lingyi; Wang, Jingshu; Tian, Yung et al. (2012): Nicotine promotes proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating alpha7AChR, ERK, HIF-1alpha and VEGF/PEDF signaling. In: *PLoS One* 7 (8), S. e43898.

Shiloh, Yosef (2006): The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. In: *Trends Biochem. Sci.* 31 (7), S. 402–410.

Shin, Vivian Y.; Wu, William K. K.; Chu, Kent-Man; Wong, Helen P. S.; Lam, Emily K. Y.; Tai, Emily K. K. et al. (2005): Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer. In: *Mol. Cancer Res.* 3 (11), S. 607–615.

Siegel, Rebecca; Naishadham, Deepa; Jemal, Ahmedin (2012): Cancer statistics, 2012. In: *CA Cancer J Clin* 62 (1), S. 10–29.

Simmermacher, Rebecca K. (2012): 1R5F Brochure New. Online verfügbar unter <http://www.ca.uky.edu/refcig/1R5F%20Brochure%20New.pdf>, zuletzt aktualisiert am 05.04.2012, zuletzt geprüft am 22.01.2013.

Singh, Kamini; Matsuyama, Shigemi; Drazba, Judith A.; Almasan, Alexandru (2012): Autophagy-dependent senescence in response to DNA damage and chronic apoptotic stress. In: *Autophagy* 8 (2), S. 236–251.

Sipos, B.; Henopp, T. (2011): Vorläuferläsionen pankreatobiliärer Karzinome. In: *Pathologe* 32 (S2), S. 224–231.

Smit, Vincent T.H.B.M; Boot, Angelina J.M; Smits, Alida M.M; Fleuren, Gert Jan; Cornelisse, Cees J.; Bos, Johannes L. (1988): KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. In: *Nucl Acids Res* 16 (16), S. 7773–7782.

Sobin, L. H.; Gospodarowicz, M. K.; Wittekind, Ch (2009): TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Sohn, T. A.; Yeo, C. J.; Cameron, J. L.; Koniaris, L.; Kaushal, S.; Abrams, R. A. et al. (2000): Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. In: *J Gastrointest Surg* 4 (6), S. 567–579.

Song, Zhigang; Bhagat, Govind; Quante, Michael; Baik, Gwang Ho; Marrache, Frederic; Tu, Shui Ping et al. (2010): Potential carcinogenic effects of cigarette smoke and Swedish moist snuff on pancreas: a study using a transgenic mouse model of chronic pancreatitis. In: *Lab. Invest.* 90 (3), S. 426–435.

Su, G. H.; Hruban, R. H.; Bansal, R. K.; Bova, G. S.; Tang, D. J.; Shekher, M. C. et al. (1999): Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. In: *Am. J. Pathol.* 154 (6), S. 1835–1840.

Sugimoto, Atsuhiko; Masuda, Haruchika; Eguchi, Masamichi; Iwaguro, Hideki; Tanabe, Teruhisa; Asahara, Takayuki (2007): Nicotine enlivenment of blood flow recovery following endothelial progenitor cell transplantation into ischemic hindlimb. In: *Stem Cells Dev.* 16 (4), S. 649–656.

Takahashi, Hiroyuki; Ogata, Hisanobu; Nishigaki, Reiko; Broide, David H.; Karin, Michael (2010): Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta and JNK1-dependent inflammation. In: *Cancer Cell* 17 (1), S. 89–97.

Tanaka, Toshiki; Huang, Xuan; Jorgensen, Ellen; Gietl, Diana; Traganos, Frank; Darzynkiewicz, Zbigniew; Albino, Anthony P. (2007): ATM activation accompanies histone H2AX phosphorylation in A549 cells upon exposure to tobacco smoke. In: *BMC Cell Biol* 8, S. 26.

Tang, Yijin; Kassie, Fekadu; Qian, Xuemin; Ansha, Buzayew; Turesky, Robert J. (2013): DNA adduct formation of 2-amino-9H-pyrido2,3-bindole and 2-amino-3,4-dimethylimidazo4,5-fquinoline in mouse liver and extrahepatic tissues during a subchronic feeding study. In: *Toxicol Sci* 133 (2), S. 248–258.

Teague Enterprises: Overseas Smoke Exposure System. Hg. v. Teague Enterprises. Online verfügbar unter www.teague-ent.com/manuals/exposure-system-overseas/at_download/file, zuletzt geprüft am 20.08.2014.

Thomson, Nicole M.; Kenney, Patrick M.; Peterson, Lisa A. (2003): The pyridyloxobutyl DNA adduct, O6-4-oxo-4-(3-pyridyl)butylguanine, is detected in tissues from 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-treated A/J mice. In: *Chem Res Toxicol* 16 (1), S. 1–6.

- Toyooka, Tatsushi; Ibuki, Yuko (2009): Cigarette sidestream smoke induces phosphorylated histone H2AX. In: *Mutat. Res.* 676 (1-2), S. 34–40.
- Tsurutani, Junji; Castillo, S. Sianna; Brognard, John; Granville, Courtney A.; Zhang, Chunyu; Gills, Joell J. et al. (2005): Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. In: *Carcinogenesis* 26 (7), S. 1182–1195.
- Tuveson, David A.; Shaw, Alice T.; Willis, Nicholas A.; Silver, Daniel P.; Jackson, Erica L.; Chang, Sandy et al. (2004): Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. In: *Cancer Cell* 5 (4), S. 375–387.
- Upham, Brad L.; Blaha, Ludek; Babica, Pavel; Park, Joon-Suk; Sovadinova, Iva; Pudrith, Charles et al. (2008): Tumor promoting properties of a cigarette smoke prevalent polycyclic aromatic hydrocarbon as indicated by the inhibition of gap junctional intercellular communication via phosphatidylcholine-specific phospholipase C. In: *Cancer Sci* 99 (4), S. 696–705.
- Vermeulen, P. B.; Libura, M.; Libura, J.; O'Neill, P. J.; van Dam, P.; van Marck, E. et al. (1997): Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 42 (2), S. 165–172.
- Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. In: *Science* 294 (5545), S. 1299–1304.
- Villablanca, A. C. (1998): Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. In: *J. Appl. Physiol.* 84 (6), S. 2089–2098.
- Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M. et al. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. In: *N Engl J Med* 319 (9), S. 525–532.
- Vrieling, Alina; Bueno-de-Mesquita, H. Bas; Boshuizen, Hendriek C.; Michaud, Dominique S.; Severinsen, Marianne T.; Overvad, Kim et al. (2010): Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. In: *Int J Cancer* 126 (10), S. 2394–2403.

Wang, M.; Abbruzzese, J. L.; Friess, H.; Hittelman, W. N.; Evans, D. B.; Abbruzzese, M. C. et al. (1998): DNA adducts in human pancreatic tissues and their potential role in carcinogenesis. In: *Cancer Res.* 58 (1), S. 38–41.

Watters, D.; Kedar, P.; Spring, K.; Bjorkman, J.; Chen, P.; Gatei, M. et al. (1999): Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisomes. In: *J. Biol. Chem.* 274 (48), S. 34277–34282.

Weidner, N.; Carroll, P. R.; Flax, J.; Blumenfeld, W.; Folkman, J. (1993): Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. In: *Am J Pathol* 143 (2), S. 401–409.

Weiß; Rzany (2010): *Basiswissen Medizinische Statistik*. 5. Aufl. Springer.

Winter, Jordan M.; Cameron, John L.; Campbell, Kurtis A.; Arnold, Meghan A.; Chang, David C.; Coleman, Joann et al. (2006): 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. In: *J Gastrointest Surg* 10 (9), S. 1199-210; discussion 1210-1.

Wittel, Uwe A.; Hopt, Ulrich T.; Batra, Surinder K. (2008): Cigarette smoke-induced pancreatic damage: experimental data. In: *Langenbecks Arch Surg* 393 (4), S. 581–588.

Wittel, Uwe A.; Pandey, Krishan K.; Andrianifahanana, Mahefatiana; Johansson, Sonny L.; Cullen, Diane M.; Akhter, Mohammed P. et al. (2006): Chronic pancreatic inflammation induced by environmental tobacco smoke inhalation in rats. In: *Am J Gastroenterol* 101 (1), S. 148–159.

Wong, Gilbert Y.; Schroeder, Darrell R.; Carns, Paul E.; Wilson, Jack L.; Martin, David P.; Kinney, Michelle O. et al. (2004): Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 291 (9), S. 1092–1099.

Wood, Laura D.; Hruban, Ralph H. (2012): Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms. In: *The Cancer Journal* 18 (6), S. 492–501.

World Health Organisation (2012): *WHO Global Report on Mortality Attributable to Tobacco. Mortality attributable to tobacco*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

World Health Organisation (2014): WHO | WHO's pain ladder. World Health Organization. Online verfügbar unter <http://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/>, zuletzt geprüft am 17.06.2014.

Wu, William K. K.; Wong, Helen P. S.; Luo, Shi W.; Chan, Kevin; Huang, Fung Y.; Hui, Marco K. C. et al. (2005): 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone from cigarette smoke stimulates colon cancer growth via beta-adrenoceptors. In: *Cancer Res* 65 (12), S. 5272–5277.

Yang, Gao-yun; Zhang, Chun-lei; Liu, Xiang-chen; Qian, Ge; Deng, Dan-qi (2013): Effects of cigarette smoke extracts on the growth and senescence of skin fibroblasts in vitro. In: *Int J Biol Sci* 9 (6), S. 613–623.

Yao, Hongwei; Sundar, Isaac K.; Gorbunova, Vera; Rahman, Irfan (2013): P21-PARP-1 pathway is involved in cigarette smoke-induced lung DNA damage and cellular senescence. In: *PLoS One* 8 (11), S. e80007.

Zhu, Liqin; Shi, Guanglu; Schmidt, C. Max; Hruban, Ralph H.; Konieczny, Stephen F. (2007): Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. In: *Am. J. Pathol.* 171 (1), S. 263–273.

9. Anhang

9.1 Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1.1: Dysplasie-Karzinom Sequenz des Pankreas.	4
Abbildung 1.2: Eigenschaften von maligne entarteten Tumorzellen.	9
Abbildung 1.3: Effekte von Tabakrauch auf zellulärer Ebene.	13
Abbildung 1.4: Restriktion des Stopcodons LSL durch die Cre-Recombinase.....	14
Abbildung 3.1: Apparatur-Schema zur Gewinnung des Rauchmediums.	28
Abbildung 3.2: Rauchexpositions-kammer von Teague Enterprises.....	34
Abbildung 4.1: HE-Färbung des gesunden Pankreasgewebes der WT-Mäuse.	42
Abbildung 4.2: HE-Färbung der neoplastischen Regionen der K/C-Mäuse.	43
Abbildung 4.3: HE-Färbung der maximal neoplastisch veränderten K/C-Pankreata.	44
Abbildung 4.4: Boxplot – Prozentualer Anteil des pathologisch veränderten Gewebes im Pankreas der K/C-Tiere.....	45
Abbildung 4.5: PanIN-1a- und 1b-Läsionen im Pankreas der K/C-Tiere.....	46
Abbildung 4.6: Boxplot – Anzahl der PanIN-1a im Gesamtgewebe der 6-Monats-K/C- Tiere.	48
Abbildung 4.7: PanIN-2-Läsionen im Pankreas der K/C-Tiere.....	49
Abbildung 4.8: ADM-Läsionen im Pankreas der K/C-Tiere.....	50
Abbildung 4.9: Stromareaktion im Pankreas der K/C-Tiere.	52
Abbildung 4.10: Duktektasie im Pankreas der K/C-Tiere.....	53
Abbildung 4.11: Beispielhafter Immunoblot mit Nachweis der DNA-Reparatur-Kaskade in HPDE-Zellen nach 48 h Exposition.	55
Abbildung 4.12: p-ATM-Färbung der K/C-Tiere.....	56
Abbildung 4.13: Ki-67-Färbung der WT-Tiere.....	58
Abbildung 4.14: Ki-67-Färbung der K/C-Tiere.	60
Abbildung 4.15: CD31-Färbung der WT-Tiere.....	62
Abbildung 4.16: CD31 Färbung der K/C-Tiere.....	64

Tabellen

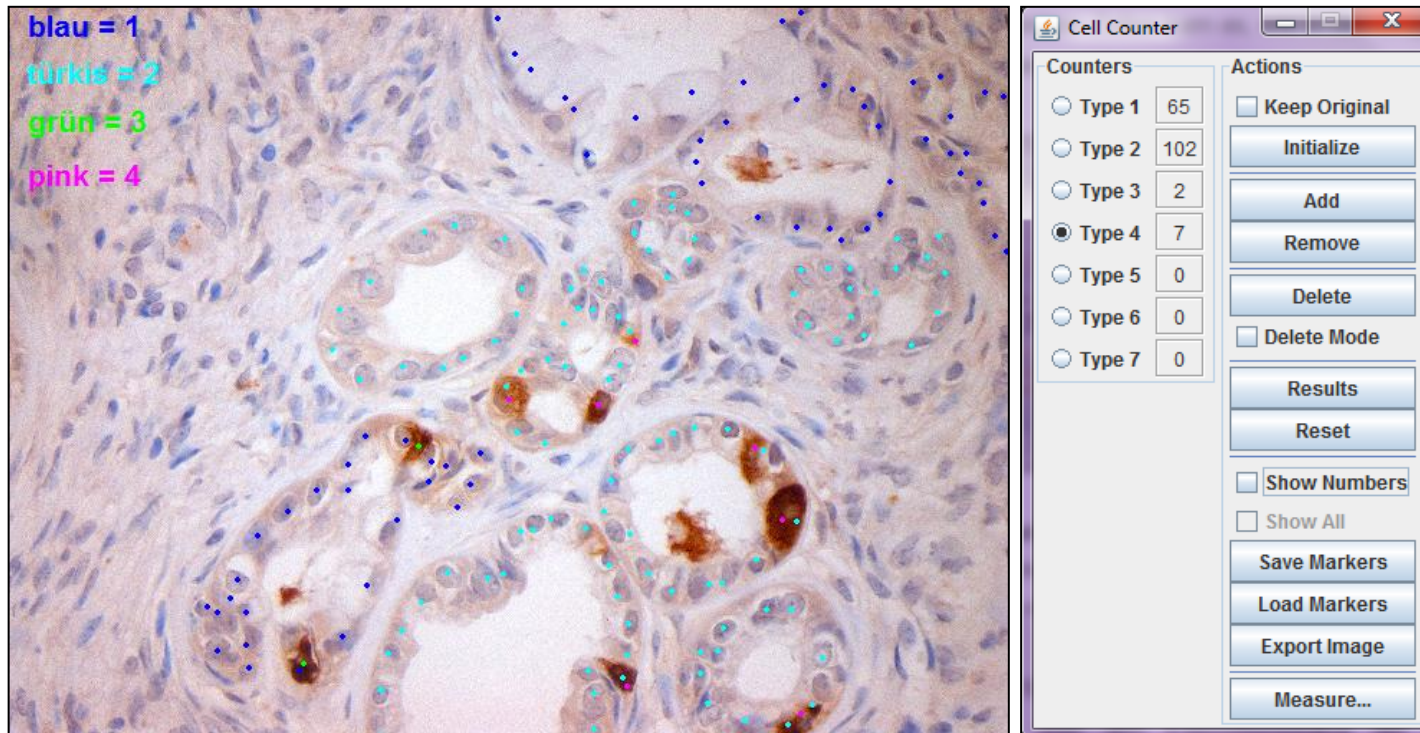
Tabelle 3.1: Aufbau des Mausmodells nach genetischem Hintergrund und Expositionstatus	33
Tabelle 3.2: Histologisch ausgewertete Tiere nach ihrem genetischen Hintergrund, Expositionstatus und Dauer der Exposition	33
Tabelle 4.1: Letalität im Mausmodell	41
Tabelle 4.2: Prozentualer Anteil der pathologischen Veränderungen am Gesamtpankreas der 3- und 6-Monats-K/C-Tiere	46
Tabelle 4.3: PanIN-1-Belastung in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren.....	47
Tabelle 4.4: Anzahl der PanIN-1a im Gesamtpankreas der 6-Monats-K/C-Tiere.....	48
Tabelle 4.5: Anzahl der PanIN-1b im Gesamtpankeas der 6-Monats-K/C-Tiere.....	48
Tabelle 4.6: PanIN-2-Belastung in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren.....	50
Tabelle 4.7: ADM-Belastung in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren.....	51
Tabelle 4.8: Ausprägung der Fibrose in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren.....	52
Tabelle 4.9: Ausprägung der Entzündung in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren.....	53
Tabelle 4.10: Ausprägung der Duktectasie in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren.....	54
Tabelle 4.11: Anteil p-ATM-positiven Zellen der PanINs, ADMs und beiden Neoplasiearten (insgesamt) in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren.....	57
Tabelle 4.12: Ki-67-positive Zellen pro Bild der 3- und 6-Monats-WT-Tiere	59
Tabelle 4.13: Anteil der Ki-67-positiven Zellen der PanINs, ADMs und beiden Neoplasiearten (insgesamt) in den 3- und 6-Monats-K/C-Tieren.....	61
Tabelle 4.14: Anzahl der Mikrogefäße pro Bild der 3- und 6-Monats-WT-Tiere	63
Tabelle 4.15: Anzahl der Mikrogefäße pro Bild der 3- und 6-Monats-K/C-Tiere.....	64

9.2 Abkürzungen und Einheiten

5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
5-FU	5-Fluoruracil
α 7-nAChR	α -7-nicht-neuronaler-nikotinerger-Acetylcholin-Rezeptor
ADM	azino-duktale Metaplasie
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	AMT- and Rad3-related
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft
BSA	Bovines Serum Albumin
BRCA	Breast Cancer
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD31	Cluster of Differentiation 31
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
AB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
DSB	Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence Reagenz
EDTA	Ethylen-Diamin Tetraacetat
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
FCS	fetales calf serum
γ -H2AX	Phospho-Histon H2A.X
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPDE	Human Pancreatic Duct Epithelial
HRP	Horse Radish Peroxidase
K/C	P48 ^{+Cre} ; LSL-KRAS ^{G12D}
kDa	Kilo-Dalton

K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KSFM	Keratinocyte-SFM is a serum-free medium
LSL	Lox-STOP-Lox
p16	Protein 16
p48	Protein 48
p53	Protein 53
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
p-ATM	Phosphorylated Ataxia Telangiectasia Mutated
p-ATR	Phosphorylated Ataxia-Telangiectasia- and Rad3-related
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	Rounds per Minute
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethyendiamin
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS-Tween
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	total suspended particles
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp-K-ras

9.3 Auswertung mit ImageJ



Beispielhafte Auswertung mit ImageJ: Es handelt sich um eine von 10 Aufnahmen einer p-ATM-Färbung eines Pankreas in 40-facher Vergrößerung. Im linken Bild ist das sogenannte Zähl-Fenster. Es wird zunächst ein Zelltyp im rechten „Cell-Counter“ ausgewählt. Typ 1 = blau = PanIN-Zelle. Typ 2 = türkis = ADM-Zelle. Typ 3 = grün = positive PanIN-Zelle. Typ 4 = pinkt = positive ADM-Zelle. Per Mausklick werden alle Zellen des jeweiligen Typs im linken Bild ausgewählt und automatisch im rechten Fenster zusammengezählt.

9.4 Statistische Analysen

Histologische Untersuchung

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf den prozentualen **Anteil des veränderten Gewebes** der K/C-Tiere

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-16,973	22,369		-,759	,456
	Raucherstatus	9,409	9,589	,166	,981	,337
	Dauer	35,158	9,651	,615	3,643	,001

a. Dependent Variable: Anteil path. Gewebe

Mann-Whitney-U-Test der **computergestützten PanIN-1a und PanIN-1b-Auszählung** der 6-Monats-K/C-Tiere durch die AG Heeschen

PanIN-1a

1	Table Analyzed	PanIN 1a
2		
3	Column B	Smoking 6 months
4	vs.	vs.
5	Column A	Control
6		
7	Mann Whitney test	
8	P value	0.0110
9	Exact or approximate P value?	Exact
10	P value summary	*
11	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
12	One- or two-tailed P value?	One-tailed
13	Sum of ranks in column A,B	42.50 , 62.50
14	Mann-Whitney U	6.500
15		
16	Difference between medians	
17	Median of column A	18.50, n=8
18	Median of column B	60.50, n=6
19	Difference: Actual	42.00
20	Difference: Hodges-Lehmann	39.50

PanIN-1b

1	Table Analyzed	PanIN 1b
2		
3	Column B	Smoking 6 months
4	vs.	vs.
5	Column A	Control
6		
7	Mann Whitney test	
8	P value	0.2744
9	Exact or approximate P value?	Exact
10	P value summary	ns
11	Significantly different? (P < 0.05)	No
12	One- or two-tailed P value?	One-tailed
13	Sum of ranks in column A,B	55 , 50
14	Mann-Whitney U	19
15		
16	Difference between medians	
17	Median of column A	8.000, n=8
18	Median of column B	11.00, n=6
19	Difference: Actual	3.000
20	Difference: Hodges-Lehmann	3.000

Mann-Whitney-U-Test der **histologischen Untersuchung** der 3- und 6-Monats-K/C-Tiere

3 Monate

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von PanIn 1 ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,429 ¹	Nullhypothese beibehalten
2	Die Verteilung von PanIn 2 ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,662 ¹	Nullhypothese beibehalten
3	Die Verteilung von ADM ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,662 ¹	Nullhypothese beibehalten
4	Die Verteilung von Entzündung ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,247 ¹	Nullhypothese beibehalten
5	Die Verteilung von Fibrose ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,662 ¹	Nullhypothese beibehalten
6	Die Verteilung von Dukt-Ektasie ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,537 ¹	Nullhypothese beibehalten

Asymptotische Signifikanz werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

¹Für diesen Test wird die exakte Signifikanz angezeigt.

6 Monate

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von PanIn 1 ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,755 ¹	Nullhypothese beibehalten
2	Die Verteilung von PanIn 2 ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,755 ¹	Nullhypothese beibehalten
3	Die Verteilung von ADM ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,852 ¹	Nullhypothese beibehalten
4	Die Verteilung von Entzündung ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,950 ¹	Nullhypothese beibehalten
5	Die Verteilung von Fibrose ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,950 ¹	Nullhypothese beibehalten
6	Die Verteilung von Dukt-Ektasie ist über die Kategorien von Raucherstatus identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,573 ¹	Nullhypothese beibehalten

Asymptotische Signifikanz werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

¹Für diesen Test wird die exakte Signifikanz angezeigt.

DNA-Schaden

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf den **DNA Schaden in den Neoplasien insgesamt** der K/C-Tiere

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	1,162	1,389		,837	,412
	Raucherstatus	-,191	,605	-,063	-,317	,755
	Dauer	1,273	,607	,416	2,098	,048

a. Abhängige Variable: p-ATM pos. Zellen gesamt

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf den **DNA Schaden in den ADM-Läsionen** der K/C-Tiere

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	,144	1,839		,078	,939
	Raucher	,242	,800	,060	,303	,765
	Dauer	1,710	,803	,423	2,129	,045

a. Abhängige Variable: p-ATM pos. Zellen in ADM

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf den **DNA Schaden in den PanIN-Läsionen** der K/C-Tiere

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	1,146	1,052		1,090	,288
	Raucher	-,013	,458	-,006	-,028	,978
	Dauer	,909	,459	,398	1,979	,061

a. Abhängige Variable: p-ATM pos. Zellen in PanIn

Proliferation

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf die **proliferierenden Zellen pro Bild** der WT-Tiere

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	20,823	32,452		,642	,532
	Raucher	23,198	15,393	,377	1,507	,156
	Dauer	-12,552	15,393	-,204	-,815	,430

a. Abhängige Variable: Ki67 pos gesamt

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf die **Proliferation insgesamt** der K/C-Tiere

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	20,547	6,586		3,120	,005
	Raucherstatus	-3,928	2,866	-,287	-1,370	,185
	Dauer	-,907	2,876	-,066	-,315	,756

a. Abhängige Variable: Proliferation gesamt

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf die **Proliferation der PanIN-Läsionen** der K/C-Tiere

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	12,466	5,547		2,247	,036
	Raucher	-3,000	2,414	-,254	-1,243	,228
	Dauer	2,841	2,423	,239	1,172	,254

a. Abhängige Variable: Proliferation in PanIn

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf die **Proliferation der ADM-Läsionen** der K/C-Tiere

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	26,054	10,062		2,589	,017
	Raucher	-2,212	4,379	-,107	-,505	,619
	Dauer	-5,069	4,394	-,244	-1,154	,262

a. Abhängige Variable: Proliferation in ADM

Angiogenese

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf die **Angiogenese** in den WT-Tieren

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	41,610	14,017		2,969	,010
	Raucher	5,013	6,651	,185	,754	,463
	Dauer	-7,028	6,779	-,254	-1,037	,316

a. Abhängige Variable: CD31

Multilineare Regressionsanalyse des Einfluss von Dauer (= Alter) und Raucherstatus auf die **Angiogenese** in den K/C-Tieren

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
1	(Konstante)	54,018	9,829		5,496	,000
	Raucher	-5,022	4,284	-,248	-1,172	,254
	Dauer	-,768	4,330	-,038	-,177	,861

a. Abhängige Variable: CD31

9.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg: Barth, Bartsch, Baum, Becker, Bien, Bohlander, Burchert, Cetin, Czubayko, Del Rey, Daut, Dinges, Dodel, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Görg, Greulich, Gress, Grzeschik, Grundmann, Hertl, Heverhagen, Hofmann, Höffken, Hoyer, Hundt, Kann, Kill, Kircher, Klose, Koehler, Kolb-Niemann, König, Koolmann, Kühnert, Kühne, Krüger, Kruse, Lill, Lohoff, Maier, Maier, Maisch, Michl, Meissner, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Langohr, Leonhardt, Neubauer, Nikolaizik, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Printz, Ramaswamy, Renz, Riera-Knorrenschild, Richter, Röhm, Rominger, Rosenow, Rucholtz, Sahmland, Schäfer, Schäfer, Seitz, Sekundo, Sevinc, Steiniger, Steinkamp, Stiletto, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Werner, Weihe, Wulf, Zemlin

In Gießen: Dettmeyer, Eikmann, Schneider

In Hamm: Löb

In Salzburg: Dietmar, Waclawiczek

In Kassel: Tegtmeyer

In London: Preston

9.6 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Thomas Gress für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in der Klinik für Gastroenterologie anfertigen zu können.

Im Besonderen gilt mein aufrichtiger Dank Prof. Dr. Patrick Michl für die Bereitstellung des Themas, die fachliche und persönliche Unterstützung und seinen Optimismus.

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung unserer Kooperationspartner der AG Bals in Homburg und AG Heeschen in Madrin möglich gewesen. Auch Herrn Prof. Dr. Sipos aus Tübingen gilt mein Dank für seine Expertise und den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie in Marburg für ihre fachlichen Hilfestellungen und anregenden Ideen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der AG Michl insbesondere Dr. Benjamin Kühnemuth, Andre Busch, Eleni Aprin, Dr. Nada Milosevic, Leonie Mühlberg, Dr. Heidi Griesmann und Dr. Sebastian Krug für ihre Unterstützung, Geduld, aufbauenden Worte und ein angenehmes Arbeitsklima.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeitern der AG Elenrieder und AG Buchholz für das unterstützende, kollegiale Miteinander.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Brüdern und meinem Freund für ihre stets uneingeschränkte Unterstützung, ihren zugesprochenen Mut, ihr immer offenes Ohr und ihr Vertrauen in mich und meinen Lebensweg bedanken.

Darüber hinaus danke ich meinen guten Freunden, die jeden Tag in der Bibliothek schöner gemacht haben.

