

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen pankreatischer Sternzellen nach G-Protein gekoppelter Stimulation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der

Universität Hamburg

vorgelegt von:

Ameli Maria Schuster

aus Bremerhaven

Hamburg 2013

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.02.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Andrea Pace

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Stefan Kindler

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Martin Horstmann

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die chronische Pankreatitis	1
1.1.1 Die Rolle der pankreatischen Sternzellen.....	2
1.1.2 Die Aktivierung der PSC	3
1.1.3 Die Rolle des Cholezystokinins und seiner Rezeptoren	6
2 ZIEL DER ARBEIT	8
3 MATERIAL UND METHODEN	9
3.1 Material.....	9
3.1.1 Chemikalien.....	9
3.1.2 Puffer	11
3.1.3 Stimulanzen und Inhibitoren	13
3.1.4 Antikörper.....	13
3.1.5 Verbrauchsmaterial.....	14
3.1.6 Geräte.....	15
3.2 Methoden	16
3.2.1 Zellisolation	16
3.2.2 Zellkultivierung	18
3.2.3 Passagieren der Zellen	19
3.2.4 Zellaussaat für die Stimulationsversuche	20
3.2.5 Zellstimulation und Versuchsaufbau	20
3.2.6 Methoden der Proteinanalyse	21
3.2.7 Western Blot SDS-Page	22
3.2.8 Densitometrische und statistische Auswertung.....	24
4 ERGEBNISSE	25
4.1 Untersuchung des dosisabhängigen Effekts vom CCK1R-Agonisten und JMV-180	25
4.1.1 Der dosisabhängige Effekt von CCK1R-A und JMV nach 2,5 min auf pAkt im Vergleich mit CCK und Gastrin.....	25
4.1.2 Der dosisabhängige Effekt von CCK1R-A und JMV nach 5 min auf pERK im Vergleich mit CCK und Gastrin.....	27

4.2 Der Einfluss der Proteinkinase C nach G-Protein gekoppelter Stimulation	28
4.2.1 Der PKC-Einfluss auf pPKD1	28
4.2.2 Der PKC-Einfluss auf pERK.....	29
4.2.3 Der PKC-Einfluss auf pSrc	31
4.3 Die Rolle des intrazellulären Calciums nach G-Protein gekoppelter Stimulation	32
4.3.1 Der Einfluss des intrazellulären Calciums auf pPKD1	32
4.3.2 Der Einfluss des intrazellulären Calciums auf pERK	34
4.3.3 Der Einfluss des intrazellulären Calciums auf pSrc	35
4.4 Die Rolle der Src-Family-Kinasen nach G-Protein gekoppelter Stimulation	37
4.4.1 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pPKD1	37
4.4.2 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pERK	38
4.4.3 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pSrc	39
4.4.4 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pAkt	41
4.4.5 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pELK.....	42
5 DISKUSSION.....	45
5.1 Die Bedeutung der Phospholipase C für verschiedene Proteine	46
5.2 Die Wirkung der Src-Family-Kinasen auf verschiedene Proteine.....	50
5.3 Ausblick	54
6 ZUSAMMENFASSUNG	55
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	56
8 DANKSAGUNG.....	65
9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	66

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfate
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninsäure (= <u>b</u> icin <u>ch</u> oninic <u>a</u> cid)
BSA	Rinderserumalbumin (= bovine serum albumine)
cAMP	cyclic Amino-Monophosphat
CCK	Cholezystokinin
CCK1R	Cholezystokinin-Rezeptor 1
CCK1R-A	Cholezystokinin-Rezeptor 1-Agonist
CCK2R	Cholezystokinin-Rezeptor 2
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonucleinsäure
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrixproteine (= extra cellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular-regulated Kinase 1 and 2
FCS	fetales Kälberserum
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GI	gastrointestinal
GPCR	G-protein coupled receptor
HRP	Horseradish Peroxidase
kDa	Kilodalton
l	Liter
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar

NaCl	Natriumchlorid
NEAS	nicht essentielle Aminosäuren
nM	nanomolar
p	phospho
PBS	phosphat-buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3 K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)- 7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PP3	4-Amino-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PSC	Pankreatische Sternzellen (= pancreatic stellate cells)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gelelectrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (= standard error of the mean)
SERCA	Sarco-Endoplasmatic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SerP	Serinphosphorylierung
SFK	Src-Family Kinasen
SH	Src Homologie
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Temed	Tetramethylethylaminomethan
TG	Thapsigargin
TPA	12-Otetradecanoylphorbol-13-Acetat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tyr	Tyrosin
TyrP	Tyrosinphosphorylierung
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

Tabelle 1 Abkürzungsverzeichnis

1 EINLEITUNG

1.1 Die chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine Erkrankung, die mit einer ausgesprochen hohen Morbidität und Mortalität einhergeht. Mit einer Prävalenz von 15/100.000 Bevölkerung und einer Inzidenz von 3,5-4/100.000 Bevölkerung wird das eigentliche Ausmaß der Krankheit wahrscheinlich noch unterschätzt, da bei dieser Datenerhebung subklinische Fälle nicht berücksichtigt wurden (Etemad und Whitcomb 2001; Tandon, Sato et al. 2002). Die Tendenz der letzten Jahre ist aufgrund des steigenden Alkoholkonsums der Bevölkerung zunehmend. Im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung ist die Mortalität der Erkrankten um den Faktor 3,6 gesteigert (Banks 2002). Als häufigste Ursache der chronischen Pankreatitis wird mit 55-80% langjähriger Alkoholkonsum angeführt. Es handelt sich dabei um einen Konsum von 150 bis 175 g/Tag über einen Zeitraum von 18 ± 11 Jahren bei Männern und 11 ± 8 Jahren bei Frauen (Etemad und Whitcomb 2001). Aufgrund ihrer Seltenheit treten chronische Pankreatitiden andere Genese, wie z.B. die idiopathische, medikamentös-toxische, genetisch bedingte oder iatrogen induzierte Pankreatitis, eher in den Hintergrund.

Abgesehen von chronisch rezidivierenden Abdominalschmerzen, die eines der Leitsymptome der Krankheit darstellen, wird die Lebensqualität der Patienten, durch die in späteren Stadien auftretende Globalinsuffizienz des Pankreas und die damit erforderlich werdenden Therapien, stark eingeschränkt. Die Entstehung eines Pankreaskarzinoms auf dem Boden einer Pankreasfibrose stellt darüber hinaus eine weitere verheerende Komplikation der chronischen Pankreatitis dar (Talamini, Falconi et al. 1999; Dite, Novotny et al. 2010; Raimondi, Lowenfels et al. 2010).

Im Krankheitsverlauf entsteht eine dauerhafte bzw. rezidivierende Inflammation des pankreatischen Drüsengewebes. Dies stellt sich histopathologisch durch eine Atrophie und Kalzifizierung der Azini dar und resultiert in Veränderungen des duktales Systems. Das Parenchym mitsamt der ursprünglichen glandulären Architektur wird sukzessive und irreversibel zerstört. Während das funktionelle Parenchym abgebaut wird, gewinnt der fibrosierte Anteil des Pankreas an Masse dazu. Klinisch enden diese Prozesse meist in der exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz. Die Patienten leiden an einem Maldigestionssyndroms und einem pankreoprivem Diabetes Mellitus (Deng, Wang et al. 2005; Chen, Unnikrishnan et al. 2011; Ewald, Kaufmann et al. 2011). Der

beschriebene Fibrosierungsprozess des Organs stellt jedoch keinesfalls das Endprodukt der chronischen Entzündung dar, es handelt sich vielmehr um einen dynamischen, aktiven Prozess, welcher sich über mehrere Jahre hinweg stetig entwickelt.

Die Pankreasfibrose ist somit ein wesentliches pathologisches Charakteristikum der chronischen Pankreatitis jeglicher Ätiologie (Haber, Keogh et al. 1999; Apte und Wilson 2004). Sie ist nicht nur eine auftretende Begleiterscheinung der fortschreitenden Erkrankung (Jaster, Sparmann et al. 2002), sondern maßgeblich für deren Progredienz verantwortlich (Jaster und Emmrich 2008). Während die morphologischen und ätiologischen Hintergründe der Erkrankung größtenteils bekannt sind, blieben lange Zeit die grundlegenden molekularen Mechanismen der Fibrose im Unklaren.

Aus der aktuellen Studienlage geht hervor, dass der akuten Pankreatitis u.a. eine Aktivierung der Azinuszellen zugrunde liegt (Saluja, Saluja et al. 1989). Für die chronische Pankreatitis hingegen zeichnet sich immer deutlicher ab, dass hauptsächlich eine Aktivierung der pankreatischen Sternzellen (PSC = pancreatic stellate cells), speziell in Bezug auf die Fibrogenese, von elementarer Bedeutung ist (Apte, Haber et al. 1998; Bachem, Schneider et al. 1998; Apte und Wilson 2004; Berna, Seiz et al. 2010).

1.1.1 Die Rolle der pankreatischen Sternzellen

Im gesunden Pankreas bilden die periazinär verteilten pankreatischen Sternzellen einen Anteil von etwa 4% (Apte, Haber et al. 1998). Die physiologische Rolle der PSC ist bisweilen weitestgehend unbekannt. Aufgrund ihrer perivaskulären und periduktalen Verteilung im Pankreas wird vermutet, dass sie verschiedene Regulatorfunktionen in den entsprechenden Bereichen erfüllen (Masamune, Watanabe et al. 2009).

Das Ruhestadium der PSC ist durch die Nachweisbarkeit Vitamin A-haltiger Lipidtröpfchen gekennzeichnet. Zudem dienen GFAP (= Glial Fibrillary Acidic Protein) und Desmin als Marker für diesen Zustand (Masamune und Shimosegawa 2009). Ruhende PSC erfahren nach Stimulation durch verschiedenen Mediatoren, wie z.B. Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Alkohol und dessen Metaboliten, sowie unter oxydativem Stress bestimmte phänotypische Veränderungen. Die Zellen werden aktiviert und in einen myofibroblastenähnlichen Zelltyp umgewandelt (Apte, Haber et al. 1998; Ohnishi, Miyata et al. 2003; Masamune, Satoh et al. 2010). Die PSC verlieren die Vitamin A-haltigen Lipidtröpfchen, des Weiteren sind GFAP und Desmin nicht mehr nachweisbar. Aktivierte PSC exprimieren stattdessen den Myofibroblastenmarker α -SMA (= Alpha-Smooth Muscle Actin), proliferieren sehr stark und produzieren große

Mengen extrazellulärer Matrixproteine u.a. Kollagen, Laminin und Fibronectin (Apte, Haber et al. 1998; Bachem, Schneider et al. 1998; Korc 2007). Den beschriebenen Aktivierungsprozessen der PSC wird eine grundlegende Rolle für die Entstehung einer Pankreasfibrose im Rahmen einer chronischen Pankreatitis zugeschrieben. Die intrazellulären Effekte der Fibrose-induzierenden Mediatoren werden über verschiedene Signalkaskaden transduziert, bei denen u.a. die Proteine ERK, Akt, Src und PKD1 entscheidend beteiligt sind (Ohnishi, Miyata et al. 2003; Masamune, Satoh et al. 2005; Hama, Ohnishi et al. 2006).

1.1.2 Die Aktivierung der PSC

Zu den Aktivatoren der PSC zählen neben G-Protein gekoppelten Rezeptoren und verschiedenen Wachstumsfaktoren auch Alkohol und dessen Metaboliten. Aus der Aktivierung resultieren Zellproliferation, Zellmigration und die Produktion extrazellulärer Matrixproteine (ECM = extra cellular matrix; Masamune, Satoh et al. 2005; Hama, Ohnishi et al. 2006; Berna, Seiz et al. 2010; Masamune, Satoh et al. 2010). Der Plated derived growth factor (= PDGF) ist als einer der potentesten PSC-Aktivatoren überhaupt bekannt (Luttenberger, Schmid-Kotsas et al. 2000; Kordes, Brookmann et al. 2005). Hauptsächlich vermittelt PDGF seinen Effekt über Phosphorylierung des Proteins ERK (Jaster, Sparmann et al. 2002; Wan, Wang et al. 2005), aber auch Akt, Src und PKD1 spielen bei der Aktivierung zentrale Rollen und fungieren als Mediatoren in profibrogenen Signalwegen (Masamune, Satoh et al. 2005). Neuste Studien deuten stark darauf hin, dass die gastrointestinalen Hormone CCK und Gastrin auf PSC über die Stimulation der G-Protein gekoppelten Rezeptoren CCK1R und CCK2R ähnliche Effekte wie PDGF vermitteln können (siehe 1.1.3), dazu zählen auch die direkte Aktivierung der PSC und die Induktion der Kollagensynthese (Berna, Seiz et al. 2010).

Die Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (= PKC) nimmt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion nach G-Protein gekoppelter Stimulation ein. Der Aktivierung der PKC zugrunde liegend ist die G-Protein getriggerte Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (= PIP₂) durch die Phospholipase C. Die membrangebundene Lipase spaltet PIP₂ in Diacylglycerin (= DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (= IP₃). Während freies IP₃ an das rER bindet und somit die Calciumfreisetzung zur Folge hat, bleibt DAG membrangebunden. Die Ca²⁺-Ionen fungieren als 2nd Messenger und initiieren in

Verbindung mit DAG die Tyrosinphosphorylierung der PKC, welche ihrerseits weitere Proteine phosphoryliert, darunter auch die PKD1 (Brose, Betz et al. 2004).

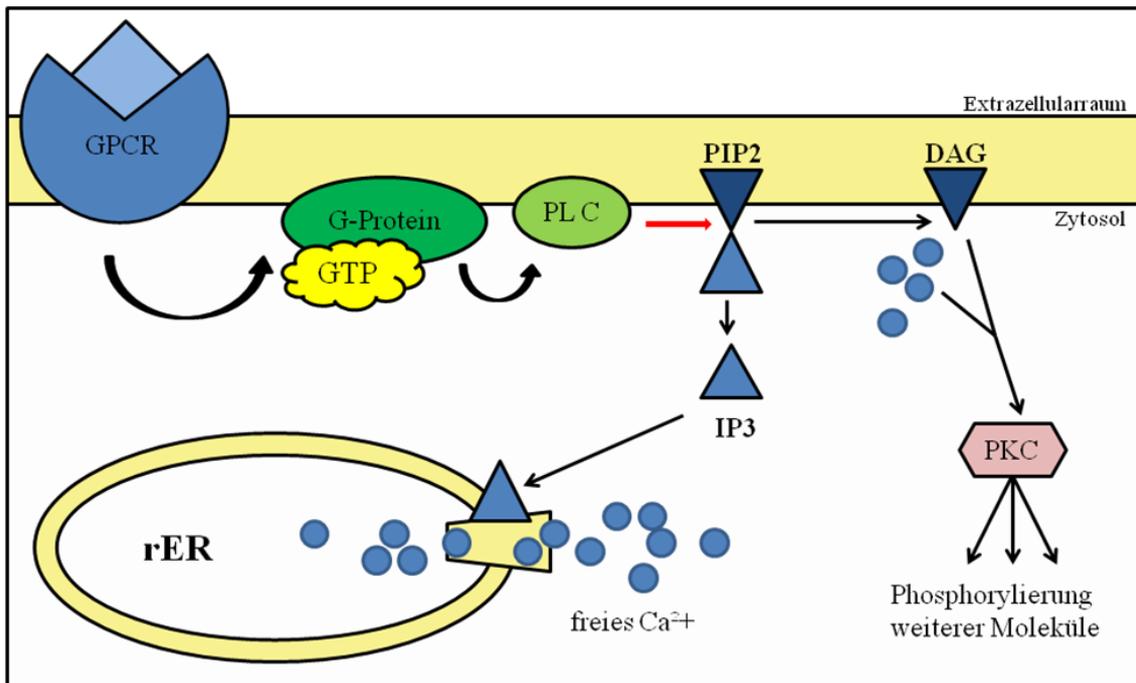


Abbildung 1 Die schematische Darstellung der PKC-Aktivierung nach G-Protein gekoppelter Stimulation. Die zytosolische α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins hält im inaktiven Zustand GDP (= Guanosindiphosphat) gebunden. Nach G-Protein gekoppelter Rezeptorstimulation erfolgt die Phosphorylierung zu GTP (= Guanosintriphosphat). Das nun aktivierte G-Protein aktiviert die PLC, welche wiederum die Hydrolyse von PIP2 (= Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat) zu DAG (= Diacylglycerin) und IP3 (= Inositol-1,4,5-trisphosphat) katalysiert. Das freie IP3 bindet an einen speziellen durch IP3-aktivierten Ca²⁺-Kanal im rER bzw. SR und triggert somit die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Dies hat den intrazellulären Ca²⁺-Anstieg zur Folge. Freies Ca²⁺ fungiert als 2nd Messenger und übernimmt zusammen mit dem membrangebundenen DAG die Aufgabe der PKC-Phosphorylierung. Die aktivierte PKC phosphoryliert weitere zytosolische und nukleare Proteine u.a. die PKD1 und nimmt somit aktiv am Zellzyklusgeschehen teil.

PKD1

Die Proteinkinase D1 (= PKD1) zählt zur Subklasse der AGC-Family Kinasen (AGC = Arginin-directed Kinase). Sie setzt sich aus einer N-terminalen Region, zwei Cysteinreichen Zink-Finger Proteinregionen, einer stark negativ geladenen Aminosäuren Region, einer Pleckstrin-homologen und einer katalytischen Ser/Thr Kinasen Region, dem Activation-Loop, zusammen (Iglesias und Rozengurt 1998; Van Lint, Rykx et al. 2002).

Die Kinase ist an der Regulation der verschiedensten Zellfunktionen beteiligt. Dazu zählen beispielsweise Proteinsekretion (Fugmann, Hausser et al. 2007), Zellproliferation (Rozengurt, Rey et al. 2005), Phosphorylierungen von Hitze-Schock-Proteinen (Yuan und Rozengurt 2008) und Regulatorfunktionen im Apoptosegeschehen (Trauzold, Schmiedel et al. 2003).

Die PKD1 kann durch multiple Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, oxidativen Stress, Thrombin, bioaktive Lipide und GPCR, aktiviert werden (Zugaza, Sinnett-Smith et al. 1996; Waldron und Rozengurt 2000; Storz und Toker 2003; Qiang, Yao et al. 2004). In vivo erfolgt die PKD1-Aktivierung hauptsächlich über die Phosphorylierung von Ser-744 und Ser-748 im Activation-Loop direkt durch eine Form der Proteinkinase C (Waldron, Rey et al. 2001; Storz, Doppler et al. 2004; Rozengurt, Rey et al. 2005).

ERK

ERK 1/2 ist eine Serin/Threonin Kinase, die zu den MAP Kinasen (= mitogen-activated protein kinase) zählt und hauptsächlich über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, aber auch über Tyrosinkinase-rezeptoren und Zytokine, aktiviert wird (Dufresne, Seva et al. 2006). Die Signaltransduktion mittels des ras/raf-ERK 1/2 Weges ist in Bezug auf ihre regulatorische Funktion des Zellwachstums und der -differenzierung weitestgehend gut dokumentiert (Lewis, Shapiro et al. 1998; Chang und Karin 2001).

ERK ist u. a. für die Vermittlung der profibrogenen Signale in PSC nach PDGF-Stimulation verantwortlich. Es wird eine direkte Korrelation zwischen der ERK-Aktivität und der Zellproliferation beschrieben (Jaster, Sparmann et al. 2002).

Src

Die Src-Family Kinasen zählen zur Gruppe der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen. Sie erfüllen zahlreiche Rollen bezüglich Zelladhäsion, -wachstum, -differenzierung und -motilität. In vielen verschiedenen Geweben sind sie maßgeblich an der Transduktion von Wachstumsfaktorsignalen beteiligt (Thomas und Brugge 1997). Auch für PSC wurden regulierende Aufgaben der Src-Kinasen beschrieben. Beispielsweise induziert PDGF Src-abhängig den JAK2-STAT Signalweg, der u. a. die PDGF vermittelte PSC-Aktivierung bedingt (Masamune, Satoh et al. 2005).

Bei den Kinasen handelt sich um zytosolische Proteine, die sich in neun verschiedene Familienmitglieder differenzieren: Src, Lyn, Fyn, Yes, Lck, Hck, Blk, Fgr und Yrk (Van Lint, Rykx et al. 2002; Yeatman 2004; Pace, Tapia et al. 2006). SH2 (= Src Homologie 2), SH3 (= Src Homologie 3) sowie die Kinase katalytische Domäne bilden die drei Hauptdomänen des Src-Proteins. Tyr416 und Tyr527 bilden die Phosphorylierungsstellen der katalytischen Domäne. Src kann über diese Phosphorylierungsstellen aktiviert oder deaktiviert werden und dementsprechend mit weiteren Proteinen aus Membran, Zytosol und Nukleus interagieren.

Die Src-Family Proteine werden u. a. PLC-abhängig aktiviert. Dementsprechend spielen die PKC und das intrazelluläre Calcium eine wesentliche Rolle bei der Src-inkludierenden Signaltransduktion (Pace, Tapia et al. 2006).

Akt

Die PI3-Kinase und deren Downstream-Target Akt, welches den zentralen Mediator der Kinase darstellt, erfüllen insbesondere bei der Apoptoseregulation der Zellen eine herausragende Rolle (Downward 2004). Wird die Kinase aktiviert, vermittelt sie der Zelle Proliferations- und Überlebenssignale und verhindert somit die Apoptose. Die Dysregulation und die ungebremste Aktivierung dieses Signalweges sind kennzeichnend für viele Tumorerkrankungen des Menschen (McCubrey, Steelman et al. 2006; Mattmann, Stoops et al. 2011; Shin-Kang, Ramsauer et al. 2011).

Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase. Die Aktivierung erfolgt über Phosphorylierungen des Activation Loops an Thr308 und des Carboxylendes des Proteins an Ser473 (Alessi, Andjelkovic et al. 1996).

Die PI3-Kinase und somit Akt werden u.a. durch GPCR, PDGF, Insulin und andere Wachstumsfaktoren aktiviert (Burgering und Coffey 1995). Sie sind, abgesehen von ihrer Rolle in der Apoptoseregulation, an der Zellaktivierung und -migration in PSC nach PDGF-Stimulation beteiligt (McCarroll, Phillips et al. 2004; Kordes, Brookmann et al. 2005). Darüber hinaus übernimmt Akt auch regulative Aufgaben im Glykogenstoffwechsel (Hajdich, Litherland et al. 2001).

1.1.3 Die Rolle des Cholezystokinins und seiner Rezeptoren

Das Peptidhormon Cholezystokinin (= CCK) wurde als eines der ersten gastrointestinalen Hormone überhaupt entdeckt. Die Isolation erfolgte ursprünglich als 33 Aminosäuren langes Peptid aus dem Duodenum des Schweins (Mutt und Jorpes 1968). Zudem sind heute noch viele weitere molekulare Varianten bekannt. Die Synthese von CCK erfolgt in den I-Zellen des Duodenums und Jejunums (Rehfeld, Friis-Hansen et al. 2007). Physiologisch erfolgt die Induktion der CCK-Freisetzung im Gastrointestinaltrakt postprandial durch bestimmte Nahrungsbestandteile wie Fettsäuren und Proteine. Das Hormon ist u. a. für die Kontraktion und Entleerung der Gallenblase verantwortlich und wirkt stimulierend auf die Enzymsekretion der pankreatischen Azinuszellen. Darüber hinaus reguliert CCK die Kolonmotilität und inhibiert die Gastrin-induzierte HCl-Produktion des Magens (Meyer, Werth et al. 1989; Jensen 2002; Peter, D'Amato et al. 2006; Rehfeld, Friis-Hansen et al. 2007).

Die CCK-Rezeptoren werden pharmakologisch in zwei Subtypen unterschieden: CCK1-Rezeptor (= CCK1R) und CCK2-Rezeptor (= CCK2R). Beide zählen zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, welche die Zellmembran heptahelikal durchziehen. Die Homologie der Rezeptoren beträgt 48%. Sie werden in verschiedenen Geweben exprimiert, darunter auch im exokrinen Pankreas (Dufresne, Seva et al. 2006; Berna und Jensen 2007). Die Stimulation der Rezeptoren erfolgt durch die natürlichen Agonisten CCK und Gastrin. Während CCK zu beiden CCK-Rezeptoren die gleiche Affinität besitzt, bindet Gastrin mit 1000-fach höherer Affinität an CCK2R (Berna und Jensen 2007).

CCK1R wird wiederum in zwei Subtypen differenziert, einem High-Affinity und einem Low-Affinity Status, die nach jeweiliger Stimulation verschiedene intrazelluläre Signalmechanismen nach sich ziehen (Dufresne, Seva et al. 2006).

In supraphysiologischen Konzentrationen kann CCK in Säugetieren durch seine Wirkung auf Azinuszellen über den CCK1-Rezeptor eine akute Pankreatitis induzieren (Renner, Wisner et al. 1983; Williams 2001). Diese Erkrankung heilt zumeist innerhalb weniger Tage nach Exposition aus und geschädigtes Pankreasgewebe wird regeneriert. In Kostimulation mit anderen Substanzen wird der Einsatz von CCK als etabliertes Modell genutzt, um experimentell eine chronische Pankreatitis bei Nagetieren zu erzeugen (Vaquero, Molero et al. 1999; Gukovsky, Cheng et al. 2004; Deng, Wang et al. 2005).

Es wurde mehrfach *in vitro* gezeigt, dass stark supraphysiologische CCK-Konzentrationen in der Inflammation des Pankreas und der Apoptose der Azinuszellen resultieren (Gukovsky, Gukovskaya et al. 1998; Williams 2001). Des Weiteren zeigten Studien, dass bei Patienten, die an chronischer Pankreatitis leiden, wiederholt erhöhte basale CCK-Plasmaspiegel im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gemessen wurden (Slaff, Jacobson et al. 1984; Schafmayer, Becker et al. 1985). Es ist daher anzunehmen, dass eine positive Korrelation zwischen erhöhtem CCK-Level und der chronischen Pankreatitis besteht.

Der direkte Effekt von CCK auf PSC stand bisher jedoch kaum im Fokus der Forschung. Neuste Ergebnisse unserer Forschungsgruppe wiesen im Tiermodell die Expression beider CCK-Rezeptoren in PSC nach. Zudem wurden für die Rezeptoren tragende Rollen bezüglich der Kollagen 1-Produktion und der Zellproliferation gezeigt (Berna, Seiz et al. 2010). Dies sind entscheidende Bestandteile der Organfibrose des Pankreas und somit von herausragendem Interesse für die weitere Forschung.

2 ZIEL DER ARBEIT

Das gastrointestinale Hormon Cholezystokinin kann in Säugetieren durch seine Wirkung auf Azinuszellen eine akute Pankreatitis induzieren. In Kombination mit anderen Substanzen wird es als etabliertes Modell genutzt, um experimentell eine chronische Pankreatitis zu erzeugen.

Einige Studien zeigen, dass bei Patienten, die an chronischer Pankreatitis erkrankt sind, wiederholt erhöhte CCK-Plasmaspiegel im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gemessen wurden (Slaff, Jacobson et al. 1984). Der direkte Effekt von CCK auf die PSC war bisher, trotz der bekannten elementaren Rolle der PSC in der Fibrogenese, nicht Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung.

Unsere Arbeitsgruppe konnte die Expression und die Funktionalität beider CCK-Rezeptoren, CCK1R und CCK2R, in PSC zeigen. Zudem wurde der fibrogene Effekt des Hormons auf PSC dargestellt (Berna, Seiz et al. 2010). Über die intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen, die sich an die Stimulation dieser Rezeptoren anschließen, ist bislang nur sehr wenig bekannt.

Aufgrund der zentralen Bedeutung, die PSC in der Fibrogenese der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms einnehmen, stellen die Aktivierungsmechanismen der Zellen einen wichtigen Angriffspunkt für die möglichen Therapien der Erkrankung dar (Shimizu 2008).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Signaltransduktionskaskaden in PSC, welche durch die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren CCK1R und CCK2R in Gang gesetzt werden, weiter aufzuschlüsseln. Der Fokus richtete sich dabei speziell auf die Frage, welche Signaltransduktionswege aktiviert werden, um profibrogene Stimuli zu erzeugen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Benzamidine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
BSA (= Bovine Serum Albumine)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Diethyläther	Riedel-de Haen AG, Seelze
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol 99%	Walter-CMP GmbH und CoKG, Kiel
FCS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe
HBSS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hepes	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Histodenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Iscovemedium	Biochrom AG, Berlin
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Ketamin	aniMedica GmbH, Senden-Bosensell
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Methanol	JT.Baker, New Jersey, USA

Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH und CoKG , Karlsruhe
Na ² HPO ₄ x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NaCl	Carl Roth GmbH und CoKG , Karlsruhe
Na-Flouride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NaH ² PO ₄ x H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Na-Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Na-Pyrophosphate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Na-Vanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nicht essentielle Aminosäuren	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Protease	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rompun 2%	Bayer HealthCare, Leverkusen
Rotilumin	Carl Roth GmbH und CoKG , Karlsruhe
Salzsäure rauchend	Carl Roth GmbH und CoKG , Karlsruhe
SDS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sodiumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Supersignal west dura extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Karlsruhe
Temed	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trisbase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trisbse	Carl Roth GmbH und CoKG , Karlsruhe
Triton X	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 2 Auflistung verwendeter Chemikalien

3.1.2 Puffer

- TBS 10x

Trisbase 12,11 g, NaCl 87,66 g, ad Aqua dest. 1000 ml
pH 7,6

- Waschpuffer (= TBS/T)

10xTBS 100 ml, Aqua dest. 900 ml, Tween 500 µl

- Laufpuffer 10x

SDS 20 g, Glycin 288 g, TrisBase 60,6 g, ad Aqua dest. 2 l

Laufpuffer 1x:

Aqua dest. 900 ml, 10xLaufpuffer 100 ml

- Blotpuffer 10x

Glycin 144 g, TrisBase 30,2 g, ad Aqua dest. 1 l

Blotpuffer 1x:

Aqua dest. 700 ml, Methanol 200 ml, 10xBlotpuffer 100 ml

- Blockpuffer

TBS/T, Milch 5%

- Lämmli-puffer 5x

TrisBase 250 mM, Sodiumphosphat 30 mM, SDS 10%, Bromphenolblau 0,5%,
Glycerol 50%, DTT 0,5 M

- Lysisgrundpuffer

Hepes 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Triton-X 1%, Na-Flourid 50 mM,
Glycerol 10%

frisch hinzugeben: Aprotinin 2 mg/ml, Leupeptin 5 mg/ml,
Na-Vanadat 200 mM, PMSF 35 mg/ml

- Antikörper-Grundlösung

TBS/T, BSA 5%

- Stripping-Puffer

Mercaptoethanol 10 mM, SDS 2%, Tris-HCL pH 6,7 62,5 mM

- Verdaulösung
HBSS 40 ml, DNase 5 mg, Protease 10 mg, Collagenase P 20 mg
- Zusammensetzung Nährmedium
Iscovemedium 500 ml, Pen/Strep 8 ml, NEAS 5 ml
+ FCS je nach Konzentrationsbedarf
- Grundstocklösung für SDS-Page Gele

	<u>12%-Acrylamid Trenngelstock</u>	<u>10%-Acrylamid Trenngelstock</u>	<u>5%-Acrylamid Sammelgelstock</u>
H ₂ O	24 ml	29 ml	74 ml
Acrylamid	30 ml	25 ml	12,5 ml
1,5M Tris pH 8,8	25 ml	25 ml	12,5 ml
10% SDS	1 ml	1 ml	1 ml
Glycerol	20 ml	20 ml	-----
APS	0,04%ig	0,04%ig	0,025%ig
Temed	0,02%ig	0,02%ig	0,0125%ig

Tabelle 3 **Zusammensetzung der SDS-Page Gele**

3.1.3 Stimulanzen und Inhibitoren

<u>Stimulanzen/Inhibitoren</u>	<u>Funktion</u>
CCK	natürlicher CCK1R und CCK2R Agonist
CCK1R-Agonist	selektiver CCK1R Agonist (High- und Low-Affinity Status)
Gastrin	natürlicher CCK2R Agonist
GFX	Proteinkinase C Inhibitor
JMV-180	Agonist des CCK1- High Affinity Status; Antagonist des Low-Affinity Status
PP2	Src-Kinase Inhibitor
PP3	inaktives Analogon von PP2
Thapsigargin	nicht-kompetitiver SERCA Inhibitor
TPA	Proteinkinase C Agonist

Tabelle 4 Auflistung verwendeter Stimulanzen und Inhibitoren

3.1.4 Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma</u>	<u>Source</u>	<u>Größe</u>
pAkt (Ser473)	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling	rabbit	60 kDa
pELK1	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling	rabbit	62 kDa
pERK1/2 (pp44/42)	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling	rabbit	42/44 kDa
pPKD1 (Ser916)	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling	rabbit	115 kDa
pSrc Family (Tyr416)	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling	rabbit	60 kDa
HRP-Actin	1:1000 in 5% Milch	Santa-Cruz Biotechnology	---	46 kDa
<u>Sekundärantikörper</u>				
Anti-Rabbit IgG HRP-linked	1:2000 in 5% Milch	Cell Signaling	goat	---

Tabelle 5 Auflistung verwendeter Primär- und Sekundärantikörper

3.1.5 Verbrauchsmaterial

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
10 ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
12-Loch Platten	Nunc, Langenselbold
15 ml Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
175 cm ³ Flaschen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
20 ml Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg
50 ml Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
5 ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
6-Loch und 96-Loch Platten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
BE-Kanülen/Monovetten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Braunüle Jelco i.v. Katheter 24G	Smith Medical International Ltd. Lancashire, Großbritannien
ELISA Platten Maxisorp	Nunc, Langenselbold
Eppis "Self-Lock"-Tubes 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Filterpapier (Chromatography Paper 3mm CHR)	Whatman Ltd., Maidstone, Großbritannien
Gilson Pipetten	Gilson, WI, USA
Große Kanüle	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose Transfermembrane)	Whatman Ltd., Maidstone, Großbritannien
Petrischale	Fischer Labortechnik GmbH, Frankfurt
Pipettus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon Products, Beston Dickens Labware, New Jersey, USA
Subkutankanüle Sterican 0,4x20 mm 27G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Zellscraper	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht

Tabelle 6 Auflistung verbrauchter Materialien

3.1.6 Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Absauggerät Miniport	Servox Medizintechnik GmbH, Köln
Blot Roller	Stuart Roller Mixer SRT6, Barloworld Scientific Ltd,UK
Blotkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Chemidoc XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO ₂ -Brutschrank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
EL 808 Ultra Microplate Reader	Bio-Tek Instruments Inc., Bad Friedrichshall
Feinwaage Typ 822	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Gelständler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach
powerpack	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protean tetracell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rasierer	Wilkinson Sword GmbH, Solingen
Schüttler Typ: KL2	Edmund Bühler 7400 Tübingen, Tübingen
Sicherheitswerkbank ("Hood")	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Sonicator GM 2070	BANDELIN electronic GmbH und CoKG, Berlin
Standard Mikroskop Zellkultur	Hund Wilovert GmbH, Wetzlar
Tischzentrifuge 5180R	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer	Janke & Kunkel GmbH, IKA-Labortechnik, Staufen
Wärmeblock Dri-Block DB-3D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Sigma 3K30	B.Braun Biotech International, Melsungen

Tabelle 7 Auflistung verwendeter Geräte

3.2 Methoden

Die tierexperimentellen Versuche wurden unter strenger Berücksichtigung nationaler Tierpflegestandards und gemäß den ethischen Richtlinien durchgeführt und waren von der Regierung genehmigt.

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank („Hood“) durchgeführt. Die Zellkultivierung erfolgte bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in feuchter Atmosphäre. Alle verwendeten Puffer und Medien wurden vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

3.2.1 Zellisolation

Es wurden zwei männliche Sprague-Dawley Ratten (à ca. 150 g) pro Zellisolation benötigt. Die Freilegung und Präparation der Pankreas beider Tiere fand jeweils nacheinander statt.

Narkose und Präparation

Die Narkose der Tiere erfolgte in zwei Schritten. Die Tiere wurden nacheinander mit Äther sediert und anschließend mit ca. 2,5-3 ml eines Ketamin-Rompun-Gemisches i.p. narkotisiert. Nachdem keine Reflexe mehr auszulösen waren, erfolgte die Tötung mittels zervikaler Dislokation. Im Anschluss wurde der Bauch der Tiere rasiert. Durch mediane laparotomische Öffnung der Bauchdecke entlang der Linea Alba bis zum Sternum wurde das Abdomen des Tieres eröffnet. Zwei Einschnitte beidseits quer zum Laparotomieschnitt erweiterten die Sicht auf das OP-Feld. Mittels einer Gefäßklemme wurde der Leberhilus mitsamt Ductus Hepaticus Communis, A. Hepatica Propria und V. Portae abgeklemmt. Es folgte die Punktion des Ductus Pancreaticus Communis über die Papilla Vateri mit einer 24G-Kanüle. Über diesen Zugang wurden 8 ml Verdaulösung infundiert, die retrograd über die Ductuli Pancreatici das Pankreasgewebe aufblähten.

Das aufgeblähte Gewebe wurde von den umgebenden Strukturen mit einer feinen Präparierschere abgetrennt und in eine Petrischale überführt. Es folgte eine weitere Infusion von 2 ml Verdaulösung durch eine Subkutankanüle in bisher nicht aufgeblähtes Pankreasgewebe. Anschließend wurde das Gewebe manuell weiter zerkleinert.

Das Pankreas-Verdaulösungsgemisch wurde von Fett und Lymphknoten befreit und in ein Falcon-Tube überführt, welches für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubierte.

Isolation der PSC

Nach 10-minütiger Inkubation im Brutschrank wurden weitere 29 ml Verdauungslösung sowie 500 µl DNase dem zerkleinerten Pankreasgewebe hinzugegeben. Das Gemisch wurde mit einer 10 ml Pipette resuspendiert, um das Gewebe auch mechanisch weiter zu zerkleinern. Es folgten weitere 10 min im Brutschrank und erneutes Resuspendieren. Das angedaute Gewebe wurde 5 min mit 1450 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Gewebe mit 10 ml 4%-FCS-HBSS resuspendiert. Das entstandene Gemisch wurde vollständig durch ein 150 µm-mesh Zellsieb in ein Becherglas pipettiert. Abermals folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 1450 rpm bei RT.

Das Pellet wurde in 4%-FCS-HBSS resuspendiert und auf ein Gesamtvolumen von 12 ml aufgefüllt. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation trennten sich schließlich die PSC von weiteren Bestandteilen in der Zellsuspension. Hierfür wurde zu den bereits vorgelegten 12 ml Suspension 8 ml Histodenz gegeben, welches den Dichtegradienten bilden würde. Mit diesem Gemisch unterschichteten wir nun weitere 7 ml 4%-FCS-HBSS, so dass ein Zweiphasengemisch entstand. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4°C mit 2910 rpm (ohne Bremse).

Die PSC bildeten einen schmalen, trüben Ring zwischen dem Überstand und dem am Boden des Falcons abgelagerten Zelldetritus (siehe Abb. 2). Mit einer Pipette wurde dieser Ring aufgenommen und in 10%-FCS-Medium überführt. Ein weiteres Mal erfolgte die Zentrifugation für 5 min mit 1450 rpm bei RT. Das entstandene Pellet wurde mit 25 ml 17%-Medium resuspendiert und in einer 175 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Die Anzucht der PSC erfolgte bei 37°C im Brutschrank.

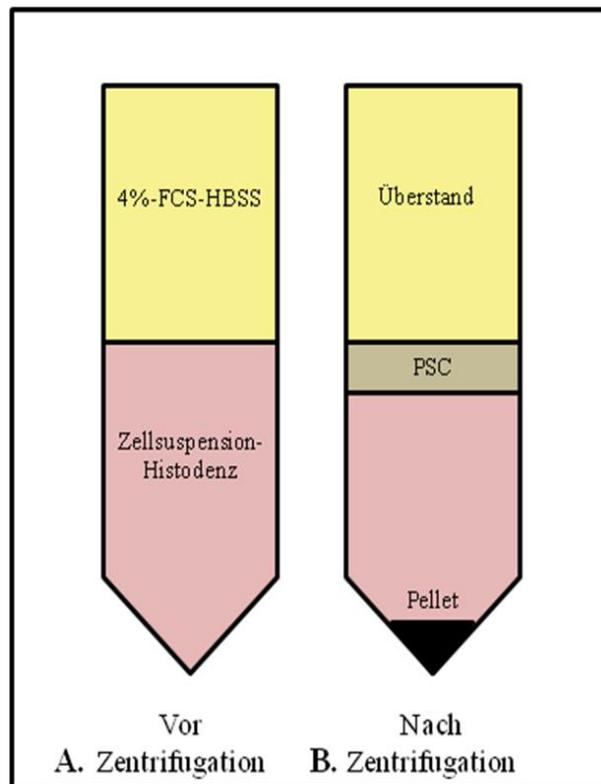


Abbildung 2 Schema der Dichtegradientenzentrifugation zur PSC-Gewinnung

A. 7 ml HBSS-FCS wurden mit 20 ml des Histodenz-Zellsuspensiongemisches unterschichtet. Es entstanden zwei voneinander getrennte liquide Phasen. Die Zentrifugation für 20 min bei 4°C erfolgte bei 2910 rpm (ohne Bremse).

B. Durch die speziellen physikalischen Eigenschaften des Histodenz bildete sich nach dem Zentrifugieren ein trüber Ring, in dem sich fast ausschließlich PSC befanden. Dieser Ring wurde mit einer Pipette eingesammelt und die PSC wurden zur Kultivierung ausgesät. Der Zelldetritus sammelte sich als Pellet am Boden des Falcon.

3.2.2 Zellkultivierung

Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen im Lichtmikroskop betrachtet und deren Morphologie beurteilt. Die Zellkultivierung erfolgte nach folgendem Schema in sterilen 175 cm² Zellkulturflaschen mit jeweils 25 ml Nährmedium:

Tag 0:	Zellisolation
Tag 1:	Waschen der Zellen mit PBS und Gabe von 17%-FCS-Medium
Tag 2:	Waschen der Zellen mit PBS und Gabe von 17%-FCS-Medium
Tag 3:	ruhen lassen
Tag 4:	Waschen der Zellen mit PBS und Gabe von 10%-FCS-Medium
Tag 5:	Passagieren der Zellen (3.2.3) und Zellaussaat (3.2.4)

3.2.4 Zellaussaat für die Stimulationsversuche

Um sicherzustellen, dass die jeweiligen Stimulationsversuche bei konstanter Proteinmenge erfolgten, wurden jeweils 100.000 Zellen/Well auf 6-Well Zellkulturplatten in 10%-FCS-Medium ausplattiert. Die ausgesäten Platten inkubierten weiterhin bei 37°C im Brutschrank.

Bei einer Konfluenz von ca. 90%, dies war zumeist zwei Tage nach dem „Splitten“ der Fall, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und auf 0,1%-Nährmedium herabgesetzt.

Nach weiteren 24 Stunden waren die PSC bereit zur Stimulation.

3.2.5 Zellstimulation und Versuchsaufbau

	Konzentration	Inkubationsdauer
<u>Agonist</u>		
CCK	1 nM	5 min
Gastrin	1 µM	2,5 min, 5 min
JMV-180	1 µM, 1 nM	2,5 min, 5 min
CCK1R-Agonist	1 µM, 1 nM	2,5 min, 5 min
TPA	1 µM	5 min
<u>Inhibitor</u>		
GFX	5 µM	2 h
Thapsigargin	1 µM	1 h
PP2	20 µM	2 h
PP3	20 µM	2 h

Tabelle 8 Konzentrationen und Inkubationsdauern der Agonisten und Inhibitoren

3.2.6 Methoden der Proteinanalyse

Zelllyse

Zur Proteinextraktion wurden die PSC nach Stimulation mit dem entsprechenden Agens mit 50 µl Lysispuffer pro Well versehen. Während des gesamten Lyseprozesses lagerten die Zellplatten und Lysate zur Kühlung auf Eis.

Mit einem Cellscraper wurden die Zellen vom Boden jedes Wells gelöst und die entstandenen Zelllysate in Eppis überführt.

Das Aufbrechen der Zellmembranen zur Proteinfreisetzung erfolgte mittels Sonifikation der Lysate und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 4°C mit 13.000 rpm.

Die Überstände stellten die fertigen Lysate dar, welche in neue Eppis überführt wurden.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Lysate beruhte auf der Biuret-Reaktion. Bei dieser Reaktion wurden zunächst in alkalischer Lösung Komplexe aus Cu^{2+} -Ionen und Proteinen gebildet. Nach Zugabe von Bicinchoninsäure (b_ic_in_ch_on_in_ic acid = BCA) erfolgte die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ . Durch die Reduktion entstand ein violetter Farbkomplex, dessen Intensität proportional zur Proteinmenge anstieg.

Die Probenmessungen erfolgten mit Hilfe eines BCA-Kits in 96-Loch Platten in Doppelbestimmung unter 1:2-facher Verdünnung der Lysate mit Aqua destillata. Die Absorption wurde bei 540 nm mittels EL 808 Ultra Microplate Reader gemessen.

Probenvorbereitung

Anhand der ermittelten Proteinkonzentration (ng/µl) berechneten wir das benötigte Probenvolumen, um jeweils äquivalente Proteinmengen im Western Blot laden zu können. Die minimal verwendete Proteinmenge betrug ca. 20 µg.

Lämmli-Puffer wurde in einfacher Verdünnung den Lysaten hinzugefügt und für 5 min bei 94°C aufgeköcht. Der Natriumphosphat-haltige Lämmli-Puffer verringerte die intra- und intermolekularen Disulfidbrückenbindungen, so dass die Proteinauftrennung aufgrund der Proteingröße und nicht aufgrund von Form oder Ladung erfolgte. Der Bromphenolblauanteil des Puffers zeigte den Fortlauf der geladenen Proben in der Gelelektrophorese an und verlief aufgrund der physikalischen Eigenschaften vor der Proteinfrent.

3.2.7 Western Blot SDS-Page

Bei der Western Blot Methode werden Proteine anhand ihrer Größe mittels Elektrophorese voneinander getrennt, auf eine Trägermatrix übertragen und anschließend auf einer Nitrozellulosemembran fixiert.

Um eine größenspezifische Trennung der Proteine zu erreichen und die Proteinladungen dabei unberücksichtigt zu lassen, wurde den Gelen Sodium Dodecyl Sulfate (= SDS) hinzugefügt. SDS denaturierte die Proteine und band mit seinen ungeladenen Molekülteilen an die apolaren Seitenketten der Proteine. Es ist selber negativ geladen, so dass eine insgesamt einheitlich negative Ladung der Proteine entstand und die Trennung lediglich aufgrund der Molekülgröße und unabhängig von der Polarität erfolgte.

Gele gießen

Die SDS-Gele bestanden aus zwei verschiedenen Anteilen, die jeweils nacheinander in einer Glaskammer gegossen wurden. Der untere Teil des Gels bildete das Trenngel. Es bestand bei den durchgeführten Versuchen zu 10% bzw. 12% aus Acrylamid, wobei sich die Wahl des Prozentgehalts des Trenngels nach dem nachzuweisenden Protein richtete. Je größer das nachzuweisende Protein war, desto kleiner wurde der Acrylamidanteil des Gels gewählt werden.

Das Sammelgel bildete den oberen, schmaleren Teil des Gels. Es wurde direkt nach dem Trenngel in die Kammer gegossen. Im Unterschied zum Trenngel enthielt das Sammelgel kein Glycerol (siehe auch 3.1.2).

Direkt nach dem Gießen wurde mit 80%-Isopropanol die Geloberfläche vollständig von Bläschen befreit und ein 10-Taschen-Kamm ins Sammelgel eingesetzt. Nach ca. 40 min waren die Gele vollständig polymerisiert und beladungsbereit.

Gellauf

In diesem Schritt wurden die Proteine auf die SDS-Page Trägermatrix übertragen. Aufgrund ihrer Größe bewegten sie sich unterschiedlich schnell in der Matrix, so dass sie später eine Funktion der Proteingröße darstellten.

Das vollständig polymerisierte SDS-Gel wurde in eine mit Laufpuffer gefüllte „Lauf-Kammer“ eingespannt. Die Blotting-Taschen wurden von polymerisierten Acrylamidresten befreit und die Proben (max. 50 µl/Tasche) sowie ein Molekulargewichtsstandard („Page-Ruler“) als Proteinmarker geladen. Der „Page-Ruler“ beinhaltete Proteine bekannter Größe, die sich farblich auf dem Blot darstellten.

Zunächst startete der Gellauf bei 100 mV für ca. 15-20 min. Es folgten in Abhängigkeit des Acrylamidanteils des Trenngels weitere 90-120 min bei 160 mV. Hatten sich die Proteine vollständig aufgetrennt, wurden die Gele, die nun die Proteine beinhalteten, aus der Kammer entfernt und im folgenden Schritt auf Nitrozellulosemembranen übertragen.

Blotten

Beim Blotten wurden die im Gel gebundenen Proteinbanden auf 0,4 µm dicke Nitrozellulosemembranen transferiert. Mittels eines senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feldes von 300 mA bewegten sich die Proteine von der Gelmatrix auf die Membran. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen blieben sie dort irreversibel haften. Der dafür nötige „Sandwich“-Aufbau der Elektroden, des SDS-Gels, der Nitrozellulosemembran und der als Puffer dienenden Filterpapiere wird in Abbildung 4 dargestellt.

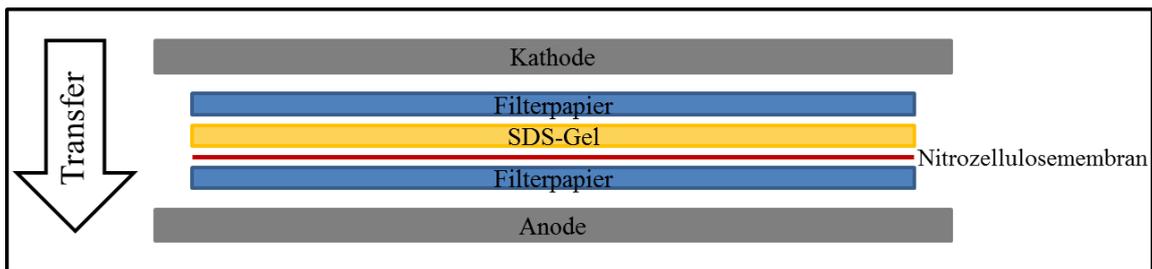


Abbildung 4 "Sandwich"-Aufbau beim Blotten Das elektrische Feld überträgt die Proteinbanden vom SDS-Gel irreversibel auf die Nitrozellulosemembran.

Die Blot-Kammer wurde nach Einsetzen des fertigen „Blotting-Sandwiches“ mit Blotpuffer gefüllt. Nach 60 min bei 300 mV waren die Proteine vollständig und irreversibel auf die Nitrozellulosemembran überführt. Die Membranen wurden getrocknet und für 60 min in Blockpuffer inkubiert. Die Antikörperbeladung erfolgte über Nacht bei 4°C mit 5 ml Antikörpergrundlösung in einem Falcon.

Detektion

Die Membranen wurden durch mehrmaliges Waschen in Waschpuffer (TBS/T) vom Antikörper befreit. Es folgte die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper für 60 min bei RT 1:2000-fach verdünnt in Blockpuffer-Lösung.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels „Chemie-Doc“ QRS.

Strippen

Um die Membranen mit einem weiteren Antikörper beladen zu können, musste zunächst der vorherige Antikörper entfernt werden.

Die Rückstände der Entwicklerlösung wurden mit TBS/T von der Membran gewaschen. Danach inkubierte sie für 10 min in Mercaptoethanol-haltigem Stripping-Puffer bei 70°C in einem Wasserbad-Schüttler.

Anschließend wurde die Membran erneut bei RT mehrfach mit TBS/T gewaschen und für 30 min bei RT in Blockpuffer inkubiert. Die erneute Antikörperbeladung erfolgte über Nacht bei 4°C.

3.2.8 Densoisometrische und statistische Auswertung

Die Digitalisierung der Proteinbanden erfolgte mittels „Chemie Doc QRS“. Die Intensität der jeweiligen Banden wurde mit dem NIH-Computerprogramm Image J (Version V) bestimmt. Die Quantifizierung der einzelnen Proteinbanden erfolgte mittels Densoisometrie. Aus den erworbenen Einzelwerten wurden in jeder Versuchsreihe arithmetische Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler der Mittelwerte (SEM = standard error of the mean) berechnet. Alle Versuchsreihen wurden mit einem Minimum von drei Wiederholungen durchgeführt.

Mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism 5 erfolgte die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse.

Der ungepaarte t-Test diente zur Analyse von Unterschieden und möglichen Signifikanzwerten zwischen unbehandelten und stimulierten Zellen.

Dabei wurden Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 als signifikant, Ergebnisse mit einem p-Wert <0,01 als hoch signifikant betrachtet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchung des dosisabhängigen Effekts vom CCK1R-Agonisten und JMV-180

Für das Peptidhormon CCK existieren zwei bekannte Rezeptoren: CCK1R und CCK2R. Während die Affinität von CCK zu beiden Rezeptoren etwa gleich ist, bindet Gastrin mit 1000-fach stärkerer Affinität an CCK2R und ist somit als Agonist für diesen Rezeptor zu betrachten.

Um herauszufinden welche Anteile der PSC-Aktivierung der natürliche Agonist CCK über CCK1R bzw. CCK2R vermittelt, wurden beide Rezeptoren mittels verschiedener Agonisten und Antagonisten unabhängig voneinander betrachtet.

Zunächst wurden die PSC für 2,5 min mit Gastrin [1 μ M] bzw. für 5 min mit CCK [1nM] inkubiert. Des Weiteren erfolgte die Stimulation mit JMV-180 (= JMV) in den Konzentrationen 1 μ M und 1 nM für die jeweiligen gleichen Zeiträume.

JMV ist ein synthetisches CCK-Analogon. Es fungiert als Agonist des CCK1R High-Affinity Status und ist gleichzeitiger Antagonist des Low-Affinity Status. Dies ermöglicht die isolierte Betrachtung der Rolle des CCK1R High-Affinity Status in Unabhängigkeit vom Low-Affinity Status.

Ebenso wurde die Rolle von CCK1R im Allgemeinen in der Signaltransduktion nach GPCR-Stimulation betrachtet. Dies geschah mit einem CCK1R-Agonisten (= CCK1R-A), der beide Status des CCK1R gleichermaßen stimuliert, in den Konzentrationen 1 μ M und 1 nM.

In vorherigen Arbeiten wurde bereits in PSC durch Stimulation mit CCK [1nM] nach 2,5 min eine maximale Aktivität von pAkt und durch Stimulation mit Gastrin [1 μ M] für 5 min eine maximale Aktivität von pERK gezeigt (Berna, Seiz et al. 2010). Um eine Aktivitätszunahme der Zellen in den vorliegenden Versuchen darzustellen, wurde dementsprechend für den Zeitraum von 2,5 min pAkt und für den Zeitraum von 5 min pERK als repräsentatives Protein gewählt.

4.1.1 Der dosisabhängige Effekt von CCK1R-A und JMV nach 2,5 min auf pAkt im Vergleich mit CCK und Gastrin

Die 2,5 min Stimulation mit den CCKR-Agonisten CCK, Gastrin, CCK1R-A und JMV riefen durchweg deutliche pAkt Anstiege hervor.

Die maximale signifikante Stimulation wurde mit CCK [1nM] erreicht (Bande 2). Sie betrug das $2,6 \pm 0,4$ -fache der Kontrolle und war mit $p < 0,01$ hoch signifikant. Gastrin rief einen ebenfalls signifikanten Effekt um das $2,0 \pm 0,7$ -fache hervor ($n=2$, Bande 3).

Die alleinige Stimulation des CCK1-Rezeptors mit CCK1R-A resultierte bei verschiedenen Konzentrationen in signifikanten und hochsignifikanten pAkt-Anstiegen. Die Stimulation mit CCK1R-A [1 μ M] bewirkte einen Anstieg um das $2,5 \pm 0,5$ -fache der Kontrolle (Bande 4). Der stimulierende Effekt von CCK1R-A [1nM] fiel mit einer Steigerung auf das $2,2 \pm 0,4$ etwas geringer aus (Bande 5).

Bei JMV [1 μ M] und JMV [1nM] zeigten sich ähnliche Tendenzen (Bande 6 und 7), doch aufgrund stark divergenter Ergebnisse ergab sich eine ausgeprägte Standardabweichung. Die Resultate sind dementsprechend nicht signifikant.

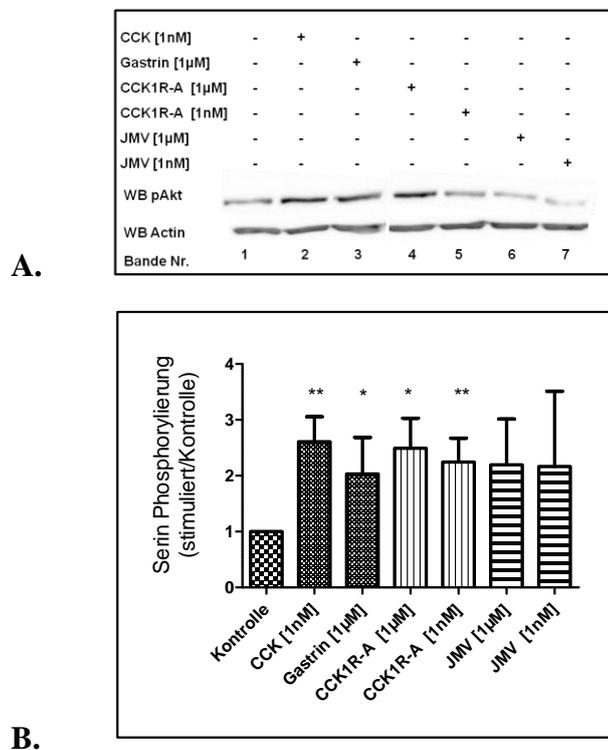


Abbildung 5 Nachweis der Akt-Phosphorylierung in PSC nach 2,5 min Stimulation mit verschiedenen Agonisten. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt. Am Folgetag erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK [1nM], Gastrin [1 μ M], CCK1R-A [1 μ M], CCK1R-A [1nM], JMV [1 μ M] oder JMV [1nM] für jeweils 2,5 min. Anschließend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pAkt analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.1.2 Der dosisabhängige Effekt von CCK1R-A und JMV nach 5 min auf pERK im Vergleich mit CCK und Gastrin

Die 5 min Stimulation der PSC mit CCK, Gastrin, CCK1R-A und JMV hatte durchweg hoch signifikante Steigerungen von pERK zur Folge.

Die maximale ERK-Phosphorylierung wurde durch Gastrin [1 μ M] erreicht mit einem Effekt vom $2,8 \pm 0,2$ -fachen der Kontrolle (Bande 3). Ähnlich hohe Ergebnisse erreichten CCK1R-A [1nM] ($2,8 \pm 0,4$ -facher Anstieg, Bande 5) und CCK [1nM] ($2,7 \pm 0,3$ -facher Anstieg, Bande 2).

JMV [1 μ M] bzw. JMV [1nM] riefen eine Steigerung um den Faktor $2,5 \pm 0,4$ bzw. $2,6 \pm 0,5$ (Bande 6 und 7) hervor.

CCK1R-A [1 μ M] (Bande 4) stimulierte die ERK-Phosphorylierung um das $2,3 \pm 0,36$ -fache das Ausgangswertes.

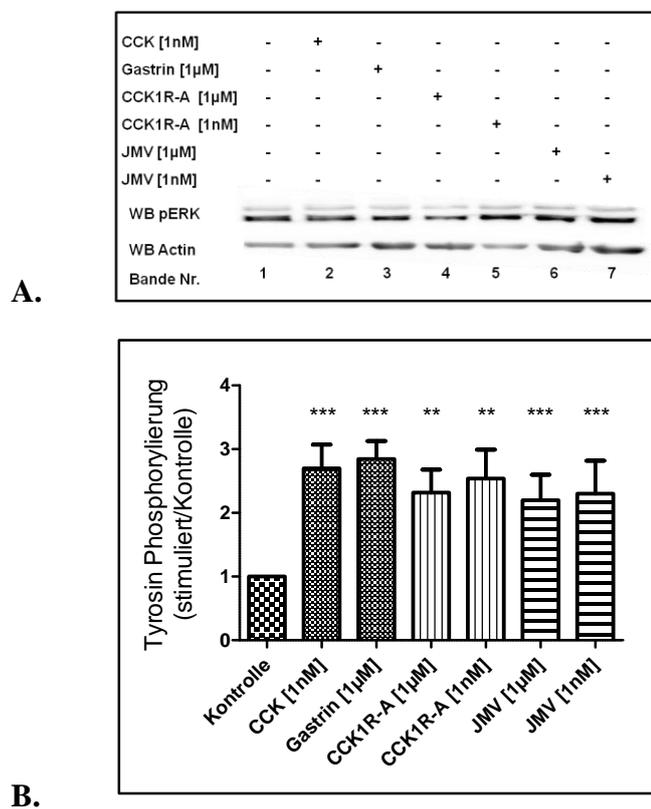


Abbildung 6 Nachweis der ERK-Phosphorylierung in PSC nach 5 min Stimulation mit verschiedenen Agonisten. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt. Am Folgetag erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK [1nM], Gastrin [1 μ M], CCK1R-A [1 μ M], CCK1R-A [1nM], JMV [1 μ M] oder JMV [1nM] für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pERK analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2 Der Einfluss der Proteinkinase C nach G-Protein gekoppelter Stimulation

Die Phospholipase C nimmt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion nach G-Protein gekoppelter Stimulation ein. Die Proteinkinase C stellte das zentrale Downstream-Target der Lipase dar.

In diesem Versuch wurde die Proteinkinase einerseits mittels des PKC-Inhibitors GFX aus der Signaltransduktionskaskade exkludiert und andererseits durch TPA, einem PKC-Aktivator, maximal aktiviert. Die Präinkubation mit GFX erfolgte in einer Konzentration von 5 μM für 2 h, die Stimulation mit TPA [1 μM] für 5 min.

In der Auswertung wurden die Ergebnisse der Rezeptorstimulation durch CCK1R-A [1nM] und Gastrin [1 μM] mit und ohne GFX-Präinkubation verglichen.

4.2.1 Der PKC-Einfluss auf pPKD1

Der Einfluss der PKC auf PKD1 in der Signaltransduktion nach Stimulation der Rezeptoren CCK1R und CCK2R wurde in diesem Versuch näher betrachtet. Die Kinase spielt im Zellzyklusgeschehen und in der Signaltransduktion eine zentrale Rolle.

Ausschließlich mit CCK1R-A stimulierte PSC wiesen eine $4,4 \pm 0,6$ -fache Erhöhung in der PKD1-Phosphorylierung auf (Bande 2). PSC, die zuvor für 2 h mit GFX präinkubierten und ebenfalls mit CCK1R-A stimuliert wurden, lagen unterhalb der unstimulierten Kontrollgruppe ($0,8 \pm 0,3$ -facher Anstieg, Bande 6). Mit $p < 0,01$ ist dieser Unterschied hoch signifikant.

Die CCK2R-Stimulation erfolgte mittels Gastrin [1 μM]. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg um das $1,7 \pm 0,4$ -fache (Bande 3) im Vergleich zu vorher mit GFX präinkubierten Zellen (Bande 7). Der Gastrin-induzierte pPKD1 Anstieg konnte durch Präinkubation mit GFX vollständig unterdrückt werden.

Die maximale, hoch signifikante pPKD1 Aktivität wurde nach 5 min Stimulation mit TPA [1 μM] erreicht und betrug das $79,3 \pm 0,7$ -fache der Kontrolle (Bande 4). Durch Präinkubation mit GFX konnte dieser Anstieg hoch signifikant auf das $5,4 \pm 0,6$ -fache gesenkt werden (Bande 8, $p = 0,0005$).

Die alleinige Präinkubation mit GFX ohne Zugabe weiterer Stimulanzien hatte keinen signifikanten Effekt auf pPKD1 (Bande 5).

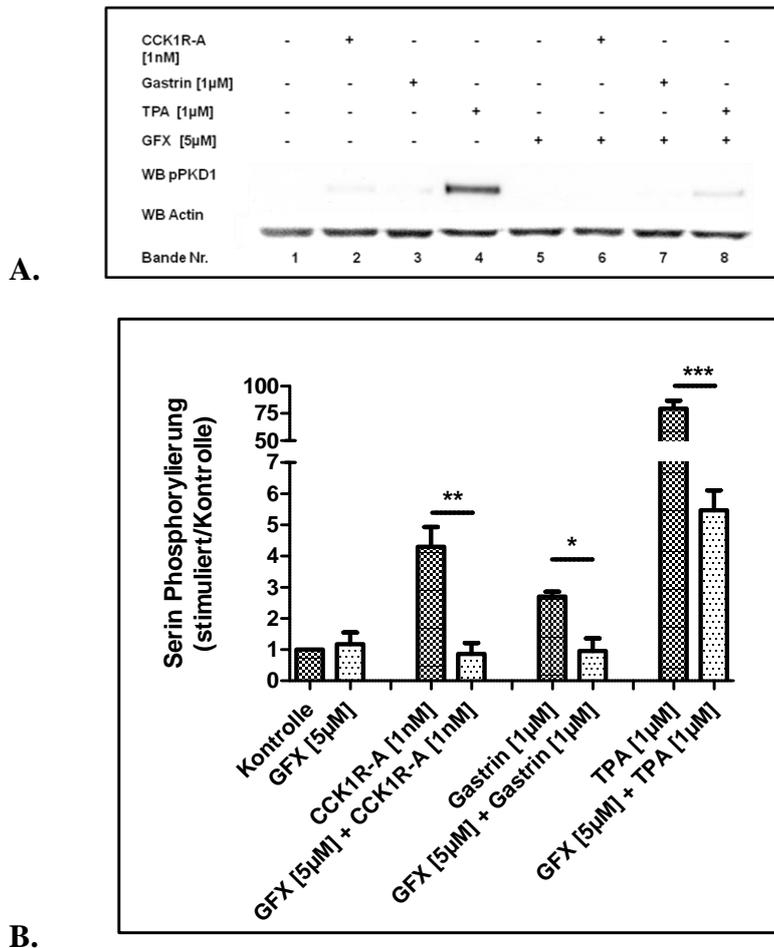


Abbildung 7 Nachweis der PKD1-Phosphorylierung im Vergleich zwischen unvorbehandelten PSC und nach Präinkubation mit GFX. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen oder mit GFX [50µM] für 2 h inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1µM] oder TPA [1µM] für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pPKD1 analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2.2 Der PKC-Einfluss auf pERK

Der Einfluss der PKC auf ERK in der Signaltransduktion nach Aktivierung der Rezeptoren CCK1R und CCK2R wurde hier evaluiert.

Das Exkludieren der PKC mittels 2 h Präinkubation mit GFX [5µM] hatte weder nach anschließender CCK1R-Stimulation mit CCK1R-A [1nM] noch nach CCK2R-Stimulation mit Gastrin [1µM] einen signifikanten Effekt auf pERK.

In beiden Fällen erzeugte die Stimulation mit CCK1R-A bzw. Gastrin eine signifikante ERK-Stimulation (Bande 2 und 3), die durch GFX Präinkubation nicht signifikant verändert wurde (Bande 6 und 7).

Die alleinige Präinkubation mit GFX ohne Zugabe weiterer Stimulanzen zeigte einen signifikanten pERK Anstieg um den Faktor $2,05 \pm 0,32$ (Bande 5) im Vergleich zu gänzlich unstimulierten Zellen (Abbildung 8).

Die maximale, hoch signifikante pERK Aktivität wurde nach 5 min Stimulation mit TPA [$1\mu\text{M}$] erreicht und zeigte eine Steigerung um das $3,8 \pm 0,4$ -fache (Bande 4) ausgehend von der Kontrolle (Bande 1). Durch Präinkubation mit GFX [$5\mu\text{M}$] konnte dieser Effekt signifikant auf das $2,0 \pm 0,2$ -fache (Bande 8) gesenkt werden.

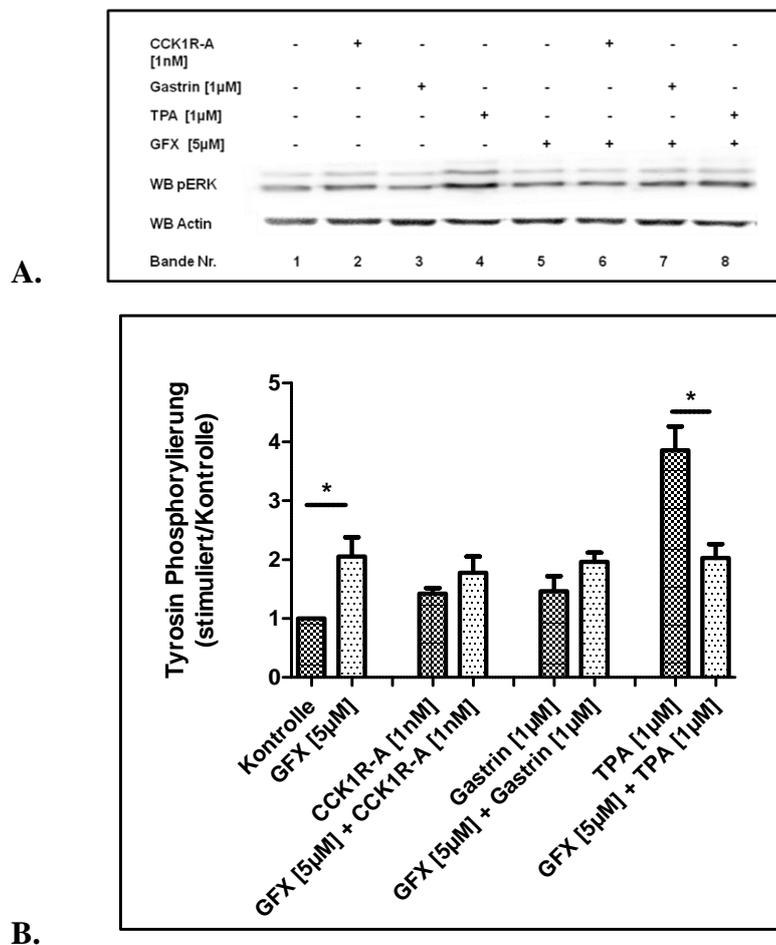


Abbildung 8 Nachweis der ERK-Phosphorylierung im Vergleich zwischen unvorbehandelten PSC und nach Präinkubation mit GFX. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen oder mit GFX [$50\mu\text{M}$] für 2 h inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [$1\mu\text{M}$] oder TPA [$1\mu\text{M}$] für jeweils 5 min. Folgend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pERK analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. * $p < 0,05$

4.2.3 Der PKC-Einfluss auf pSrc

Hier wurde der Einfluss der PKC auf Src nach Aktivierung der Rezeptoren CCK1R und CCK2R in der Signaltransduktion näher betrachtet. Die Src-Kinasen sind an vielen proliferativen Prozessen in PSC beteiligt.

Abbildung 9 zeigt, dass die Präinkubation mit GFX für 2 h vor Stimulation mit CCK1R-A in einer signifikanten Abnahme der TyrP von pSrc von $312 \pm 46\%$ (Bande 2 ohne GFX) auf $150 \pm 11\%$ (Bande 6 mit GFX) resultiert.

Die CCK2R-Stimulation mittels Gastrin [$1\mu\text{M}$] zeigte ebenfalls einen tendenziell inhibierender Effekt von GFX (Bande 3 ohne GFX: $2,4 \pm 0,5$ und Bande 7 mit GFX: $1,6 \pm 0,5$, $p=0,3$).

Die alleinige PKC-Inhibition durch GFX ohne Zugabe weiterer Stimulanzen resultierte in einem hoch signifikanten, positiven Effekt auf pSrc und betrug das $2,2 \pm 0,2$ -fache der Kontrolle (Bande 5).

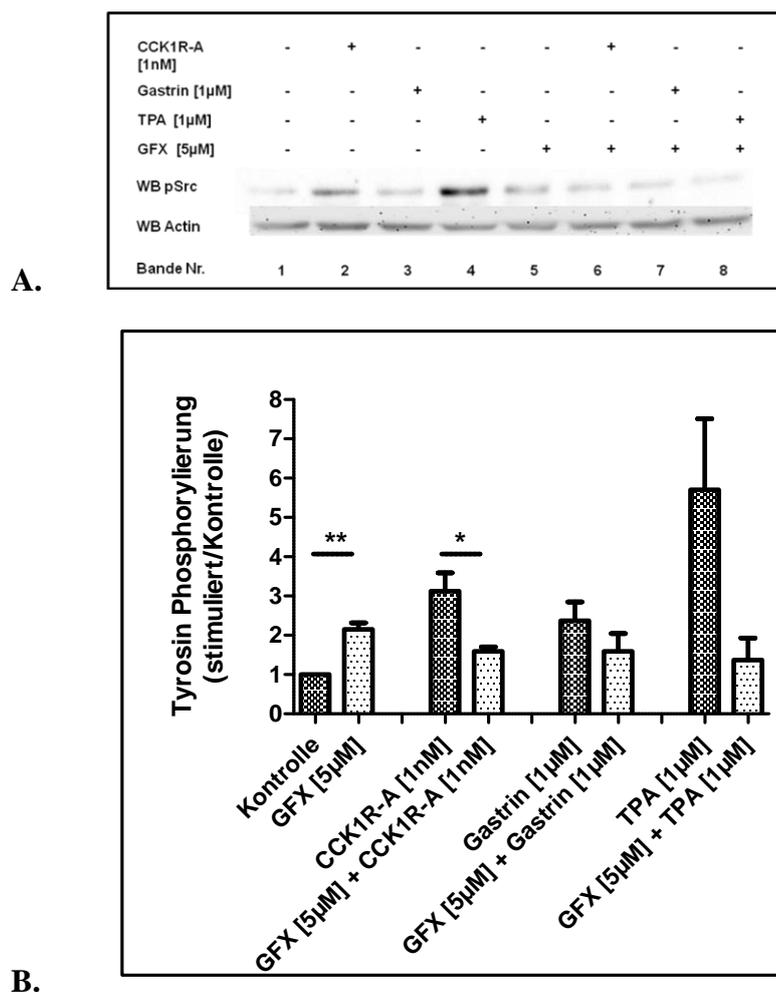


Abbildung 9 Nachweis der Src-Phosphorylierung im Vergleich zwischen unvorbehandelten PSC und nach Präinkubation mit GFX. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-

Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen oder mit GFX [50 μ M] für 2 h inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1 μ M] oder TPA [1 μ M] für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pSrc analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3 Die Rolle des intrazellulären Calciums nach G-Protein gekoppelter Stimulation

Ziel dieses Versuches war die Betrachtung der in PSC ablaufenden Signalkaskade in Unabhängigkeit der zytosolischen Calciumkonzentration und deren Schwankungen zu betrachten.

Der zytosolische Calciumanstieg ist für die Aktivierung der PKC in der Signaltransduktion essentiell. Die Ausschüttung aus intrazellulären Speichern erfolgt nach Aktivierung durch IP₃, einem Spaltprodukt aus der Hydrolyse des Phospholipids PIP₃ zu DAG und IP₃. Gemeinsam mit dem membrangebundenen DAG fungiert Calcium als 2nd Messenger und aktiviert die PKC (Abbildung 1).

Thapsigargin (= TG) ist ein nicht-kompetiver Hemmer der SERCA (= Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase). Die SERCA hat die Funktion Calcium aus dem Zytosol ATP-abhängig zurück ins Endoplasmatische Retikulum bzw. ins Sarkoplasmatische Retikulum zu pumpen. In diesen Versuchen hatte die Blockade durch TG die vollständige Calciumdepletion der intrazellulären Speicher ins Zytosol zur Folge. EGTA fungierte als Chelator, der die freigesetzten Ca²⁺-Ionen band und somit reaktionsunfähig machte. Calcium konnte somit nicht mehr als 2nd Messenger in der Signaltransduktion fungieren.

Vor Versuchsbeginn wurden die mit TG zu präinkubierenden Zellen in Waschpuffer gewaschen und mit Ca²⁺-freiem 0,1%-FCS-Medium sowie EGTA [5 μ M] versetzt.

4.3.1 Der Einfluss des intrazellulären Calciums auf pPKD1

pPKD1 zeigte in diesem Versuch eine deutliche Zunahme der TyrP nach 1 h Präinkubation mit TG (9,7 \pm 1,4-fach der Kontrolle, Bande 5) im Vergleich zu gänzlich unbehandelten PSC (Bande 1). Folgende Stimulationen mit CCK1R-A, TPA oder Gastrin für jeweils 5 min hatten keine signifikanten additiven Effekte auf pPKD1 (Bande 6, 7 und 8).

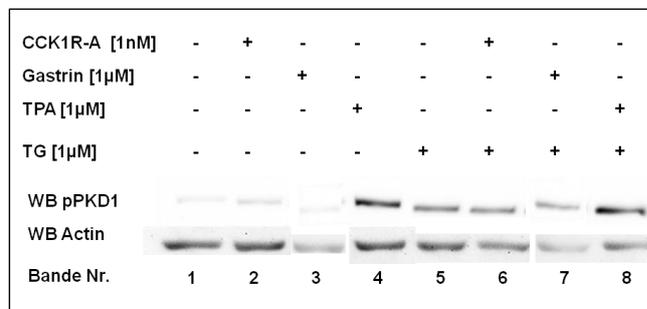
Vergleicht man die Gruppen nach Stimulanzen geteilt ohne und mit vorheriger TG-Inkubation untereinander, zeigte sich für CCK1R-A [1nM] ein hoch signifikanter Anstieg um den Faktor 4,8 vom $2,0 \pm 0,6$ -fachen (Bande 2 ohne TG) auf das $9,7 \pm 1,2$ -fache der Kontrolle (Bande 6 mit TG) und für Gastrin [1 μ M] ein signifikanter Anstieg um das 6,7-fache vom $3,1 \pm 0,7$ -fachen (Bande 3 ohne TG) auf das $21,7 \pm 5,8$ -fache (Bande 7 mit TG) der Kontrolle.

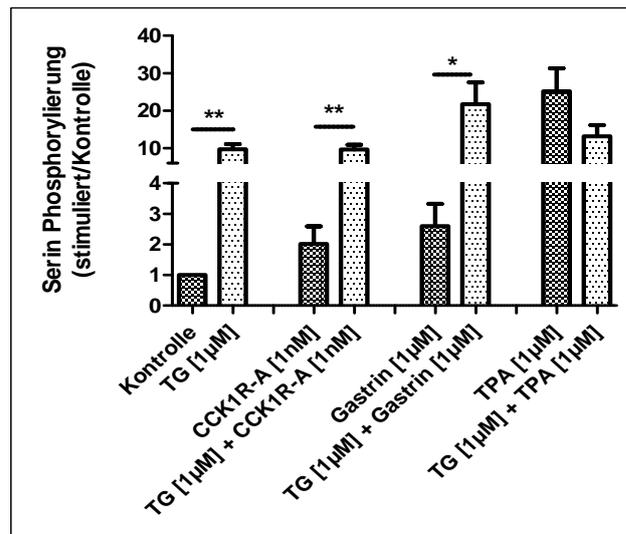
Wie in vorangegangenen Versuchen bereits gezeigt, wurde die maximale PKD1-Phosphorylierung durch die Stimulation mit TPA [1 μ M] erreicht ($25,2 \pm 6,1$ -fach der Kontrolle, Bande 4). Die Präinkubation mit TG halbierte diesen Effekt auf das $13,2 \pm 2,9$ fache (Bande 8). Mit $p=0,15$ ist dieser Effekt allerdings knapp nicht signifikant.

Insgesamt zeigte sich deutlich, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion der PKD1-Aktivierung spielt. Durch Ausschluss des Calciums aus der Signaltransduktionskaskade mittels TG-Präinkubation ließ sich der Effekt der CCK1R- und CCK2R-Stimulation vervielfachen.

Des Weiteren zeigte sich der bedeutende Einfluss der intrazellulären Calciumkonzentration auf die Aktivität der PKC. Die durch den PKC-Aktivator hervorgerufene PKD1-Phosphorylierung konnte durch TG beträchtlich gesenkt werden und betrug nach TG-Präinkubation etwa die Hälfte des Ausgangswertes.

A.





B.

Abbildung 10 Die Effekte des nicht-kompetitiven SERCA-Inhibitors Thapsigargin auf pPKD1. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen, mit GFX [50µM] für 2 h oder mit Thapsigargin [1µM] für 1 h in EGTA [5µM] calciumfreien Medium inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], TPA [1µM] oder Gastrin [1µM] für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pPKD1 analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.2 Der Einfluss des intrazellulären Calciums auf pERK

In diesem Versuch zeigte sich nach 1 h Präinkubation mit TG ohne Zugabe weiterer Stimulanzen eine Steigerung der TyrP von pERK auf das $3,6 \pm 1,0$ -fache der Kontrolle (Bande 5, $p = 0,056$). Auf die Präinkubation folgende Stimulationen mit CCK1R-A [1nM], TPA [1µM] oder Gastrin [1µM] für jeweils 5 min zeigten keine signifikanten additiven Effekte (Bande 6, 7 und 8).

Im Vergleich der einzelnen Stimulanzen untereinander ohne und mit vorangegangener TG-Präinkubation zeigte ausschließlich Gastrin [1µM] eine signifikante 3,46-fache Zunahme vom $1,3 \pm 0,6$ -fachen (Bande 3 ohne TG) auf das $4,5 \pm 0,9$ -fache der Kontrolle (Bande 7 mit TG). CCK1R-A rief eine Verdopplung der TyrP hervor (Bande 2 ohne TG: $1,6 \pm 0,6$ -fach der Kontrolle; Bande 6 mit TG: $3,3 \pm 0,7$ -fach der Kontrolle; $p = 0,11$). Die TPA Stimulationen ohne und mit TG-Präinkubation unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Bande 4 und 8).

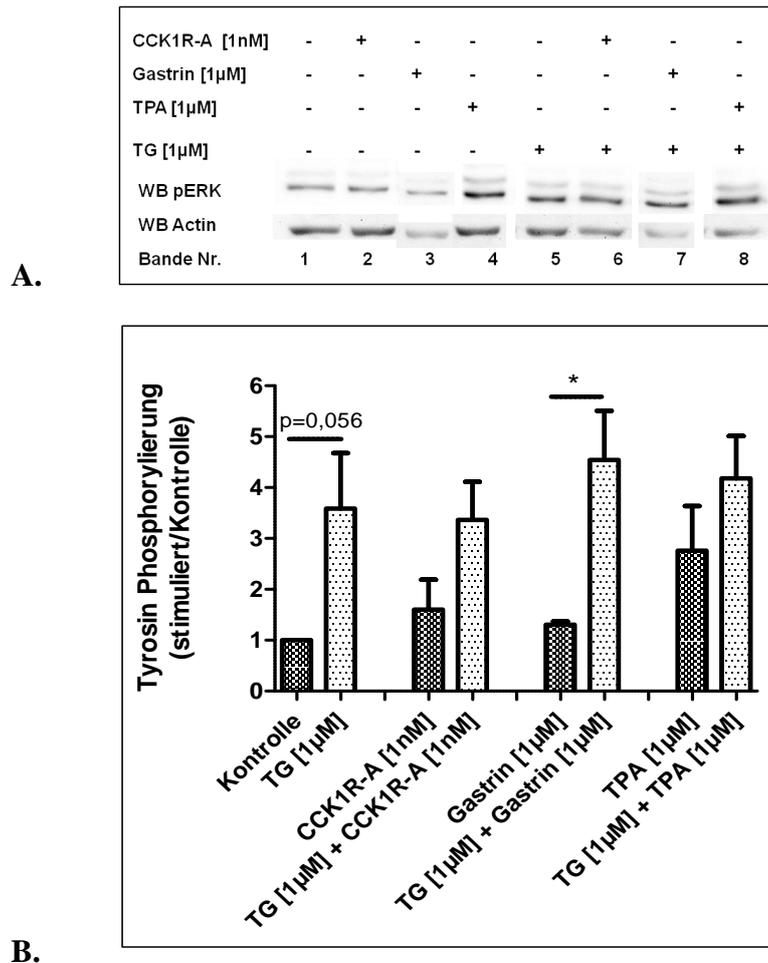


Abbildung 11 Die Effekte des nicht-kompetitiven SERCA-Inhibitors Thapsigargin auf pERK. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen, mit GFX [50µM] für 2 h oder mit Thapsigargin [1µM] für 1 h in EGTA [5µM] calciumfreien Medium inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], TPA [1µM] oder Gastrin [1µM] für jeweils 5 min. Folgend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pERK analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. * $p < 0,05$

4.3.3 Der Einfluss des intrazellulären Calciums auf pSrc

Dieser Versuch begutachtet die Rolle der intrazellulären Calciumkonzentration hinsichtlich der TyrP von Src (Abbildung 12).

Die alleinige Präinkubation mit TG [1µM] rief keine signifikanten Veränderungen bei pSrc hervor (Bande 5). Auch die nachfolgenden Stimulationen mit CCK1R-A [1nM], TPA [1µM] oder Gastrin [1µM] zeigten keine signifikanten Effekte (Bande 6, 7 und 8). Betrachtete man die TyrP von Src nach alleiniger CCK1R-Stimulation ($4,5 \pm 0,4$ -fach der Kontrolle, Bande 2), verglichen mit PSC, die zunächst mit TG präinkubierten und

daraufliegend mit CCK1R-A stimuliert wurden ($1,3 \pm 0,9$ -fach der Kontrolle, Bande 6), zeigte sich eine signifikante Abnahme der Aktivität um ca. 70%.

TPA in Verbindung mit TG zeigte ein ähnliches Verhalten. Die signifikante Abnahme der TyrP erfolgte um den Faktor 0,095 von $2,4 \pm 0,6$ (ohne TG, Bande 4) auf $0,2 \pm 0,01$ (mit TG, Bande 8) und lag damit unter dem basalen Ausgangsniveau der Kontrollgruppe.

Die Gastrin-Stimulation in Verbindung mit TG erzeugte im Vergleich zu ausschließlich mit Gastrin stimulierten PSC keine signifikanten Veränderungen und zeigte eine konstante Phosphorylierung.

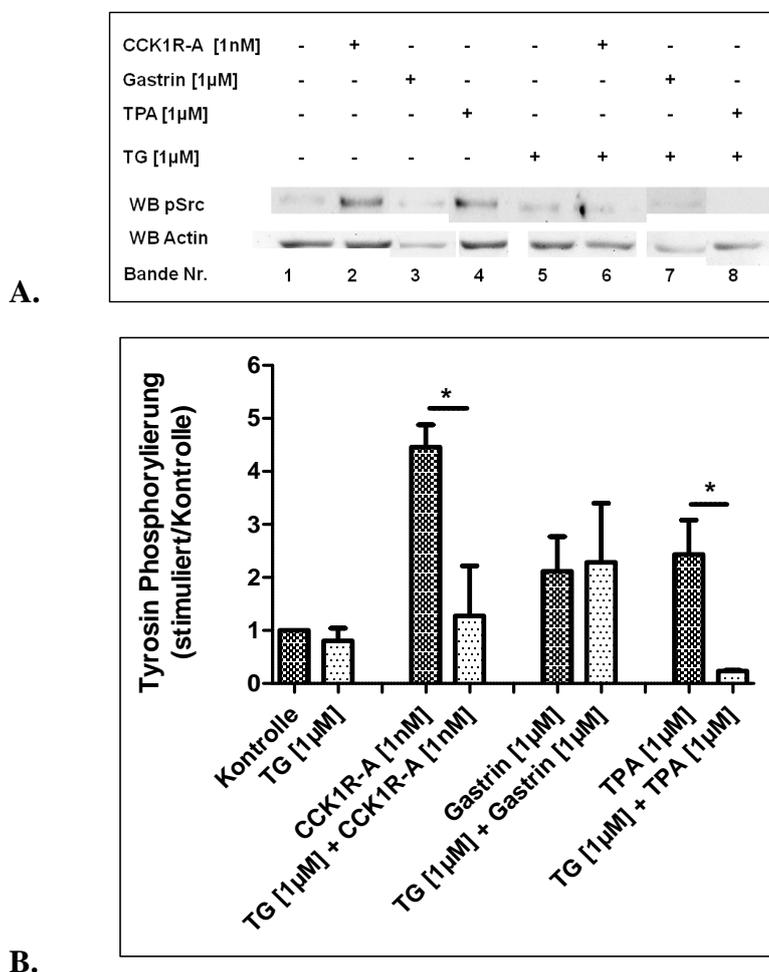


Abbildung 12 Die Effekte des nicht-kompetitiven SERCA-Inhibitors Thapsigargin auf pSrc. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen, mit GFX [50µM] für 2 h oder mit Thapsigargin [1µM] für 1 h in EGTA [5µM] calciumfreien Medium inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], TPA [1µM] oder Gastrin [1µM] für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pSrc analysiert, gestriipt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. * $p < 0,05$

4.4 Die Rolle der Src-Family-Kinasen nach G-Protein gekoppelter Stimulation

Die Src-Family Kinasen (= SFK) sind zytosolische Rezeptor-Tyrosinkinasen. Sie erfüllen u.a. zentrale Aufgaben in der Signaltransduktion. PP2 nahm in diesem Versuch die Rolle eines SFK Inhibitors ein. Speziell die Familienmitglieder Src, Fyn, Lck, Hck wurden durch diesen Inhibitor gehemmt. PP3 diente als inaktives Analogon von PP2 und somit als Effektkontrolle. Die Präinkubation erfolgte für PP2 [20 μ M] und PP3 [20 μ M] für jeweils 2 h.

Um den jeweiligen Effekt der Agenzien auf die PSC zu zeigen, erfolgte die graphische Darstellung jeweils gruppenintern. Die alleinig durch Stimulationen mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1 μ M] und TPA [1 μ M] hervorgerufenen durchschnittlichen Phosphorylierungszunahmen wurden jeweils als 100% angenommen und fungierten als Kontrolle in der jeweiligen Gruppe. Die Effekte von PP2 und PP3 wurden dazu in Relation gesetzt.

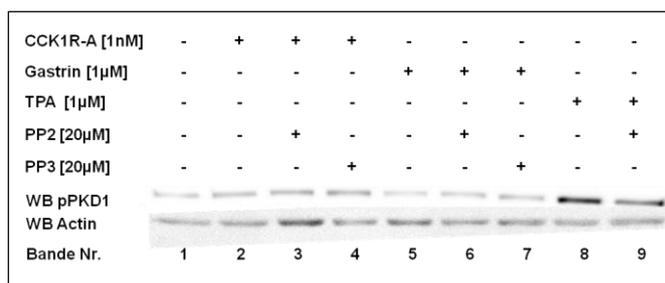
4.4.1 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pPKD1

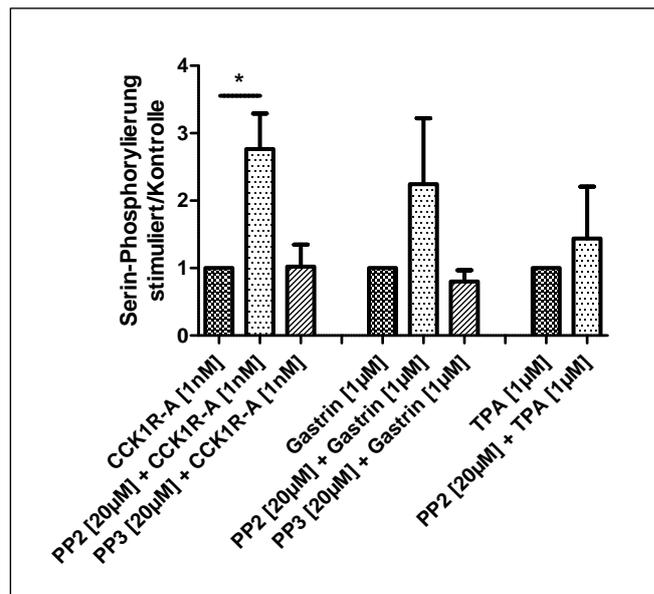
Die CCK1R Stimulation mit CCK1R-A [1nM] und zusätzlicher PP2-Präinkubation rief eine signifikante 2,8-fache Aktivierungssteigerung von pPKD1 verglichen mit ausschließlich durch CCK1R-A stimulierten Zellen hervor (Abbildung 13, Bande 2 und Bande 3).

Die SFK-Inhibition hatte weder nach CCK2R-Stimulation mit Gastrin [1 μ M] (Bande 5 und 6) noch nach TPA-Stimulation [1 μ M] (Bande 8 und 9) einen signifikanten Einfluss auf pPKD1. Zwar ließen sich ähnliche Tendenzen wie nach CCK1R-Stimulation erkennen, diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

Die Präinkubation mit PP3 als Effektkontrolle zeigte keine signifikanten Abweichungen zur Kontrolle.

A.





B.

Abbildung 13 Die Effekte des SFK Inhibitors PP2 und dessen inaktiven Analogons PP3 auf pPKD1. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen, mit PP2 [20µM] oder mit PP3 [20µM] für jeweils 2 h inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1µM] oder TPA [1µM] für jeweils 5 min. Folgend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pPKD1 analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. Zur graphischen Darstellung wurde der Effekt von PP2 und PP3 jeweils in Relation zu ausschließlich mit CCK1R-A, Gastrin und TPA inkubierten PSC gesetzt.
* $p < 0,05$

4.4.2 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pERK

Die 2 h Präinkubation der PSC mit PP2 [20µM] zeigte in diesem Versuch einen deutlichen Effekt auf pERK (Abbildung 14). Wie in vorherigen Versuchen dargestellt, resultierten die Stimulationen mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1µM] und TPA [1µM] in der jeweiligen Phosphorylierungszunahme von ERK. Die zusätzliche PP2-Präinkubation und somit SFK-Inhibition konnte diese Zunahmen vollständig unterdrücken. Im Durchschnitt rief die PP2-Inkubation vor CCK1R Stimulation eine Reduktion auf das $0,61 \pm 0,12$ -fache hervor (Bande 2 und 3, $p=0,05$). Die durch Stimulation mit Gastrin induzierte TyrP wurde hoch signifikant auf das $0,35 \pm 0,02$ -fache herabgesenkt (Bande 5 und 6). Die PP2-Präinkubation reduzierte die TPA-induzierte Zunahme der TyrP hoch signifikant um die Hälfte (Bande 8 und 9).

Die Präinkubation mit PP3 als Effektkontrolle zeigte keine signifikanten Veränderungen.

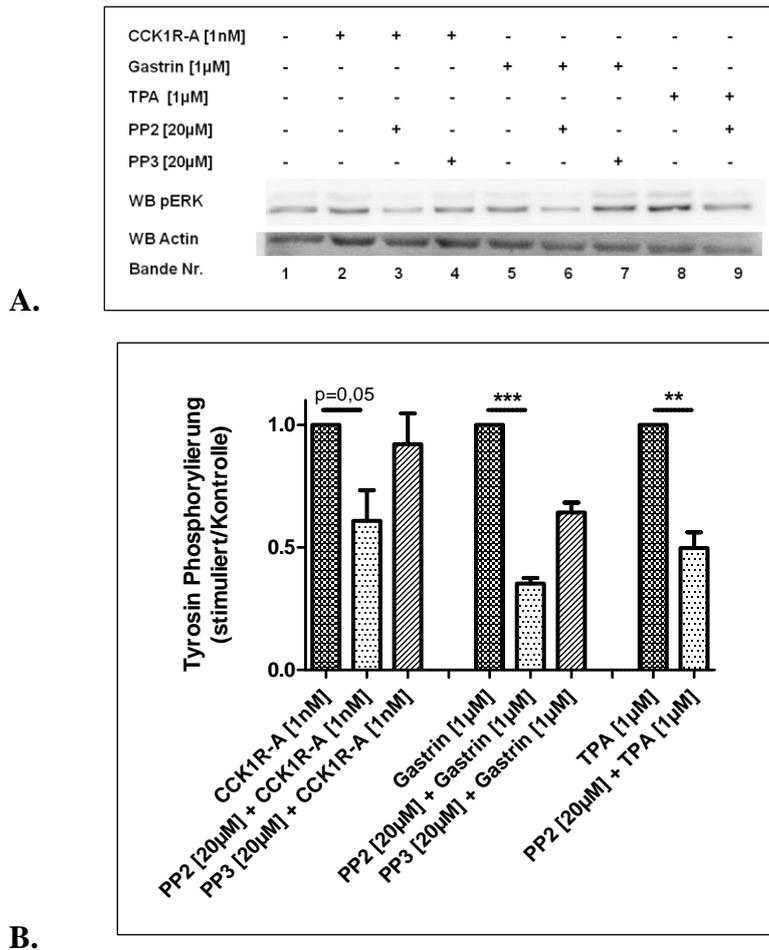


Abbildung 14 Die Effekte des SFK Inhibitors PP2 und dessen inaktiven Analogons PP3 auf pERK. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen, mit PP2 [20µM] oder mit PP3 [20µM] für jeweils 2 h inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1µM] oder TPA [1µM] für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pERK analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. Zur graphischen Darstellung wurde der Effekt von PP2 und PP3 jeweils in Relation zu ausschließlich mit CCK1R-A, Gastrin und TPA inkubierten PSC gesetzt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.4.3 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pSrc

Die Inhibition der Src Family Kinasen mittels PP2 wurde hier bezüglich seiner Wirkung auf die TyrP des Src-Proteins selbst untersucht.

In vorherigen Versuchen riefen CCK1R-A, Gastrin und TPA jeweils eine Zunahme der TyrP von pSrc hervor. Die Stimulationen der CCK-Rezeptoren mit CCK1R-A und Gastrin nach vorangegangener PP2 Inkubation zeigten in beiden Fällen einen additiven Effekt des bisher Gesehenen und resultierten in einer zusätzlichen signifikanten Steigerung der TyrP. Die CCK1R-vermittelte TyrP von Src ließ sich mittels PP2-Präinkubation auf das $2,46 \pm 0,43$ -fache steigern (Bande 2 und 3). Die SFK-Inhibition

vor CCK2R-Stimulation mit Gastrin hatte mit einer $2,90 \pm 0,5$ -fachen Zunahme einen noch größeren Effekt zur Folge (Bande 5 und 6). TPA verhielt sich gleichermaßen. Die Präinkubation mit PP2 verdreifachte die TyrP von Src (Bande 8 und 9). Mit $p=0,08$ gilt dieses Ergebnis jedoch knapp als nicht signifikant.

Durch die Präinkubation mit PP3 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

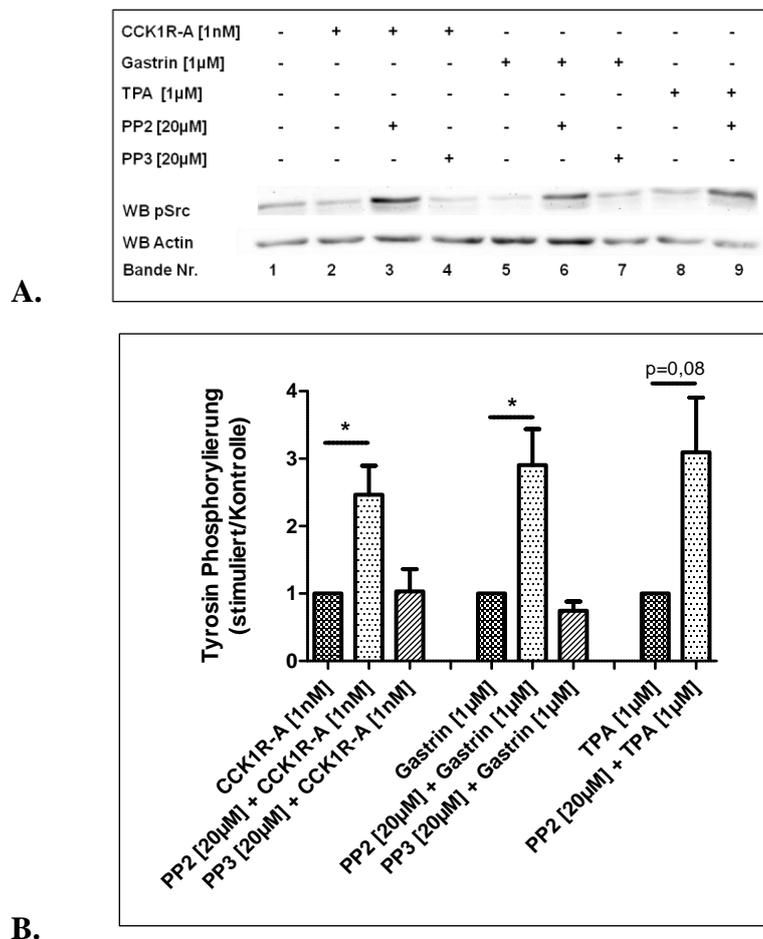


Abbildung 15 Die Effekte des SFK PP2 und dessen inaktiven Analogons PP3 auf pSrc. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulanzen, mit PP2 [20µM] oder mit PP3 [20µM] für jeweils 2 h inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1µM] oder TPA [1µM] für jeweils 5 min. Folgend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pSrc analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. Zur graphischen Darstellung wurde der Effekt von PP2 und PP3 jeweils in Relation zu ausschließlich mit CCK1R-A, Gastrin und TPA inkubierten PSC gesetzt.
* $p < 0,05$

4.4.4 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pAkt

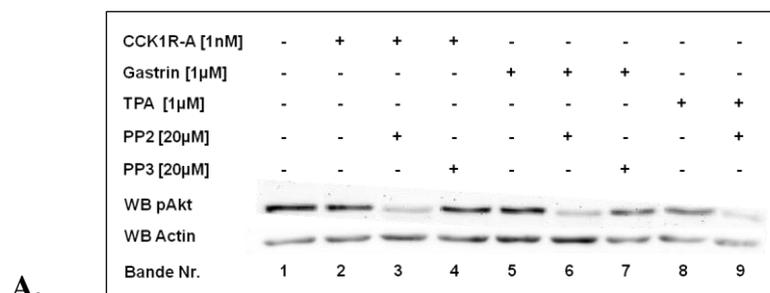
Hier wurde der Effekt von PP2 und somit der Effekt der SFK-Inhibition mit Hinblick auf die SerP des Proteins Akt untersucht. Die maximale Stimulation über CCK2R wurde für Akt bisher bei 2,5 min beschrieben (Berna, Seiz et al. 2010). Um eine Vergleichbarkeit mit den weiteren hier durchgeführten PP2-Inhibitionsversuchen zu schaffen und da für die 5 min Stimulation eine nur marginal geringere Stimulation beschrieben wurde, erfolgte in diesen Versuchen die Stimulation mit Gastrin ebenfalls über 5 min.

Zunächst musste hierfür die alleinige 5 min Stimulation mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1 μ M] und TPA [1 μ M] für pAkt quantifiziert werden (Abbildung 16 B). Die Stimulation mit CCK1R-A führte zu einer hoch signifikanten Abnahme der pAkt Aktivität auf das $0,6 \pm 0,1$ -fache der Kontrolle (Bande 2). Ähnlich verhielt es sich mit TPA. Die Stimulation mit dem PKC-Agonisten senkte die Akt-Phosphorylierung hoch signifikant auf das $0,4 \pm 0,1$ -fache des Ausgangswertes (Bande 8). Gastrin hingegen rief eine starke Zunahme der Akt-Phosphorylierung um den Faktor $2,9 \pm 1,2$ hervor (Bande 5, $p=0,12$).

Die Präinkubation mit PP2 hatte durchweg eine inhibierende Wirkung auf pAkt. PP2 senkte die CCK1-R vermittelte Akt-Phosphorylierung auf das $0,32 \pm 0,04$ -fache. Die durch Gastrin hervorgerufene Stimulation wurde vollständig durch PP2 unterdrückt. Es ergab sich ein Wert vom lediglich $0,09 \pm 0,03$ -fachen der Kontrolle. Die durch TPA erzeugte inhibitorische Wirkung auf pAkt wurde durch PP2 verstärkt und um den Faktor $0,46 \pm 0,16$ gesenkt (Bande 9).

Zusammenfassend zeigte dieser Versuch, dass sich die CCK1R-Stimulation inhibitorisch auf den Phosphorylierungsgrad von pAkt auswirkt und dieser Effekt durch SFK-Inhibition weiter verstärkt werden kann.

Die CCK2R-Stimulation mit Gastrin hingegen vermittelte eine Zunahme der SerP. Durch PP2 konnte diese Stimulation komplett unterdrückt werden.



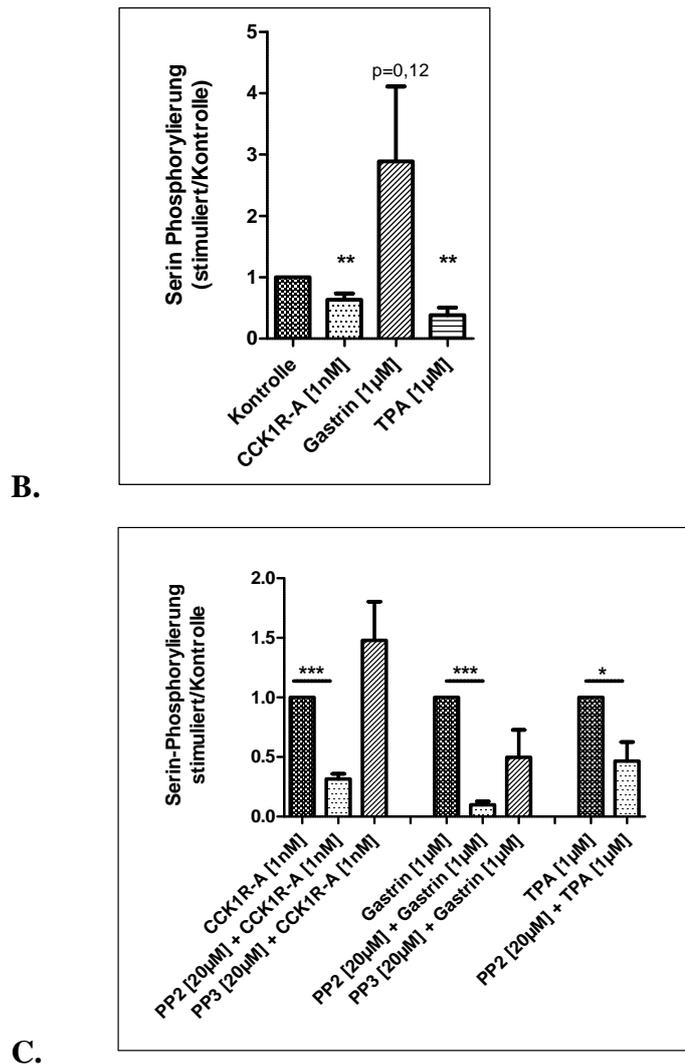


Abbildung 16 Die Effekte SFK Inhibitors PP2 und dessen inaktiven Analogonss PP3 auf pAkt. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne Stimulantien, mit PP2 [20µM] oder mit PP3 [20µM] für jeweils 2 h inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1µM] oder TPA [1µM] für jeweils 5 min. Folgend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pAkt analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen den Durchschnittswert \pm SEM dar. ** $p < 0,01$

C. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. Zur graphischen Darstellung wurde der Effekt von PP2 und PP3 jeweils in Relation zu ausschließlich mit CCK1R-A, Gastrin und TPA inkubierten PSC gesetzt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

4.4.5 Der Einfluss der Src-Family-Kinasen auf pELK

pElk ist eines der wichtigsten Downstream-Targets des Proteins pERK. Als Transkriptionsfaktor ist pElk u.a. für die Vermittlung proliferativer Stimuli verantwortlich. Er wird über Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Der Effekt des SFK-Inhibitors PP2 wurde hier mit Hinblick auf pElk näher betrachtet. Abbildung 17 B zeigt

die Quantifizierung der durch Stimulation mit CCK1R-A [1nM] ($326 \pm 91\%$), Gastrin [$1\mu\text{M}$] ($278 \pm 33\%$) und TPA [$1\mu\text{M}$] ($239 \pm 94\%$) erzeugten Steigerung der TyrP von pElk.

Weder die Stimulation mit CCK1R-A (Bande 2 und 3), noch mit Gastrin (Bande 5 und 6) oder TPA (Bande 8 und 9) erzeugte nach 2 h Inkubation mit PP2 [$20\mu\text{M}$] im Vergleich zu nicht SFK-inhibierten PSC signifikante Veränderungen von pElk (Abbildung 17 C).

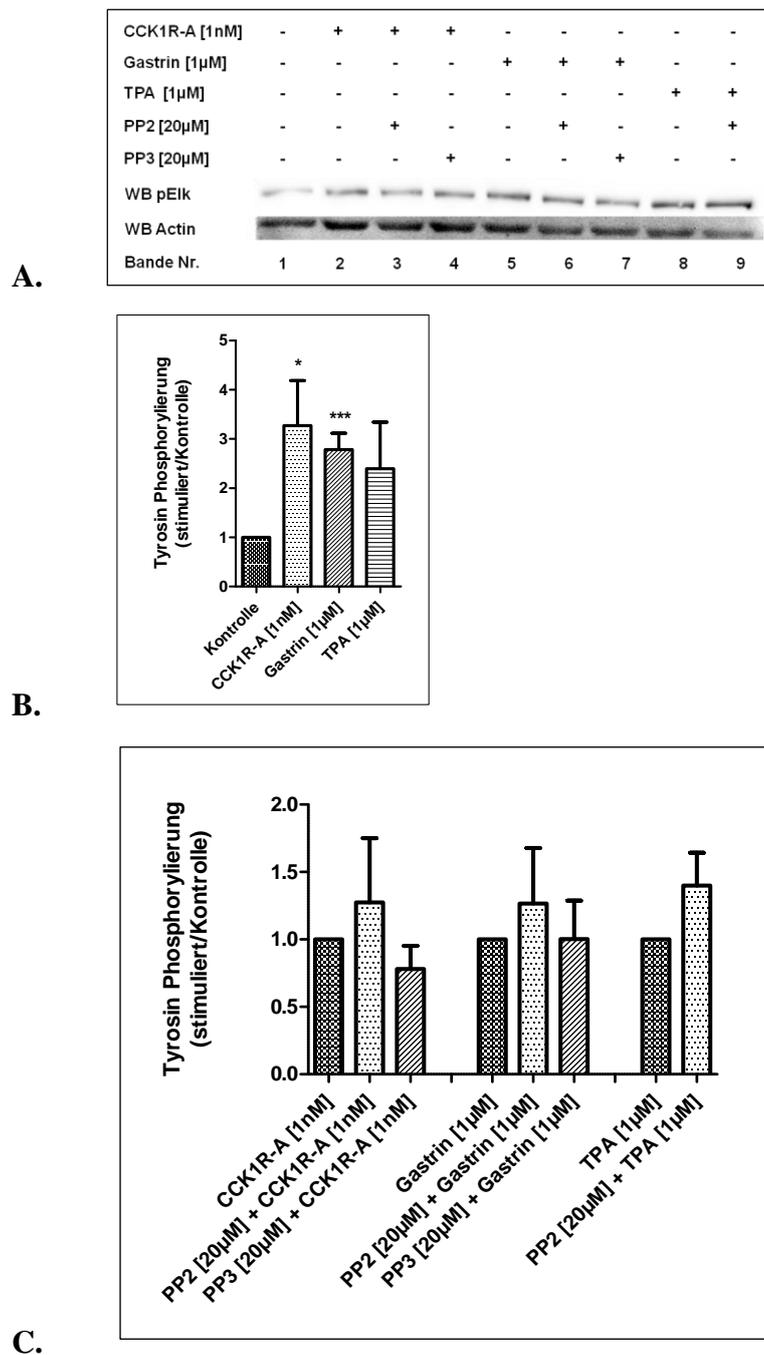


Abbildung 17 Die Effekte des SFK Inhibitors PP2 und dessen inaktiven Analogon PP3 auf pElk. PSC wurden für 6 Tage kultiviert und am 7.Tag auf 0,1%-FCS-Serum herabgesetzt und am Folgetag ohne

Stimulanzen, mit PP2 [20 μ M] oder mit PP3 [20 μ M] für jeweils 2 h inkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte die Stimulation ohne Zugaben (Kontrolle), mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1 μ M] oder TPA [1 μ M] für jeweils 5 min. Folgend wurden die Zellen lysiert.

A. Die Lysate wurden mittels WB für pElk analysiert, gestrippt und mit Actin als Beladungskontrolle erneut analysiert.

B. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen den Durchschnittswert \pm SEM dar. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

C. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar. Zur graphischen Darstellung wurde der Effekt von PP2 und PP3 jeweils in Relation zu ausschließlich mit CCK1R-A, Gastrin und TPA inkubierten PSC gesetzt.

5 DISKUSSION

Die chronische Pankreatitis ist eine Krankheit, die mit einer hohen Morbidität einhergeht. Langjähriger Alkoholabusus stellt den wohl mit Abstand größten Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis dar (Deng, Wang et al. 2005). Aufgrund des zunehmenden Alkoholkonsums der Bevölkerung (Konig, Spitaler et al. 1992) ist die Inzidenz der Erkrankung in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich angestiegen. Die Pankreasfibrose ist dabei ein grundlegendes Merkmal der Erkrankung, welches histopathologisch bei chronischen Pankreatitiden verschiedenster Genese beobachtet werden kann (Kloppel, Detlefsen et al. 2004).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass PSC bei der Fibrogenese des Pankreas von zentraler Bedeutung sind (Apte, Phillips et al. 2000; Masamune, Satoh et al. 2005; Hama, Ohnishi et al. 2006; Masamune, Kikuta et al. 2009). Die genauen Signalwege, welche die Kollagensynthese induzieren und somit für die Fibrose verantwortlich gemacht werden können, sind jedoch größtenteils unverstanden. Des Weiteren wurde die direkte Wirkung des Peptidhormons CCK, dessen erhöhte Konzentration häufig im Plasma der an chronischer Pankreatitis erkrankten Patienten gemessen wird (Slaff, Jacobson et al. 1984; Schafmayer, Becker et al. 1985), auf PSC bisher kaum untersucht.

Neuste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass PSC funktionelle CCK1- und CCK2-Rezeptoren exprimieren (Berna, Seiz et al. 2010). Dies ist anhand der Tatsache, dass pankreatische Azinuszellen ausschließlich CCK1-Rezeptoren exprimieren, ein unerwartetes Ergebnis (Reubi, Waser et al. 2003). Darüber hinaus deuten die erhobenen Daten daraufhin, dass die natürlichen CCK1R- und CCK2R-Agonisten CCK und Gastrin profibrogene Signalwege wie Akt, ERK und Src in PSC aktivieren und darüber eine direkte Wirkung auf PSC entwickeln (Berna, Seiz et al. 2010). PKD1 ist ein weiteres Protein, welches in der vorliegenden Arbeit aufgrund seiner zentralen Rolle in Signaltransduktion, Zellproliferation und Apoptoseinduktion genauer betrachtet wurde (Liljedahl, Maeda et al. 2001; Zhukova, Sinnott-Smith et al. 2001; Trauzold, Schmiedel et al. 2003).

Die o.g. Proteine (PKD1, ERK, Akt und Src) sind wahrscheinlich maßgeblich an der Fibrogenese bei chronischer Pankreatitis beteiligt und daher von herausragendem Interesse bezüglich weiterer Forschungen an PSC.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es nun, die Signaltransduktionswege in PSC nach G-Protein gekoppelter Stimulation mittels verschiedener spezifischer CCK1R- und

CCK2R-Agonisten vor dem Hintergrund der Beteiligung an der Fibrogenese genauer zu beleuchten.

5.1 Die Bedeutung der Phospholipase C für verschiedene Proteine

Die Phospholipase C ist ein Enzym aus der Gruppe der Hydrolasen. Sie ist ein Schlüsselenzym im Phosphoinositolstoffwechsel und von zentraler Bedeutung in der Signaltransduktion. Auch nach G-Protein gekoppelter Stimulation spielt die Phospholipase C eine bedeutsame Rolle in der Signaltransduktion. Die GPCR-Stimulation triggert die Aktivierung der Phospholipase C. Die membrangebundene Lipase spaltet PIP₂ (= Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat) zu DAG (= Diacylglycerin) und IP₃ (= Inositol-1,4,5-trisphosphat). IP₃ bindet an das rER und induziert über diese Bindung die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern. DAG bleibt währenddessen membrangebunden und übernimmt in Verbindung mit den freigesetzten Ca²⁺-Ionen, die als 2nd Messenger fungieren, die Tyrosinphosphorylierung der PKC (Brose, Betz et al. 2004).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche beschäftigten sich zunächst mit der Phospholipase C bzw. mit denen durch die Phospholipase aktivierten Prozesse: der PKC und der Mobilisation von Calcium aus intrazellulären Speichern. Die PKC wurde zu diesem Zwecke mit GFX, einem Inhibitor von klassischen und neuartigen PKC-Isoformen, gehemmt (Toullec, Pianetti et al. 1991). Thapsigargin in Verbindung mit EGTA wurde genutzt, um Calcium aus intrazellulären Speichern zu depletieren, zu binden und somit reaktionsunfähig zu machen (Tapia, Ferris et al. 1999).

Die erhobenen Daten zeigen, dass die Proteinkinase C eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung der Proteine PKD1 und Src nach CCK1R- und CCK2R-Stimulation einnimmt. Die Inhibition der PKC durch GFX resultierte in einer vollständigen Unterdrückung der durch CCK1R- oder CCK2R-Stimulation hervorgerufenen Effekte auf PKD1 und Src. Für die TyrP von ERK ließ sich keine relevante Funktion der PKC nach Stimulation der CCK-Rezeptoren erkennen.

Des Weiteren lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass auch die intrazelluläre Calciumkonzentration, insbesondere bei den Phosphorylierungen von PKD1 und ERK, modulierende, in diesem Fall inhibitorische, Funktionen in der Signaltransduktion der PSC erfüllt. Die Präinkubation mit Thapsigargin vervielfachte die durch Stimulation mit CCK1R-A bzw. Gastrin hervorgerufene Phosphorylierung beider Proteine deutlich. Auf Src scheint sich die intrazelluläre Calciumkonzentration genau gegenteilig auszuwirken.

Thapsigargin inhibierte nach CCK1R-Stimulation die Src-Phosphorylierung stark, während es auf die CCK2R-vermittelte TyrP des Proteins keinen signifikanten Einfluss ausübte.

PKD1

In pankreatischen Azinuszellen erfolgt die PKD1-Phosphorylierung über beide Arme der PLC, über die PKC und über den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Präinkubation der Azinuszellen mit GFX oder Thapsigargin verursachte jeweils eine Reduktion der Phosphorylierung (Berna, Hoffmann et al. 2007). Diese Erkenntnisse decken sich nur teilweise mit den hier erbrachten Ergebnissen bezüglich PSC.

In PSC nahm die PKD1-Phosphorylierung nach Stimulation beider CCK-Rezeptoren hoch signifikant zu (CCK1R $440 \pm 40 \%$, CCK2R $174 \pm 43\%$). Die Stimulation wurde durch GFX Präinkubation vollständig unterdrückt (Abbildung 7B). Dies lässt vermuten, dass die SerP von pPKD1 nach CCK1R- und CCK2R-Stimulation zumindest zu Teilen über die PKC transduziert wird, so wie es auch in pankreatischen Azinuszellen der Fall ist (Berna, Hoffmann et al. 2007).

Bezüglich der intrazellulären Calciumkonzentration zeigten sich überraschende Ergebnisse. Nach Präinkubation mit Thapsigargin ließen sich durchweg signifikante und starke Anstiege von pPKD1 beobachten. Während schon die alleinige Stimulation der CCK-Rezeptoren eine Phosphorylierungszunahme von PKD1 nach sich zog, wurde diese Zunahme durch TG-Präinkubation erheblich potenziert. Sie wurde durch CCK1R-Stimulation 4,8-fach auf $947 \pm 124\%$ und nach CCK2R-Stimulation 6,7-fach auf $2170 \pm 548\%$ gesteigert (Abbildung 10B). Auch die alleinige Stimulation mit TG führte zu einem hoch signifikanten, starken Anstieg von pPKD1 auf $969 \pm 138\%$ der Kontrolle.

Diese Ergebnisse sind unerwartet, da sich PSC hier gegensätzlich zu pankreatischen Azinuszellen verhalten. In Azinuszellen erfolgt die PKD1-Phosphorylierung nach Stimulation mit CCK über beide Arme der PLC-vermittelten Signalkaskade. Die Präinkubation mit TG hat daher in Azinuszellen eine starke Abnahme der PKD1-Phosphorylierung zur Folge (Berna, Hoffmann et al. 2007). In PSC wurde anhand der vorliegenden Arbeit eine starke Phosphorylierungssteigerung nach TG-Präinkubation gezeigt. Dies lässt den Schluss zu, dass sich die basale intrazelluläre Calciumkonzentration in PSC inhibitorisch auf die Phosphorylierung und somit auf die Aktivität von pPKD1 auswirkt.

ERK

PDGF ist einer der stärksten bekannten Aktivatoren für PSC. Der Wachstumsfaktor entwickelt seinen Effekt hauptsächlich über die Phosphorylierung des Proteins ERK (Jaster, Sparmann et al. 2002; Wan, Wang et al. 2005). Die Stimulationen mit Gastrin und CCK, so zeigen neuste Studien, erzeugen gleichermaßen signifikante Anstiege der Proteinphosphorylierung (Berna, Seiz et al. 2010). Die Aktivierung von ERK über GPCR kann PKC-abhängig und PKC-unabhängig erfolgen (Rozenfurt 2007).

In unseren Versuchen wurde nach 5 min CCK1R-Stimulation bzw. CCK2R-Stimulation eine Zunahme von pERK gezeigt. Die Inhibition der PKC hatte keine signifikante Änderung der Phosphorylierung zur Folge. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die TyrP von pERK nach CCK1R und CCK2R-Stimulation in Unabhängigkeit der PKC abläuft (Abbildung 8).

Mit Thapsigargin präinkubierte PSC zeigten im Vergleich zu unbehandelten PSC eine deutliche Zunahme von pERK um das 3,6-fache der Kontrolle. Die zusätzliche CCK2R-Stimulation mit Gastrin erzeugte einen additiven, ebenfalls signifikanten Effekt. Nach CCK1R-Stimulation und TG-Präinkubation verhielt sich pERK tendenziell gleichartig, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 11B). Zusammenfassend zeigte sich, dass sich die Anwesenheit von Calcium inhibierend auf die Proteinphosphorylierung bzw. die Abwesenheit von Calcium aktivierend auf die ERK-Kaskade auswirkt.

Intrazelluläres Calcium ist ein vielseitiger 2nd Messenger, der ubiquitär intrazellulär vorhanden und durch verschiedenste Mechanismen beeinflussbar ist. Es ist bekannt, dass sich eine veränderte Calciumkonzentration modulierend auf die ERK-Kaskade auswirken kann (Chuderland und Seger 2008). In der Mehrzahl der Fälle ruft eine erhöhte Calciumkonzentration auch eine erhöhte ERK-Aktivität hervor. Doch der inhibierend modulierende Effekt von Calcium, wie er sich hier in PSC zeigte, wurde ebenfalls mehrfach wissenschaftlich beschrieben (Agell, Bachs et al. 2002; Cullen und Lockyer 2002).

Src

Die Src-Family-Kinasen nehmen in pankreatischen Azinuszellen bedeutende Funktionen in den verschiedensten Prozessen ein, dazu gehören u.a. die Enzymsekretion, das Membranrecycling, die Proteinsynthese und die Apoptoseregulation (Tsunoda, Yoshida et al. 1996; Nozu, Owyang et al. 2000; Redondo, Lajas et al. 2003; Lynch, Kohler et al. 2004). In Azinuszellen können SFK

durch Gastrin und CCK aktiviert werden (Nozu, Owyang et al. 2000; Tsunoda, Yoshida et al. 2004; Pace, Tapia et al. 2006). Dies wurde homolog bereits für PSC beschrieben (Berna, Seiz et al. 2010).

Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich pSrc im Western Blot zeigten, dass die Stimulation der CCK-Rezeptoren 1 und 2 in PSC in einer signifikanten Phosphorylierungszunahme resultierte (CCK1R > CCK2R, Abbildung 9). Die PKC-Inhibition mit GFX vor Stimulation der Rezeptoren erzeugte in beiden Fällen eine Reduktion der TyrP. Die TyrP von pSrc nach CCK1R-Stimulation halbierte sich signifikant nach GFX-Inkubation von $312 \pm 46\%$ auf $150 \pm 11\%$ (Abbildung 9B). Die weiterhin signifikante Steigerung von 150% des Basalwertes lässt den Schluss zu, dass die Src-Phosphorylierung nach CCK1R-Stimulation einerseits in Abhängigkeit der PKC verläuft, andererseits aber auch über PKC-unabhängige Signalwege transduziert werden muss. Die CCK2R-Stimulation mit Gastrin nach PKC-Inhibition zeigte ebenfalls eine Phosphorylierungsreduktion von pSrc. Sie fiel jedoch schwächer und nicht signifikant aus ($p=0,3$). Die CCK2R-vermittelte Src-Phosphorylierung läuft somit sehr wahrscheinlich auf PKC-unabhängigem Wege ab. Die alleinige Aktivierung der PKC mit TPA resultierte in einer starken Phosphorylierungssteigerung von pSrc.

Die Präinkubation mit Thapsigargin wirkte sich auf pSrc gegensätzlich zu pPKD1 und pERK aus. Die stärkste Zunahme der TyrP von pSrc rief die CCK1R-Stimulation mit $445 \pm 42\%$ hervor, durch TG-Präinkubation wurde sie auf $127 \pm 97\%$ reduziert. Dieser signifikante Unterschied führt zu der Annahme, dass ein großer Teil der Src-Phosphorylierung nach CCK1R-Stimulation über den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration verläuft. Nach CCK2R-Stimulation zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg von pSrc, doch ähnlich der Präinkubation mit GFX rief auch die Präinkubation mit TG keine signifikanten Veränderungen hervor (Abbildung 12B).

Die PKC und der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration sind an der TyrP von pSrc nach Stimulation des GPCR CCK1R beteiligt. Es lässt sich feststellen, dass sich die Rezeptoren CCK1R in PSC und pankreatischen Azinuszellen kongruent zueinander verhalten (Pace, Tapia et al. 2006). Die CCK2R-vermittelte Src-Phosphorylierung zeigte hingegen ein von der intrazellulären Calciumkonzentration und der Aktivität der PKC größtenteils unabhängiges Verhalten.

5.2 Die Wirkung der Src-Family-Kinasen auf verschiedene Proteine

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich näher mit den Src-Family-Kinasen. Die Gruppe der SFK besteht aus neun strukturell ähnlichen Familienmitgliedern, die über verschiedenste Mechanismen wie z.B. Wachstumsfaktoren, oxidativen Stress und GPCR aktiviert werden können. Die aktivierten Kinasen interagieren daraufhin mit einer Vielzahl an zytosolischen, nukleären und membranständigen Proteinen, welche über Tyrosinphosphorylierung modifiziert werden und Einfluss auf Zellwachstum, Gentranskription, Apoptose und Zelladhäsion nehmen (Yeatman 2004). Mittels PP2 wurden die SFK, insbesondere die Familienmitglieder Src, Fyn, Lck und Hck, inhibiert. PP3, ein inaktives PP2-Analogon, wurde als Negativkontrolle genutzt (Hanke, Gardner et al. 1996; Liu, Bishop et al. 1999).

Die SFK zeigten hierbei unerwartete Ergebnisse. Die Inhibition der SFK rief im Western Blot einen starken, signifikanten Anstieg von pSrc selbst hervor. Dieser Effekt wiederholte sich ähnlich bei Betrachtung von pPKD1. Beide Proteine reagierten auf Inhibition der SFK vor Stimulation der CCK-Rezeptoren mit einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung.

Einen signifikanten Abfall der Phosphorylierung in Folge der SFK-Inhibition wiesen hingegen pERK und pAkt auf. Dies gibt Anlass zu der Annahme, dass SFK einen positiven Effekt in der Signaltransduktion auf die ERK- und die Akt-Phosphorylierung nach CCK1R- und CCK2R-Stimulation haben.

PKD1

Die PKD1-Phosphorylierung nach CCK1R- und CCK2R-Stimulation, so zeigten unsere Ergebnisse, erfolgt in negativer Abhängigkeit zur Aktivität der Src-Family-Kinasen. Die SFK-Inhibition vor CCK1R-Stimulation führte zu einer 2,8-fachen, signifikanten Zunahme der PKD1-Phosphorylierung in PSC. Die CCK2R-Stimulation in Kombination mit PP2-Präinkubation führte zu einer Phosphorylierungszunahme von $224 \pm 97\%$ (Abbildung 13B). Die Zunahme der SerP von PKD1 nach SFK-Inhibition deutet auf einen inhibierenden Charakter der SFK nach GPCR-Stimulation hin.

Diese Ergebnisse zeigen ein divergentes Verhalten der PSC gegenüber pankreatischen Azinuszellen, in denen die Phosphorylierung von PKD1 SFK-unabhängig verläuft, so dass die Präinkubation mit PP2 die Signaltransduktion nicht beeinflusst (Berna, Hoffmann et al. 2007).

ERK und Elk

Die PSC-Aktivierung durch Alkohol und Acetaldehyd wird über die Phosphorylierung von ERK und dessen Downstream-Target dem Transkriptionsfaktor Elk transduziert (McCarroll, Phillips et al. 2003). Die ERK-Aktivierung erfolgt u.a. durch GPCR und Wachstumsfaktoren und resultiert in der Phosphorylierung von Elk. pElk vermittelt die Transkription von c-fos. Dieser Prozess resultiert wiederum in Zellwachstum und -proliferation (Marshall 1995; Treisman 1995). In PSC wurde bereits eine MEK-ERK abhängige TyrP des Downstream-Targets Elk beschrieben (Berna, Seiz et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die durch CCK1R- und CCK2R-Stimulation hervorgerufene erhöhte ERK-Aktivierung mittels PP2-Präinkubation vollständig unterdrückt werden konnte, so dass die Ergebnisse gleichwertig und sogar unterhalb der basalen TyrP von pERK in PSC lagen. Besonders eindrücklich ließ sich dies durch CCK2R-Stimulation zeigen. Die PP2-Präinkubation senkte die TyrP hochsignifikant auf $35 \pm 2\%$ der ausschließlich mit Gastrin stimulierten PSC (Abbildung 14B). Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Abhängigkeit der ERK-Phosphorylierung von SFK.

Vor Versuchsbeginn avisierten wir nach PSC Stimulation einen Anstieg bzw. nach zusätzlicher PP2 Präinkubation einen Reduktion von pElk konkordant zum Verhalten von pERK sehen zu können. Der erwartete Anstieg von pELK nach CCK1R und CCK2R trat zwar ein (CCK1R $326 \pm 91\%$ und CCK2R $278 \pm 33\%$, Abbildung 17B), jedoch resultierte die PP2-Präinkubation in keiner signifikanten Reduktion von pElk, wie es aufgrund der pERK-Reduktion zu erwarten gewesen wäre (Abbildung 18). Diese Ergebnisse waren unerwartet und bedürfen weiterer Beleuchtung, um diese Beobachtung weiter verifizieren zu können.

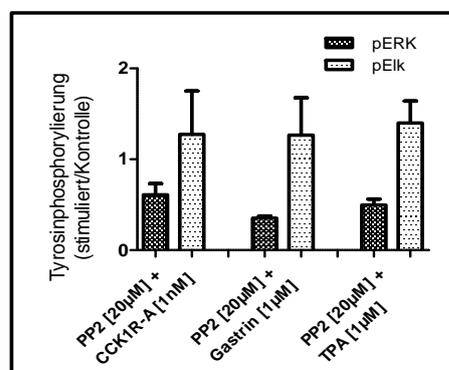


Abbildung 18 Direkter Vergleich der Tyrosinphosphorylierung von pERK und pElk nach 2 h Präinkubation mit PP2 [20µM] und nachfolgender Stimulation mit CCK1R-A [1nM], Gastrin [1µM] und TPA [1µM] für jeweils 5 min. Mittels Dichtemessung erfolgte die Quantifizierung der einzelnen WB-Banden. Die Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM dar (siehe dazu auch Abbildung 14 und Abbildung 17).

Src

Die Stimulation der Rezeptoren CCK1 und CCK2 erzeugte im Western Blot einen deutlichen Anstieg von pSrc-Werte. Die Inhibition der SFK rief eine unerwartete additive Steigerung der Src-Phosphorylierung hervor und zwar tendentiell gleichermaßen nach CCK1R-A, Gastrin und TPA-Stimulation (Abbildung 15B). Diese Ergebnisse konnten konkordant und mehrfach in unserer Arbeitsgruppe reproduziert werden.

Für den stimulierenden Effekt, den PP2 hier auf SFK ausübt, gibt es bisher keine Veröffentlichungen. Es kommen verschiedene Ursachen für dieses Ergebnis in Frage. Eine potentielle Ursache wäre, dass PP2 nur die Familienmitglieder Src, Fyn, Lck und Hck, der insgesamt neun verschiedenen Src-Family-Kinasen, inhibiert. Infolgedessen könnte die Inhibition dieser Familienmitglieder eine Aktivierung und somit Phosphorylierungszunahme der anderen zur Folge haben. Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um einen allgemein Src-Family-Kinase bindenden Antikörper. Die Differenzierung, an welche der Familienmitglieder der Kinase der Antikörper sich genau bindet, ist somit nicht vornehmbar. Es ist also möglich, dass zwar einige Familienmitglieder mittels PP2 inhibiert, andere aber weiterhin über CCK-Rezeptorstimulation aktiviert wurden. Die Summe des ganzen könnte in einer Phosphorylierungszunahme von pSrc im Western Blot resultiert haben.

Um diese Ergebnisse weiter differenzieren zu können, sind nachfolgende Versuche z.B. mit einem anderen SFK-Inhibitor im Vergleich mit PP2 nötig.

Akt

Die Akt-Aktivierung erfolgt für gewöhnlich über die PI3-Kinase (= Phosphoinositid-3-Kinasen). Analog wurde dieser Prozess für pankreatische Azinuszellen nach Stimulation des CCK1R high-Affinity Status beschrieben (Berna, Tapia et al. 2009). Die wichtigen Funktionen von Akt im Zellzyklusgeschehen der PSC, insbesondere in Bezug auf profibrogene Stimulation, wurden bereits mehrfach publiziert (Berna und Jensen 2007; Masamune, Kikuta et al. 2009). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aktivität von pAkt maßgeblich mit der Ser473-Phosphorylierung des Proteins korreliert (Sarbasov, Guertin et al. 2005; Li, Sampat et al. 2006). In PSC wurde vorab eine starke Phosphorylierungssteigerung von pAkt nach Stimulation mit CCK für 2,5 min beschrieben. Diese Steigerung war nach 5 min zwar immer noch signifikant, unterschied sich aber nur gering von der durch Gastrin erzeugten Stimulation (Berna, Seiz et al. 2010). Dies legt die Vermutung nahe, dass der nach 2,5 min durch CCK

gezeigte Effekt, als Agonist beider CCK-Rezeptoren, vor allem über CCK1R-Stimulation transduziert wird, während die vorhandene Restaktivität nach 5 min v.a. CCK2R vermittelt ist. Die nun hier erhobenen neuen Daten unterstützen diese Annahme.

Die CCK1R-Stimulation reduzierte nach 5 min die Akt-Phosphorylierung auf $60 \pm 10\%$ der Kontrolle. Die zusätzliche SFK-Inhibition resultierte in einer weiteren Reduktion auf ein Drittel der ausschließlich mit CCK1R-A erzeugten SerP (Abbildung 16B und C). Die Daten suggerieren somit einen inhibierenden Effekt von CCK1R nach 5 min auf pAkt, der durch Src-Inhibition noch verstärkt werden kann. Da durch CCK die maximale Aktivierungssteigerung nach 2,5 min beschrieben wurde, kann man davon ausgehen, dass die CCK1R-Stimulation zwar einen kurzfristigen Anstieg von pAkt hervorruft, dieser aber nach länger andauernder Stimulation in einer Reduktion endet. Dieses Ergebnis steht somit nicht im Widerspruch zu bisher veröffentlichten Daten.

Des Weiteren zeigen unsere Ergebnisse nach 5 min CCK2R-Stimulation mit Gastrin [$1\mu\text{M}$] eine maximale Akt-Aktivierung in PSC von durchschnittlich $288 \pm 120\%$ (Abbildung 16B, $p=0,12$). Dies deckt sich mit den von Berna et al. erhobenen Daten, welche ebenfalls eine CCK2R-abhängige Akt-Phosphorylierung beschreiben (Berna, Seiz et al. 2010). Die zusätzliche Präinkubation mit PP2 hatte eine komplette Inhibition der Akt Phosphorylierung zur Folge (Abbildung 16C, $p=0,052$), so dass von einer Src-Abhängigkeit der Akt-Aktivierung durch CCK2R ausgegangen werden kann.

5.3 Ausblick

Die pankreatischen Sternzellen sind eine relativ neu entdeckte Zellart, die in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms grundlegende Funktionen zu erfüllen scheinen. Mehrfach wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der PSC-Aktivierung, die in der Synthese extrazellulärer Matrixproteine resultiert, und der Pankreasfibrose beschrieben. Für die Aktivierung der Zellen werden v.a. die physiologisch ubiquitär vorhandenen Hormone CCK und Gastrin verantwortlich gemacht. Die hier vorliegende Arbeit hatte das Ziel den Einblick in die intrazellulär ablaufenden Signalwege zu vertiefen.

Die PSC und deren Aktivierung zu einem myofibroblasten-ähnlichen Zelltypen stellen aktuell einen vielversprechenden Ansatzpunkt für das therapeutische Vorgehen gegen beide oben genannten Erkrankungen dar (Shimizu 2008). Der Fokus liegt dabei auf der Inhibition der PSC-aktivierenden Signalwege sowie in der Unterdrückung, der durch aktivierte PSC produzierten Substanzen (Madro, Slomka et al. 2011).

Auch wenn die Ergebnisse klinisch kontrollierter Studien noch ausstehen, scheinen die Ansatzpunkte hierfür vielversprechend zu sein. Das bessere Verständnis der Signaltransduktion ist somit die Grundlage der weiteren Ausschöpfung des therapeutischen Potentials der gezielten PSC-Inhibition.

Viele der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse werfen neue Fragen auf und wurden bisher auch in anderen Zellen nicht gleichermaßen beschrieben. Von speziellem Interesse scheint hier das diskordante Verhalten von ERK und dessen Downstream-Target Elk nach SFK-Inhibition mit PP2 zu sein (4.4.2 und 4.4.5). Des Weiteren ist die genauere Betrachtung des Proteins Src nach SFK Inhibition für weitere Forschung von besonderem Interesse. Zur genaueren Differenzierung des gezeigten Verhaltens müssten weitere Versuche beispielsweise mit einem weiteren SFK-Inhibitor im direkten Vergleich zu PP2 durchgeführt werden. SU 6656 wäre hier eine mögliche Option (Blake, Broome et al. 2000). Es handelt sich dabei um einen SFK-Inhibitor, der sich strukturell von PP2 unterscheidet und zusätzlich zu Src, Fyn, Hck und Lck auch verstärkt das Familienmitglied Lyn inhibiert (Blake, Broome et al. 2000).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die profibrogene intrazelluläre Signaltransduktion in PSC nach Stimulation der G-Protein gekoppelten Rezeptoren CCK1R und CCK2R genauer darzustellen und dadurch besser verstehen zu können.

Insgesamt zeigte sich, dass den der Rezeptorstimulation nachgeschalteten Signalwege häufig ähnliche Mechanismen zu Grunde liegen, wenn auch in unterschiedlich starkem Ausmaß und Verhältnis zueinander. Die hier betrachteten Proteine spielen allesamt essentielle Rollen in der Zellproliferation und Apoptoseregulation der PSC und sind ferner mutmaßlich an der Fibrogenese des Pankreas beteiligt.

Die Proteinkinase C scheint an der SerP des Proteins PKD1 nach CCK1R- und CCK2R-Stimulation maßgeblich mitzuwirken, während intrazelluläres Calcium und Src-Family-Kinasen eher inhibierende Wirkungen innehaben.

Es zeigte sich, dass ERK in PSC SFK-abhängig aktiviert wird. Das ERK-Downstreamtarget pElk verhielt sich unerwartet diskordant. Die intrazelluläre Calciumkonzentration erfüllt für pERK homolog zu pPKD1 eine inhibitorische Funktion. Besonders deutlich zeigte sich dies für die CCK2R-vermittelte TyrP des Proteins. Die PKC hatte auf die Phosphorylierung von ERK keinen Effekt.

Die CCK1R-vermittelte Src-Phosphorylierung wird vermeintlich über beide Arme der PLC transduziert, über die PKC und den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Nach CCK2R-Stimulation erzeugte die Inhibition beider Arme tendenziell homologe Ergebnisse zu CCK1R, die jedoch nicht signifikant ausfielen. Die weiteren Ergebnisse der SFK-Inhibitionsversuche ließen neue Fragen aufkommen. Durch Inhibition der Kinasen mit PP2 zeigten sich bei nachfolgender Stimulation der CCK-Rezeptoren hoch signifikante Anstiege der TyrP von Src selbst. Diese Ergebnisse waren mehrfach signifikant reproduzierbar. Ähnliche Ergebnisse, die eine stimulierende Wirkung des SFK-Inhibitors PP2 auf das Protein Src beschreiben, sind bisher nicht veröffentlicht. Dies bedarf weiterer Differenzierung, beispielsweise anhand von Versuchen mit anderen SFK-Inhibitoren im Vergleich mit PP2.

Abschließend lässt sich sagen, dass die hier vorliegenden Ergebnisse grundlegende neue Einblicke in die intrazelluläre Signaltransduktion der PSC nach GPCR-Stimulation erbracht haben, gleichzeitig werfen sie jedoch neue Fragen auf. Anschlussexperimente zum besseren Verständnis der komplexen Pathophysiologie der Pankreasfibrose im Rahmen der chronischen Pankreatitis sind daher von ausgesprochenem Interesse weiterer Forschungsprojekte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agell, N., O. Bachs, N. Rocamora und P. Villalonga (2002). "Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin." Cell Signal 14(8): 649-654.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen und B. A. Hemmings (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." EMBO J 15(23): 6541-6551.
- Apte, M. V., P. S. Haber, T. L. Applegate, I. D. Norton, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola und J. S. Wilson (1998). "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." Gut 43(1): 128-133.
- Apte, M. V., P. A. Phillips, R. G. Fahmy, S. J. Darby, S. C. Rodgers, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola, D. Naidoo und J. S. Wilson (2000). "Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells." Gastroenterology 118(4): 780-794.
- Apte, M. V. und J. S. Wilson (2004). "Mechanisms of pancreatic fibrosis." Dig Dis 22(3): 273-279.
- Bachem, M. G., E. Schneider, H. Gross, H. Weidenbach, R. M. Schmid, A. Menke, M. Siech, H. Beger, A. Grunert und G. Adler (1998). "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." Gastroenterology 115(2): 421-432.
- Banks, P. A. (2002). "Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis." Gastrointest Endosc 56(6 Suppl): S226-230.
- Berna, M. J., K. M. Hoffmann, J. A. Tapia, M. Thill, A. Pace, S. A. Mantey und R. T. Jensen (2007). "CCK causes PKD1 activation in pancreatic acini by signaling through PKC-delta and PKC-independent pathways." Biochim Biophys Acta 1773(4): 483-501.
- Berna, M. J. und R. T. Jensen (2007). "Role of CCK/gastrin receptors in gastrointestinal/metabolic diseases and results of human studies using gastrin/CCK receptor agonists/antagonists in these diseases." Curr Top Med Chem 7(12): 1211-1231.
- Berna, M. J., O. Seiz, J. F. Nast, D. Benten, M. Blaeker, J. Koch, A. W. Lohse und A. Pace (2010). "Cck1- and Cck2-Receptors Are Expressed on Pancreatic Stellate Cells and Induce Collagen Production." J Biol Chem.
- Berna, M. J., J. A. Tapia, V. Sancho, M. Thill, A. Pace, K. M. Hoffmann, L. Gonzalez-Fernandez und R. T. Jensen (2009). "Gastrointestinal growth factors and hormones have divergent effects on Akt activation." Cell Signal 21(4): 622-638.

-
- Blake, R. A., M. A. Broome, X. Liu, J. Wu, M. Gishizky, L. Sun und S. A. Courtneidge (2000). "SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling." Mol Cell Biol 20(23): 9018-9027.
- Brose, N., A. Betz und H. Wegmeyer (2004). "Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals." Curr Opin Neurobiol 14(3): 328-340.
- Burgering, B. M. und P. J. Coffey (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." Nature 376(6541): 599-602.
- Chang, L. und M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature 410(6824): 37-40.
- Chen, N., I. R. Unnikrishnan, R. M. Anjana, V. Mohan und C. S. Pitchumoni (2011). "The complex exocrine-endocrine relationship and secondary diabetes in exocrine pancreatic disorders." J Clin Gastroenterol 45(10): 850-861.
- Chuderland, D. und R. Seger (2008). "Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions." Commun Integr Biol 1(1): 4-5.
- Cullen, P. J. und P. J. Lockyer (2002). "Integration of calcium and Ras signalling." Nat Rev Mol Cell Biol 3(5): 339-348.
- Deng, X., L. Wang, M. S. Elm, D. Gabazadeh, G. J. Diorio, P. K. Eagon und D. C. Whitcomb (2005). "Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats." Am J Pathol 166(1): 93-106.
- Dite, P., I. Novotny, M. Precechtelova, M. Ruzicka, A. Zakova, M. Hermanova, J. Trna und H. Nechutova (2010). "Incidence of pancreatic carcinoma in patients with chronic pancreatitis." Hepatogastroenterology 57(101): 957-960.
- Downward, J. (2004). "PI 3-kinase, Akt and cell survival." Semin Cell Dev Biol 15(2): 177-182.
- Dufresne, M., C. Seva und D. Fourmy (2006). "Cholecystokinin and gastrin receptors." Physiol Rev 86(3): 805-847.
- Etemad, B. und D. C. Whitcomb (2001). "Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments." Gastroenterology 120(3): 682-707.
- Ewald, N., C. Kaufmann, A. Raspe, H. U. Kloer, R. G. Bretzel und P. D. Hardt (2011). "Prevalence of diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c)." Diabetes Metab Res Rev.

- Fugmann, T., A. Hausser, P. Schoffler, S. Schmid, K. Pfizenmaier und M. A. Olayioye (2007). "Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein." J Cell Biol 178(1): 15-22.
- Gukovsky, I., J. H. Cheng, K. J. Nam, O. T. Lee, A. Lugea, L. Fischer, J. M. Penninger, S. J. Pandol und A. S. Gukovskaya (2004). "Phosphatidylinositide 3-kinase gamma regulates key pathologic responses to cholecystokinin in pancreatic acinar cells." Gastroenterology 126(2): 554-566.
- Gukovsky, I., A. S. Gukovskaya, T. A. Blinman, V. Zaninovic und S. J. Pandol (1998). "Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis." Am J Physiol 275(6 Pt 1): G1402-1414.
- Haber, P. S., G. W. Keogh, M. V. Apte, C. S. Moran, N. L. Stewart, D. H. Crawford, R. C. Pirola, G. W. McCaughan, G. A. Ramm und J. S. Wilson (1999). "Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis." Am J Pathol 155(4): 1087-1095.
- Hajdуч, E., G. J. Litherland und H. S. Hundal (2001). "Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport?" FEBS Lett 492(3): 199-203.
- Hama, K., H. Ohnishi, H. Aoki, H. Kita, H. Yamamoto, H. Osawa, K. Sato, K. Tamada, H. Mashima, H. Yasuda und K. Sugano (2006). "Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad7 induction through a protein kinase C pathway." Biochem Biophys Res Commun 340(3): 742-750.
- Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok und P. A. Connelly (1996). "Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation." J Biol Chem 271(2): 695-701.
- Iglesias, T. und E. Rozengurt (1998). "Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain." J Biol Chem 273(1): 410-416.
- Jaster, R. und J. Emmrich (2008). "Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases." Best Pract Res Clin Gastroenterol 22(1): 17-29.
- Jaster, R., G. Sparmann, J. Emmrich und S. Liebe (2002). "Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells." Gut 51(4): 579-584.
- Jensen, R. T. (2002). "Involvement of cholecystokinin/gastrin-related peptides and their receptors in clinical gastrointestinal disorders." Pharmacol Toxicol 91(6): 333-350.
- Kloppel, G., S. Detlefsen und B. Feyerabend (2004). "Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern." Virchows Arch 445(1): 1-8.

- Konig, P., H. Spitaler und R. Waanders (1992). "[Epidemiology of alcoholism in Voralberg. Comparison of administrative incidence 1967, 1977 and 1987 in a regional psychiatric hospital]." Psychiatr Prax 19(5): 139-148.
- Korc, M. (2007). "Pancreatic cancer-associated stroma production." Am J Surg 194(4 Suppl): S84-86.
- Kordes, C., S. Brookmann, D. Haussinger und H. Klonowski-Stumpe (2005). "Differential and synergistic effects of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta1 on activated pancreatic stellate cells." Pancreas 31(2): 156-167.
- Lewis, T. S., P. S. Shapiro und N. G. Ahn (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." Adv Cancer Res 74: 49-139.
- Li, L., K. Sampat, N. Hu, J. Zakari und S. H. Yuspa (2006). "Protein kinase C negatively regulates Akt activity and modifies UVC-induced apoptosis in mouse keratinocytes." J Biol Chem 281(6): 3237-3243.
- Liljedahl, M., Y. Maeda, A. Colanzi, I. Ayala, J. Van Lint und V. Malhotra (2001). "Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network." Cell 104(3): 409-420.
- Liu, Y., A. Bishop, L. Witucki, B. Kraybill, E. Shimizu, J. Tsien, J. Ubersax, J. Blethrow, D. O. Morgan und K. M. Shokat (1999). "Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1." Chem Biol 6(9): 671-678.
- Luttenberger, T., A. Schmid-Kotsas, A. Menke, M. Siech, H. Beger, G. Adler, A. Grunert und M. G. Bachem (2000). "Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis." Lab Invest 80(1): 47-55.
- Lynch, G., S. Kohler, J. Leser, M. Beil, L. J. Garcia-Marin und M. P. Lutz (2004). "The tyrosine kinase Yes regulates actin structure and secretion during pancreatic acinar cell damage in rats." Pflugers Arch 447(4): 445-451.
- Madro, A., M. Slomka und K. Celinski (2011). "Can we expect progress in the treatment of fibrosis in the course of chronic pancreatitis?" Adv Med Sci: 1-6.
- Marshall, C. J. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." Cell 80(2): 179-185.
- Masamune, A., K. Kikuta, T. Watanabe, K. Satoh, M. Hirota, S. Hamada und T. Shimosegawa (2009). "Fibrinogen induces cytokine and collagen production in pancreatic stellate cells." Gut 58(4): 550-559.

- Masamune, A., A. Satoh, T. Watanabe, K. Kikuta, M. Satoh, N. Suzuki, K. Satoh und T. Shimosegawa (2010). "Effects of ethanol and its metabolites on human pancreatic stellate cells." Dig Dis Sci 55(1): 204-211.
- Masamune, A., M. Satoh, K. Kikuta, N. Suzuki und T. Shimosegawa (2005). "Activation of JAK-STAT pathway is required for platelet-derived growth factor-induced proliferation of pancreatic stellate cells." World J Gastroenterol 11(22): 3385-3391.
- Masamune, A., M. Satoh, K. Kikuta, N. Suzuki und T. Shimosegawa (2005). "Endothelin-1 stimulates contraction and migration of rat pancreatic stellate cells." World J Gastroenterol 11(39): 6144-6151.
- Masamune, A. und T. Shimosegawa (2009). "Signal transduction in pancreatic stellate cells." J Gastroenterol 44(4): 249-260.
- Masamune, A., T. Watanabe, K. Kikuta und T. Shimosegawa (2009). "Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis." Clin Gastroenterol Hepatol 7(11 Suppl): S48-54.
- Mattmann, M. E., S. L. Stoops und C. W. Lindsley (2011). "Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape." Expert Opin Ther Pat.
- McCarroll, J. A., P. A. Phillips, R. K. Kumar, S. Park, R. C. Pirola, J. S. Wilson und M. V. Apte (2004). "Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-kinase) pathway." Biochem Pharmacol 67(6): 1215-1225.
- McCarroll, J. A., P. A. Phillips, S. Park, E. Doherty, R. C. Pirola, J. S. Wilson und M. V. Apte (2003). "Pancreatic stellate cell activation by ethanol and acetaldehyde: is it mediated by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway?" Pancreas 27(2): 150-160.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, S. L. Abrams, J. T. Lee, F. Chang, F. E. Bertrand, P. M. Navolanic, D. M. Terrian, R. A. Franklin, A. B. D'Assoro, J. L. Salisbury, M. C. Mazzarino, F. Stivala und M. Libra (2006). "Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance." Adv Enzyme Regul 46: 249-279.
- Meyer, B. M., B. A. Werth, C. Beglinger, P. Hildebrand, J. B. Jansen, D. Zach, L. C. Rovati und G. A. Stalder (1989). "Role of cholecystokinin in regulation of gastrointestinal motor functions." Lancet 2(8653): 12-15.
- Mutt, V. und J. E. Jorpes (1968). "Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin." Eur J Biochem 6(1): 156-162.

- Nozu, F., C. Owyang und Y. Tsunoda (2000). "Involvement of phosphoinositide 3-kinase and its association with pp60src in cholecystokinin-stimulated pancreatic acinar cells." Eur J Cell Biol 79(11): 803-809.
- Ohnishi, N., T. Miyata, H. Ohnishi, H. Yasuda, K. Tamada, N. Ueda, H. Mashima und K. Sugano (2003). "Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis." Gut 52(10): 1487-1493.
- Pace, A., J. A. Tapia, L. J. Garcia-Marin und R. T. Jensen (2006). "The Src family kinase, Lyn, is activated in pancreatic acinar cells by gastrointestinal hormones/neurotransmitters and growth factors which stimulate its association with numerous other signaling molecules." Biochim Biophys Acta 1763(4): 356-365.
- Peter, S. A., M. D'Amato und C. Beglinger (2006). "CCK1 antagonists: are they ready for clinical use?" Dig Dis 24(1-2): 70-82.
- Qiang, Y. W., L. Yao, G. Tosato und S. Rudikoff (2004). "Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells." Blood 103(1): 301-308.
- Raimondi, S., A. B. Lowenfels, A. M. Morselli-Labate, P. Maisonneuve und R. Pezzilli (2010). "Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection." Best Pract Res Clin Gastroenterol 24(3): 349-358.
- Redondo, P. C., A. I. Lajas, G. M. Salido, A. Gonzalez, J. A. Rosado und J. A. Pariente (2003). "Evidence for secretion-like coupling involving pp60src in the activation and maintenance of store-mediated Ca²⁺ entry in mouse pancreatic acinar cells." Biochem J 370(Pt 1): 255-263.
- Rehfeld, J. F., L. Friis-Hansen, J. P. Goetze und T. V. Hansen (2007). "The biology of cholecystokinin and gastrin peptides." Curr Top Med Chem 7(12): 1154-1165.
- Renner, I. G., J. R. Wisner, Jr. und H. Rinderknecht (1983). "Protective effects of exogenous secretin on ceruletide-induced acute pancreatitis in the rat." J Clin Invest 72(3): 1081-1092.
- Reubi, J. C., B. Waser, M. Gugger, H. Friess, J. Kleeff, H. Kayed, M. W. Buchler und J. A. Laissie (2003). "Distribution of CCK1 and CCK2 receptors in normal and diseased human pancreatic tissue." Gastroenterology 125(1): 98-106.
- Rozengurt, E. (2007). "Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors." J Cell Physiol 213(3): 589-602.
- Rozengurt, E., O. Rey und R. T. Waldron (2005). "Protein kinase D signaling." J Biol Chem 280(14): 13205-13208.

- Saluja, A. K., M. Saluja, H. Printz, A. Zaverchnik, A. Sengupta und M. L. Steer (1989). "Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion." Proc Natl Acad Sci U S A 86(22): 8968-8971.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali und D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science 307(5712): 1098-1101.
- Schafmayer, A., H. D. Becker, M. Werner, U. R. Folsch und W. Creutzfeldt (1985). "Plasma cholecystokinin levels in patients with chronic pancreatitis." Digestion 32(2): 136-139.
- Shimizu, K. (2008). "Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis." J Gastroenterol 43(11): 823-832.
- Shin-Kang, S., V. P. Ramsauer, J. Lightner, K. Chakraborty, W. Stone, S. Campbell, S. A. Reddy und K. Krishnan (2011). "Tocotrienols inhibit AKT and ERK activation and suppress pancreatic cancer cell proliferation by suppressing the ErbB2 pathway." Free Radic Biol Med.
- Slaff, J., D. Jacobson, C. R. Tillman, C. Curington und P. Toskes (1984). "Protease-specific suppression of pancreatic exocrine secretion." Gastroenterology 87(1): 44-52.
- Storz, P., H. Doppler und A. Toker (2004). "Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling." Mol Cell Biol 24(7): 2614-2626.
- Storz, P. und A. Toker (2003). "Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway." EMBO J 22(1): 109-120.
- Talamini, G., M. Falconi, C. Bassi, N. Sartori, R. Salvia, E. Caldiron, L. Frulloni, V. Di Francesco, B. Vaona, P. Bovo, I. Vantini, P. Pederzoli und G. Cavallini (1999). "Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis." Am J Gastroenterol 94(5): 1253-1260.
- Tandon, R. K., N. Sato und P. K. Garg (2002). "Chronic pancreatitis: Asia-Pacific consensus report." J Gastroenterol Hepatol 17(4): 508-518.
- Tapia, J. A., H. A. Ferris, R. T. Jensen und L. J. Garcia (1999). "Cholecystokinin activates PYK2/CAKbeta by a phospholipase C-dependent mechanism and its association with the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic acinar cells." J Biol Chem 274(44): 31261-31271.
- Thomas, S. M. und J. S. Brugge (1997). "Cellular functions regulated by Src family kinases." Annu Rev Cell Dev Biol 13: 513-609.

- Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle und et al. (1991). "The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C." J Biol Chem 266(24): 15771-15781.
- Trauzold, A., S. Schmiedel, B. Sipos, H. Wermann, S. Westphal, C. Roder, W. Klapper, A. Arlt, L. Lehnert, H. Ungefroren, F. J. Johannes und H. Kalthoff (2003). "PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells." Oncogene 22(55): 8939-8947.
- Treisman, R. (1995). "Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE." EMBO J 14(20): 4905-4913.
- Tsunoda, Y., H. Yoshida, L. Africa, G. J. Steil und C. Owyang (1996). "Src kinase pathways in extracellular Ca(2+)-dependent pancreatic enzyme secretion." Biochem Biophys Res Commun 227(3): 876-884.
- Tsunoda, Y., H. Yoshida und F. Nozu (2004). "Receptor-operated Ca²⁺ influx and its association with the Src family in secretagogue-stimulated pancreatic acini." Biochem Biophys Res Commun 314(3): 916-924.
- Van Lint, J., A. Rykx, Y. Maeda, T. Vantus, S. Sturany, V. Malhotra, J. R. Vandenheede und T. Seufferlein (2002). "Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move." Trends Cell Biol 12(4): 193-200.
- Vaquero, E., X. Molero, X. Tian, A. Salas und J. R. Malagelada (1999). "Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by cyclosporin in rats." Gut 45(2): 269-277.
- Waldron, R. T., O. Rey, T. Iglesias, T. Tugal, D. Cantrell und E. Rozengurt (2001). "Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo." J Biol Chem 276(35): 32606-32615.
- Waldron, R. T. und E. Rozengurt (2000). "Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C." J Biol Chem 275(22): 17114-17121.
- Wan, Y., T. Wang und Q. Zhao (2005). "PD98059 inhibited the activation of pancreatic stellate cells mediated by platelet-derived growth factor BB in rats." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 25(3): 297-299, 306.
- Williams, J. A. (2001). "Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystikinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells." Annu Rev Physiol 63: 77-97.
- Yeatman, T. J. (2004). "A renaissance for SRC." Nat Rev Cancer 4(6): 470-480.

-
- Yuan, J. und E. Rozengurt (2008). "PKD, PKD2, and p38 MAPK mediate Hsp27 serine-82 phosphorylation induced by neurotensin in pancreatic cancer PANC-1 cells." J Cell Biochem 103(2): 648-662.
- Zhukova, E., J. Sinnett-Smith und E. Rozengurt (2001). "Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin, or phorbol esters in Swiss 3T3 cells." J Biol Chem 276(43): 40298-40305.
- Zugaza, J. L., J. Sinnett-Smith, J. Van Lint und E. Rozengurt (1996). "Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway." EMBO J 15(22): 6220-6230.

8 DANKSAGUNG

Die Fertigstellung der Dissertationsschrift möchte ich als Möglichkeit nutzen einigen Personen zu danken, die mich über diesen langen Zeitraum unterstützt und motiviert haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Andrea Pace für die Bereitstellung dieses interessanten Promotionsthemas, die Ermöglichung der Umsetzung und die gleichzeitige Betreuung dieser Arbeit. Seine wertvollen Ratschlägen und Anregungen habe ich immer sehr geschätzt und mich dadurch stets unterstützt gefühlt. Vielen Dank noch einmal an dieser Stelle!

Für seine Mühe und Geduld möchte ich mich auch bei meinem Mitdoktoranden Oliver Seiz bedanken, sowie bei Martina Pfahl für ihre wertvolle Unterstützung und Anleitung im Labor.

Meiner Familie und Freunden bin ich sehr dankbar für die Ausdauer, Geduld und auch die erforderliche Ablenkung, die sie mir stets entgegen gebracht haben.

Ganz speziellen Dank möchte ich dabei an Jan-Hendrik Riedel und Anne Ulrich richten, ohne deren Hilfe ich diese Arbeit wahrscheinlich nicht hätte fertig stellen können. Ich danke euch von ganzem Herzen!

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Hamburg, September 2013

