Abteilung Innere Medizin I der Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Guido Adler

Die Entwicklung der Pankreasfibrose im TGFβ1-transgenen Tiermodell

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Doris Anne Ruf

Ochsenhausen

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Andre Menke

2. Berichterstatter: PD Dr. Rainer Voisard

Tag der Promotion: 20.07.2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 3

1. Einleitung 4

Transformierender Wachstumsfaktor β 4
Pankreatitis 5
Modelle zur Untersuchung von Pankreatitis 7
Extrazellulärer Matrix 8
Fragestellung 10

2. Material und Methoden 11

Tiere 11
Histologie 11
Zellkultur 14
Western Blot 15
Northern Blot 18
Southern Blot 22
PCR 24
Statistik 27

3. Ergebnisse 28

DNA-Untersuchungen 28
Zeitlicher Verlauf der ECM-Ablagerung 29

Western und Northern Blots 39
Wachstumsfaktoren 44
Pankreatische Sternzellen 45

4. Diskussion 50

5. Zusammenfassung 61

6. Literaturverzeichnis 63

7. Veröffentlichungen 74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Zerfälle pro Minute
CMF	calcium- und magnesiumfrei
CTGF	*connective tissue growth factor*
DTT	Dithiothreitol
DMEM	*Dulbecco´s Modification of Eagle´s Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
FGF1	*fibroblast growth factor 1*
FGF2	*fibroblast growth factor 2*
FCS	fetales Kälberserum
HE	Hämatoxylin-Eosin
hGH	*human growth hormone*
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSC	*hepatic stellate cells* / hepatische Sternzellen
IGF	*insulin-like growth factor*
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF A	*platelet-derived growth factor A*
PDGF B	*platelet-derived growth factor B*
PSC	*pancreatic stellate cell* / pankreatische Sternzelle
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse Transkriptionspolymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFα	*transforming growth factor alpha*
TGFβ	*transforming growth factor beta*
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

Transformierender Wachstumsfaktor β

Definition und Eigenschaften

1978 wurden von de Larco und Todaro erstmals mittels Säulenchromatographie Polypeptide, die nichttransformierte Mäuse- und Rattenfibroblasten im Weich-Agar zur Kolonienbildung anregten, isoliert.

Die Peptide besaßen ein Molekulargewicht von 7, 12 und 25 Kilodalton, waren hitze- und säurestabil und konnten an den Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) binden. Sie reagierten aber nicht mit einem gegen EGF gerichteten Antikörper (de Larco und Todaro, 1978). Nach Entdeckung weiterer ähnlicher Wachstumsfaktoren wurden diese unter der Bezeichnung „*transforming growth factors*" (TGF) zusammengefasst. Darunter verstand man eine heterogene Gruppe von Polypeptiden, die kompetent sind, nichttransformierte Zellen phänotypisch zu verändern (Roberts et al, 1983).

Durch weitere Aufreinigung mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie konnten zwei verschiedene Polypeptide isoliert werden: transformierender Wachstumsfaktor α und transformierender Wachstumsfaktor β, der sowohl hinsichtlich der Proteinzusammensetzung als auch der biologischen Wirkung ein neues Protein darstellt (Anzano et al, 1983).

Die biologisch aktive Form des TGFβ ist ein homodimeres Molekül mit einem Molekulargewicht von 25 000 Dalton. Es besteht aus zwei identischen Ketten zu je 112 Aminosäuren, die über neun Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Nach Spaltung der Disulfidbrücken ist das Molekül biologisch inaktiv (Roberts et al, 1983).

Wirkungen

Mitglieder aus der Familie des transformierenden Wachstumsfaktors β (TGFβ) wirken auf bestimmte Zellen, stimulieren oder hemmen die Teilung bzw. verstärken in einer bestimmten Konzentration und behindern in einer anderen die Proliferation. Tatsächlich haben die meisten Wachstumsfaktoren neben der Regulierung von Zellwachstum und Teilung eine Vielzahl weiterer Aufgaben: sie kontrollieren, in Abhängigkeit von den Begleitumständen, Vermehrung, Überleben, Differenzierung, Bewegung oder Funktion von Zellen (Alberts, 1995).

Die Wirkungen von TGFβ sind also extrem vielfältig und noch heute Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten.
Die Entwicklung einer Organfibrosierung aufgrund einer chronischen Pankreatitis scheint durch TGFβ mitreguliert zu sein. Hierbei könnte eine Stimulation von Fibroblasten und die Induktion weiterer Wachstumsfaktoren bei der Regulation der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen.

Pankreatitis

Die Pankreatitis wird aufgrund klinischer und morphologischer Kriterien in eine akute und eine chronische Pankreatitis unterteilt.

Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis zeichnet sich durch Oberbauchschmerzen und Anstieg der Pankreasenzyme in Serum und Urin aus. Sie beginnt meist akut mit heftigen Abdominalschmerzen die nach allen Seiten ausstrahlen können.
Ursächlich stehen Gallenwegserkrankungen (akute biliäre Pankreatitis) an erster Stelle, gefolgt von toxischen Schäden durch Alkohol.
Morphologisch finden sich Ödeme, hämorrhagische Nekrosen und Fettgewebsnekrosen. In der Regel sind diese Veränderungen reversibel (Herold, 2005).

Chronische Pankreatitis

Leitsymptom der chronischen Pankreatitis ist der rezidivierende Schmerz, der nicht kolikartig ist und Stunden bis Tage andauern kann. Häufig finden sich auch Beschwerden nach dem Essen. Wenn die exokrine Pankreasfunktion auf 10% der Norm vermindert ist, finden sich außerdem Zeichen der Maldigestion: Gewichtsabnahme, Diarrhoe, Meteorismus, Fettstühle mit Fehlen fettlöslicher Vitamine im Blut. Ist der endokrine Pankreasanteil mitbetroffen tritt außerdem eine diabetische Stoffwechsellage auf.
Überwiegend sind Männer betroffen, wobei der Beginn der Symptome zwischen dem 30. Und 40. Lebensjahr liegt. Dies ist auf den Alkoholismus als wichtigste Ursache der chronischen Pankreatitis zurückzuführen. Pathogenetisch wirken exogene

Ursachen sowie eine genetische Disposition zusammen (Goebell 1994, Klöppel und Heitz, 1997).

In tropischen Ländern können bereits bei Jugendlichen chronische primäre Pankreatitiden beobachtet werden. Als Ursachen werden Ernährungsfaktoren, wie Eiweißmangel und der Genuss der Betelnuss (Cassava) diskutiert (Klöppel und Heitz, 1997).

Histologisch finden sich bei chronischer Erkrankung entzündliche Läsionen mit Destruktion des exokrinen und endokrinen Pankreasgewebes und fortschreitende fibrotische Umbaureaktionen. Dabei zeigt sich im Frühstadium eine perilobuläre, oft sehr zellreiche und lymphozytär durchsetzte Fibrose in einem Teil des Pankreas, während benachbarte Areale noch völlig unverändert sein können. Im weiteren Verlauf dehnt sich die perilobuläre Fibrose aus, wobei in den Lobuli die azinären Zellen mehr und mehr durch Bindegewebe ersetzt werden (intralobuläre Fibrose). Schließlich bleiben in diesen Fibrosefeldern nur noch unregelmäßig gestaltete Gänge mit teilweise hyperplastischem Epithel, Gruppen von unregelmäßig großen Inseln und Lymphozytenaggregate übrig (Klöppel und Heitz, 1997).

Für die Pathogenese der chronischen primären Pankreatitis gibt es zwei Hypothesen. Die eine postuliert, dass aufgrund langjährigen Alkoholkonsums die Proteinkonzentration im Pankreassekret erhöht ist. Dadurch kommt es zu Proteinpräzipitaten in den Gängen. Diese können verkalken und verlegen dann die kleinen Gänge. Die Folgen sind neben Obstruktionen auch Gangulzerationen mit Fibrosen.

Die andere Hypothese geht von rezidivierenden schweren akuten Pankreatitiden aus, aus denen sich eine chronische Pankreatitis entwickelt. Durch entzündliche und vernarbende Umbauvorgänge wird der Abfluss des Pankreassekrets behindert und eine Präzipitation des kalziumreichen Sekrets mit Gangobstruktionen und damit Atrophie und Fibrose ermöglicht. Damit ließen sich auch die anfangs nur fokal-segmentalen betroffenen Regionen erklären. Ein Fortschreiten der Fibrose hängt von weiteren Sekretabflussbehinderungen, insbesondere im Rahmen von Umbauvorgängen nach Pankreatitisrezidiven ab (Klöppel und Heitz, 1997).

Die Rolle von Wachstumsfaktoren bei der Entwicklung einer Pankreasfibrose bei chronischer Pankreatitis ist noch unklar. Um diese zu erforschen wurde versucht, verschiedene Modelle zu entwickeln, um eine Pankreatitis zu induzieren und deren Verlauf zu erforschen und zu beeinflussen. Aufgrund der Schwierigkeit, dynamische

pathophysiologische Mechanismen am humanen Pankreas zu studieren, wurden Tiermodelle der Pankreatitis entwickelt, um die zellulären und molekularen Mechanismen der Pankreatitis zu untersuchen.

Modelle zur Untersuchung von Pankreatitis

Caerulein-induzierte Pankreatitis

Caerulein ist ein Cholecystokinin-Analog, welches zur Hyperstimulation der Sekretion von Pankreasenzymen führt und dadurch Pankreatitiden induzieren kann. Die Regeneration nach akuter caerulein-induzierter Pankreatitis ist durch Proliferation der azinären und zentroazinären Zellen, einem Anstieg der mitotischen Aktivität der Fibroblasten und einer Stimulation von Transkription, Synthese und Ablagerung von Komponenten der ECM, speziell von Kollagen I, Kollagen III und Fibronektin, gekennzeichnet. Bei Induktion einer einmaliger Entzündung konnte nach etwa zwei Wochen eine komplette Regeneration mit Abbau der zwischenzeitlich gebildeten ECM gezeigt werden, auch bei wiederholten Pankreatitiden entwickelte sich kein fibrotischer Umbau des Organs (Elsässer et al, 1992).

TGFβ1 scheint den Aufbau der ECM mit zu regulieren. So konnte in der Entzündungsphase (mit Ablagerung von Komponenten der ECM) bei caerulein-induzierter Pankreatitis ein Anstieg von TGFβ1 gemessen werden (Gress et al, 1994). Durch Neutralisation von TGF-β1 durch entsprechende Antikörper war die Ausdehnung insbesondere von Kollagen I und Kollagen III im entzündeten Pankreas deutlich reduziert (Menke et al, 1997; Müller-Pillasch et al, 1999), während durch Applikation von TGFβ1 bei wiederholten caerulein-induzierten Pankreatitiden die Entwicklung einer Pankreasfibrose begünstigt werden konnte (van Laethem, 1996). Möglicherweise könnte also TGFβ1 bei der Pathogenese der chronischen Pankreatitis ein bedeutender Faktor sein.

Transgene Mäuse mit dominant-negativer Mutation des TGFβ Typ II – Rezeptors

Bei diesem transgenen Mausmodell wurde TGFβ durch eine Mutation des Rezeptors funktionell inaktiviert. Histologisch zeigte sich in diesem Modell eine Pankreasfibrose mit vermehrter Kollagenausdehnung, daneben duktale Transformationen der Azini, Neoangiogenese und teilweisem Ersatz des exokrinen Pankreasanteils durch Fettgewebe. Parallel dazu konnte ein Anstieg der mRNA von Kollagen I, Fibronektion

und TIMP-1 *(tissue inhibitor of metallo proteinase 1)* gemessen werden, weiterhin eine signifikant erhöhte RNA-Expression von TGFβ (Böttinger et al, 1997).
Nach Induktion wiederholter akuter Pankreatitiden durch intraperitoneale Injektion von Caerulein war die Entwicklung einer Fibrose bei transgenen Mäusen mit dominant-negativer Mutation des TGFβ Typ II – Rezeptors im Vergleich zu Wildtypen deutlich vermindert (Yoo et al, 2005).

TGFα-transgenes Tiermodell

Die Überexpression von TGFα im Pankreas bewirkt einen Anstieg des Bindegewebes, insbesondere von Kollagen I, im Organ. Daneben werden vermehrt tubuläre Komplexe entwickelt, möglicherweise handelt es sich hierbei teilweise um Transformationen von azinären in tubuläre Zellen. (Bockman und Merlino, 1992).

TGFβ1-transgene Tiermodelle

Um den Einfluss von TGFβ in vivo zu erforschen, wurden transgene Mausmodelle, die TGFβ1 im Pankreas überexprimieren, entwickelt.
Lee et al zeigten in TGFβ-transgenen Mäusen eine Proliferation von Fibroblasten und eine abnormale Ablagerung der ECM, die schließlich fast den ganzen exokrinen Pankreas ersetzte. Hierbei wurden vermehrt Ablagerungen von Laminin und Fibronektin in den fibrotischen Arealen beschrieben (Lee et al, 1995).
Auch Sanvito et al beschrieben einen fibrotischen Umbau des Pankreas in einem TGFβ-transgenen Mausmodell. Die fibrotischen Umbauzonen waren durch starke Deposition von Kollagen und Elastin charakterisiert, weiterhin konnten in diesen Zonen viele fibroblasten-ähnliche Zellen beobachtet werden (Sanvito et al, 1995).

Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix besteht überwiegend aus fibrillären Proteinen, die von Glykosaminoglykanen umgeben werden. Neben Elastin, Fibrillin und Fibronektin stellen die Kollagene den größten Anteil extrazellulärer Matrixkomponenten dar. Als fibrilläres Kollagen (z. B. Kollagen Typ I) widersteht es Zugkräften, retikuläre Fasern (z. B. Kollagen Typ III) nehmen Stützfunktionen wahr, zusätzlich sind Kollagene (z. B. Kollagen Typ IV) für die Bildung von Basalmembranen wichtig. Basalmembranen trennen die extrazelluläre Matrix von parenchymatösen Geweben. Sie dienen zur

Zelladhäsion, als Diffusionsbarriere, sowie zur Regulierung des Zellwachstums (Stevens und Lowe, 1997).

Hepatische Sternzellen *(hepatic stellate cells)*

Die Ansammlung extrazellulärer Matrix wird neben der chronischen Pankreatitis auch bei der Leberzirrhose beobachtet.

Bereits vor über 120 Jahren wurden vom Anatomen von Kupffer sternförmige Zellen in der Leber entdeckt, denen eine phagozytotische Aktivität zugeschrieben wurde und welche aufgrund dessen als Makrophagen interpretiert wurden.

Diese Zellen verändern sich morphologisch nach Aktivierung, sie werden lang und spindelförmig, entwickeln ein prominentes endoplasmatisches Retikulum, können mit Antikörpern gegen α-Glattmuskelaktin angefärbt werden und speichern dann kein Vitamin A mehr. Sie können Komponenten der extrazellulären Matrix (insbesondere Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV, Proteoglykane und Glykoproteine) produzieren. Der Mechanismus der (pathologischen) Aktivierung ist bislang nicht hinreichend geklärt, jedoch scheint hierbei der Wachstumsfaktor TGFβ1 eine bedeutende Rolle zu spielen.

Die Identifikation dieser sogenannten hepatischen Sternzellen *(hepatic stellate cells)* als Quelle extrazellulärer Matrix verschaffte zunehmende Klarheit im Verständnis der Entwicklung chronisch fibrotischer Erkrankungen. Neben diesen hepatischen Sternzellen existieren Sternzellen auch in der Lunge, in der Niere, im Intestinum sowie im Pankreas (Ramadori, 1991, Senoo 2004, Wells 2005).

Pankreatische Sternzellen *(pancreatic stellate cells)*

Auch im Pankreas wurden Vitamin-A-speichernde Zellen entdeckt (Ikejiri 1990), deren physiologischen und pathophysiologischen Funktionen jedoch lange unerkannt blieben. Saotome et al. konnten 1996 periazinäre fibroblastenähnliche Zellen aus humanem Pankreasgewebe isolieren. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Zellen α-Glattmuskelaktin exprimieren, weiterhin Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Prokollagen und Fibronektin synthetisieren und Mikrofilamente im Zytoplasma aufweisen. Die Kollagensynthese der periazinären fibroblastenähnlichen Zellen konnte durch Stimulation mit TGF-β noch deutlich gesteigert werden.

Auch Bachem et al. konnten Zellen isolieren, die sich mit Antikörpern gegen α-Glattmuskelaktin, Kollagen und Fibronektin anfärben ließen, elektronenmikro-

skopisch waren zunächst Fetttröpfchen nachweisbar die später einem prominenten rauhen endoplasmatischem Retikulum gewichen waren. Diese Zellen ließen sich aus humanem chronisch-fibrotischem Pankreasgewebe, aus fibrotischem Pankreasgewebe von TGFα-transgenen Mäusen beziehungsweise akuter caerulininduzierter Pankreatitis bei Ratten, jedoch nicht aus gesundem Pankreasgewebe, isolieren. In Anlehnung an die morphologisch und mutmaßlich pathophysiologisch ähnlichen Zellen in der Leber, den hepatischen Sternzellen, wurden diese Zellen im Pankreas pankreatische Sternzellen *(pancreatic stellate cells)* genannt (Bachem et al, 1998).

Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung der Fibrose bei der chronischen Pankreatitis im TGFβ1-transgenen Tiermodell näher aufgezeigt. Dabei soll insbesondere der Zeitverlauf der Ablagerung der extrazellulären Matrix und derer Zusammensetzung analysiert werden.

Weiter wird untersucht, ob möglicherweise andere Wachstumsfaktoren an der Entstehung der Pankreasfibrose mitbeteiligt sind.

Schließlich sollen pankreatische Sternzellen als Quelle extrazellulärer Matrix identifiziert, isoliert und kultiviert werden.

2. Material und Methoden

Tiere

Für die Untersuchungen wurden TGFβ1-transgene Mäuse, die TGFβ1 unter einem Insulin-Promoter von Ratten exprimieren und nicht-transgene Tiere des Stammes C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld) gekreuzt. Um zufällige unerwünschte Effekte bei homozygoten Allelen auszuschließen, wurden nur heterozygote TGFβ1-transgene Tiere verwendet. Untersucht wurden die Altersstufen 1 Tag, 14 Tage, 30 Tage, 70 Tage und 330 Tage nach der Geburt. Die transgenen Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Orci, Universität Genf, zur Verfügung gestellt (Sanvito et al. 1995).

Haltung

Die Mäuse wurden in der zentralen Tierversuchsanlage der Universität Ulm bei 24°C im zwölfstündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Die Tiere erhielten Standarddiät und Wasser nach Belieben.

Präparation

Die Mäuse wurden mit Hilfe von CO_2-Gas betäubt und durch anschließende Zervikaldislokation getötet. Das Pankreas wurde entnommen und je nach Weiterverarbeitung in einer 4%-igen Formalinlösung fixiert, in flüssigem Stickstoff gefroren oder in Nährmedium zur Kultivierung weiter bearbeitet.

Histologie

Die in 4%igem Formalin über Nacht fixierten Gewebe wurden in Paraffin eingebettet. Danach konnten mit dem Mikrotom Schnitte in unterschiedlichen Dicken (3, 5 und 40 µm) angefertigt werden.

HE-Färbungen

Vor der Anfärbung wurden die Schnitte entparaffinisiert (je 2x 5 min in Rotihistol (Roth, Karlsruhe), 96%igem Ethanol, 80%igem Ethanol, 70%igem Ethanol) und anschließend mit CMF-PBS (calcium- und magnesiumfreie phosphatgepufferte Salzlösung, NaCl 8,0 g/l, KCl 0,2 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, NaH_2PO_4 1,4 g/l) gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (0,1% Hämatoxylin in Wasser) gefärbt und unter fließendem Wasser gebläut. Anschließend erfolgte die Färbung mit Eosin (1% Eosin in 1%iger Essigsäure) und die Differenzierung 30 secunter fließendem Wasser.

Danach wurden die Präparate durch eine aufsteigende Reihe verschiedener Alkoholkonzentrationen (je 2x 1 min in 70%igem Ethanol, 80%igem Ethanol, 96%igem Ethanol, Rotihistol) dehydriert und in Rotikitt (Roth) eingebettet.

Immunfluoreszenzen

Vor der Anfärbung wurden die Schnitte durch eine absteigende Reihe verschiedener Alkoholkonzentrationen entparaffinisiert und anschließend zur Demaskierung von Antigendomänen in 10 mM Citratpuffer pH 6 in der Mikrowelle bei 600 Watt 15 min gekocht. Zum Abblocken unspezifisch antikörperbindender Oberflächenbereiche wurden die Präparate 30 min in 3%iger BSA-Lösung ((Serva, Heidelberg), BSA in CMF-PBS) inkubiert.

Die Inkubation mit den ersten Antikörpern erfolgte über 2 h bei Raumtemperatur. Die Antikörper wurden mit 0,2% BSA-CMF-PBS-Lösung wie folgt verdünnt:

Anti-Kollagen I	1:200	polyklonal	Chemicon (Temecula, USA)
Anti-Kollagen III	1:250	polyklonal	Rockland (Gilbertsville, USA)
Anti-Kollagen IV	1: 50	polyklonal	Rockland (Gilbertsville, USA)
Anti-E-Cadherin	1:300	monoklonal	BD Biosciences, San Jose, USA)
Anti-β-Catenin	1:500	monoklonal	BD Biosciences, San Jose, USA)
Anti-Laminin	1: 50	polyklonal	Biomol (Hamburg)
Anti-Fibronektin	1:200	polyklonal	Biomol (Hamburg)
Anti-Glattmuskelaktin	1:100	monoklonal	Sigma (München)
Anti-Glattmuskelaktin	1: 10	monoklonal	Roche Diagnostics (Mannheim)

Danach wurden die Präparate 5 min mit Tween-CMF-PBS (CMF-PBS mit Zusatz von 2% Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat, Sigma, München)) und 2 x je 5 min mit CMF-PBS gewaschen und dann 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln mit den zweiten Antikörpern inkubiert:

Anti-Kaninchen Cy 3 1:1000 (Biomol) für alle polyklonalen Erstantikörper
Anti-Maus Cy 3 1:1000 (Biomol) für alle monoklonalen Erstantikörper.

Wiederum erfolgte ein Waschgang: 5 min mit 2%igem Tween-CMF-PBS und 2x je 5 min mit CMF-PBS, dann wurden die Präparate in Elvanol (25% Mowiol (Hoechst, Frankfurt) in CMF-PBS, pH 7,3) eingebettet.

Colorimetrische Kollagenbestimmung

Die Kollagenbestimmung erfolgte durch Anfärbung von Kollagen durch SiriusRed (Sigma, Deisenhofen) und von Nichtkollagenproteinen durch FastGreen (Merck, Darmstadt) nach der Methode von López-de León und Rojkind (López-de León und Rojkind, 1985).

Dazu wurden die Schnitte zunächst durch eine absteigende Reihe verschiedener Ethanolkonzentrationen entparaffinisiert und anschließend mit CMF-PBS gewaschen.

Die Färbung erfolgte direkt auf den Objektträgern mit Färbelösung (in Wasser gesättigte Pikrinsäure (entspricht ca. 1,2% – 1,3%) mit 0,1% FastGreen und 0,1% SiriusRed) für 30 min schüttelnd im Dunkeln. Dann wurde die Färbelösung abgesaugt und die Schnitte mit Wasser gewaschen bis sich keine Farbe mehr löste.

Danach wurde die verbliebene Farbe von den Präparaten mit Methanol-Natriumlauge (100% Methanol und 0,1 N NaOH im Verhältnis 1:1) ausgewaschen und die Absorption der in der Waschlösung enthaltenen Farbstoffe bei 605 nm (FastGreen) und 540 nm (SiriusRed) bestimmt.

Aus dem Verhältnis der Absorptionen kann die Kollagenmenge bestimmt werden.

Zur Berechnung muss eine leichte Absorption von FastGreen bei 540 nm berücksichtigt werden:

29,1% der Absorption bei 605 nm wird von der Absorption bei 540 nm abgezogen:

$$o.D._{540} - o.D._{605} * 0{,}291 = \text{korr. } o.D._{540}$$

Berechnung:

Angabe in mg Kollagen/mg Gesamtprotein/jeweiliges Farbäquivalent

Kollagengehalt in mg/Schnitt: $o.D._{540}/37,4$

Nichtkollagenproteingehalt in mg/Schnitt: $o.D._{605}/2,08$

Gesamtprotein in mg/Schnitt: Kollagengehalt + Nichtkollagengehalt

Zellkultur

Isolierung der pankreatischen Sternzellen

Nach Tötung der Mäuse wurde das Pankreas rasch entnommen und in 60 mm Zellkulturschalen mit 3 ml Nährlösung gelegt (Dulbecco´s Modifiziertem Eagle Medium mit 20%-igem fötalem Rinderserum (FCS) (beides Gibco, Eggenstein), als Antimykotikum 1‰ Diflucan (Pfizer, Karlsruhe), als Antibiotikum 0,2‰ Certomycin (Essex Pharma, München)) gefüllte 60 mm Zellkulturschale (Greiner, Frickhausen). Darin wurde das Gewebe mit einer feinen Schere in kleine Stücke zerschnitten und in einer Atmosphäre von 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Schon 12 Stunden später konnte man die aus dem Pankreasgewebe aussprossenden Zellen gut erkennen. Das Nährmedium wurde täglich gewechelt. Nach fünf Tagen hatte sich ein gleichmäßiger Zellrasen gebildet.

Zum Lösen der Zellen von den Kulturflaschen wurden die Zellen schrittweise mit CMF-PBS und Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in modifizierter Puck´s Salzlösung (Gibco)) behandelt und im Nährmedium aufgenommen. Nach dem Abzentrifugieren bei 1000 U/min. wurde das Pellet wiederum in Nährlösung aufgenommen.

Diese Zellsuspension wurde in, mit Deckgläsern bestückten, 24-Loch-Platten (Nunc, Wiesbaden) gleichmäßig ausgesät und weiter kultiviert bis wieder ein Zellrasen entstanden war.

Anfärbung der pankreatischen Sternzellen

Nach Fixation mit –20°C kaltem Methanol/Aceton (Mischungsverhältnis 1:1) erfolgte die Blockierung unspezifisch-bindender Bereiche mit BSA-Lösung (3% in CMF-PBS). Danach wurden die Zellen, wie oben zur Immunfluoreszenz

beschrieben, je 5 min 1x mit 2%igem Tween-CMF-PBS und 2x mit CMF-PBS gewaschen. Die Inkubation mit den ersten Antikörpern erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Antikörper wurden mit 0,2% BSA-CMF-PBS-Lösung wie folgt verdünnt:

Anti-Glattmuskelaktin	1:200	monoklonal	Sigma (München)
Anti-Desmin	1:50	monoklonal	Sigma (München)
Phalloidin-Rhodamin	1:100		Sigma (München)

Danach wurden die Zellen wieder gewaschen und die Phalloidin-Rhodamin-Präparate in Elvanol eingebettet. Die anderen Präparate wurden mit dem zweiten Antikörper, Anti-Maus Cy 3 (Biomol), Verdünnung 1:1000 in 0,2% BSA-CMF-PBS-Lösung, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen erfolgte die Einbettung in Elvanol.

Western Blot

Gewebeaufbereitung

Die Pankreata wurden gewogen und je 50 µg Gewebe in 1 ml Extraktionspuffer nach Laemmli aufgenommen (Laemmli, 1970) (62,5mM Tris pH 6,8 (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol) , 2% SDS (Natrium-dodecyl-Sulfat), 10% Glycerol, 5% Mercaptoethanol mit folgenden Proteinaseinhibitoren: 5 µM Aprotinin (Bayer-Leverkusen, Leverkusen), 0,1 mM Leupeptin, 1 mM Pefabloc, 10 µM Pepstatin, 5 mM STI (alle Roche Diagnostics Mannheim)). Die Pankreasproben wurden dann mit der Schere mechanisch zerkleinert, 10 min bei 95°C inkubiert und 15 min mit 12000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Überstände aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit dieser Methode wurden Proteine mit Hilfe des ionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) in einer Gelmatrix ihrer Größe nach aufgetrennt.

Dazu wurden Trenngele mit 10% Acrylamid und zur Quervernetzung mit Bisacrylamid in destilliertem Wasser hergestellt. Als Starter der Reaktion diente Ammoniumpersulfat, als Katalysator TEMED (Tetramethylethylendiamin), als Puffer Tris und als Detergenz 10% SDS. Für die Sammelgele wurde 7,5% Acrylamid eingesetzt.

Die Proben wurden mit 25% Probenpuffer (50 mM Trisma Base, 150 mM Glyzin, 0,1% SDS) gemischt, zur Denaturierung 10 min bei 95°C inkubiert und auf die Gele aufgetragen. Zur Identifizierung der Proteine wurde ein Größenmarker, Sigma prestained (Sigma), eingesetzt.

Die Proteintrennung erfolgte durch Anlegen von Strom an die Gele: zur Fokussierung wurden 80 V Spannung und 400 mA Stromstärke, zur Auftrennung 140 V und 400 mA verwendet.

Zur weiteren Analyse wurden die Proteine dann entweder auf Nitrozellulose überführt (siehe unten) oder mit Coomassieblau-Lösung (0,025% Coomassie Brilliant Blue, 10% Essigsäure, 25% Isopropanol) gefärbt und mit Entfärber (10% Essigsäure, 12,5% Isopropanol) solange entfärbt bis nur noch die Proteinbanden Farbe aufwiesen.

Da das im Laemmlipuffer enthaltene Mercaptoethanol eine sehr hohe Reaktivität mit Färbereagenzien hat, konnte von den „rohen“ Proben keine Proteinbestimmung durchgeführt werden. Für die spätere quantitative Bestimmung bestimmter Proteine ist eine einheitliche Menge der eingesetzten Gesamtproteinmenge (mit je ca. 300 ng Protein je Gelspur) jedoch von Bedeutung, die Angleichung erfolgte visuell anhand der Coomassie-gefärbten Gelen.

Protein-Blot

Die Überführung der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte im Nass-Blot-Verfahren durch Anlegen von Gleichstrom.

Der Blotaufbau erfolgte von der Anode her. Darauf wurden nacheinander ein rauhes Netz, ein Filterpapier, die gewaschene Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel), das Gel, wiederum ein Filterpapier, ein Netz und schließlich die Kathodenplatte aufgeschichtet. Der Transfer erfolgte über 8 Stunden bei 40V

Spannung und 140 mA Stromstärke in einem Puffer (25 mM Trisma Base, 0,1% SDS, 1,5% Glyzin, 20% Methanol).
Um den Erfolg des Übertragungsvorganges abzuschätzen, wurden die Proteine auf der Nitrozellulose mit 1:10 verdünnter Ponceau-Rot-Lösung (Sigma) gefärbt. Nach Markierung der Molekulargewichtstandards wurde das Ergebnis fotografiert und die Nitrozellulose anschließend mit CMF-PBS wieder entfärbt.

Immunfärbung

Der Nachweis spezifischer Proteine sowie deren Menge auf der Nitrozellulose erfolgte immunologisch durch die Anfärbung mit spezifischen Antikörpern.
Unspezifische Bindungsstellen der Nitrozellulose wurden mit 3% Magermilchpulver in CMF-PBS eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert.
Die Inkubation mit den ersten Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Antikörper wurden mit 0,2% BSA-CMF-PBS-Lösung wie folgt verdünnt:

Anti-Kollagen I	1:1000	polyklonal	Chemicon (Temecula, USA
Anti-Kollagen III	1: 500	polyklonal	Chemicon (Temecula, USA)
Anti-Kollagen IV	1: 250	polyklonal	Rockland (Gilbertsville, USA)
Anti-E-Cadherin	1:1000	monoklonal	BD Biosciences (San Jose, USA)
Anti-β-Catenin	1:1000	monoklonal	BD Biosciences (San Jose, USA)
Anti-Laminin	1:1000	polyklonal	Biomol (Hamburg)
Anti-Fibronektin	1:5000	polyklonal	Biomol (Hamburg)
Anti-β-Aktin	1:5000	polyklonal	Sigma (München)

Danach wurde je 5 min mit 1‰ Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)-CMF-PBS und 2x mit CMF-PBS gewaschen.
Die Inkubation mit den zweiten Antikörpern (verdünnt mit 0,2% BSA in CMF-PBS-Lösung) erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur. Für polyklonale Erstantikörper wurde Anti-Kaninchen-HRP *(horse radish peroxidase)* 1:8000 (Pierce, Rochester, USA) oder Anti-Kaninchen–AP (Alkalische Phosphatase) 1:5000 (Dianova, Hamburg); für monoklonale Erstantikörper wurde Anti-Maus-HRP 1:8000 (Pierce) oder Anti-Maus-AP 1:5000 (Sigma) verwendet.

Die Blots mit den HRP-gekoppelten Antikörpern wurden je 5 min mit Tween-CMF-PBS und 2x mit CMF-PBS gewaschen und die Blots mit den AP-gekoppelten Antikörpern 3x 5 min in Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9,4).

HRP *(horse radish peroxidase)* bewirkt enzymatisch nach Inkubation mit den beiden ECL-Lösungen (*enhanced chemoluminescence*, Pierce) ein Fluoreszenzsignal. Durch Belichtung eines aufgelegten Röntgenfilmes (Kodak XAR, Rochester, USA; Hyperfilm, Amersham-Buchler, Braunschweig) wurden die spezifischen Proteinbanden sichtbar gemacht und dokumentiert.

AP (alkalische Phosphatase) ist ein Enzym das bei Inkubation mit NBT (4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid, Roche Diagnostics, Mannheim) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat, Roche Diagnostics) einen dunkelblauen Farbstoff produziert und so die Proteinbanden direkt sichtbar macht. Für diese Möglichkeit der Visualisierung der Ergebnisse konnten auch Blots, die schon einen HRP-gekoppelten Antikörper gebunden hatten, verwendet werden.

Northern Blot

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Um RNAse-Freiheit zu garantieren, wurden alle Materialien sterilisiert (Glas in 180°C Hitze) oder in 3% Wasserstoffperoxid inkubiert.

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Pankreasproben wurden mechanisch in flüssigem N_2 zerkleinert. Das entstandene Pulver wurde in Guanidin-thiozyanatlösung (4 M Guanidiniumthiozyanat, 25 mM Natriumcitrat pH7, 0,5% N-Laurylsarkosin, 0,1 M Mercaptoethanol; ca. 1 ml / 100 mg Gewebe) aufgelöst und zunächst in einem Glashomogenisator homogenisiert, dann die DNA durch eine 50 ml Spritze mit Kanüle zerkleinert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 3500 rpm wurde der Überstand gemischt mit dem gleichen Volumen Phenol, 10% des Volumens 3 M Na-Acetat-Lösung pH 5 und mit 20% des Volumens Chloroform-Isoamylalkohol (Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1), 15 min

auf Eis inkubiert und bei 10.000 rpm und 4°C 20 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem 0,8-fachen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 49:1) gemischt und erneut zentrifugiert. Wiederum die wässrige Phase wurde mit demselben Volumen Isopropanol gut gemischt. Zum Ausfällen der RNA wurden die Proben eine Stunde bei –20°C inkubiert. Anschließend erfolgte nochmals eine Zentrifugation 20 min bei 10000 rpm und 4°C. Das Sediment wurde in 0,5 ml Guanidinthiozyanatlösung (s.o.) resuspendiert, nochmals mit demselben Volumen Isopropanol gemischt, eine Stunde bei –20°C inkubiert und 20 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol verworfen, die Proben im Vakuum-Konzentrator 5 min getrocknet und die Sedimente in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) gelöst.
Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch in einem Beckman Spektrophotometer in einer Präzisionsküvette aus Quarzglas bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Berechnung der RNA-Konzentration wurde folgende Formel eingesetzt:
Absorption * Verdünnungsfaktor * 40 / 1000 = RNA-Konzentration in mg/ml.
Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei –80°C.
Zur Prüfung der Integrität der RNA wurden jeweils Proben mit 2 µg RNA in einem Agarosegel (1% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 10 mM EDTA pH 8)) eine Stunde bei 120 V und 80 mA aufgetrennt, anschließend mit Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht angeschaut und fotografiert.

Northern Blot

Zur Herstellung der Proben wurden jeweils 30 µg RNA mit 4,0 µl MOPS-Puffer (5 mM MOPS (3-[N-Morpholino] propane sulfonic acid), Sigma), 4 mM Natrium-Acetat, 0,5 mM EDTA), 20 µl Formamid und 6,4 µl Formaldehyd gemischt, bei 65°C für 15 min inkubiert, auf Eis abgekühlt und nach Anzentrifugieren mit 1/5 Volumen Gelladepuffer (50% Glycerin, 10 mM Na-P-Puffer, 0,25% Bromphenolblau) versetzt. Dann erfolgte die Auftrennung der RNA in einem formaldehydhaltigen Gel (1%iges Agarosegel mit 16% Formaldehyd und 1x MOPS-Puffer) bei 3 V pro cm Lauflänge Stromspannung. Danach wurde das Gel

mit DEPC-H_2O (H_2O mit 0,1‰ Diethyl-phosphorylcyanid) abgespült und 45 min in 20x SSC (0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid) eingelegt.

Der Transfer der RNA-Proben auf eine Membran erfolgte mittels Kapillarblot. Dazu wurde eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham-Buchler, Braunschweig) in Gelgröße zugeschnitten und 10 min in 20x SSC eingelegt. Über einer mit 20x SSC gefüllten Kunststoffbox mit einer Kapillarbrücke aus Glasplatte und Filterpapier erfolgte nun der Blotaufbau der in Abbildung 1 gezeigt ist. Über die Filterpapierbrücke wurde noch ein Filterpapier (Whatmann Nr. 5, Biometra, Göttingen), dann das Formaldehydgel, die Nylonmembran, nochmals ein Filterpapier, einige Zentimeter saugfähige Papiertücher, eine waagerecht ausgerichtete Glasplatte und schließlich ein etwa 1 kg schweres Gewicht geschichtet.

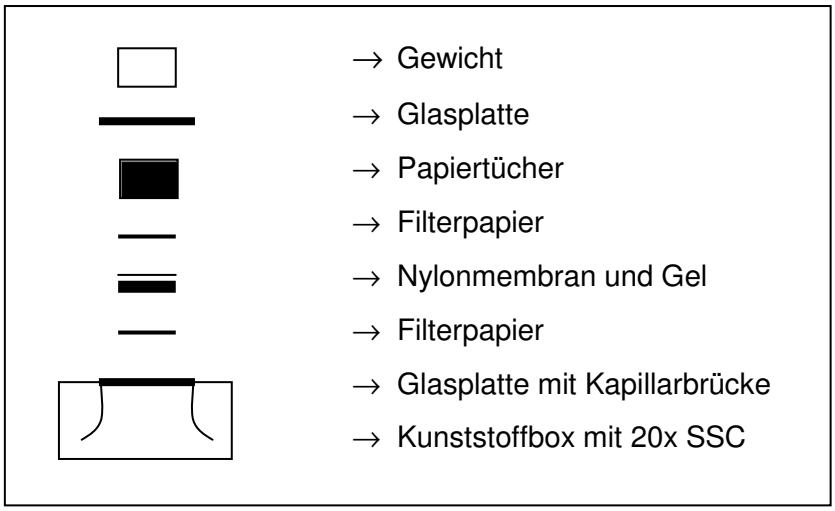

Abb. 1: Schema des RNA-Blottes

Die Blottingdauer betrug mindestens 12 h. Danach wurde die Nylonmembran getrocknet und zur Fixierung der Nukleinsäuren 2 h bei 80°C inkubiert. Um die RNA zusätzlich chemisch mit der Membran zu vernetzen, erfolgte noch eine UV-Behandlung (*Crosslinking*) im UV-Stratalinker (Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

Markierung der cDNA-Sonden

Zur Hybridisierung der Northern Blots wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden eingesetzt. Diese Sonden binden spezifisch an ihre RNA-Äquivalente, die Radioaktivität lässt dies mittels Filmexposition und -entwicklung visualisieren.

Zur Sondenherstellung wurden isolierte cDNA-Fragmente von Kollagen I, Kollagen III, Kollagen IV, Fibronektin und Laminin (alle American Type Culture Collection, Rockville, USA) auf 95°C erhitzt, um die Doppelstrangbindungen zu lösen. Die Markierung erfolgte mit dem Random-Priming-Kit (RPN 1601 Y, Amersham-Buchler), bei dem durch enzymatische DNA-Replikation durch das Enzym Klenow-Polymerase Tochterstränge gebildet werden, die durch den Einbau von P^{32} markiertem Cytosin radioaktiv sind.

Der Reaktionsansatz bestand aus 30 ng cDNA-Fragment, 10 µl Markierungspuffer (Puffer und Nukleotide), 5 µl Primer, 2 µl Klenow-Enzym, 1,5 µl [^{32}P] dCTP und wurde mit bidestilliertem, sterilem H_2O auf 50 µl aufgefüllt.

Die Reaktionsdauer, in der die radioaktiv markierten Tochterstränge gebildet wurden, betrug eine Stunde bei 37°C.

Um die markierten Sonden zu isolieren, wurden die Reaktionsansätze mit Hilfe von Sephadex G-50 in drei Elutionen aufgetrennt. Dazu wurden mit Sephadex G-50 gefüllte Säulen (Pharmacia, USA) zunächst mit 2 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gewaschen. Dann wurde die Probe mit den radioaktiv markierten Tochtersträngen aufgetragen und mit TE-Puffer überschichtet. Für das erste Eluat wurden 400 µl, für das zweite 350 µl und für das dritte 500 µl TE-Puffer verwendet. Von den jeweiligen Eluaten wurden 10 µl zur Radioaktivitäts-bestimmung in einem Liquid Szintillation Counter gemessen und dann die Aktivität jedes Eluats berechnet (Aktivität * Eluatvolumen / 10µl). Weiterverwendet wurde jeweils die Probe mit der höchsten Radioaktivität.

Vor der Hybridisierung der Northern Blots wurde die markierte Sonde 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und anzentrifugiert.

Northern Blot Hybridisierung

Zum Abblocken unspezifisch bindender RNA-Bereiche wurden die Blots bei 42°C mindestens drei Stunden in 30 ml Prähybridisierungspuffer (50% Formamid, 6x SSC, 5x Denhardt´s (1‰ Ficoll Typ 400, 1‰ Polyvinylpyrrolidon, 1‰ BSA

(Fraktion V)), 0,5% SDS, 50 mM Na_2HPO_4, 100 µg/ml Lachsspermien-DNA (Sigma), 100 µg/ml tRNA (Sigma), 10 µg/ml poly U (Pharmacia)) inkubiert. Dann wurde die markierte Sonde (pro ml Hybridisierungspuffer $1x10^6$ counts) in den Prähybridisierungspuffer hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Die Blots wurden anschließend einmal mit 2x SSC + 0,1% SDS, dann mit 0,25x SSC + 0,1% SDS und schließlich mit 0,1x SSC + 0,1% SDS für jeweils 30 min bei 67°C gewaschen, bis die Aktivität der Blots mit einem Handcounter gemessen unter 20 counts/cm² war. Danach wurden die Blots eingeschweißt, mit dem Phosphorimager (Storm 860, Molecular Dynamics, Uppsala, Schweden) gescannt und, je nach Ergebnis, mehrere Tage auf einem Röntgenfilm (Kodak) exponiert.

Um bereits benutzte RNA-Blots mit einer anderen Sonde hybridisieren zu können, musste die vorhandene vollständig abgewaschen werden. Dazu wurden die Blots 30 min bei 70°C in 5 mM Natrium-Phosphat-Puffer mit 0,1% SDS gewaschen, anschließend zweimal mit Wasser gespült und danach in 0,1x SSC + 0,1% SDS + 0,2M Tris-HCl pH 7,5 mindestens 30 min inkubiert sowie auf Restaktivität kontrolliert.

Southern Blot

DNA-Isolierung aus Mausproben

Zur DNA-Isolierung wurden 1 cm lange Schwanzspitzen der gekreuzten Mäuse (TGFβ1-transgen / nichttransgen) in 400 µl TE-SDS Puffer (100 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5% SDS) mit der Schere mechanisch zerkleinert. Zu jedem Ansatz wurden 5 µl Proteinase K (Stammlösung 20 mg/ml in H_2O) zugegeben und über Nacht bei 55°C schüttelnd inkubiert. Die Überstände wurden mit 75 µl 3 M Na-Acetat-Lösung und 500 µl Chloroform zur DNA-Fällung vermischt, gut geschüttelt, 10 min geschwenkt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit dem zweifachen Volumen Isopropanol versetzt und die DNA durch Schütteln ausgefällt.

Die Proben wurden 20 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, die Überstände wurden dann verworfen. Die DNA-haltigen Pellets wurden mit –20°C kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Dann wurde 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) hinzugegeben und die DNA durch Schwenken über Nacht gelöst.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch in einem Beckman Spektrophotometer in einer Präzisionsküvette aus Quarzglas bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Berechnung der DNA-Konzentration wurde folgende Formel eingesetzt:

Absorption * Verdünnungsfaktor * 50 / 1000 = DNA-Konzentration in mg/ml.

Zur Prüfung der DNA wurden jeweils Probenanteile mit 2 µg DNA in einem 1%igem Agarosegel eine Stunde bei 10 V pro cm Lauflänge und 80 mA aufgetrennt, mit Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht angeschaut und fotografiert.

Die Proben wurden bei – 80°C aufbewahrt und dann für den Southern Blot und für die PCR verwendet.

DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Um die DNA-Stränge kleiner zu schneiden, wurden Probenanteile mit jeweils 20 µg DNA mit 3 µl Restriktionsenzym Eco R I, 4 µl Puffer H, 4 µl Spermidin (alles Roche Diagnostics Mannheim) versetzt, mit Wasser auf 40 µl aufgefüllt und bei 37°C zwei Stunden verdaut. Um das Spaltergebnis abzuschätzen wurden jeweils 2 µl der Proben mit Ladepuffer versetzt, in einem Agarosegel (1% Agarose in TAE-Puffer) bei 120 V Stromspannung und 80 mA Stromstärke aufgetrennt, mit Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht angeschaut und fotografiert.

Herstellung des Southern Blots

Die Proben mit der gespaltenen DNA (jeweils 19 µg) wurden mit 20% des Probevolumens Gelladepuffer versetzt. Die Auftrennung der Proben der Größe nach erfolgte in einem 1%igem Agarosegel bei 140 V Stromspannung und 100 mA Stromstärke. Dann wurde die im Agarosegel enthaltene DNA denaturiert. Dazu wurde das Gel 5 min in 0,25 M HCl-Lösung und 20 min in 0,5 M NaOH + 1,5 M

NaCl-Lösung neutralisiert und anschließend in 1,5 M NaCl + 0,5 M Tris-HCl gewaschen.

Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham-Buchler) erfolgte durch einen Kapillarblot dessen Aufbau beim Northern Blotting beschrieben ist. Der Nachweis der DNA erfolgte mit einer Sonde die aus dem PCR-Produkt (siehe unten) isoliert, aufgereinigt und radioaktiv markiert wurde, ebenfalls nach der Beschreibung vom Northern Blot. Auch die Hybridisierung wurde analog zum Northern Blot, lediglich mit einer veränderten Hybridisierungstemperatur von 65°C, durchgeführt.

Die Blots wurden anschließend einmal mit 2x SSC + 0,1% SDS, dann mit 0,25x SSC + 0,1% SDS und schließlich mit 0,1x SSC + 0,1% SDS für jeweils 30 min bei 67°C gewaschen, bis die Aktivität der Blots mit dem Handcounter gemessen unter 20 counts / cm² lag.

Danach wurden sie eingeschweißt, mit dem Phosphorimager (Storm 860) gescannt und, je nach Scanergebnis, mehrere Stunden auf einem Röntgenfilm (Kodak) exponiert.

PCR

Nachweis transgener Mäuse

Die Transgenität der Mäuse resultierte aus einer mutierten cDNA (Austausch zweier Aminosäuren, statt Cys 223 und Cys 225 Ser 223 und Ser 225) von TGFβ1, welche nach einem Insulin-Promotor von Ratten eingesetzt wurde, sodass biologisch aktives TGFβ1 exprimiert werden konnte. Das Fusionsfragment wurde in die cDNA von hGH *(human growth hormone)* eingefügt (Sanvito et al. 1995).

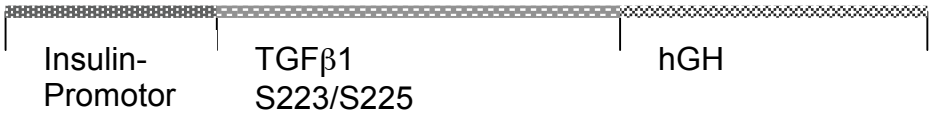

Abb. 2: Konstrukt der transgenen Maus

Um die Transgenität der Mäuse nachzuweisen wurden für die PCR (Polymerasekettenreaktion) hochspezifische Primer für hGH benutzt; so dass nur in den transgenen Tieren ein 390 bp Fragment vorhanden war.
Folgende Primer wurden eingesetzt:

5´-CCTAGAGGAAGGCATCCAAACGC-3´ anterograd
5´-GCCCGTAGTTCTTGAGTAGTGCG-3´ retrograd.

Der Reaktionsansatz für die PCR enthielt 5 µl 10x Red Taq-Puffer als Reaktionspuffer, 2 µl 0,2 mM dNTP Stammlösung (1:10 verdünnt) als Nukleotide, je 1,0 µl der 10 pM Primer 1 und Primer 2, 1,0 µl Red Taq Polymerase (alles Sigma) und 40 µl H_2O. Je Probe wurden von diesem Ansatz 5 µl eingesetzt und jeweils 20 ng Template-DNA (Proben aus DNA-Isolierung, Beschreibung siehe oben) zugegeben.
Die PCR wurde in einem Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt, bestehend aus einem ersten Zyklus mit einer Stufe (3 min bei 94°C), dann 10 Zyklen mit drei Stufen (30 sec bei 94°C, 30 sec bei 65°C, 30 sec bei 72°C) und schließlich 30 Zyklen mit drei Stufen (30 sec bei 94°C, 30 sec bei 60°C, 30 sec bei 72°C).
Zum Nachweis der Fragmente wurden die Proben in einem 3%igem Agarose-TAE-Gel mit Ethidiumbromidlösung bei 120 V und 80 mA aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die 390 bp großen Fragmente der transgenen TGFβ-Mäuse angeschaut und fotografiert werden.

Quantitative RT-PCR-Analyse

Die RT-PCR-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. med. Martin Wagner (Innere Medizin I, Universität Ulm) durchgeführt.
Der Probenansatz zur Synthese der cDNA enthielt 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0,5 µM random hexamer primer, 0,5 mM dNTP, 200 U Superscript II RT (Gibco BRL, Rockville, USA) und jeweils 2 µg RNA (Isolierung der RNA siehe oben). Die Reaktionsansätze wurden gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.
Die Expression der mRNA wurde quantitativ durch eine RT-PCR-Analyse mittels TaqMan (Applied Biosystems, Norwalk, USA) bestimmt (Gibson et al, 1996), dabei

wurden die unten angeführten Primer verwendet. Die PCR wurde für jede Reaktion zum endogenen 18S-mRNA-Spiegel genormt (Ribosomal control reagent, Applied Biosystems, Norwalk, USA). Die relative Quantifizierung der cDNA im Vergleich zu den Wildtypen erfolgte durch die Δ−Δ−CT-Methode. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert und Standardabweichungen der RNA-Expressionslevel präsentiert.

Primer

Nach Möglichkeit wurden Primer ausgewählt, die sich über Exon-Intron-Grenzen erstreckten. Außerdem wurden alle Primer auf Kreuzreaktionen mit anderen Genen überprüft. Die optimalen Primerkonzentrationen wurden in mehreren Versuchen getestet.

Folgende Primer wurden eingesetzt (Applied Biosystems, Norwalk, USA):

TGFβ1	anterograd	(300 nM)	5´-GTACAGCAAGGTCCTTGCCCT-3´
TGFβ1	retrograd	(300 nM)	5´-TAGTAGACGATGGGCAGTGGC-3´
TGFβ2	anterograd	(300 nM)	5´-GCAGAGTTCAGGGTCTTCCG-3´
TGFβ2	retrograd	(300 nM)	5´-CAGCGTCTGTCACGTCGAA-3´
TGFβ3	anterograd	(50 nM)	5´-TGACCCACGTCCCCTATCA-3´
TGFβ3	retrograd	(900 nM)	5´-TCTCCTGAGTGCAGCCTTCC-3´
CTGF	anterograd	(300 nM)	5´-GTGTGCACTGCCAAAGATGGT-3´
CTGF	retrograd	(300 nM)	5´-ACACCCACTCCTTGCAGCATT-3´
FGF1	anterograd	(300 nM)	5´-TATACGGCTCGCAGACACCAA-3´
FGF1	retrograd	(50 nM)	5´-AACCAGTTCTTCTCCGCATGC-3´
FGF2	anterograd	(300 nM)	5´-AGCGACCACACGTCAAACTAC-3´
FGF2	retrograd	(300 nM)	5´-CAGCCGTCCATCTTCCTTCATA-3´
PDGF A-Kette	anterograd	(300 nM)	5´-CCCATTCGCAGGAAGAGAAGTA-3´
PDGF A-Kette	retrograd	(900 nM)	5´-TTGACGCTGCTGGTGTTACAA-3´
PDGF B-Kette	anterograd	(300 nM)	5´-GCAAGAGTGTGGGCAGGGTTAT-3´
PDGF B-Kette	retrograd	(300 nM)	5´-GAATCAGGCATCGAGACAGACG-3´

IGF1	anterograd	(900 nM)	5´-AGATGTACTGTGCCCCACTGAA-3´
IGF1	retrograd	(900 nM)	5´-CTTCCTTCTGAGTCTTGGGCAT-3´
TGFα	anterograd	(300 nM)	5´-GGCTGCCAGCCAGAAGAA-3´
TGFα	retrograd	(300 nM)	5´-ACAGGTGATAATGAGGACAGCCA-3´

Statistik

Bei der Auswertung der Messergebnisse wurde von vier und mehr Einzelmessungen der arithmetische Mittelwert +/- Standardabweichung errechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student´s-t-Test untersucht.

3 Ergebnisse

DNA-Untersuchungen

Der Nachweis der Transgenität der Mäuse erfolgte, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, durch Bestimmung der entsprechenden cDNA für hGH mittels PCR und Southern Blotting. Als Restriktionsenzym um die DNA-Stränge für das Southern Blotting kleiner zu schneiden wurde Eco R I (Boehringer Mannheim) verwendet, als Primer für die PCR bez. Sonde für das Southern Blotting wurden folgende eingesetzt:

5´-CCTAGAGGAAGGCATCCAAACGC-3´ anterograd,

5´-GCCCGTAGTTCTTGAGTAGTGCG-3´ retrograd.

Die Ergebnisse der PCR und des Southern Blot sind in Abbildung 3 dargestellt:

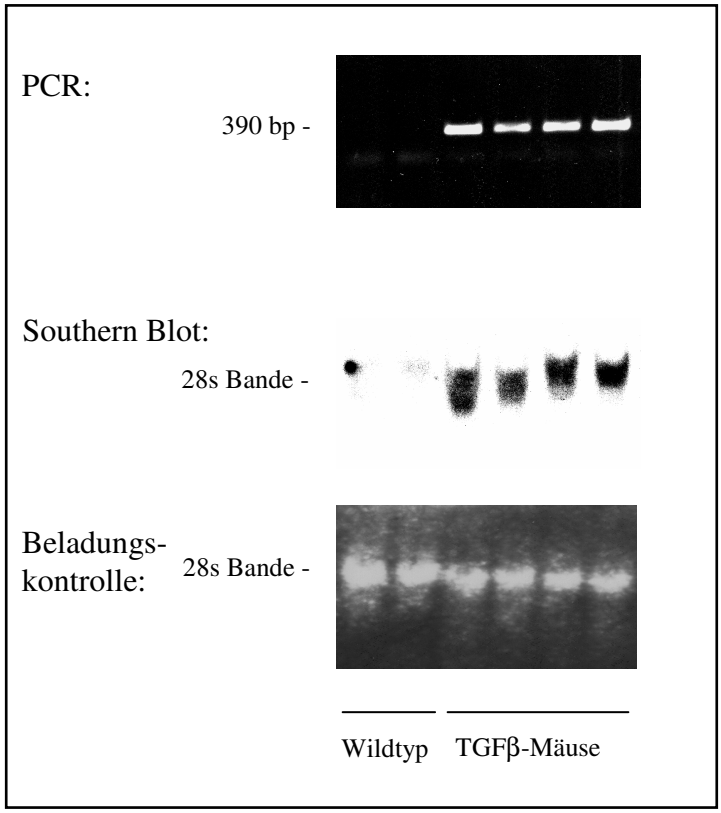

Abb. 3: Nachweis der cDNA von hGH mittels Southern Blot und PCR im Pankreasgewebe der TGFβ1-transgenen Mäuse

Die Transgenität der heterozygoten Mäuse konnte durch die positiven Signale in der PCR und im Southern Blot gezeigt werden, die Kontrolle (Ethidiumbromidfärbung der gespaltenen DNA) zeigt die gleichmäßige Gelbeladung des Southern Blots.

Zeitlicher Verlauf der ECM-Ablagerung

HE-Färbungen

Die Schnitte durch das Pankreas einer Wildtyp-Maus zeigen in Hämatoxylin-Eosin-Färbung das Bild eines typischen Mäusepankreas (Abb. 4). Der exokrine Anteil ist dichtgepackt und von unregelmäßigen Septen durchzogen die zu einer Lobulierung führen. Die Drüsenendstücke enthalten proteinsezernierende Pankreasazinuszellen mit breiter Basis und schmaler apikaler Oberfläche. An der Zellbasis befinden sich die Zellkerne. Die in die Azini eingeschobene Anfangsteile der Schaltstücke stellen die zentroazinären Zellen dar (Pfeil).
Der endokrine Anteil (Langerhans-Inseln) stellt sich deutlich heller als der exokrine Pankreasanteil dar, die Zellkerne befinden sich etwa in der Mitte der Zelle (Pfeilspitze).

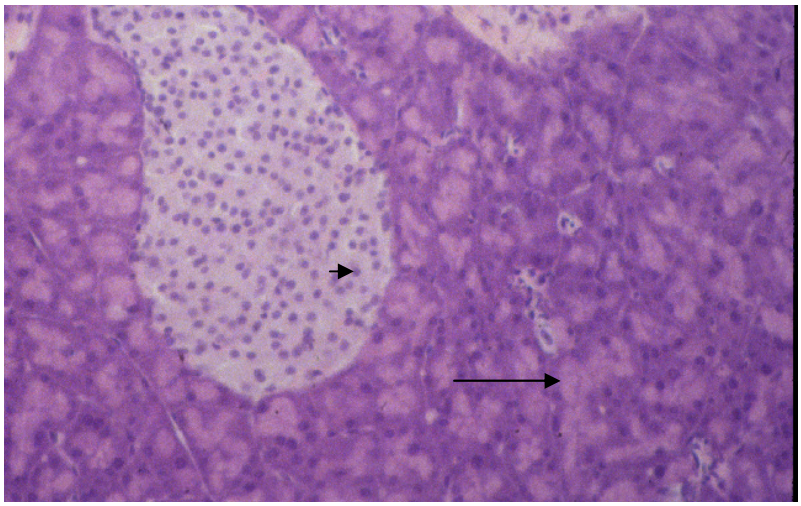

Abb. 4: Normales Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus mit exokrinem Gewebeanteil (Pfeil) und endokrinem Gewebeanteil (Pfeilspitze)
Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung: ca. x250

Die heterozygoten Mäuse zeigen 14 Tage nach der Geburt eine Auflockerung des exokrinen Gewebes (Pfeil) und eine um die Langerhans-Inseln herum beginnende Fibrose (Pfeilspitze), die in den exokrinen Anteil des Pankreasgewebes eindringt (Abb. 5).

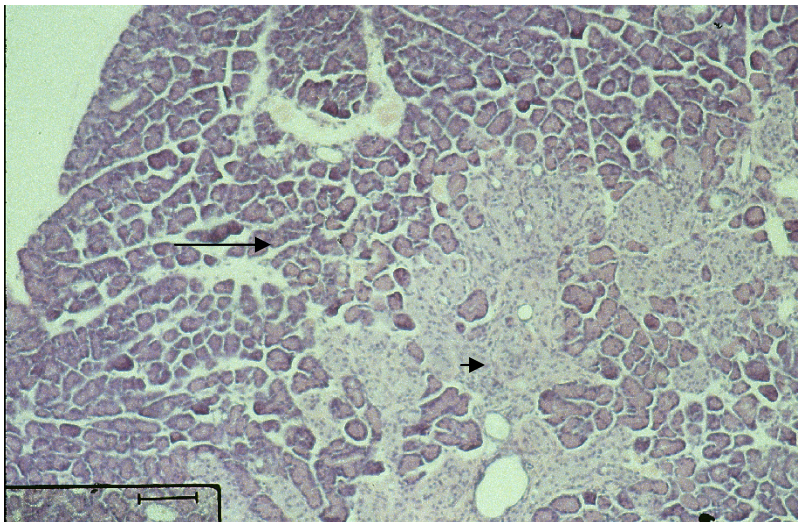

Abb. 5: Beginnende Fibrosierung um die Langerhans-Inseln herum (Pfeilspitze) und Auflockerung des exokrinen Gewebeanteils (Pfeil) im Pankreasgewebe einer TGFβ1-transgenen Maus an Tag 14 nach der Geburt
Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung: ca. x100

In den Schnitten von 70 Tage alten Mäusen ist die Fibrose im Pankreas weiter fortgeschritten. In den fibrotischen Arealen finden sich viele spindelförmige, fibroblastenähnliche Zellen (Pfeil) und nur wenige Entzündungszellen (Abb. 6).

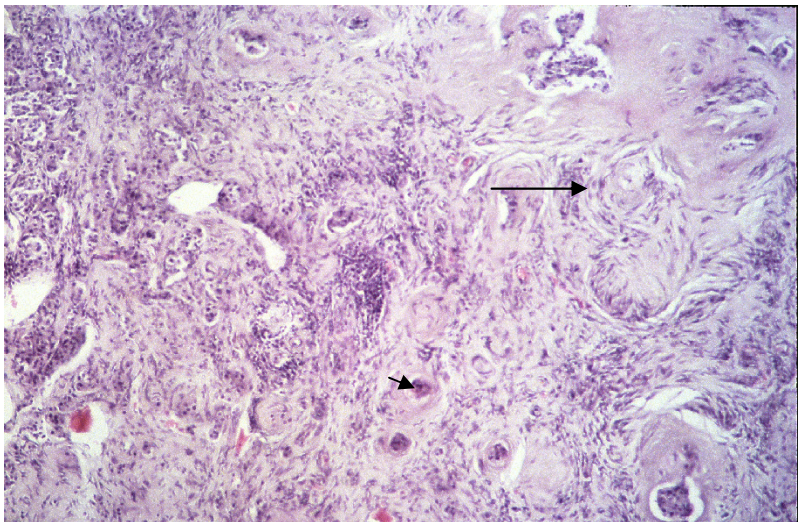

Abb. 6 (Vorseite): Weiter fortschreitende Fibrosierung im Pankreasgewebe einer TGFβ1-transgenen Maus an Tag 70 nach der Geburt mit wenigen verbliebenen Azini (Pfeilspitze) und vielen fibroblastenähnlichen Zellen (Pfeil)
Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung: ca. x150

An Tag 330 nach der Geburt schließlich sind die meisten Azini durch Bindegewebe und teilweise auch durch Fettgewebe ersetzt (Abb. 7).

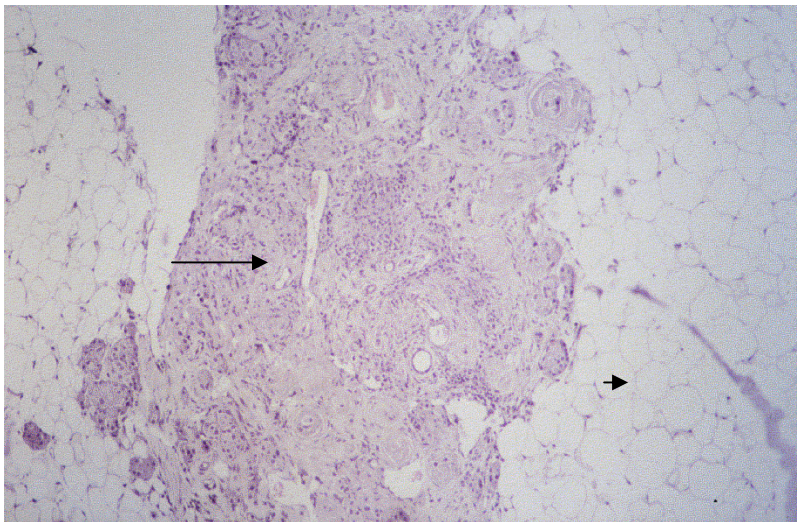

Abb. 7: Weiter fortschreitende Fibrosierung (Pfeil) und Ersetzen der exokrinen Pankreaszellen durch Fettgewebe (Pfeilspitze) bei einer 330 Tage alten TGFβ1-transgenen Maus
Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung: ca. x100

Um die Zusammensetzung der hier beschriebenen extrazellulären Matrix zu analysieren wurden spezielle Untersuchungen des Pankreasgewebes mittels Immunfluoreszenzen verschiedener ECM-Proteinen durchgeführt.

Immunfluoreszenzen

Kollagen I ist immunhistochemisch in formalinfixiertem und paraffineingebettetem Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus nicht anfärbbar (Abb. 8).

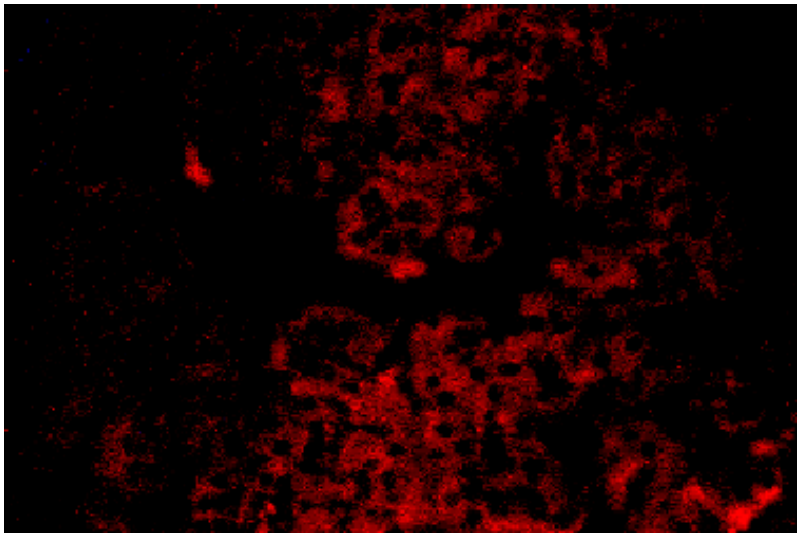

Abb. 8: Kollagen I ist in normalem Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus nicht nachweisbar
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Kollagen I, Vergrößerung: ca. x200

Mit zunehmender Fibrosierung des Pankreas in der TGFβ1-transgenen Maus kommt es um die verbliebenen Azini herum zu Ablagerungen von extrazellulärer Matrix, deren wesentlicher Bestandteil, wie Abbildung 9 zeigt, Kollagen I ist (Pfeil).

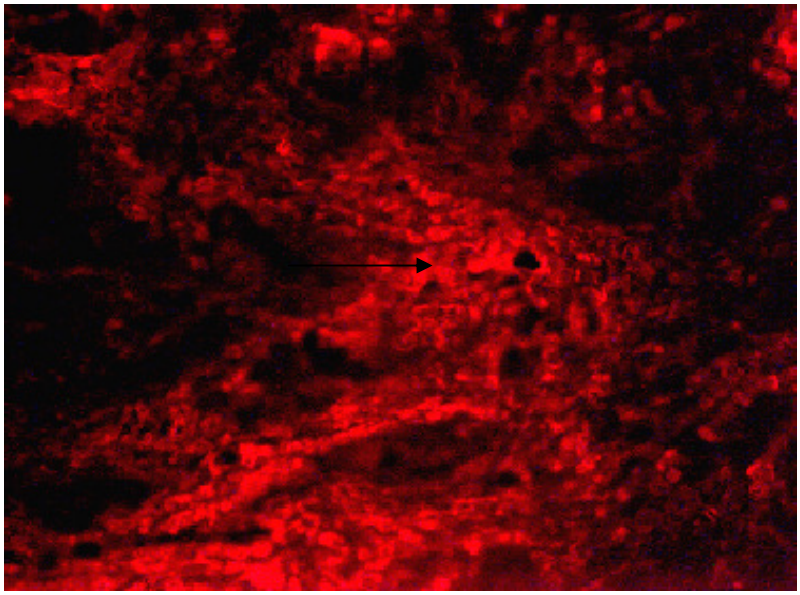

Abb. 9 (Vorseite): Kollagen I (Pfeil) bei zunehmender Fibrosierung des Pankreasgewebes einer TGFβ1-transgenen, 70 Tage alten Maus
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Kollagen I, Vergrößerung: ca. x200

Auch Kollagen III lässt sich in normalem Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus nicht anfärben (Abb. 10).

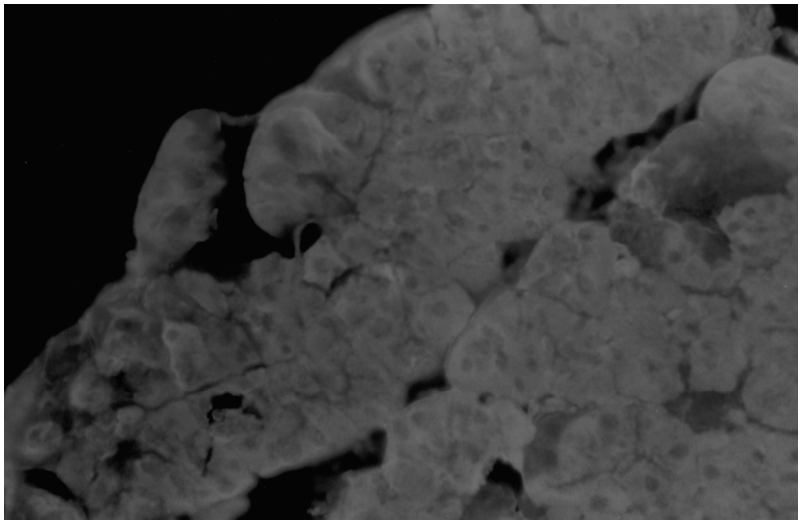

Abb. 10: Eine spezifische Anfärbung von Kollagen III in normalem Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus ist nicht nachweisbar
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Kollagen III, Vergrößerung: ca.x200

Wie Kollagen I ist auch Kollagen III Bestandteil des sich ausbreitenden Bindegewebes und lässt sich entsprechend in den fibrotischen Arealen im Pankreasgewebe einer TGFβ1-transgenen Maus immunhistochemisch nachweisen (Pfeil, Abb. 11).

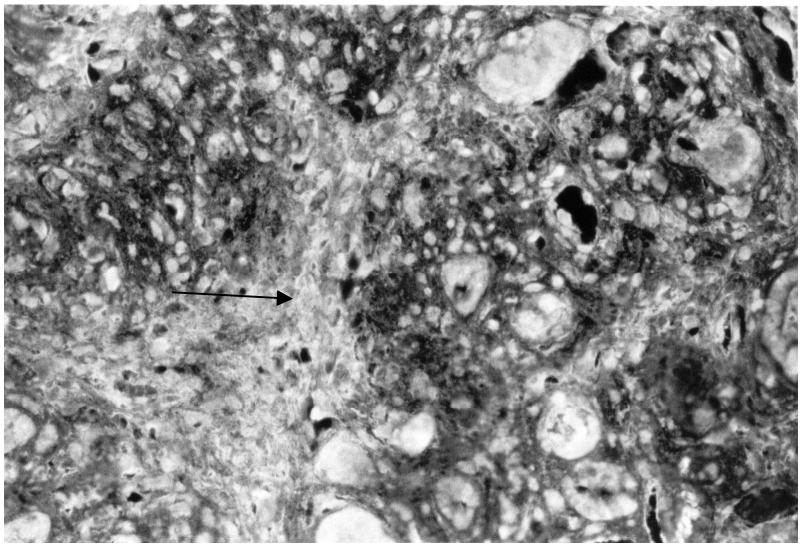

Abb. 11: Kollagen III (Pfeil) bei Fibrosierung des Pankreasgewebes einer TGFβ1-transgenen, 70 Tage alten Maus
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Kollagen III, Vergrößerung: ca. x200

Die Anfärbung mit Antikörpern gegen Fibronektin zeigt im Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus lediglich ein diagonal durch das Bild verlaufendes Septum bei physiologischer Lobulierung des Pankreas durch extrazelluläre Matrix (Abb. 12).

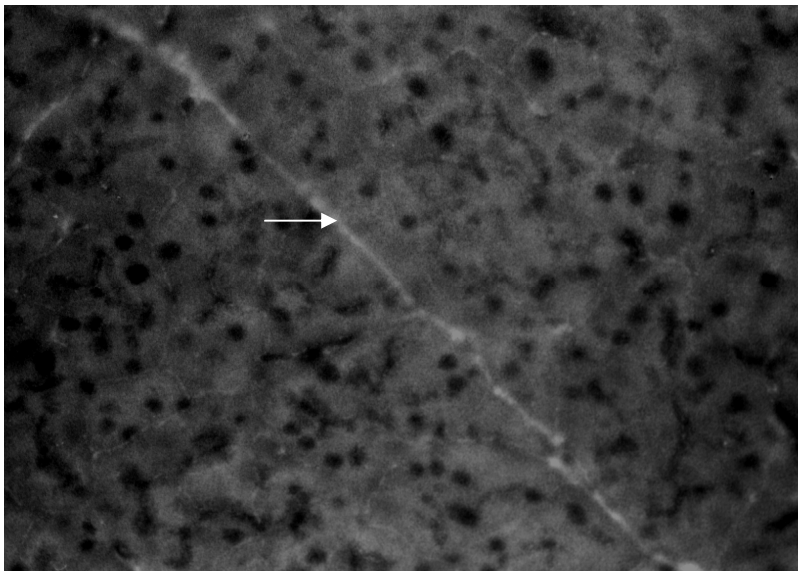

Abb. 12 (Vorseite): Fibronektin in normalem Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus, es zeigt sich lediglich ein diagonal verlaufendes Septum (Pfeil)
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Fibronektin, Vergrößerung: ca. x200

An Tag 70 lassen sich in fibrotischem Pankreasgewebe einer TGFβ1-transgenen Maus viele feine faserige Strukturen an den verbliebenen Epithelgeweberesten vorbei anfärben und als Fibronektin identifizieren (Pfeil, Abb.13).

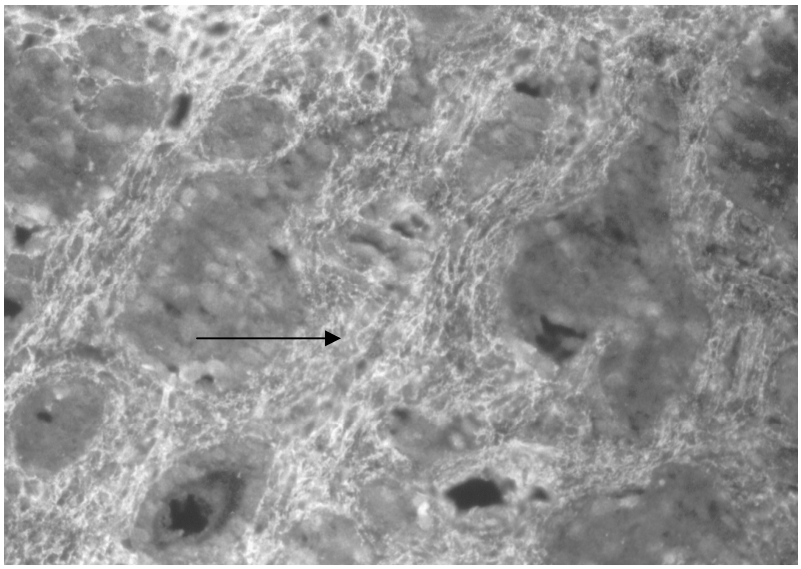

Abb. 13: Fibronektin in fibrotischem Pankreasgewebe einer TGFβ1-transgenen Maus, es zeigen sich angefärbte faserige Strukturen (Pfeil) um die verbliebenen Azini
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Fibronektin, Vergrößerung: ca. x200

Die Anfärbung von Gewebeschnitten aus dem Pankreas einer Wildtyp-Maus mit Antikörpern gegen Kollagen IV zeigt eine netzförmige Struktur um die Azini

herum (Abb. 14). Als Zeichen für die differenzierte Gewebestruktur im Pankreas der Wildtypmaus stellt sich hier die Basalmembran, von der Kollagen IV ein Bestandteil ist, dar.

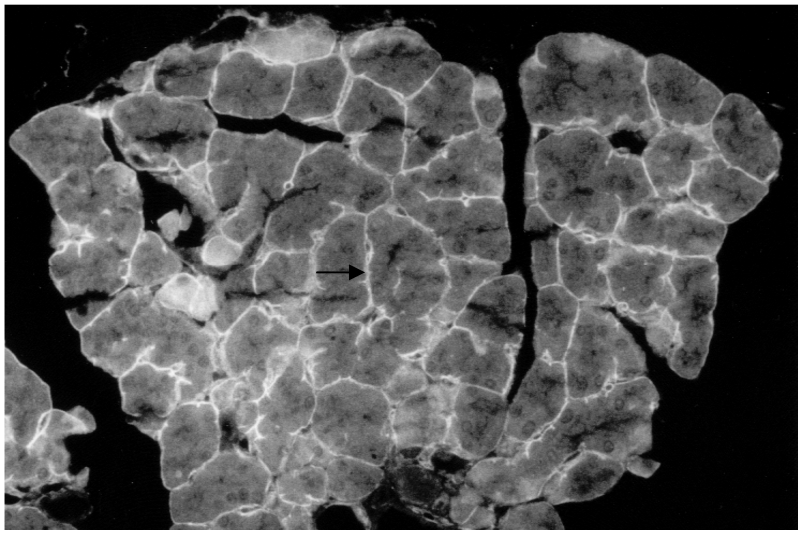

Abb. 14: Kollagen IV in normalem Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus, es zeigen sich netzförmige Strukturen (Pfeil) um die Azini
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Kollagen IV , Vergrößerung: ca. x200

In der 70 Tage alten TGFβ1-transgenen Maus hat sich die netzförmige Struktur gänzlich verloren. Es finden sich Schichten von Kollagen Typ IV (Pfeil), die auf verbliebene Basalmembranen schließen lassen. Darüber hinaus findet sich eine diffuse Anfärbung im ganzen Präparat (Abb. 15).

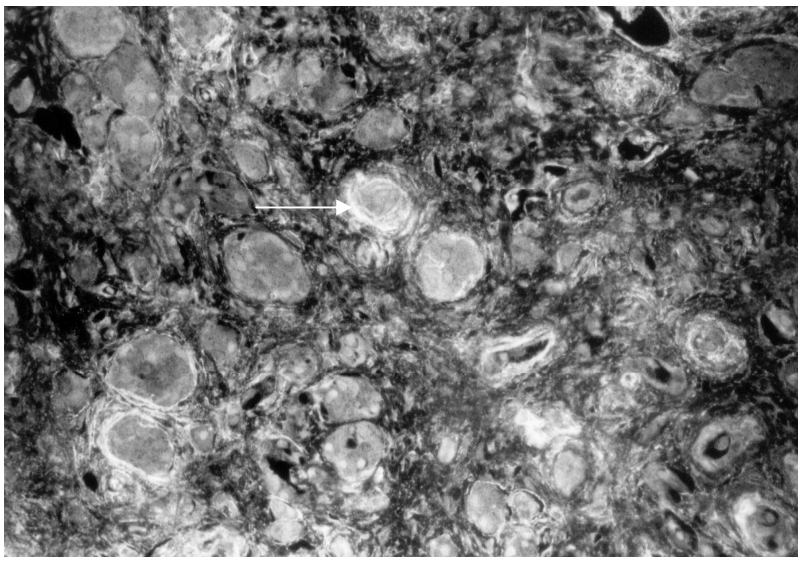

Abb. 15 (Vorseite): Kollagen IV (Pfeil) in fibrotischem Pankreasgewebe einer TGFβ1-transgenen Maus, die netzförmige Struktur hat sich verloren
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Kollagen IV, Vergrößerung: ca. x200

Als Bestandteil der Zonula adhaerens zeigen die Anfärbungen mit Antikörpern gegen E-Cadherin und β-Catenin die Verbindungen zwischen den einzelnen Epithelzellen miteinander. In der Wildtyp-Maus stellen sich diese als feine Strukturen zwischen den Epithelzellen dar, die im Präparat dichtgepackt eng aneinander liegen. Die Abbildungen zeigen die Anfärbung mit Antikörpern gegen E-Cadherin (Abb. 16).

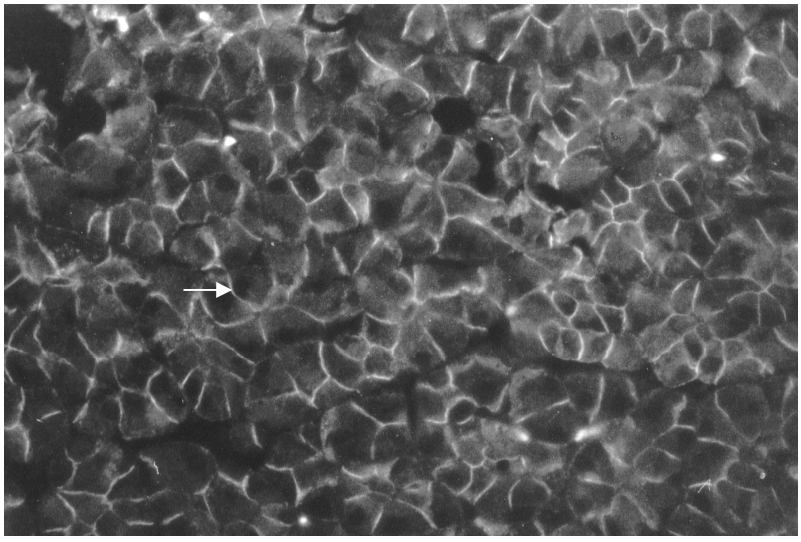

Abb. 16: E-Cadherin in normalem Pankreasgewebe einer Wildtyp-Maus, es stellen sich die Verbindungen zwischen den Epithelzellen dar (Pfeil)
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen E-Cadherin, Vergrößerung: ca. x200

Im Pankreasgewebe von 70 Tage alten TGFβ1-transgenen Mäusen sieht man die noch verbliebenen Azini, die verstreut im nicht angefärbten Bindegewebe liegen. Zwischen den Azinuszellen zeigen sich die verschieden dicke Anfärbungen (Pfeile) mit Antikörpern gegen E-Cadherin (Abb. 17).

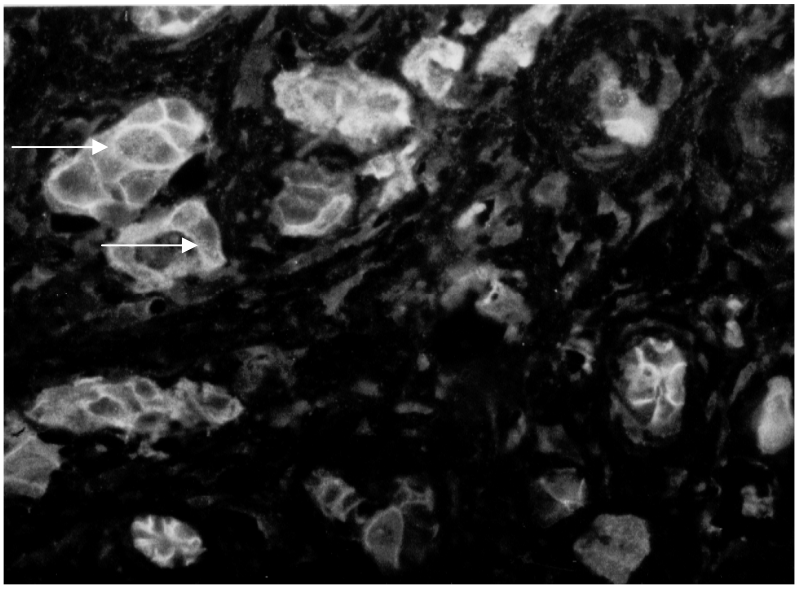

Abb. 16: E-Cadherin im Pankreasgewebe einer TGFβ1-transgenen-Maus, man erkennt die Verbindungen zwischen den Epithelzellen der verbliebenen Azini (Pfeile)
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen E-Cadherin, Vergrößerung: ca. x200

Western und Northern Blots

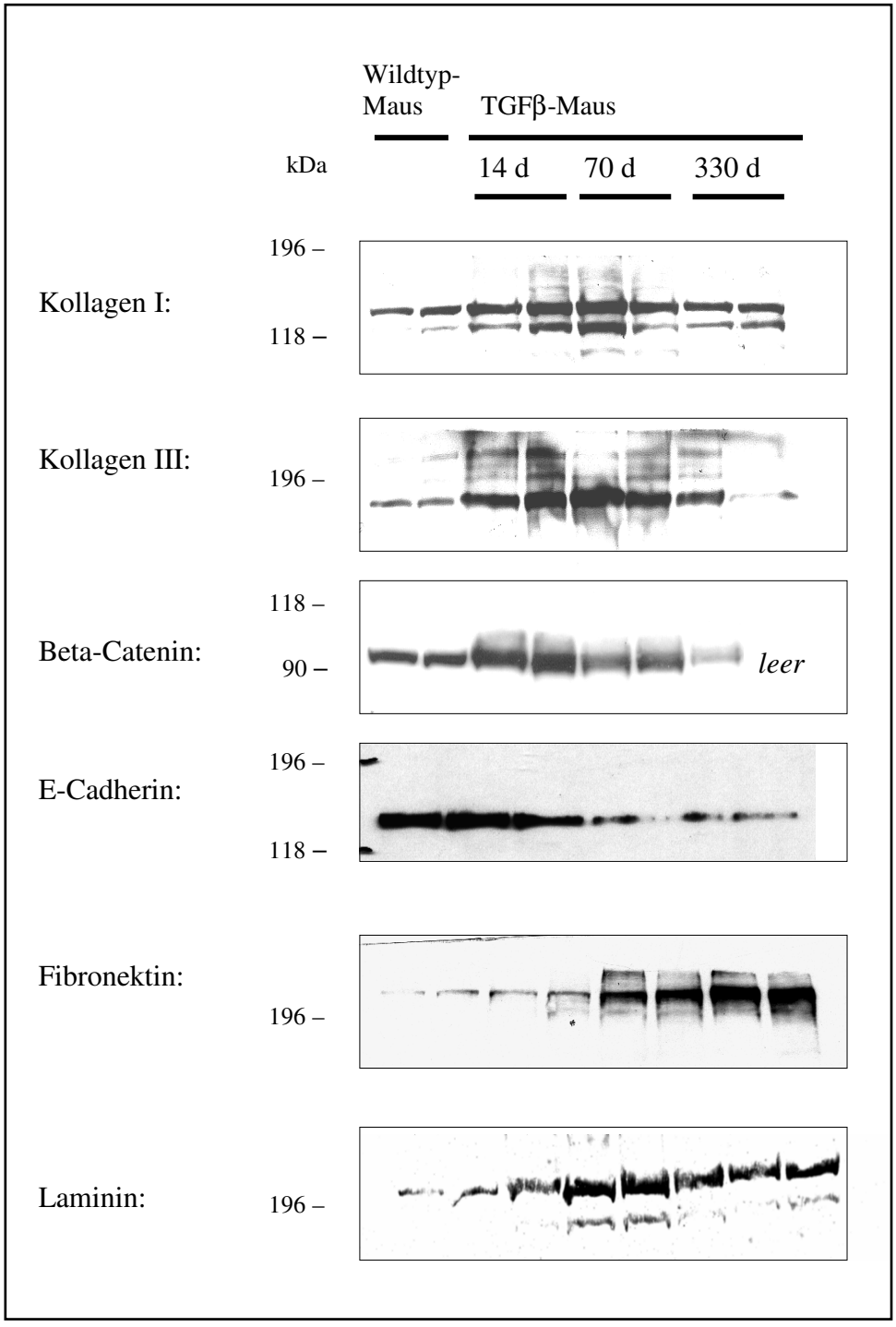

Abb. 18: Analyse der extrazellulären Matrix durch Untersuchung der Protein-Präsenz mittels Western Blot mit Antikörpern gegen Kollagen I, Kollagen III, Beta-Catenin, E-Cadherin, Fibronektin und Laminin von Pankreasgewebe TGFβ1-transgener Mäuse in den Altersstufen 14, 70 und 330 Tage nach der Geburt im Vergleich zur Wildtyp-Maus

Die Angleichung der eingesetzten Gesamtproteinmenge der Western Blots erfolgte visuell durch Färbung von Kontrollgelen nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Coomassieblau (Abbildung 19).

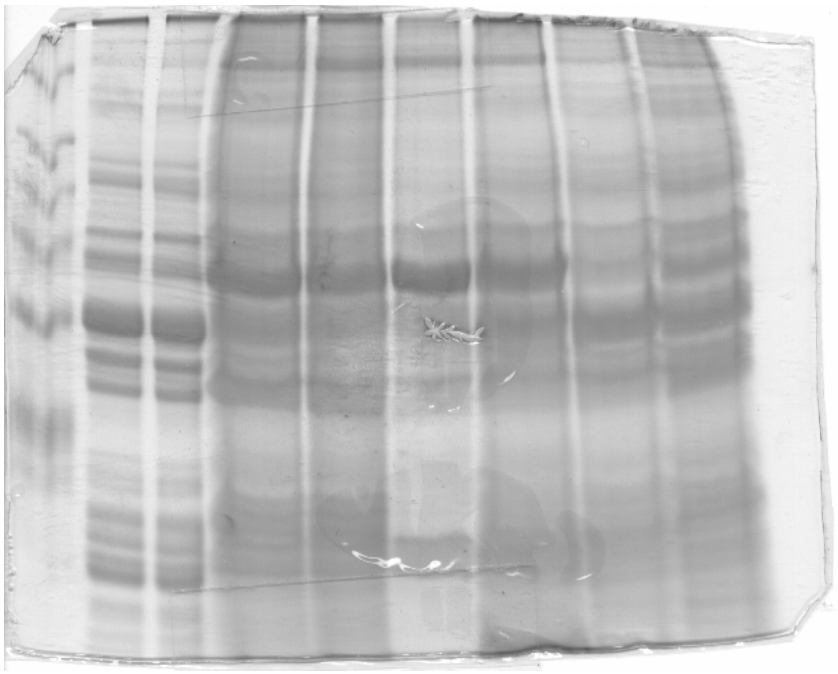

Abb. 19: Kontrolle der Proteinbeladung von Gelen nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durch Färbung mit Coumassieblau

Zur weiteren Analyse wurde der zeitliche Verlauf verschiedener Anteile der extrazellulären Matrix im Pankreasgewebe auf Protein- und mRNA-Ebene in den TGFβ1-transgenen Mäusen verglichen zu den Wildtyp-Mäusen in verschiedenen Altersstufen (14 d, 70 d, 330 d) untersucht. Wie die Abbildungen 18 und 20 zeigen sind Kollagen I und Kollagen III an Tag 14 auf Protein- und mRNA-Ebene im Pankreasgewebe der transgenen Maus angestiegen. Zu diesem Zeitpunkt bleibt Fibronektin im Vergleich zum Wildtyp nahezu unverändert. An Tag 70 ist die Expression von Fibronektin auf Protein- und mRNA-Ebene auffallend angestiegen, wie auch in den Immunfluoreszenzen gezeigt werden konnte.

Morphologisch wurde, wie oben beschrieben, an Tag 330 eine ausgeprägte Fibrosierung des Pankreasgewebes der transgenen Mäuse gesehen. Die Blots zeigen auf Protein- und RNA-Ebene an Tag 330 keinen weiteren Anstieg von Kollagen I und Kollagen III, es zeichnet sich jedoch eine nochmals erhöhte Expression von Fibronektin ab.

Während E-Cadherin im zeitlichen Verlauf, auch verglichen mit dem Wildtyp, immer weniger wird, steigt die Proteinexpression von β-Catenin an Tag 14 an, um dann an Tag 70 etwa auf Werte der Wildtyp-Mäuse und an Tag 330 noch darunter zu fallen.

Die Western Blots, in denen die Proteinexpression mit Antikörpern gegen Laminin untersucht wurde, zeigen im Pankreasgewebe transgener Mäusen eine zeitlich unabhängige erhöhte Proteinexpression gegenüber den Wildtyp-Mäusen.

Für die Northern Blots erfolgte die Angleichung der eingesetzten Gesamt-RNA-Menge durch photometrische Bestimmung der RNA-Konzentrationen, zusätzlich wurde eine Kontrolle durch Auftrennung von Anteilen der Proben in einem Agarosegel und Visualisierung mit Ethidiumbromid durchgeführt (Abb. 20).

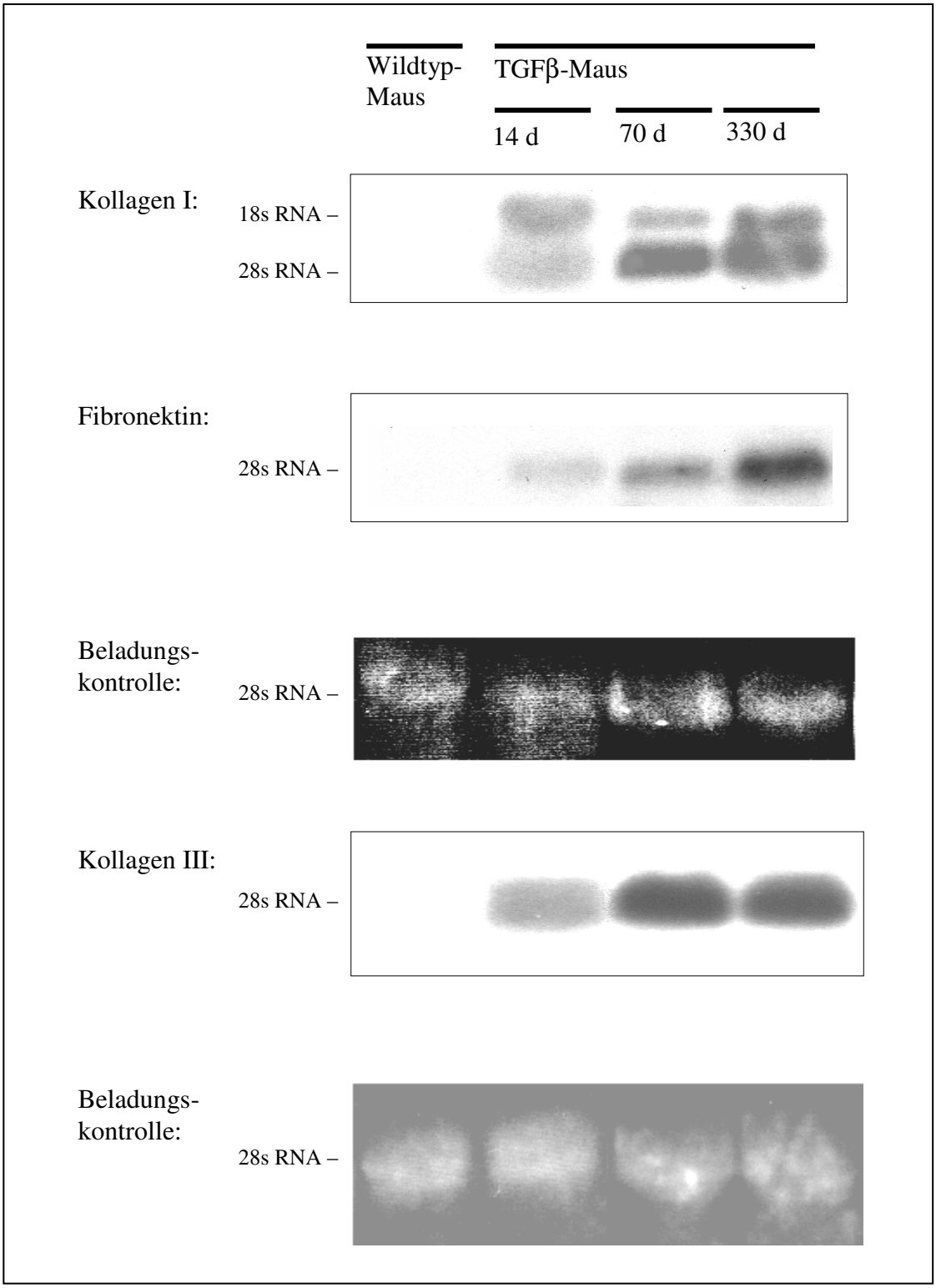

Abbildung 20: Analyse der extrazellulären Matrix durch Untersuchung der mRNA-Expression mittels Northern Blotting mit Sonden für Kollagen I, Kollagen III und Fibronektin von Pankreasgewebe TGFβ1-transgener Mäuse in verschiedenen Altersstufen im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Beladungskontrolle durch Ethidiumbromidfärbung der geblotteten Membranen.

Colorimetrische Kollagenbestimmung

Um die Veränderungen der extrazellulären Matrix weiter zu analysieren wurde der Kollagengehalt in den Pankreasgewebeschnitten colorimetrisch quantifiziert. Abbildung 21 zeigt den Kollagenanteil am Gesamtprotein in µg/mg im Pankreasgewebe TGFβ1-transgener Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten (Alter von 14, 30, 70 und 330 Tagen nach der Geburt). Die Wildtyp-Mäuse hatten einen niedrigen Kollagenanteil, der zu allen untersuchten Zeitpunkten gleich war. In den TGFβ1-transgenen Mäusen stieg der Kollagenanteil von Tag 14 bis 70 an. An Tag 70 betrug der Kollagenanteil 44,0 ± 6,7 µg/mg vom Gesamtprotein. In älteren TGFβ1-transgenen Tieren (330 Tage) zeigte sich kein weiterer Anstieg von Kollagen im Verhältnis zum Gesamtprotein (Abb. 21).

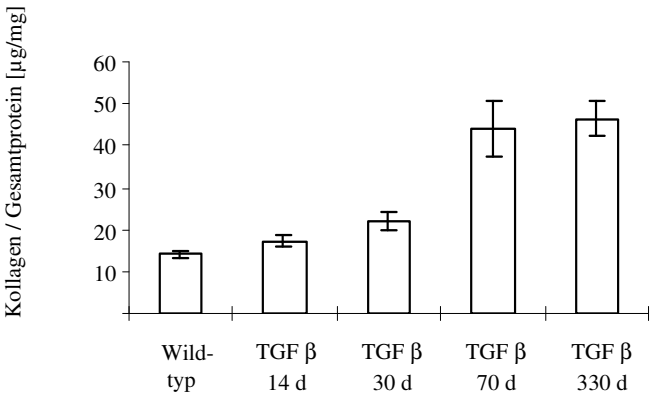

Abb. 21: Anteil des Kollagens am Gesamtprotein in µg/mg im Pankreasgewebe TGFβ1-transgener Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in verschiedenen Altersstufen

Wachstumsfaktoren

Wie die quantitative RT-PCR mit Hilfe des TaqMan (Applied Biosystems, Norwalk, USA) zeigt, war der TGFβ1-Transkriptionslevel bei den TGFβ1-transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen an Tag 14 auf das 9,8 ± 1,8-fache und an Tag 70 auf das 15,8 ± 1,9-fache signifikant erhöht (jeweils Mittelwert +/- Standardabweichung, Stichprobenzahl = 4; Abb. 23).

An Tag 14 zeigte die Analyse keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression von TGFβ2 *(transforming growth factor β2)*, TGFβ3 *(transforming growth factor β3)*, CTGF *(connective tissue growth factor)*, FGF1 *(fibroblast growth factor 1)*, FGF2 *(fibroblast growth factor 2)*, IGF1 *(insulin-like growth factor 1),* PDGF A *(platelet-derived growth factor A)* und PDGF B *(platelet-derived growth factor B)*.

An Tag 70 zeigt CTGF, ein Wachstumsfaktor von welchem bereits die Einbindung in die Regulation von TGFβ-Effekten beschrieben wurde, eine signifikante Erhöhung auf das 2,6 ± 0,4-fache. Die CTGF-Hochregulierung konnte auch in einem Northern Blot (Abb. 22) verifiziert werden.

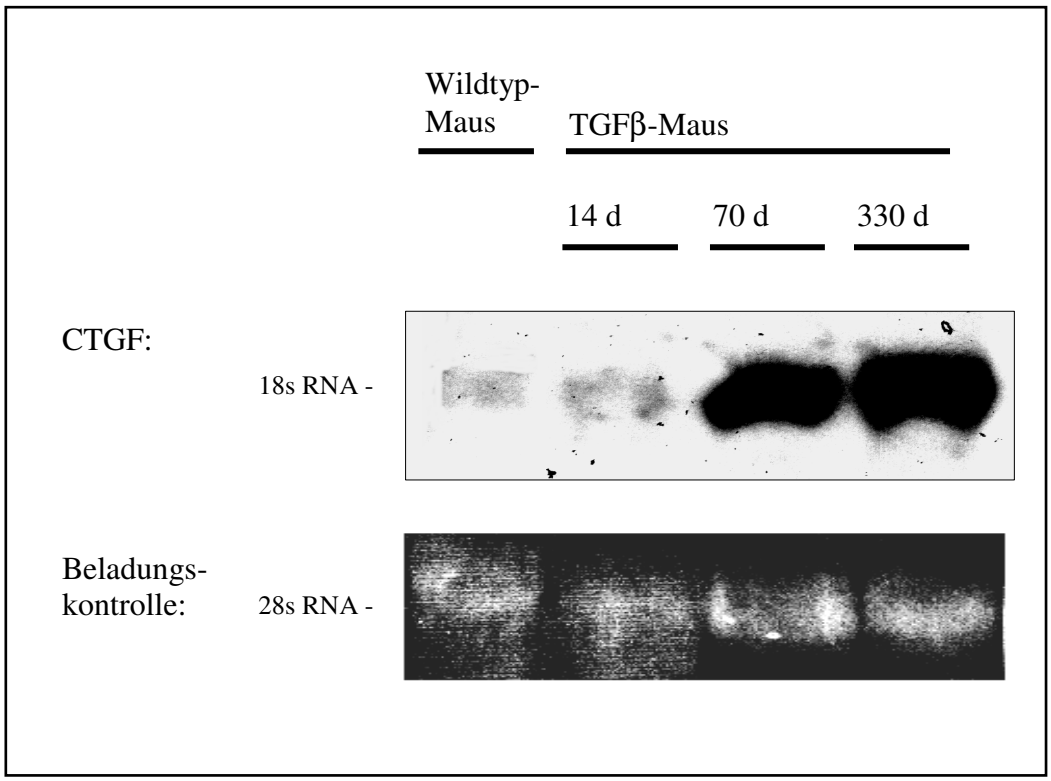

Abb. 22: mRNA-Expression (Northern Blot) von CTGF im Pankreasgewebe TGFβ1-transgener Mäuse in verschiedenen Altersstufen im Vergleich zur Wildtyp-Maus

Desweiteren waren an Tag 70 die mRNA-Expressionslevel von FGF1 (4,7-fach), FGF2 (5,4-fach) und TGFβ2 (2,5-fach) signifikant erhöht.

Die Expressionslevel von PDGF A, PDGF B, IGF1 und TGFβ3 blieben im Pankreas von transgenen und Wildtyp-Mäusen gleich, TGFα wird signifikant herunterreguliert (0,38 ± 0,10-fach).

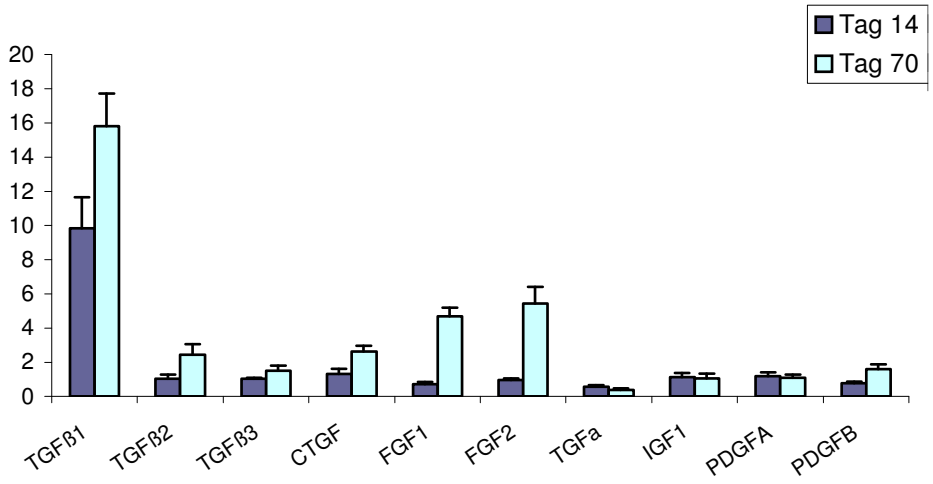

Abb. 23: mRNA-Expressionslevel verschiedener Wachstumsfaktoren im Pankreasgewebe TGFβ1-transgener Mäuse an den Tagen 14 und 70 nach der Geburt, Abbildung der Mittelwerte und Standardabweichungen, Ermittlung mittels RT-PCR (TaqMan, Applied Biosystems, Norwalk, USA)

Pankreatische Sternzellen

Immunfluoreszenz in Pankreasgewebe

Die Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen α-Glattmuskelaktin von semi-dünnen Schnitten durch Pankreasgewebe TGFβ1-transgener Mäuse zeigt eine mit dem Alter ansteigende Anzahl von oval geformten Zellen in den fibrotischen Anteilen. Sie gruppieren sich an Tag 14 um morphologisch unauffällig erscheinendes exokrines Pankreasgewebe (Abb. 24), an Tag 70 zeigt sich eine deutlich größere Anzahl dieser Zellen in den fibrotischen Arealen (Abb. 25).

Im Pankreasgewebe von Wildtyp-Mäusen finden sich keine aktivierten pankreatischen Sternzellen (Abb. 26).

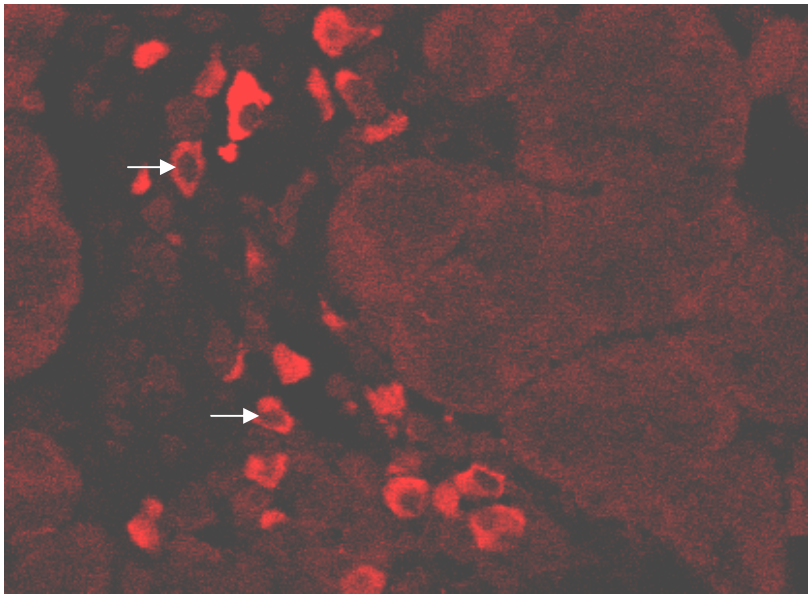

Abb. 24: Aktivierte pankreatische Sternzellen (Pfeile) gruppieren sich um exokrines Pankreasgewebe einer 14 Tage alten TGFβ1-transgenen Maus

Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen α-Glattmuskelaktin , Vergrößerung: ca. x400

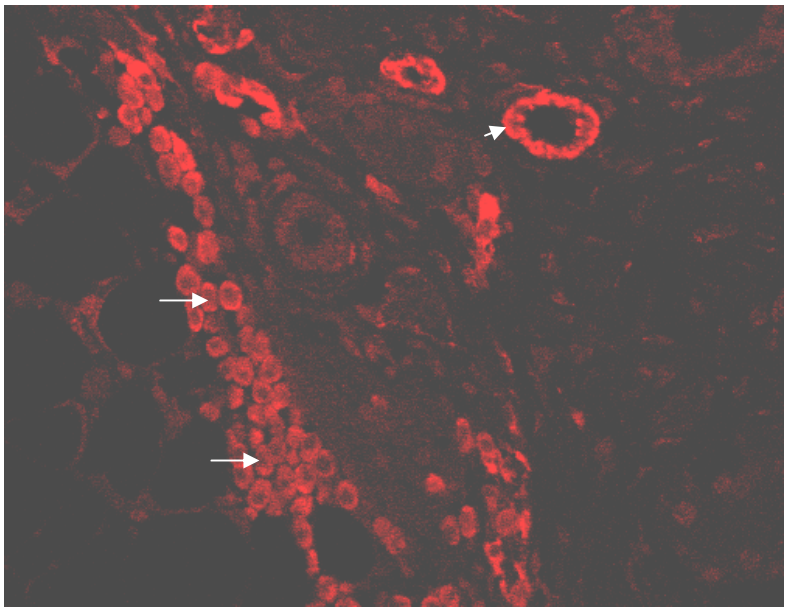

Abb. 25 (Vorseite): Pankreatische Sternzellen (Pfeile) in Pankreasgewebe mit fortgeschrittener Fibrosierung einer TGFβ1-transgenen, 70 Tage alten Maus. Zusätzlich zu den PSC stellen sich Blutgefäße angefärbt dar (Pfeilspitze)
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen α-Glattmuskelaktin, Vergrößerung: ca. x200

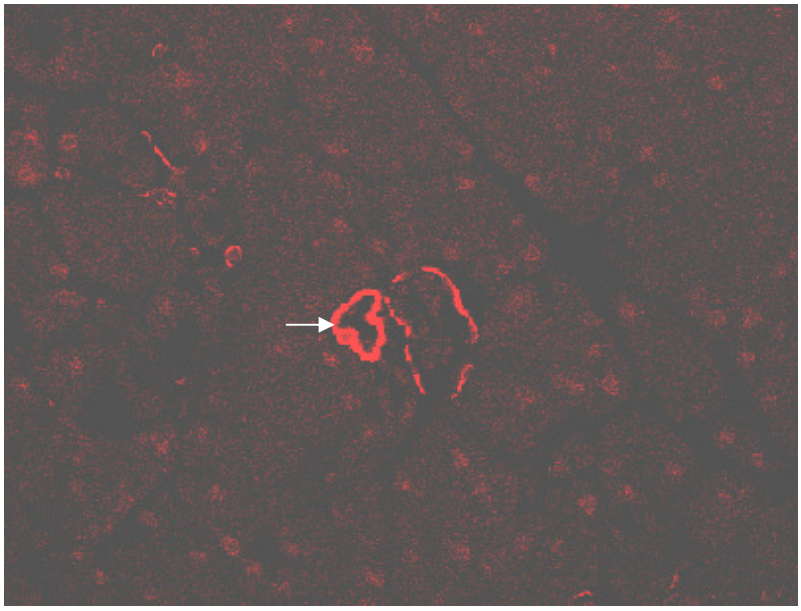

Abb. 26: In den Wildtyp-Mäusen lassen sich keine aktivierten pankreatischen Sternzellen darstellen, hier zeigen sich lediglich wieder Blutgefäße, die α-Glattmuskelaktin-positiv sind (Pfeil)
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen α-Glattmuskelaktin, Vergrößerung: ca. x200

Immunfluoreszenzen der kultivierten Zellen aus Pankreasgewebe TGFβ1-transgener Mäuse

Nach Entnahme des Pankreas von TGFβ1-transgenen Mäusen wurde das Gewebe in Nährlösung zerschnitten und inkubiert. Bereits 12 Stunden später konnte man die aussprossenden Zellen gut erkennen, nach 5 Tagen hatte sich ein gleichmäßiger Zellrasen gebildet.

Der Nachweis von Aktin in den kultivierten Zellen mit Phalloidin-Rhodamin zeigt eine Anfärbung über das ganze Zytoplasma und einen stärker angefärbten, breiten Saum um die Zellkerne herum (Abb. 27).

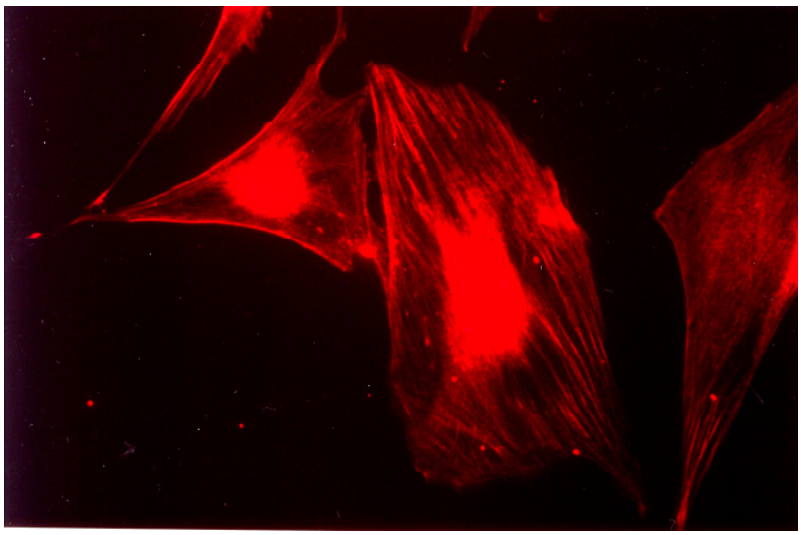

Abb. 27: Aktin-Färbung der aus Pankreasgewebe der TGFβ1-transgenen Maus aussprossenden kultivierten Zellen

Färbung: Immunfluoreszenz mit Phalloidin-Rhodamin, Vergrößerung: ca. x800

Die Zellen wurden durch ihre Anfärbbarkeit mit α-Glattmuskelaktin und Desmin als pankreatische Sternzellen charakterisiert (Abb. 28 und 29):

Ein dünner, kräftig angefärbter Saum um die Zellkerne stellt sich in der Desmin-Färbung dar und feine angefärbte Strukturen ziehen von den Zellkernrändern aus in die Peripherie (Abb. 28).

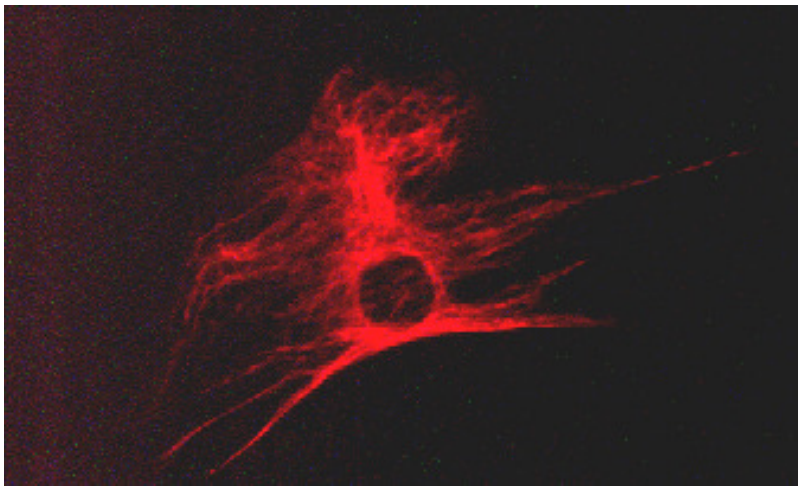

Abb. 28: Nachweis von Desmin in den aus Pankreasgewebe der TGFβ1-transgenen Maus aussprossenden kultivierten Zellen
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Desmin, Vergrößerung: ca. x800

Die Färbung mit Antikörpern gegen α-Glattmuskelaktin zeigt eine Anfärbung der charakteristischen feinen faserigen, teilweise fast parallelen Aktinfasern über das ganze Zytoplasma (Abb. 29).

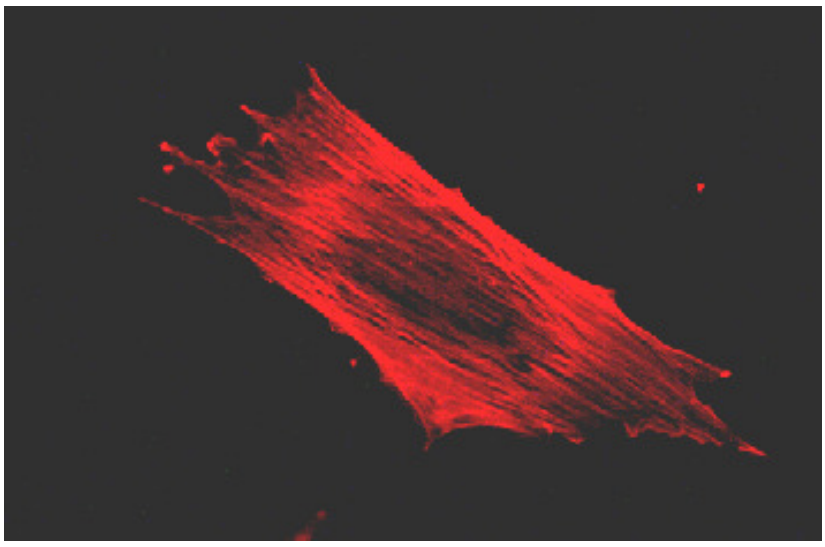

Abb. 29: Nachweis von α-Glattmuskelaktin in den aus Pankreasgewebe aussprossenden kultivierten Zellen
Färbung: Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen α-Glattmuskelaktin, Vergrößerung: ca. x800

4. Diskussion

Der Verlauf der chronischen Pankreatitis beim Menschen ist durch den progredienten Charakter der Erkrankung vorgegeben. Es kommt zur Atrophie der Azini und schließlich zur Fibrosierung des Organs (Goebell 1994). Dabei entstehen Veränderungen in der extrazellulären Matrix. In speziellen Anfärbungen findet sich eine Vermehrung von Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Fibronektin, und zwar sowohl in fibrotischen als auch in histologisch unverändert erscheinenden Bereichen der Proben (Kennedy et al. 1987).

Bei der Entstehung von Fibrose in anderen Organen, zum Beispiel Leberzirrhose (Czaja et al. 1989, Castilla et al. 1991), Glomerulonephritis (Okuda et al. 1990) oder Lungenfibrose (Broekelmann et al. 1991), gilt TGFβ als wichtiger Mediator. Auch bei chronischer Pankreatitis beim Menschen findet man erhöhte mRNA-Werte der Mitglieder der TGFβ - Familie (van Laethem et al. 1995, Di Mola et al. 1999). Um den Einfluss von TGFβ1 weiter zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie die Entwicklung der Pankreasfibrose in einem TGFβ1-transgenen Mausmodell analysiert.

Die Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Ablagerungen extrazellulärer Matrix geben Einblick in die Regulation derselben *in vivo*. Schon zu frühen Zeitpunkten ist die extrazelluläre Matrix im Pankreas beim TGFβ1-transgenen Mausmodell im Vergleich zum Wildtyp verändert. Das Pankreas bei 14 Tage alten Mäusen zeigt schon eine beginnende Fibrose, die extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und Kollagen Typ III. Bei weiter fortgeschrittener Fibrose zu späteren Zeitpunkten (Tag 70, Tag 330) sind Kollagen und mit fortschreitendem Alter zunehmend auch Fibronektin die vorherrschenden Komponenten extrazellulärer Matrix.

Während der Regeneration caerulein-induzierter Pankreatitis bei der Ratte wurden gesteigerte Transkriptionslevel für Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, außerdem vermehrte Kollagenablagerung und Fibroblastenproliferation, gezeigt. (Elsässer et

al. 1989). Parallel dazu konnten gesteigerte TGFβ1-Transkriptionslevel und Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden (Gress et al. 1994).
Ein weiterer Hinweis für die Rolle von TGFβ bei der Entstehung von Pankreasfibrose zeigten Van Laethem et al. (1996). Sie untersuchten den Effekt von rekombinantem TGFβ auf die Entwicklung einer Pankreasfibrose nach wiederholten caerulein-induzierten Pankreatitiden bei Mäusen. Auf die Regeneration einer einmaligen Pankreatitis hatte die Behandlung mit TGFβ keinen Einfluss. Nach sechs Zyklen akuter Pankreatitis wiesen Mäuse, die nicht mit TGFβ behandelt wurden, nur milde entzündliche Veränderungen auf. Hingegen zeigten die Mäuse, die zusätzlich mit TGFβ behandelt wurden, perilobuläre und intralobuläre Fibrose, angrenzend an entzündliche oder nekrotische Herde.
Umgekehrt zeigten Menke et al. (1997) durch die Inhibition von TGFβ1 durch Injektion neutralisierender TGFβ1-Antikörper eine Reduktion der Entstehung extrazellulärer Matrix während der Genesung von caerulein-induzierter Pankreatitis. Dabei wurden signifikant reduzierte Protein- und mRNA-Konzentrationen für Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Fibronektin im Pankreas bei den mit TGFβ1-Antikörpern behandelten Tieren nachgewiesen.
Auch bei Zellkulturen konnte der Einfluss von TGFβ beschrieben werden: Kultivierte Hepatozyten von Ratten zeigten bei Zugabe von TGFβ1 eine deutlich erhöhte Anfärbbarkeit von Prokollagen I, eine Induktion der Prokollagen-Produktion durch TGFβ ist daher anzunehmen (Eghbali-Fatourechi et al. 1996).
Auch bei kultivierten epithelialen Nierenzellen von Ratten ist nach Stimulation mit TGFβ die Kollagenproduktion, insbesondere von Kollagen I, gesteigert. TGFβ ist also auch hier als Mediator der extrazellulären Matrix anzunehmen (Creely et al. 1992).

TGFβ1 wird im Pankreas der transgenen Mäuse klar überexprimiert, an Tag 14 um das 9,8-fache und an Tag 70 um das 15,8-fache. Bei beginnender Fibrose jüngerer Tiere besteht die extrazelluläre Matrix hauptsächlich aus Kollagen Typ I und Kollagen Typ III. Dies zeigt den Effekt von TGFβ auf die Entstehung einer Fibrose zu einem frühen Zeitpunkt und wurde aufgrund der bestehenden Literatur auch erwartet.

Die Inhibition von TGFβ1 mit neutralisierenden Antikörpern gegen TGFβ1 nach caerulein-induzierter Pankreatitis konnte die Formation extrazellulärer Matrix nicht komplett aufheben. Dies lässt darauf schließen, dass noch andere Faktoren mitbeteiligt sind (Menke et al. 1997). Bei weiter fortgeschrittener Fibrose gehört neben Kollagen Typ I und Kollagen Typ III auch Fibronektin zu den vorherrschenden Komponenten der extrazellulären Matrix. Parallel zu der ansteigenden Fibronektinkonzentration in älteren Tieren zeigt sich, neben der transgen bedingten Überexprimierung von TGFβ1, ein signifikanter Anstieg anderer Wachstumsfaktoren, nämlich CTGF (2,6-fach), TGFβ2 (2,5-fach), FGF1 (4,7-fach) und FGF2 (5,4-fach). Die Sezernierung von CTGF erfolgt durch Fibroblasten, die mit TGFβ aktiviert wurden. CTGF senkt den Einfluss von TGFβ auf Bindegewebszellen und stimuliert seinerseits die Zellproliferation und die Synthese extrazellulärer Matrix. Während TGFβ jedoch viele Zelltypen beeinflussen kann scheint die Wirkungsweise von CTGF sehr viel spezifischer zu sein (Grotendorst, 1997).

Schwach bis mäßig erhöhte CTGF-Transkriptionslevel konnten auch in Proben aus malignem Pankreasgewebe mit entsprechender Fibrosierung nachgewiesen werden, wobei das Ausmaß der Fibrose mit erhöhten CTGF-Transkriptionslevel korrelierte (Wenger et al. 1999).

Die positive Korrelation konnte auch bei humanen Gewebsproben aus chronischer Pankreatitis gezeigt werden, neben der Hochregulation der CTGF-mRNA-Expression fand sich hier zusätzlich auch eine Erhöhung der TGFβ1-mRNA (Di Mola et al. 1999).

Eine Blockade von CTGF zur Beeinflussung des Fibroseausmaßes bei chronischer Pankreatitis ist daher vorstellbar, allerdings würde hierdurch durch die fehlende negative Rückkopplung eine Herunterregulation von TGFβ verhindert, welches selbst einen fibrotischen Umbau im betroffenen Organ und die Induktion weiterer Wachstumsfaktoren bewirken kann.

Neben TGFβ1 und CTGF werden in 70 Tagen alten Mäusen auch FGF1 und FGF2 überexprimiert.

Über das Potential von FGF1 in der Entwicklung einer Fibrose ist nur wenig bekannt. Für die Proliferation von interstitiellen Fibroblasten in menschlichen Nierenerkrankungen wurde eine Rolle von FGF1 angenommen (Kuo et al. 1997).

Die Effekte von FGF2 auf die Synthese von ECM-Komponenten sind bei verschiedenen Zelltypen widersprüchlich. So wurde bei Osteoblasten in Zellkultur (Hurley et al. 1993), aber auch bei Fibroblasten in Narbenkeloiden (Tan et al. 1993) eine Herunterregulation der Synthese von Kollagen I durch FGF2 beobachtet. Bei neuroepithelialen Zellen bewirkt eine Stimulation mit FGF2 einen Anstieg der Lamininsynthese bei den glialen Vorläuferzellen (Drago et al. 1991).

FGF1 und FGF2 und ihre Rezeptoren sind physiologischerweise in Proben von normalem humanen Pankreas nachweisbar. Diese Wachstumsfaktoren können die Freisetzung von Amylase stimulieren, möglicherweise spielen sie eine physiologische Rolle in der Regulation des exokrinen Pankreas (Balaz et al. 2001).

Nach akuter Pankreatitis kann immunhistochemisch in nekrotischem humanen Pankreasgewebe kein FGF1, FGF2 oder FGF-Rezeptor 1 nachgewiesen werden, in Regenerationsgewebe zeigt sich jedoch ein deutlicher Anstieg von FGF1, FGF2 und FGF-Rezeptor 1. Ein Einfluss dieser Wachstumsfaktoren auf die Regeneration nach akuter Pankreatitis wäre daher möglich (Ebert et al. 1999).

Auch in Proben von Patienten mit chronischer Pankreatitis konnte eine Erhöhung der mRNA-Expressionslevel der Wachstumsfaktoren FGF1 und FGF2 nachgewiesen werden (Friess et al. 1994). Bei diesen Wachstumsfaktoren wurde eine Rolle in der Entstehung der Pankreasfibrose vermutet, da in Regionen mit stärker ausgeprägten Veränderungen im Vergleich zu Regionen mit weniger ausgeprägten Veränderungen auch erhöhte mRNA-Level von FGF1 und FGF2 nachgewiesen wurden. Findet keine weitere Fibrosierung mehr statt, zeigt sich immunhistochemisch keine Anfärbung mehr für FGF1 und FGF2, die mRNA-Level sind nur noch unbedeutend erhöht. (Friess et al. 1994).

Auch in der vorliegenden Studie konnte eine Hochregulation der mRNA-Expressionslevel von FGF1 und FGF2 an Tag 70 gezeigt werden.

In kultivierten myofibroblastähnlichen Leberzellen (später als hepatische Sternzellen *(hepatic stellate cells)* bezeichnet) konnte ein TGFβ1-bedingter Anstieg von FGF2 und den dazugehörigen Rezeptoren nachgewiesen werden, FGF2 seinerseits bewirkt über eine autokrine Stimulation einen weiteren Anstieg. FGF2 wirkt mitogen auf die hepatischen Sternzellen und bewirkt so ihre Proliferation (Rosenbaum et al. 1995). Bei Fibroblasten aus dem Pankreas konnte durch Stimulation mit FGF2 ein Anstieg der mRNA-Konzentration für Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Fibronektin gezeigt werden (Menke et al. 1999).

CTGF und FGF2 sind in diesem TGFβ1-transgenen Mausmodell in frühen Stadien nicht erhöht. Dies suggeriert, dass TGFβ1 allein genügt um in frühen Stadien eine Pankreasfibrose zu induzieren. In späteren Stadien scheinen jedoch CTGF und FGF2 Cofaktoren zu sein, die Kollagenablagerungen bleiben konstant während sich die Fibronektinexpression erhöht.

Als mögliche Quelle extrazellulärer Matrix identifizierten Bachem et al. im Pankreasgewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis sowie von Ratten nach caerulein-induzierter Pankreatitis retinoidspeichernde Zellen, welche extrazelluläre Matrix produzieren können und benannte diese, in Anlehnung an die morphologisch und mutmaßlich pathophysiologisch ähnlichen Zellen in der Leber, den hepatischen Sternzellen, pankreatische Sternzellen (*pancreatic stellate cells*) (Bachem et al. 1998). Sowohl in Gewebeproben von Ratten mit repetitiver Pankreatitis als auch von Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden, colokalisiert mit Ablagerungen extrazellulärer Matrix, pankreatische Sternzellen nachgewiesen (Neuschwander-Tetri et al. 2000, Haber et al. 1999). Auch in Gewebeproben von Patienten mit einem Pankreaskarzinom wurde eine große Anzahl pankreatischer Sternzellen gefunden (Bachem et al. 2005). Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl aktivierter pankreatischer Sternzellen und dem Ausmaß der Fibrosierung, unabhängig davon ob die chronische Pankreatitis alkoholischer oder ideopatischer Genese war oder sich bei einem Pankreaskarzinom entwickelte (Jaskiewicz et al. 2003).
Auch im untersuchten TGFβ1-transgenen Mausmodell konnten pankreatische Sternzellen *(pancreatic stellate cells, PSC)* als eine mögliche Quelle der entstehenden extrazellulären Matrix identifiziert werden.

Saotome et al. beschrieben in periazinären Zonen des Pankreas fibroblastenähnliche Zellen die Myofibroblasten ähnlich sind. In diesen Zellen in Kultur konnte durch Stimulation mit TGFβ1 die Kollagensynthese gesteigert werden, außerdem die Synthese von α-Glattmuskelaktin als Marker für einen myofibroblastähnlichen Phänotyp (Saotome et al. 1997).

Für die Stimulation der Proliferation der PSC und derer Kollagensynthese wurde TGFβ1 als Hauptfaktor identifiziert. Auch bei kultivierten pankreatischen Sternzellen bewirkt eine Stimulation mit TGFβ eine Proliferation der Zellen und eine Steigerung der Kollagensynthese (Apte et al. 1999, Vogelmann et al. 2001).

Die aus dem Pankreasgewebe des TGFβ1-transgenen Mausmodells in Kultur auswachsenden Zellen lassen sich mit α-Glattmuskelaktin und Desmin anfärben, dies identifiziert sie als pankreatische Sternzellen. TGFβ1 stimuliert die Kollagenexpression in diesen kultivierten pankreatischen Sternzellen, nicht aber die Fibronektinexpression (Vogelmann et al. 2001).

Möglicherweise reicht im lebenden Organismus die Anwesenheit von TGFβ1 alleine aus, um durch Aktivierung der pankreatischen Sternzellen und der damit verbundenen Kollagenexpression in frühen Stadien eine Pankreasfibrose zu induzieren.

Die Kollagen- und Fibronektinexpression steigt durch TGFβ bei kultivierten Fibroblasten und Myofibroblasten aus Pankreasgewebe und pankreatsichen Sternzellen (Bachem et al. 1998, Saotome et al. 1997). Auch für andere Zelllinien wurde die Regulation der Fibronektinexpression durch TGFβ gezeigt (Dean et al. 1988).

Desgleichen konnte eine Stimulation der Kollagen- und Fibronektinexpression bei kultivierten pankreatischen Sternzellen durch die zentrifugierten Überstände von kultivierten Pankreaskarzinomzellen beobachtet werden. Bei vorheriger Inkubation der Karzinomzellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen TGFβ1, FGF2 und PDGF ließen sich diese Stimulationseffekte deutlich reduzieren (Bachem et al. 2005).

Unter veränderten experimentellen Bedingungen verursacht TGFβ auf den gleichen Zelltyp verschiedene Effekte. Früh kultivierte PSC zeigen eine andere ECM-Expression und eine andere Reaktion auf die Stimulation mit

Wachstumsfaktoren als andere Fibroblasten (Knittel et al. 1996, Knittel et al. 1999). Dies lässt darauf schließen, dass noch andere Signale und Wachstumsfaktoren in die Regulation der extrazellulären Matrix einbezogen sind.
Die vorliegende Studie zeigt, dass einer dieser Faktoren CTGF sein kann. CTGF stimuliert die Synthese von Fibronektin und Kollagen Typ I in Fibroblasten die TGFβ ausgesetzt waren (Grotendorst et al. 1997). In der vorliegenden Studie belegt die Tatsache, dass TGFβ die Fibronektinexpression nicht direkt beeinflusst, die Idee, dass die TGFβ-Effekte auf Fibronektin zumindest teilweise durch Induktion von zusätzlichen Wachstumsfaktoren vermittelt sind und betont die Komplexität in der Kontrolle der ECM-Zusammensetzung *in vivo*.

Die Komplexität der ECM-Kontrolle durch TGFβ lässt sich auch durch die Beobachtung der Regulation von Kollagen Typ IV in diesem TGFβ1-transgenen *in-vivo*-Mausmodell hervorheben. Daten von kultivierten hepatischen Sternzellen zeigen eine Induktion von Kollagen Typ IV durch TGFβ (Knittel et al. 1996). Trotz der Induktion von Kollagen Typ IV auf mRNA-Ebene bleibt der Proteinlevel über die untersuchten Zeitpunkte der TGFβ-transgenen Maus, verglichen mit dem Wildtyp, konstant (Vogelmann et al. 2001).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass FGF2 die Expression und Synthese von Kollagen Typ I *und* Fibronektin in kultivierten pankreatischen Sternzellen der TGFβ-transgenen Maus stimuliert (Vogelmann et al. 2001). Wie oben kurz umrissen, wurde für FGF2 die Induktion der Kollagen– und Fibronektin-Expression in menschlichen PSC und Fibroblasten aus Pankreasgewebe gezeigt (Bachem et al. 1998, Menke et al. 1999). Im Pankreas konnten die pankreatischen Sternzellen aus der TGFβ-transgenen Maus an Tag 70 nach der Geburt aufgezeigt werden. Zu diesem Zeitpunkt war die Expression von FGF2 erhöht und, wie bei kultivierten PSC bereits gezeigt, vermehrt Kollagen und Fibronektin vorhanden. Dies deutet auf den zusätzlichen Effekt von FGF2 und, wie oben schon ausgeführt, CTGF, auf die Fibronektin- und Kollagenproduktion im TGFβ1-transgenen Mausmodell als mögliche Cofaktoren bei der Induktion einer Pankreasfibrose ab dem 70. Lebenstag.

Die Entstehung einer chronischen Pankreatitis beim Menschen ist in den meisten Fällen, nämlich bei über 70% der Betroffenen, durch Alkoholkonsum bedingt. Es kommt zu Atrophien der Azini mit begleitendem Entzündungsreiz und anschließender Fibrosierung des Pankreas (Goebell 1994).
Ein Mausmodell einer alkoholabhängigen chronischen Pankreatitis entwickelte Perides. Im Vergleich zu normal gefütterten Mäusen bewirkt eine akute caerulein-induzierte Pankreatitis bei Mäusen, die über acht Wochen hinweg 24% ihrer Kalorien durch Alkohol erhielten, eine Zunahme von Kollagen, α-Glattmuskelaktin und TGFβ1 (Perides et al. 2005).
Das Risiko der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis steigt bei hohem täglichen Alkoholkonsum sowie auch bei Langzeitkonsum von über 35 Jahren. Ein nutritiv bedingter Mangel an Vitamin E und gesättigten Fettsäuren scheint zusätzlich eine Rolle bei der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis zu spielen (Lin et al. 2001). Eine Verminderung von Vitamin E im Serum konnte bei Patienten mit akuter und chronischer Pankreatitis sowie insbesondere bei Patienten mit Adenokarzinomen des Pankreas nachgewiesen werden (Wang et al. 2002).
Ob Alkohol die Fibrose des Pankreas direkt stimulieren kann, war die Frage einer Studie von Apte et al. (Apte et al. 2000). Dabei wurden pankreatische Sternzellen von Ratten in Zellkultur mit Ethanol oder Acetaldehyd inkubiert. Und tatsächlich führte dies zu einer Aktivierung der pankreatischen Sternzellen, außerdem zu einer intrazellulären Lipidperoxidation. Diesen Veränderungen konnte mit dem Antioxidans Vitamin E vorgebeugt werden.
Ob eine Therapie mit Vitamin E die Entstehung einer chronischen Pankreatitis beim Menschen verhindern oder zumindest günstig beeinflussen könnte, wäre ein möglicher Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis konnte im Tiermodell durch Hemmung von Angiotensin II erreicht werden.
Angiotensin converting enzyme (ACE) - Hemmer sowie Angiotensin-II-Rezeptor-antagonisten sind in der antihypertensiven Therapie durch Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems etabliert.
Bei Ratten, welche über zehn Wochen den ACE-Hemmer Lisinopril über das Trinkwasser einnahmen, konnte bei chronischer Pankreatitis die Überexprimierung

von TGFβ1 unterdrückt werden. Es bildete sich deutlich weniger fibrotisches Gewebe bei reduzierter Anzahl aktivierter pankreatischer Sternzellen (Kuno et al. 2003). Gleiche Effekte konnten auch durch den Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten Candesartan erzielt werden (Yamada et al. 2003).
Kombiniert scheinen Lisinopril und Candesartan synergistisch zu wirken. Bereits bei deutlich niedrigeren Dosen als bei einer jeweiligen Monotherapie konnte die Überexprimierung von TGFβ1, TNFα sowie PDGF B unterdrückt werden. Die Anzahl pankreatischer Sternzellen war reduziert, es fand sich weniger fibrotisches Gewebe im Pankreas (Yamada et al. 2005).
Ob die Einnahme von ACE-Hemmern oder Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten bei chronischer Pankreatitis bei Patienten eine sinnvolle Therapiemaßnahme sein könnte werden weitere Studien zeigen müssen.

Metalloproteasen scheinen eine große Rolle bei physiologischen Resorptionsvorgängen extrazellulärer Matrix, zum Beispiel bei postnatalen Umbauvorgängen, zu spielen. Außerdem sind sie auch bei pathologischer Resorption extrazellulärer Matrix beteiligt, zum Beispiel bei lokalem invasiven Wachstum oder Metastasierung maligner Tumoren und bei der Gelenkzerstörung bei rheumatoider Arthritis (Krane 1994, Woessner 1994, Brown 1997).
Im Pankreas sind Metalloproteasen während der Regeneration einer akuten Entzündung beim Abbau der entstandenen extrazellulären Matrix physiologischerweise mitbeteiligt. Nach caerulein-induzierter Pankreatitis lassen sich erhöhte mRNA-Level von Typ IV-Kollagenase (MMP-2), stromelysin (MMP-3) und tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) sowie erhöhte Proteinlevel von MMP-2 und MMP-3 messen. Mittels einer Inhibition von TGFβ1 durch entsprechende Antikörper konnte die Transkription von MMP-3 signifikant reduziert werden (Müller-Pillasch et al. 1997). Auch im Mausmodell der alkoholabhängigen chronischen Pankreatitis ist MMP-9 erniedrigt sowie TIMP-1 erhöht (Perides et al. 2005). Kultivierte pankreatische Sternzellen reagieren auf Stimulation mit TGFβ1 mit gesteigerter Kollagensynthese, MMP-3 und MMP-9 werden herunterreguliert. Dieser Effekt kann durch Inhibition von TGFβ1 durch neutralisierende Antikörper aufgehoben beziehungsweise umgekehrt werden (Shek et al. 2002). Ein mitbeeinflussender hemmender Effekt von TGFβ1 auf die

Resorption von ECM nach akuter Pankreatitis durch Verminderung von Metalloproteasen kann also angenommen werden, hierdurch wäre ein Übergang in eine chronische Pankreatitis begünstigt.

Der Verlauf der chronischen Pankreatitis beim Menschen ist durch den progredienten Charakter der Erkrankung vorgegeben (Goebell 1994). Dies gilt meist leider auch bei Beseitigung der primären Krankheitsursache. Als Erklärungsmodell hierfür ist eine autokrine Stimulation durch TGFβ denkbar:
Nach caerulein-induzierter Pankreatitis kommt es neben Produktion von extrazellulärer Matrix auch zur signifikanten Expression von TGFβ1 und TGFβ2 (Maximum an Tag 2) und zur Erhöhung der korrespondierenden Rezeptoren TβRI und TβRII (Maxima der mRNA beider Rezeptoren an Tag 2, beziehungsweise der entsprechenden Proteinlevel an Tag 3). Die Injektion von neutralisierenden Antikörpern gegen TGFβ1 während der Induktion der akuten Pankreatitis reduzierte den mRNA-Level von TGFβ1, die Expression und Ablagerung von Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Fibronektin sowie bei kultivierten Zellen den Anstieg des Rezeptors TβRI. Diese Ergebnisse zeigen eine autokrine Stimulation durch TGFβ1 auf (Menke et al. 1999).
In der vorliegenden Arbeit wurde eine drastische Erhöhung von TGFβ1 in steigenden Altersstufen (9,8-fach an Tag 14, 15,8-fach an Tag 70 verglichen mit dem Wildtyp) gemessen, möglicherweise als Ausdruck einer autokrinen Stimulation.
Untersuchungen zeigen, dass TGFβ1 auf autokrinem Weg die extrazelluläre Matrixsynthese bei den pankreatischen Sternzellen stimulieren kann. Diese autokrine TGFβ-Schleife kann zumindest bei kultivierten pankreatischen Sternzellen durch Antisense-Oligonukleotide unterbrochen werden (Kandenwein 2000). Durch komplementäre Basenpaarung mit der Sequenz der mRNA des Zielproteins verhindern sie die Translation und Bildung des Zielproteins. Eine wiederholte Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden zu PSC konnte die Synthese von Kollagen Typ I signifikant hemmen (Bachem et al. 1999).
Eine Unterbrechung der autokrinen Stimulation als möglicher Ansatz einer Therapie bei chronischer Pankreatitis wäre durch eine Inhibition von TGFβ durch

entsprechende Antikörper oder durch Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden denkbar.

Die vorliegende Studie gibt unter anderem Einblick in die komplexe Regulation der extrazellulären Matrix durch Wachstumsfaktoren. Die gezielte Beeinflussung von Wachstumsfaktoren (Inhibition oder Stimulation) könnte ein möglicher Therapieansatz bieten, um die Progression der Fibrose in entzündlichen Pankreaserkrankungen positiv zu beeinflussen.
Um das genaue Zusammenspiel verschiedenster Faktoren sowie die Komplexität der Entstehung und Beeinflussung von Fibrose in entzündlichen Pankreas-erkrankungen zu verstehen werden weitere Studien nötig sein.

5. Zusammenfassung

Der Verlauf der chronischen Pankreatitis beim Menschen ist durch den progredienten, bisher nicht ausreichend beeinflussbaren Charakter der Erkrankung mit Fibrosierung des Organs vorgegeben. Zur Erforschung der pathophysiologischen zellulären und molekularen Mechanismen wurden verschiedene Modelle der Pankreatitis entwickelt.
In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von TGFβ1 (transforming growth factor beta 1) auf die Entwicklung der Pankreasfibrose in einem transgenen Mausmodell mit selektiver Überexprimierung von TGFβ1 im Pankreas analysiert.

Hierbei zeigte sich histologisch eine im Laufe des Lebensalters fortschreitende Fibrosierung, wobei immunhistochemisch die extrazelluläre Matrix in frühen Stadien hauptsächlich aus Kollagen I und Kollagen III bestand, in fortgeschrittenen Stadien konnten, bei etwa gleichbleibendem Kollagengehalt (colorimetrische Kollagenbestimmung), zusätzlich Ablagerungen von Fibronektin nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ließen sich auch auf Proteinebene (Western Blot) sowie mRNA-Ebene (Northern Blot) verifizieren.

Parallel zu der ansteigenden Fibronektinkonzentration in älteren Tieren zeigte sich, neben der transgen-bedingten Überexprimierung von TGFβ1, ein signifikanter Anstieg anderer Wachstumsfaktoren, insbesondere von CTGF (connective tissue growth factor) sowie FGF2 (fibroblast growth factor 2; Ermittlung mittels RT-PCR (reverse Transkriptionspolymerasekettenreaktion) und Northern Blot).

Als mögliche Quelle der entstandenen extrazellulären Matrix konnten pankreatische Sternzellen (pancreatic stellate cells) nachgewiesen werden. In Wildtypmäusen stellten sich diese nicht dar, in den Immunfluoreszenzfärbungen (Antikörper gegen α-Glattmuskelaktin) von TGFβ1-transgenem Pankreasgewebe zeigte sich jedoch eine mit dem Alter ansteigende Anzahl pankreatischer Sternzellen insbesondere in den fibrotischen Arealen.

Es wurde gezeigt, dass transgene Mäuse, die selektiv TGFβ1 im Pankreas überexprimieren, eine erhöhte Synthese und Ablagerung extrazellulärer Matrix im Pankreasgewebe aufweisen. Als Quelle dieser Ansammlung extrazellulärer Matrix konnten pankreatische Sternzellen identifiziert werden. An frühen Zeitpunkten (14 und 70 Tage nach der Geburt) besteht die abgelagerte extrazelluläre Matrix hauptsächlich aus Kollagen Typ I und III, hierbei ist als Wachstumsfaktor TGFβ1 erhöht. Mit fortschreitendem Alter und Fibrosierung wird Fibronektin zunehmend zu einem Bestandteil der extrazellulären Matrix parallel zu einer Erhöhung weiterer Wachstumsfaktoren, insbesondere CTGF und FGF2.
TGFβ1 scheint in den transgenen Mäusen in frühen Stadien vermutlich allein die Pankreasfibrose zu induzieren, in späteren Stadien könnten CTGF sowie FGF2 Cofaktoren sein.

Theoretisch ist insgesamt eine Regulation der extrazellulären Matrix durch Induktion von zusätzlichen Wachstumsfaktoren durch TGFβ1 beziehungsweise generell durch Wachstumsfaktoren denkbar. Um das genaue Zusammenspiel der Wachstumsfaktoren und die Komplexität der Entstehung von Fibrose in entzündlichen Pankreaserkrankungen zu verstehen, werden weitere Studien nötig sein. Vielleicht könnte in Zukunft über eine gezielte Beeinflussung von Wachstumsfaktoren therapeutisch der progrediente Charakter der Pankreasfibrose bei chronischer Pankreatitis positiv beeinflusst werden.

Literaturverzeichnis

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.: Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, Chapman & Hall, London, Glasgow, Weinheim, 1995, S. 1057.

Anzano M.A., Roberts A.B., Smith J.M., Sporn M.B., De Larco J.E.: Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 80: 6264-6268, 1983.

Apte M.V., Haber P.S., Applegate T.L., Norton I.D., McCaughan G.W., Korsten M.A., Pirola R.C., Wilson J.S.: Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 43: 128-133, 1998.

Apte M.V., Haber P.S., Darby S.J., Rodgers S.C., McCaughan G.W., Korsten M.A., Pirola R.C., Wilson J.S.: Pancreatic stellate cells are activated by proflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. Gut 44: 534-541, 1999.

Apte M.V., Phillips P.A., Fahmy R.G., Darby S.J., Rodgers S.C., McCaughan G.W., Korsten M.A., Pirola R.C., Naidoo D., Wilson J.S.: Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. Gastroenterology 118: 780-794, 2000.

Bachem M.G., Schmid-Kotsas A., Kadlec N., Kandenwein J., Schmid R., Menke A., Adler G., Siech M., Beger H., Grünert A.: An antisense oligonucleotide binding to the promoteter region ot the TGFβ1 Gene reduces autocrine stimulated collagen type I and fibronectin synthesis of cultured pancreatic stellate cells. Pancreas 19, 1999.

Bachem M.G., Schneider E., Gross H., Weidenbach H., Schmid R.M., Menke A., Siech M., Beger H., Grunert A., Adler G.: Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. Gastroenterology 115: 421-432, 1998.

Bachem M.G., Schunemann M., Ramadani M., Siech M., Beger H., Buck A., Zhou S., Schmid-Kotsas A., Adler G.: Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. Gastroenterology 128: 907-921, 2005.

Balaz P., Friess H., Büchler M. W.: Growth factors in pancreatic health and disease. Pancreatology 1: 343-355, 2001.

Böttinger E.P., Jakubczak J. L., Roberts I. S. D., Mumy M., Hemmati P., Bagnall K., Merlino G., Wakefield L. M.: Expression of a dominant-negative mutant TGF-β type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF-β in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. EMBO J 16, 2621-2633, 1997.

Bockman D.E., Merlino G.: Cytological changes in the pancreas of transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. Gastroenterology 103: 1883-1892, 1992.

Broekelmann T.J., Limper A.H., Colby T.V., Mc Donald J. A.: Transforming growth factor-β1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA 88: 6642-6646, 1991.

Brown P.D.: Matrix metalloproteinase inhibitors in the treatment of cancer. Med Oncol 14: 1-10, 1997.

Castilla A., Prieto J., Fausto N.: Transforming growth factor β1 and α in chronic liver disease: effects of interferon alpha therapy. N Engl J Med 324: 933-940, 1991.

Chomczynski P. and Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159, 1987.

Creely J.J., DiMari S.J., Howe A.M., Haralson M. A.: Effects of transforming growth factor-beta on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. Am J Pathol 140: 45-55, 1992.

Czaja, M.J., Weiner F.R., Flanders K.C., Giambrone M.A., Wind R., Biempica L., Zern M A.: In vitro and in vivo association of transforming growth factor β1 with hepatic fibrosis. J Cell Biol 108: 2477-2482, 1989.

Dean D.C., Newby R.F., Bourgeois S.: Regulation of fibronectin biosynthesis by dexamethasone, transforming growth factor beta, and cAMP in human cell lines. J Cell Biol 106: 2159-2170, 1988.

De Larco J.E., Todaro G.J.: Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4001-4005, 1978.

Di-Mola F.F., Friess H., Martignoni M.E., Di-Sebastiano P., Zimmermann A., Innocenti P., Graber H., Gold L.I., Korc M., Buchler M.W.: Connective tissue growth factor is a regulator for fibrosis in human chronic pancreatitis. Ann Surg 230: 63-71, 1999.

Drago J., Nurcombe V., Pearse M.J., Murphy M., Bartlett P.F.: Basic fibroblast growth factor upregulates steady-state levels of laminin B1 and B2 chain mRNA in cultured neuroepithelial cells. Exp Cell Res 196: 246-254, 1991.

Ebert M., Yokoyama M., Ishiwata T., Friess H., Buchler M. W., Malfertheiner P., Korc M.: Alteration of fibroblast growth factor and receptor expression after acute pancreatitis in humans. Pancreas 18: 240-246, 1999.

Eghbali-Fatourechi G., Sieck G.C., Prakash Y.S., Maercklein P., Gores G.J., Fitzpatrick L A.: Type I procollagen production and cell proliferation is mediated by

transforming growth factor-beta in a model of hepatic fibrosis. Endocrinology 137: 1894-1903, 1996.

Ellenrieder V., Schneiderhan W., Bachem M., Adler G.: Fibrogenesis in the pancreas. Rocz Akad Med Bialymst 49: 40-46, 2004.

Elsässer H.P., Adler G., Kern H.F.: Fibroblast structure and function during regeneration from hormone-induced acute pancreatitis in the rat. Pancreas 4: 169-178, 1989.

Elsässer H.P., Haake T., Grimmig M., Adler G., Kern H.F.: Repetitive cerulein-induced pancreatitis and pancreatic fibrosis in the rat. Pancreas 7: 385-390, 1992.

Friess H., Yamanaka Y., Buchler M., Beger H.G., Do D.A., Kobrin M.S., Korc M.: Increased expression of acidic and basic fibroblast growth factors in chronic pancreatitis. Am J Pathol 144: 117-128, 1994.

Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M.: A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 6: 995-1001, 1996.

Goebell H.: Chronische Pankreatitis – Ätiologie und Pathogenese. In: Innere Medizin, herausgegeben von Classen M., Diehl V., Kochsiek K., 3. neubearbeitete Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, S. 711-712, 1994.

Gress T.M., Menke A., Bachem M., Müller-Pillasch F., Ellenrieder V., Weidenbach H., Wagner M., Adler G.: Role of extracellular matrix in pancreatic diseases. Digestion 59: 625-637, 1998.

Gress T.M., Müller-Pillasch F., Elsässer H.P., Bachem M., Ferrara C., Weidenbach H., Lerch M., Adler G.: Enhancement of transforming growth factor beta 1 expression in the rat pancreas during regeneration from coerulein-induced pancreatitis. Eur J Clin Invest 24: 679-685, 1994.

Gressner A.M., Bachem M.G.: Molecular mechanisms of liver fibrogenesis – a homage to the role of activated fat-storing cells. Digestion 56: 335-346, 1995.

Grotendorst G.R.: Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. Cytokine Growth Factor Rev 8: 171-179, 1997.

Haber P.S., Keogh G.W., Apte M.V., Moran C.S., Stewart N.L., Crawford D.H., Pirola R.C., McCaughan G.W., Ramm G.A., Wilson J.S.: Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. Am J Pathol 155: 1087-1095, 1999.

Herold, G.: Akute und chronische Pankreatitis. In: Innere Medizin, herausgegeben von Herold G., Herold, Köln, S. 423-424; S. 428-429, 2005.

Hurley M.M., Abreu C., Harrison J.R., Lichtler A.C., Raisz L.G., Kream B.E.: Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. J Biol Chem 268: 5588-5593, 1993.

Ikejiri, N.: The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas. Kurume Med J 37: 67-81, 1990.

Jaskiewicz K., Nalecz A., Rzepko R., Sledzinski Z.: Immunocytes and activated stellate cells in pancreatic fibrogenesis. Pancreas 26: 239-242, 2003.

Kandenwein J.A.: Nachweis einer autokrinen Stimulation der extrazellulären Matrixsynthese bei kultivierten humanen pankreatischen Sternzellen über TGFβ1. Medizinische Dissertation, Universität Ulm, 2001.

Kennedy R.H., Bockman D.E., Uscanga L., Choux R., Grimaud J.A., Sarles H.: Pancreatic extracellular matrix alterations in chronic pancreatitis. Pancreas 2: 61-72, 1987.

Klöppel G., Heitz, Ph. U.: Pankreas. In: Pathologie, herausgegeben von Böcker W., Denk, H., Heitz Ph. U., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, S. 719-721, 1997.

Klöppel G., Maillet B.: The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. Virchows Arch 420: 1-4, 1992.

Knittel T., Janneck T., Muller L., Fellmer P., Ramadori G.: Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. Hepatology 24: 352-360, 1996.

Knittel T., Kobold D., Saile B., Grundmann A., Neubauer K., Piscaglia F., Ramadori G.: Rat liver myofibroblasts and lineage with fibrogenic potential. Gastroenterology 117: 1205-1221, 1999.

Krane S.M.: Clinical importance of metalloproteinases. Ann N Y Acad Sci 732: 1-10, 1994.

Kuno A., Yamada T., Masuda K., Ogawa K., Sogawa M., Nakamura S., Nakazawa T., Ohara H., Nomura T., Joh T., Shirai T., Itoh M.: Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. Gastroenterology 124: 1010-1019, 2003.

Kuo N.T., Norman J.T., Wilson P.D.: Acidic FGF regulation of hyperproliferation of fibroblasts in human autosomal dominant polycystic kidney disease. Biochem Mol Med 61: 178-191, 1997.

Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.

Laird P.W., Zijderveld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenisch R., Berns A.: Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nucleic Acids Res 19: 4293, 1991.

Lee M.S., Gu D., Feng L., Curriden S, Arnush M., Krahl T., Gurushanthaiah D., Wilson C., Loskutoff D.L., Fox H.: Accumulation of extracellular matrix and developmental dysregulation in the pancreas by transgenic production of transforming growth factor-beta 1. Am J Pathol 147: 42-52, 1995.

Lin Y., Tamakoshi A., Hayakawa T., Ogawa M., Ohno Y.: Associations of alcohol drinking and nutrient intake with chronic pancreatitis: findings from a case-control study in Japan. Am J Gastroenterol 96: 2622-2627, 2001.

López-de León A., Rojkind M.: A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. J Histochem Cytochem 33: 737-743, 1985.

Massague J., Weis Garcia F.: Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. Cancer Surv 27: 41-64, 1996.

Menke A., Geerling I., Giehl K., Vogelmann R., Reinshagen M., Adler G.: Transforming growth factor-beta-induced upregulation of transforming growth factor-beta receptor expression in pancreatic regeneration. Biochim Biophys Acta 1449: 178-185, 1999.

Menke A., Lutz M.P., Ludwig C.U., Gress T.M., Adler G.: Regeneration after acute pancreatitis: influences of peptide growth factors. In: Acute Pancreatitis – Novel Concepts in Biology and Therapy, herausgegeben von Büchler M., Uhl W., Friess H., Malfertheiner P., Blackwell Wissenschaft, Berlin, S. 129-141, 1999.

Menke A., Yamaguchi H., Gress T.M., Adler G.: Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor beta 1 in pancreatitis in the rat. Gastroenterology 113: 295-303, 1997.

Müller-Pillasch F., Gress T.M., Yamaguchi H., Geng M., Adler G., Menke A.: The influence of transforming growth factor beta 1 on the expression of genes coding for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during regeneration from cerulein-induced pancreatitis. Pancreas 15: 168-175, 1997.

Müller-Pillasch F., Menke A., Yamaguchi H., Elsässer HP., Bachem M., Adler G., Gress TM.: TGFbeta and the extracellular matrix in pancreatitis. Hepatogastroenterology 46: 2751-2756, 1999.

Neuschwander-Tetri B.A., Bridle K.R., Wells L.D., Marcu M., Ramm G.A.: Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells. Lab Invest 80: 143-150, 2000.

Okuda S., Languino L.R., Ruoslahti E., Borde W.A.: Elevated expression of transforming growth factor-β and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. J Clin Invest 86: 453-462,1990.

Perides G., Tao X., West N., Sharma A., Steer M.L.: A mouse model of ethanol dependent pancreatic fibrosis. Gut 54: 1461-1467, 2005.

Roberts A.B., Anzano M.A., Meyers C.A., Wideman J., Blacher R., Pan Y.C., Stein S., Lehrman S.R., Smith J.M., Lamb L.C., et al: Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. Biochemistry 22: 5692-5698, 1983.

Roberts A.B., Frolik C.A., Anzano M.A., Sporn M.B.: Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. Fed Proc 42: 2621-2626, 1983.

Roberts A.B., Sporn M.B.: The transforming growth factor beats. In: Peptide Growth Factors and Their Receptors - Handbook of Experimental Pathology, herausgegeben von Sporn M.B. Roberts A.B., Springer, Heidelberg, S. 419-472, 1990.

Rosenbaum J., Blazejewski S., Preaux A.M., Mallat A., Dhumeaux D., Mavier P.: Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta 1 interactions in human liver myofibroblasts. Gastroenterology 109: 1986-1996, 1995.

Sanvito F., Nichols A., Herrera P.L., Huarte J., Wohlwend A., Vassalli J.D., Orci L.: TGF-beta 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF-alpha, triggers insulin-dependent diabetes. Biochem Biophys Res Commun 217: 1279-1286, 1995.

Saotome T., Inoue H., Fujimiya M., Fujiyama Y., Bamba T.: Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. Pancreas 14: 373-382, 1997.

Schneider E.: Morphologische und biochemische Charakterisierung pankreatischer Sternzellen – Identifizierung polypeptidartiger Wachstumsfaktoren als fibrogene Mediatoren dieser Zellen. Medizinische Dissertation, Universität Ulm, 2001.

Senoo, H.: Structure and function of hepatic stellate cells. Med Electron Microsc 37: 3-15, 2004.

Shek F.W., Benyon R.C., Walker F.M., McCrudden P.R., Pender S.L., Williams E.J., Johnson P.A., Johnson C.D., Bateman A.C., Fine D.R., Iredale J.P.: Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. Am J Pathol 160: 1787-1798, 2002.

Stevens A., Lowe J.: Extrazelluläre Matrix. In: Histologie des Menschen, 2. Auflage, Chapman & Hall, London, Glasgow, Weinheim, 1997, S. 49–57.

Tan E.M., Rouda S., Greenbaum S.S., Moore J.H. Jr., Fox J.W. IV., Sollberg S.: Acidic and basic fibroblast growth factors down-regulate collagen gene expression in keloid fibroblasts. Am J Pathol 142: 463-470, 1993.

Valderrama R., Navarro S., Campo E., Camps J., Gimenez A., Parés A., Caballeria J.: Quantitative measurement of fibrosis in pancreatic tissue. Int J Pancreatol 10: 23-29, 1991.

Van Laethem J.L., Devière J., Résibois A., Rickaert F., Vertongen P., Ohtani H., Cremer M., Miyazono K., Robberecht P.: Localization of transforming growth factor beta 1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis. Gastroenterology 108: 1873-1881, 1995.

Van Laethem J.L., Robberecht P., Résibois A., Devière J.: Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice. Gastroenterology 110: 576-582, 1996.

Vogelmann R., Ruf D., Wagner M., Adler G., Menke A.: Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGFβ1 transgenic mouse model. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280: 164-172, 2001.

Wang D.F., Qu X.C., Dai Z.Q.: Alteration of Vitamin E levels in patients with pancreatic adenocarcinoma. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 22: 210-211, 2002.

Wells R.G.: The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. J Clin Gastroenterol 39: 158-161, 2005.

Wenger C., Ellenrieder V., Alber B., Lacher U., Menke A., Hameister H., Wilda M., Iwamura T., Beger H.G., Adler G., Gress T.M.: Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells. Oncogene 18: 1073-1080, 1999.

Woessner J.F.: The family of matrix metalloproteinases. Ann N Y Acad Sci 732: 11-21, 1994.

Yamada T., Kuno A., Masuda K., Ogawa K., Sogawa M., Nakamura S., Ando T., Sano H., Nakazawa T., Ohara H., Nomura T., Joh T., Itoh M.: Candesartan, an angiotensin II receptor antagonist, suppresses pancreatic inflammation and fibrosis in rats. J Pharmacol Exp Ther 307: 17-23, 2003.

Yamada T., Kuno A., Ogawa K., Tang M., Masuda K., Nakamura S., Ando T., Okamoto T., Ohara H., Nomura T., Joh T., Shirai T., Itoh M.: Combination therapy

with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor blocker synergistically suppresses chronic pancreatitis in rats. J Pharmacol Exp Ther 313: 36-45, 2005.

Yoo B.M., Yeo M., Oh T.Y., Choi J.H., Kim W.W., Kim J.H., Cho S.W., Kim S.J., Hahm K.B.: Amelioration of pancreatic fibrosis in mice with defective TGF-beta signaling. Pancreas 30: 71-79, 2005.

6. Veröffentlichungen

Abstract:

Vogelmann R., Ruf D., Wagner M., Wenger C., Gress T.M., Adler G., Menke A.: Development of pancreatic fibrosis in a TGFβ1 transgenic mouse. Gastroenterology 116: G 5090, 1999.

Publikation:

Vogelmann R., Ruf D., Wagner M., Adler G., Menke A.: Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGFβ1 transgenic mouse model. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280: 164-172, 2001.