

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin, 1. Medizinische Klinik

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

**Die Rolle des Platelet Derived Growth Factor in der Pathogenese
der Pankreasfibrose**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jan Friso Nast
aus Soltau

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 05.05.2017

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Andreas de Weerth

Prüfungsausschuss; ~~3. Gutachter/in:~~

Meinen wundervollen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese	1
2	Einleitung	3
2.1	Das Pankreas.....	3
2.2	Chronische Pankreatitis.....	4
2.3	Pancreatic Stellate Cells (PSC).....	8
2.4	Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGF-R)	12
2.5	Der Signalweg über Mitogen-Activated-Protein-Kinases (MAPK).....	14
2.6	Der Signalweg über Phosphatidyl-Inositid-3-Kinase (PI3K).....	16
2.7	Imatinib mesylate.....	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Versuchstiere	19
3.2	Zellisolation.....	19
3.2.1	Operation und intraduktaler Organverdau	19
3.2.2	Dichtegradientenzentrifugation	20
3.3	Zellkultur.....	21
3.3.1	Bestimmung der Vitalität und Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung.....	21
3.3.2	Zellpassage.....	23
3.4	Stimulantien und Inhibitoren.....	24
3.4.1	Platelet-derived growth factor (PDGF).....	24
3.4.2	Imatinib-Mesylate.....	24
3.5	Western Blot.....	25
3.5.1	Versuchsaufbau.....	25
3.5.1.1	Dosisfindung PDGF-BB.....	26
3.5.1.2	Stimulationszeit PDGF-BB	26
3.5.1.3	Imatinib mesylate	26
3.5.1.4	Nachweis von Kollagen Typ I	27
3.5.1.5	Bestimmung von Apoptose	27
3.5.2	Proteinisolation	27
3.5.2.1	Herstellung des Lysepuffers	27
3.5.2.2	Chemische Zellyse	28
3.5.2.3	Physikalische Zellyse	29
3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
3.5.4	Probenvorbereitung	31
3.5.5	Natriumdodecylsulfat-Polacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32

3.5.5.1	Polyacrylamid-Gele	32
3.5.5.2	Elektrophorese	34
3.5.6	Transfer der Proteine auf Nitrocellulose	36
3.5.7	Immunchemischer Nachweis von Proteinen	37
3.5.8	Ablösen der Antikörperkomplexe von der Nitrocellulosemembran (Stripping)	39
3.5.9	Beladungskontrolle	39
3.5.10	Densitometrie	40
3.5.11	Antikörper	40
3.6	Zellfärbungen	41
3.6.1	Immunzytochemie	41
3.6.2	Zytochemische Färbung mit Nile red	42
3.6.3	Immunfluoreszenzfärbungen	42
3.6.4	Antikörper	44
3.7	Thiozolylblau (MTT) Assay	44
3.8	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	46
3.8.1	Versuchsablauf	46
3.8.2	Antikörper	48
3.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	48
3.9.1	Versuchsaufbau	50
3.9.2	Isolation von Ribonukleinsäure (RNA)	50
3.9.3	RNA-Konzentrationsbestimmung	51
3.9.4	Reverse Transkription	52
3.9.5	Quantitative Echtzeit-PCR	54
3.9.6	Verwendete Primer	56
3.10	Statistische Auswertung	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Charakterisierung und Identifikation der Pancreatic Stellate Cells	57
4.2	Dosisabhängiger Effekt von PDGF-BB auf die Aktivierung von PDGFR-β, ERK 1/2 und AKT	59
4.3	Zeitabhängiger Effekt von PDGF-BB auf die Aktivierung von PDGFR-β, ERK 1/2 und AKT	61
4.4	Effekt des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib mesylate auf die Aktivierung von PDGFR-β, ERK1/2 und AKT	63
4.5	Wachstumshemmender Effekt von Imatinib mesylate auf Pancreatic Stellate Cells im MTT-Assay	65
4.6	Imatinib mesylate induziert seine wachstumshemmende Wirkung nicht durch Apoptose	66

4.7	Hemmung der Expression und Freisetzung von Kollagen Typ I durch Imatinib mesylate	67
5	Diskussion	72
5.1	Nachweis und Funktionszustand von Pancreatic Stellate Cells	72
5.2	Stimulation von pPDGF-R β , pERK1/2 und pAKT durch PDGF-BB.....	73
5.3	Imatinib mesylate inhibiert pPDGF-R dosisabhängig, bewirkt jedoch in hoher Dosierung die Aktivierung pERK1/2 und pAKT	75
5.4	Imatinib mesylate hemmt die Proliferation von Pancreatic Stellate Cells ohne die Induktion von Apoptose	78
5.5	Imatinib mesylate inhibiert die profibrogenetischen Eigenschaften von Pancreatic Stellate Cells durch Reduktion der Kollagensynthese	80
6	Zusammenfassung.....	83
7	Summary	85
8	Tabellenverzeichnis.....	87
9	Abbildungsverzeichnis.....	88
10	Abkürzungsverzeichnis.....	90
11	Literaturverzeichnis.....	86
12	Danksagung	94
13	Lebenslauf.....	95
14	Erklärung	96

1 Arbeitshypothese

Für die Entstehung der chronischen Pankreatitis und im Rahmen von Pankreaskarzinomen ist die Existenz einer Pankreasfibrose ein zentrales Kriterium. Bei der Fibroseentstehung kommt es zu einer Dysregulation von Zellen, die die extrazelluläre Matrix bilden. Die vornehmlich an dieser Regulationsstörung beteiligten Zellen sind die 1998 entdeckten Pancreatic Stellate Cells (M V Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998). Bei einer Pankreatitis gehen die im gesunden Pankreas in einer nicht-aktiven Form vorliegenden Zellen in einen aktivierten Zustand über, in dem es zu vermehrter Proliferation, einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, Migration und Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix kommt (Haber et al., 1999; Mews et al., 2002; Omary, Lugea, Lowe, & Pandol, 2007). Im fibrotisch veränderten Pankreas stellen die Pancreatic Stellate Cells (PSC) die wichtigste Quelle der Kollagenproduktion dar (Haber et al., 1999).

Es ist bis heute nicht ausreichend verstanden, welche Mechanismen zur Entstehung einer Fibrose nach schädigenden Reizen wie Alkoholkonsum, oxidativem Stress oder dem Einfluss bestimmter Zytokine, führen. Anhand der deutlich besser untersuchten Leberfibrose und einigen Fortschritten bei der Entdeckung der Genese der Pankreasfibrose in den letzten Jahren lässt sich jedoch vermuten, dass bestimmte Signaltransduktionskaskaden bei der Entwicklung einer Pankreasfibrose eine wichtige Rolle spielen. Eine dieser bedeutsamen Kaskaden scheint der Signalweg über den Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und dessen Rezeptor Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGF-R) zu sein. PDGF und der PDGF-R spielen eine zentrale Rolle bei Proliferation, Migration und Produktion von extrazellulärer Matrix (Klöppel, Detlefsen, & Feyerabend, 2004; Luttenberger et al., 2000; Schneider et al., 2001).

Zwei wichtige intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen über den PDGF-R sind die Ras-Raf-ERK- und PI3K/AKT-Signalwege. So konnte gezeigt werden, dass PDGF, über ERK1/2, ein potenter Stimulator der Proliferation von PSC ist (Jaster, Sparmann, Emmrich, & Liebe, 2002; Masamune, Kikuta, Satoh, Kume, & Shimosegawa, 2003).

Bei dem fibrotischen Umbau des Pankreas kommt es zur Zunahme von Proteinen der extrazellulären Matrix. Schon früh nach der Entdeckung der PSC konnte gezeigt

werden, dass in stark fibrotischen Arealen des Pankreas eine hohe Dichte an PDGF-R positiven Zellen vorhanden ist (Haber et al., 1999). In Hepatic Stellate Cells (HSC), dem umfangreicher untersuchten hepatischen Pendant der PSC, bewirkte eine Inhibition der PI3K die Reduktion extrazellulärer Matrix (Son, Hines, Lindquist, Schrum, & Rippe, 2009). In den Jahren nach der Erstisolation konnte auch für PSC gezeigt werden, dass sie die wichtigste Quelle bei der pathologischen Zunahme extrazelluläre Matrix sind (Gibo et al., 2005; Mews et al., 2002).

Mit Hilfe dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inhibierung des PDGF-R durch den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib mesylate einen Einfluss auf die Proliferation und profibrogenetischen Eigenschaften der PSC hat. So könnten diese Daten zur Erweiterung, der noch immer eingeschränkten Therapieoptionen der chronischen Pankreatitis, verwendet werden.

2 Einleitung

2.1 Das Pankreas

Das Pankreas entsteht während der Embryonalentwicklung aus drei getrennten Anlagen, die im Verlauf miteinander verschmelzen und schließlich retroperitoneal zwischen Leber, Duodenum, Magen, Milz, Wirbelsäule und in enger Nachbarschaft zu den großen abdominellen Gefäßen zu liegen kommen (siehe Abbildung 2-1).

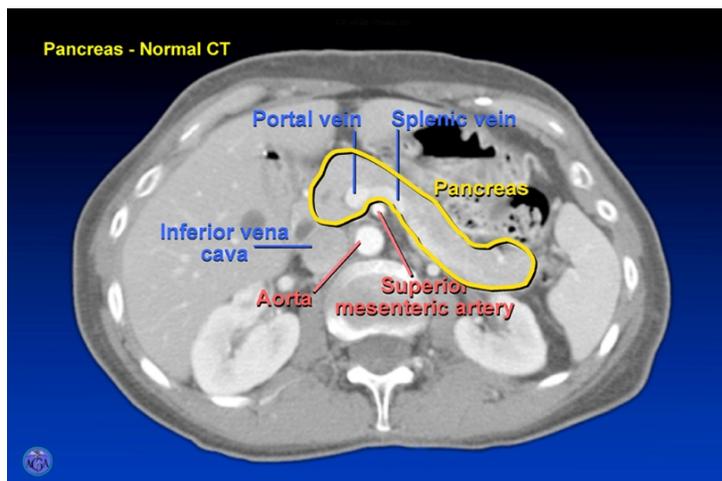


Abbildung 2-1 Computertomographie des oberen Abdomen.

Die Bauchwand zeigt zum Oberrand des Bildes, die Ansicht des Querschnittes ist von unten. Ganz rechts liegt die Milz, die linke Bildhälfte wird von der Leber bestimmt, nach dorsal liegen die beiden Nieren, nach ventral der Magen. Farblich dargestellt sind Lagebeziehungen des Pankreas zu den großen abdominellen Gefäßen, was für den klinischen Verlauf bei Erkrankung des Organes häufig einen entscheidenden Faktor darstellt. Das Bild stammt aus (Longnecker, 2014) und wurde von der American Gastroenterological Association zur Verfügung gestellt.

Bei dieser Verschmelzung verbinden sich die in den Anlagen vorhandenen Gangsysteme und bilden den größeren, ventralen Hauptbauchspeicheldrüsengang (Ductus pancreaticus oder Wirsungianus) und den dorsalen, kleineren Bauchspeicheldrüsengang (Ductus pancreaticus accessorius oder Santorini), siehe Abbildung 2-2). In etwa 5-10% bleiben die Gangsysteme voneinander getrennt (Pancreas divisum) (DiMagno & Wamsteker, 2012).

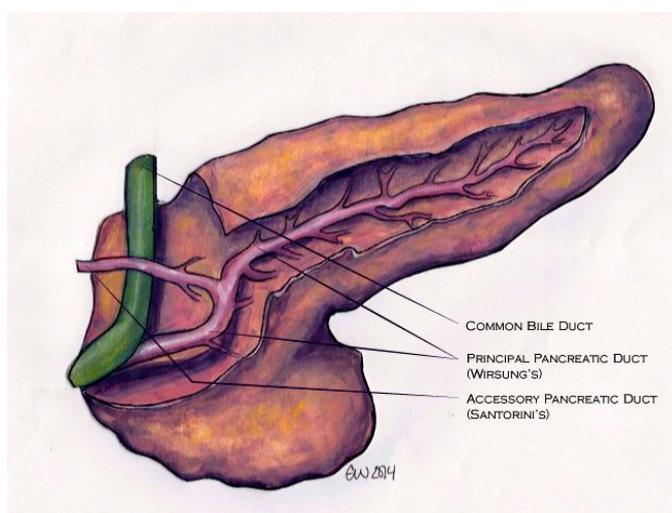


Abbildung 2-2 Normales Pankreas mit seziiertem ventralen Anteil zur Darstellung des Gangsystems.

Zu sehen sind die 3 Anteile des Pankreas. Der Caput mit Gallengang und beiden Pankreasgängen (Wirsungianus und Santorini), der Corpus im mittleren Teil und die sich verjüngende Cauda im rechten Bildanteil. Das Bild stammt aus (Longnecker, 2014), die Zeichnung wurde angefertigt von Emily Weber für Pancreapedia.

Es handelt sich beim Pankreas um eine Drüse mit exokriner und endokriner Funktion. Der exokrine Anteil besteht zum einen aus in Lobuli liegenden Azinuszellen, die für die Produktion digestiver Enzyme, sog. Zymogene, zuständig sind. Insgesamt werden 20 verschiedene Zymogene produziert. Die wichtigsten sind Amylase, Lipase, Trypsin und Chymotrypsin. Zum anderen besteht das exokrine Pankreas aus

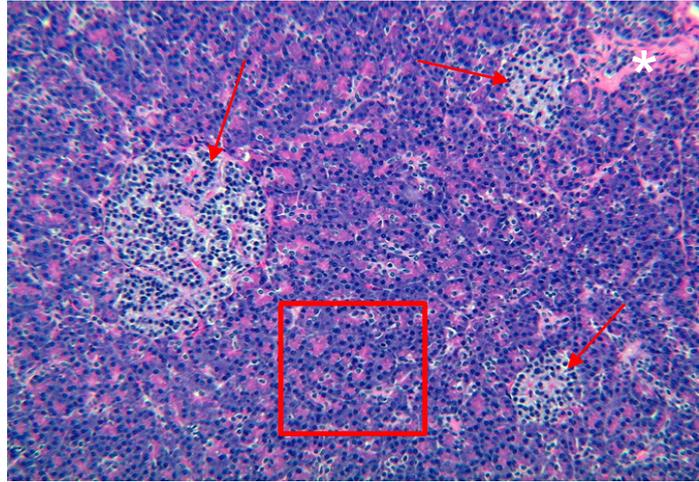


Abbildung 2-3 Humanes Pankreas in H&E-Färbung. Übersicht mit großen Mengen an exokrinem Gewebe (Azini, Kästchen), 3 Langerhans-Inseln (Pfeile) und einem kleinen Gang in der rechten oberen Ecke (Stern). Bild modifiziert aus (Longnecker, 2014).

dem Gangsystem, das Bikarbonat, Mucus und Wasser sezerniert. Der endokrine Anteil setzt sich aus neuroendokrinen Zellen zusammen, welche die Langerhans-Inseln bilden und vor allem für die Produktion der Hormone zur Glukosemetabolisation (Alphazellen: Glucagon; Betazellen: Insulin) zuständig sind. Zudem kommen auch Deltazellen, die Somatostatin produzieren, und PP-Zellen, die Pankreatisches Polypeptid bilden, vor (Longnecker, 2014). Abbildung 2-3 zeigt einen Überblick über die Histologie des Pankreas.

2.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine fortschreitende, inflammatorische Erkrankung des Pankreas, wobei es zu einer Zerstörung des Drüsengewebes und Ersatz durch Bindegewebe kommt. Nach dem Befallsmuster werden dabei zwei Typen der chronischen Pankreatitis unterschieden. In einer Variante kommt es zur Beteiligung der großen Ausführungsgänge, man spricht von dem Large-duct kalzifizierenden Typ. Bei der anderen Ausprägungsform kommt es nur zu minimalen Veränderungen des Organs und vorzugweise Beteiligung der kleinen Pankreasgänge, was als Small-duct Typ bezeichnet wird (Gupta & Toskes, 2005; Sarles, 1986; Walsh, Rode, Theis, & Russell, 1992).

Klinisch äußert sich die chronische Pankreatitis vor allem durch die drei Charakteristika Schmerzen, Maldigestion mit Steatorrhoe (Fettstühle) und Gewichtsverlust, sowie Diabetes mellitus. Anhand des klinischen Verlaufes kann die Erkrankung in vier

Phasen unterteilt werden. (I) Es kommt zu einer präklinischen Phase mit abwesenden oder unspezifischen Beschwerden. (II) Daran schließen sich rezidivierende Episoden einer Pankreatitis ohne sicher nachweisbare Zeichen einer Chronizität an. (III) Es folgen weitere Erkrankungsschübe mit intermittierenden und konstanten Schmerzen sowie Zeichen der chronischen Pankreatitis, wie Gangerweiterungen oder Kalzifikationen. (IV) Am Ende kommt es zu einer Besserung der Beschwerden, was am ehesten mit dem Untergang des Organs einhergeht (Witt, Apte, Keim, & Wilson, 2007).

Die Prävalenz der Erkrankung ist sehr abhängig von der geographischen Lage. So werden zum Beispiel für die USA Prävalenzraten von 13 pro 100.000 Einwohnern und in Südindien bis zu 200 pro 100.000 Einwohnern beschrieben (Etemad & Whitcomb, 2001; Garg & Tandon, 2004).

Ätiologisch existieren eine ganze Reihe an auslösenden Faktoren einer chronischen Pankreatitis. Unterteilen lassen sich diese am besten anhand verschiedenener Kategorien:

(I) Xenobiotika, wie Alkohol, Zigaretten oder Medikamente; (II) Endogene Ursachen wie Hyperkalzämie oder Hyperlipidämie; (III) Infektionen wie HIV, Mumps- oder Coxsackieviren; (IV) Genetische Ursachen mit den drei häufigsten Mutationen (CFTR, PRSS1, SPINK1, siehe Abkürzungsverzeichnis); (V) Obstruktion durch Tumore, Steine oder nach Operationen; (VI) Autoimmune Genese; (VII) Idiopathisch. Bei Erwachsenen geht man davon aus, dass etwa in 90-95% der

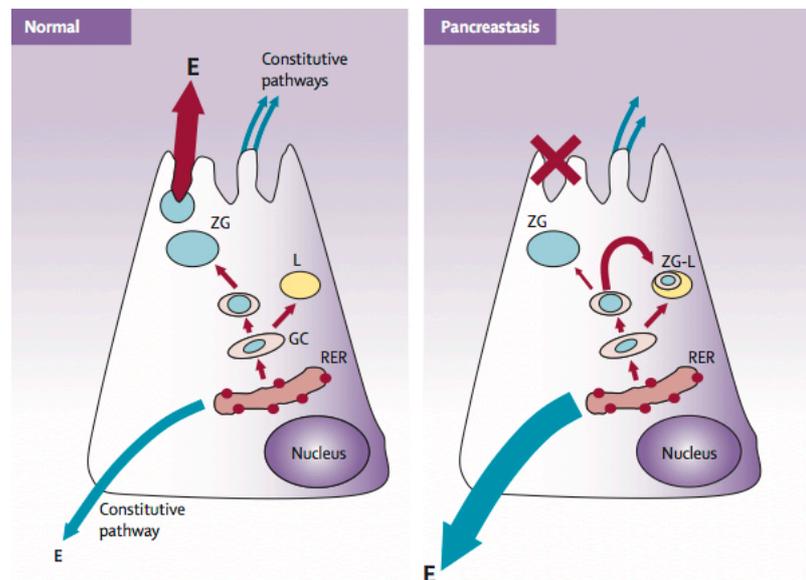


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung einer Azinuszelle bei der Pankreatitis.

Der konstitutive Signalweg an der basolateralen Membran (constitutive pathway) transportiert normalerweise nur eine kleine Fraktion der synthetisierten Enzyme (E), der größte Teil wird über die apikale Membran freigesetzt. Bei der Pankreatitis kommt es zu einer Hemmung der apikalen Freisetzung und zum primären Transport über die basolaterale Membran sowie zu der intrazellulären Aktivierung einer kleinen Fraktion von Zymogenen durch Co-Lokalisation mit lysosomalen Enzymen (ZG-L). RER = raues endoplasmatisches Retikulum. GC = Golgi Apparat. L = Lysosomen. ZG = Zymogengranula.

Fälle Alkohol die Ursache ist. In neueren Arbeiten wird jedoch auch eine biliäre Ursache, also durch Gallensteine verursacht, in bis zu 30% der Fälle beschrieben (J. Braganza, Lee SH, McCloy RF, & McMahon MJ, 2011; Frulloni L et al., 2009).

Man geht davon aus, dass sich das Grundprinzip für die Entstehung einer Pankreatitis-episode sowohl für die verschiedenen Ursachen als auch die Verlaufsformen (akut oder chronische Pankreatitis) ähnelt. Es beginnt mit einer gestörten apikalen Exozytose der Azinuszellen, was man unter Pankreastase versteht. Ursächlich hierfür sind rezidivierende Stressfaktoren, abhängig von der Ursache, und der konsekutive Anfall reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) (Sanfey, Bulkley, & Cameron, 1984). Überschreitet der Anfall von ROS die antioxidative Kapazität der Zelle entsteht oxidativer Stress. Dieser führt über eine Störung des Glutathionstoffwechsels dazu, das ROS nicht mehr entgiftet werden kann und die Reaktion sich so selbst unterhält (J. M. Braganza, 2001). Die Azinuszellen sezernieren ihre synthetisierten Enzyme nun über die basolaterale Membran ins Lymphgewebe, Interstitium oder direkt in die Blutbahn (Cook, Musa, & Case, 1996). Das Resultat ist eine Entzündungsreaktion. Den Ablauf dieser Vorgänge bezeichnet man als Pankreastase-Pankreatitis-Sequenz (J. M. Braganza, 1996), siehe Abbildung 2-4.

Bei der chronischen Pankreatitis kommt es im Rahmen der rezidivierenden Entzündungsepisoden in einem schrittweisen Prozess zur vermehrten Bildung extrazellulärer Matrix (ECM), vor allem Kollagen Typ I und III sowie Fibronectin (M V Apte et al., 1999). Im ersten Schritt entsteht eine Schädigung des Pankreasgewebes durch Pankreastase und konsekutive Entzündungsreaktion mit Nekrose oder Apoptose der Azinuszellen. Dabei werden Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. Transforming growth factor β 1, TGF β 1; Platelet-derived growth factor, PDGF) freigesetzt (Ebert et al., 1998). Im zweiten Schritt werden die untergegangenen Zellen durch Makrophagen

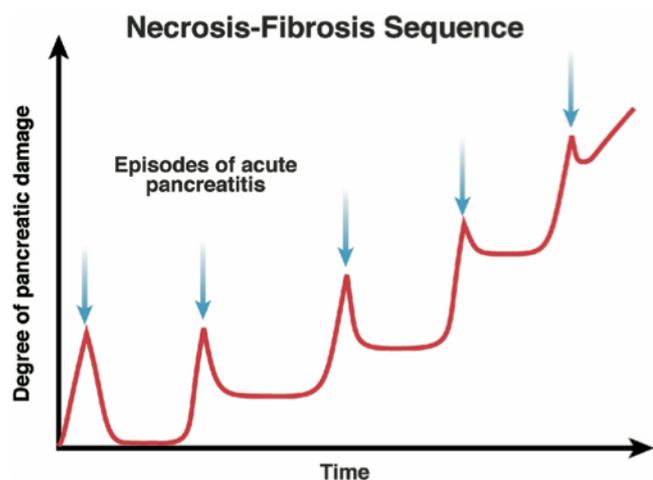
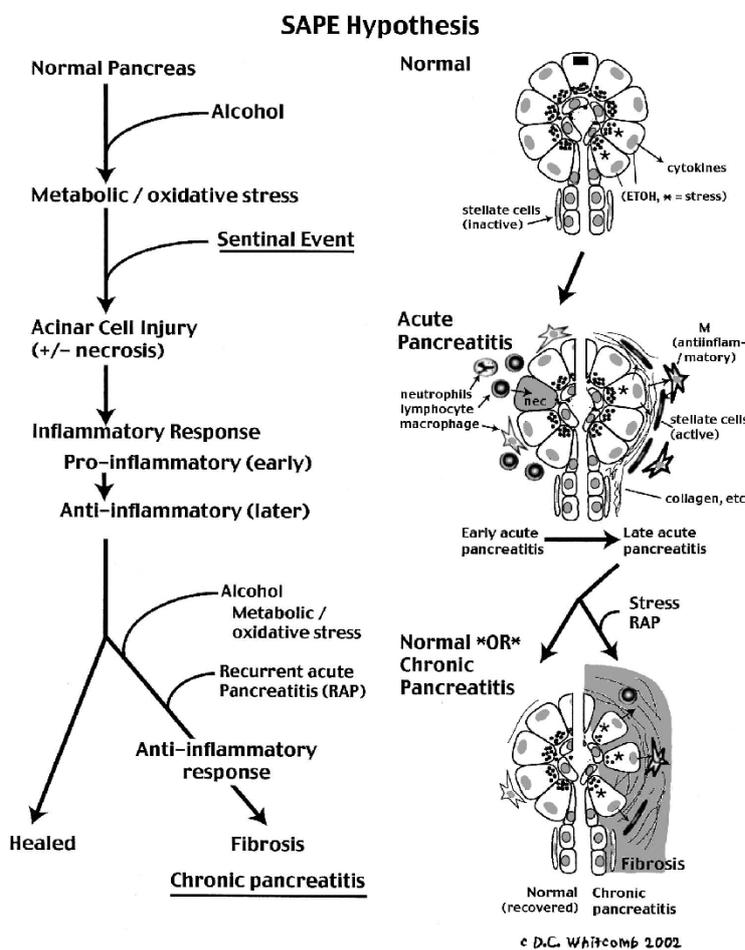


Abbildung 2-5 Nekrose-Fibrose-Sequenz.

Wiederholte Entzündungsepisoden mit Nekroseentstehung führen zu zunehmender Schädigung des Pankreas mit schließlich irreversiblen Gewebeerkrankungen charakterisiert durch Atrophie der Azini und Fibrose (Witt et al., 2007).

phagozytiert und es resultiert eine Aktivierung und Proliferation von lokalen Bindegewebszellen, den Pancreatic Stellate Cells (PSC, siehe 2.3) (Haber et al., 1999). Im letzten Schritt kommt es durch die aktivierten PSC zur Produktion von ECM, welche das entzündliche Infiltrat und die vorherigen Azinuszellen ersetzt (Izumi & Suda, 2007). Dadurch verändert sich die Architektur und Funktionalität des verbleibenden Pankreasgewebes. Es entsteht eine Fibrose des Pankreas. Dies ist eines der zentralen Kriterien der chronischen Pankreatitis. Wiederholt sich diese Nekrose-Fibrose-Sequenz (Witt et al., 2007) kommt es im Verlauf zu einer progredienten Schädigung des Organs (siehe Abbildung 2-5).



Der Zusammenhang zwischen diesen vielfältigen Vorgängen und dem mit der Zeit fortschreitenden Untergang des Pankreas bzw. dessen vollständigen Heilung nach akuter Entzündungsepisode wurde 2003 durch D. C. Whitcomb in der SAPE-Hypothese (SAPE, Sentinel Acute Pancreatitis Event) postuliert (Whitcomb, 2003). Darin wird, anhand des Beispiels Alkohol, beschrieben, dass es nach einem zentralen, schädigenden Reiz (SAPE) zum Ablauf der einzelnen Schritte kommt, die letztlich die

Abbildung 2-6 SAPE-Hypothese zur Ätiologie der chronischen Pankreatitis.

Dargestellt sind die ablaufenden Schritte von akuter zu chronischer Pankreatitis. Links zeigt die Kausalkette, rechts die zentralen Ereignisse auf zellulärer Ebene in 3 Schritten: Im gesunden Pankreas bestehen regelrechte Azini mit apikalen Zymogengranula. Unter Einfluss verschiedener Ursachen, hier am Beispiel Alkohol, kommt es zu metabolischem oder oxidativem Stress (*) und Zytokine werden, ohne nachweisbare Pathologie, freigesetzt. Im zweiten Schritt kommt es zu einer frühen pro-inflammatorischen Phase mit Rekrutierung von Neutrophilen, Lymphozyten und Makrophagen, es entstehen Zellnekrosen. Im Anschluss kommt es zu einer späten anti-inflammatorischen Phase mit Aktivierung von PSC und anti-inflammatorischen Makrophagen (M) und konsekutiver Heilungsphase und Kollagenproduktion. Im letzten Schritt kommt es entweder zu einer Heilung des Azinuszells (Pfeil nach links) oder, bei weiterhin bestehendem oxidativem Stress, zum Fortbestehen der Entzündung und PSC-Aktivierung mit Produktion extrazellulärer Matrix und Fibrose.

Entstehung einer chronischen Pankreatitis bewirken können (siehe Abbildung 2-6). Diese Theorie lässt sich aber, neben Alkohol, auch auf andere Ursachen anwenden. Lange Zeit wurden die akute und chronische Pankreatitis als zwei verschiedene Krankheitsentitäten gesehen. Bei Suszeptibilität des Individuums z.B. durch eine entsprechende genetische Veranlagung, wie rezessive, nicht primär krankheitsauslösende Mutationen, geht man, aufbauend auf der oben beschriebenen Sequenz, zunehmend von einem Krankheitskontinuum aus. Letztlich ist die Pathogenese der Erkrankung nicht eindeutig belegt. Neben genannten auslösenden Faktoren und Mechanismen existieren auch andere Theorien zur Entstehung der Erkrankung. So gibt es die Theorie, dass die chronische Pankreatitis primär vom Gangsystem ausgeht und durch Proteinablagerungen zu einem Aufstau mit Entzündung führt. Eine andere Überlegung ist, dass es zu einer direkten toxischen Schädigung, z.B. durch Alkohol, von Azinuszellen sowie PSC kommt und letztere dadurch direkt aktiviert werden ohne den Umweg über lokale Stimulationsmechanismen zu nehmen (J. Braganza et al., 2011).

2.3 Pancreatic Stellate Cells (PSC)

Die erste Beschreibung von Vitamin A-haltigen Zellen im Pankreas erfolgte 1982 (Watari, Hotta, & Mabuchi, 1982). Damals wurde für den gefundenen Zelltyp eine Assoziation, mit den durch Karl von Kupffer 1876 beschriebenen Hepatic Stellate Cells (HSC), angenommen.

Lange konnten diese Zellen des Pankreas nicht weiter untersucht werden, da eine entsprechende Isolationsmethode fehlte. Diese wurde erst 1998 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen gefunden und macht seitdem die Isolation von Pancreatic Stellate Cells (PSC) möglich (M V Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998). Dabei verwendeten Apte et al. einen Dichtegradienten und Bachem et al. eine Auswuchsmethode aus Pankreasgewebe zur Isolation. Beide Verfahren werden bis heute angewendet und ließen die Charakterisierung des neuen Zelltyps sowie das Verständnis der Pankreasfibrose maßgeblich voranschreiten.

Im gesunden Pankreas befinden sich die PSC periazinär entlang der Basalmembran der Azinuszellen und interlobulär. Eine Assoziation mit Langerhans-Inseln konnte bisher nicht gesehen werden.

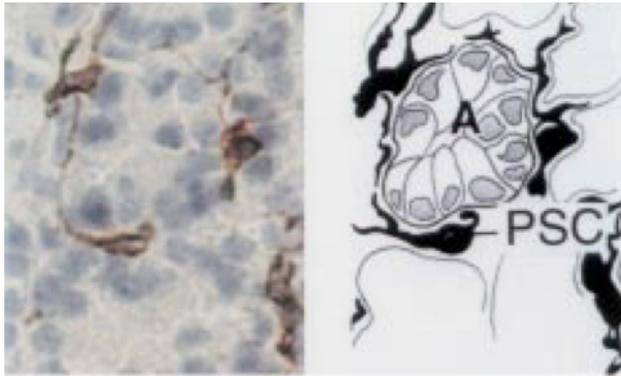


Abbildung 2-7 PSC im Pankreasgewebe. Desmin positive Zellen (PSC) liegen im Interstitium zwischen den Azini. Links: Immunhistochemie auf Desmin in 40x Vergrößerung. Rechts: Schematische Darstellung der Histologie. (M V Apte et al., 1998).

Die Zellen können in zwei Zuständen vorliegen. Einerseits einem inaktiven Zustand mit vielen Lipideinschlüssen, Expression der Zytoskelettbestandteile Desmin und Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), niedriger Zellteilungsrate und geringer Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM). Dieser Zustand liegt im gesunden Organ vor. Man geht davon aus, dass inaktive PSC etwa 4 – 7% des normalen Pankreasparenchyms ausmachen.

Bei der Entstehung eines Krankheitsprozesses, wie z.B. einer Pankreatitis oder dem Pankreaskarzinom, oder unter Zellkulturbedingungen gehen die PSC andererseits in einen aktivierten Zustand über. Dieser zeichnet sich durch eine Lokalisation von vermehrten Zellen im krankhaften Gewebe, Verlust der Lipideinschlüsse, Veränderung des Zytoskeletts mit Expression von α -SMA, hoher Zellteilungsrate, Migration, Bildung von ECM (vor allem Kollagen Typ I, III, XI, Fibronectin) und Proteinen für deren Abbau (MMP, TIMP) sowie Expression von Cytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-8), Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF β 1, CTGF, VEGF) als auch deren Rezeptoren (PDGF-R, TGF β -R) aus (M V Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998; Haber et al., 1999; Karger et al., 2008; Mews et al., 2002).

Wie bei der chronischen Pankreatitis (siehe 2.2) beschrieben, besteht die Annahme, dass es durch einen schädigenden Reiz über die Nekrose-Fibrose-Sequenz zur Aktivierung von PSC kommt oder diese direkt durch toxische Metabolite, wie z.B. Acetaldehyd bei der Alkoholverstoffwechsellung oder oxidativem Stress aktiviert werden (Minoti V. Apte, Pirola, & Wilson, 2006).

Die regulatorischen Mechanismen, die zur Aktivierung der PSC führen, sind vielseitig. So wurde in einigen Arbeiten beschrieben, dass es durch Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) zur parakrinen und autokrinen Aktivierung kommt. Zudem wurde eine Rolle in der Aktivierung von PSC für Moleküle wie Angiotensin II und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben (Hama et al., 2006; Omary et al., 2007; Schneider et

al., 2001). Die meisten Hinweise für eine zentrale Rolle bei der Aktivierung bestehen jedoch für PDGF und TGF β 1. Dabei wird PDGF eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Migration der Zellen zugeschrieben, wohingegen TGF β 1 primär die Produktion von ECM und α -SMA zu beeinflussen scheint (Luttenberger et al., 2000; Shek et al., 2002).

In den Jahren seit der Entdeckung der PSC wurden gute Hinweise darauf gefunden, dass die Zellen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Fibroseentwicklung als auch bei der Fibrolyse spielen.

Die Fibroseentstehung lässt sich in Bezug auf den Funktionszustand der PSC in vier Stadien einteilen: In Stadium I liegen die PSC nah mit Makrophagen zusammen im Nekroseareal, in Stadium II kommt es zu fibrotischen Umbauprozessen und die PSC finden sich auch perilobulär, Stadium III kennzeichnet sich durch eine dichte Fibrose mit reduzierter Anzahl von PSC, im letzten Stadium IV, mit zusätzlicher Entstehung von Ablagerungen im Gangsystem, liegen die PSC vor allem in der Nähe von ductalen Ulzerationen (Detlefsen, Sipos, Feyerabend, & Klöppel, 2006; Klöppel et al., 2004). Es wird angenommen, dass während der ersten beiden Stadien eine Regeneration möglich ist, wenn der schädigende Reiz beseitigt werden kann.

Die zentrale Funktion der PSC bei der Fibroseentstehung ist die Bildung der extrazellulären Matrix durch Produktion von Kollagen Typ I, III, XI, Fibronectin und Periostin (Erkan et al., 2007; Klöppel et al., 2004).

Versteht man die Fibrose nicht nur als Endstrecke der chronischen Pankreatitis, kann den PSC auch eine Rolle in der Wundheilung zukommen. Dabei stellt die ECM-Produktion eine Art Schutzfunktion dar, in der ein provisorischer Raum geschaffen wird, in dem Zellen proliferieren und migrieren können, die Entzündung so bekämpft wird und sich schließlich in diesem Raum neue Parenchymzellen bilden können (Zimmermann et al., 2002). Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass PSC durch die Produktion von Proteinen für den ECM-Abbau (MMP: Matrixmetalloproteinasen und dessen Inhibitor TIMP: Tissue inhibitor of Metalloproteinases), die Fähigkeit zur Fibrolyse besitzen (Phillips et al., 2003). Insgesamt existieren derzeit jedoch nicht genügend Daten, die das regeneratorsche Potenzial von PSC belegen.

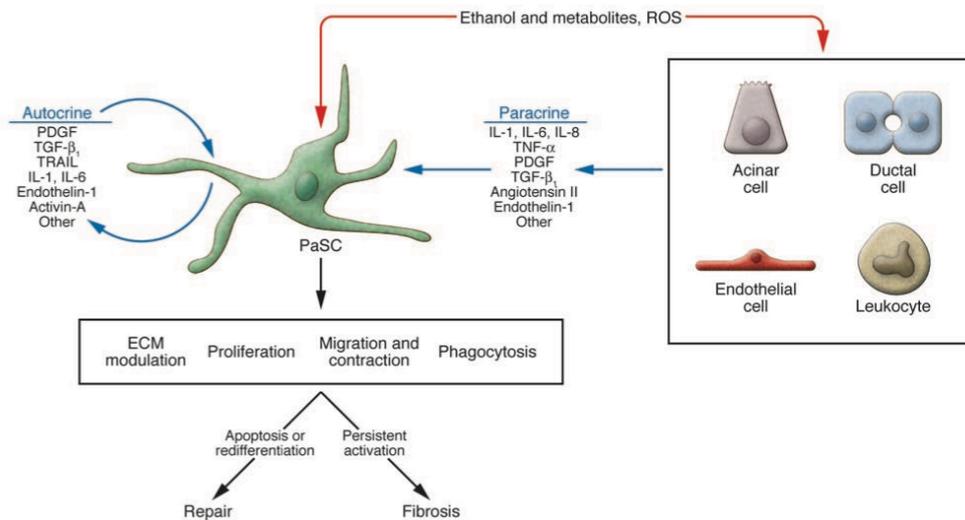


Abbildung 2-8 Mechanismus der PSC Aktivierung.

Der Einfluss von Alkohol, dessen Metaboliten oder Noxen mit Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) resultieren in einer autokrinen, parakrinen oder direkten Aktivierung von PSC. Dabei können die parakrinen Stimuli durch benachbarte Zellen entstehen. Nach der Aktivierung wandern die PSC in geschädigtes Gewebe, proliferieren, generieren Komponenten der extrazellulären Matrix, was Geweberegeneration oder Fibrose zur Folge haben kann, und sind sogar in der Lage Phagozytose zu betreiben. Persistierende Aktivierung bewirkt Fibrose, während Re-Differenzierung in einen inaktiven Status oder Apoptose der Zellen Geweberegeneration begünstigt (Omary et al., 2007).

Bei der Tumorentwicklung ist die Entstehung eines speziellen Mikromilieus von entscheidender Bedeutung für den malignen Phänotyp im Pankreas. Dazu zählt die Entwicklung eines fibrotischen Umbaus und Expression bestimmter Wachstumsfaktoren. PSC wurden im Mikromilieu von Pankreaskarzinomen gefunden und scheinen hier eine Rolle beim Tumorwachstum, bei der Metastasenbildung und der Erhöhung von Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung zu spielen (Hwang et al., 2003; Muerkoester et al., 2004).

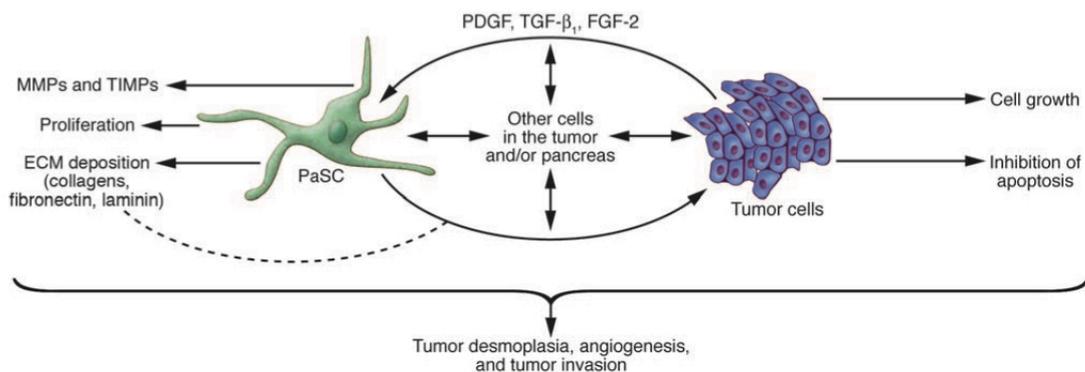


Abbildung 2-9 Einfluss von PSC auf Tumorinvasion und Desmoplasie.

Es existieren zunehmende Hinweise auf eine Zell-Zell-Interaktion von PSC, Tumorzellen und anderen lokalen Zellen wie Azinuszellen, duktalem Zellen, Endothelzellen und Leukozyten. Dies trägt zu der ausgeprägten Desmoplasie (Ausbildung einer kollagenen Stromakomponente) bei Pankreastumoren bei. Dieser Dialog zwischen den Zellen begünstigt die Tumorinvasion und beeinflusst die Angiogenese. (Omary et al., 2007)

2.4 Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGF-R)

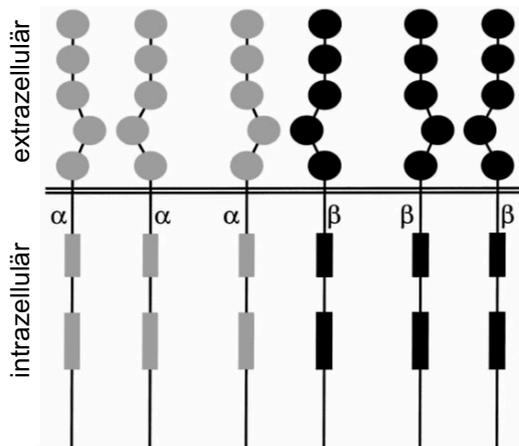


Abbildung 2-11 Schematische Darstellung des PDGF-Rezeptors.

Bei Ligandenbindung formieren die α - und β -Rezeptoren Homo- oder Heterodimere ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$). Der extrazelluläre Anteil besteht aus 5 Ig-ähnlichen Domänen. Die Liganden binden an die äusseren 3 Domänen, während die 4. Domäne an der direkten Rezeptor-Rezeptor-Interaktion beteiligt ist. Der intrazelluläre Anteil besteht aus Tyrosinkinasedomänen. (Heldin & Westermark, 1999)

Der Wachstumsfaktor Platelet-derived Growth Factor (PDGF) wurde 1974 durch Ross et al. als ein Faktor aus Blutplättchen beschrieben, der das Wachstum von arteriellen, glatten Muskelzellen anregt, und 1979 durch Heldin et al. vollständig aufgereinigt und teilweise charakterisiert (Heldin, Westermark, & Wasteson, 1979; Ross, Glomset, Kariya, & Harker, 1974).

Der PDGF wird von insgesamt vier Genen kodiert (A, B, C, D). Die seit längeren bekannten Gene A und B formieren drei biologisch aktive Formen (PDGF-AA, -BB, -AB). Die Isoformen PDGF-CC und -DD sind erst Anfang des 21. Jahrhunderts beschrieben worden und werden im Un-

terschied zu den anderen Isoformen in einer inaktiven Form sezerniert (Tallquist & Kazlauskas, 2004).

Beim PDGF-Rezeptor handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase, die sich entweder als Homo- oder Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzt (PDGF-R $\alpha\alpha$ / - $\beta\beta$ / - $\alpha\beta$) (Heldin & Westermark, 1999). Der extrazelluläre Anteil besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen, an die der entsprechende Ligand bindet, während es sich beim intrazellulären Anteil um eine Tyrosinkinase-Domäne handelt (siehe Abbildung 2-11). Kinasen sind Proteinstrukturen, die die Fähigkeit zur Phosphorylierung besitzen. Dabei können sie sowohl andere Proteine phosphorylieren als auch sich selbst (Autophosphorylierung).

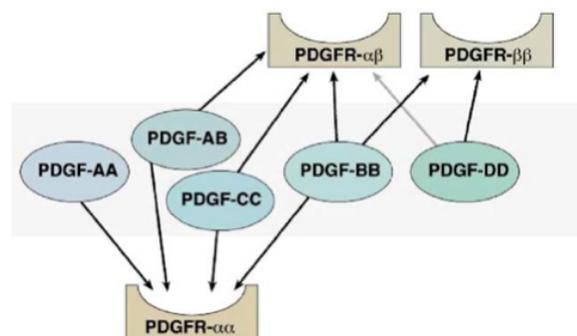


Abbildung 2-10 Affinität der PDGF Isoformen zu den PDGF-Rezeptoren.

PDGF-AA bindet nur an PDGF-R $\alpha\alpha$. PDGF-BB bindet als einzige Isoform an alle Rezeptoren. PDGF-AB bindet an PDGF-R $\alpha\beta$. PDGF-CC an - $\alpha\alpha$ und PDGF-DD vor allem an - $\beta\beta$. (Tallquist & Kazlauskas, 2004)

Die Liganden binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren. Dabei kann PDGF-AA nur an PDGF-R α binden während PDGF-BB der einzige Ligand ist, der an alle drei Rezeptoren bindet. Alle anderen Isoformen binden mit unterschiedlicher Affinität an die einzelnen Rezeptorkombinationen, siehe Abbildung 2-10 (Tallquist & Kazlauskas, 2004). Bei Ligandenbindung kommt es zur Dimerisation der beiden Ketten und Autophosphorylierung durch die Tyrosinkinase-Aktivität der intrazellulären Domäne. Dies bewirkt eine Aktivierung weiterer intrazellulärer Signalkaskaden, z.B. über die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) oder MAPK (Mitogen-Activated-Protein-Kinases), und konsekutiver Genexpression (siehe Abbildungen Abbildung 2-12 und Abbildung 2-13). Zu den über das PDGF-System vermittelten Funktionen gehören Proliferation, Migration, Überleben, Synthese extrazellulärer Matrix (z.B. Kollagen), Gewebe-Remodeling und Wundheilung (Borkham-Kamphorst & Weiskirchen, 2015).

2.5 Der Signalweg über Mitogen-Activated-Protein-Kinases (MAPK)

Ein wichtiger zellulärer Signalweg für die Reaktion auf extrazelluläre Stimuli ist die Signalkaskade über Mitogen-Activated-Protein-Kinases (MAPK). MAPK spielen eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation, Zytokinproduktion, Überleben und Apoptose der Zellen (Chang & Karin, 2001). Die Familie der MAPK setzt sich aus einer Reihe verschiedener Moleküle zusammen. Die Moleküle ERK, JNK und p38-MAPK sind dabei zentrale Elemente, um die Signale von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Stressfaktoren, wie z.B. oxidativem Stress, in die Zelle weiterzuleiten. Ein wichtiger Signalweg für Proliferation sowie die Entscheidung über Apoptose oder Überleben der Zelle ist die Kaskade über Raf-MEK-ERK1/2 (McCubrey et al., 2007). Dabei kommt es durch ein extrazelluläres Signal, z.B. Bindung eines Liganden an eine Rezeptortyrosinkinase (z.B. PDGF an PDGFR), zur Formierung eines Bindungskomplexes aus Shc, Grb2 und SOS. Dieser aktiviert Ras durch Austausch von GDP gegen GTP, was nun Raf an die Zellmembran rekrutiert und phosphoryliert. Im weiteren Verlauf werden dann MEK1/2 und ERK1/2 aktiviert und schließlich

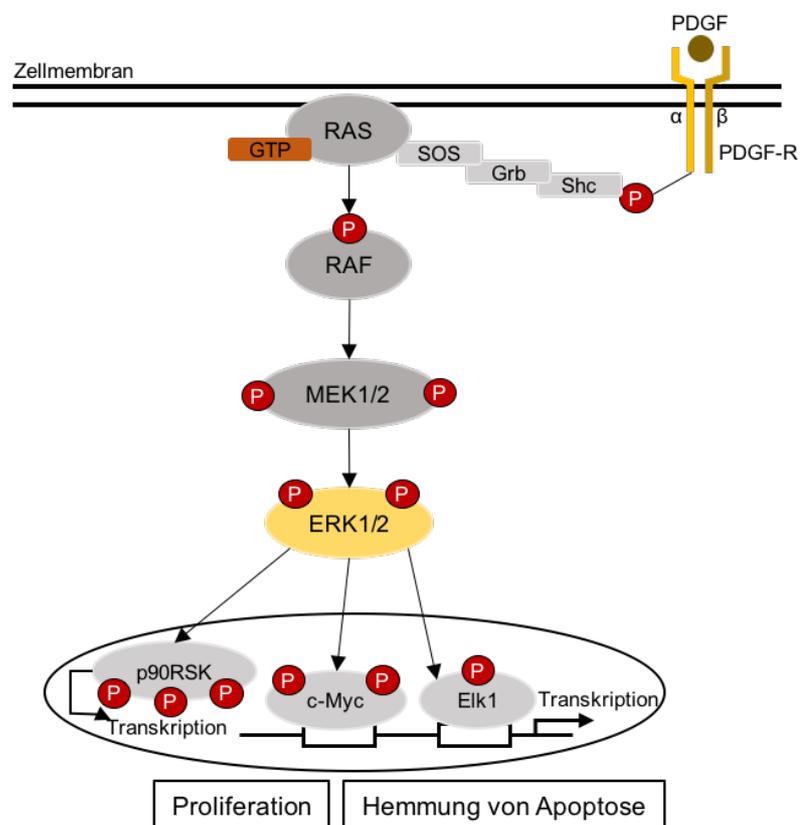


Abbildung 2-12 Überblick über den Raf/MEK/ERK-Signalweg via PDGF-R.

Nach Bindung des Liganden PDGF (z.B. PDGF-BB) kommt es zur Rezeptordimerisierung von PDGF-R (z.B. -αβ). Durch Autophosphorylierung bindet dieser einen Komplex aus Shc, Grb, SOS. Dieser bindet Ras. Die folgende Raf/MEK/ERK-Kaskade wird durch Ras induziert, welches Raf an die Zellmembran rekrutiert und phosphoryliert. Es folgt die Signalweiterleitung über MEK1/2 und ERK1/2, was schließlich zur Induktion von Transkriptionsfaktoren und Genexpression führt. Zwei der wichtigsten Funktionen dieses Signalweges sind die Proliferation von Zellen und Hemmung von Apoptose. PDGF: Platelet-derived growth factor; PDGF-R: Platelet-derived growth factor receptor; Shc: Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein; Grb: growth factor receptor bound protein; SOS: son of sevenless; RAS: Rat sarcoma; GTP: Guanosintri-phosphat; RAF: apidly accelerated fibrosarcoma; MEK1/2: Mitogen-activated protein kinase kinase; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase; p90RSK: p90 Ribosomal S6 kinase; cMyc: c-"Myelocytomatose"; Elk1: ETS domain-containing protein Elk-1. Modifiziert nach (McCubrey et al., 2007).

Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Myc oder Elk, induziert (McCubrey et al., 2007).
Abbildung 2-12 zeigt einen Überblick über die Prozesse bei Aktivierung dieses Weges und der konsekutiven Steuerung von Proliferation und Überleben der Zelle.

2.6 Der Signalweg über Phosphatidyl-Inositid-3-Kinase (PI3K)

Ein anderer wichtiger Signalweg über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) führt über die Aktivierung der PI3K und die Proteinkinase B (PKB oder AKT). Dabei kommt es nach Aktivierung der RTK zu einer Bindung von p85, der regulatorischen Untereinheit von PI3K, die dann p110, die katalytische Untereinheit von PI3K, rekrutiert. Die so aktivierte PI3K konvertiert Phosphatidylinositol

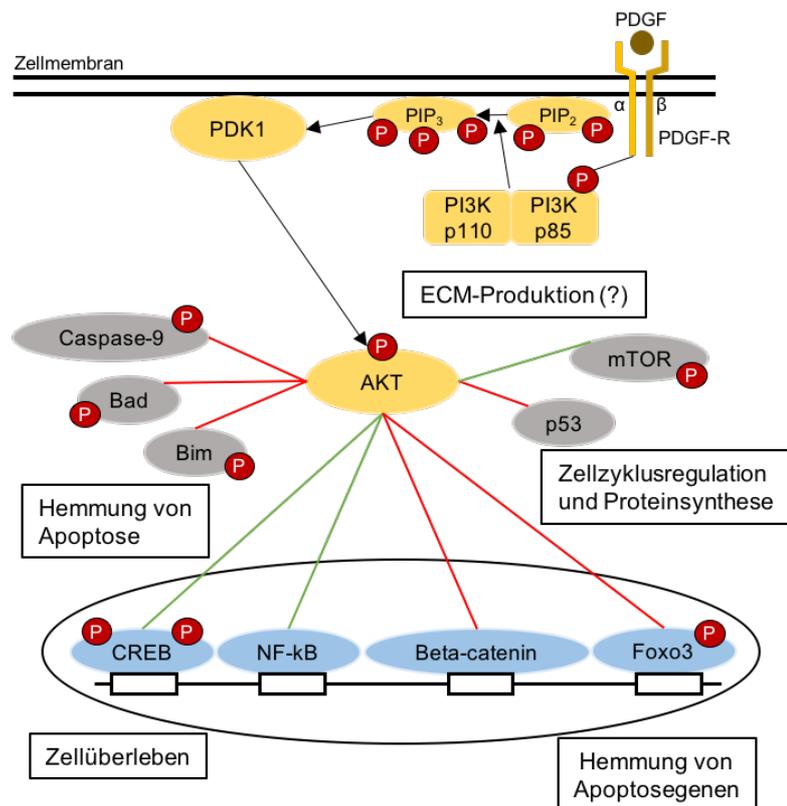


Abbildung 2-13 Überblick über den PI3K/AKT-Signalweg via PDGF-R.

Durch Autophosphorylierung bindet dieser die regulatorische Untereinheit p85 von PI3K und diese ihrerseits die katalytische Untereinheit p110 der PI3K. Damit wandert PI3K an die Zellmembran und bildet PIP₃ aus PIP₂, was zur Rekrutierung von PDK1 und Aktivierung von AKT durch Phosphorylierung führt. AKT führt nun zahlreiche Aufgaben in der Zelle über verschiedene Signalwege durch. Dargestellt sind jeweils die Endstrecken dieser entsprechenden Wege. Stimulatorische Signale sind durch grüne Linien dargestellt, inhibitorische Signale durch rote Linien, Zielproteine in grau, Transkriptionsfaktoren in blau. Über die Inhibition von Caspase-9, Bad und Bim werden Apoptosemechanismen der Zelle unterbrochen. Die Transkriptionsfaktoren CREB und NF-kB dienen dem Zellüberleben und zur Proliferation. Beta-catenin und Foxo-3 induzieren normalerweise pro-apoptotische Genexpression, ihre Funktion wird durch AKT gehemmt. p53 bewirkt als sog. Tumorsuppressorgen einen Zellzyklusarrest. Seine Funktion wird durch AKT ebenfalls gehemmt, so dass der Zellzyklus voranschreitet. Der mTOR-Komplex besitzt viele Funktionen, unter anderem die Proteinsynthese über Produktion von Ribosomen. Beschrieben ist auch, dass die Produktion extrazellulärer Matrix über diesen Signalweg beeinflusst wird, der Mechanismus dahinter ist jedoch nicht bekannt. PDGF: Platelet-derived growth factor; PDGF-R: Platelet-derived growth factor receptor; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PIP₂₍₃₎: Phosphatidylinositol Bi- (Tri-) Phosphat; PDK1: Phosphoinositid-dependent Kinase 1; AKT: Protein kinase B; Bad: Bcl-2-Antagonist of Cell Death; Bim: Bcl-2-like protein 11; p53: tumor suppressor p53; mTOR: Mechanistic target of rapamycin; CREB: cAMP response element-binding protein; NF-kB: Nuclear factor-kappa B; Foxo3: Forkhead box O3. Modifiziert nach (Hers, Vincent, & Tavar, 2011; McCubrey et al., 2007)ach Bindung des Liganden PDGF (z.B. PDGF-BB) kommt es zur Rezeptordimerisierung von PDGF-R (z.B. -αβ).

Biphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol Triphosphat (PIP₃), welches die Phosphoinositid-dependent Kinase 1 (PDK1) an die Zellmembran bindet. AKT wird nun über PDK1 rekrutiert und an dem Tyrosinrest 308 (T308) sowie Serinrest 473 (S473) phosphoryliert (McCubrey et al., 2007). Über AKT werden Zellfunktionen wie Zellüberleben, Zellzyklusprogression und Zellwachstum gesteuert. Zudem scheint AKT

eine Rolle bei der Bildung extrazellulärer Matrixbestandteile, wie Kollagen, und damit der Fibroseentstehung zu spielen (Gu, Sun, Zhang, Wu, & Wei, 2015). Abbildung 2-13 zeigt einen Überblick über den Signalweg und die Funktionen der PI3K/AKT-Kaskade.

2.7 Imatinib mesylate

Imatinib mesylate (initial STI571) wurde als erste zielgerichtete Therapie zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) entwickelt. Bei der CML kommt es durch reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 zu einer gekürzten Version von Chromosom 22. Dies ist als Philadelphia Chromosom bekannt und stellte die erste Verbindung zwischen einer spezifischen, genetischen Veränderung und einer Tumorerkrankung her. Die Konsequenz dieser Translokation ist die Entstehung des BCR-ABL Gens, welches für ein Protein kodiert,

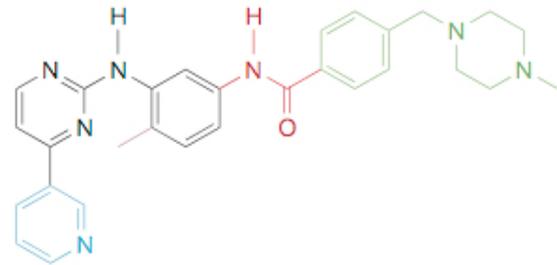


Abbildung 2-14 Strukturformel von Imatinib mesylate.

Dargestellt ist die endgültige Strukturformel von Imatinib mesylate. Die Farben zeigen die chemischen Optimierungen an, die Imatinib mesylate seine Wirkung verleihen. Schwarz: Phenylamino-Derivat, Kernstruktur der Grundsubstanz. Blau: 3'-Pyridygruppe, Steigerung der zellulären Aktivität. Rot: Amidgruppe, bewirkt Aktivität gegenüber Tyrosinkinasen. Lila: Sog. „flag methyl“, beseitigt Aktivität gegenüber Protein-Kinase C (Eigenschaft der Grundsubstanz). Grün: N-methyl-Piperazinrest, erhöht Löslichkeit und orale Bioverfügbarkeit.

das eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität aufweist. Darauf aufbauend wurde eine Substanz gesucht, die diese Funktion von BCR-ABL hemmen kann. Das Ergebnis dieser Arbeiten, mit Erstzulassung 2001 für die CML, war Imatinib mesylate, ein Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) mit hoher Affinität zu den drei Tyrosinkinasen Bcr-Abl, c-Kit und dem PDGF-Rezeptor (Capdeville, Buchdunger, Zimmermann, & Matter, 2002), siehe Abbildung 2-15.

Die Inhibition mehrerer Tyrosinkinasen hat im Laufe der Zeit dazu geführt, dass auch das Ansprechen anderer Erkrankungen auf Imatinib mesylate getestet wurde. So hat zum Beispiel die Reaktivität gegenüber c-Kit zur Zulassung der Behandlung Gastrointestinaler Stromatumore (GIST) geführt (Blanke et al., 2008).

Aufgrund der Wirksamkeit von Imatinib mesylate gegenüber dem PDGF-Rezeptor bestehen nicht nur Therapieoptionen bezüglich maligner Grunderkrankungen. Einerseits konnte bei *in vitro* Versuchen zwar auch an myeloischen Leukämiezelllinien und Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt werden, dass es zu einer, über den PDGF-R vermittelten, Inhibition der Proliferation durch Imatinib mesylate kommt (Buchdunger

et al., 2000; Hwang et al., 2003). Andererseits wurde für Imatinib mesylate jedoch eine positive Beeinflussung bei der Entwicklung einer Fibrose in Lunge, Haut, Niere und Leber beschrieben (Aono et al., 2005; Distler et al., 2007; Wang, Wilkes, Leof, & Hirschberg, 2005; Yoshiji et al., 2005).

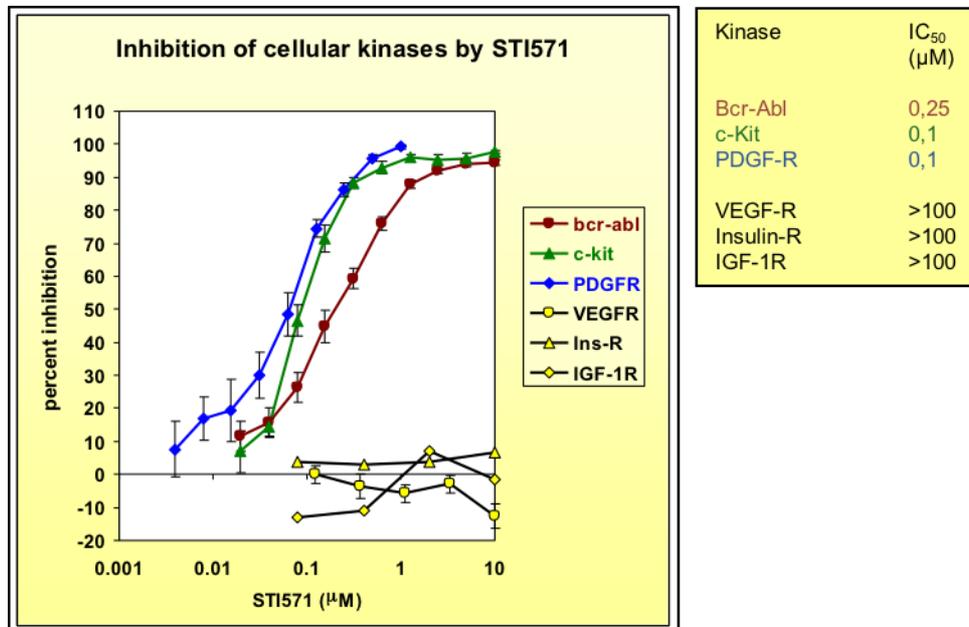


Abbildung 2-15 Affinität von Imatinib mesylate zu verschiedenen Tyrosinkinasen.

Gemessen wurde die Inhibition der Phosphorylierung, wiedergegeben in Prozent und IC₅₀. Für Bcr-Abl, c-Kit und PDGF-R besteht eine hohe Inhibition bei bereits niedriger Dosierung. Im Gegensatz dazu besteht für VEGF-R, Insulin-R und IGF-1R eine sehr niedrige Affinität. STI571: Imatinib mesylate; Bcr-Abl: Fusionsprotein aus (9:22) Translokation; c-Kit: Tyrosine-rotein kinase KIT; PDGF-R: Platelet-derived growth factor receptor; VEGF-R: Vascular endothelial growth factor receptor; Ins-R/Insulin-R: Insulinreceptor; IGF-1R: Insulin-like growth factor 1 receptor; IC₅₀: Konzentration bei der eine 50%ige Abnahme der Tyrosinkinaseaktivität vorlag. Graph aus Präsentation von Novartis International AG, Daten aus (Buchdunger et al., 2000; Druker et al., 1996).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für alle durchgeführten Experimente wurden gesunde, männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 150-250g verwendet. Die Tiere wurden in einer Temperatur-kontrollierten Umgebung der interdisziplinären Forschungseinrichtung des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE) unter einem 12-stündigen Tag-/Nacht-Zyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Versorgung der Ratten wurde durch die Versuchstierhaltung des UKE gewährleistet.

3.2 Zellisolation

Die Isolation der Pancreatic Stellate Cells (PSC) erfolgte in Anpassung an hiesige Bedingungen, entsprechend dem zuvor beschriebenen Vorgehen (M V Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998; Jaster et al., 2002).

3.2.1 Operation und intraduktaler Organverdau

Zur Isolation der Pancreatic Stellate Cells (PSC) wurden pro Isolation jeweils zwei Ratten verwendet. Die Versuchstiere wurden mittels Diethylether (puriss. >99,5%, Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) anästhesiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Im Anschluss wurde eine mediale Laparotomie durchgeführt und das Pankreas sowie die Milz und das Ligamentum hepatoduodenale dargestellt. Letzteres wurde mittels einer Pean-Klemme fixiert, um einen späteren Verlust der Verdauungsenzyme in die Leber zu vermeiden. Dann wurde die Milz und der Pankreaschwanz frei präpariert und anschließend die Papilla Vateri aufgesucht. Diese wurde mittels einer 24G Venenverweilkanüle (Medex Medical Ltd., Haslingden, Großbritannien) sondiert und es erfolgte die Injektion von 8ml der in Tabelle 3-1 aufgeführten Verdauungsenzymlösung.

Verdauungsenzymlösung		
37 ml Hank's balanced salt solution plus		
Substanz	Menge	Hersteller
Collagenase P	800mg/l	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Protease Typ XIV	400mg/l	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
DNAse I	200mg/l	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Tabelle 3-1 Zusammensetzung Verdauungsenzymlösung

Waschpuffer		
Substanz	Menge	Hersteller
Hank's balanced salt solution (HBSS)	50ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3-2 Zusammensetzung Waschpuffer für die Zellisolation

Das nun mit Enzymlösung gefüllte Organ wurde vorsichtig reseziert und in eine Petrischale überführt, mechanisch zerkleinert und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur weiteren mechanischen Zerkleinerung wurde anschließend steril unter der Zellkulturbank mittels Pipette resuspendiert, die restliche Enzymlösung hinzugegeben und für weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen bei Raumtemperatur 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und in Waschpuffer (siehe Tabelle 3-2) resuspendiert. Diese Suspension wurde nun durch ein Sieb mit einer Maschenbreite von 150µm (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gefiltert und das Sieb mehrmals mit Waschpuffer gewaschen und erneut unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert.

3.2.2 Dichtegradientenzentrifugation

Für den Dichtegradienten wurde nun die Lösung mit dem verdauten Organ mit 8 ml einer Histodenz-Lösung vermischt und in eine Spritze aufgezogen. Die Histodenz-Lösung bestand aus selbst angesetztem Phosphat-buffered saline (PBS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, 1,39g/L Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 0,28g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat) mit einem pH von 7,25 und 30% Histodenz (Sigma-Aldrich, St- Louis, USA). Jetzt wurden 7ml HBSS plus 4% FKS mit der Organlösung unterschichtet und 20 Minuten bei 4°C mit 2900 Umdrehungen zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Grenzfläche der beiden Phasen abgenommen und in

Zellkulturmedium aufgenommen (17% Iscove-Medium, siehe 3.3 Zellkultur). Das Medium bestand aus Iscove-Medium (Biochrome, Berlin, Deutschland) 17% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin und nicht-essenziellen Aminosäuren (NEAS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mittels Zentrifugation, anschließend konnten die Zellen ausgesät werden.

Alle Zentrifugationsschritte wurden mit der Eppendorf Zentrifuge 5810R von Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, durchgeführt und es wurde der 16,1 cm Ausschwingrotor benutzt.

3.3 Zellkultur

Die Pancreatic Stellate Cells (PSC) wurden nach der Isolation in 6-Well-Platten (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) unter sterilen Bedingungen für drei Tage in 17%igem, dann bis zum Beginn der Experimente in 10%igem Iscove-Medium (jeweils 17 bzw. 10% FKS) bei 37°C unter 5% CO₂ in Kultur gehalten. Die genaue Zusammensetzung der Zellkulturmedien ist in Tabelle 3-3 einzusehen. Die ersten zwei Tage wurde zweimal mit Phosphat-buffered saline (PBS) gewaschen und anschließend frisches Medium auf die Zellen gegeben. Der weitere Verlauf bzgl. des Wechsels des Zellkulturmediums und die Passage der Zellen war abhängig von dem jeweiligen Versuch und ist in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

Zellkulturmedien			
Substanz	Menge	Hersteller	
Iscove-Medium	500ml abzüglich übriger Volumina	Biochrom, Deutschland	Berlin,
Fetal-calf serum (FCS)	17%, 10%, 0,0%	Invitrogen, Deutschland	Karlsruhe,
Penicillin / Streptomycin	1%	Invitrogen, Deutschland	Karlsruhe,
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAS)	1%	Invitrogen, Deutschland	Karlsruhe,

Tabelle 3-3 Zusammensetzung Zellkulturmedien

3.3.1 Bestimmung der Vitalität und Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung

Zur Bestimmung der Quantität und Vitalität der Zellen wurde eine Trypanblau-Färbung in einer Neubauerkammer durchgeführt.

Bei der Trypanblau-Färbung handelt es sich um eine einfache und schnelle Färbung zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen sowie deren konsekutiver Zählung. Trypanblau ist ein Vertreter der Gruppe der Azofarbstoffe, dessen Anion an Zellproteine bindet. Es handelt sich dabei um eine Ausschlussfärbung, denn der Farbstoff dringt selektiv nur in tote Zellen ein, da deren Zellmembran für den Farbstoff mit einer molaren Masse von $M = 960,8 \text{ g/mol}$ durchlässig geworden ist. Membranen von lebenden Zellen können hingegen nicht durchdrungen werden. Die toten Zellen werden tiefblau angefärbt (Schmitz, 2007).

Gezählt wurden die lebenden Zellen nach Färbung in einer Variante eines Hämocytometers, der sogenannten Neubauerkammer (Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland). Hierbei handelt es sich um eine Glaskammer mit einer definierten Tiefe und einer graduierten Unterteilung der Bodenfläche, dem sogenannten Zählnetz. Die Anzahl der gezählten Zellen erlaubt so, unter Bezug auf das bekannte Kammer-volumen (Kammerfaktor) und den Verdünnungsfaktor der Probe, die Bestimmung der Zellzahl pro Volumeneinheit (ml) (Schmitz, 2007).

Zur Durchführung der Färbung und Zählung wurde zunächst die mit 70%igem Alkohol gereinigte Neubauerkammer angehaucht und mit einem Deckglas bedeckt, so dass zwischen Deckglas und Auflageflächen an den Seiten feine farbige Ringe (Newtonsche Ringe) entstanden. Zwischen Deckglas und Zählnetz entstand so ein feiner Spalt. Dann wurden $10 \mu\text{l}$ der Zellsuspension (in PBS oder Zellkulturmedium) mit $10 \mu\text{l}$ Trypanblau-Lösung (0,4% Trypanblau, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) gemischt und gut resuspendiert. Anschließend wurden $10 \mu\text{l}$ der Suspension in den Spalt unter das Deckglas gegeben, so dass unter Kapillarwirkung ein gleichmäßiger Film über dem Zählnetz entstand. Die Zellen wurden nun nach folgendem Schema unter dem Mikroskop (4x zur Orientierung, 40x zum Zählen) ausgezählt:

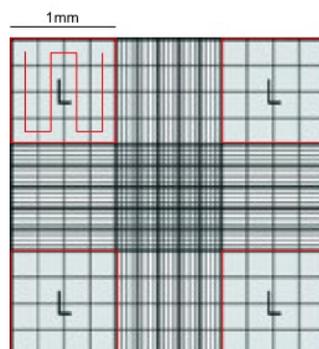


Abbildung 3-1 Graphische Darstellung der Zellzählung.

Gezählt wurden die vier rot markierten Quadrate jeweils nach dem links oben dargestellten Ablauf. (modifiziert nach Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland)

Die vier rot markierten Quadrate wurden nach dem links oben exemplarisch dargestellten Schema ausgezählt. Die Zellzahl wurde dann nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 2 \times 10^4$$

Dabei stellt 2 den Verdünnungsfaktor nach vorheriger Verdünnung mit Trypanblau dar und 10^4 den Kammerfaktor (Umrechnung vom Einschlußvolumen auf 1ml).

Hierbei ergaben sich Zellausbeuten von 500.000 bis zu 900.000 Zellen aus jeweils zwei Versuchstieren zu den für die einzelnen Versuche genannten Zeitpunkten der Zellernte.

3.3.2 Zellpassage

Kommt es zu nahezu 100%iger Konfluenz der Zellen in ihrem Zellkulturgefäß, erleichtert durch Mechanismen wie z.B. direkter Zell-Zell-Kontakt und parakrine Stimulation/Inhibition, deren Proliferation. Sind jedoch größere Zellzahlen für die Versuche von Nöten oder möchte man die Zellen nur in Kultur halten, können die Zellen von ihrem Zellkulturgefäß gelöst werden, in Medium resuspendiert und wieder in neuen Zellkulturgefäßen auf größerer Fläche ausgesät werden. Diesen Vorgang versteht man unter Zellpassage, welcher folgendermaßen durchgeführt wurde:

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 500µl (6-well Zellkulturplatte) 0,05% Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mechanisch (vorsichtiges Klopfen) von der Kulturplatte gelöst, in Medium aufgenommen und in ein steriles 50ml Reaktionsgefäß (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, New Jersey, USA) überführt. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute (Zentrifuge siehe Dichtegradientenzentrifugation) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in neuem Medium resuspendiert, Vitalität und Zellzahl (siehe Bestimmung der Vitalität und Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung) bestimmt und schließlich in neue Zellkulturgefäße überführt.

3.4 Stimulantien und Inhibitoren

3.4.1 Platelet-derived growth factor (PDGF)

Der verwendete Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) lag bei Lieferung als lyophilisiertes Pulver vor. Die Gesamtmenge betrug 50µg. Daraus wurde zunächst eine Stammlösung mit sterilem PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) hergestellt. Die Endkonzentration der Stammlösung betrug 25µg in 100µl. Zur Vermeidung von rezidivierenden Auftauprozessen und damit zusammenhängendem Proteinverlust wurde die Stammlösung in Aliquots abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Vor Gebrauch wurden die Aliquots erneut 1:10 mit PBS verdünnt, um, bei den ansonsten sehr geringen Volumina, einem Fehler beim Pipettieren vorzubeugen. Die Endkonzentration des schließlich verwendeten PDGF-BB lag somit bei 25ng/µl.

Die eingesetzten Volumina wurden für die einzelnen Experimente in Zellkulturmedium verdünnt. Die Konzentration hing dabei vom jeweiligen Versuch ab und wird in den entsprechenden Kapiteln beschrieben. Zum Einsatz der entsprechenden Volumina für die verschiedenen Endkonzentrationen siehe Tabelle 3-4. Alle Schritte während der Bearbeitung von PDGF-BB und die konsekutiven Zellkulturversuche wurden unter sterilen Kautelen unter einer Sicherheitswerkbank für Zellkultur durchgeführt.

PDGF-BB		
Einsatz von 25ng/µl Stammlösung für entsprechende Konzentration		
Volumen Stammlösung in µl	Volumen Medium in µl	Endkonzentration in ng/ml
0,4	1	10
1	1	25

Tabelle 3-4 Pipettierschema zur Herstellung der PDGF-BB Konzentrationen aus der hergestellten Stammlösung

3.4.2 Imatinib-Mesylate

Imatinib Mesylate wurde uns von der Novartis International AG zur Verfügung gestellt. Die Lagerung des lyophilisierten Pulvers erfolgte lichtgeschützt bei 4°C. Die molekulare Masse von Imatinib Mesylate beträgt $M=589,7\text{g/mol}$. Zur Verwendung des Medikamentes in den Zellkulturversuchen erfolgte die Herstellung von 50ml einer 1mM Stammlösung unter Zuhilfenahme folgender Formel:

$$m = c * M * V$$

Dabei ist \underline{m} die einzuwiegende Masse von Imatinib Mesylate, \underline{c} die Stoffmengenkonzentration der endgültigen Lösung, \underline{M} die molare Masse von Imatinib Mesylate und \underline{V} das angestrebte Volumen der Lösung. Umgesetzt bedeutete dies:

$$m = 10^{-3} \text{ mol/l} * 589,7 \text{ g/mol} * 0,05\text{l} = 0,029485 \text{ g}$$

Aufgrund des niedrigen Gewichtes erfolgte das Abwiegen auf einer von allen Seiten geschlossenen Feinwaage mit vier Nachkommastellen. Das endgültig eingewogene Imatinib Mesylate betrug somit 0,0295 g. Dieses wurde im Anschluss mit 50ml sterilem, destilliertem Wasser (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) langsam auf einem Vortex-Mixer (IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) gelöst und anschließend bei 4°C gelagert. Die eingesetzten Volumina wurden schließlich für die einzelnen Experimente in Zellkulturmedium verdünnt. Die Konzentration hing dabei vom jeweiligen Versuch ab und wird in den entsprechenden Kapiteln beschrieben. Zum Einsatz der entsprechenden Volumina für die verschiedenen Endkonzentrationen siehe Tabelle 3-5. Alle Schritte während der Bearbeitung von Imatinib Mesylate und die konsekutiven Zellkulturversuche wurden unter sterilen Kautelen unter einer Sicherheitswerkbank für Zellkultur durchgeführt.

Imatinib mesylate		
Einsatz von 1mM Stammlösung für entsprechende Konzentration		
Volumen Stammlösung in μl	Volumen Medium in μl	Endkonzentration in μM
0,1	1	0,1
1	1	1
7	1	7
10	1	10
100	1	100

Tabelle 3-5 Pipettierschema zur Herstellung der Imatinib mesylate Konzentrationen aus der hergestellten Stammlösung

3.5 Western Blot

3.5.1 Versuchsaufbau

Aufgrund der Vielzahl der Experimente, bei denen der Western Blot zum Einsatz kam, soll hier der Versuchsaufbau der einzelnen Experimente kurz beschrieben werden.

Für alle Versuche wurden die Zellen bei 90 - 100% Konfluenz einmalig passagiert, gezählt und zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät. Bei etwa 80 - 90% Kon-

fluenz (zumeist nach zwei Tagen) wurde das Medium auf serumfreies Medium gewechselt und für 24 Stunden belassen. Serumfreies Medium bedeutet, dass kein Fetales Kälberserum (FKS) enthalten war, die Aminosäuren und Antibiotika jedoch so belassen wurden. Im Anschluss wurden in neuem serumfreiem Medium die Stimulantien und Inhibitoren in ihrer entsprechenden Konzentration hinzugefügt und entsprechend der einzelnen Experimente inkubiert. Die Behandlungen wurden durch Waschen mit kaltem PBS und anschließender Zugabe von Lysepuffer (siehe 3.5.2.1) gestoppt.

3.5.1.1 Dosisfindung PDGF-BB

Um herauszufinden bei welcher Konzentration PDGF-BB, unter den vorhandenen Versuchsbedingungen, seine größte Wirkung erzielt, wurden zwei verschiedene Konzentrationen verwendet (10ng/ml und 25ng/ml). Als Kontrolle wurde ein Well nicht stimuliert. Die Stimulationszeit betrug 5 Minuten. Die Wahl dieser Konzentrationen und der Zeit beruhte auf verschiedenen Literaturangaben, bei denen PDGF-BB verwendet wurde (Hu et al., 2007; Jaster et al., 2002). Zur Bestimmung der Wirkung PDGF-BB wurde im Western Blot eine Untersuchung auf pPDGFR-beta Tyr751, pERK 1/2, und pAKT Ser 473 durchgeführt und deren Expression im Vergleich zu Actin (Beladungskontrolle) ermittelt.

3.5.1.2 Stimulationszeit PDGF-BB

Die in der Dosisfindung festgelegte Konzentration an PDGF-BB (25ng/ml) wurde den Zellen zugefügt und jeweils für 2, 5, 10, 15 und 30 Minuten bei 37°C im Zellkulturschrank inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Well nicht stimuliert.

Zur Bestimmung der zeitlichen Wirkung des PDGF-B wurde im Western Blot eine Untersuchung auf pPDGFR-beta Tyr751, pERK 1/2, und pAKT Ser 473 durchgeführt und deren Expression im Vergleich zu Actin (Beladungskontrolle) ermittelt.

3.5.1.3 Imatinib mesylate

Zunächst wurden die Zellen für 4 Stunden mit Imatinib mesylate (0,1µM, 1µM, 10µM, 20µM) in serumfreiem Medium inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Well nicht behandelt. Ein Well wurde ebenfalls ausgelassen, um im nächsten Schritt nur mit PDGF-BB behandelt zu werden. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von PDGF-BB (25ng/ml,

5 Minuten) in alle Wells außer der Kontrolle. Zur Bestimmung der Wirksamkeit der Behandlung wurde im Western Blot eine Untersuchung auf pPDGFR-beta Tyr751, pERK 1/2, und pAKT Ser 473 durchgeführt und deren Expression im Vergleich zu Actin (Beladungskontrolle) ermittelt.

3.5.1.4 Nachweis von Kollagen Typ I

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit PDGF-BB 25ng/ml, 7 μ M Imatinib mesylate, 7 μ M Imatinib mesylate plus PDGF-BB 25ng/ml oder ohne Zugabe von Stimulantien/Inhibitoren (Kontrolle) behandelt. Nach 12 Stunden wurde das Medium unter gleichen Bedingungen gewechselt. Zur Bestimmung des Effektes auf die Kollagenproduktion wurde im Western Blot die Expression von Kollagen Typ I im Vergleich zu Actin (Beladungskontrolle) untersucht.

3.5.1.5 Bestimmung von Apoptose

Die Zellen wurden für 48 Stunden mit PDGF-BB 25ng/ml, 7 μ M Imatinib mesylate plus PDGF-BB 25ng/ml, 10 μ M Imatinib mesylate plus PDGF-BB 25ng/ml, 20 μ M Imatinib mesylate plus PDGF-BB 25ng/ml, Cisplatin 100 μ M (Positivkontrolle) oder ohne Zugabe von Stimulantien/Inhibitoren (Negativkontrolle) behandelt. Nach 12 Stunden wurde das Medium unter gleichen Bedingungen gewechselt. Die Bestimmung der Apoptoseinduktion durch die Behandlungen erfolgte im Western Blot durch Darstellung der Spaltung, und damit Aktivierung, von Caspase-3 in ein 35 kDa Fragment (vollständige Länge) und das große Spaltprodukt p17 (17kDa).

3.5.2 Proteinisolation

3.5.2.1 Herstellung des Lysepuffers

Für die Lyse der Zellen und konsekutive Proteinernte erfolgte die Herstellung eines Lysepuffers. Hierzu wurde zunächst ein Basispuffer mit destilliertem Wasser, HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) und Natriumchlorid (NaCl) hergestellt, der im Anschluss auf einen pH von 7,4 eingestellt wurde. Dieser Grundlösung wurden dann Triton-X-100, Natriumfluorid, Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Glycerol zugegeben. Die fertige Lösung wurde dann bei 4°C gelagert.

Aufgrund ihrer Instabilität erfolgte die Zugabe der einzelnen Proteaseinhibitoren erst kurz vor Beginn der Zellyse. Der fertige Lysepuffer wurde dann auf Eis gelagert und für nicht mehr als 4 Stunden verwendet. Eine genaue Auflistung der Mengen und Hersteller für die einzelnen Substanzen befindet sich in folgender Tabelle 3-6).

Basispuffer (Mengenangaben für einen Liter)		
Reagenzien	Menge	Hersteller
HEPES	11,91g	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	8,77g	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Triton X-100	1%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	50mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	2mM	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Glycerol	10%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zugaben zum Basispuffer vor Lyse		
Reagenzien	Menge	Hersteller
Benzamidin	1%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumorthovanadat	1%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMSF	1%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Leupeptin	0,1%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aprotinin	0,2%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 3-6 Zusammensetzung Lysepuffer

3.5.2.2 Chemische Zellyse

Die Zellen wurden bei etwa 90% Konfluenz nach maximal zwei Passagen geerntet. Hierzu erfolgte zunächst das Absaugen des Zellkulturmediums. Daran anschließend wurde ein Waschschritt mit Phosphat-buffered saline (PBS), das zuvor bei 4°C aufbewahrt und während der gesamten Prozedur auf Eis gelagert wurde, durchgeführt. Das PBS wurde dann ebenfalls vollständig abgesaugt. Daraufhin wurden in jedes Well 50µl eines selbst angesetzten Lysepuffers (siehe Tabelle 3-6) gegeben, mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gelöst und anschließend in 1,5ml Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Für

jede Probe wurden zu Erhöhung der Proteinausbeute jeweils 2 Wells einer 6-Well-Platte zusammengeführt.

3.5.2.3 Physikalische Zellyse

In einem weiteren Schritt wurde die chemische Zellyse noch um einen physikalischen Schritt, mittels Ultraschallwellen, ergänzt. Hierzu wurde ein Ultraschallgerät (Sonopuls HD 2070, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) mit einer dünnen Spitze direkt in die Gefäße mit den 100µl großen Proben aus der chemischen Zellyse eingebracht und für 5 Sekunden mit 25%iger Leistung des Gerätes beschallt.

Schließlich wurden die Proben für 10 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert (5415R, Eppendorf, Hamburg Deutschland). Am Boden der Gefäße bestand nun ein Pellet aus Zellresten. Der proteinreiche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte nun direkt weiter verwendet oder, eingefroren bei -20°C, gelagert werden.

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Sicherstellung von gleichen Mengen für den Proteineinsatz im Western Blot erfolgte aus den Zellysaten eine Proteinbestimmung. Hierzu wurde das BCA-Assay-Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine von Smith et al. beschriebene Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Farbumschlagmethode. Im ersten Schritt dieser Methode kommt es durch das Vorliegen von Proteinen in einer alkalischen Lösung zu einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} . Die Proteine bilden dann einen Chelatkomplex mit Kupfer und es kommt zu einem bläulichen Farbumschlag. Diese Reaktion wird Biuret-Reaktion bezeichnet. Das bläuliche Produkt absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 540nm und kann bereits zur Proteinquantifizierung genutzt werden. Hierzu werden jedoch große Mengen an Protein benötigt, so dass in einem zweiten Schritt Bicinchoninsäure (BCA) verwendet wird um die Sensitivität der Methode zu erhöhen. BCA bildet einen Komplex mit dem in Schritt 1 entstandenen Cu^{1+} , so dass ein violetter Farbumschlag entsteht, der zwischen 550 und 570nm gemessen werden kann (siehe Abbildung 3-2). Für die durchgeführten Versuche wurde eine Wellenlänge von 562nm verwendet, da es hierbei zur stärksten linearen Absorption kommt, die proportional zur Proteinkonzent-

ration ist (Smith et al., 1985). Durch Verwendung der BCA-Reaktion besteht eine etwa 100-fach höhere Sensitivität als in der Biuret-Reaktion, so dass die eingesetzte Proteinmenge reduziert werden konnte.

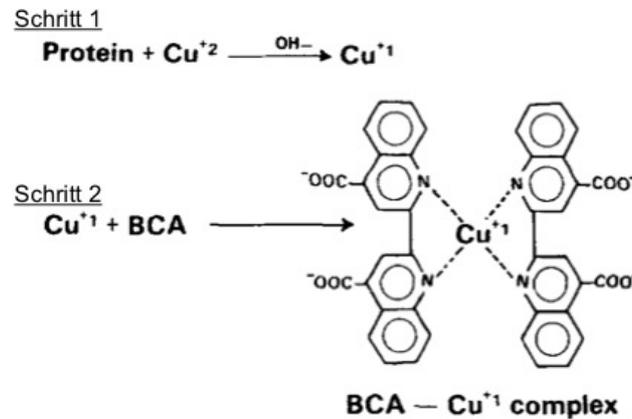


Abbildung 3-2 Darstellung BCA-Reaktion

Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Chelatkomplexbildung mit Proteinen in alkalischer Lösung und konsekutivem bläulichen Farbumschlag (Biuret-Reaktion, Schritt 1) sowie der Komplexbildung von Cu¹⁺ mit BCA (Schritt 2), was einen violetten Farbumschlag bewirkt, modifiziert nach (Smith et al., 1985).

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurden vom Hersteller zwei Reagenzien geliefert (Reagenz A und Reagenz B), die in einem Verhältnis von 50(A):1(B) zunächst ineinander gegeben und dann kurz auf einem Vortexgerät gemischt wurden. Als nächstes erfolgte die Vorbereitung einer 96-Well-Platte (NuncTM, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) mit jeweils 10µl Volumen pro Well. Zunächst wurde eine Standardreihe nach folgendem Muster pipettiert:

Standartreihe BCA-Assay-Kit		
BSA (2mg/ml) in µl	H2O dest. in µl	Konzentration in µg/ml
0	10	0
2,5	7,5	500
5	5	1000
7,5	2,5	1500
10	0	2000
BSA = bovine serum albumin H2O dest. = destilliertes Wasser		

Tabelle 3-7 Pipettierschema für die BSA-Standardreihe im BCA-Assay

Im Anschluss wurden die Zelllysate in einem Verhältnis von 1:1 mit destilliertem Wasser pipettiert (5µl H2O / 5µl Lysat). Alle Proben (Standard und Lysate) wurden in Doppelbestimmungen pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200µl des Gemisches

aus Reagenz A und B. Die so präparierte 96-Well-Platte wurde abgedeckt und für 30 Minuten bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Schließlich konnte die eigentliche Proteinbestimmung durchgeführt werden. Hierzu wurde der Deckel abgenommen und die Platte in einem Mikroplattenlesegerät (Elx808, Absorbance Microplate Reader, Bio Tek Instruments Inc., VT, USA) ausgelesen. Zur Analyse der Daten wurde das Programm KC4 Kinocalc for Windows Version 3.4 (Bio Tek Instruments Inc., VT, USA) verwendet. Dazu erfolgte zunächst die Eingabe des Layouts auf der Platte, der Verdünnungen und des Standards. Dann wurde die Platte im Lesegerät für 3 Sekunden geschüttelt, um die Lösungen in den Wells möglichst homogen zu machen. Schließlich erfolgte die Auslesung bei 562nm.

Aus den jeweiligen Doppelbestimmungen wurden durch das Programm bereits eine Standardkurve und ein Mittelwert für die Proteinkonzentration der einzelnen Proben errechnet. Die Ausgabe der Proteinkonzentration war als µg/ml angegeben.

3.5.4 Probenvorbereitung

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration konnten die Proben für die Gel-Elektrophorese vorbereitet werden. Hierzu erfolgte, in Abhängigkeit von der Proteinausbeute, der Einsatz von immer der gleichen Menge Protein pro Probe (z.B. 20µg) in ein 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die Proteinlösung wurde dann mit Laemmli-Puffer in einem Verhältnis von 1 (Laemmli) : 5 (Protein) verdünnt, so dass schließlich eine einfache Konzentration der fünffach konzentrierten Grundlösung des Laemmli-Puffers vorlag. Die Zusammensetzung des Laemmli-Puffers ist in Tabelle 3-8 einzusehen.

Der Laemmli-Puffer dient dazu die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine aufzubrechen, um so möglichst nur die Primärstruktur vorliegen zu haben. Dadurch wird die Detektierbarkeit der Proteine deutlich erhöht. SDS bewirkt eine Denaturierung der Proteine und schafft eine negative Gesamtladung, so dass eine Trennung nach Größe ermöglicht wird. DTT (Dithiothreitol) dient zur Aufspaltung der Disulfidbrücken. Das Glycerol hat die Aufgabe, die Dichte des Gemisches zu erhöhen und so eine leichtere Eingabe in die einzelnen Geltaschen zu ermöglichen. Bromphenolblau läuft während der Elektrophorese vor den Proteinen und dient lediglich als optische Markierung (Laemmli, 1970).

Die Lösung aus Laemmli-Puffer und Proteinprobe wurde schließlich für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock in einem abschließenden Denaturierungsschritt erhitzt und dann bis zur Verwendung in der Elektrophorese auf Eis gestellt.

Laemmli-Puffer (5x)			
Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Trisbase	1,5g	250mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DTT (Dithiothreitol)	3,86g	0,5M	
Bromphenolblau	250mg	0,50%	
Glycerol	25ml	50%	
SDS (Natriumdodecylsulfat)	5,0g	10%	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA
Auf eine Gesamtmenge von 50ml mit destilliertem Wasser auffüllen			

Tabelle 3-8 Zusammensetzung des 5-fach konzentrierten Laemmli-Puffer

3.5.5 Natriumdodecylsulfat-Polacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Bei dieser Methode werden die unter 3.5.4 vorbereiteten Proben in ein Polyacrylamidgel geladen und anschließend in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Grundlage hierfür ist, dass sich das negativ geladene SDS an die hydrophoben Regionen der Proteine anlegt und ihnen so eine stark negative Ladung verleiht, die ihre Eigenladung überlagert. Dadurch ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld lediglich von ihrem Molekulargewicht abhängig. Gleichzeitig wird mit den Proben ein Marker für den Protein-Standard (verwendet wurde: Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) während der Elektrophorese benutzt. Anhand dessen kann dann, nach Abschluss der elektrophoretischen Trennung, die entsprechende Größe der Proteine abgelesen werden.

Die Gelkammern, Gelhalterungen sowie die Elektrophoresekammer als auch das dazu passende Netzteil wurden von der Firma Bio-Rad Laboratories Inc. (CA, USA) verwendet.

3.5.5.1 Polyacrylamid-Gele

Für die Gele wurden zwei verschiedenen Basispuffer, jeweils für Sammel- und Trenngel, angesetzt. Vor der Verwendung wurde die entsprechende Menge, abhängig von der Anzahl der benötigten Gele, abgefüllt und mit APS (Ammoniumpersulfat, Bio-Rad

Laboratories, Inc., CA, USA) und Temed (Tetramethylethyldiamin, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) versetzt. Pro Gel wurden 5 ml Trenngel und 2,5 ml Sammelgel berechnet. APS und Temed dienen als Katalysatoren für die Polymerisation der beiden Moleküle Acrylamid und Bis-Acrylamid. Für das Gießen der Gele wurden 1 mm dicke Kammern mit einer Taschentiefe von 5 mm verwendet. Die Gele wurden aus zwei verschiedenen prozentigen Polyacrylamid-Mischungen hergestellt, so dass ein 5%iges Sammelgel und 10%iges Trenngel bestanden. Das Sammelgel wurde mit einer niedrigeren Konzentration gegossen, um den Eintritt der Proben in das Gel zu erleichtern. Für die Präparation wurde die eigentliche Kammer mit einem Deckglas bedeckt, dann mittels Pipette das Trenngel langsam und gleichmäßig eingegeben und im Anschluss das Sammelgel in gleicher Weise über das Trenngel geschichtet. Durch Zugabe von Glycerol in das Trenngel konnten beide Gele in flüssiger Form, ohne Vermischung, übereinander gegeben werden. Nach Zugabe des Sammelgels erfolgte ein Überschichten mit Isopropanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), um an der Oberfläche befindliche Luftblasen und konsekutive Unebenheiten im Gel zu beseitigen. Schließlich erfolgte von der oberen, offenen Seite der Gelkammer die Einlage eines Kammes in das Sammelgel zur Bildung von Geltaschen und die Gele wurden zur Aushärtung für etwa 10 bis 15 Minuten stehen gelassen. Alle verwendeten Substanzen sowie deren Konzentrationen sind in Tabelle 3-9 einzusehen.

Polyacrylamidgele		
Sammelgel (5% Gel)		
Substanz	Menge	Hersteller
Tris 1,0M, pH 6,8 (Trishydroxymethylaminomethan)	12,5ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
SDS 10% (Natriumdodecylsulfat)	1ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Destilliertes Wasser	74ml	interne Herstellung
Acrylamid 40%	12,5ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	20µl	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA
Temed (Tetramethylethyldiamin)	10µl	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA
Trenngel (10% Gel)		
Tris 1,5M, pH 8,8 (Trishydroxymethylaminomethan)	25ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
SDS 10% (Natriumdodecylsulfat)	1ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Glycerol	20ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Destilliertes Wasser	29ml	interne Herstellung
Acrylamid 40%	25ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	25µl	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA
Temed (Tetramethylethyldiamin)	12,5µl	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA

Tabelle 3-9 Zusammensetzung der Lösungen für Trenn- und Sammelgel.

3.5.5.2 Elektrophorese

Nach Aushärtung der Gele wurden diese in die Elektrophoresekammer eingelegt, so dass eine geschlossene, kleinere Kammer mit jeweils zwei Gelen bzw. einem Platzhalter in der Mitte, und eine große Kammer um die mittlere Kammer herum bestand (siehe Abbildung 3-3).

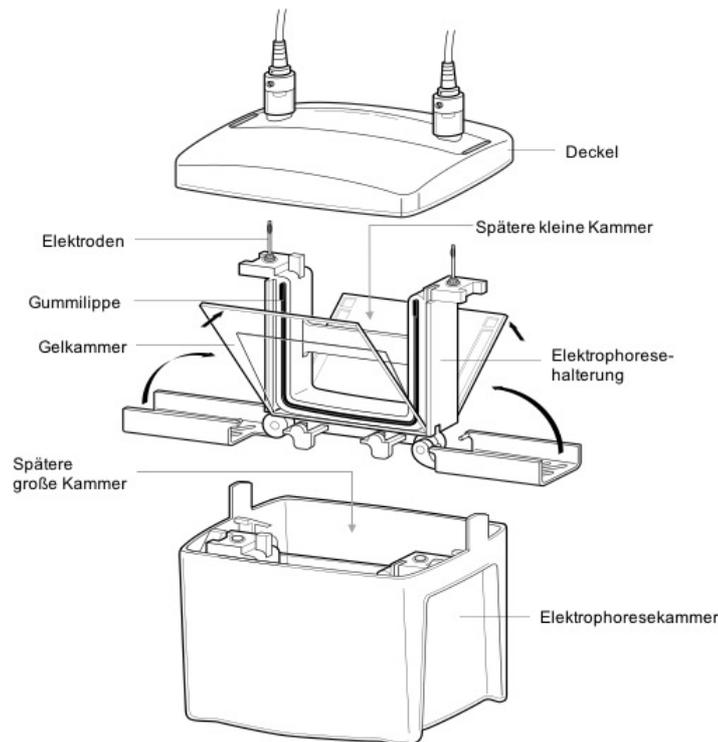


Abbildung 3-3 Zusammensetzung der Elektrophoresekammer.

Mini-Protean Tetra Cell System, modifiziert nach Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA.

Durchgeführt wurde die Elektrophorese mit Mini-Protean 3 oder Mini-Protean Tetra Cell System von Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA. Nun wurde von der inneren Kammer aus mit einfach konzentriertem Laufpuffer (siehe Tabelle 3-10) aufgefüllt bis die Gele vollständig bedeckt waren aber noch zwei getrennte Kammern bestanden. Die vorbereiteten Proben (siehe 3.5.4) und der Proteinstandard wurden dann in die Geltaschen pipettiert. Das System wurde schließlich mit einem Deckel verschlossen und über den Deckel eine Spannung angelegt. Zu Beginn wurde für 15 Minuten eine Spannung von 100V verwendet, um ein langsames, gleichmäßiges Einlaufen der Proteine zu gewährleisten, dann wurde für 1,5 Stunden auf 140V gesteigert. Zur konstanten Spannungsgeneration wurde der PowerPac (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) verwendet. Der Laufpuffer konnte nun abgegossen und die Gele aus den Gelkammern mit Hilfe eines kleinen Spartels herausgenommen werden.

Laufpuffer		
10x Konzentration (1L)		
Substanz	Menge	Hersteller
SDS (Natriumdodecylsulfat)	10g	Bio-Rad Laboratorien, Inc., CA, USA
Glycin	144g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trisbase	30,3g	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Mit destilliertem Wasser auf 1L auffüllen		
1x Laufpuffer (1L): 100ml 10x Laufpuffer + 900ml destilliertes Wasser		

Tabelle 3-10 Zusammensetzung des Laufpuffers für die SDS-PAGE

3.5.6 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose

Bei diesem Schritt wurden die in einem Gel (Polyacrylamid) befindlichen, immobilisierten, negativ geladenen Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Membran übertragen. Die verwendete Methode erfolgte nach den Arbeiten von Towbin et al. (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979).

Für die hier dargestellten Versuche wurden nur Nitrocellulosemembranen mit einer Porengröße von 0,2µm (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) verwendet.

Die fertigen Gele wurden nun, nach Abtrennung des Sammelgels samt Geltaschen, in die Western Blot Vorrichtung eingebracht (siehe Abbildung 3-4), die aus zwei verbundenen Plastikschaalen (schwarz und transparent) bestand. Diese wurden in eine Schale mit 1x konzentriertem Blotpuffer (siehe Tabelle 3-11) gelegt, dann der Reihe nach ein Schwamm (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA), zwei Filterpapiere (GE Healthcare, Buckinghamshire, England), das fertige Gel, eine Nitrocellulosemembran, zwei Filterpapiere und ein Schwamm von der schwarzen zur transparenten Seite blasenfrei aufeinander gelegt und verschlossen. Diese fertige Kammer konnte nun in eine entsprechende Haltevorrichtung mit zwei Elektroden eingebracht werden. Der elektrische Strom also die sog. Blotrichtung verlief dabei von der Kathode zur Anode. Um also bei dem beschriebenen Versuchsaufbau die Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran zu bringen, mussten die Western Blot-Kammern so eingebracht werden, dass der Strom von der schwarzen zur transparenten Seite verläuft. Hierzu bestanden bei dem verwendeten System farbliche Markierungen, um eine Verwechslung zu vermeiden. Die so vorbereitete Haltevorrichtung wurde nun in eine geschlossene Kammer eingebracht und diese mit 1x konzentriertem Blotpuffer vollständig

gefüllt. Das System wurde abschließend mit Eis gekühlt, um eine Überwärmung zu vermeiden, und mit einem Deckel verschlossen sowie eine Stromstärke von 400mA für eine Stunde angelegt. Dann konnten die Membranen aus der Vorrichtung genommen werden und zur weiteren Proteinanalyse verwendet werden.

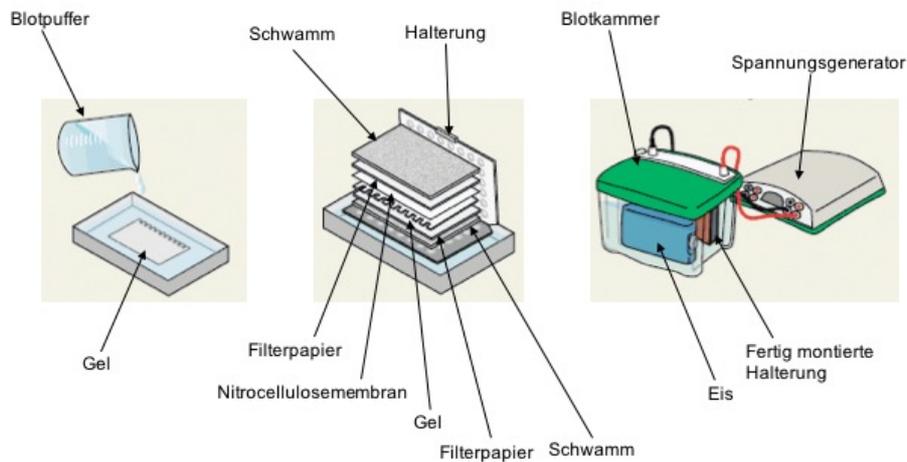


Abbildung 3-4 Vorbereitung und des Aufbaus der Blot-Kammer.
(modifiziert nach Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)

Blotpuffer		
10x Konzentration (1L)		
Substanz	Menge	Hersteller
Glycin	144g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trisbase	30,3g	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Mit destilliertem Wasser auf 1L auffüllen		
1x Blotpuffer (1L): 100ml 10x Blotpuffer + 700ml destilliertes Wasser		
Methanol	200ml	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3-11 Zusammensetzung des Blotpuffers für den Western Blot

3.5.7 Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran, wurde diese in ein 50ml Röhrchen gegeben und auf einem Laborroller für 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die Blockung diente dazu, unspezifische Bindungsstellen der an die Membran gebundenen Proteine abzusättigen. Verwendet wurde hierzu 5% Trockenmilchpulver in Tris-buffered saline und Tween 20 (TBS/T, siehe Tabelle 3-11). Bei Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) handelte sich um Polysorbat 20, ein nichtionisches Tensid, das zur weiteren Reduktion von unspezifischer Antikörperbindung beitrug.

Im Anschluss konnte die Blocklösung abgegossen werden und die Membran wurde 3x in TBS/T (siehe Zusammensetzung Waschpuffer in Tabelle 3-12) gewaschen. In einem nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper. Dieser band mit dem Fab-Fragment, also dem Teil eines Antikörpers zur entsprechenden Epitoperkennung, an das gesuchte Protein. Der Antikörper wurde in 5 ml TBS/T mit 5% Trockenmilchpulver verwendet und die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Laborroller.

Anschließend wurde die Membran 3x in TBS/T gewaschen und mit dem 2. Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der 2. Antikörper band mit seinem Fab-Fragment an das Fc-Fragment des 1. Antikörpers. An das Fc-Fragment des 2. Antikörpers war eine Peroxidase aus dem Meerrettich (HRP = horseradish peroxidase) gebunden. Die Wahl des 2. Antikörpers richtete sich nach dem Ursprung des Ersten. Wurde zum Beispiel der erste Antikörper aus der Ratte gewonnen, so musste der zweite Antikörper sich gegen Ratte richten und selber aus einem anderen Tier stammen (z.B. einer Ziege). Nach Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgte erneutes 3x Waschen mit TBS/T für jeweils 5 Minuten. Dann konnte die Entwicklung stattfinden. Hierzu wurde ein chemilumineszentes Substrat benutzt, das Wasserstoff-Peroxid beinhaltete. HRP setzte in dessen Anwesenheit Luminol um, wobei ein Anion im angeregten Zustand entsteht. Fällt dieses wieder in seinen Grundzustand zurück, wird Licht freigesetzt, das dann z.B. auf einem Röntgenfilm festgehalten werden konnte. Für die Versuche wurde als Chemilumineszenz-Substrat Roti[®]-Lumin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Roti[®]-Lumin bestand aus zwei Grundsubstanzen (Roti[®]-Lumin 1 und 2). Diese wurden im Verhältnis 1: 1 gemischt (3ml pro 50ml Röhrchen). Die Inkubation der Membran erfolgte dann für 2 Minuten, die Membran wurde aus dem Röhrchen genommen, glatt in eine Röntgenkammer gegeben und vor Licht geschützt. Je nach Belichtung erfolgte dann die Entwicklung auf Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten.

Waschlösung		
Substanz	Menge	Hersteller
10x TBS		
Trisbase	12,11g	
Natriumchlorid	87,66g	
Destilliertes Wasser	100ml	interne Herstellung
Zunächst Einstellung des pH auf 7,6 mit Salzsäure (HCl, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), dann bis 1L mit destilliertem Wasser auffüllen		
1x TBS/T		
100ml 10x TBS + 500µl Tween 20, dann auf 1L mit destilliertem Wasser auffüllen		
Polysorbat 20 (Tween 20)	500µl	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

Tabelle 3-12 Zusammensetzung und Herstellung von TBS/T.

Waschpuffer für alle Schritte im Western Blot und gleichzeitig Lösemittel für die Blocklösung mit Milchpulver.

3.5.8 Ablösen der Antikörperkomplexe von der Nitrocellulosemembran (Stripping)

Um für den gleichen Versuchslauf unterschiedliche Proteine auf derselben Membran darstellen zu können, mussten die vorherigen Antikörperkomplexe (Antikörper 1 und 2) wieder von der Membran gelöst werden. Basierend auf den Versuchen von Legocki und Verma (Legocki & Verma, 1981) wurde dazu eine sog. „Stripping-Lösung“ (siehe Tabelle 3-13) benutzt. Dabei wurde die Membran nach der fertigen Entwicklung der vorherigen Antikörper für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Im Anschluss erfolgten erneut 3x Waschschrte mit TBS/T für jeweils 5 Minuten. Dann wurde die Membran erneut geblockt und mit Antikörpern inkubiert.

Stripping-Lösung		
Substanz	Menge	Hersteller
β-Mercaptoethanol	700µl	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
SDS 10%	20µl	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA
Tris-HCL 1M, pH 6,7	6,25ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Mit destilliertem Wasser auf 100ml auffüllen		

Tabelle 3-13 Zusammensetzung und Herstellung der Stripping-Lösung

3.5.9 Beladungskontrolle

Beladungskontrollen dienen beim Western Blot dazu, auch nach Bestimmung der Proteinkonzentration, Ausrechnung der jeweils gleichen Volumina und exaktem Pi-

pettieren, eine Kontrolle der Proteinbeladung nach Abschluss aller Verfahrensschritte zu erhalten. So sollten zwischen in den einzelnen Proben vergleichbare Proteinmengen vorhanden sein, so dass daraus ein Rückschluss auf die Expression der jeweils gesuchten Proteine gezogen werden kann. In den durchgeführten Experimenten wurde Actin (Antikörper siehe 3.5.11, Tabelle 3-14) als Beladungskontrolle verwendet. Hierbei handelt es sich um ein in allen eukaryoten Zellen exprimiertes Protein, das als Zytoskelettbestandteil stabil exprimiert wird und sich so als Beladungskontrolle eignet.

3.5.10 Densitometrie

Zur Messung der jeweiligen Bandenstärke wurden die Röntgenfilme nach der Entwicklung gescannt. Die Banden wurden dann mittels dem Programm Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) gemessen und ausgewertet.

3.5.11 Antikörper

Antikörper - Western Blot		
1. Antikörper	Verdünnung	Hersteller
p-PDGFR- β Tyr 751, rabbit	1:500 in 5% Milchpulver in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
pAKT Ser 473, rabbit	1:500 in 5% Milchpulver in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
pERK 1/2 (Thr202/Tyr204), rabbit	1:1000 in 5% Milchpulver in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
Kollagen Typ 1, goat	1:500 in 5% Milchpulver in TBS/T	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Actin, goat und rabbit	1:1000 in 5% Milchpulver in TBS/T	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Caspase-3, rabbit	1:1000 in 5% Milchpulver in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
2. Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat Anti-rabbit IgG, HRP-linked	1:1000 in 5% Milchpulver in TBS/T	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
Rabbit Anti-goat, HRP-linked	1:1000 in 5% Milchpulver in TBS/T	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA

Tabelle 3-14 Verwendete Antikörper im Western Blot.

3.6 Zellfärbungen

3.6.1 Immunzytochemie

Die verwendete immunzytochemische Färbemethode basierte, ähnlich dem Nachweis der Proteine im Western Blot, auf der Zugabe eines Erstantikörpers, der die Zielstruktur erkannte. Dann folgte die Zugabe eines Zweitantikörpers, der den Erstantikörper detektierte und mit einem Molekül (in diesem Fall HRP) gekoppelt war, das, in Reaktion mit einem Substrat (in diesem Fall DAB+/Chromogen), einen braunen Farbumschlag bewirkte, der die Zielstruktur sichtbar machte.

Zur immunzytochemischen Analyse wurden die Zellen nach Isolation in eine 24-Well-Platte übertragen (5000 Zellen/Well), unter normalen Bedingungen gehalten und ohne Passage nach 2 Tagen auf Desmin und nach 3 Tagen auf α -SMA untersucht.

Für die Färbung wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und dann mit 1 ml Phosphat-buffered saline (PBS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 3x gewaschen. Anschließend erfolgte die erste Fixierung mit 500 μ l 100% Methanol pro Well für 5 Minuten. Nach erneutem dreimaligem Waschschriff mit PBS wurde die zweite Fixierung mit 500 μ l 4% PFA (Paraformaldehyd, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) pro Well für 5 Minuten durchgeführt. Dies war gefolgt von einem erneuten dreimaligen Waschen der Zellen für jeweils 2 Minuten in TBS/T (siehe Waschpuffer Western Blot, Tabelle 3-12).

Nun wurden die Zellen mit dem 1. Antikörper und der Negativkontrolle inkubiert. Die Antikörper wurden mit Antikörper-Diluent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) verdünnt. Für die Negativkontrolle wurde nur Antikörper-Diluent verwendet. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 200 μ l. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Dann erfolgten erneut drei Waschschriffe mit TBS/T für jeweils 5 Minuten und die Inkubation mit dem 2. Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit jeweils 100 μ l pro Well.

Der Zweitantikörper richtete sich, wie bereits im Kapitel Western Blot beschrieben, nach der Herkunft des Erstantikörpers und war ebenfalls an HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS/T für jeweils 5 Minuten konnte gefärbt werden. Die Färbung erfolgte über das DAB+/Chromogen-System (DAB = Diaminobenzidin, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), das, nach Reaktion mit HRP, eine braune Färbung der Zielstrukturen bildete. Das Mischungsverhältnis von DAB+ zu Chromogen betrug 50:1. Bei ausreichender Färbung wurde die Reaktion mit 1 ml destilliertem Wasser pro Well gestoppt. Das Wasser wurde ab-

gesaugt und zum Mikroskopieren PBS verwendet. Die mikroskopische Darstellung erfolgte mit dem Leica DM LB Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), ausgestattet mit einer Retiga I300 Kamera (QImaging, Surrey, BC, Canada). Die Akquisition der Bilder erfolgte mit der IPLab3-Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.6.2 Zytochemische Färbung mit Nile red

Die Nile red Färbung beruht auf der von Greenspan et al. beschriebenen Methode (Greenspan, Mayer, & Fowler, 1985) zur Darstellung von intrazellulären Lipideinschlüssen. Für die Färbung wurden die Zellen 2 Tage nach der Isolation ohne Passage und unbehandelt verwendet. In den ersten Schritten erfolgte die Herstellung einer 1,5%igen Lösung von Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) in PBS zur Fixierung der Zellen und das Ansetzen der Basislösung Nile red (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Hierzu wurden 1 mg Nile red Pulver in 1 ml Acetone (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) gelöst. Diese Lösung wurde dann lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Zur Färbung der Zellen wurden diese einmalig in PBS gewaschen und für 5 Minuten mit der 1,5%igen Glutaraldehydlösung fixiert. Dann folgten drei weitere Waschschritte für jeweils 2 Minuten in PBS. Die Nile red Lösung wurde in einer Konzentration von 10µl/1ml PBS (1:100) verdünnt, im abgedunkelten Raum auf die Zellen gegeben und für fünf Minuten inkubiert. Gestoppt wurde die Färbung durch einmaliges Waschen mit PBS. Die mikroskopische Darstellung erfolgte weiterhin im abgedunkelten Raum mit einem Fluoreszenzfilter von 546nm mit dem Leica DM LB Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), ausgestattet mit einer Retiga I300 Kamera (QImaging, Surrey, BC, Canada). Die Akquisition der Bilder erfolgte mit der IPLab3-Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.6.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Nach der ersten Passage erfolgte die Aussaat von 5000 Zellen auf Objektträgern mit Glaskammern (Nunc® Lab-Tek II Chamber Slide system™, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), diese wuchsen für 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne FKS im Serum und wurden schließlich mit PDGF-BB 25ng/ml, Imatinib mesylate 7µM, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7µM

oder ohne Behandlung für weitere 24 Stunden inkubiert. Ein Wechsel des Mediums und der Stimulantien/Inhibitoren erfolgte nach 12 Stunden. Dann wurde einmalig mit PBS gewaschen und für 5 Minuten mit -20°C kaltem Aceton fixiert. Als nächstes erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS für jeweils 5 Minuten. Dieser war gefolgt von der Inkubation mit dem 1. Antikörper mit jeweils 200µl pro Well für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für 5 Minuten wurde mit dem zweiten Antikörper für 30 Minuten inkubiert. Dieser war an einen fluoreszierenden Farbstoff (Alexa Fluor[®] 488 oder 594) gekoppelt, der unter Anregung durch Licht in der für ihn optimalen Wellenlänge (488nm oder 594nm) fluoreszierte. Eine Darstellung der verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 3-15. Nach Inkubation des Zweitantikörpers wurde erneut dreimalig für 5 Minuten mit PBS gewaschen und eine Kernfärbung mit Bisbenzimid (1:10000 in PBS, 1 Minute, Raumtemperatur, Fluoreszenzfilter 418nm) durchgeführt. Es folgten erneut zwei Waschschrift mit PBS für jeweils 5 Minuten, ein vorsichtiges Abgießen des PBS und schließlich die Zugabe von flüssigem Eindeckmedium (Fluoromount[™], Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) und die Auflage eines Deckglases.

Die mikroskopische Darstellung erfolgte im abgedunkelten Raum mit einem grünen Fluoreszenzfilter für Alexa Fluor 488 bzw. roten Fluoreszenzfilter für Alexa Fluor 594 mit dem Leica DM LB Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), ausgestattet mit einer Retiga I300 Kamera (QImaging, Surrey, BC, Canada). Die Akquisition der Bilder erfolgte mit der IPLab3-Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.6.4 Antikörper

Immuncytochemie & Immunfluoreszenz		
1. Antikörper	Verdünnung	Hersteller
alpha-Smooth-Muscle-Actin, mouse anti-rat	1:200 in Antibody Diluent*	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Desmin, mouse anti-rat	1:200 in Antibody Diluent	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Kollagen Typ I, goat anti-rat	1:50 Antibody Diluent*	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
2. Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Donkey anti-goat, Alexa Fluor 488	1:1000 Antibody Diluent*	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Donkey anti-mouse, Alexa Fluor 594	1:1000 Antibody Diluent*	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EnVision+ System-HRP labelled anti-mouse	1:1000 Antibody Diluent*	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
EnVision+ System-HRP labelled anti-rabbit	1:1000 Antibody Diluent*	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
* Dako Real Antibody Diluent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)		

Tabelle 3-15 Verwendete Antikörper in der Immunzytochemie und Immunfluoreszenz.

3.7 Thiozolylblau (MTT) Assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Thiozolylblau) ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz mit gelblicher Färbung. Es wird bei *in vitro* Versuchen dazu verwendet, metabolische Aktivität von Zellen zu detektieren und eignet sich dadurch zur Erkennung von Proliferation, Lebendigkeit und Zytotoxizität. Die mitochondriale Reduktion des gelben MTT zu lila-farbenem Formazan findet nur in metabolisch aktiven Zellen statt, so dass proportional zu dem entsprechenden Farbumschlag auf die Zellproliferation rückgeschlossen werden kann (Mosmann, 1983). Für den MTT-Assay wurden die Zellen für fünf Tage kultiviert, dann passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen ausgesät (30.000 Zellen/Well) und für einen Tag unter normalen Kulturbedingungen gehalten. Die Zellkulturplatten wurden dabei so bestückt, dass für den geplanten MTT-Assay jeweils Doppelbestimmungen möglich waren. Am Folgetag wurde kontrolliert, ob die Zellen gut angewachsen waren und das Zellkulturmedium wurde gegen ein serumfreies Medium ausgetauscht. Das bedeutet, dass dem Medium kein fetales Kälberserum (FKS) zugefügt wurde, um die Zellen in einen sogenannten „Serum-Hunger“ zu versetzen und so den Einfluss der im Serum vorhandenen Wachstumsfaktoren zu verhindern. So war der jeweilige Effekt der Stimulatoren oder Inhibitoren für die Proliferation weniger durch Störfaktoren beeinflusst

und lässt sich besser abbilden. Die Zellen wurden im serumfreien-Medium für weitere 24 Stunden gehalten. Das Zellkulturmedium enthielt kein Phenolrot, da dies mit MTT reagiert und so keine validen Ergebnisse entstehen würden.

An Tag 0 wurden 2 Wells ohne Stimulation für den Basiswert bestimmt, dieser diente als Kontrolle für die Entwicklung der Zellen unter Behandlung. Nach Bestimmung des Basiswertes wurde in die einzelnen Wells 25ng/ml PDGF-BB, 10 μ M Imatinib mesylate und PDGF-BB (25ng/ml) plus Imatinib mesylate 10 μ M hinzugegeben und jede Probe zum Zeitpunkt 72 Stunden mittels MTT-Assay abgelesen.

Der MTT-Assay wurde folgendermaßen durchgeführt:

Zunächst wurde eine Basislösung MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) mit einer Konzentration von 500 μ g/ml in PBS hergestellt und vor Licht geschützt. Nach 72 Stunden wurden 20 μ l (10 μ g) der MTT-Basislösung pro Well hinzugefügt, gut per Hand geschüttelt und für 2 Stunden bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Das Medium wurde dann abgesaugt und zur Darstellung des Farbumschlages 220 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) pro Well hinzugefügt. Dies wurde für 3 Minuten bei 37°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Währenddessen wurde eine 96-Well-Platte vorbereitet und 100 μ l DMSO als Leerkontrolle in Doppelbestimmungen verwendet. Die fertig inkubierten Proben wurden nun in Doppelbestimmungen mit jeweils 100 μ l pro Well ebenfalls in die 96-Well-Platte pipettiert. Am Mikroplatten-Lesegerät (Elx808, Absorbance Microplate Reader, Bio Tek Instruments Inc., VT, USA) wurde die Aufteilung der Proben eingegeben und mit einem 570nm Filter ausgelesen. Zur Analyse der Daten wurde das Programm KC4 Kinexcel for Windows Version 3.4 (Bio Tek Instruments Inc., VT, USA) verwendet. Aus den Daten konnte nun in Microsoft Excel der Mittelwert und die Standardabweichung aus den jeweiligen Doppelbestimmungen, zunächst der einzelnen Proben (Proliferation eines jeden Wells wurde doppelt bestimmt) und für die jeweils gleich behandelten Proben (jeweils zwei Wells auf der 24-Well-Platte wurden gleich behandelt) berechnet werden. Die Werte für die behandelten Proben wurden in Relation zum Basiswert an Tag 0 gesetzt, um so einen Rückschluss auf die Proliferation oder dessen Inhibition der Zellen durch die Behandlung zu erhalten.

3.8 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

3.8.1 Versuchsablauf

Die Methode beruht auf den 1971 unabhängig voneinander entwickelten Verfahren durch Engvall und Perlmann sowie van Weemen und Schuurs (Engvall & Perlmann, 1971; van Weemen & Schuurs, 1971).

In den vorliegenden Versuchen wurde ein indirekter ELISA, entsprechend Abbildung 3-5, verwendet.

Indirekt bedeutete hier, dass der Nachweis des Antigens nicht direkt durch einen Antikörper geschah sondern ein erster Antikörper das Antigen erkannte und zur Darstellung ein zweiter Antikörper verwendet wurde, der den Ersten erkannte. Der zweite Antikörper war in diesem Fall an HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt und konnte mit Hilfe von Tetramethylbenzidin (TMB) sichtbar gemacht werden.

Die Zellen wurden nach der ersten Passage in 12-Well-Platten zu gleichen Teilen (50.000 Zellen pro Well) ausgesät und unter unveränderten Kulturbedingungen bis zu etwa 90% Konfluenz gehalten. Dann wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium mit Zusatz von 50µg/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) gehalten. Im Anschluss erfolgte ein Wechsel des serumfreien Mediums mit Zugabe von PBS für die Kontrolle oder 25ng/ml PDGF-B, 7µM Imatinib mesylate plus 25ng/ml PDGF-B, 10µM Imatinib mesylate plus 25ng/ml PDGF-B, 20µM Imatinib mesylate plus 25ng/ml PDGF-B für die behandelten Zellen. Ein Wechsel der Medien mit gleichen Bedingungen erfolgte nach 12 Stunden. Das abgenommene Medium wurde gesammelt und bei 4°C gelagert.

Die Behandlung der Zellen wurde nach 24 Stunden beendet. Dazu wurden die Überstände erneut eingesammelt, mit den vorherigen zusammengeführt und 1:4 mit PBS verdünnt. Nach gründlichem Mischen wurden davon 50µl pro Well verwendet, um eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorp, Nunc, Langensbold, Deutschland) zu beschichten. Diesen Vorgang versteht man unter Adsorption des Antigens an einen Feststoff, in diesem Fall die Mikrotiterplatte. Die Inkubationszeit betrug 12 Stunden bei 4°C. Im Anschluss wurden die Wells mit 5% Trockenmilchpulver in TBS/T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um ungesättigte Proteinbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte zu blocken. Dann erfolgte ein dreimaliger Waschschrift für 5 Minuten mit TBS/T und die anschließende Inkubation mit dem 1. Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Es folgte ein erneutes Waschen wie im Schritt zuvor, um ungebundene Antigen-Antikörper-Komplexe abzuwaschen und dann die Inkubation

mit dem HRP-gekoppelten 2. Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3-16 einzusehen.

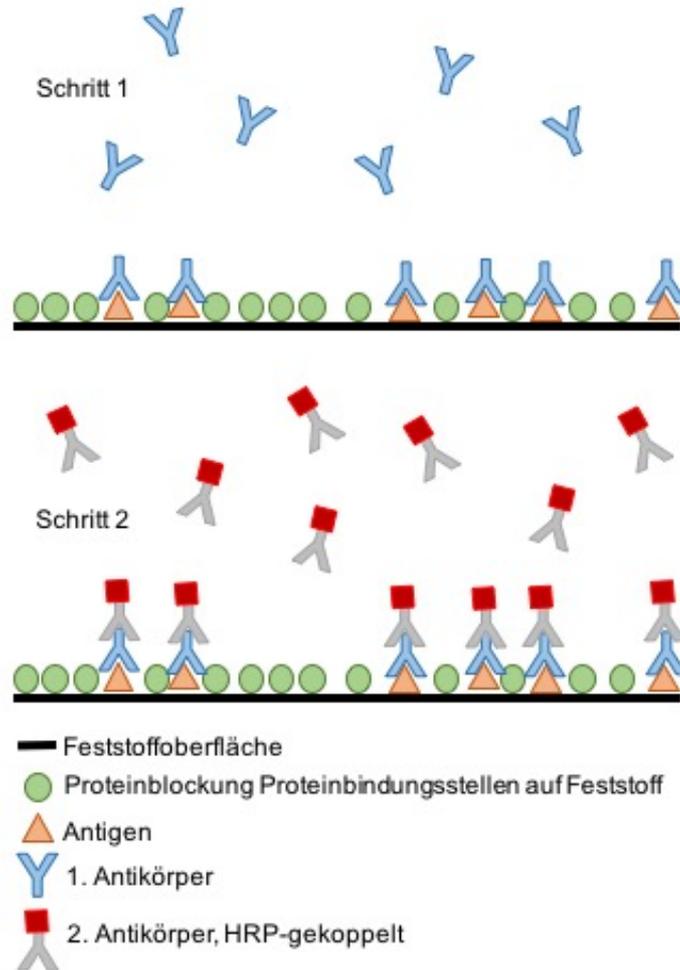


Abbildung 3-5 Schematische Darstellung eines indirekten ELISA.

Zunächst werden die Wells mit dem gesuchten Antigen und dessen Begleitprotein inkubiert, dann erfolgt eine Blockung der übrigen Proteinbindungsstellen des Feststoffes (Blockung und Begleitprotein: grüne Kreise), schließlich wird der 1. Antikörper gegen das Antigen hinzugegeben. In einem zweiten Schritt erfolgt die Zugabe des HRP-gekoppelten 2. Antikörpers und die Entwicklung mittels TMB. Das Ergebnis kann dann an einem Mikroplattenlesegerät abgelesen werden, modifiziert nach (Rehm, 2002).

Schließlich erfolgte ein erneuter Waschschrift wie zuvor und die Zugabe von 100µl pro Well des Substrates TMB (TMB Plus, Kementec, Taestrup, Dänemark). Die Mikrotiterplatten wurden während der Entwicklung vor Licht geschützt. In Abhängigkeit der Konzentration des Antigens kam es zu einem blauen Farbumschlag. Die enzymatische Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 0,2 N Schwefelsäure (H₂SO₄, 50µl pro Well) gestoppt und in einem Mikroplattenlesegerät (Elx808, Absorbance Microplate Reader, Bio Tek Instruments Inc., VT, USA) mit einem 540nm Filter ausgelesen. Zur Analyse der Daten wurde das Programm KC4 Kinecal

for Windows Version 3.4 (Bio Tek Instruments Inc., VT, USA) verwendet. Alle Proben wurden als Triplett bestimmt, ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

3.8.2 Antikörper

Antikörper - ELISA		
1. Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kollagen Typ I	1:500 in 5% Milchpulver in TBS/T	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
2. Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Rabbit Anti-goat, HRP-linked	1:1000 in 5% Milchpulver in TBS/T	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA

Tabelle 3-16 Verwendete Antikörper im ELISA

3.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In allen Zellen, die einen Zellkern enthalten, liegen in diesem die Chromosomen. Diese hochkomplexen Moleküle bestehen zum größten Teil aus der doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA), die mit den vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin die einzelnen Gene kodieren. Bei der Expression der Gene werden diese durch einen komplexen Apparat aus Enzymen abgelesen und schließlich in Ribonukleinsäure (RNA) umgeschrieben. Diesen Vorgang nennt man Transkription. Die RNA besteht zum größten Teil aus mRNA (m = messenger RNA), die für die einzelnen Proteine kodiert. Darin wird die Base Thymin durch Uracil ersetzt. Ebenso wird die komplexe Struktur aufgehoben und es entsteht ein einzelner Strang, der schließlich über die Ribosomen abgelesen und in Proteine umgeschrieben wird. Diesen Vorgang versteht man unter Translation.

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein zentrales Verfahren, sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der medizinischen Diagnostik. Bei dieser Methode durch Kary B. Mullis (Saiki et al., 1985) entwickelten Methode können innerhalb von kurzer Zeit millionenfach Kopien eines bestimmten DNA-Abschnittes erstellt werden. Hierzu nutzt man für die Zielstruktur spezifische Oligonukleotidsequenzen (Primer), die in der Reaktion als Vorwärts- und Rückwärts-Primer vorliegen, so dass der DNA-Strang in beide Richtungen abgelesen werden kann. Nach Bindung der Primer an ihre Zielsequenzen synthetisiert das Enzym Taq-DNA-Polymerase den Komplementärstrang dazu aus, wozu Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dNTPs) benötigt

werden. Die Taq-Polymerase ist ein Enzym aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* (daher Taq), die ihr Aktivitätsoptimum bei 72°C besitzt. Die PCR basiert auf drei wesentlichen Schritten in einem sich wiederholenden Zyklus:

Im ersten Schritt (*Denaturierung*) wird die DNA-Probe zur linearen Auftrennung der Doppelstränge auf 95°C erhitzt. Im zweiten Schritt (*Annealing*) wird die Probe auf die optimale Arbeitstemperatur für die Primer (z.B. 60°C) abgekühlt, so dass sich die Primer an die komplementäre DNA anlagern. Im dritten Schritt (*Elongation*) werden die Proben auf die optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase von 72°C erhitzt, so dass diese nun durch Einbau der dNTPs die Primer bis zum 5'OH-Ende der DNA verlängert. Somit ist eine exakte Kopie der Zielsequenz entstanden. Wiederholt man diesen Zyklus, entstehen mit jedem Zyklus (n) theoretisch 2^{n-1} Kopien. In der Praxis ist der durchschnittliche Kopierfaktor jedoch sehr variabel und liegt bei ca. 1,6 pro Zyklus.

Mittels der quantitativen Polymerase Kettenreaktion (qPCR) kann man die Expression der einzelnen Gene messen. Dazu wird zunächst mRNA aus den Zellen isoliert und diese dann in eine Komplementär-DNA (cDNA, c = complementary) umgeschrieben. Durch das Umschreiben von mRNA in cDNA erhält man einen zur mRNA komplementären Strang, also einen Strang, der von der Basenabfolge dem ursprünglichen DNA-Strang und somit den gesuchten Genen gleicht. Die Umschreibung von mRNA in cDNA bezeichnet man als Reverse Transkription. Man nutzt hierfür das Enzym Reverse Transkriptase. Schließlich wird das gesuchte Gen durch Amplifikation nach dem oben beschriebenen PCR-Prinzip vervielfacht. Die Quantifizierung der Expression ergibt sich daraus, dass mit der umgeschriebenen RNA nur die, unter den entsprechenden Versuchsbedingungen, tatsächlich exprimierten Gene analysiert werden. Bei der qPCR wird der Reaktion ein fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben, der an die neu entstandenen Sequenzen bindet und jeweils am Ende der Elongation Licht freisetzt. Durch die Intensität des Farbstoffes kann ein dazu proportionaler Rückschluss auf die Menge der entstandenen Kopien gezogen werden. Ist ein Gen also stark exprimiert, entsteht ein stärkeres Signal, es liegen somit mehr Kopien vor. Gemessen wird bei diesem Prinzip jeweils am Ende einer jeden Elongation.

Aufgrund der unterschiedlichen Effizienz der Reversen Transkription kommt es zu großen Unterschieden in der cDNA-Konzentration. Eine Quantifizierung der cDNA liefert unter diesen Umständen nur einen Hinweis auf die Mindestmenge an RNA,

jedoch keinen absoluten Wert, da man keine Information über die cDNA-Integrität hat und auch die Effizienz der Umschreibung nicht bekannt ist. Um diesem Problem zu begegnen, wird ein externer Standard für alle Versuche angewendet. Bei diesem Standard handelt es sich um ein sogenanntes Haushalts- (*housekeeping*) Gen, von dem angenommen wird, dass es in einer konstanten Menge exprimiert wird. In den hier durchgeführten Versuchen wurde β -Actin als Houskeeping-Gen verwendet.

3.9.1 Versuchsaufbau

Nach der ersten Passage wurden die Zellen zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät. Bei etwa 90% Konfluenz wurden die Zellen einmalig mit 3ml PBS gewaschen und mit serumfreiem Medium für 24 Stunden inkubiert. Am Folgetag wurde das serumfreie Medium mit Zugabe der Stimulantien und Inhibitoren gewechselt. Hierzu erfolgte keine Behandlung oder die Zugabe von 25ng/ml PDGF-BB, 7, 10 oder 20 μ M Imatinib mesylate plus 25ng/ml PDGF-BB und Cisplatin 100 μ M. Nach 12 Stunden wurde das Medium unter gleichen Bedingungen gewechselt. Nach 24 Stunden wurde die Behandlung beendet, das Medium abgesaugt und einmalig mit 3 ml PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen, wie bei der Passage, mit Zugabe von 500 μ l Trypsin pro Well für 3 Minuten bei 37°C von der Zellkulturschale gelöst und in 50 ml Röhrchen gegeben. Dann erfolgte die Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen pro Minute (Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet entsprechend den Schritten der RNA-Isolation weiterverwendet.

3.9.2 Isolation von Ribonukleinsäure (RNA)

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy[®] Plus Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die im Pellet (aus 3.9.1) befindlichen Zellen wurden in 350 μ l RLT-Puffer Plus plus β -Mercaptoethanol (10 μ l pro 1 ml RLT-Puffer, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) resuspendiert. Dabei wurde so häufig resuspendiert bis eine homogene Flüssigkeit entstand und keine Reste mehr an der Wand des Röhrchens haften. Das so entstandene Zelllysat wurde in einem nächsten Schritt homogenisiert. Dazu wurde ein QIAshredder Homogenisator auf ein 2 ml Sammelröhrchen gesetzt und für 2 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurden die homogenisierten Lysate auf eine gDNA-Eliminationszentrifugationssäule

geladen, um genomische DNA aus dem Lysat zu entfernen, da diese an die Zentrifugationssäulen bindet, während die gesuchte RNA aufgrund ihrer Größe hindurchfließt. Diese Säulen wurden dann bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Säulen wurden verworfen und der Durchfluss mit 70% Ethanol (gleiche Menge des initial eingesetzten RLT-Puffer Plus, also 350µl) vermischt und gut resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine RNeasy Zentrifugationssäule geladen und auf 2 ml Sammelröhrchen gestellt. Dieses wurde dann für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule enthielt nun die gesuchte RNA. Anschließend wurden zum Waschen 700µl RW-1 Puffer auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen, 500µl RPE Puffer (4:1 mit 98% Ethanol verdünnt, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) auf die Säule gegeben und erneut 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zum Waschen der Zentrifugationssäule zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt mit 2 Minuten Zentrifugation wiederholt. Schließlich wurde die RNeasy Säule in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gesetzt und destilliertes Wasser auf die Membran der Säule gegeben. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 1 Minute. Durch das Wasser wurde die RNA mit in das neue Röhrchen gewaschen. Die RNA wurde nun bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die verwendeten Puffer RLT zur Zellyse sowie RW-1 und RPE für die Waschschrte wurden von Qiagen geliefert, ihre genaue Zusammensetzung ist unbekannt. Alle verwendeten Materialien für die RNA-Isolation waren frei von RNase, ein Enzym, das schon in geringer Konzentration RNA schneidet und so die RNA-Ernte aus den Zellen massiv beeinträchtigen würde. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit der Zentrifuge 5427 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

3.9.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde der Nano Drop 2000 von (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Spektrophotometer, das in einem einzigen Schritt die Konzentration von RNA bei einer Wellenlänge von 260nm und die Reinheit durch Bildung einer Ratio zwischen 260 und 280nm bestimmen kann. Eine Ratio um 2,0 wurde hierbei als hohe Reinheit der RNA

angesehen. Die Berechnungen des Gerätes beruhen auf dem folgenden modifizierten Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{A * \epsilon}{b}$$

c = Konzentration der RNA in ng/µl

A = Absorption in AU (arbitrary units)

ε = Wellenlänge-abhängiger Extinktionskoeffizient in ng-cm/µl

b = Optische Weglänge

Es wurde jeweils 1 µl der Probe als kleiner Tropfen auf die Messapparatur gegeben, als Negativkontrolle diente dabei destilliertes Wasser, da die RNA in Wasser gelöst vorlag. Die Konzentrationsangaben wurde in ng/µl ausgegeben. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben direkt für die reverse Transkription verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.9.4 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das Quantitect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Die RNA-Proben und entsprechenden Reagenzien des Kits wurden auf Eis aufgetaut. Abhängig von der RNA-Ausbeute bei deren Isolation wurde nach vorheriger Konzentrationsbestimmung jeweils die gleiche Menge (200ng) an RNA für alle Proben verwendet. Als erstes erfolgte eine erneute Elimination genomischer DNA. Hierzu wurde ein Mix nach folgendem Schema hergestellt:

Komponenten zur Elimination genomischer DNA (gDNA)		
Substanz	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2µl	1x
RNA-Probe	Volumen entsprechend 200ng	
RNase-freies Wasser	abhängig vom Volumen der RNA	
Gesamtvolumen	14µl	
gDNA Wipeout Buffer wurde mit dem Kit geliefert, die exakten Inhaltsstoffe sind im Handbuch nicht beschrieben, RNase-freies Wasser stammt ebenfalls aus dem Kit		

Tabelle 3-17 Pipettierschema zur Elimination genomischer DNA in der Reversen Transkription.

Nun folgte eine Inkubation der Proben bei 42°C für 2 Minuten in einem Heizblock. Im Anschluss wurden die Proben sofort auf Eis gestellt.

Im nächsten Schritt wurde für alle Proben eine Basislösung aus der Reversen Transkriptase, dem RT-Puffer und dem RT Primer Mix nach folgendem Schema hergestellt:

Komponenten für die Reverse Transkription		
Reverse Transkription: Basislösung		
Substanz	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
Quantiscript Reverse Transcriptase	1µl	
Quantiscript RT Buffer, 5x	4µl	1x
RT Primer Mix	1µl	
RNA-Probe		
Gesamte Probe nach gDNA Elimination	14µl	
Gesamtvolumen	20µl	

Tabelle 3-18 Pipettierschema zur Reversen Transkription.

Dieser Basislösung wurden die 14 µl aus der gDNA-Elimination hinzugefügt, so dass ein Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl entstand. Dieses wurde nun gemischt und kurz zentrifugiert, um alle Bestandteile vom Deckel zu lösen. Schließlich folgte die eigentliche RT-PCR nach folgendem Schema:

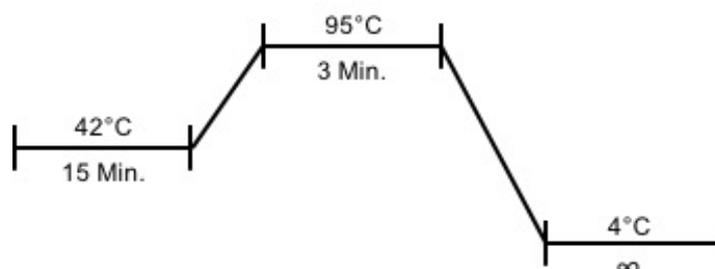


Abbildung 3-6 Programm in der PCR-Maschine für die RT-PCR.

Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gestellt und fünffach mit destilliertem, RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt, um ein größeres Volumen für weitere Versuche zu erhalten und Pipettierfehler bei sonst sehr geringen Mengen zu vermeiden. Dann wurde direkt eine quantitative PCR angeschlossen oder die Proben bei -80°C gelagert.

3.9.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurde das LightCycler[®]-System mit Glaskapillaren (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) verwendet. Nach Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte das Ansetzen eines Reaktionsgemisches für die qPCR nach folgendem Schema:

Komponenten für die qPCR		
PCR-Lösung		
Substanz	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
DNase-/RNase-freies Wasser	12,4µl	
MgCl ₂ , 3mM	1,6µl	Konzentration an Zielstruktur angepasst
Primer 10x Konzentration	2µl	0,5µM
LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green 1, 10x Konzentration	2µl	1x
Gesamtvolumen	18µl	
cDNA-Probe	2µl	
Gesamtvolumen Reaktionsgemisch	20µl	

Tabelle 3-19 Pipettierschema für die quantitative PCR mittels mit LightCycler[®] FastStart DNA Master Sybr green 1.

In dem gleichen Versuchsaufbau wurden verschiedene Konzentrationen für Magnesiumchlorid (MgCl₂, 2, 3 und 4mM), mit jeweils adaptierter Menge an Wasser, so dass das Volumen des Reaktionsgemisches gleich blieb, getestet. Magnesiumchlorid wird für die Aktivität der Polymerase benötigt und beeinflusst das Primerannealing, Trennung der Stränge, Produktspezifität und die Bildung von Primerdimeren. Die Konzentration stellt somit einen wesentlichen Faktor für die Fehlerrate der PCR dar. Für die verwendeten Primer zeigte eine Konzentration von 3mM Magnesiumchlorid ein gutes Ergebnis, so dass diese Konzentration für alle Versuche verwendet wurde. Als Negativkontrolle diente jeweils Wasser statt cDNA. Die Glaskapillaren wurden in einen, bei 4°C vorgekühlten, Metallblock (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) gegeben und zunächst mit 18 µl PCR-Lösung beladen. Im Anschluss wurde 2 µl der cDNA bzw. Wasser hinzugegeben, die Kapillaren mit einem Deckel verschlossen und in den LightCycler[®] eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden alle, fertig hergestellt und für ihre Zielsequenzen getestet, bei der Firma Qiagen erworben (Quantitect[®] Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland). Diese Primer sind für die Verwendung mit Sybr Green 1 (Qiagen, Hilden, Deutschland) erprobt und sind so entwickelt worden, dass ein kombinierter Annealing/Enlongations-Schritt bei 60°C durch-

geführt werden kann. Daher wurde der LightCycler® auf folgende PCR-Schritte programmiert:

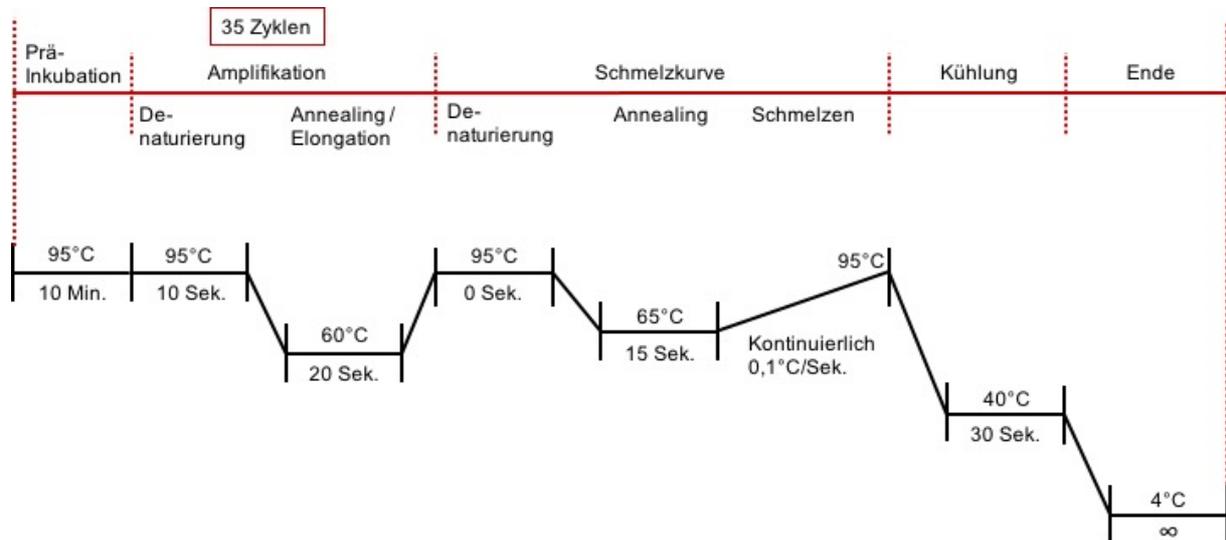


Abbildung 3-7 Programm für den LightCycler® zur Durchführung der quantitativen PCR.

Entsprechend des abgelaufenen Programmes erfolgte nach der Amplifikation die Erstellung einer Schmelzkurve. Dabei wurde die Temperatur kontinuierlich um 0,1°C pro Sekunde von 65°C auf 95°C erhöht. Die entstandene DNA schmolz, löste also ihre Doppelstrangstruktur, abhängig von der Größe des Endproduktes, auf. Große Produkte schmolzen dabei später als Kleine. Bei diesem Prozess wurde der Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall Sybr Green 1, frei. Die Veränderung der Fluoreszenz konnte gemessen werden und es zeigte sich bei der entsprechenden Temperatur eine am Computer graphisch dargestellte Spitze bei der Auftragung von Fluoreszenz (y-Achse) gegen Temperatur (x-Achse). Unspezifische Produkte, wie zum Beispiel Primerdimere, schmolzen bei einer niedrigeren Temperatur als das gesuchte Produkt. Über die Analyse der Schmelzkurve konnte man somit die Spezifität für die gesuchte Struktur ermitteln. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenz (y-Achse) und Zellzyklusnummer (x-Achse) konnte nun im Anschluss der relative Rückschluss auf die Expression gezogen werden. Je früher sich eine exponentielle Zunahme der Fluoreszenz zeigte, desto höher war die Expression des entsprechenden Gens.

3.9.6 Verwendete Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Qiagen (QuantiTect® Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland) bezogen. Hierbei lagen jeweils Vorwärts- und Rückwärts-Primer als lyophilisiertes Pulver in einem Röhrchen vor. Das Pulver wurde mit 1,1 ml TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer, 1M Tris-HCL, 0,1M EDTA, pH 8,0, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) versetzt, um eine zehnfach konzentrierte Primerlösung zu erhalten, und anschließend in kleinen Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Die Primer wurden direkt aus der Datenbank von Qiagen bestellt und waren somit bereits gegenüber ihrer Zielsequenz getestet. Die exakte Sequenz der Primer wurde jedoch vom Hersteller nicht mitgeteilt. Auch die PCR-Bedingungen waren bereits getestet. So konnten alle Primer bei einer Temperatur von 60°C gleichzeitig im Annealing- und Elongationsschritt in der qPCR verwendet werden. Der Abgleich der Zielstrukturen sowie deren entsprechenden Proteine erfolgte über die Gen-Suchfunktion der Webseite www.ncbi.nlm.nih.gov.

Bezüglich der Details der einzelnen Primer siehe folgende Tabelle:

Primer						
Offizieller Name	Gen-Symbol	Refseq-Transkript	Entrez Gene ID	Spezies	Kodiertes Protein / Entrez proteins	Assay Name / Hersteller
Actin, beta	Actb	NM_031144	81822	Ratte	Actin, cytoplasmic 1 / NP_112406	Rn_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay / Qiagen, Hilden, Deutschland
Collagen, type 1, alpha 2	Col1a2	NM_053356	84352	Ratte	Collagen alpha-2(1) chain precursor / NP_445808	Rn_Col1a2_1_SG, QuantiTect Primer Assay / Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 3-20 Verwendete Primer in der qPCR.

3.10 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens dreifach durchgeführt, die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism Version 6.0c (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Unterschiede zwischen einzelnen Stichproben wurden mit dem unpaired Student's T-Test untersucht. Zur Unterscheidung zwischen mehreren Stichproben wurde eine Analyse mittels one-way ANOVA mit Tukey multiple comparison Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde dabei ein p-Wert <0,05 (* = p <0,05, ** = p <0,01, *** = p <0,005) angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung und Identifikation der Pancreatic Stellate Cells

Die Isolation von Pancreatic Stellate Cells (PSC) ist bereits 1998 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben worden (M V Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998). Am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf wurde das Verfahren jedoch für die vorliegende Dissertation und Beantwortung der Fragestellungen neu etabliert. Nachdem die einzelnen Isolationsschritte an hiesige Bedingungen angepasst wurden, sollten einige Eigenschaften der Zellen zunächst charakterisiert werden bevor die einzelnen Versuche bezüglich der Fragestellung begonnen wurden.

Als erstes wurde die Wachstumsrate der Zellen untersucht (siehe Abbildung 4-1). Hierzu wurden die Zellen am Tag der Isolation und dann jeweils an den Folgetagen bis zu 100% Konfluenz zur Bestimmung ihrer Morphologie und Quantifizierung mikroskopiert und gezählt (siehe 3.3.1). So konnten die optimalen Tage für Färbungen, Zellpassage und die Planung der anschließenden Versuche festgelegt werden.

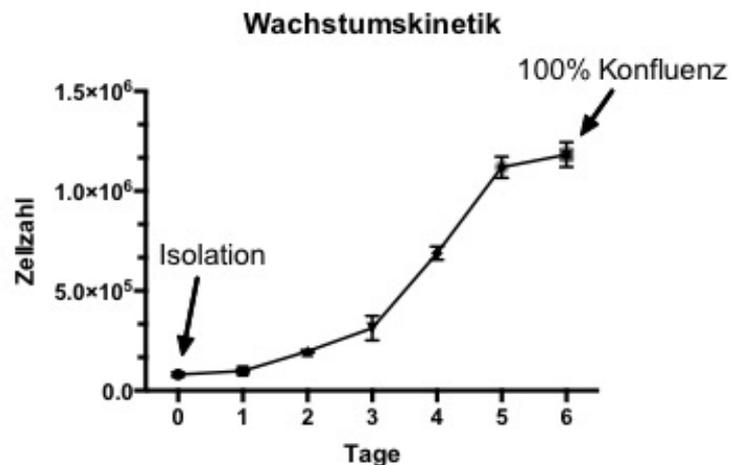


Abbildung 4-1 Wachstumskinetik von PSC.

PSC wurden isoliert, die Zellen gezählt, ihre Vitalität bestimmt und zu gleichen Teilen in zwei 6-Well-Platten ausgesät. Dann wurde täglich ein Well trypsiniert, zentrifugiert, in Medium resuspendiert und erneut die Vitalität und Zellzahl sowie die Morphologie der Zellen bestimmt bis 100% Konfluenz erreicht wurde und das Wachstum ein Plateau erreicht hatte. Dies war an Tag 6 nach der Isolation. Gezeigt sind die Ergebnisse aus 3 Versuchen.

Es ist beschrieben, dass PSC in einer inaktiven und aktiven Form vorliegen können (Haber et al., 1999). In den ersten Tagen nach der Isolation besteht die inaktive Form, die durch das Vorliegen von Desmin, einer noch leicht gedrunen Form und intrazellulären Lipideinschlüssen ausgemacht wird. Im Lauf der nächsten Tage gehen die Zellen dann unter Kulturbedingungen in ihren aktivierten Zustand über. Es

entwickeln sich längere Zellfortsätze und die Zellen werden positiv für α -SMA (M V Apte et al., 1998).

Für die Darstellung von Desmin und intrazellulären Lipideinschlüssen wurden die Zellen 2 Tage nach Isolation zytochemisch untersucht, da diese Eigenschaften verloren gehen je länger sich die Zellen in Kultur befinden. Sichtbar wird in Abbildung 4-2a eine bräunliche Färbung für Desmin mit noch großem Zellkern und relativ kleinem Zellkörper. In Abbildung 4-2b zeigen sich schwach fluoreszierende Lipideinschlüsse im Zytoplasma. Für PSC ist bekannt, dass sie in ihrem inaktiven Zustand Vitamin A in kleinen Fettvakuolen speichern und diese Eigenschaft während der Aktivierung verlieren (Vonlaufen et al., 2010).

Mit weiterem Verlauf in Kultur werden die Zellen positiv für α -SMA. Abbildung 4-2c zeigt zwei Zellen nach 3 Tagen in Kultur, die bereits positiv für α -SMA sind. Dies wird in der Literatur als ein Marker für den Aktivierungsprozess der Zellen angesehen. In Abbildung 4-2d sind native Zellen nach 4 Tagen in Kultur dargestellt, die bereits einen Myofibroblasten-artigen Phänotypen mit langen Zellausläufern angenommen haben.

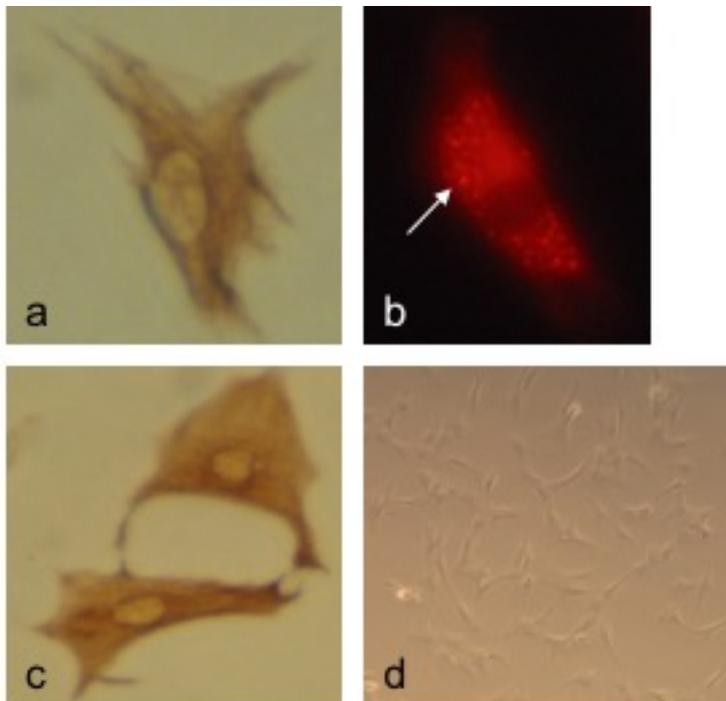


Abbildung 4-2 Darstellung Zellspezifischer Charakteristika.

(a) PSC der Ratte wurden isoliert, in eine 24-Well-Platte ausgesät und für 2 Tage in Kultur gehalten. Dann wurde in Methanol und PFA fixiert und die Zellen auf Desmin mit HRP-gekoppeltem 2. Antikörper gefärbt. Zu sehen ist die bräunliche Färbung durch Umsatz des DAB+/Chromogen Substrates mit HRP, Vergrößerung 100x. (b) In gleicher Weise wurden die PSC in Kultur gehalten, dann in Glutaraldehyd fixiert und mit Nile red gefärbt. Dargestellt sind die leicht fluoreszierenden Lipideinschlüsse in den PSC, die noch am Anfang durch Vitamin A Speicherung auftreten, Vergrößerung 100x. (c) Die PCS wurde isoliert, in eine 24-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage in Kultur gehalten. Dann mit Methanol und PFA fixiert sowie auf α -SMA mit 2. HRP-gekoppeltem Antikörper inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mittels

DAB+/Chromogen. Es zeigte sich die Darstellung der braun angefärbten α -SMA Filamente, Vergrößerung 100x. (d) Darstellung nativer Zellen nach 3 Tagen in Kultur. Es zeigte sich die typische spindelartige Form mit langen Zellausläufern aktivierter PSC, Vergrößerung 40x.

4.2 Dosisabhängiger Effekt von PDGF-BB auf die Aktivierung von PDGFR- β , ERK 1/2 und AKT

PDGF spielt für viele Zellen, über die Stimulation des PDGFR, eine zentrale Rolle bei der Induktion von Signalkaskaden für die Proliferation und Fibrogenese. Dieser Effekt ist auch in PSC beschrieben. ERK 1/2 spielt dabei vornehmlich eine Rolle bei der Proliferation und AKT bei der Zellmigration und Induktion fibrotischer Umbauprozesse (Jaster et al., 2002; Masamune et al., 2003). Zur Analyse der dosisabhängigen Wirkung von PDGF-BB auf dessen Rezeptor PDGFR- β und die daran anschließenden Signalwege über ERK1/2 und AKT wurden zwei Dosen untersucht. Bei der Aktivierung der einzelnen Proteine kommt es über Proteinkinasen zu einer Phosphorylierung von Aminosäureresten. Diese Phosphorylierung wurde zur Abbildung der Aktivität der Proteine im Western Blot dargestellt. Hierzu wurden die Zellen isoliert, bei 100% Konfluenz einmalig passagiert und nach weiteren 2 Tagen für 24 Stunden ohne FKS im Medium gehalten. Dann erfolgte die Stimulation mit PDGF-BB in einer Konzentration von 10 oder 25 ng/ml für 5 Minuten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-3 zusammengefasst.

Die Ergebnisse wurden auf ihre jeweilige Beladungskontrolle normalisiert und dann in Prozent zur Kontrolle (nicht stimulierte Zellen) wiedergegeben. Für die Stimulation von pPDGFR Tyr751 (Abbildung 4-3a) zeigte sich ein dosisabhängiger Zusammenhang mit proportional zur Dosis steigender Aktivität und statistisch signifikantem Unterschied zwischen Kontrolle und einer Dosis von 25ng/ml (* = $p < 0,05$). Dieses Bild zeigte sich auch im Fall von pERK Thr202/Tyr204 (Abbildung 4-3c). Hier bestand jedoch eine nur minimal höhere Stimulation durch 25ng/ml ohne statistische Signifikanz zu 10ng/ml. Beide Dosen zeigten eine signifikant höhere Stimulation im Vergleich zur Kontrolle (* = $p < 0,05$). Für pAKT Ser473 (Abbildung 4-3b) bestand eine stärkere Stimulierung in der niedrigeren Dosis von 10ng/ml, beide Dosen bewirkten jedoch eine statistisch signifikante Stimulation von pAKT (* = $p < 0,05$) ohne sich voneinander signifikant zu unterscheiden. Anhand dieser Daten ließ sich die dosisabhängige Induktion von pPDGFR, pAKT und pERK durch PDGF-BB darstellen. Darauf aufbauend wurde für alle weiteren Versuche eine Dosis von 25ng/ml verwendet. Die schwächere Wirkung im Fall von AKT wurde dabei in Kauf genommen, da auch 25ng/ml hier signifikante Ergebnisse erzielte und dies für pPDGFR und pERK die bessere Dosis war.

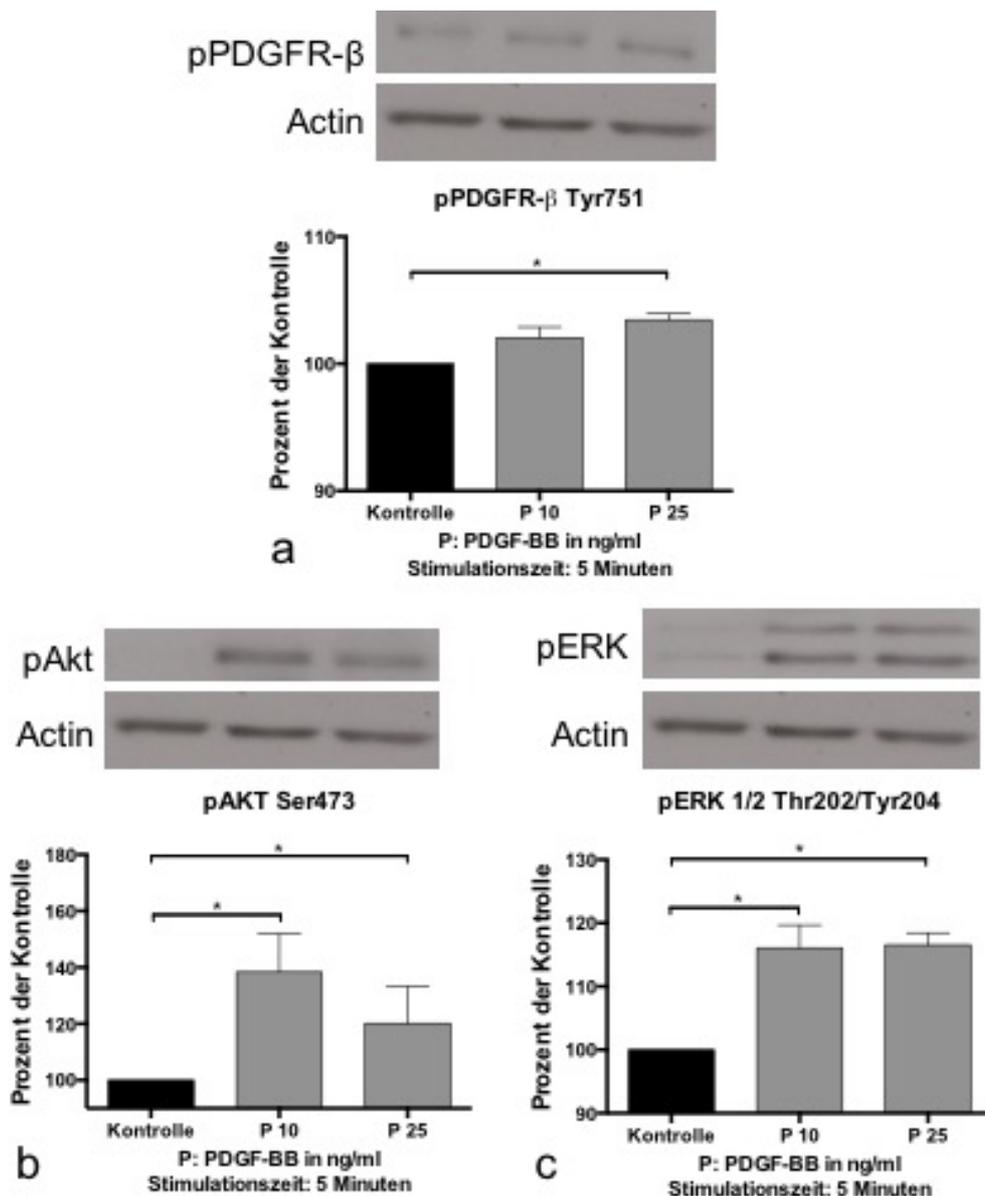


Abbildung 4-3 Dosisabhängigkeit von PDGF-BB für die Stimulation von PDGF-Rezeptor beta, ERK 1/2 und AKT.

PSC wurden isoliert, für 5 Tage kultiviert, einmalig passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät, für 2 Tage unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Es wurde keine Stimulation oder PDGF-BB 10ng/ml oder 25ng/ml hinzugegeben und für 5 Minuten belassen. Die Zellen wurden lysiert und per Western Blot auf pPDGFR-beta, pERK 1/2 und pAKT analysiert. Die Membranen wurden mit Stripping-Puffer behandelt und zur Beladungskontrolle auf Actin untersucht. **(a)** Für die Aktivierung von pPDGFR-beta zeigte sich eine stärkere Stimulation mit 25ng/ml. **(b)** Für die Aktivierung von pAKT zeigte sich eine stärkere Stimulation bei 10ng/ml und für **(c)** pERK 1/2 zeigte sich die Stimulation etwa gleich stark für beide Dosierungen. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus insgesamt 3 Versuchen.

4.3 Zeitabhängiger Effekt von PDGF-BB auf die Aktivierung von PDGFR- β , ERK 1/2 und AKT

Zur weiteren Optimierung der Versuchsbedingung und Charakterisierung der Signalkaskaden in PSC wurde untersucht, ob ein zeitabhängiger Effekt der PDGF-Stimulation vorliegt. Hierzu wurden die Zellen isoliert, bei 100% Konfluenz einmalig passagiert und nach weiteren 2 Tagen für 24 Stunden ohne FKS im Medium gehalten. Dann erfolgte die Stimulation mit PDGF-BB in einer Konzentration von 25ng/ml zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 15, 30 Minuten und eine Darstellung des Phosphorylierungsstatus von PDGFR, ERK 1/2 und AKT mittels Western Blot. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-4 gezeigt. Für pPDGFR-beta Tyr751 (Abbildung 4-4a) zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei 5 Minuten (***) = $p < 0.005$) und konsekutivem Abfall der Aktivität für die längeren Zeiträume. pERK 1/2 Thr202/Tyr204 (Abbildung 4-4b) zeigte eine signifikante Stimulation für 2 und 5 Minuten (* = $p < 0.05$), wobei die Stimulation ebenfalls bei 5 Minuten am höchsten war und dann abnahm. Bei pAKT Ser473 bestand die stärkste Stimulation bei 2 Minuten, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. 5 Minuten hingegen zeigten auch hier starke Stimulation mit statistischer Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (* = $p < 0,05$) und bei längeren Zeiträumen einen erneuten Abfall der Phosphorylierung (Abbildung 4-4c).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich in Ergänzung zum dosisabhängigen Verlauf zusammenfassen, dass eine gute stimulatorische Wirkung durch PDGF-BB auf die untersuchten Proteine bei 25ng/ml und einer Stimulationszeit von 5 Minuten besteht. Eine längere Stimulation bis 30 Minuten steigert die Aktivität von PDGFR, ERK 1/2 und AKT nicht weiter.

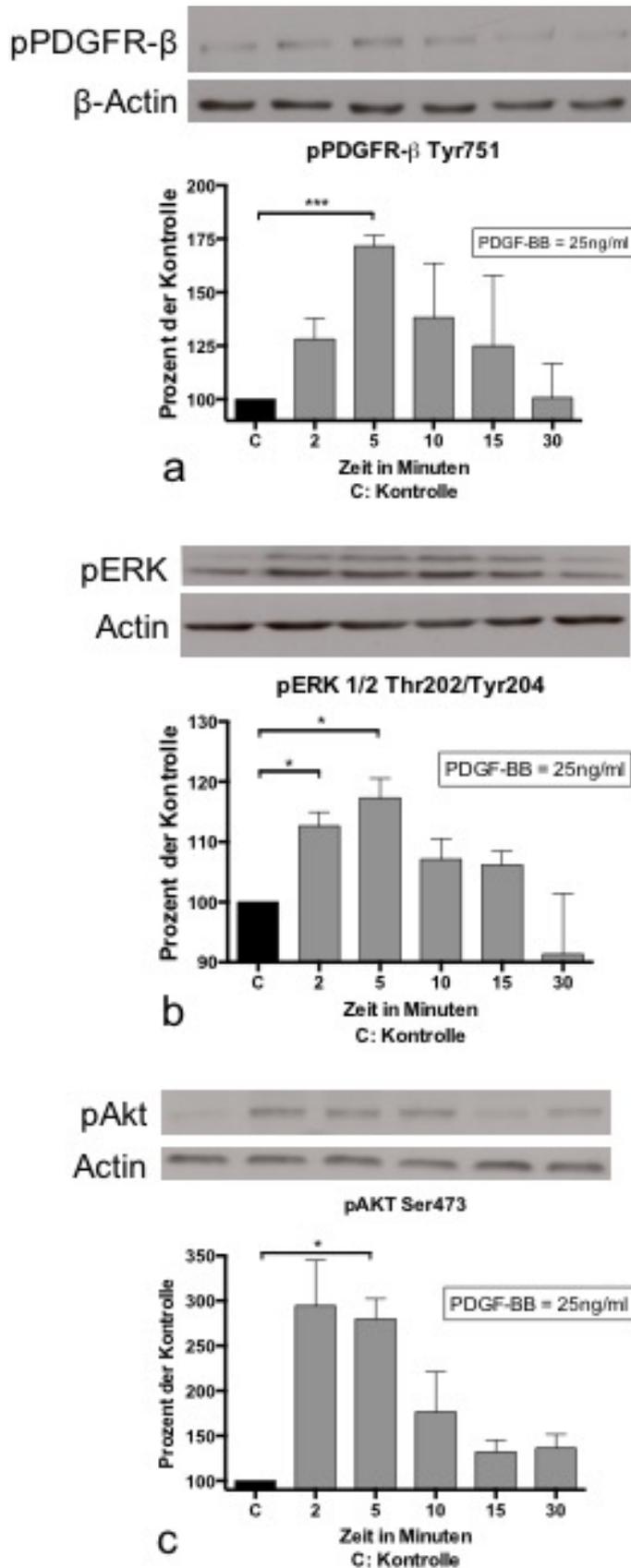


Abbildung 4-4 Zeitabhängigkeit von PDGF-BB für die Stimulation von PDGF-Rezeptor beta, ERK 1/2 und AKT.

PSC wurden isoliert, für 5 Tage kultiviert, einmalig passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät, für 2 Tage unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Es wurde keine Stimulation oder PDGF-BB 25ng/ml hinzugegeben und für die Zeitpunkte 2, 5, 10, 15, 30 Minuten belassen. Die Zellen wurden lysiert und per Western Blot auf (a) pPDGFR, (b) pERK und (c) pAKT analysiert. Die Membranen wurden mit Stripping-Puffer behandelt und zur Beladungskontrolle auf Actin untersucht. Für alle drei Zielproteine zeigte sich eine stabile Stimulation nach 5 Minuten. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus 3 Versuchen.

4.4 Effekt des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib mesylate auf die Aktivierung von PDGFR- β , ERK1/2 und AKT

Die Stimulation des PDGF-Rezeptors sowie von ERK1/2 stellen zentrale Signalwege für die Proliferation und Fibrogenese dar. In den humanen (M-07c) und murinen (32D) myeloischen Leukämiezelllinien wurde eine Inhibition des Phosphorylierungsprozesses von PDGFR, ERK1/2 und AKT durch Imatinib mesylate und gleichzeitige Inhibition der Proliferation beschrieben (Buchdunger et al., 2000; Heinrich et al., 2000). Die Blockierung dieser Signalwege sollte zunächst in PSC gezeigt werden. Hierzu wurden die Zellen nach einmaliger Passage und bei ca. 90% Konfluenz mit serumfreiem Medium für 24 Stunden inkubiert, dann nicht behandelt oder mit Imatinib mesylate (0,1, 1, 10 und 20 μ M) für 4 Stunden, gefolgt von PDGF 25ng/ml für 5 Minuten, inkubiert.

Für die Phosphorylierung von PDGFR (Abbildung 4-5a) an Tyr751 zeigte sich eine dosisabhängige, inhibitorische Wirkung von Imatinib mesylate mit statistischer Signifikanz für 1 und 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle. Die Aktivierung von AKT und ERK1/2 zeigte ein weniger einheitliches Bild. Für AKT (Abbildung 4-5b) zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle keine Abnahme der Phosphorylierung in den niedrigeren Dosierungen von 0,1 und 1 μ M, jedoch auch nicht für 10 μ M ohne Zugabe von PDGF-BB. Ab einer Dosis von 10 μ M mit Zugabe von PDGF-BB bestand sogar eine Erhöhung der Aktivität. Um zu sehen, ob dies ein dosisabhängiger Effekt war, wurde die Dosierung um eine noch höhere Dosis (20 μ M) erweitert. Darunter erreichte die Stimulation schließlich auch statistische Signifikanz (* = $p < 0,05$). Ähnlich zeigte sich die Aktivierung von ERK 1/2 (Abbildung 4-5c), wo es jedoch in den Dosierungen von 0,1 und 1 μ M zu einer statistisch nicht signifikanten Erniedrigung der Phosphorylierung kam. Ab 20 μ M bestand auch bei ERK 1/2 eine signifikante Erhöhung der Aktivität (* = $p < 0,05$). Zusammenfassend kam es bei diesen Versuchen somit bei steigender Dosierung von Imatinib mesylate zu einer abnehmenden Aktivität des PDGF-Rezeptors und einer zunehmenden Aktivität von AKT und ERK 1/2.

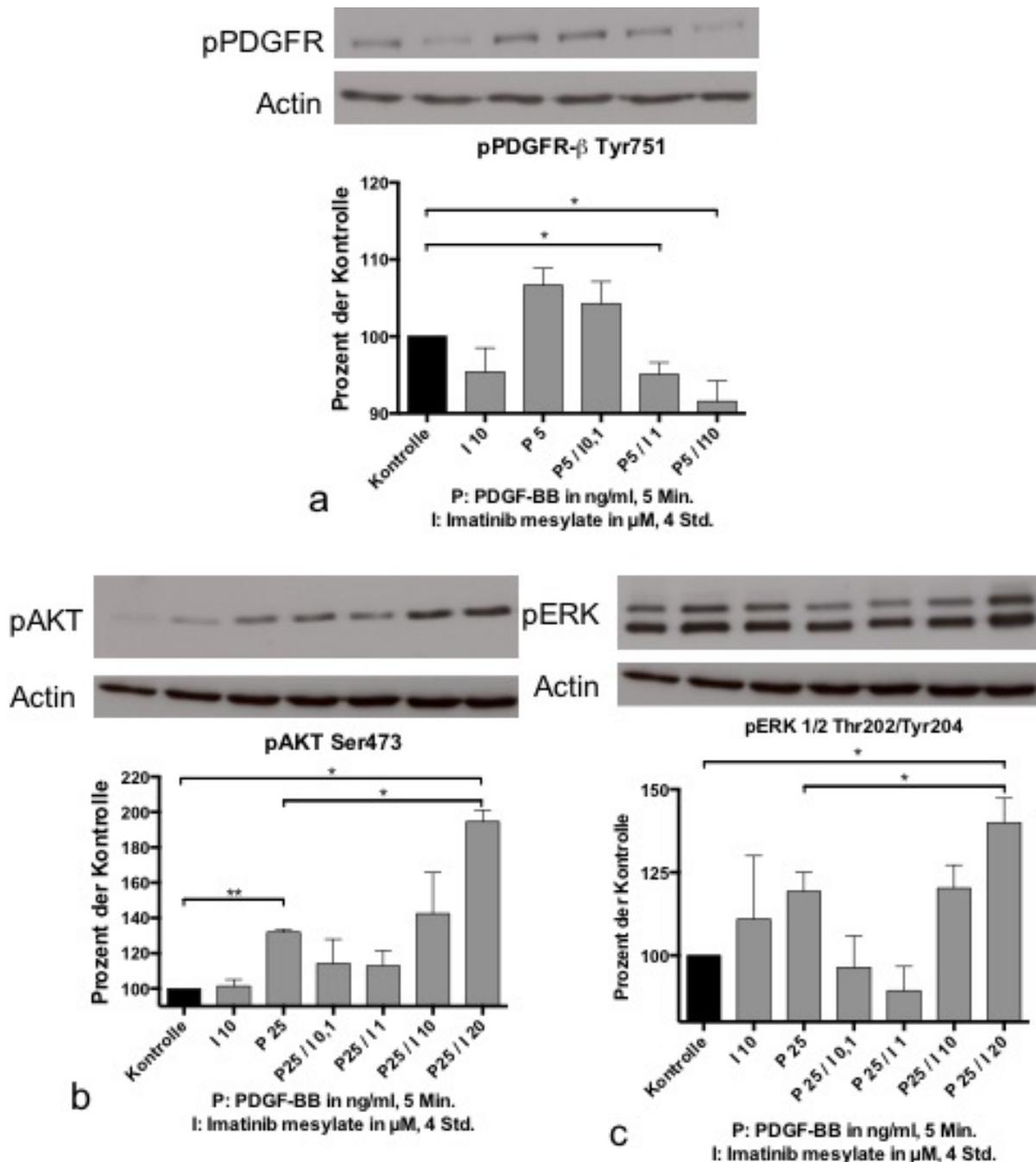


Abbildung 4-5 Dosisabhängige Wirkung von Imatinib mesylate auf PDGF-Rezeptor beta, ERK 1/2 und AKT.

PSC wurden isoliert, für 5 Tage kultiviert, einmalig passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät, für 2 Tage unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Es wurde keine oder eine Behandlung mit Imatinib mesylate (0,1, 1, 10 oder 20 μ M) für 4 Stunden durchgeführt und dann keine oder eine Stimulation mit PDGF-BB 25ng/ml für 5 Minuten durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert und per Western Blot auf (a) pPDGFR, (b) pERK und (c) pAKT analysiert. Die Membranen wurden mit Stripping-Puffer behandelt und zur Beladungskontrolle auf Actin untersucht. Zu sehen war (a) eine dosisabhängige Inhibition der Aktivität des PDGF-Rezeptors bei 1 und 10 μ M Imatinib mesylate. Für (b) AKT und (c) ERK zeigte sich jedoch eine inhibitorische Wirkung nur bis 1 μ M ohne statistische Signifikanz. Ab einer Dosierung von 10 μ M bestand eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT und ERK, die jedoch noch nicht statistisch signifikant war. Um herauszufinden, ob sich dies bei steigender Dosierung ändert, wurde zusätzlich mit 20 μ M inkubiert. Hier zeigte sich eine weitere, statistisch signifikante (* = $p < 0,05$) Zunahme der Aktivität. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus insgesamt 4 Versuchen.

4.5 Wachstumshemmender Effekt von Imatinib mesylate auf Pancreatic Stellate Cells im MTT-Assay

Für die Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl und Lungenfibroblasten wurde ein wachstumshemmender Effekt und Inhibition des PDGF-Rezeptors durch Imatinib mesylate beschrieben (Aono et al., 2005; Hwang et al., 2003). Dies sollte in der vorliegenden Arbeit mittels MTT-Assay an PSC gezeigt werden (Abbildung 4-6). Hierzu wurden die isolierten PSC nach 5 Tagen einmalig passagiert, gezählt und 30.000 Zellen pro 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden normalen Kulturbedingungen erfolgte die Inkubation für 24 Stunden in serumfreiem Medium und schließlich keine Behandlung oder die Zugabe von PDGF-BB 25ng/ml, Imatinib mesylate 10 μ M oder Imatinib mesylate 10 μ M plus PDGF-BB 25ng/ml für 72 Stunden. Dabei zeigte sich kein statistisch signifikantes Ergebnis zwischen der Kontrolle und PDGF-BB 25ng/ml, die Tendenz zur Proliferation der Zellen wurde jedoch abgebildet. Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand jedoch zwischen PDGF-BB 25ng/ml und PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 10 μ M, was die inhibitorische Funktion von Imatinib mesylate deutlich machte. Die beiden Proben, die mit Imatinib mesylate inkubiert wurden, zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Tag 0 Kontrolle, was darauf rückschließen ließ, dass hier in etwa gleich viele stoffwechselaktive Zellen vorhanden waren. Zusammenfassend wirkte Imatinib mesylate sowohl in Abwesenheit von PDGF-BB als auch in dessen Anwesenheit inhibitorisch auf die Proliferation von PSC.

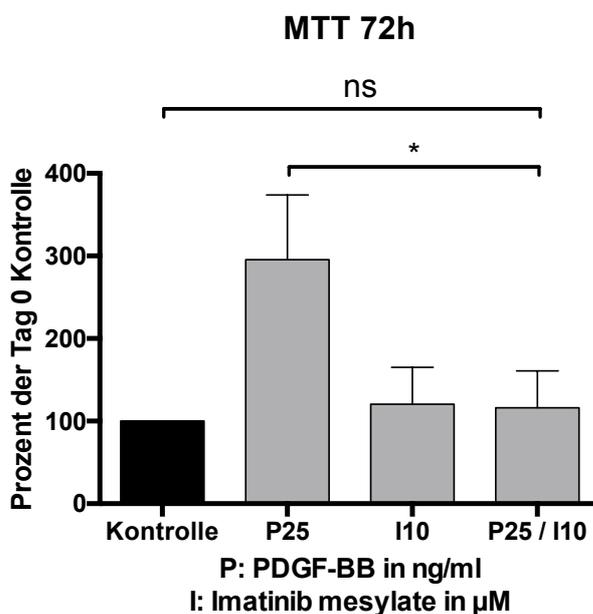


Abbildung 4-6 Effekt von PDGF-BB und Imatinib mesylate auf die Proliferation von PSC.

PSC wurden isoliert, für 5 Tage kultiviert, einmalig passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen in 24-Well-Platten ausgesät (30.000 Zellen/Well). Anschließend für 1 Tag unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Am Folgetag wurde der erste MTT-Assay für den Ausgangswert (Tag 0 Kontrolle) bestimmt und die übrigen Wells ohne Behandlung oder mit PDGF-BB 25ng/ml, Imatinib mesylate 10 μ M oder Imatinib mesylate 10 μ M plus PDGF-BB 25ng/ml für 72 Stunden inkubiert. Ein Wechsel der Medien mit Stimulation/Inhibition fand alle 12 Stunden statt. Dargestellt sind die Werte nach 72 Stunden in Bezug auf den Ausgangswert von 4.

4.6 Imatinib mesylate induziert seine wachstumshemmende Wirkung nicht durch Apoptose

Für Imatinib mesalyte sind unterschiedliche Mechanismen bezüglich seines hemmenden Effektes auf die Zellproliferation beschrieben. Einerseits konnte in Glioblastom-Zelllinien gezeigt werden, dass das Zellwachstum nicht durch Apoptose sondern vielmehr durch einen Zellzyklus-Arrest entsteht (Kilic et al., 2000). Andererseits wurde in Zelllinien für das Dermatofibrosarkom protuberans und das Riesenzellfibrosarkom, zwei infiltrative Hauttumore, gezeigt, dass die hemmende Wirkung von Imatinib mesylate auf die Proliferation durch Apoptose entsteht (Sjöblom et al., 2001).

Aufgrund der in Kapitel 4.5 gezeigten inhibitorischen Wirkung von Imatinib mesylate auf die Proliferation von PSC sollte untersucht werden, ob dieser Effekt durch einen Zelluntergang mittels Apoptose zu erklären war. Hierzu wurden die Zellen nach einmaliger Passage zu gleichen Teilen ausgesät, für jeweils 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen, dann ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Dann erfolgte für 48 Stunden eine Inkubation ohne Behandlung oder mit PDGF-BB 25ng/ml, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7, 10 oder 20µM sowie Cisplatin 100µM. Cisplatin sollte hier als Positivkontrolle dienen. Die Entstehung von Apoptose wurde dann mittels Western Blot durch Darstellung von Caspase-3 untersucht. Caspase-3, ein Schlüsselenzym der Apoptose, wird bei ihrer Aktivierung gespalten. Der hier verwendete Antikörper machte im Western Blot das vollständige Protein (35kDa) und das Spaltprodukt (17kDa) separat sichtbar. Diese Spaltung wurde als Induktion von Apoptose gewertet (siehe Abbildung 4-7).

Zu sehen war keine Aktivierung von Caspase-3 für die Kontrolle, PDGF-BB 25ng/ml und alle Konzentrationen von Imatinib mesylate. Cisplatin hingegen zeigte eine Spaltung und damit Aktivierung von Caspase-3. In PSC wurde somit durch die Behandlung mit Imatinib mesylate bis zu einer Konzentration von 20µM keine Apoptose induziert.

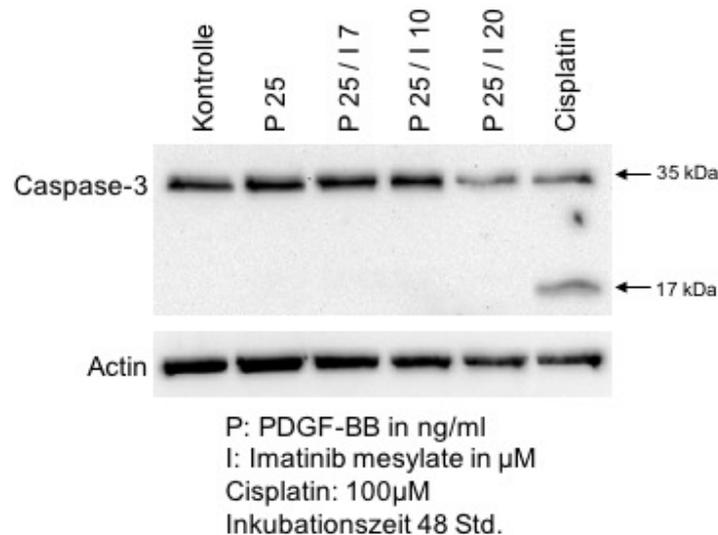


Abbildung 4-7 Effekt von Imatinib mesylate auf die Induktion von Apoptose.

PSC wurden isoliert, für 5 Tage kultiviert, einmalig passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät, für 2 Tage unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Es wurde keine oder eine Behandlung mit PDGF-BB 25ng/ml, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7, 10 oder 20µM sowie Cisplatin 100µM für 48 Stunden durchgeführt. Das Medium mit den Stimulantien/Inhibitoren wurde nach 12 Stunden gewechselt. Die Zellen wurden lysiert und per Western Blot auf vollständige Caspase-3 sowie das bei der Aktivierung entstehende große Spaltprodukt p17 (17kDA) analysiert. Die Membranen wurden mit Stripping-Puffer behandelt und zur Beladungskontrolle auf Actin untersucht. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus insgesamt 3 Versuchen.

4.7 Hemmung der Expression und Freisetzung von Kollagen Typ I durch Imatinib mesylate

Für den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib mesylate ist beschrieben, dass es in dermalen und pulmonalen Fibroblasten über eine Hemmung des PDGF-Rezeptors zur Inhibition fibrotischer Umbauprozesse kommt (Aono et al., 2005; Distler et al., 2007). Die Freisetzung extrazellulärer Matrixproteine spielt für den fibrotischen Umbau bei der chronischen Pankreatitis eine entscheidende Rolle. So konnte z.B. ein Zusammenhang zwischen PDGF und der Freisetzung von Kollagen Typ I in PSC gezeigt werden (Luttenberger et al., 2000). Darauf beruhend wurde die inhibitorische Funktion von Imatinib mesylate auf die Expression von Kollagen Typ I in PSC getestet.

Kollagen unterliegt bei dessen Biosynthese vielen Einflüssen (posttranskriptional, posttranslational, beim Transport nach extrazellulär und der konsekutiven Fertigstellung der vollständigen Kollagenfibrillen). Daher wurde die Inhibition der Kollagensynthese durch Imatinib mesylate auf verschiedenen Ebenen getestet.

Zunächst wurde untersucht, ob es zu einer Reduktion von extrazellulärem Kollagen Typ I kommt. Dazu erfolgte ein ELISA aus den Zellkulturüberständen. Die PSC wur-

den hierzu isoliert, nach 5 Tagen einmalig passagiert, für 2 weitere Tage in Kultur gehalten und schließlich für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Für die Kollagenbiosynthese wird Ascorbinsäure benötigt, die dem Medium zugegeben wurde. Die Zellen wurden dann nicht behandelt oder mit PDGF-BB 25ng/ml, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7, 10 oder 20 μ M für 24 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-8 dargestellt und zeigen einen statistisch signifikanten, dosisabhängigen Abfall von Kollagen Typ I im Zellkulturüberstand für alle Dosierungen von Imatinib mesylate (* = $p < 0,05$).

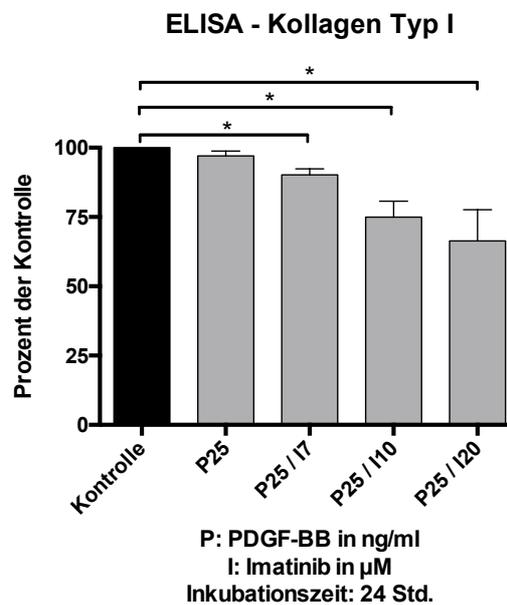


Abbildung 4-8 Dosisabhängige Inhibition durch Imatinib mesylate auf Kollagen Typ I im Zellüberstand.

PSC wurden isoliert, für 5 Tage kultiviert, einmalig passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät, für 2 Tage unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Dem Medium wurde dann Ascorbinsäure hinzugegeben und die Zellen nicht behandelt oder mit PDGF-BB 25ng/ml, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7, 10 oder 20 μ M für 24 Stunden inkubiert. Das Medium mit den Stimulantien/Inhibitoren wurde nach 12 Stunden gewechselt. Aus den Zellkulturüberständen wurde ein indirekter ELISA auf Kollagen Typ I durchgeführt. Die Daten zeigen Ergebnisse aus insgesamt 3 Versuchen.

Im nächsten Schritt wurde für die geringste, wirksame Dosis von Imatinib mesylate im ELISA (7 μ M) eine Untersuchung auf zytoplasmatischer Ebene durchgeführt. Ergänzt wurde bei dieser Untersuchung eine Inhibition durch Imatinib ohne Zugabe des Stimulans PDGF-BB, um zu untersuchen, ob die gleichzeitige Stimulation des Rezeptors eine Rolle bei der Expression spielt. Die Zellen wurden wie für den ELISA isoliert und in Kultur gehalten, jedoch konnte hierbei auf die Zugabe von Ascorbinsäure verzichtet werden. Es erfolgte dann die Inkubation mit PDGF-BB 25ng/ml, Ima-

tinib mesylate 7 μ M oder PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7 μ M für 24 Stunden sowie keine Behandlung für die Kontrolle. Die Zellen wurden dann lysiert und mittels Western Blot auf Kollagen Typ I untersucht. Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion von Kollagen Typ I (* = $p < 0,05$) sowohl für Imatinib mesylate ohne PDGF-BB als auch für die gleichzeitige Behandlung. Die Beladung der einzelnen Proben wurde mittels Actin kontrolliert und dann im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wiedergegeben (siehe Abbildung 4-9).

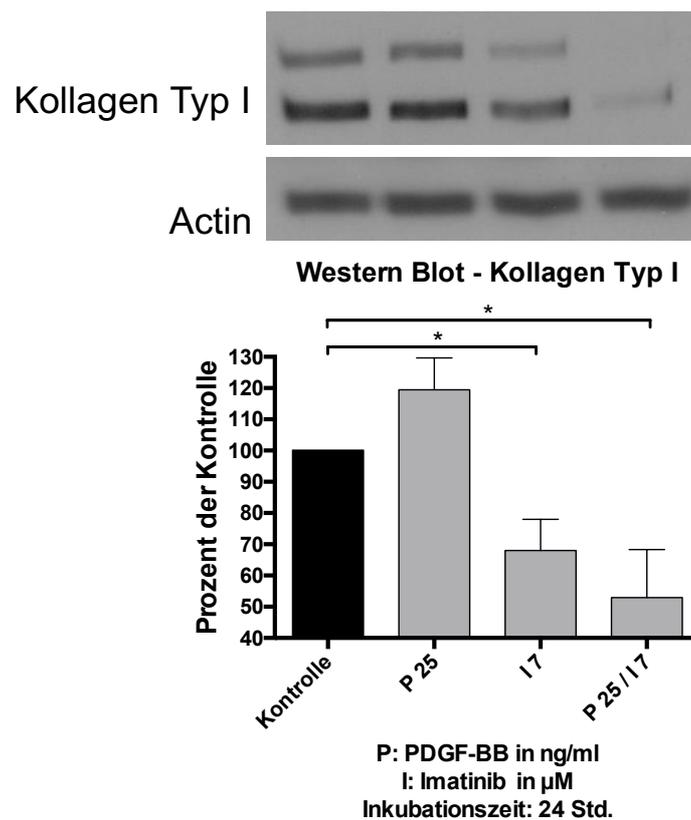


Abbildung 4-9 Dosisabhängige Reduktion von zytoplasmatischem Kollagen Typ I durch Imatinib mesylate.

PSC wurden isoliert, für 5 Tage kultiviert, einmalig passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät, für 2 Tage unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Es wurde keine oder eine Behandlung mit PDGF-BB 25ng/ml, Imatinib mesylate 7 μ M oder PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7 μ M für 24 Stunden durchgeführt. Das Medium mit den Stimulantien/Inhibitoren wurde nach 12 Stunden gewechselt. Die Zellen wurden lysiert und per Western Blot auf Kollagen Typ I analysiert. Die Membranen wurden mit Stripping-Puffer behandelt und zur Beladungskontrolle auf Actin untersucht. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus insgesamt 6 Versuchen.

Schließlich wurde untersucht, ob die inhibitorische Wirkung auf die Kollagenproduktion auch auf Ebene der Genexpression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4-10). Die Zellen wurden, wie in den Schritten zuvor, isoliert, kultiviert und dann mit PDGF-BB 25ng/ml, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate (7, 10 oder 20 μ M) und Cisplatin 100 μ M oder ohne Behandlung für 24 Stunden inkubiert. Dann wurde RNA

aus den Zellen isoliert, diese mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR quantifiziert. Dabei zeigte sich für alle Dosierungen von Imatinib mesylate eine statistisch signifikante, dosisabhängige Reduktion der Kollagen Typ I Expression (PDGF-BB 25ng/ml + Imatinib mesylate 7 μ M: * = $p < 0,05$; PDGF-BB 25ng/ml + Imatinib mesylate 10 μ M: ** = $p < 0,01$; PDGF-BB 25ng/ml + Imatinib mesylate 20 μ M: *** = $p < 0,005$). Cisplatin interkaliert mit der DNA, hemmt damit die Genexpression und bewirkt so eine Störung der Zellfunktion auf vielen Ebenen. In diesem Versuch diente Cisplatin als Negativkontrolle. Die Kollagensynthese wurde nur gering reduziert (Ergebnisse nicht statistisch signifikant) und war am ehesten durch den Zelluntergang unter Cisplatin bedingt.

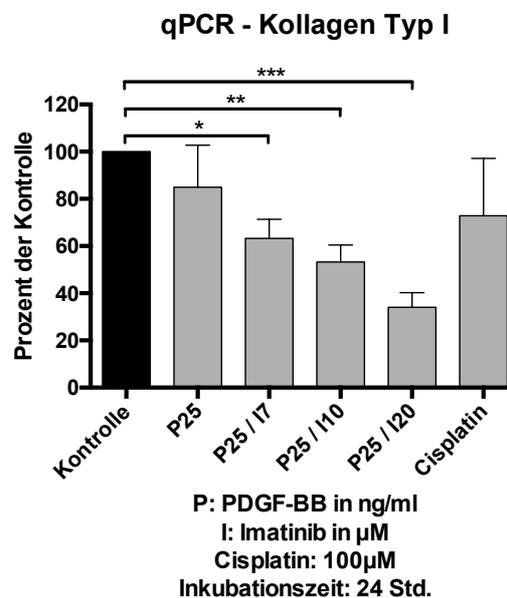


Abbildung 4-10 Dosisabhängige Reduktion der Genexpression von Kollagen Typ I durch Imatinib mesylate.

PSC wurden isoliert, für 5 Tage kultiviert, einmalig passagiert, gezählt, zu gleichen Teilen in 6-Well-Platten ausgesät, für 2 Tage unter normalen Kulturbedingungen, dann für 24 Stunden ohne Zugabe von FKS im Medium gehalten. Es wurde keine oder eine Behandlung mit PDGF-BB 25ng/ml, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate (7, 10 oder 20 μ M) und Cisplatin 100 μ M für 24 Stunden durchgeführt. Das Medium mit den Stimulantien/Inhibitoren wurde nach 12 Stunden gewechselt. Die Zellen wurden trypsinisiert und zentrifugiert. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von Kollagen Typ I mittels qPCR untersucht. Die Expression ist in Relation zum Housekeeping-Gen beta-Actin und dann im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht worden. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus insgesamt 5 Versuchen.

Im letzten Schritt sollte die Reduktion der Kollagenfibrillen noch bildmorphologisch festgehalten werden (Abbildung 4-11). Dazu wurden die Zellen wie zuvor beim Western Blot isoliert und in Kultur gehalten, nach der ersten Passage auf Objektträger mit Glaskammer ausgesät, 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten und schließlich nicht behandelt oder mit PDGF-BB 25ng/ml, Imatinib mesylate 7 μ M, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7 μ M für 24h inkubiert. Für die Färbung wurden die Zellen mit Aceton fixiert und auf Kollagen und α -SMA mit fluoreszierendem 2. Antikörper untersucht. Dargestellt wurde Kollagen in grün (Alexa Fluor 488) und α -SMA in rot (Alexa Fluor 594). Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Bisbenzimid (blau). Auch in der Immunfluoreszenz zeigte sich eine deutliche Abnahme von Kollagen Typ I bei weiterhin darstellbaren Zellen mit schwacher α -SMA Ausprägung.

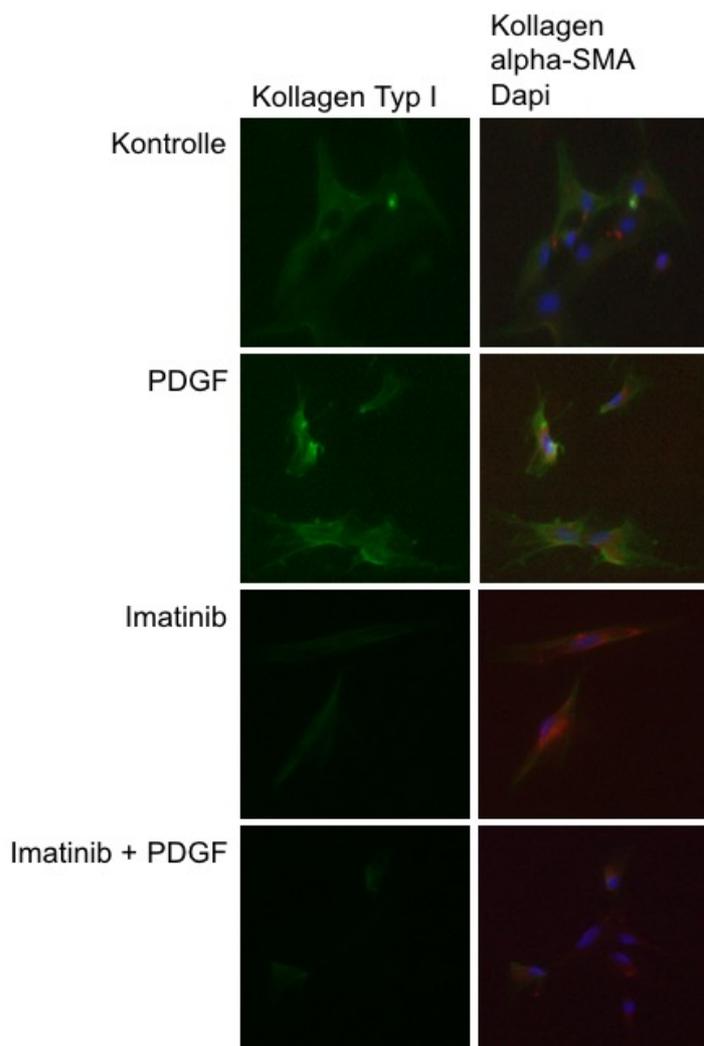


Abbildung 4-11 Bildmorphologische Darstellung der Reduktion von Kollagen Typ I durch Imatinib mesylate in der Immunfluoreszenzfärbung.

PSC der Ratte wurden isoliert, bis etwa 90% Konfluenz in Zellkultur gehalten, passagiert, in Objektträger mit Glaskammer ausgesät und für weitere 24 Stunden in Kultur gehalten. Dann wurde das Zellkulturmedium ohne Zugabe von FKS gewechselt, für 24h belassen und die Zellen ohne oder mit Behandlung von PDGF-BB 25ng/ml, Imatinib mesylate 7 μ M, PDGF-BB 25ng/ml plus Imatinib mesylate 7 μ M für 24h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Aceton fixiert und es erfolgte die Fluoreszenzfärbung auf Kollagen Typ I (grün) sowie alpha-SMA (rot). Die Kernfärbung (blau) wurde mit Bisbenzimid durchgeführt. Links: Kollagen Typ I Darstellung. Rechts: Überlagerung der 3 Färbungen im gleichen Bildausschnitt. Vergrößerung 100x.

5 Diskussion

5.1 Nachweis und Funktionszustand von Pancreatic Stellate Cells

Bereits 1876 gelang Karl von Kupffer in der Leber der Nachweis von Hepatic Stellate Cells (HSC). Die Erstbeschreibung von ähnlichen Zellen im Pankreas folgte erst 1982 (Watari et al., 1982). Dabei wurden Zellen mit reichhaltigem Einschluss von Lipidtröpfchen beschrieben, welche sich als Vitamin-A Einschlüsse herausstellten. Erst nach der Isolation 1998 (M V Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998) wuchs das Wissen über diesen Zelltyp, welcher im Verlauf, entsprechend der HSC, Pancreatic Stellate Cells (PSC) benannt wurde.

PSC zeichnen sich, ähnlich ihrem Gegenüber in der Leber, durch eine Reihe von Zytoskelettmerkmalen und Funktionen aus, die in den Jahren nach der Isolation beschrieben wurden. Inaktive PSC besitzen lange, zytoplasmatische Fortsätze, einen zentralen Zellkörper mit relativ großem Kern, Lipideinschlüsse, sind positiv für Desmin aber negativ für α -SMA und haben eine niedrige Zellteilungsrate. Im aktivierten Zustand wandelt sich der Phänotyp. Es kommt zu einem Verlust der Lipideinschlüsse, Positivität von α -SMA, hohem mitotischen Index und Bildung von Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren (Haber et al., 1999; Karger et al., 2008).

Aufgrund der Tatsache, dass die Zellisolationmethode für die angefertigte Arbeit neu am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf etabliert wurde, sollten einige der oben genannten Charaktereigenschaften der Zellen untersucht werden, um Reinheit, Zellteilung und Funktionszustand unter hiesigen Bedingungen festzustellen.

So konnte gezeigt werden, dass die Zellen an den ersten Tagen nach der Isolation einen zentralen Zellkörper mit Zellausläufern besaßen und sich positiv für Desmin sowie intrazelluläre Lipideinschlüsse färbten (siehe Abbildung 4-2). Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass, während Morphologie und Lipideinschlüsse sich immer ähnlich zeigten, für die Färbungen auf Desmin deutliche Unterschiede bestanden. Dies ist im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen, sehr variablen, Desminexpression in PSC, die zwischen 20 und 40% angegeben wird (Bachem et al., 1998). Im Verlauf von drei Tagen nach der Isolation wurden die Zellen nahezu 100% positiv für α -SMA (siehe Abbildung 4-2) und verloren ihre Lipideinschlüsse, die Zellkörper zeigten sich größer und die Zellteilungsrate nahm einen annähernd exponentiellen Verlauf bis zur Konfluenz (siehe Abbildung 4-1). Diese Eigenschaften wurden so interpretiert, dass die PSC in einen aktivierten Zustand übergegangen sind. α -SMA ist bei dieser Ent-

wicklung kritisch zu hinterfragen. Es ist zwar ein Bestandteil aktivierter Zellen, jedoch werden auch Myofibroblasten positiv für α -SMA mit ihrer Aktivierung. Somit wurde α -SMA im Verlauf eher als ein Transdifferenzierungsmarker für einen myofibroblasten-ähnlichen Phänotypen angesehen, als für einen Marker für die PSC Aktivität per se (Krizhanovsky et al., 2011). Ein stabiles Kriterium für PSC Aktivierung scheint jedoch der Verlust der Lipideinschlüsse zu sein (Erkan et al., 2012).

Zusammenfassend konnten, mit Hilfe der untersuchten Eigenschaften, die PSC erkannt werden, es bestand eine hohe Reinheit von nahezu 100% nach drei Tagen in Kultur und die Zellen zeigten ein typisches Verhalten für Wachstum und Phänotyp nach Aktivierung. Diese Daten sind im Einklang mit der beschriebenen Literatur.

5.2 Stimulation von pPDGF-R β , pERK1/2 und pAKT durch PDGF-BB

Die Stimulation von Pancreatic Stellate Cells (PSC) wurde bereits über eine Vielzahl von Mechanismen beschrieben. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Stimulation durch TGF- β über den TGF- β 1 Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Migration der PSC spielt (M V Apte et al., 1999). Alkohol hingegen bewirkt über eine Steigerung der PDGF induzierten NADPH-Oxidase Aktivität (NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) die Proliferation von PSC (Hu et al., 2007). Hama et al. berichteten, dass Angiotensin II, ein Blutdruck sowie den Salzhaushalt regulierendes Octapeptid des Renin-Angiotensin-Systems, PSC über die Transaktivierung des EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor) zur Proliferation anregte (Hama et al., 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass CTGF (Connective Tissue Growth Factor) in PSC exprimiert wird und dieser autokrin, über Bindung an ein α 5 β 1-Integrin, PSC zur Proliferation und Bildung von ECM stimuliert (Karger et al., 2008).

Der weitaus am besten beschriebene Mechanismus zur Stimulation von PSC ist der Weg über das PDGF-System. So konnten schon früh PDGF-Rezeptoren in aktivierten PSC nachgewiesen werden. Dabei wurde PDGF als stark wirksames Mitogen für PSC identifiziert (M V Apte et al., 1999; Luttenberger et al., 2000; Schneider et al., 2001).

Eine wichtige Rolle für die intrazelluläre Signalweiterleitung des PDGF-Rezeptors spielen die Signalkaskaden über ERK1/2 und AKT. So konnte gezeigt werden, dass PDGF eine Stimulation von ERK1/2 in PSC bewirkt und diese zur Proliferation anregt. Dieser Mechanismus konnte durch die Zugabe von PD98059, einem spezifischen Inhibitor von MEK1/2, unterbunden werden (Jaster et al., 2002). Masamune et

al. zeigten zudem in PSC eine Stimulation durch PDGF sowohl auf die Induktion von pERK1/2 als auch auf pAKT (Masamune et al., 2003). Die Stimulation beider Enzyme konnte durch die Zugabe eines PI3K-Inhibitors, Wortmannin, gehemmt werden, was nahelegt, dass eine Interaktion der beiden Wege in PSC existiert. Diese Interaktion scheint jedoch nur teilweise zu bestehen. So stellten McCarroll et al. dar, dass die Induktion des PI3K/AKT-Signalweges durch PDGF vor allem für die Migration von Bedeutung war, diese jedoch von einer ERK1/2-induzierten Proliferation abhängig war. Durch Inhibition, ebenfalls durch Wortmannin, der PI3K wurde die Aktivierung von ERK1/2 geschwächt, jedoch nicht vollständig gehemmt, was einen alternativen Signalweg über den PDGF-Rezeptor nahelegt (J. A. McCarroll et al., 2004).

Die Stimulation des PDGF-Signalweges über ERK1/2 und AKT sollte auch in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Hierzu erfolgte die Durchführung einer Dosis- und Zeitfindung für PDGF in PSC unter hiesigen Bedingungen (siehe Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4). Für den PDGF-R und ERK1/2 zeigten Dosierungen von 25 ng/ml eine etwas stärkere Aktivierung, während AKT mit 10 ng/ml stärker stimuliert wurde. Aufgrund der Tatsache, dass beide Dosierungen statistisch signifikant waren, wurde die höhere Dosis gewählt, da dies die Untersuchung aller drei Moleküle in einem Experiment ermöglichte. Der Grund für die schwächere Stimulation bei 25 ng/ml PDGF in den Versuchen ist nicht bekannt. Der PDGF-Rezeptor und die bis hierher diskutierten Moleküle haben gemeinsam, dass jeweils von einer unterschiedlichen Beeinflussung ihrer Kinaseaktivität ausgegangen wird. Das bedeutet, dass es jeweils zu einer starken oder weniger starken Phosphorylierung kommt. Letztlich unterliegt der Phosphorylierungsstatus von Molekülen nicht nur der Kontrolle von Kinasen, sondern auch der ihrer Gegenspieler, den sog. Phosphatasen. Dabei handelt es sich um Enzyme, die in der Lage sind phosphorylierte Moleküle wieder zu dephosphorylieren und so ihren Aktivitätszustand zu kontrollieren. Physiologisch aber auch pathophysiologisch handelt es sich somit um ein Kontrollsystem bei der Signalweiterleitung. So könnte z.B. erklärt werden, warum es bei der Verarbeitung von Reizen durch die Zellen, abhängig vom Funktionszustand, zu verschiedenen Zellantworten kommt, oder anders, warum ein Stimulans oder ein Inhibitor z.B. dosisabhängig eine andere Reaktion der Zelle bewirkt.

Im konkreten Beispiel bzgl. der schwächeren Stimulation auf AKT durch eine höhere Dosis PDGF könnte ein Mechanismus sein, dass eine zu starke Aktivierung von AKT

zu einem negativen Feedback-Mechanismus führt. So wurde gezeigt, dass die Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) die Aktivierung von AKT inhibiert, indem die Umwandlung von PIP₂ zu PIP₃ verhindert wird aber auch eine direkte Assoziation mit dem PDGF-Rezeptor stattfindet und dieser dephosphoryliert wird. Es wird angenommen, dass dies darauf beruht, dass PDGF-R bei der Autophosphorylierung zu einem stark negativ geladenen Molekül wird und damit die Aktivität von PTEN erhöht wird (Mahimainathan & Ghosh Choudhury, 2004). So könnte durch starke Aktivierung von PDGF-R die geringere Aktivierung von AKT erklärt werden.

Zur Feststellung des zeitabhängigen Verlaufes bei der Stimulation mit PDGF-BB erfolgte die Untersuchung mit der Dosierung 25 ng/ml auf die Aktivierung von PDGF-R, ERK1/2 und AKT nach 2, 5, 10, 15 und 30 Minuten mit jeweils der stärksten Stimulation nach 5 Minuten und konsekutivem Abfall nach dieser Zeit. In Bezug auf AKT stehen diese Daten etwas im Kontrast zu den Daten von McCarroll et al., wo sich eine gleichbleibende Stimulation über einen Zeitraum von mindestens 60 Minuten gezeigt hat (J. A. McCarroll et al., 2004). Hier wurde jedoch nur eine PDGF Dosis von 10 ng/ml benutzt, die eventuell eine gleichmäßigere Stimulation bewirkte. Auch diese Daten könnten ggf. auf einen negativen Regulationsmechanismus bei starker AKT Aktivierung hindeuten.

5.3 Imatinib mesylate inhibiert pPDGF-R dosisabhängig, bewirkt jedoch in hoher Dosierung die Aktivierung pERK1/2 und pAKT

Imatinib mesylate wirkt als Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) negativ auf die Weiterleitung von Signalkaskaden, vor allem über Bcr-Abl, c-Kit und PDGF-R (Capdeville et al., 2002). Die initiale Entwicklung des Medikamentes erfolgte zur Behandlung der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML), so dass in vielen Studien vor allem die anti-proliferative Wirkung untersucht wurde.

Druker et al. berichteten 1996 über die *in vitro* Ergebnisse an MO7e (human) und 32Dcl3 (murin) Zelllinien, zwei CML-Zelllinien. Dabei zeigten sie nicht nur die anti-proliferativen Eigenschaften von Imatinib mesylate auf die Zellen, sondern berichteten auch über die dosisabhängige Selektivität des Medikamentes für die verschiedenen Tyrosinkinasen. Bcr-Abl, das Molekül, für das Imatinib mesylate entwickelt wurde, und PDGF-R zeigten dabei eine IC₅₀ von nur 0,25 und 0,3µM (jeweils entspre-

chend). Im Vergleich lagen die übrigen IC_{50} Werte, z.B. für EGF-R oder IGF-1R, mit $>100\mu\text{M}$ deutlich darüber. Dies bewirkt eine relative Selektivität von Imatinib mesylate für Bcr-Abl, c-Kit und PDGF-R (Druker et al., 1996).

Buchdunger et al. legten, ebenfalls *in vitro*, dar, dass die Proliferationshemmung in der CML-Mauszelllinie 32D abhängig von der Inhibition auf c-Kit und PDGF-R sowie der konsekutiven Hemmung der Signalwege über ERK1/2 und AKT ist (Buchdunger et al., 2000).

Im Hinblick auf die beschriebenen Wirkungen besitzt Imatinib mesylate auch bei anderen malignen und nicht malignen Erkrankungen therapeutisches Potential. Hwang et al. untersuchten in einem Mausmodell mit orthotoper Transplantation humaner Pankreaskarzinomzellen die Wirksamkeit von Imatinib mesylate in Kombination mit Gemcitabin. Neben der Tatsache, dass das Ansprechen unter Kombinationstherapie signifikant besser war, zeigte sich ebenso eine Abnahme aktivierter (phosphorylierter) PDGF-Rezeptoren (Hwang et al., 2003).

Die Signalwege über ERK und AKT spielen im Hinblick auf eine ganze Reihe von Erkrankungen eine entscheidende Rolle. So entstehen, durch Störungen des ERK-Signalweges, z.B. die autosomal dominant vererbten Krankheitsbilder Neurofibromatose Typ 1 und das Noonan-Syndrom. Dabei handelt es sich beim Ersteren um eine neurokutane Erkrankungen (sog. Phakomatose), bei der es letztlich zu einer vererbten Tumorentstehung kommt, und beim Letzteren um eine Erkrankung, die letztlich den gesamten Organismus betreffen kann, häufig aber vor allem durch kardiale Funktionseinschränkungen bedingt ist (Buscà, Pouysségur, & Lenormand, 2016; Rauen, 2014). Ebenso werden auch eine ganze Reihe von erworbenen Tumorerkrankungen durch Überaktivierung des ERK-Signalweges beschrieben. Beispiele hierfür sind sowohl die Überexpression oder Mutation innerhalb der EGF-Rezeptor-Familie wie beim Lungen- oder Kolonkarzinom (Barber, Vogelstein, Kinzler, & Velculescu, 2004) als auch Punktmutationen im Ras-Gen, die bei über 95% der dukalen Pankreaskarzinome gefunden werden (Bryant, Mancias, Kimmelman, & Der, 2014).

Auch Störungen des AKT-Signalweges spielen bei der Entstehung vieler Tumore eine zentrale Rolle. So kommt es zum Beispiel bei Mamma-, Kolon- und Ovarialkarzinomen zu einer konstitutiven Aktivierung von AKT durch eine Mutation innerhalb einer Domäne des Moleküls. Aber auch auf Rezeptorebene kann es durch Überex-

pression oder aktivierenden Mutation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (EGF-R, PDGF-R) zu einer Überaktivierung von AKT kommen. Für Gliome und endometriale Tumore ist andererseits auch eine Störung des negativen Feedbackmechanismus über PTEN gezeigt worden, so dass das AKT-Signal nicht mehr abgeschaltet werden kann und somit Proliferation sowie Überleben der Tumorzellen gefördert wird. Andere Erkrankungen, bei denen AKT eine pathophysiologische Rolle spielt sind Diabetes mellitus, durch gestörten Einbau von Glukostransportern in die Membran von Muskel- und Fettzellen, und kardiovaskuläre Erkrankungen, wie eine pathologische kardiale Hypertrophie (Hers, Vincent, & Tavar, 2011).

Aufgrund der zentralen Rolle der Kaskaden über ERK1/2 und AKT für Proliferation, Überleben der Zellen und auch Bildung extrazellulärer Matrix wurde dies auch in PSC untersucht. Jaster et al. zeigten, dass die Blockade von MEK1/2, einer ERK1/2 übergeordneten Kinase im MAPK-Signalweg, durch PD98059 zu einer reduzierten Proliferation von PSC führt. Ebenso konnte mittels Trepidil (ein PDGF-R Antagonist), durch Hemmung des PDGF-R und konsekutiver ERK1/2 Inhibition, die Proliferation eingeschränkt werden (Jaster et al., 2002). Dies führte zu der Annahme, dass der Signalweg über PDGF-R und konsekutiv ERK1/2 zur Proliferation von PSC beiträgt. Ähnliches fanden auch Masamune et al. durch die Inhibition des ERK-Signalweges durch PD98059. In dieser Arbeit wurde zudem der AKT Signalweg mittels LY294002 gehemmt. Dabei zeigte sich, dass AKT in PSC die Migration der Zellen steuert, jedoch nicht deren Proliferation (Masamune et al., 2003). In einer anderen Arbeit wurde durch die Verwendung von PD98059 gezeigt, dass unter Inhibition von MEK1/2 auch die Kollagensynthese in PSC unterdrückt wird (Yuantai, Tiancai, & Qiu, n.d.).

Basierend auf diesen Erfahrungen sollte in der vorliegenden Arbeit getestet werden welche Wirkung Imatinib mesylate auf PSC ausübt (siehe Abbildung 4-5). Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung auf die Aktivierung von PDGF-R β mit statistisch signifikanter Inhibition ab einer Dosierung von 1 μ M unter Stimulation mit PDGF-BB 25ng/ml. Imatinib mesylate wurde zuvor für 4 Stunden inkubiert und dann mit PDGF für 5 Minuten stimuliert. Die Vorinkubation wurde gewählt, weil zunächst eine vollständige Bindung des Medikamentes an den Rezeptor gewährleistet werden sollte, um den Effekt von PDGF möglichst maximal zu unterdrücken. Die Daten der Inhibition von pAKT und pERK1/2 zeigten im Vergleich zum PDGF-R ein heterogenes Bild. Weder für ERK1/2 noch AKT zeigte sich bis zu einer Dosierung von 1 μ M eine

signifikante Inhibition, auch wenn die Tendenz zumindest für pERK1/2 vorhanden war. Hier war die Standardabweichung der Proben zu groß um statistische Signifikanz zu erreichen. pAKT zeigte sogar eine leichte Zunahme. Ab einer Dosis von 10 μ M bestand eine deutliche Zunahme sowohl für pAKT als auch für pERK1/2, die ab 20 μ M sogar statistisch signifikant war. Dieser Effekt war bei suffizienter Inhibition von pPDGF-R nicht erwartet worden. Erklären ließe sich dieser Effekt dadurch, dass es ab einer Schwellendosis zwischen 1 und 20 μ M zu einer Induktion von AKT und ERK1/2 kommt, die von den Zellen initiiert wird, um ein Zellüberleben zu sichern oder in Apoptose zu gehen. Denkbar wäre auch, dass, nach Inhibition des PDGF-Rezeptors, davon unabhängige Signale zur Stimulation von ERK1/2 und AKT führen, z.B. über autokrine Mechanismen der PSC. Statistisch gesehen könnte durch Vergrößerung der Zahl der Einzelexperimente ggf. eine für die niedrigen Dosen statistisch signifikante Inhibition erreicht werden, was jedoch das Ergebnis der höheren Dosierungen wahrscheinlich nur noch deutlicher machen würde. Auch ist bei dem Ergebnis an ein technisches Problem, wie zuvor bereits geschädigte Zellen, fehlerhafte Behandlung der Zellen oder Fehler bei der Zubereitung der Stimulantien und Inhibitoren zu denken. Die Ergebnisse stellen jedoch 4 unabhängige Experimente dar, die Zellen wurden zuvor auf Viabilität mittels Trypan Blau überprüft, die Zellkulturen waren nicht kontaminiert (Durchführung einer Untersuchung auf Mykoplasmen und Pilze) und die jeweiligen Therapeutika wurden frisch zubereitet. Zur Untersuchung dieser Ergebnisse wären weitere Schritte nötig, um den Einfluss von Imatinib mesylate auf die einzelnen Aspekte der Signalkaskaden zu untersuchen.

5.4 Imatinib mesylate hemmt die Proliferation von Pancreatic Stellate Cells ohne die Induktion von Apoptose

Die meisten Zellen des menschlichen Organismus besitzen eine endliche Lebensspanne. Vereinfacht ist damit letztlich das Überleben der Zellen und auch des Gesamtorganismus assoziiert. Lebensstil-assoziierte Erkrankungen, wie zum Beispiel kardiovaskuläre Erkrankungen oder Diabetes mellitus, treten mit zunehmendem Alter oder bestimmtem Lebensstil gehäuft auf. Viele der zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht vollständig verstanden. Aus genetischen Untersuchungen ist jedoch bekannt, dass vor allem Komponenten des DNA-Reparatur-Systems, Tumorsuppressor-Gene, die Kontrolle von Telomeren oder auch metabolische Signalwege, wie der Insulin/AKT-Signalweg von besonderer Relevanz sind. Die meisten dieser Moleküle

spielen auch eine Rolle bei der Regulation zellulärer Seneszenz. Unter zellulärer Seneszenz versteht man einen Zellzyklusarrest, der bewirkt, dass die Zellen sich nicht mehr teilen können und letztlich ihre organspezifische Funktion nicht mehr aufrechterhalten können. Dabei handelt es sich um einen, in der Regel, irreversiblen Prozess (Minamino, 2010).

In einem murinen Modell zur Untersuchung der Leberfibrose konnte gezeigt werden, dass es im fibrotischen Organ zu einer Akkumulation von seneszenten Zellen kommt. Diese Zellen sind vor allem Hepatic Stellate Cells, die ähnlich zum Pankreas, als Reaktion auf einen schädigenden Reiz proliferieren und extrazelluläre Matrix bilden. In Mäusen, denen Schlüsselregulatoren zur Induktion von Seneszenz fehlen, bleibt dieser Mechanismus der HSC bestehen und die Fibrose des Organs schreitet fort. Im Umkehrschluss wurde für Mäuse mit der Fähigkeit zur zellulären Seneszenz gezeigt, dass HSC nicht mehr proliferieren und weniger extrazelluläre Matrix bilden. Schließlich kam es so zu einer Begünstigung der Fibrosereparatur durch die Beseitigung von seneszenten Zellen durch natürliche Killerzellen (Krizhanovsky et al., 2011).

Basierend auf der unter 4.5 und 4.6 beschriebenen Wirkung von Imatinib mesylate auf die Zellproliferation und in Anlehnung an die Rolle zellulärer Seneszenz in Bezug auf die positive Entwicklung in der Leberfibrose, sollte in PSC untersucht werden, ob sich die Proliferation mittels Imatinib mesylate hemmen ließ. Dazu erfolgte die Durchführung eines MTT-Assay. Nach 72 Stunden Inkubation bestand eine statistisch signifikante Inhibition im Vergleich zwischen den Zellen, die mit nur PDGF behandelt wurden und denjenigen, die zusätzlich noch mit Imatinib mesylate behandelt wurden. Das Signal für die mit Imatinib mesylate behandelten Zellen unterschied sich dabei nicht signifikant von der Tag 0 Kontrolle. Dies spricht dafür, dass zwar keine weitere Proliferation bestand, die Zellen jedoch auch nicht starben (siehe Abbildung 4-6).

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im Western Blot untersucht, ob es zur Aktivierung von Caspase-3 kommt. Caspase-3 ist eine sogenannte Effektor-Caspase und wird als Schlüsselenzym bei der Apoptose angesehen, da sie an zentraler Position der verschiedenen Apoptosesignalwege sitzt. Das bedeutet, dass sie sowohl extrinsische (Induktion der Apoptose von außerhalb der Zelle, z.B. über TNF-Rezeptoren) wie auch intrinsische (Induktion von Apoptose durch eine Vielzahl von Stimuli, die alle eine Veränderung der inneren Mitochondrienmembran bewirken) Apoptosesignale verarbeitet. Zudem stellt sie die Endstrecke für alle sogenannten Initiator-Caspasen dar. Wird Caspase-3 aktiviert, kommt es zu einer Spaltung mit

Entstehung von drei Spaltprodukten, der vollständigen Caspase mit 35kDa, einem p19 (19kDa) und einem p17 (17kDa) Spaltprodukt.

Bei Durchführung der Experimente konnte gezeigt werden, dass keine der verwendeten Dosierungen von Imatinib mesylate im Vergleich zur Positivkontrolle Cisplatin nach 48 Stunden eine Apoptose der Zellen bewirkte (siehe Abbildung 4-7). Die unterschiedliche Stimulationszeit im Vergleich zum MTT-Assay musste gewählt werden, da sich die Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Cisplatin vom Zellkulturboden ablösten, somit also nicht mehr lebendig waren und nicht zur Positivkontrolle verwendet werden konnten. Mikroskopisch schienen dabei die mit Imatinib mesylate behandelten Zellen intakt. In der Zusammenschau mit den Proliferationsdaten aus dem MTT-Assay unterstreicht die Beobachtung des Verhaltens von Caspase-3, dass PSC unter Behandlung mit Imatinib mesylate eine reduzierte Zellteilung aufweisen, jedoch nicht sterben. Zu erklären wäre dieser Mechanismus dadurch, dass es zu einem Zellzyklusarrest kommt und die Zellen sogar wieder in einen inaktiven Zustand übergehen. Dass der Zellzyklusarrest eine potenzielle Option ist, zeigen die Ergebnisse an PSC, in denen es durch die Wirkungen von Cholecystokinin (CCK) und Gastrin zur einer Proliferationshemmung kam und woraufhin die Zellen in einen G1-Zellzyklusarrest übergingen (Berna et al., 2010). Ähnliche Daten wurden auch zur Wirkung von Ellagsäure, einem Polyphenol, und den Vitamin-A Derivaten All-trans Retinsäure (ATRA) und 9-cis Retinsäure (9-RA) beschrieben (Masamune et al., 2005; J. a McCarroll et al., 2006). Um festzustellen, dass Imatinib mesylate in PSC die Fähigkeit besitzt einen Zellzyklusarrest zu bewirken, wären z.B. Untersuchungen zum Zustand von p21 und p27 oder durchflusszytometrische Analysen mit Propidiumiodidfärbung nötig.

5.5 Imatinib mesylate inhibiert die profibrogenetischen Eigenschaften von Pancreatic Stellate Cells durch Reduktion der Kollagensynthese

Die Entstehung einer Fibrose, als Komplikation und häufige Endstrecke einer chronischen Erkrankung, ist in vielen Organsystemen belegt. Allen gemeinsam sind die sehr eingeschränkten Therapieoptionen und die im Verlauf abnehmende Organfunktion bis hin zur vollständigen Insuffizienz. Diese kann, wenn möglich, eine Organtransplantation zur Folge haben.

Bei der renalen interstitiellen Fibrose kommt es beispielsweise über einen ähnlichen Mechanismus, wie unter 5.2 durch Alkohol im Pankreas beschrieben (Hu et al.,

2007), bei dem es durch NADPH zu einem vermehrten Anfall von ROS kommt. Die daraus resultierende Fibrose im Tiermodell kann durch die Hemmung von NADPH mittels der antifibrotischen Substanz Fluorofenidon abgemildert werden (Qin et al., 2013).

In dermalen Fibroblasten von Patienten mit Systemischer Sklerose, einer chronischen Erkrankung mit Fibrose der Haut und der inneren Organe, konnte die Kollagensynthese mittels Imatinib mesylate sowohl in unbehandelten als auch mit TGF- β oder PDGF behandelten Zellen unterdrückt werden (Distler et al., 2007).

Im Tiermodell zur idiopathischen Lungenfibrose wurde mittels Bleomycin eine Fibrose der Lunge induziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Imatinib mesylate, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, bei isolierten Fibroblasten die Entstehung einer Lungenfibrose bzw. die profibrotischen Eigenschaften der Fibroblasten einschränken konnte. Der antifibrotische Effekt erfolgte über die Inhibition von TGF- β und PDGF (Aono et al., 2005; Daniels et al., 2004). Etwas später zeigten Kulkarni et al. an humanen Fibroblasten von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose, dass der TGF- β Signalweg ebenfalls durch Liganden am Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ (PPAR- γ) gehemmt werden kann. Dieser Mechanismus erfolgte über die Hemmung des PI3K/AKT-Signalweges (Kulkarni et al., 2011).

Hepatic Stellate Cells (HSC) sind den PSC sehr ähnlich und spielen bei der Entwicklung der Leberfibrose eine zentrale Rolle. In kultivierten HSC stellt PDGF eines der potentesten mitogenen Signale dar. Gleichzeitig wird der PDGF-R β sehr stark exprimiert. Eine ausgeprägte Expression beider Moleküle in HSC wird besonders sowohl im Rahmen einer akuten als auch chronischen Leberschädigung beobachtet. Bei medikamentöser Inhibition kommt es im experimentellen Modell zu einer geringeren Fibrose der Leber. Auf zellulärer Ebene konnte in HSC eine antiproliferative und antifibrotische Wirkung von Imatinib mesylate nachgewiesen werden (Kim et al., 2013). Darüber hinaus induzierte der Cyclo-Oxygenase 2 (COX2) Hemmer Celecoxib eine Apoptose in HSC und über die Hemmung von AKT eine Verbesserung der Leberfibrose im Tiermodell bewirken (Paik et al., 2009).

Neben einer erhöhten Stimulation des PDGF-R auf der einen Seite, scheint auf der anderen Seite dessen Regulation durch Phosphatasen in der Leber eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass eine loss of function Mutation von PTEN zu Steatohepatitis, Fibrose und im Verlauf zu einem Hepatozellulären Karzinom führen kann (Borkham-Kamphorst & Weiskirchen, 2015).

In PSC bewirkte die Hemmung durch PD98059, einem spezifischen Inhibitor von MEK1/2, die Runterregulation sowohl von EKR1/2 als auch von Kollagen $\alpha 1$ Typ 1 (Yuantai et al., n.d.), einem Vorläufer von Kollagen Typ 1. Ähnlich zum oben beschriebenen System in Lungenfibroblasten kommt es in PSC zur Inhibition ihrer Aktivierung durch Liganden von PPAR- γ aber auch zur Unterdrückung von profibrogenen Eigenschaften wie der Kollagensynthese (Masamune et al., 2002). Ein Beispiel hierfür sind Thiazolidinedion-Derivate, sogenannte Insulin-Sensitizer, die im Tiermodell der chronischen Pankreatitis eine deutliche Besserung von Inflammation und fibrotischem Umbau zeigten (Shimizu et al., 2002). Camostat mesylate, ein oraler Proteaseinhibitor, der in Japan bereits am Patienten genutzt wurde, bewirkte eine Hemmung der Proliferation, jedoch nicht der Kollagensynthese, in PSC. Dennoch entwickelten die Ratten im Tiermodell keine Pankreasfibrose (Gibo et al., 2005).

Basierend auf der offensichtlich relevanten pathophysiologischen Rolle von PDGF und PDGF-R im Rahmen der Leberfibrose und der Notwendigkeit einer Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten bei der Pankreasfibrose, sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Imatinib mesylate auf das fibrogenetische Potenzial der PSC untersucht werden (siehe Abbildungen Abbildung 4-8, Abbildung 4-9, Abbildung 4-10 und **Abbildung 4-11**).

Die Kollagensynthese wurde in dosisabhängiger Weise bereits ab einer Dosierung von $7\mu\text{M}$ statistisch signifikant inhibiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Imatinib mesylate nach 24 Stunden bereits die Freisetzung von Kollagen aus den Zellen hemmt und die Wirkung selbst bis auf Transkriptionsebene eine Rolle zu spielen scheint. In allen Versuchen besteht jedoch der Eindruck, dass die Stimulation durch PDGF keine Wirkung auf die Kollagensynthese hat. Die Stimulationszeit betrug in allen Versuchen 24 Stunden, dabei wurde PDGF einmalig gewechselt. Letztlich kann eine zu geringe PDGF-Menge dafür verantwortlich sein, da die biologische Aktivität im Zellkulturschrank nur kurz ist und so kumulativ zu wenig PDGF vorhanden war, um einen Effekt zu erzielen. Andererseits wäre auch eine PDGF-R unabhängige Hemmung der Kollagensynthese möglich.

6 Zusammenfassung

Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis kommt es zu einem bedeutsamen Anteil an Morbidität und Mortalität. Ein zentrales Kriterium bei der Krankheitsentstehung ist die Entwicklung einer Pankreasfibrose. Diese zeichnet sich durch den vermehrten Anfall extrazellulärer Matrix aus. Die fibrotischen Umbauprozesse bei der chronischen Pankreatitis sind begleitet von Schmerzen, Irregularitäten des Gangsystems, Maldigestion und im Verlauf einem zunehmenden Untergang des funktionellen Pankreasgewebes mit exokriner und endokriner Insuffizienz.

Die zentrale Rolle für die Produktion extrazellulärer Matrix spielen die Pancreatic Stellate Cells (PSC), welche durch verschiedene Stimuli der sie umgebenden Zellen des Pankreas, Zellen des Immunsystems, durch autokrine Mechanismen oder durch schädigende Noxen direkt aktiviert werden können. Bei der Aktivierung kommt es zur Änderung des Phänotyps und Funktionszustandes sowie zur Proliferation. Kann der schädigende Reiz beendet werden, können die Zellen wieder in ihre inaktive Form übergehen oder es kommt zur Apoptose. Bei fortgesetzter Schädigung des Organs verbleiben die Zellen in ihrem aktivierten Zustand und die Produktion extrazellulärer Matrix sowie von Entzündungsmediatoren bleibt bestehen, so dass der fibrotische Umbau fortschreitet.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die vor Ort neu etablierte Zellisolation funktionierte und einen hohen Grad an Reinheit sowie, der Literatur entsprechender, Funktionalität von PSC abbilden konnte. Die Stimulation durch PDGF aktivierte den PDGF-Rezeptor β und die Signalkaskaden über ERK1/2 und AKT in Zeit- und Dosisabhängigkeit, wobei AKT etwas mehr in niedrigerer Dosierung stimuliert wurde.

Imatinib mesylate inhibierte den PDGF-Rezeptor ab einer Dosierung von $1\mu\text{M}$. Die inhibitorische Wirkung auf ERK1/2 und AKT erreichte keine statistische Signifikanz, sondern bewirkte, entgegen der Erwartung, ab einer Dosierung $20\mu\text{M}$ sogar eine Stimulation der Signalwege. Dieser Einfluss ließe sich durch die Induktion von Mechanismen erklären, die das Zellüberleben in Anwesenheit des schädigenden Reizes Imatinib mesylate anstreben. Gleichzeitig legt es nahe, dass die Hemmung der Zellfunktionen über den PDGF-Rezeptor über alternative Signalwege in die Zelle weitergeleitet wird. Der Einfluss von Imatinib mesylate auf Modifikationen an den untersuchten Signalwegen oder die Beeinflussung anderer Signalwege in PSC, die eine Induktion von ERK1/2 und AKT zur Folge haben, muss weiter untersucht werden.

Zur Analyse funktioneller Eigenschaften wurden die PSC auf ihre proliferatorischen und profibrotischen Eigenschaften unter Stimulation von PDGF und Inhibition durch Imatinib mesylate untersucht.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass Imatinib mesylate die Proliferation von PSC hemmt und dieser Mechanismus höchstwahrscheinlich nicht durch Apoptose bedingt war. Denkbar wäre hier, dass die Wachstumshemmung durch die Induktion eines Zellzyklusarrests erreicht wird. Diese Beobachtung unterstreicht einen potentiellen Nutzen von Imatinib mesylate bei der Wiederherstellung eines inaktiven Phänotypen.

Kollagen spielt als Komponente der extrazellulären Matrix bei der Pankreasfibrose eine entscheidende Rolle. Imatinib mesylate konnte die Bildung von Kollagen Typ I in PSC signifikant reduzieren. Diese Inhibition wurde schon nach 24 Stunden sowohl in Bezug auf die Freisetzung von Kollagen im Zellüberstand nachgewiesen als auch bei der Proteinsynthese und mRNA Expression. Dies legt nahe, dass Imatinib mesylate auf der Ebene der Genexpression direkt die Bildung von Kollagen Typ I unterdrückt. Vermittelt werden diese Prozesse wahrscheinlich über eine Suppression der PDGF-Rezeptor Aktivität aber anhand der inkongruenten Daten zur Inhibition der ERK1/2 und PI3K/AKT Signalwege erfolgte die Weiterleitung der Informationen möglicherweise über eine alternative Signalkaskade.

Anhand der suppressiven Wirkung auf die proliferativen und profibrotischen Eigenschaften der PSC stellt die Behandlung der Pankreasfibrose mit Imatinib mesylate in Zukunft möglicherweise eine Option dar, um die durch die PSC induzierten Veränderungen zu reduzieren und so den Erkrankungsverlauf der Patienten zu verbessern. Die Mechanismen, welche die Wirkung des Medikamentes in PSC bedingen, müssen dabei noch weiter untersucht werden.

7 Summary

Chronic pancreatitis is accompanied by an extensive amount of morbidity and mortality. During the course of the disease a central pathogenic mechanism is the development of pancreatic fibrosis. This in turn is characterized by an excessive production of extracellular matrix. The fibrotic reconstruction during pancreatic inflammation comes along with pain, irregularities of pancreatic ducts, maldigestion, and further on an increasing demise of functionally intact pancreatic tissue. This leads to exocrine and endocrine insufficiency of the organ.

Pancreatic Stellate Cells (PSC) play a pivotal role concerning the production of extracellular matrix. On one hand PSC are stimulated by surrounding cells, such as immune cells or other pancreatic cells, via autocrine mechanisms. On the other hand they can be activated by harmful noxa. During activation PSC change their phenotype as well as their functional and proliferatory status. If the damaging stimulus comes to an end, PSC return to their inactive form or apoptosis occurs. When the organ damage continues PSC stay in their active state and excessive amounts of extracellular matrix and inflammatory mediators are produced. This in turn expedites the progression of fibrosis.

For this thesis the cell isolation technique was newly established at the University Medical Center Hamburg Eppendorf. The isolation produced a high grade of purity and functionally intact PSC. The stimulation by PDGF activated the PDGF-receptor β and the signaling pathways via ERK1/2 and AKT in a time- and dose-dependent manner, in which AKT stimulation was higher in smaller dosages.

Imatinib mesylate inhibited the PDGF-receptor at a dosage as small as 1 μ M. The inhibitory effect on ERK1/2 and AKT was not statistically significant but showed, against all expectations, even a stimulatory effect from dosages of 20 μ M and higher. This action could be explained by mechanisms leading to cell survival under the influence of a damaging agent such as Imatinib mesylate. Another explanation could be that the inhibitory signals are transduced via different pathways into the cells. Finally those mechanisms have not been elucidated to date and need further examination.

In order to analyze functional aspects, proliferatory and profibrotic properties of PSC were examined under stimulation of PDGF and inhibition by Imatinib mesylate.

Imatinib mesylate was able to decrease proliferation in PSC. This mechanism seemed to be independent of apoptosis and was possibly due to a cell cycle arrest.

This would emphasize the potential benefit of Imatinib mesylate to restore an inactive phenotype of PSC.

As an extracellular matrix component collagen plays a crucial role during pancreatic fibrosis. The production of collagen type I was inhibited by Imatinib mesylate significantly. This effect was observed after 24 hours for collagen in cell culture supernatants as well as collagen protein synthesis and mRNA expression, suggesting that Imatinib mesylate inhibits collagen production directly on gene expression level.

These processes are most likely moderated via the PDGF-receptor but the incongruent data on inhibition of ERK1/2 and AKT raises the question whether these actions are possibly mediated via alternative pathways.

Due to the suppressive effects on proliferatory and profibrotic properties of PSC Imatinib mesylate might be an option for the treatment of pancreatic fibrosis in the future, possibly leading to a positive influence on disease development in patients.

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Zusammensetzung Verdauungsenzymlösung	20
Tabelle 3-2 Zusammensetzung Waschpuffer für die Zellisolation.....	20
Tabelle 3-3 Zusammensetzung Zellkulturmedien	21
Tabelle 3-4 Pipettierschema zur Herstellung der PDGF-BB Konzentrationen aus der hergestellten Stammlösung.....	24
Tabelle 3-5 Pipettierschema zur Herstellung der Imatinib mesylate Konzentrationen aus der hergestellten Stammlösung.....	25
Tabelle 3-6 Zusammensetzung Lysepuffer	28
Tabelle 3-7 Pipettierschema für die BSA-Standardreihe im BCA-Assay	30
Tabelle 3-8 Zusammensetzung des 5-fach konzentrierten Laemmli-Puffer	32
Tabelle 3-9 Zusammensetzung der Lösungen für Trenn- und Sammelgel.	34
Tabelle 3-10 Zusammensetzung des Laufpuffers für die SDS-PAGE	36
Tabelle 3-11 Zusammensetzung des Blotpuffers für den Western Blot.....	37
Tabelle 3-12 Zusammensetzung und Herstellung von TBS/T.....	39
Tabelle 3-13 Zusammensetzung und Herstellung der Stripping-Lösung	39
Tabelle 3-14 Verwendete Antikörper im Western Blot.	40
Tabelle 3-15 Verwendete Antikörper in der Immunzytochemie und Immunfluoreszenz.	44
Tabelle 3-16 Verwendete Antikörper im ELISA.....	48
Tabelle 3-17 Pipettierschema zur Elimination genomischer DNA in der Reversen Transkription.....	52
Tabelle 3-18 Pipettierschema zur Reversen Transkription.	53
Tabelle 3-19 Pipettierschema für die quantitative PCR mittels mit LightCycler® FastStart DNA Master Sybr green 1.....	54
Tabelle 3-20 Verwendete Primer in der qPCR.	56

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Computertomographie des oberen Abdomen.	3
Abbildung 2-2 Normales Pankreas mit seziiertem ventralen Anteil zur Darstellung des Gangsystems.	3
Abbildung 2-3 Humanes Pankreas in H&E-Färbung.	4
Abbildung 2-4 Schematische Darstellung einer Azinuszelle bei der Pankreatitis.	5
Abbildung 2-5 Nekrose-Fibrose-Sequenz.	6
Abbildung 2-6 SAPE-Hypothese zur Ätiologie der chronischen Pankreatitis.	7
Abbildung 2-7 PSC im Pankreasgewebe.	9
Abbildung 2-8 Mechanismus der PSC Aktivierung.	11
Abbildung 2-9 Einfluss von PSC auf Tumorinvasion und Desmoplasie.	11
Abbildung 2-10 Schematische Darstellung des PDGF-Rezeptors.	12
Abbildung 2-11 Affinität der PDGF Isoformen zu den PDGF-Rezeptoren.	12
Abbildung 2-12 Überblick über den Raf/MEK/ERK-Signalweg via PDGF-R.	14
Abbildung 2-13 Überblick über den PI3K/AKT-Signalweg via PDGF-R.	16
Abbildung 2-14 Strukturformel von Imatinib mesylate.	17
Abbildung 2-15 Affinität von Imatinib mesylate zu verschiedenen Tyrosinkinase... ..	18
Abbildung 3-1 Graphische Darstellung der Zellzählung.	22
Abbildung 3-2 Darstellung BCA-Reaktion	30
Abbildung 3-3 Zusammensetzung der Elektrophoresekammer.	35
Abbildung 3-4 Vorbereitung und des Aufbaus der Blot-Kammer.	37
Abbildung 3-5 Schematische Darstellung eines indirekten ELISA.	47
Abbildung 3-6 Programm in der PCR-Maschine für die RT-PCR.	53
Abbildung 3-7 Programm für den LightCycler® zur Durchführung der quantitativen PCR.	55
Abbildung 4-1 Wachstumskinetik von PSC.	57
Abbildung 4-2 Darstellung Zell-spezifischer Charakteristika.	58
Abbildung 4-3 Dosisabhängigkeit von PDGF-BB für die Stimulation von PDGF-Rezeptor beta, ERK 1/2 und AKT.	60
Abbildung 4-4 Zeitabhängigkeit von PDGF-BB für die Stimulation von PDGF-Rezeptor beta, ERK 1/2 und AKT.	62
Abbildung 4-5 Dosisabhängige Wirkung von Imatinib mesylate auf PDGF-Rezeptor beta, ERK 1/2 und AKT.	64

Abbildung 4-6 Effekt von PDGF-BB und Imatinib mesylate auf die Proliferation von PSC.	65
Abbildung 4-7 Effekt von Imatinib mesylate auf die Induktion von Apoptose.	67
Abbildung 4-8 Dosisabhängige Inhibition durch Imatinib mesylate auf Kollagen Typ I im Zellüberstand.	68
Abbildung 4-9 Dosisabhängige Reduktion von zytoplasmatischem Kollagen Typ I durch Imatinib mesylate.	69
Abbildung 4-10 Dosisabhängige Reduktion der Genexpression von Kollagen Typ I durch Imatinib mesylate.	70
Abbildung 4-11 Bildmorphologische Darstellung der Reduktion von Kollagen Typ I durch Imatinib mesylate in der Immunfluoreszenzfärbung.	71

10 Abkürzungsverzeichnis

A

AKT..... auch PKB, Proteinkinase B
 APS Ammoniumpersulfat
 ATRA.....All-trans Retinsäure

B

Bad Bcl-2-Antagonist of Cell Death
 BCA Bicinchoninsäure
 Bcr-Abl..... Philadephia Chromosom mit gleichnamigem Fusionsprotein
 Bim Bcl-2-like protein 11

C

CCK..... Cholecystkinin
 cDNA Komplementär-DNA
 CFTR.....Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
 c-Myc..... c-Myelocytomatose
 COX2..... Cyclo-Oxygenase 2
 CREB..... cAMP response element-binding protein
 CTGF..... Connective tissue growth factor

D

DMSO..... Dimethylsulfoxid
 DNA..... Desoxyribonukleinsäure
 dNTPs..... Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
 DTT..... Dithiothreitol

E

ECM..... Extrazelluläre Matrix
 EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
 EGF-R Epidermal Growth Factor Receptor
 ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay
 Elk..... ETS domain-containing protein Elk-1

ERK1/2 Extracellular regulated kinases 1/2

F

FGF Fibroblast growth factor

FKS..... Fetales Kälberserum

Foxo3 Forkhead box O3

G

GDP Guanosindiphosphat

Grb2 Growth factor receptor bound protein 2

GTP Guanosintriphosphat

H

HBSS..... Hank's balanced salt solution

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

HIV..... Humanes Immundefizienz-Virus

HRP horseradish peroxidase

HSC..... Hepatic Stellate Cells

I

IC₅₀ Halb maximale inhibitorische Konzentration

IGF-1R..... Insulin-like growth factor receptor 1

IL-1 β Interleukin 1beta

IL-6 Interleukin 6

IL-8 Interleukin 8

Ins-R..... Insulinrezeptor

J

JNK..... C-Jun-N-terminal Kinases

M

MAPK Mitogen-activated-protein-kinases

MEK1/2..... Mitogen-activated protein kinase kinase

MMP Matrix Metalloproteinasen

mRNA..... messenger RNA

mTOR..... Mechanistic target of rapamycin
 MTT Thiozolyblau

N

NaCl..... Natriumchlorid
 NADPH.....Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
 NEAS..... Nicht-essenziellen Aminosäuren
 NF-κB Nuclear factor-kappa B

P

p53 Tumor suppressor p53
 p90RSK p90 Ribosomal S6 kinase
 PBS Phosphat-buffered saline
 PCR..... Polymerase Kettenreaktion
 PDGF..... Platelet-derived Growth Factor
 PDGF-R..... Platelet-derived Growth Factor Receptor
 PDK1Phosphoinositol-dependent Kinase 1
 PFA..... Paraformaldehyd
 PI3K..... Phosphoinositid-3-Kinase
 PIP₂ Phosphatidylinositol Biphosphat
 PIP₃ Phosphatidylinositol Triphosphat
 PMSF.....Phenylmethylsulfonylfluorid
 PPAR-γ..... Peroxisome Proliferator-activated Receptor-γ
 PRSS1.....PRSS1 Protease Serin 1
 PSC Pancreatic Stellate Cell(s)

Q

qPCR.....quantitative Polymerase Kettenreaktion

R

Raf.....Rapidly accelerated fibrosarcoma
 RNA..... Ribonukleinsäure
 ROS..... Reactive oxygen species
 9-RA 9-cis Retinsäure

S

SAPE Sentinel Acute Pancreatitis Event
SDS Natriumdodecylsulfat
Shc Squalene Hopene Cyclase
SOS Son of sevenless
SPINK1 Serin protease inhibitor Kazal-type-1

T

TBS/T Tris-buffered saline und Tween 20
Temed Tetramethylethylendiamin
TGF β 1 Transforming growth factor β 1
TIMP Tissue inhibitor of metalloproteinases
TKI Tyrosinkinaseinhibitor
TMB Tetramethylbenzidin
TNF- α Tumor necrosis factor alpha
TRAIL Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tris Trishydroxymethylaminomethan

V

VEGF Vascular endothelial growth factor
VEGF-R Vascular endothelial growth factor receptor

11 Literaturverzeichnis

- Aono, Y., Nishioka, Y., Inayama, M., Ugai, M., Kishi, J., Uehara, H., ... Sone, S. (2005). Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1279–1285. <http://doi.org/10.1164/rccm.200404-531OC>
- Apte, M. V., Pirola, R. C., & Wilson, J. S. (2006). Battle-scarred pancreas: Role of alcohol and pancreatic stellate cells in pancreatic fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 21(SUPPL. 3), 97–101. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04587.x>
- Apte, M. V, Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., ... Wilson, J. S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 43(1), 128–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1727174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Apte, M. V, Haber, P. S., Darby, S. J., Rodgers, S. C., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., ... Wilson, J. S. (1999). Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*, 44(4), 534–41. <http://doi.org/10.1136/gut.44.4.534>
- Bachem, M. G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., ... Adler, G. (1998). Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*, 115(2), 421–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679048>
- Barber, T. D., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., & Velculescu, V. E. (2004). Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *The New England Journal of Medicine*, 351, 2883. <http://doi.org/10.1056/NEJM200412303512724>
- Berna, M. J., Seiz, O., Nast, J. F., Benten, D., Bl??ker, M., Koch, J., ... Pace, A. (2010). CCK1 and CCK2 receptors are expressed on pancreatic stellate cells and induce collagen production. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 38905–38914. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.125534>
- Blanke, C. D., Rankin, C., Demetri, G. D., Ryan, C. W., von Mehren, M., Benjamin, R. S., ... Borden, E. C. (2008). Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol*, 26(4), 626–632. <http://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.4452>
- Borkham-Kamphorst, E., & Weiskirchen, R. (2015). The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 28, 53–61. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.10.002>
- Braganza, J., Lee SH, McCloy RF, & McMahon MJ. (2011). Chronic pancreatitis. *Lancet*, 377, 1184–1197. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61852-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61852-1)
- Braganza, J. M. (1996). The pathogenesis of chronic pancreatitis. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 89(4), 243–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8733510>
- Braganza, J. M. (2001). Towards a novel treatment strategy for acute pancreatitis - 2. Principles and potential practice. *Digestion*, 63(3), 143–162.

- Bryant, K. L., Mancias, J. D., Kimmelman, A. C., & Der, C. J. (2014). KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(2), 91–100. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>
- Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J., & Lydon, N. B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(1), 139–145.
- Buscà, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2016). ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(June), 1–23. <http://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053>
- Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., & Matter, A. (2002). Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(7), 493–502. <http://doi.org/10.1038/nrd839>
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37–40. <http://doi.org/10.1038/35065000>
- Cook, L. J., Musa, O. A., & Case, R. M. (1996). Intracellular Transport of Pancreatic Enzymes. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31(sup219), 1–5. <http://doi.org/10.3109/00365529609104990>
- Daniels, C. E., Wilkes, M. C., Edens, M., Kottom, T. J., Murphy, S. J., Limper, A. H., & Leof, E. B. (2004). Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- β and prevents bleomycin mediated lung fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(9), 1308–16. <http://doi.org/10.1172/JCI200419603>
- Detlefsen, S., Sipos, B., Feyerabend, B., & Klöppel, G. (2006). Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, 19(8), 1019–26. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3800613>
- DiMagno, M., & Wamsteker, E. (2012). Pancreas Divisum. *Current Gastroenterology Reports*, 13(2), 150–156. <http://doi.org/10.1007/s11894-010-0170-8>
- Distler, J. H. W., Jüngel, A., Huber, L. C., Schulze-Horsel, U., Zwerina, J., Gay, R. E., ... Distler, O. (2007). Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis and Rheumatism*, 56(1), 311–322. <http://doi.org/10.1002/art.22314>
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., ... Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmerman, J.; Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine*, 2(5), 561–566. <http://doi.org/10.1038/nm0596-561>
- Ebert, M., Kasper, H. U., Hernberg, S., Friess, H., Büchler, M. W., Roessner, A., ... Malfertheiner, P. (1998). Overexpression of platelet-derived growth factor (PDGF) B chain and type beta PDGF receptor in human chronic pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(3), 567–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539653>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [http://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](http://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)

- Erkan, M., Adler, G., Apte, M. V., Bachem, M. G., Buchholz, M., Detlefsen, S., ... Wilson, J. (2012). StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*, *61*(2), 172–8. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301220>
- Erkan, M., Kleeff, J., Gorbachevski, A., Reiser, C., Mitkus, T., Esposito, I., ... Friess, H. (2007). Periostin Creates a Tumor-Supportive Microenvironment in the Pancreas by Sustaining Fibrogenic Stellate Cell Activity. *Gastroenterology*, *132*(4), 1447–1464. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.031>
- Etemad, B., & Whitcomb, D. C. (2001). Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*, *120*(3), 682–707. <http://doi.org/S001650850100796X> [pii]
- Frulloni L et al. (2009). Chronic pancreatitis: report from a multicenter Italian survey (PanCrolnfAISP) on 893 patients. *Digestive and Liver Disease*, *41*(4), 311–17. <http://doi.org/10.1016/j.dld.2008.07.316>
- Garg, P. K., & Tandon, R. K. (2004). Survey on chronic pancreatitis in the Asia-Pacific region. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *19*(9), 998–1004. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03426.x>
- Gibo, J., Ito, T., Kawabe, K., Hisano, T., Inoue, M., Fujimori, N., ... Nawata, H. (2005). Camostat mesilate attenuates pancreatic fibrosis via inhibition of monocytes and pancreatic stellate cells activity. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *85*(1), 75–89. <http://doi.org/10.1038/labinvest.3700203>
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, *J. Cell Biol.* *100* (1985) 965–973. *The Journal of Cell Biology*, *100*(10), 965–973. <http://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
- Gu, Y. J., Sun, W. Y., Zhang, S., Wu, J. J., & Wei, W. (2015). The emerging roles of beta-arrestins in fibrotic diseases. *Acta Pharmacol Sin*, *36*(11), 1277–1287. <http://doi.org/10.1038/aps.2015.74>
- Gupta, V., & Toskes, P. P. (2005). Diagnosis and management of chronic pancreatitis. *Postgraduate Medical Journal*, *81*(958), 491–497. <http://doi.org/10.1136/pgmj.2003.009761>
- Haber, P. S., Keogh, G. W., Apte, M. V., Moran, C. S., Stewart, N. L., Crawford, D. H., ... Wilson, J. S. (1999). Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *The American Journal of Pathology*, *155*(4), 1087–95. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65211-X](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65211-X)
- Hama, K., Ohnishi, H., Aoki, H., Kita, H., Yamamoto, H., Osawa, H., ... Sugano, K. (2006). Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad7 induction through a protein kinase C pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *340*(3), 742–750. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.069>
- Heinrich, M. C., Griffith, D. J., Druker, B. J., Wait, C. L., Ott, K. A., & Zigler, A. J. (2000). <Heinrich et al.. 2000. Blood. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor.pdf>, *96*(3), 925–932.
- Heldin, C. H., & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*, *79*(4), 1283–1316.
- Heldin, C. H., Westermark, B., & Wasteson, A. (1979). Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 76(8), 3722–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=383905&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hers, I., Vincent, E. E., & Tavar??, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*, 23(10), 1515–1527. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>
- Hu, R., Wang, Y. L., Edderkaoui, M., Lugea, A., Apte, M. V., & Pandol, S. J. (2007). Ethanol augments PDGF-induced NADPH oxidase activity and proliferation in rat pancreatic stellate cells. *Pancreatology*, 7(4), 332–340. <http://doi.org/10.1159/000105499>
- Hwang, R. F., Yokoi, K., Bucana, C. D., Tsan, R., Killion, J. J., Evans, D. B., & Fidler, I. J. (2003). Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(17), 6534–6544.
- Izumi, M., & Suda, K. (2007). Pancreatic ductal myofibroblasts. *Pancreas - Pathological Practice and Research*, 56–66. <http://doi.org/10.1159/000100401>
- Jaster, R., Sparmann, G., Emmrich, J., & Liebe, S. (2002). Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut*, 51(4), 579–584. <http://doi.org/10.1136/gut.51.4.579>
- Karger, A., Fitzner, B., Brock, P., Sparmann, G., Emmrich, J., Liebe, S., & Jaster, R. (2008). Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells. *Cellular Signalling*, 20(10), 1865–1872. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.016>
- Kilic, T., Alberta, J. A., Zdunek, P. R., Acar, M., Iannarelli, P., O'Reilly, T., ... Stiles, C. D. (2000). Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Research*, 60(18), 5143–5150. <http://doi.org/11016641>
- Kim, Y., Fiel, M. I., Albanis, E., Chou, H. I., Zhang, W., Khitrov, G., & Friedman, S. L. (2013). Anti-fibrotic Activity and Enhanced Interleukin-6 Production by Hepatic Stellate cells in Response to Imatinib Mesylate. *Liver Int.*, 16(3), 387–393. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.002>
- Klöppel, G., Detlefsen, S., & Feyerabend, B. (2004). Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, 445(1), 1–8. <http://doi.org/10.1007/s00428-004-1021-5>
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Miething, C., Yee, H., ... Lowe, S. W. (2011). NIH Public Access, 134(4), 657–667. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049.Senescence>
- Kulkarni, A. A., Thatcher, T. H., Olsen, K. C., Maggirwar, S. B., Phipps, R. P., & Sime, P. J. (2011). PPAR-?? ligands repress TGF??-induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: Implications for therapy of fibrosis. *PLoS ONE*, 6(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015909>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>

- Legocki, R. P., & Verma, D. P. (1981). Multiple immunoreplica Technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, 111(2), 385–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6166216>
- Longnecker, D. (2014). Anatomy and Histology of the Pancreas. *The Pancreapedia: Exocrine Pancreas ...*, 332–339. <http://doi.org/10.3998/panc.2014.3>
- Luttenberger, T., Schmid-Kotsas, A., Menke, A., Siech, M., Beger, H., Adler, G., ... Bachem, M. G. (2000). Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 80(1), 47–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653002>
- Mahimainathan, L., & Ghosh Choudhury, G. (2004). Inactivation of Platelet-derived Growth Factor Receptor by the Tumor Suppressor PTEN Provides a Novel Mechanism of Action of the Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15258–15268. <http://doi.org/10.1074/jbc.M314328200>
- Masamune, A., Kikuta, K., Satoh, M., Kume, K., & Shimosegawa, T. (2003). Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 199(2), 69–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12705352>
- Masamune, A., Kikuta, K., Satoh, M., Sakai, Y., Satoh, A., & Shimosegawa, T. (2002). Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- γ block activation of pancreatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 141–147. <http://doi.org/10.1074/jbc.M107582200>
- Masamune, A., Satoh, M., Kikuta, K., Suzuki, N., Satoh, K., & Shimosegawa, T. (2005). Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. *Biochemical Pharmacology*, 70(6), 869–878. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.06.008>
- McCarroll, J. A., Phillips, P. A., Kumar, R. K., Park, S., Pirola, R. C., Wilson, J. S., & Apte, M. V. (2004). Pancreatic stellate cell migration: Role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway. *Biochemical Pharmacology*, 67(6), 1215–1225. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.11.013>
- McCarroll, J. a, Phillips, P. a, Santucci, N., Pirola, R. C., Wilson, J. S., & Apte, M. V. (2006). Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut*, 55(1), 79–89. <http://doi.org/10.1136/gut.2005.064543>
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., ... Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263–1284. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>
- Mews, P., Phillips, P., Fahmy, R., Korsten, M., Pirola, R., Wilson, J., & Apte, M. (2002). Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut*, 50(4), 535–41. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1773172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Minamino, T. (2010). Role of Cellular Senescence in Lifestyle-Related Disease. *Circulation Journal*, 74(12), 2527–2533. <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0916>

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Muerkoester, S., Wegehenkel, K., Arlt, A., Witt, M., Sipos, B., Kruse, M. L., ... Sch??fer, H. (2004). Tumor Stroma Interactions Induce Chemoresistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cells Involving Increased Secretion and Paracrine Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1?? *Cancer Research*, 64(4), 1331–1337. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1860>
- Omary, M. B., Lugea, A., Lowe, A. W., & Pandol, S. J. (2007). The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 50–9. <http://doi.org/10.1172/JCI30082>
- Paik, Y.-H., Kim, J. K., Lee, J. I., Kang, S. H., Kim, D. Y., An, S. H., ... Brenner, D. A. (2009). Celecoxib induces hepatic stellate cell apoptosis through inhibition of Akt activation and suppresses hepatic fibrosis in rats. *Gut*, 58(11), 1517–27. <http://doi.org/10.1136/gut.2008.157420>
- Phillips, P. A., McCarroll, J. A., Park, S., Wu, M.-J., Pirola, R., Korsten, M., ... Apte, M. V. (2003). Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*, 52(2), 275–82. <http://doi.org/10.1136/gut.52.2.275>
- Qin, J., Xie, Y. Y., Huang, L., Yuan, Q. J., Mei, W. J., Yuan, X. N., ... Peng, Z. Z. (2013). Fluorofenidone inhibits nicotinamide adeninedinucleotide phosphate oxidase via PI3K/Akt pathway in the pathogenesis of renal interstitial fibrosis. *Nephrology*, 18(10), 690–699. <http://doi.org/10.1111/nep.12128>
- Rauen, K. A. (2014). NIH Public Access, 355–369. <http://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153523>.The
- Rehm, H. (2002). *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics. Molecular and Cellular Biology* (Vol. 23). <http://doi.org/10.1007/978-3-8274-2313-9>
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., & Harker, L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), 1207–10. <http://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1207>
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), 1350–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999980>
- Sanfey, H., Bulkley, G. B., & Cameron, J. L. (1984). The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Annals of Surgery*, 200(4), 405–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207783>
- Sarles, H. (1986). Etiopathogenesis and definition of chronic pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 31(9 Suppl), 91S–107S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3525051>
- Schmitz, S. (2007). *Der Experimentator: Zellkultur*. (U. G. Moltmann & B. Saglio, Eds.) (1. Auflage). Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schneider, E., Schmid-Kotsas, A., Zhao, J., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., ... Bachem, M. G. (2001). Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *American Journal of*

- Physiology. Cell Physiology*, 281(2), C532-43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11443052>
- Shek, F. W.-T., Benyon, R. C., Walker, F. M., McCrudden, P. R., Pender, S. L. F., Williams, E. J., ... Iredale, J. P. (2002). Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *The American Journal of Pathology*, 160(5), 1787–98. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1850856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shimizu, K., Shiratori, K., Hayashi, N., Kobayashi, M., Fujiwara, T., & Horikoshi, H. (2002). Thiazolidinedione derivatives as novel therapeutic agents to prevent the development of chronic pancreatitis. *Pancreas*, 24(2), 184–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854624>
- Sjöblom, T., Shimizu, A., O'Brien, K. P., Pietras, K., Dal Cin, P., Buchdunger, E., ... Heldin, C. H. (2001). Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist ST1571 through induction of apoptosis. *Cancer Research*, 61(15), 5778–5783.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Son, G., Hines, I. N., Lindquist, J., Schrum, L. W., & Rippe, R. A. (2009). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in hepatic stellate cells blocks the progression of hepatic fibrosis. *Hepatology*, 50(5), 1512–1523. <http://doi.org/10.1002/hep.23186>
- Tallquist, M., & Kazlauskas, A. (2004). PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(4), 205–213. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.003>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439>
- van Weemen, B. K., & Schuurs, A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 15(3), 232–236.
- Vonlaufen, A., Phillips, P. A., Yang, L., Xu, Z., Fiala-Ber, E., Zhang, X., ... Apte, M. V. (2010). Isolation of quiescent human pancreatic stellate cells: A promising in vitro tool for studies of human pancreatic stellate cell biology. *Pancreatology*, 10(4), 434–443. <http://doi.org/10.1159/000260900>
- Walsh, T. N., Rode, J., Theis, B. A., & Russell, R. C. (1992). Minimal change chronic pancreatitis. *Gut*, 33(11), 1566–71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1379548&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wang, S., Wilkes, M. C., Leof, E. B., & Hirschberg, R. (2005). Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for*

- Experimental Biology*, 19(1), 1–11. <http://doi.org/10.1096/fj.04-2370com>
- Watari, N., Hotta, Y., & Mabuchi, Y. (1982). Morphological and Complex Studies with Vitamin Pancreatic on a Vitamin following Observed Excess Cell in Mouse and Macrophage Tissues A Administration By NAKAZO WATARI , YASUAKI HOTTA and YOSHIO MABUCHI The First Department of Anatomy , Nagoya City Univer. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 58(4–6), 837–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7122019>
- Whitcomb, D. C. (2003). Genetic predisposition to alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreas*, 27(4), 321–326. <http://doi.org/10.1097/00006676-200311000-00009>
- Witt, H., Apte, M. V., Keim, V., & Wilson, J. S. (2007). Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy. *Gastroenterology*, 132(4), 1557–1573. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.001>
- Yoshiji, H., Noguchi, R., Kuriyama, S., Ikenaka, Y., Yoshii, J., Yanase, K., ... Fukui, H. (2005). Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(5), G907–G913. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00420.2004>
- Yuantai, W., Tiancai, W., & Qiu, Z. (n.d.). PD98059 inhibits expression of pERK1 protein and collagen alpha1(I) mRNA in rat pancreatic stellate cells activated by platelet-derived growth factor. *Indian Journal of Gastroenterology : Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 24(3), 100–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16041100>
- Zimmermann, a, Gloor, B., Kappeler, a, Uhl, W., Friess, H., & Büchler, M. W. (2002). Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans. *Gut*, 51(4), 574–8. <http://doi.org/10.1136/gut.51.4.574>

12 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben und mich auf dem Wege ihrer Fertigstellung unterstützt haben.

Prof. Dr. Ansgar W. Lohse danke ich dafür, dass ich das Projekt in seiner Institution, der I. Medizinischen Klinik, durchführen konnte.

PD Dr. Michael Bläker danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu dürfen und diese sehr leerreiche Phase dort erleben zu können. Ebenso danke ich dir für die Unterstützung bei der Bewerbung für das BMEP. All das hat mich sehr geprägt.

Mein größter und mit Worten kaum zu umschreibender Dank gilt PD Dr. Andrea Pace. Einerseits gilt dies für die Aufgabenstellung, Problemlösungen, vielen Gespräche und nicht zuletzt die Möglichkeit meine Forschungs- und Lebenserfahrung auf Vorträgen und um die Zeit in den USA während des BMEP zu erweitern. Andererseits gilt dies ebenso für die ersten Schritte nach dem Studium, bei denen du mir immer zur Seite gestanden hast. In all dieser Zeit warst du für mir ein wunderbarer Mentor und ein Vorbild.

Zudem danke ich allen im Labor für die viele Unterstützung bei Durchführung und Planung der Versuche. Insbesondere PD Dr. Daniel Benten für die Hilfe bei den immunzytologischen Untersuchungen als auch Martina Fahl und Verena Matzat bei so fast jeder Optimierung der einzelnen Verfahren. Besonderer Dank gilt schließlich noch Oliver Seiz. Unsere gemeinsame Zeit als Kollegen war wirklich großartig. Ich bin froh, dass wir uns dort getroffen haben und daraus eine Freundschaft entstanden ist, die bis heute anhält.

Schließlich danke ich meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme, für alles, was ihr mir in meinem Leben ermöglicht habt und allen Freunden, die diese, doch sehr lange Zeit bei mir waren. Insbesondere Daniel Biermann für alle Höhen und Tiefen, die wir, während des Studiums, gemeistert haben.

[REDACTED]

14 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.



Unterschrift: