Aus der Zentralen Einrichtung Klinische Chemie
der Universitätsklinik Ulm
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. M.G. Bachem

Optimierung der Transfektion pankreatischer Sternzellen mit TGFβ1 – Antisense – Oligonukleotiden. Ein Beitrag zum Nachweis autokriner Stimulationsmechanismen über TGFβ1.

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades in der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Nicole Kadlec
aus Brünn

Ulm 2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. M.G. Bachem
2. Berichterstatter: Prof. T. Seufferlein

Tag der Promotion: 07. Juli 2005

meinen Eltern L. und V. Kadlec

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung **1**

I.1 Epidemiologie 2

I.2 Einteilung der Pankreatitiden 2

I.3 Modellvorstellung zur Pathopyshiologie und Pathogenese der chronisch kalzifizierenden Pankreatitis 6

I.4 Rolle der fibrogenen Mediatoren 9

I.5 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix 16

I.6 Die pankreatische Sternzelle 16

I.7 Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe 19

I.8 Problemstellung 21

II. Material **23**

III. Methoden

III.1 Zellkultur pankreatischer Sternzellen 32

III.2 Fluorometrische DNA Bestimmung 34

III.3 Messungen mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz 35

III.4 Messung der Toxizität der Transfektionsreagenzien 38

III.5 Optimierung der Transfektion pankreatischer Sternzellen 40

III.5.1 Zellkulturstimulation und –transfektion 40
III.5.2 Transfektion mittels Dosper Transfektionsreagenz 40
III.5.3 Transfektion mittels FuGene6 Transfektionsreagenz 41
III.5.4 Transfektion mittels Superfect Transfektionsreagenz 41
III.5.5 Optimierung mit variabler Transfektionsreagenz-Konzentration 42
III.5.6 Optimierung mit variabler Oligonukleotid-Konzentration 44
III.5.7 Kinetik der Oligonukleotid-Aufnahme 45

III.6 Vergleich verschiedener Zellyseansätze (Triton Experiment) 47

III.7 Färbung von PSC mit FITC ODN und Bisbenzimidazol 48

III.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 49

III.9 Immunfluoreszenzfärbungen 52

III.10 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 55

III.11 Statistische Analyse 55

IV. Ergebnisse

IV.1 Quantitative Messung der Fibronektinkonzentration 56

IV.2 Bestimmung der Proliferation durch BrdU Messung 59

IV.3 Quantitative Messung der LDH Freisetzung 67

IV.4 Trypanblau Färbung 71

IV.5 Transfektion der PSC mit den Transfektionsreagenzien 74

IV.5.1 Optimierung Teil 1 74
IV.5.2 Optimierung Teil 2 81
IV.5.3 Kinetik 88

IV.6 Vergleich verschiedener Zelllyseansätze 92

IV.7 Färbung mit FITC markierten ODN 97

IV.8 Transfektionseffizienz der Transfektionsreagenzien 99

IV.9 Auswirkung von AS-I auf die Matrixsynthese 104

IV.10 Auswirkungen von ODN III auf die Matrixsynthese 107

IV.11 Nachweis einer Triple-Helix Bildung (EMSA) 112

IV.12 PCR bei Transfektion mit ODN III 113

IV.13 Immunfluoreszenzen 114

V. Diskussion

V.1 Autokrine Stimulationsmechanismen 118

V.2 Antisense-Oligonukleotide 121

V.3 Einfluß des Transfektionsreagenz 125

V.4 Optimierung der Transfektion 127

V.5 Reduktion der Matrixsynthese durch AS-ODN 131

V.6 Triple Helix 132

V.7 Oligonukleotide als Therapieoption 135

VI. Zusammenfassung 138

VII. Literaturverzeichnis 140

VIII. Danksagung 181

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat-Nukleotide
Aqua dest.	destilliertes Wasser
SMA	Smooth Muscle Actin
AS-ODN	Antisense-Oligodeoxyribonukleotide
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2-deoxy-Uridin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
c-Fibronektin	zelluläres Fibronektin
CFTR	Cystis Fibrosis Transmembrane Receptor
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
kD	Kilodalton
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoxyribonukleinsäure)
dNTP	Deoxyribonukleotide
DMEM	Dulbecco´s Modification of Eagle´s Medium
DPP	Drosophila Decapentaplegic Protein
DTPA	Diethylentriaminepentaaceticacid
DTT	Dithiothreitol
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ERP	Endoscopic Retrograde Pancreaticography
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum

G	Guanin
g	Gramm
GAP	Growth Associated Protein
GDF	Growth Differentiation Factor
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Meerrettich-Peroxidase
l	Liter
LAP	TGF β1-Latency Associated Protein
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LTBP	Latent TGFβ1 Binding Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Molar
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
OD	Optische Dichte
ODN	Oligonukleotid/Oligodeoxyribonukleotid
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PSC	Pancreatic Stellate Cell/Pankreatische Sternzelle
PSP	Pancreatic Stone Protein, Lithostatine
PSTI	Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen je Minute)
rPSC	rat Pancreatic Stellate Cell/Pankreatische Sternzelle der Ratte

SCR-ODN	Scrambled-Oligodeoxyribonukleotide
SE-ODN	Sense-Oligodeoxyribonukleotide
sek	Sekunde
SGF	Sarcoma Growth Factor
T	Thymin
TFO	Triplex Forming Oligonucleotide
TGF α	Transforming Growth Factor alpha
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
tRNA	Transfer Ribonucleic Acid (Transfer RNA)
U	Unit (internationale Einheit)
UV	Ultraviolett
Vg	Vegetalizing Factor

I. Einleitung

Die Pankreatitis ist eine akut oder chronisch verlaufende entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse verschiedenster Ursache, wobei in den westlichen Industrienationen und Japan in 55-80% der Fälle chronischer Alkoholkonsum als Ursache der chronischen Pankreatitis angenommen werden kann (Etemad und Whitcomb 2001). Während nach Behebung der Ursache einer akuten Pankreatitis eine klinische, morphologische und funktionelle restitutio ad integrum zu erwarten ist, führen die fortlaufenden Entzündungsvorgänge bei einer chronischen Pankreatitis auch nach Behebung der primären Ursache zu einer progredienten strukturellen und funktionellen Zerstörung des Pankreasparenchyms (Gullo et al. 1988; Sarles et al. 1965; Sarles 1965). Auf Grund ihres chronischen, zumeist in schmerzhaften Schüben verlaufenden Charakters der chronischen Pankreatitis findet sich neben einer Beeinträchtigung der Lebensqualität der Erkrankten ein erhöhtes Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Lankisch et al. 1993; Lowenfels et al. 1993).

Die Pathogenese der chronischen Pankreatitis ist noch nicht vollständig geklärt. Die Entdeckung, Isolierung und Kultivierung der pankreatischen Sternzelle, die morphologische Ähnlichkeit zur hepatischen Sternzelle hat und deren Fähigkeit zur Synthese von Kollagen I und Fibronektin sprechen dafür, dass die pankreatische Sternzelle diejenige Zelle ist, die im Rahmen einer chronischen Pankreatitis vermehrt extrazelluläre Matrix produziert und damit die Pankraesfibrose initiiert und unterhält (Saotome et al. 1997; Bachem et al. 1998; Apte et al. 1998; Apte et al. 1999; Haber et al. 1999; Haber et al. 1999). Weitere Experimente konnten zeigen, dass TGFβ1 vermittels parakriner und autokriner Regulationsmechanismen die extrazelluläre Matrixsynthese bei kultivierten pankreatischen Sternzellen stimuliert (Schmid-Kotsas et al. 1999; Luttenberger et al. 2000; Kandenwein 2000). Das Modell der autokrinen Wachstumsstimulation liefert die Grundlage für die Forschung nach Therapieansätzen, durch die der Mechanismus der fortschreitenden Pankreasfibrose durch Regulation der Wachstumsfaktoren aufgehalten werden kann. Antisense-ODN hemmen bereits auf mRNA-Ebene die Translation des Zielproteins oder interagieren direkt mit der DNA im Zellkern, wo sie bereits die Transkription des Zielproteins verhindern. Folglich kann die Bildung des hauptsächlich zur Pathogenese beitragenden Zytokins, hier TGFβ1, und somit auch der konsekutiven Proteine spezifisch verhindert werden (Helene und Toulme 1990; Stein und Cheng 1993).

I. 1 Epidemiologie der chronischen Pankreatitis

Die Inzidenz der chronischen Pankreatitis in Nordamerika und Europa beträgt mit steigender Tendenz 3,5-10 Neuerkrankungen /Jahr und 100.000 Einwohner (Secknus und Mossner 2000). Schätzungen der Prävalenz der chronischen Pankreatitis gehen weit auseinander und reichen von 0.04 bis 5% (Steer et al. 1995). 70-81% der Erkrankten sind männlich (Secknus und Mossner 2000; Lankisch et al. 1993; Sahel und Sarles 1979), das Haupterkrankungsalter liegt um das 45. Lebensjahr (Dimagno 1999).

Die Mortalität ist bei Patienten mit chronischer Pankreatitis erhöht (Cavallini et al. 1998; Lankisch et al. 1993; Layer et al. 1994; Ammann et al. 1984). Meist geht ein jahrelanger Alkoholkonsum (1-20 Jahre) von mehr als 80g/Tag (für Frauen weniger) (Ammann 1997) der Erstmanifestation voraus, die im Mittel bei Männern 18, bei Frauen 11 bis 13 Jahre beträgt (Durbec und Sarles 1978; Sarles et al. 1979; Sarles 1984; Steer et al. 1995; Chari und Singer 1994). Eine Schwellendosis des Alkoholkonsums für das Risiko, an chronischer Pankreatitis zu erkranken, gibt es nicht, wobei eine kritische Grenze von 80g Alkohol pro Tag beim Mann und 40g Alkohol pro Tag bei der Frau liegen dürfte (Noronha et al. 1981). Ein linearer Zusammenhang besteht jedoch zwischen der durchschnittlich getrunkenen Alkoholmenge und dem Logarithmus der Erkrankungswahrscheinlichkeit, d.h. ein exponentieller Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Risiko. Letztendlich hängt die Entstehung der Erkrankung wohl von der individuellen Empfindlichkeit gegenüber Alkohol ab (Durbec und Sarles 1978; Sarles et al. 1979; Sarles 1984).

I.2 Einteilung der Pankreatitiden

Die aktuelle Einteilung nach der Marseille-Rom Klassifikation 1988

Basierend auf klinischem Erscheinungsbild und Verlauf als auch histologisch feststellbaren Veränderungen des Pankreasparenchyms wurde die bereits in den beiden vorhergehenden Marseille Klassifikationen beschlossene Einteilung in akute und chronische Verlaufsform beibehalten und folgendermaßen definiert:

Die akute Pankreatitis

Kennzeichnend für die akute Pankreatitis sind folgende potentiell reversible Läsionen im Pankreas und im peripankreatischen Gewebe: Interstitielle Ödeme, peripankreatische Fettgewebsnekrosen und Zeichen akuter Entzündungsreaktion mit Akkumulation von Leukozyten und Thrombozyten bei der interstitiellen akuten Pankreatitis. Zusätzlich ausgedehnte peri- und intrapankreatische Fettgewebsnekrosen, pankreatische und

peripankreatische Nekrosen, tubuläre Komplexe und hämorrhagische Nekrosen (Sarles et al. 1990; Bockman et al. 1986; Singer et al. 1985; Willemer und Adler 1989; Sarner 1995) bei der akuten hämorrhagischen Pankreatitis. Als Komplikation gebildete nekrotische Pseudozysten können spontan ausheilen, persistieren oder durch Infektion Abszesse bilden (Longnecker 1982). Nur in Ausnahmefällen können diese eine Einengung des pankreatischen Ganges bewirken und konsekutiv zur chronisch obstruktiven Pankreatitis führen.

Den beschriebenen intra- und peripankreatischen Läsionen können extrapankreatische Ursachen wie Gallensteine, Alkoholabusus, Medikamente, iatrogene Eingriffe, Traumata, ER(C)P, Hyperlipoproteinämie, Infektionen (v.a. mit Mumps- und Coxsackie B Virus) oder intrapankreatische Ursachen wie Tumoren, chronische Pankreatitiden (in Antithese zu (Comfort et al. 1946)) zugrunde liegen (Bradley, III 1993). Bei Elimination der Ursache und Komplikationen ist eine klinische, morphologische und funktionelle restitutio ad integrum zu erwarten.

Klinisch äußern sich diese Veränderungen in akuten epigastrischen Schmerzen, die bis zum Rücken ausstrahlen können, weiterhin Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Tachykardie, Leukozytose und Anstieg der pankreasspezifischen Enzyme in Blut und/oder Urin und häufig auch Hypokalzämie (Chari und Singer 1994; Mergener und Baillie 1998; Bradley, III 1993).

Eine alkoholinduzierte akute Pankreatitis wurde als erstes Anzeichen einer chronischen Alkoholpankreatitis angesehen (Sarles et al. 1988; Sarles et al. 1989a; Sarles 1991), diese Definition wurde jedoch erst kürzlich auf einem internationalen züricher Symposium dahingehend revidiert, als eine Unterscheidung zwischen akuter alkoholinduzierter Pankreatitis und chronischer alkoholinduzierter Pankreatitis erfolgte (Ammann et al. 1996; Ammann 1997).

Die chronische Pankreatitis

Studien der letzten 40 Jahre zeigen, dass die chronische Pankreatitis nicht eine einzelne Entität sondern vielmehr ein klinisches Syndrom ist, das durch kontinuierliche fibrotische Umbauvorgänge im Pankreas gekennzeichnet ist und dem verschiedene Ursachen zugrunde liegen können (Ammann 1997).

Morphologisch ist die chronische Pankreatitis durch chronisch entzündliche Läsionen mit fokaler, segmentaler oder diffuser Destruktion und fortschreitender Organfibrose des exokrinen und späterer Destruktion auch des endokrinen Pankreasparenchyms

charakterisiert (Sarles et al. 1990; Suda et al. 1990). Auch nach Behebung der primären Ursache kann die progrediente strukturelle und funktionelle Zerstörung des Pankreasparenchyms nicht verhindert werden (Gullo et al. 1988; Sarles 1965).

Makroskopisch imponiert das frühe Stadium durch plumpe Lobulierungen und noduläre Narbenbildungen, gelegentlich finden sich intraduktal liegende Calculi. Im fortgeschrittenen Stadium findet sich ein fibrotisches Pankreas mit Verlust der normalen Lobulation infolge Parenchymnarben und Schrumpfungsprozessen. Die Gangveränderungen des Hauptganges und die Häufigkeit der intraduktalen Calculi korrelieren mit dem Ausmaß der Parenchymfibrose (Kloppel und Maillet 1993).

Das histologische Bild hierzu ist durch ein variables Ausmaß an Ödembildung, Entzündungsprozessen mit lymphoplasmazellulären Infiltraten und Thrombozytenaggregaten, fokalen Nekrosen, Destruktion der Azinus- und Gangepithelzellen, tubulären Komplexen, duktalen Metaplasien und Gangobstruktionen gekennzeichnet, die die chronischen Entzündungsvorgänge mit interstitieller Fibrose und progredientem Verlust exokrinen Pankreasparenchyms überlagern und schließlich zu irreversibler Parenchymvernarbung führen (Longnecker 1982; Kennedy et al. 1987; Sarles et al. 1989b; Sarles et al. 1990; Oertel 1989; Steer et al. 1995). Charakteristisch treten Bereiche mit geringer perilobulärer (interlobulärer) Fibrose oder normalem Pankreasparenchym neben Bereichen mit schwerer peri- und intralobulärer Fibrose auf (Kloppel und Maillet 1995). Pankreatische Pseudozysten entstehen mit oder ohne Gangalterationen als Komplikation infolge Entzündungsprozessen in bis zu 60% der Fälle (Reber et al. 1997).

Klinisch kann die chronische Pankreatitis in 10-20% der Fälle stumm verlaufen oder mit rezidivierenden, starken, oft gürtelförmig ausstrahlenden Schmerzattacken im Epigastrium, v.a. nach Nahrungsaufnahme, einhergehen. Mit Progression der Erkrankung werden die Schmerzen häufiger und gehen bei bis zu 30% der Erkrankten in einen Dauerschmerz über. Letztendlich ist die Ursache des Pankreatitis-Schmerzes nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden perineurale Entzündungsvorgänge (Di Sebastiano et al. 1997; Bockman et al. 1988), während eine alternative Hypothese die Theorie eines erhöhten Pankreasgang- und/oder Parenchymdruckes als Schmerzursache favorisiert, die konsekutiv zu einem Kompartment-Syndrom führen und Ischämie induzieren (Dimagno 1999; Ammann und Muellhaupt 1999). Die Annahme, dass Schmerzen mit progredienter exokriner Pankreasinsuffizienz notwendigerweise nachlassen (Chari und Singer 1994) konnte in neueren Studien nicht belegt werden (Lankisch et al. 1993; Lankisch et al. 1995).

Die chronische Pankreatitis begleitend sind meist Übelkeit und Erbrechen, auch die Serumamylase und –lipasewerte können leicht erhöht sein (Steer et al. 1995). Exokrine Pankreasinsuffizienz mit Maldigestion, Steatorrhoe infolge Lipasemangel, Gewichtsabnahme und Zeichen der Mangelernährung einschließlich Vitaminmangelernährung an fettlöslichen Vitaminen mit konsekutiver Osteoporose, Seh- und Gerinnungsstörungen werden erst bei einer Verminderung der exokrinen Pankreasfunktion um 80-90% manifest (Dimagno et al. 1973). Im Spätstadium der Erkrankung kann durch progredienten Funktionsverlust des Pankreasgewebes auch die endokrine Funktion betroffen werden und die Ursache eines sekundären Diabetes mellitus sein (Ammann und Muellhaupt 1999).

Die chronische Pankreatitis wird unterteilt in die 1) chronisch obstruktive Pankreatitis, wobei eine Läsion durch Einengung des Ductus Pancreaticus entsteht (Suda et al. 1990; Steer et al. 1995; Sarles 1984; Sarles et al. 1989b; Sarles et al. 1990; Kloppel und Maillet 1993; Cavallini et al. 1996). Die im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie sklerosierende Cholangitis, Sjögren-Syndrom, primäre biliäre Zirrhose, M. Crohn, Colitis ulcerosa u.a. vorkommende chronische Pankreatitis ist eine Sonderform der obstruktiven chronischen Pankreatitis, die durch Autoantikörper gegen das Pankreasepithel ausgelöst wird (Naruse et al. 1998; Kloppel und Maillet 1993; Yoshida et al. 1995).

2) chronisch kalzifizierende Pankreatitis mit unregelmäßig über das Pankreas verteilten, lobulären, fleckförmigen Läsionen, deren Intensität in benachbarten Läppchen unterschiedlich ist als auch Einengungen, Dilatationen oder Destruktionen der inter- und intralobulären Pankreasgänge (Sarles et al. 1989a; Sarles et al. 1989b; Kloppel und Maillet 1993; Suda et al. 1990). 50-90% der Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung röntgenologisch sichtbare Verkalkungen, sog. Pankreassteine (Calculi) (Cavallini et al. 1998; Sarles et al. 1990; Chari und Singer 1994; Foitzik und Buhr 1997; Ammann et al. 1984; Ammann et al. 1994; Ammann und Muellhaupt 1999). Ätiologische Ursachen für diese Form der Pankreatitis können in erster Linie chronischer Alkoholkonsum, seltener Ernährungsfaktoren wie hohe Proteinzufuhr als auch abnorm geringe oder hohe Lipidzufuhr (>110g/täglich oder <85g/täglich), Nikotinabusus (Cavallini et al. 1998) und Hyperkalzämie sein (Sarles et al. 1989b; Sarles 1984; Durbec und Sarles 1978).

Weiterhin existieren folgende Pankreatitisformen mit diesem Erscheinungsbild:

- Die sogenannte idiopathische chronische Pankreatitis, der keine Ursache zugrunde gelegt werden kann, wird in zwei verschiedene Formen anhand des Alters der Erstmanifestation und Schmerzsensation unterteilt: I) Juvenile chronische

Pankreatitis (early-onset idiopathic chronic pancreatitis) mit dem Erkrankungsgipfel von 21 Jahren und 100%iger Schmerzwahrnehmung und II) die senile chronische Pankreatitis (late-onset idiopathic chronic pancreatitis) mit einem Erkrankungsgipfel um 55 Jahre hat Schmerzsensationen nur in 50% der Fälle und einen generell milden Verlauf (Layer et al. 1994; Dimagno 1999; Dimagno 2001; Steer et al. 1995). Bei einigen Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis wurden Mutationen in einem Allel des CFTR-Proteins beschrieben (Sharer et al. 1998; Dimagno 2001). Diese Formen wären dann letztendlich Sonderformen einer Mucoviscidose ohne Lungenbeteiligung (Cohn et al. 1998; Etemad und Whitcomb 2001).

- Heriditäre Pankreatitisformen manifestieren sich meist zwischen dem 5.-15. Lebensjahr durch rekurrierende Attacken akuter Pankreatitiden und werden durch ein autosomal dominantes Gen mit inkompletter Penetranz und variabler Expressivität vererbt. Bei den meisten der Patienten findet eine Progression zur chronischen Pankreatitis statt (Rinderknecht H.1993; Whitcomb et al. 1996; Gorry et al. 1997).
- Die Tropische Pankreatitis in Ländern der dritten Welt ist wahrscheinlich durch Malnutrition aufgrund protein-, fettarmer und kohlenhydratreicher Ernährung bedingt (Sarles et al. 1979; Sarles et al. 1989b; Sarles et al. 1979). Als weiterer ätiologischer Faktor zur Entstehung dieser Form der chronischen Pankreatitis wird die Aufnahme potentiell toxischer Substanzen wie Cyanogenen der Manjokwurzel genannt (Sarles et al. 1990; Steer et al. 1995; Bhatia et al. 2002).

3) chronische entzündliche Pankreatitis mit diffuser Fibrose und Zerstörung des exokrinen Pankreasparenchyms mit Infiltration des Pankreasgewebes durch mononukleäre Zellen diverser Ursache und 4) asymptomatische perilobuläre Fibrose. Die Teilnehmer des Marseille-Rom-Symposiums waren der Meinung, dass diese Art der Pankreasläsion nicht als chronische Pankreatitis angesehen werden sollte (Sarles et al. 1988; Sarles et al. 1989a; Sarles 1991; Chari und Singer 1994).

I.3 Modellvorstellungen zur Pathophysiologie und Pathogenese der chronischen kalzifizierenden Pankreatitis

Mehrere Theorien zur Pathophysiologie und Pathogenese der chronischen kalzifizierenden Pankreatitis wurden bisher entworfen, unter anderem die Obstruktionstheorie, die von einer lithogenen Wirkung des Alkohols ausgeht, wobei es initial zu einer modifizierten

Zusammensetzung des Pankreassekrets durch vermehrte Proteinsekretion der Azinuszellen (Renner et al. 1980) und gleich bleibender oder verminderter Bikarbonat- und Wassersekretion durch das Gangepithel kommt (Sahel und Sarles 1979). Durch die dadurch bedingte Viskositätserhöhung kommt es zur Präzipitation von Protein (PSP, Lithostatin) und schließlich Kalziumsalzen mit Plug-Bildung inter- und intralobulär (Steer et al. 1995; Sarles et al. 1989b). Konsekutive Obliteration der Azinuslumina und kleinster Ausführungsgänge führt zur Dilatation des Gangsystems mit Gangepithelproliferation, zunehmender Azinuszelldegeneration und Entzündungszellinfiltration, die letztendlich in der Bildung eines fibrotischen Narbengewebes mündet (Sarles et al. 1965; Sarles et al. 1989b; Sarles et al. 1990; Sarles 1991; Pitchumoni und Bordalo 1996; Multigner et al. 1981; Multigner et al. 1985; Montalto et al. 1986; Guy et al. 1983; Steer et al. 1995; De Caro et al. 1984).

Manche Autoren bezweifeln diese Hypothese und gehen davon aus, dass Kalzifizierungen ein Epiphänomen der chronischen Pankreatitis, nicht die Ursache sind (Ammann et al. 1984; Ammann et al. 1996; Schmiegel et al. 1990; Suda et al. 1990; Bimmler et al. 1996; Cavallini et al. 1998).

Die Äthyltoxische Metaboliten Hypothese geht von einer direkten Schädigung der Zellmembranen und Störung des Energiehaushaltes durch toxische Metabolite des Alkohols aus. So kommt es neben Veränderungen der Protein- und Enzymsekretion zur gestörten Fettsäureoxidation als auch zum gestörten Cholesterin- und Triglyzeridumsatz in der Azinuszelle. Infolge dessen zur degenerativen Verfettung und Fibroseinduktion (Luthen und Niederau 1990; Dreiling et al. 1979; Apte et al. 2000). Als weiterer toxischer Faktor auf die Azinuszelle werden die durch Alkoholabbau in der Leber entstehenden Metabolite diskutiert (Bordalo et al. 1977; Noronha et al. 1981).

Die Hypothese des oxidativen Stresses stellt dar, dass durch Alkoholeinwirkung die Freisetzung freier Sauerstoffradikale durch Aktivierung von Chymotrypsinogen mit konsekutiver Xanthinoxidasebildung begünstigt wird. Der zytotoxische Effekt wird durch die Lipidperoxidation von Zellmembranen in Lysosomen, Mitochondrien u.a., eine direkte Schädigung von Nukleinsäuren und Proteinen und direkter Aktivierung von Pankreasenzymen erklärt (Luthen und Niederau 1990; Sanfey et al. 1986; Apte et al. 2000). Braganza geht davon aus, dass die erhöhte Produktion freier Sauerstoffradikale auch mit einer gestörten Detoxifikation bestimmter Stoffe (z.B. aromatische Kohlenwasserstoffe) in der Leber und einem alimentären Mangel an Antioxidantien in Zusammenhang steht (Braganza 1983; Braganza 1996).

Basierend auf histologischen Untersuchungen entwickelten Klöppel et al. die Hypothese einer Nekrose-Fibrose-Sequenz, nach der die chronische Pankreatitis das Spätstadium akuter nekrotisierender oder rezidivierender alkoholinduzierter Pankreatitiden ist. Die Hypothese geht davon aus, dass sich nach schweren akuten Pankreatitiden auftretende exokrine und endokrine Funktionseinschränkungen in Abhängigkeit von der Schwere des Ereignisses nicht immer vollständig zurückbilden. Durch wiederholte akute Entzündungsreaktion bzw. Nekrosen kann es zur Progression der Erkrankung kommen. Periazinäre und periduktale Fettzellnekrosen und Hämorrhagien triggern die perilobuläre Entzündung und Fibrosierung und führen somit zu Stenosierungen und Obstruktion der interlobulären Pankreasgänge mit sekundärer Proteinplaque- und Steinbildung, die letztendlich zur intralobulären Fibrose führen (Kloppel und Maillet 1991; Kloppel und Maillet 1992; Kloppel und Maillet 1995). Als pathogenetische Mechanismen werden sowohl toxisch metabolische Störungen der Azinuszellfunktion, duktale Permeabilitätsstörungen, Ischämie als auch oxidativer Stress diskutiert.

1988 formulierte Rinderknecht die Hypothese der Leukozyten-Toxizität, wodurch exzessive Leukozyten-Stimulation durch die Produktion freier Radikale zur Schädigung azinärer Zellen mit konsekutiver Freisetzung lysosomaler Enzyme führe (Rinderknecht 1988; Jalleh et al. 1993). Die bevorzugte Lokalisierung dieser Zellen zum verbliebenen intakten Pankreasparenchym stützt die Hypothese einer T-Zellvermittelten Autotoxizität (Hunger et al. 1997; Adler und Schmid 1997).

Die Hypothese der lysosomalen Hyperaktivität geht von einer vorzeitigen Zymogenaktivierung durch lysosomale Hydrolasen aus, wodurch Azinuszellschädigungen entstehen. Trypsin, als Aktivator der anderen Zymogene, kann vorzeitig bei Kalzium-Anwesenheit und erniedrigten pH-Werten (pH 4,5-5,5), wie dies in Lysosomen der Fall ist, aus Trypsinogen aktiviert werden (Frick et al. 1997; Wilson et al. 1990).

Singh geht in der Hypothese der abnormalen Proteinverteilung davon aus, dass Ethanol eine veränderte Proteinverteilung innerhalb der Azinuszelle bedingt, was zur Kolokalisierung lysosomaler Proteine und Verdauungsenzyme durch Fusion der Zymogengranula mit Lysosomen führt. Diese zytoplasmatischen Vakuolen entstehen durch Krinophagie oder Alterationen des normalen Vakuolenreifungsprozesses im Golgi Apparat und enthalten u.a. Kathepsin B, das bei niedrigen pH Werten in vitro Trypsinogen zu Trypsin aktivieren kann (Singh 1992). Falls ein Austritt dieser Enzyme in das extrazelluläre Kompartiment anstelle des Gangsystemes erfolgte, führt dies zu

Zellnekrosen, Hypersekretion und vorzeitiger Aktivierung proteolytischer Enzyme mit konsekutiver pankreatischer Autodigestion (Singh 1991).

I.4 Rolle der fibrogenen Mediatoren bei der Entstehung der chronischen Pankreatitis

Insbesondere TGFβ und TGFα scheinen den Fibrosierungsprozess zu stimulieren und zu unterhalten. So konnte TGFβ als wichtiger Mediator für verschiedene, mit Fibrosierung einhergehende Erkrankungen wie Leberzirrhose (Czaja et al. 1989) Lungenfibrose (Broekelmann et al. 1991), systemische Sklerosen oder Glomerulonephritis (Okuda et al. 1990) identifiziert werden.

In der Regenerationsphase einer durch Caerulein ausgelösten Pankreatitis der Ratte ging eine erhöhte Expression von TGFβ in Azinus- und Stromazellen mit einer gesteigerten extrazellulären Matrixsynthese einher (Gress et al. 1994a; Gress et al. 1994b; Elsasser et al. 1989). Durch Inhibition der TGFβ Aktivität durch neutralisierende Antikörper konnte eine deutliche Reduktion der extrazellulären Matrixbildung bei der Regeneration der Caerulein-induzierten Pankreatitis der Ratte erreicht werden (Menke et al. 1997). Weiterhin gelang im Caerulein-induzierten Pankreatitismodell durch wiederholte Caerulein- und TGFβ-Verabreichungen die Auslösung einer Pankreasfibrose (van Laethem et al. 1996). Diese Studienergebnisse lassen darauf schließen, dass TGFβ1 bei der Regeneration der akuten Pankreatitis als auch bei der Entstehung der Pankreasfibrose involviert ist (van Laethem et al. 1996; Menke et al. 1997).

Ein Anstieg des TGFβ konnte im „closed-duodenal-loop-pancreatitis“ Modell nachgewiesen werden, bei dem eine Pankreatitis durch eine 24 Stunden andauernde Ligatur des Duodenums ausgelöst wird. Einhergehend hiermit war eine vermehrte Produktion an Fibronektin und Kollagen III (Kimura et al. 1995).

In transgenen Tiermodellen für TGFα und TGFβ zog eine jeweilige Überexpression eine gesteigerte Pankreasfibrosierung nach sich (Bockman und Merlino 1992; Jhappan et al. 1990; Lee et al. 1995). Transgene Mäuse, die TGFβ1 selektiv im Pankreas überexprimieren, zeigen eine vermehrte Proliferation der Fibroblasten, extrazelluläre Matrixablagerung als auch Inhibition der azinären und zentroazinären Zellproliferation. Diese Veränderungen ähneln denen im Menschen bei chronischer Pankreatitis (Lee et al. 1995). Vogelmann konnte erst kürzlich bei transgenen Mäusen, die TGFβ1 überexprimieren, einen Zusammenhang zwischen pankreatischen Veränderungen, wie sie für die chronische Pankreatitis charakteristisch sind mit Vermehrung der pankreatischen Sternzellen in Zusammenhang mit TGFβ1 bringen (Vogelmann et al. 2001).

1995 wies Van Laethem das TGFβ1 Vorläuferprotein in mononukleären Zellen und Fibroblasten fibrotischer Areale und in durch Fibrose beschädigten Gängen im Sinne einer TGFβ1 Überexpression bei chronischer Pankreatitis des Menschen nach (van Laethem et al. 1995). DiMola konnte die TGFβ Rezeptoren I und II bei Patienten mit chronischer Pankreatitis nachweisen (di Mola et al. 1999). Slater stellte eine verstärkte TGFβ1 Expression bei Patienten mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu normalen Kontrollen fest (Slater et al. 1995).

Insofern konnte eine erhöhte Expression von TGFβ1 parallel zu extrazellulärer Matrixproduktion und Fibroblastenproliferation während der Regeneration von akuter Pankreatitis als auch bei chronischer Pankreatitis sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell nachgewiesen werden (Gress et al. 1994a; Gress et al. 1994b; Menke et al. 1997; van Laethem et al. 1995; van Laethem et al. 1996).

TGFβ stimuliert die Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten und inhibiert die Matrixdegradation (Sporn und Roberts 1992; Ignotz und Massague 1986). Im Pankreas vermittelt TGFβ1 eine pankreatische Fibrose durch PSC Aktivierung (Bachem et al. 1998; Apte et al. 1999) und konsekutiver Ablagerung von Typ I und III Kollagen, während PDGF die Proliferation der PSC stimuliert (Saotome et al. 1997; Apte et al. 1999). Experimente deuten darauf hin, dass TGFβ1 u.a. indirekt durch Induktion der Synthese zusätzlicher Wachstumsfaktoren wie CTGF und FGF die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und deren Akkumulation moduliert (Vogelmann et al. 2001).

Ishihara fand eine korrelierende Anfärbbarkeit von TGFβ und MMP2, woraus geschlossen werden kann, dass TGFβ1 die Bildung von MMP2 auf autokrinem oder parakrinem Wege induziert, was zur Degradation des Kollagen IV der Basalmembran pankreatischer Ausführungsgänge bei chronischer Pankreatitis führt (Ishihara et al. 1998).

TGFβ, erstmalig 1978 von De Larco und Todaro beschrieben (Todaro und de Larco 1978; de Larco und Todaro 1980) ist ein multifunktionelles Zytokin mit verschiedenen Funktionen, es hat u.a. Einfluss auf Zelldifferenzierung, -proliferation, -migration, -adhäsion und ist Mediator der extrazellulären Matrixsynthese, die sich auf Entwicklung und Reparationsprozesse auswirken (Massague 1990; Massague et al. 1992; Massague und Weis-Garcia 1996; Lyons und Moses 1990; Roberts et al. 1980; Anzano et al. 1983; Moses et al. 1981). Entgegengesetzte biologische Wirkungen des TGFβ, wie Wachstumsinhibition versus -stimulation konnten an demselben Zelltyp beobachtet werden. Der Effekt des TGFβ hängt von der spezifischen Zielzelle, Zellkulturkonditionen, der Anwesenheit

anderer zellwachstumsregulierender Moleküle und deren Interaktionen ab (Battegay et al. 1990).

Für die Großzahl der Zellen stellt TGFβ den stärksten Wachstumsinhibitor dar. Die drei wichtigsten Isoformen des TGFβ wirken gleichermaßen hemmend auf Epithelzellen, Endothelzellen und Zellen lymphoiden Ursprunges als auch auf einige Zellen mesenchymaler und myeloider Herkunft (Tucker et al. 1984; Keski-Oja et al. 1987; Coffey, Jr. et al. 1988). Das Ausmaß der Proliferationshemmung auf den jeweiligen Zelltyp ist sehr verschieden, jedoch reversibel (Shipley et al. 1986). Im Wesentlichen sind alle Zellen zur Synthese von TGFβ fähig und nahezu alle normalen Zellen besitzen TGFβ Rezeptoren. TGFβ ist also imstande, Zellfunktionen sowohl durch parakrine als auch autokrine Mechanismen zu beeinflussen (Sporn und Roberts 1990).

Fünf Isoformen des TGFβ ($TGF\beta_{1,2,3,4,5}$) konnten bisher isoliert werden, deren Aminosäuresequenzen zu 60-80% homolog sind (Roberts et al. 1992). Drei dieser TGFβ Formen ($TGF\beta_{1,2,3}$) kommen bei Säugetieren vor (Derynck et al. 1988).

TGFβ gehört zu einer Familie von Disulfid-verknüpften Polypeptiddimeren, die als Pre-pro-Monomere synthetisiert werden. TGFβ wird von Thrombozyten, die die Hauptisolationsquelle darstellen (Assoian et al. 1983), und von vielen anderen Zelltypen als biologisch inaktive, latente Form freigesetzt, die an keinen der 3 TGFβ Rezeptoren binden kann (Segarini 1993). Bevor TGFβ an einen Zielrezeptor binden kann, ist eine Aktivierung durch Freisetzung vom Vorläuferkomplex durch verschiedene Mechanismen notwendig. Insofern stellt die Aktivierung des TGFβ von seinem Komplex einen wichtigen regulatorischen Schritt in vivo dar. In vitro kann eine Aktivierung z.B. durch Ansäuerung auf pH Werte unter 4,0 erreicht werden (Miyazono et al. 1988).

Aktiviertes TGFβ wiederum kann durch Bindung an verschiedene Proteine, u.a. Matrixproteine wie Typ IV Kollagen (Paralkar et al. 1991), Proteoglykane, Betaglykan (Andres et al. 1989) und Decorin inaktiviert werden. Da die Bildung von Decorin wiederum durch TGFβ induziert wird, kann hier eine negative Rückkopplungsschleife zur Regulation der TGFβ Aktivität vermutet werden (Yamaguchi et al. 1990).

Die biologisch aktive Form ist ein durch zwei Disulfid-Brücken verknüpftes 25kD Homodimer, wobei jede Homodimereinheit aus je 112 Aminosäuren (mit Ausnahme des $TGF\beta_4$, dessen Untereinheit aus 114 Aminosäuren besteht) aufgebaut ist (Sporn und Roberts 1990). Es entsteht bei Thrombozyten, Fibroblasten und anderen Zellen extrazellulär durch Dissoziation vom biologisch inaktiven 390 Aminosäure langen Vorläuferprotein β1-LAP, das der N-terminale Anteil des TGFβ1 Proteins ist (Massague

1990; Derynck et al. 1985; Gentry et al. 1987; Gentry et al. 1988). β1-LAP seinerseits ist durch Disulfidbrücken kovalent an eines der vier LTBP gebunden und bildet den sog. „large latent TGFβ1 complex“ (Kanzaki et al. 1990; Wakefield et al. 1988; Miyazono et al. 1988; Saharinen et al. 1998). LTBP scheint eine strategische Rolle im Bau, Sekretion und Aktivierung von latentem TGFβ1 zu spielen (Miyazono et al. 1991; Flaumenhaft et al. 1993).

Die Aktivierung zum bioaktiven Protein kann in vitro durch vorübergehende Ansäuerung, Proteolyse oder chaotrope Substanzen erfolgen. Bei der physiologischen Aktivierung scheinen Plasmin, Thrombin und Calpain eine Rolle zu spielen und einige Zellarten sind in der Lage, durch Aktivierungsmechanismen ein unverzüglich aktives TGFβ zu produzieren (Taipale et al. 1992; Abe et al. 1998; Larisch-Bloch und Sulitzeanu 1993; Yamamoto et al. 1994a; Bedossa und Paradis 1995).

TGFβ hat Einfluss auf die Synthese folgender extrazellulärer Matrixproteine: Kollagen I (Ignotz et al. 1987a; Penttinen et al. 1988; Casini et al. 1993; Poncelet und Schnaper 1998), II (Rosen et al. 1988), III (Casini et al. 1993; Varga et al. 1987; Poncelet und Schnaper 1998), IV (Zdunek et al. 2001; Poncelet und Schnaper 1998), V (Mestries et al. 2001; Bertelli et al. 1998; Raghu et al. 1989), VII (Rudnicka et al. 1994), Fibronektin (Dean et al. 1988; Raghow et al. 1987; Madri et al. 1988; Penttinen et al. 1988; Ignotz und Massague 1986; Casini et al. 1993), Proteoglykane (Bassols und Massague 1988), Tenascin (Pearson et al. 1988), Osteonektin (Noda und Rodan 1987), Thrombospondin (Penttinen et al. 1988), Osteopontin (Noda et al. 1988), Elastin (Liu und Davidson 1988), Hyaluronsäure (Roberts et al. 1990) und Chondroitin-Dermatansulfat Proteoglykane inklusive Decorin (Yamaguchi et al. 1990). TGFβ führt zu erhöhten mRNA Spiegeln für die meisten der hierfür untersuchten Matrixproteine mit konsekutiv gesteigerter Matrixproteinsekretion. Diese direkten Effekte des TGFβ auf die extrazelluläre Matrixsynthese werden durch dessen Fähigkeit, mit der proteolytischen Matrixproteindegradation zu interferieren, ergänzt: Einerseits vermindert TGFβ die Synthese und Sekretion verschiedener Proteasen und steigert andererseits die Synthese spezifischer Inhibitoren dieser Proteasen (Roberts et al. 1992).

Beispiele hierfür sind die Hemmung der Synthese wichtiger Proteinkinasen wie z.B. der Kollagenase (Edwards et al. 1987), Elastase (Redini et al. 1988), des Plasminogenaktivatorinhibitors (Laiho et al. 1986), Matrix-Metalloproteinase (Overall et al. 1989; Poncelet und Schnaper 1998) und Cathepsin L als auch der vermehrten Synthese bestimmter Proteinaseinhibitoren wie PAI-1 (Laiho et al. 1987), Urokinase und des

Gewebeinhibitors der Metalloproteasen (TIMP) (Edwards et al. 1987; Overall et al. 1989; Poncelet und Schnaper 1998).

Zusätzlich hat TGFβ Einfluss auf die Integrinhomöostase. Integrine sind eine Gruppe transmembranöser Glykoproteine, die zur Familie der Zelladhäsionsrezeptoren gehören und eine Verbindung zwischen ihren extrazellulären Liganden und dem Zytoskelett bewirken (Roberts et al. 1990; Hynes 1987). Die Integrinrezeptoren sind Heterodimere. Sie bestehen aus einer α Einheit (140-160 kD), die nicht-kovalent mit einer β–Untereinheit (105-120 kD) assoziiert ist (Ignotz und Massague 1987b) und deren jeweils andersartige Struktur mindestens 16 verschiedene Integrine bilden (Ruoslahti 1991; Hynes 1987).

Vermittels TGFβ konnte eine gesteigerte Synthese von Integrinen einerseits durch erhöhte mRNA-Produktion insbesondere der β-Untereinheit und andererseits posttranslational durch Stimulation der Konversion der 100 kD Vorläufereinheit in die 120 kD reife β-Untereinheit und deren verstärkten Transport zur Plasmamembran festgestellt werden (Ignotz und Massague 1987b). Zusätzlich scheint es durch verändertes Gleichgewicht der α und β-Untereinheit das Adhäsionsverhalten der Zelle zu beeinflussen (Heino et al. 1989).

Das TGFβ Homodimer bindet an einen der drei verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren I, II, III. Die meisten Zellen besitzen alle drei Rezeptortypen, wenn auch deren relativer Anteil variiert. Während die Rezeptoren I und II Glykoproteine von 65 kD (Typ I) bis 85-95 kD (Typ II) sind, ist der Typ III Rezeptor ein integrales Membranproteoglykan von 280 bis 330 kD, auch Betaglykan (Massague et al. 1990; Cheifetz et al. 1988a; Segarini 1993). Während der Typ I und II Rezeptor eine hohe Affinität für $TGF\beta_1$, jedoch nur geringe Affinität für $TGF\beta_2$ zeigen, ist der $TGF\beta_3$ Rezeptor nicht in der Lage, zwischen $TGF\beta_1$ und $TGF\beta_2$ zu diskriminieren (Cheifetz et al. 1987). Ein vierter Rezeptor wurde auf einer Ratten-Zellinie eines Hypophysentumors gefunden (Cheifetz et al. 1988b).

Lin zeigte, dass die zytoplasmatische Domäne des Typ II TGFβ Rezeptors eine funktionelle Kinase ist, was darauf hinweist, dass Serin/Threonin Phosphorylation ein Mechanismus des TGFβ rezeptorvermittelten Signalweges ist (Lin et al. 1992; Massague et al. 1992). Die Typ I und II Rezeptoren sind voneinander abhängige Komponenten: Der Typ II Rezeptor benötigt zur Signaltransduktion den Typ I Rezeptor, während der Typ I Rezeptor nur bereits an den Typ II Rezeptor gebundenes TGFβ erkennen kann. Nach Ligandbindung kommt es zur Komplexbildung des Typ II mit dem Typ I Rezeptor, wobei der Rezeptor II, der eine aktive Kinase darstellt, die zytoplasmatischen Domänen des Rezeptor I durch phosphorylierung von Serin- und Threoninresiduen aktiviert, was diesen zur Signaltransduktion befähigt. Smads fungieren als Rezeptor-Typ I aktivierte

Signaleffektoren, die die Transkription bestimmter Gene regulieren (Wrana et al. 1992; Wrana et al. 1994; Massague und Weis-Garcia 1996; Derynck et al. 1998). Sieben mammalian Mad-related proteins, Smad 1-7 wurden identifiziert, die als intrazelluläre Signaltransduktoren für die TGFβ Polypeptidfamilie fungieren (Derynck und Zhang 1996; Riggins et al. 1996; Hayashi et al. 1997).

Neueste Ergebnisse zeigen, dass die TGFβ Wirkungen durch die nachfolgenden Phosphorylierungsvorgänge an den Rezeptor-aktivierten Smad 2 und Smad 3 Proteinen (Proteine bei Wirbeltieren, die mit der Drosophila Gene Mothers against dpp (MAD)-Familie verwandt sind) erfolgen, die spezifisch mit dem TGFβ I Rezeptor interagieren (Chen et al. 2000; Usui et al. 1998). Phosphorylation induziert eine Assoziation zwischen den Rezeptor-aktivierten Smads und Smad 4. Die Smad Komplexe translozieren vom Zytoplasma in den Nukleus, wo sie mit DNA und spezifischen DNA Transkriptionsfaktoren interagieren, und somit die durch TGFβ induzierte Transkription spezifischer Gene initiieren (Derynck et al. 1998; Derynck und Zhang 1996). Die Smad mediierte Transkription kann direkt durch Bindung an bestimmte Zielgene wie PAI-1 (Dennler et al. 1998; Zhang et al. 1996) oder durch Interaktion der Smad Proteine mit anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. Smad 4 unabhängige TGFβ Wirkungen wie die Induktion der Fibronektinsynthese und TGFβ induzierter Zellzyklusarrest wurde in Smad 4 negativen Zellen gesehen und in Zusammenhang mit durch Smad 2 und/oder Smad 3 vermittelten Aktivierung des MAP Kinase Signalweges und konsekutiver Aktivierung von Jun N-terminaler Kinase bzw. ERK 1/2 gebracht. Der jeweils durch TGFβ induzierte MAP Kinase Signalweg ist zellabhängig (Liu et al. 1997; Zhang et al. 1998).

TGFβ ist demnach der Protoyp eines multifunktionellen Zytokines (McCartney-Francis und Wahl 1994; Sporn und Roberts 1988). Eine wichtige Rolle kommt dem TGFβ bei der Wundheilung zu (Mustoe et al. 1987), in der Kollagen für die Zugfestigkeit und Fibronektin für die Zelladhäsion der in die Wunde einwandernden Zellen notwendig sind (Wahl et al. 1987; Shah et al. 1992; Roberts et al. 1992).

TGFβ wird aufgrund seiner oben genannten Funktionen und Wirkungen mit Erkrankungen in Verbindung gebracht, die mit gesteigerter TGFβ Expression und konsekutiv pathologischer Matrixakkumulation einhergehen. Außer der hier erwähnten chronischen Pankreatitis sind dies insbesondere chronisch entzündliche Erkrankungen. Hierbei ist insbesondere die Leberzirrhose zu erwähnen, bei der TGFβ eine pathogenetische Schlüsselrolle durch Stimulation der Transformation hepatischer Sternzellen in extrazelluläre matrixproduzierende Myofibroblasten zukommt (Bachem et al. 1993a;

Gressner 1996b; Ueki et al. 1998; Massague et al. 1992; Ramadori et al. 1992). So wird die Matrixproteinexpression einschließlich Proteoglykanen und strukturellen Glykoproteinen wie Kollagen I, III und Fibronektin induziert (Casini et al. 1993) und die Leberzellregeneration (Michalopoulos 1990) und Hepatozytenapoptose reguliert (Gressner und Bachem 1995; Gressner 1996a; Bachem et al. 1994; Bachem et al. 1993a; Bursch et al. 1993; Gao et al. 1996; Bedossa und Paradis 1995; Roth et al. 1998).

Eine weitere mit Fibrosierungsprozessen einhergehende Erkrankung ist die tubulointerstitielle Fibrose bei Nierenerkrankungen wie diabetische Nephropathie und manchen Formen von Glomerulonephritis (Nath 1992). Ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen TGFβ Expression und Progression tubulointerstitieller Fibrose im Sinne einer Stimulation der extrazellulären Matrixsynthese konnte hergestellt werden (Roberts et al. 1992; Yamamoto et al. 1994b; Burger et al. 1998; Alvarez et al. 1992; Sharma und Ziyadeh 1994). Border gelang durch Antikörper Administration gegen TGFβ eine Verringerung der extrazellulären Matrixsynthese bei einem experimentellen Glomerulonephritis-Modell der Ratte (Border und Ruoslahti 1990). Erst kürzlich identifizierte Yokoi CTGF als wichtigen Mediator der durch TGFβ induzierten extrazellulären Matrixsynthese (Yokoi et al. 2001).

Auch bei der idiopathischen Lungenfibrose konnte eine gesteigerte TGFβ Expression festgestellt werden (Broekelmann et al. 1991; Xu et al. 2003). Zusätzlich fand Krupsky eine durch TGFβ induzierte vermehrte Synthese von Kollagen bei Lungenfibroblasten (Krupsky et al. 1996).

Bei dem durch Bleomycin induzierten Modell der Lungenfibrose konnte insbesondere während der reparativen Phase eine erhöhte Expression des TGFβ als auch dessen mRNA in den fibrosierenden Bereichen nachgewiesen werden (Vyalov et al. 1993; Santana et al. 1995; Khalil et al. 1989).

Bei einer Reihe weiterer, mit Fibrosierung einhergehender Erkrankungen konnte TGFβ als Mediator der extrazellulären Matrixsynthese identifiziert werden: Bei Systemischer Sklerose (Gruschwitz et al. 1990), proliferativer Vitreoretinopathie nach Operation bei Netzhautablösung (Connor, Jr. et al. 1989) und extrazellulärer Matrixproduktion durch Endothelzellen der Cornea (Usui et al. 1998). Ein Zusammenhang mit Sklerodermie konnte nicht bestätigt werden (McWhirter et al. 1994).

TGFβ wurde auch in Zusammenhang mit der Tumorentwicklung genannt (Sieweke und Bissell 1994). Der Verlust der wachstumsinhibierenden Funktion des TGFβ durch Defekte der TGFβ Expression oder Aktivierung, Verlust von TGFβ Rezeptoren oder der

Signaltransduktion kann zu einer onkogenen Transformation der Zellen beitragen (Shipley et al. 1986; Kuwahara et al. 2001; Derynck und Zhang 1996). Neueste Studien weisen darauf hin, dass TGFβ ebenfalls onkogene Aktivität insbesondere vermittels Smad 3 im Rahmen u.a. des Ras-ERK-Ap-1 Signalweges mit konsekutiver Aktivierung des AP-1 besitzt, das Invasion und Metastasierung bewirkt. Diese onkogenen Signalwege vermittels TGFβ werden durch autokrine Signalwege der Tumorzelle bewirkt (de Caestecker et al. 2000).

I.5 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bei chronischer Pankreatitis

Bei der chronischen Pankreatitis steigt die Fibroseausdehnung mit dem Schweregrad der Krankheit. In diesem Zusammenhang ist das Gesamtkollagen beim Erkrankten um das bis zu Dreifache höher als beim gesunden Probanden (Bedossa et al. 1989).

Der Gehalt an Kollagen vom Typ I und III sowie Fibronektin ist sowohl in fibrösen als auch histologisch unauffällig erscheinenden Arealen erhöht (Kennedy et al. 1987; Shimoyama et al. 1995) während Kollagen Typ IV und Laminin nicht erhöht sind (Gress et al. 1994a; Gress et al. 1994b; Ishihara et al. 1998). Suda fand Kollagen Typ III, das vermehrt in neu gebildetem Bindegewebe vorkommt, in inter- und intralobulären fibrotischen Arealen bei alkoholinduzierter und obstruktiver chronischer Pankreatitis, während Kollagen I nur in den interlobulären Bereichen vorkam (Suda et al. 1990).

Untersuchungen zur Genexpression, die für Proteine der extrazellulären Matrix und für extrazellulär degradierende Proteasen kodieren, ergaben einen Anstieg der MMP-2-Protease und deren spezifischen Inhibitors TIMP-2. Dies könnte als Teil eines autoregulatorischen Mechanismus von Abbau und Wiederaufbau extrazellulärer Matrix gesehen werden. Transkripte von MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 konnten nicht nachgewiesen werden (Gress et al. 1994b). Hingegen konnten im Caerulein-induzierten Pankreatitis-Modell der Maus Hinweise auf eine Regulation der MMP-3 durch TGFβ gefunden werden (Muller-Pillasch et al. 1997; Gress et al. 1998).

I.6 Die pankreatische Sternzelle

Die Erforschung hepatischer Sternzellen, synonym Fettspeicherzellen, Vitamin-A-Zellen oder Ito-Zellen, trug einerseits zum Verständnis der Fibrosierungsvorgänge bei der chronischen Hepatitis bei und legte zugleich den Grundstein für die Erforschung analoger Mechanismen im Pankreas. Bei Leberschädigung unterschiedlicher Genese (entzündlich, toxisch, bei Stoffwechsel- und Speicherkrankheiten) werden perisinusoidale Retinoid-

Speicherzellen (Ito-Zellen) durch inflammatorische Stimuli aktiviert und transformieren zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen, den qualitativ und quantitativ die Bedeutung der wichtigsten Zellen der Bindegewebssynthese im Rahmen der Leberfibrogenese zukommt.
Zur Aktivierung und Proliferation der hepatischen Sternzelle bei Leberschädigung tragen Zytokine der einwandernden Monozyten/Makrophagen wie TGFβ1, TGFα, TNFα und der Zerfall von Thrombozyten mit Freisetzung von TGFβ1, PDGF u.a. Faktoren bei.
Unter diesen Einflüssen unterliegt die hepatische Sternzelle einer morphologischen und funktionellen Veränderung: Die Zellen proliferieren und wandeln sich in Myofibroblast-ähnliche Zellen um, verlieren die Vitamin A haltigen „Fettdroplets“, reagieren mit einer Hypertrophie des rauen Endoplasmatischen Retikulums, werden α-SMA und Desmin positiv und produzieren vermehrt extrazelluläre Matrix. Parakrine und autokrine Stimulationsmechanismen, insbesondere durch TGFβ, der einer der wichtigsten fibrogenen Mediatoren darstellt, unterhalten die Fibrogenesereaktion auch nach Ende des initialen Stimulus (Geerts et al. 1989; Friedman 1993; Bachem et al. 1989; Bachem et al. 1993a; Bachem et al. 1993b; Gressner 1992; Gressner et al. 1994; Gressner und Bachem 1995; Gressner 1996b; Gressner et al. 1996c; Ramadori 1991; Ramadori et al. 1992; Hautekeete und Geerts 1997; Knittel et al. 1992; Knittel et al. 1999; Ballardini et al. 1988).
Erstmalig 1982 wurden Vitamin-A speichernde Zellen durch experimentell erzeugte Hypervitaminosen im Pankreasgewebe von Mäusen entdeckt (Watari et al. 1982). Ikejiri wies interstitielle Vitamin-A speichernde Zellen mit zytoplasmatischen Fettvakuolen sowohl in perivaskulären, interazinären und interlobulären Arealen des Rattenpankreas und normalem humanem Pankreasgewebe als auch in fibrotischen Arealen in Pankreata von Patienten mit chronischer Pankreatitis erstmalig nach. Auffallend war dort die Einbettung dieser Zellen in Kollagenfaserbündel innerhalb fibrotisch umgewandelter Areale (Ikejiri 1990). Von verschiedenen Autoren wurden Fibroblastenaktivierung bei der akuten als auch chronischen Pankreatitis beschrieben (Elsasser et al. 1989; Gress et al. 1994a; Gress et al. 1994b). Ausgehend von der zuvor erforschten pathogenetischen Bedeutung der Ito Zelle bei der Leberfibrogenese wurde in Analogie eine Rolle der Vitamin-A speichernden Zelle bei der Pankreasfibrose diskutiert. Analogien zu diesen Aktivierungsprozessen von Fibroblasten in Myofibroblasten-ähnliche Zellen mit der Fähigkeit der aktiven extrazellulären Matrixproduktion finden sich auch bei der Lungenfibrose (Zhang et al. 1994).
1997 isolierte Saotome periazinär gelegene fibroblastenähnliche Zellen von humanen pankreatischen Azini und charakterisierte sie (Saotome et al. 1997). Apte gelang 1998 die

Kultur pankreatischer Sternzellen (Apte et al. 1998) und Bachem gelang 1998 der Nachweis der Transformation der ruhenden pankreatischen Sternzelle, die im Pankreas natürlicherweise interlobulär und interazinär vorkommt, in Myofibroblasten-ähnliche Zellen in vitro (Bachem et al. 1998). Bei Aktivierung verliert die pankreatische Sternzelle zunehmend ihre intrazytoplasmatischen Fettdroplets und Vitamin A. Es entwickelt sich weiterhin ein prominentes rauhes Endoplasmatisches Retikulum und die Zellen nehmen eine charakteristische spindel- oder sternförmige Form an. Diese aktivierte Zelle, die sich durch Expression der Zytofilamente Iso-α-SMA (über 90%) (Vyalov et al. 1993; Skalli et al. 1986; Bachem et al. 1998) und Desmin auszeichnet, synthetisiert exzessiv extrazelluläre Matrix, insbesondere Fibronektin, Kollagen Typ I, III und Laminin (Bachem et al. 1998; Apte et al. 1998; Apte et al. 1999). Die morphologische Ähnlichkeit zur hepatischen Sternzelle und die Fähigkeit zur Synthese von Kollagen I und Fibronektin sprechen dafür, dass die pankreatische Sternzelle diejenige Zelle ist, die im Rahmen einer chronischen Pankreatitis vermehrt extrazelluläre Matrix produziert und damit die Pankraesfibrose initiiert und unterhält.

Auch bei der Pathogenese der akuten Pankreatitis wird eine Beteiligung der pankreatischen Sternzelle nicht ausgeschlossen (Bachem et al. 1998; Wells und Crawford 1998).

Bei der experimentellen Pankreatitis im Tiermodell als auch bei der humanen Pankraesfibrose konnte eine Aktivierung der pankreatischen Sternzelle gezeigt und ihre Rolle als Hauptquelle der Typ I Kollagen Produktion bei pankreatischer Fibrose hervorgehoben werden (Haber et al. 1999).

Die Aktivierung der pankreatischen Sternzelle zur Myofibroblasten-ähnlichen, matrixproduzierenden Zelle wird durch TGFβ vermittelt (Bachem et al. 1998; Apte et al. 1999). Erst kürzlich zeigte Mews, dass pankreatische Sternzellen auch durch proinflammatorische Zytokine wie TNFa, IL1 und IL6 als auch durch das anti-inflammatorische Zytokin IL10 aktiviert werden können (Mews et al. 2002). Auch Alkohol und sein Metabolit Azetaldehyd und oxidativer Stress sind in der Lage, kultivierte pankreatische Sternzellen zu aktivieren (Apte et al. 2000).

Inhibitorisch auf proinflammatorische und fibrogene Stimuli aktivierter PSC hingegen wirkt die Aktivierung von PPAR-γ, der ein wichtiger Regulator der Entzündungs- und Immunantwort ist (Ricote et al. 1998; Jiang et al. 1998; Masamune et al. 2002).

DiMagno diskutiert die Rolle der pankreatischen Sternzelle hinsichtlich der typischen pankreatischen Schmerzsensation. Durch ihr kontraktiles Potential und perivaskuläre Lokalisation wäre sie in der Lage, mikrovaskuläre Ischämie und konsekutiv Schmerz zu

erzeugen (Wells und Crawford 1998). Durch die Interaktion von extrazellulärer Matrix, Zytokinen und aktivierten pankreatischen Sternzellen untereinander könnte die zukünftige Therapiestrategie der Schmerzbekämpfung bei chronischer Pankreatitis auf der zellulären Ebene durch Modulation der Entzündung oder Fibrose sein (Dimagno 1999).

I.7 Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe

Nachdem Bachem 1998 der Nachweis der Transformation der ruhenden pankreatischen Sternzelle in Myofibroblasten-ähnliche Zellen in Kultur gelang, zeigte er, dass unter Wachstumsfaktoren im Serum wie bFGF, PDGF, insulin-like growth factor I und II, TNFα und TGFα nur TGFβ1 die Fähigkeit besitzt, die Fibronektinsynthese bei höheren Serumkonzentrationen zu stimulieren. BFGF, PDGF und TGFα konnten die Synthese von zellulärem Fibronektin bei kultivierten humanen pankreatischen Sternzellen lediglich in serumfreien Medium signifikant steigern (Bachem et al. 1998).

Schneider untersuchte die Wirkung polypeptidartiger Wachstumsfaktoren (bFGF, TGFα, TGFβ1, PDGF, IGF-I, IGF-II und TNFα) auf das Proliferationsverhalten und Matrixsynthese pankreatischer Sternzellen der Ratte in serumfreien Medium (Schneider et al. 2001). Er zeigte, dass TGFβ1 und TNFα die Änderung des Zellphänotyps von einer fettspeichernden in eine Myofibroblast-ähnliche Zelle beschleunigt. PDGF und in geringerem Ausmaß bFGF (Friess et al. 1992) stellen die stärksten Mitogene dar. Weiterhin stimulierten bFGF, TGFβ1, PDGF und, in geringerem Ausmaß, auch TGFα die Synthese von Kollagen Typ I, III und Fibronektin bei kultivierten pankreatischen Sternzellen der Ratte, wohingegen IGF-I, IGF II und TNFα keine stimulatorischen Effekte auf die Matrixsynthese der PSC zeigten. Den stärksten stimulatorischen Effekt jedoch zeigte 10% FKS haltiges Medium.

Ein parakriner Stimulationsmechanismus zwischen in geschädigtes Pankreasgewebe vermehrt einwandernden Makrophagen und pankreatischen Sternzellen des Menschen und der Ratte wurde 1999 von Schmid-Kotsas beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass das nativ oder transient angesäuerte Medium LPS stimulierter Makrophagen die Synthese von Typ I Kollagen und cFibronektin signifikant steigern konnte, jedoch keinen Einfluss auf die Zellproliferation hatte. Als verantwortlicher Mediator der Matrixproteinsynthese konnte TGFβ1 identifiziert werden, das von aktivierten Makrophagen synthetisiert und im angesäuerten Medium aktiviert, pankreatische Fibrosierungsvorgänge durch parakrine Stimulation der Matrixproteinsynthese der pankreatischen Sternzellen unterhält (Schmid-Kotsas et al. 1999).

Kürzlich untersuchte Luttenberger den Einfluss der Thrombozyten, die nach einer Schädigung von Azinuszellen in entzündlichen Arealen des Pankreas aggregieren (Luttenberger et al. 2000). Die aus den α-Granula der Thrombozyten freigesetzten fibrogenen und mitogenen Mediatoren wie TGFβ, PDGF und EGF/TGFα können die im Pankreas ruhenden PSC auf parakrinem Wege aktivieren und deren Proliferation und Matrixsynthese stimulieren. TGFβ konnte als Hauptmediator der Matrixsynthese identifiziert werden, da insbesondere das vorübergehend angesäuerte Thrombozytenlysat, welches TGFβ in seiner biologisch aktiven Form enthält, in Abhängigkeit von der zugegebenen Konzentration den stärksten Stimulationseffekt auf zelluläres Fibronektin und Kollagen Typ I zeigte. Durch Präinkubation mit anti-TGFβ1 konnte die Stimulation der cFibronektin-Synthese durch angesäuertes Thrombozytenlysat signifikant reduziert werden. Als Hauptmediator der Zellproliferation im angesäuerten Thrombozytenlysat konnte PDGF identifiziert werden. Die mitogene Aktivität von PDGF konnte durch Präinkubation mit anti-PDGF erfolgreich antagonisiert werden.

Angesäuertes Thrombozytenlysat zeigte jeweils eine stärkere fibrogene und mitogene Wirkung als natives Thrombozytenlysat, u.a. durch Aktivierung des im nativen, nicht-angesäuerten Lysat vorliegenden Wachstumsfaktors TGFβ.

Luttenbergers und Schmid-Kotsas Ergebnisse zeigen, dass von Thrombozyten und Makrophagen freigesetzte Mediatoren Zellwachstum und Matrixsynthese von pankreatischen Sternzellen parakrin stimulieren können (Luttenberger et al. 2000).

Kandenwein stellte die Frage nach einem den Fibrosierungsprozess bei chronischer Pankreatitis selbsterhaltenden autokrinen Stimulationsmechanismus der pankreatischen Sternzelle, da die progrediente Fibrosierung des Pankreas auch nach Beseitigung der primären Krankheitsursache nicht aufgehalten werden kann. Hierbei konnte unabhängig von fetalem Kälberserum gezeigt werden, dass pankreatische Sternzellen TGFβ1 produzieren (eine einzelne pankreatische Sternzelle produziert durchschnittlich 2,205fg TGFβ bzw. 1,41fg TGFβ1 innerhalb 24h) als auch TGF-Typ II-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Durch Zugabe von Alpha-2-Makroglobulin oder TGFβ-neutralisierenden Antikörpern konnte die Produktion der extrazellulären Matrix gehemmt werden. Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen, dass TGFβ1 auch auf autokrinem Wege die extrazelluläre Matrixsynthese bei kultivierten pankreatischen Sternzellen stimuliert (Kandenwein 2000).

I.8 Problemstellung

Eine progrediente Fibrosierung und morphologische Veränderung des Pankreas bei der chronischen Pankreatitis kann trotz Beseitigung der primären Krankheitsursache nicht verhindert werden. Die Folge dieser Vorgänge sind exokrine, später auch endokrine Pankreasinsuffizienz, eine erhöhte Inzidenz an Pankreaskarzinomen und reduzierte Lebenserwartung (Ammann 1997; Ammann et al. 1984; Sarles et al. 1965; Dimagno et al. 1973; Lowenfels et al. 1993; Lankisch et al. 1993).

In vorangegangenen Arbeiten (Luttenberger et al. 2000; Schmid-Kotsas et al. 1999; Kandenwein 2000) wurde bereits die parakrine und autokrine Stimulation der pankreatischen Sternzelle durch den Wachstumsfaktor TGFβ1 mit konsekutiver Stimulation der extrazellulären Matrixsynthese beschrieben. Kandenwein zeigte in ihrer Arbeit, dass die autokrin stimulierte Synthese von cFibronektin durch Zugabe von Anti-TGFβ um 39,7% gesenkt werden konnte. Eine mögliche Ursache der relativ geringen Inhibition der Matrixsynthese könnte das teilweise Ablaufen autokriner Mechanismen bereits auf intrazellulärer Ebene sein.

Das Modell der autokrinen Wachstumsstimulation liefert die Grundlage für die Suche nach Therapieansätzen, durch die der Mechanismus der fortschreitenden Pankreasfibrose durch Regulation der Wachstumsfaktoren aufgehalten werden kann. Folgende Therapieansätze sind generell denkbar: Verringerung der Gewebekonzentration des Zytokins durch monoklonale Antikörper. Bei diesem Konzept würde die autokrine Stimulation jedoch nicht beeinflusst werden, ebenso durch die Blockade der entsprechenden Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch Antikörper. Neben dem Modell der externen autokrinen Stimulation geht das Modell der internen autokrinen Stimulation davon aus, dass der Wachstumsfaktor mit einem intrazellulären Rezeptor interagiert. Davon ausgehend, kann die autokrine Stimulation durch Rezeptor-Antikörper, die an der Zelloberfläche angreifen, nicht effizient unterbrochen werden. Um die autokrine Stimulation bereits intrazellulär zu hemmen, bieten sich Antisense-ODN an.

Antisense-ODN hemmen bereits auf mRNA-Ebene die Translation des Zielproteins oder interagieren direkt mit der DNA im Zellkern, wo sie bereits die Transkription des Zielproteins verhindern. Folglich kann die Bildung des hauptsächlich zur Pathogenese beitragenden Zytokins und somit auch der konsekutiven Proteine spezifisch verhindert werden (Helene und Toulme 1990; Stein und Cheng 1993; Hartmann et al. 1996; Schuftan und Bachem 1999; Akagi et al. 1996; Khanna et al. 1996; Jachimczak et al. 1995; Gewirtz et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wird durch die Optimierung der Transfektion pankreatischer Sternzellen mit den kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien Dosper (Boehringer-Mannheim), FuGene6 (Boehringer-Mannheim) und Superfect (Qiagen) in Kombination mit drei verschiedenen Antisense-ODN die Grundlage für die Inhibition der TGFβ1 Synthese bereits intrazellulär auf RNA-Ebene und somit eine potentielle Möglichkeit zur Unterbrechung der autokrinen Schleife des selbsterhaltenden Fibrosierungsprozesses bei chronischer Pankreatitis geschaffen. Hierbei mussten Fragestellungen zum Einfluss des Transfektionsreagenz auf die extrazelluläre Matrixsynthese, Proliferation und Toxizität der PSC bearbeitet werden. In einem zweiten Schritt stellte sich die Frage nach dem optimalen Verhältnis von Transfektionsreagenz zu ODN mit der größtmöglichen Transfektionseffizienz. Um die Frage nach der optimalen Inkubationszeit beantworten zu können, wurde anhand einer Kinetik der Zeitraum der maximalen ODN-Aufnahme bestimmt. Da aufgrund der pH-Abhängigkeit der Emission des FITC die Gefahr besteht, den Anteil der in Lysosomen eingeschlossenen ODN zu unterschätzen (Tonkinson und Stein 1994), wurden Experimente mit verschiedenen Lyse- und Pufferansätzen durchgeführt um somit den Effekt der in zellulären Kompartimenten mit niedrigem pH eingeschlossenen FITC-markierten ODN auf die Emissionsintensität abzuschätzen. Ziel der Experimente ist die Etablierung eines effizienten, möglichst wenig toxischen Transfektionssystems und -technik für die pankreatische Sternzelle.

Weiterhin wurde die Auswirkung der AS I und III ODN auf die extrazelluläre Matrixsynthese untersucht. Durch Zugabe der Antisense-ODN gegen TGFβ1 zu pankreatischen Sternzellen ist eine Hemmung der extrazellulären Matrixsynthese zu erwarten.

Das Ziel der Experimente war die Entwicklung und Etablierung eines effizienten Gentransfersystems, das mittels Antisense-ODN gegen TGFβ1 zur Inhibierung der extrazellulären Matrixsynthese in vitro führt und die Basis für zukünftige Forschungsbestrebungen in vivo und schließlich neue Therapiestrategien der chronischen Pankreatitis bietet. Weiterhin sollten in diesem Rahmen die Auswirkungen einer intrazellulären Inhibition der autokrinen Stimulation festgestellt und somit zum Nachweis autokriner Stimulationsmechanismen über TGFβ1 beigetragen werden.

II. Materialien

II.1 Laborausstattung

Cell Strainer 100 µm, Falcon	Becton Dickinson, NJ, USA
Cytotox (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay)	Promega, Mannheim
DELFIA-Fluorometer Victor 1420 Multilabel Counter (Dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay)	Wallac, Freiburg
Epifluoreszenzmikroskop (HBO 50), Axioskop	Zeiss, Oberkochen
GelDoc 1000	BioRad, Hercules, USA
High Pure RNA Extraction Kit	Boehringer Mannheim
Inkubator BB 6220	Heraeus, Hanau
Kulturflaschen 25 und 75 cm^2, Falcon	Becton Dickinson, NJ, USA
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg
Pap Pen	Beckman Coulter-Immunotech, Fullerton, USA
Phasenkontrastmikroskop Telaval 31	Zeiss, Oberkochen
Photofilm Elite Chrome 400	Kodak, Rochester, USA
Pipetten 10 und 25 ml	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Reagiergefäße (Microtubes 1,5ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Spektrophotometer 640	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Sterilbank Hersafe	Heraeus, Hanau
6-,24-Well-Platten, Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
96-Mikrotiter-Well-Platten (Maxi Sorb)	Nunc GmbH, Wiesbaden
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml, Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifuge Rotixa/RP Typ 4200	Hettich, Tuttlingen

II.2 Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Fluka, Neu-Ulm
Albumin bovine Fraction V lyophil.	Sigma, München
β-Aminopropionitril	Sigma, München
Amphotericin B(x100)	Boehringer Mannheim
Antisense Oligonukleotide	Interactiva, Ulm
(+)L-Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
100 Base-Pair Ladder	Amersham, Buckinghamshire
Bisbenzimide H 33258 (2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazoyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl)benzimidazole trihydrochloride)	Sigma, München
Borsäure	Riedel de Haen, Seelze
5-Bromo-2-deoxy-uridin (BrdU)	Boehringer Mannheim
CoCl2 (Kobaltchlorid)	Sigma, München
DAB (3, 3-Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat)	DAKO, Glostrup, Dänemark
DNA-Standard (Kalbsthymus)	Sigma, München
Dosper Liposomal Transfection Reagent (1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propyl-amid)	Boehringer Mannheim
DTPA (Diethylenetriaminepentaessigsäure)	Sigma, München
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, München
Dulbecco´s Modification of Eagles Medium (DMEM)	Seromed-Biochrom, Berlin
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Enhancement Lösung	Wallac, Freiburg
Essigsäure (Eisessig) 100%p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Sigma, München
Fetales Kälberserum (FKS)	Boehringer Mannheim
First Strand Buffer	GibcoBRL, Eggenstein
Formaldehyd	Sigma, München
Formamid	Merck, Darmstadt
FuGene6 Transfection Reagent	Boehringer Mannheim
Gelatine (type from bovine skin)	Sigma, München
Gelstar	Biozym, Oldendorf
Glycerin	Merck, Darmstadt
HAM´s F12 Medium	Seromed-Biochrom, Berlin

HCL	Riedel-de-Haen, Seelze
HCl 1mol/l 1N Lösung	Baker, Deventer, USA
Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N[2-Ethansulfonsäure]	Sigma, München
Iodixanol-Dichtegradient, OptiPrep	Nycomed-Amersham, Buckinghamshire, UK
L-Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein
MOPS (4-Morpholinepropanesulfonic acid)	Sigma, München
NaCl	Fluka, Neu-Ulm
NaHCO3	Sigma, München
Na2HPO4 (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaH2PO4 (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaN3 (Natriumazid)	Sigma, München
Natronlauge (NaOH)	Riedel-de-Haen, Seelze
NiCl2 (Nickelchlorid)	Merck, Darmstadt
Oligo(dT) Primer	GibcoBRL, Eggenstein
Oligonukleotid Primer	Interactiva, Ulm
PBS (Phosphate buffered saline)	Seromed-Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Seromed-Biochrom, Berlin
Red Taq DNA Polymerase	Sigma, München
Ribonuclease Inhibitor	Amersham, Buckinghamshire
Superfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Superscript II RT	GibcoBRL, Eggenstein
Taq DNA Polymerase	GibcoBRL, Eggenstein
Trinatriumcitrat	Merck, Darmstadt
Tris (NH2C(CH2OH)3)	Amersham, Buckinghamshire
Trisodium Dihydrate (Citric acid, C6H5O7Na3 2H2O)	USB (United States Biochemical Corp.), Cleveland, USA
Triton X 100 (t-Octylphenoxypolythoxyethanol)	Sigma,München
Trypanblau Lösung	Sigma, München
Trypsin-EDTA	Seromed-Biochrom, Berlin
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitanmonolaureate)	Sigma, München
Tyramide Signal Amplification TSA-Indirect	Amersham, Buckinghamshire
Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2)	Merck, Darmstadt

II.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Anti-Kollagen III biotin-labeled goat	Chemikon, Temecula, USA
Anti-Mouse IgG, peroxydasemarkiert	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-rabbit HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Rabbit IgG, Biotin-labeled	DAKO, Glostrup, Dänemark
Biotin labeled Anti Mouse IgG	DAKO, Glostrup, Dänemark
Europium labeled Streptavidin	Wallac, Freiburg
Mouse Anti BrdU IgG	DAKO, Glostrup, Dänemark
Mouse monoclonal anti cellular fibronectin	Sigma, München
Rabbit Anti-human Collagen I	Chemikon, Temecula, USA
Rabbit Anti-human Fibronectin	Dade Behring, Deerfield, USA
Streptavidin FITC	DAKO, Glostrup, Dänemark
Streptavidin HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark

II.4 Standards

Fibronectin, Human Fibroblast (cellular Fibronectin)	Calbiochem, San Diego, USA
Kalbsthymus DNA	Sigma, München

II.5 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders vermerkt, in aqua bidest. angesetzt, der adäquate pH Wert wurde mit NaOH bzw. HCL adjustiert.

PBS-Puffer

9,55g PBS-Dulbeccos-Pulver ad 1000 ml aqua bidest.

Lösungen für die Trypsinierung der Zellkulturen

Trypsin-/EDTA-Lösung

PBS	
EDTA	0,1%
Trypsin	0,025%

Lösungen für den fluorometrischen DNA Test

DNA Puffer (pH 7,4)

NaH2PO4	50 mM
NaCl	2 M
ad 1000 ml Aqua dest	

DNA Farbreagenz

Bisbenzimid	1mg in 500ml DNA Puffer

Lösungen zur fluoroimmunologischen Bestimmung des zellulären Fibronektins

Assay Puffer, pH 7,7

Tris-HCL	0,05 M
NaCl	0,15 M
Rinderserumalbumin	0,5%
NaN3	0,5%

Coating-Puffer, pH 9,1

NaHCO3	0,05 M
NaN3	0,5%

Waschpuffer

NaCl	0,015 M
NaN3	0,5%
Tween 20	0,5%

DNA –Standard-Stocklösung

1mg Kalbsthymus-DNA in 100 ml DNA-Puffer gelöst

Lösungen für die Kollagen Typ I Bestimmung

Wasch-Puffer, pH 7,5

Tris	0,05 M
NaCl	0,15 M
Tween 20	0,05%

Lösungen für die BrdU-Bestimmung

DAB-Puffer, pH 7,0

Na2HPO4	0,192g
NaH2PO4-H2O	0,092g
NaCl	5,9g

in 100 ml Aqua bidest.

DAB Reagenz

10 mg 3,3-Diaminobenzidine-tetrahydrochlorid-dihydrate in 10 ml DAB-Puffer gelöst

Formamid-Lösung

Formamid	99,5%

Na2Citrat x 2 H2O 0,441 g in 10 ml aqua bidest. lösen, davon 2 ml in 38 ml Formamid

Substrat-Intensifier

H2O2	60µl
CoCl2	60mg
NiCl2	60mg

in 2 ml aqua bidest.

Blockierungslösung

FKS/TNB-Puffer (50/50, v/v)

TNB-Puffer (pH 7,4)

Tris-HCL	0,1M
NaCl	0,15 M
Bovines Serumalbumin	0,5%

ad 1000ml

TNT-Puffer (pH 7,4)

Tris-HCL	0,1M
NaCl	0,15M
Tween 20	0,05%

ad 1000ml

HBS Puffer (pH 7,4)

Hepes	20mM
NaCl	150mM
ad 100ml	

TBE Puffer (10x)

Tris	108 g
EDTA 0,5M (pH8,0)	40ml
Borsäure 55g	
ad 1000ml aqua dest.	

TFO Puffer (pH 7,2)

MOPS	5 mM
NaCl	50 mM
$MgCl_2$	10 mM

II.6 Primersequenzen

Die Primer wurden nach publizierten Gen-Bank-Sequenzen des humanen TGFβ1 und das der Ratte synthetisiert. Regionen hoher Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Genen wurden ausgeschlossen. Jede Primersequenz wurde in einer Suche auf Cross-recognition bezüglich verwandter und nicht verwandter Gene überprüft. Die optimale Primerkonzentration wurde in Vorversuchen etabliert.

Primersequenzen für TGFβ

TGF-b: 5´- AGT GGA TCC ACG AGC CCA A – 3´(Sense)

TGF-b: 5´- AGG AGC GCA CGA TCA TGT T – 3` (Antisense)

Primersequenzen für Fibronektin

5`- TCC AGG AGT TCA CTG TGC C – 3` (Sense)

5´-CTG CAA GCC TTC AAT AGT CA – 3´ (Antisense)

Primersequenzen für β-Actin

5´- GTGGGGCGCCCCAGGCACCA – 3´(Sense)

5´- CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC – 3´(Antisense)

II.7 Sequenzen der Oligonukleotide

Die für die Transfektionsstudien verwendeten ODN sind gegen TGFβ1 gerichtet. ODN der folgenden Sequenzen wurden verwendet. Die SCR-ODN bestehen aus zufällig zusammengestellten Basenabfolgen.

Aus dem „Humanen Transforming Growth Factor-beta precursor Gen“,: 2381 Basenpaare DNA, wurden folgende AS-ODN I bis III als auch SE-ODN I bis III entnommen (Derynck et al. 1987):

AS I: 5´- AGG GCG GCA TGG GGG AG – 3`(Akagi et al. 1996) (17mer)
SE I: 5´CTC CCC CAT GCC GCC CT – 3´
SCR I: 5´- CCT CGC ACT CCT CCG CC – 3´

AS II: 5´- CGA TAG TCT TGC AG – 3´ (Jachimczak et al. 1995; Jachimczak et al. 1996) (14mer)
SE II: 5´- CTG CAA GAC TAT CG – 3´
SCR II : 5´- GTC CCT ATA CGA AC – 3´

AS III: 5´- GTG GGA GGG AGA TGG – 3´ (Khanna et al. 1994) – grenzt an die Trankriptions-Initiationsstelle (15mer)
SE III: 5´- CCA TCT CCC TCC CAC – 3´
SCR III : 5´- GTC GGT GGC TGA TCG – 3´

Aus der “Rattus norvegicus transforming growth factor beta 1” (Accession NM_021578) mRNA wurden folgende AS-ODN I und II als auch SE-ODN I und II entnommen (Yang et al. 1998; Qian et al. 1990):

AS I: 5´- AGG GCG GCA TGG GGG A- 3´ (Akagi et al. 1996) (16mer)
SE I: 5´- TCC CCC ATG CCG CCC T –3´

AS II: 5´- CGA TGG TCT TGC AG – 3´ (14mer)
SE II: 5´- CTG CAA GAC CAT CG – 3´

Aus dem “Rattus norvegicus transforming growth factor beta 1 gene”, promotor and partial exon 1 (AF015683), wurde folgende AS-ODN III als auch SE-ODN III entnommen:

AS III: 5´- GGA GGA GGG GGA CGG – 3´ (15mer)
SE III: 5´- CCG TCC CCC TCC TCC – 3´
SCR III: 5´- GCT CGA GCG CGG TGC – 3´

Die Oligonukleotide wurden entsprechend aus publizierten DNA Sequenzen (Derynck et al. 1987; Qian et al. 1990; Yang et al. 1998) synthetisiert und von INTERACTIVA Virtual Laboratory (Ulm) bezogen.
Das 3´und 5´Ende der ODN wurden jeweils mit zwei Phosphorthioaten zur Prävention der schnellen Degradation verbunden, die einzelnen Deoxyribonukleotide wurden durch Phosphodiester verbunden.
Für die Fluoreszenzmarkierung wurde am 5´Ende Fluorescein angefügt. Die ODN wurden mittels reverse-phase HPLC gereinigt und schließlich lyophilisiert. Vor Gebrauch wurden die ODN in HBS-Puffer gelöst.

III Methoden

III.1 Zellkultur

III.1.1 Zellisolierung humaner pankreatischer Sternzellen

Humane pankreatische Sternzellen wurden aus histologisch fibrotischen Pankreasgebieten durch Auswachsen gewonnen. Das fibrotische Pankreasgewebe wurde zuvor chirurgisch Patienten mit chronischer Pankreatitis entnommen. Hierbei lag das Einverständnis der Patienten vor. Es wurden kleine Gewebestückchen geschnitten (0,5-1mm^3) und in 10cm^2 große, unbeschichtete Kulturplatten ausgesät (6-Well-Platte, 3-5 Stückchen/Well). Als Kulturmedium diente eine Mischung aus 10-20% fetalem Kälberserum in 1:1 (v:v) Dulbecco´s DMEM mit Ham´s F12 Medium. L-Glutamin (2mmol/l), Penicillin/Streptomycin und Amphotericin wurden frisch zugegeben.

Die Gewebestückchen wurden bei 37°C und in mit 5% CO_2 angereicherter, wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. 18h nach Aussaat wurde das Kulturmedium gewechselt, 24h später wurden die Gewebestückchen in neue Kulturplatten transferiert. Wiederum ein bis zwei Tage später wuchsen die PSC in hoher Zahl und Reinheit aus den Gewebestückchen aus. Die kleinen Gewebestückchen wurden nach 2-3 Wochen entfernt.

III.1.2 Zellisolierung pankreatischer Sternzellen der Ratte

Pankreatische Sternzellen wurden aus männlichen, 200-300g schweren Wistar-Ratten der Zuchtkolonien der Tierversuchsanlage Universität Ulm gewonnen. Die Tiere wurden bei 24°C bei einem 12-Stunden-Tag und Nacht-Zyklus mit freiem Zugang zu Nahrung und Trinkwasser gehalten. Alle Tierexperimente erfolgten nach den Richtlinien des lokalen Tierschutz- und Tierhaltungskommittees.

Zur Gewinnung und Kultur inaktivierter Zellen des Fettspeicherphänotyps wurden die Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation aus dem Pankreas unbehandelter Wistar-Ratten isoliert. Nachdem die Ratten mit Phenobarbital anästhesiert waren, wurde das Abdomen eröffnet und der Gallengang ligiert. Nach Einführen einer Kanüle in den Pankreasgang wurden die Tiere getötet und Kollagenase enthaltendes Eagle-Medium (1mg/5ml) wurde intraduktal instilliert. Das aufgetriebene Pankreas wurde daraufhin entfernt und in einem Erlenmeyerkolben für 15min bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Nach diesem ersten Verdauungsvorgang wurde das Pankreas zerkleinert und anschließend ein zweites Mal mit einer Kollagenasesuspension verdaut (1,75mg/5ml DMEM über 45min). Durch wiederholte Injektionskanülensuktion wurde die Dispersion vervollständigt.

Nach der Auflösung wurden die Acini und Zellen durch ein 250µm Nylonsieb gefiltert und nach dem Auftragen des Filtrates auf eine Dextran-Eagle-Hepes-Dichte-Gradientensäule zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen von der Gradientensäule abgetragen, zweimal gewaschen und in TRIS-Puffer resuspendiert. Nach Auftragen der Suspension auf einen Iodixanol-Dichtegradienten und einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen erneut abgetragen, gewaschen und in mit 10% FKS-angereichertem, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin enthaltenden Dulbecco´s DMEM mit Ham´s F12 Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei einer Dichte von 4x104 Zellen/cm^2 ausgesät und weiter kultiviert.

III.1.3 Kultur und Subkultur pankreatischer Sternzellen

Die Arbeit mit der Zellkultur fand unter sterilen Bedingungen statt. Alle nicht sterilen Lösungen wurden zuvor durch einen 0,22µm-Filter steril filtriert.

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C in mit 5% CO_2 angereicherter, wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Medium bestand aus DMEM/Ham´s F12 (1:1,v:v) mit 10% fetalem Kälberserum, 2% L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 1% Amphotericin. Das Medium wurde 3 Mal in der Woche gewechselt.

Sobald die Zellen einen Zustand adäquater Konfluenz erreichten, wurden sie nach dem zweimaligen Waschen mit PBS durch Trypsinierung mittels einer 0.025%igen Trypsinlösung mit 0,01% EDTA abgelöst. Zur Neutralisierung des Trypsins wurde eine Mischung aus 20% fetalem Kälberserum in einer 1:1 Mischung aus DMEM/Ham´s F 12 Medium zugegeben. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1000rpm wurden die Zellen in dem oben erwähnten Kulturmedium resuspendiert und je nach Erfordernissen in verschiedene Platten ausgesät.

III.1.4 Präservation pankreatischer Sternzellen

Bereits ab der zweiten Subkultur kultivierte Zellen konnten erfolgreich in flüssigem Stickstoff über längeren Zeitraum aufbewahrt werden. Dazu wurden die bei 37°C in mit 5% CO_2 angereicherter, wasserdampfgesättigter Atmosphäre bis zu adäquater Konfluenz kultivierten Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Trypsinierung mittels einer 0.025%igen Trypsinlösung mit 0.01% EDTA abgelöst.

Zur Neutralisation des Trypsins wurde eine Mischung aus 20% fetalem Kälberserum in einer 1:1 Mischung aus DMEM/Ham´s F 12 Medium zugegeben. Nach 5minütiger

Zentrifugation bei 1000rpm wurden die Zellen in adäquater Menge steril filtrierter Einfrier-Lösung resuspendiert, die aus 10% Glycerin mit 20% FKS bestand und mit einer 1:1 Mischung der Medien DMEM/Ham´s F 12 zur Endmenge aufgefüllt wurde. Die resuspendierten Zellen wurden daraufhin in Cryoröhrchen verteilt und 12h in einer Styroporbox bei -80°C vorgefroren, bevor sie endgültig in flüssigem Stickstoff zur Aufbewahrung kamen.

III.1.5 Rekultivierung pankreatischer Sternzellen

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen konnten erfolgreich rekultiviert werden, indem man die schnell angetauten Zellen aus den Cryoröhrchen direkt in vorbereitetes Kulturmedium resuspendierte, das aus 20% fetalem Kälberserum in einer 1:1 Mischung aus DMEM/Ham´s F 12 Medium bestand, dem 2% L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 1% Amphotericin zugesetzt wurde. Nach 24h Kultur bei 37°C in mit 5% CO_2 angereicherter, wasserdampfgesättigter Atmosphäre erfolgte der erste Mediumwechsel mit dem oben beschriebenen Mischungsverhältnis, dem jedoch nur noch 10% FKS zugesetzt wurde. Die weiteren Mediumwechsel erfolgten wie oben erwähnt.

III.2 Fluorometrische DNA-Bestimmung

Die Zellmenge korreliert positiv mit der Menge an DNA, die durch fluorometrische Messung vermittels Bisbenzimidazol quantifiziert werden kann. Die Messung beruht auf einer Bindung von Bisbenzimidazol (Hoechst 33258) mit DNA. Die Fluoreszenz und DNA-Konzentration zeigen einen linearen Zusammenhang. Somit kann indirekt von der Menge an DNA auf die Zellmenge rückgeschlossen werden.

Als Standard diente Kalbsthymus in einer Stocklösung von 10µg/ml, der in einer Verdünnungsreihe mit je 2 Standards/Verdünnung in einem 24Well wie folgt mit DNA-Puffer auf 400µl und daraufhin mit Bisbenzimide-Farbreagenz auf 2ml aufgefüllt wurde: 1. Standard: 4µg Kalbsthymus; 2. Standard: 2µg Kalbsthymus; 3.Standard: 1µg Kalbsthymus; 4. Standard: 0,5µg Kalbsthymus; 5. Standard: 0,25µg Kalbsthymus; 6. Standard: 0,1µg Kalbsthymus; 7. Standard: Bisbenzimide.

Die zu messenden 24Well-Platten wurden zuvor bei –20°C eingefroren, nachdem der Überstand dekantiert und die Zelllage mit PBS einmal gewaschen worden war. Nun wurden die Platten aufgetaut und die Zelllage mit einer Trypsin-EDTA:DNA-Puffer-Mischung im Verhältnis 1:3 abgelöst, wobei die Platten 30min bei 37°C inkubiert wurden. Danach wurde mit Bisbenzimide-Farbreagenz auf 2ml/Well aufgefüllt und die Platten

30min im Dunkeln bei Zimmertemperatur und unter leichtem Schwenken auf dem Rüttler inkubiert. Die relativen Fluoreszenzwerte (Ex. 350nm, Em.450nm) wurden mit dem Victor 1420 Multilabel Counter gemessen. Nach Erstellung der Standardkurve mit Hilfe der Stocklösung konnte der absolute DNA Gehalt bestimmt werden.

III.3 Messungen mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz

III.3.1 Quantitative Messung der extrazellulären Matrixsynthese mit dem fluoroimmunologischen Fibronektin–Assay zur Bestimmung des zellulären Fibronektins

Fibronektin ist ein multifunktionales Glykoprotein, das zirkulierend im Blutplasma, auf Zelloberflächen verschiedener Zelltypen in der extrazellulären Matrix und Basalmembranen gefunden werden kann. Das zelluläre Fibronektin, das u.a. von Fibroblasten, Endothel-, Epithelzellen und Makrophagen gebildet wird, kann mittels monoklonaler Antikörper vom plasmatischen Fibronektin differenziert werden (Atherton und Hynes 1981). Plasmatisches, lösliches Fibronektin unterscheidet sich von zellulärem Fibronektin, das von Fibroblasten und fibroblastenähnlichen Zellen synthetisiert wird. Zur Bestimmung des zellulären Fibronektins wurde folgende Methode angewandt:

Pankreatische Sternzellen wurden in DMEM/HAM´s F12 Medium mit 0,1% FKS und 100µg/ml Ascorbinsäure als auch 100µg/ml β-Aminopropionitril kultiviert. In definierten Zeitabständen nach Stimulation wurde c-Fibronektin mittels Fluoreszenz-Immunoassay im Zellkulturüberstand gemessen.

Coating der 96Well-Mikrotiterplatten: Gelatine wurde in einer Konzentration von 10µg/ml in Coating Puffer bei 60°C unter vortexen gelöst. Je 100µl der Gelatine-Lösung wurden in die Wells gefüllt und 3h bei Raumtemperatur unter Schütteln auf dem Rüttler oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten ausgeklopft und mit je 250µl Assay Puffer pro Well geblockt, mit Folie abgeklebt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten können so bis zur weiteren Verwendung mit Folie abgeklebt und bei 4°C bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden. Der Assay Puffer wird erst kurz vor Gebrauch ausgeklopft.

c-Fibronektin–Assay: Mit je 100µl Standard, jeweils 1:2 mit Assay Puffer verdünnt, wurde eine Standardreihe der Standarde 1-9 von 5000 ng/ml bis 19,5 ng/ml erstellt, wobei der 10. Standardwert als Blank-Wert 100µl Assay Puffer entsprach.

Der zu untersuchende Proben-Überstand wurde je nach Vorversuch mit Assay Puffer (1/20 bis 1/200) verdünnt und jeweils 100µl/Well in die zuvor gecoateten und ausgeklopften Mikrotiterplatten pipettiert.

Die Platten wurden daraufhin für 2h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln auf dem Rüttler oder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3mal mit auf 1:2,5 mit Aqua dest. verdünnter Waschlösung gewaschen. Diesem Schritt folgte eine 90minütige Inkubation der Platten mit je 100µl/Well eines 1:1000 mit Assay Puffer verdünnten, monoklonalen mouse anti-cellular-fibronectin (anti-cFN) Antikörpers bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln auf dem Rüttler. Nach 3maligem Waschen der Platten mit verdünnter Waschlösung wurden die Platten für weitere 90min mit je 100µl/Well eines verdünnten 2. Antikörpers, des 1:1000 mit Assay Puffer verdünnten, biotin–markierten anti-mouse IgG und bei Raumtemperatur unter Schütteln auf dem Rüttler inkubiert. Nachdem die Platten wiederum 3mal mit verdünnter Waschlösung gewaschen worden waren, wurden 100µl/Well 1:1000 mit Assay Puffer verdünntes Europium markiertes Streptavidin zupipettiert und für 45min bei Raumtemperatur unter Schütteln auf dem Rüttler inkubiert. Nach abschließendem 3maligem Waschen mit verdünnter Waschlösung wurden 100µl/Well Enhancement Solution für 45min bei Raumtemperatur und unter Schütteln hinzugefügt. Anschließend wurde die zeitaufgelöste Fluoreszenz des Europium Chelates mit einem Victor Fluorometer gemessen. Die Probenkonzentrationen wurden mit Hilfe der Standardkurve ermittelt. Alle Messungen, sowohl die Standards als auch die Kontrollen und Proben, wurden doppelt bestimmt.

III.3.2 Quantitative Messung von Kollagen Typ I

Pankreatische Sternzellen wurden in DMEM/HAM´s F12 Medium mit 0,1% FKS und 100µg/ml Ascorbinsäure als auch 100µg/ml β-Aminopropionitril kultiviert. In definierten Zeitabständen nach Stimulation wurde Kollagen Typ I mittels Fluoreszenz-Immunoassay im Zellkulturüberstand gemessen.

Hierzu wurde 100µl 1:4 mit 0,05 mol/l NaHCO3, pH 9,1, verdünnter Zellkulturüberstand in 96Well-Mikrotiterplatten pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3maligem Waschen mit Wasch-Puffer wurden die Platten für 2h mit Assay Puffer geblockt. Anschließend wurden die Platten für 3h mit einem 1:500 in Assay Puffer verdünnten polyklonalen Rabbit-anti-human-collagen type I Antikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschzyklen mit Wasch-Puffer wurden die Platten für 2h mit dem zweiten Antikörper, einem Biotin-markierten Anti-Rabbit IgG, der zuvor 1:1000 in Assay Puffer verdünnt wurde, inkubiert. Anschließend wurde für eine weitere Stunde 1:1000 verdünntes, Europium-markiertes Streptavidin zugefügt. Nach weiterem 3maligem Waschen mit

Wasch-Puffer wurde 100µl Enhancement Solution für 30min aufpipettiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz des Europium Chelates mittels eines Victor Multilabel Counters gemessen.

III.3.3 Quantitative Messung der Zellproliferation mittels Bromodesoxyuridine

Für die Messung können die Zellen in 24Well-Platten (2cm^2/Well) als auch in 48Well-Platten (0,75cm^2/Well) ausgesät und dann unter angegebenen optimalen Bedingungen zu geeigneter Konfluenz gezogen werden, wobei der Konfluenzgrad nicht zu hoch sein sollte, um nach der Stimulation mit dem zu testenden Reagenz noch Raum für einen eventuellen Proliferationsschub zu gewährleisten. Das BrdU wird entsprechend der Proliferationsrate anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA aufgenommen und kann dann quantitativ vermittels Fluoreszenz-Immunoassay nach folgender Methode bestimmt werden:

Markierung mit Bromuridin: 6h nach Stimulation der Zellen mit denjenigen Reagenzien, deren Effekt auf die Zellproliferation gemessen werden soll, wurde Bromuridin in einer 5x10^2 Molaren Lösung zugegeben, wobei das Bromuridin kurz zuvor in Medium gelöst wurde. Die Zellen wurden daraufhin für 18h bei 37°C im Inkubator mit BrdU markiert.

Fixation: Nach der Inkubationszeit wurden die Well-Platten 1mal mit PBS gewaschen und somit auch der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen bei rascher Zugabe von 4°C kalter Fixierlösung bestehend aus Ethanol/Essigsäure im Verhältnis 95:5 fixiert und für 10min im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2mal mit TNT-Puffer gewaschen und daraufhin mit 0,05M HCl 20min im Kühlschrank belassen.

DNA-Spaltung: Nach 2maliger Waschung mit TNT-Puffer erfolgte die Zugabe von Formamid-Lösung im Verhältnis Trinatriumcitrat:Formamid wie 1:20. Unter 45minütigem leichten Schütteln auf dem Vortexer im 80°C aufgeheizten Wasserbad erfolgte der Aufbruch des DNA-Stranges.

Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen: Nach 3maligem Waschen mit TNT-Puffer wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen eine TNB:FKS-Lösung im Verhältnis 1:1 folgendermaßen verteilt: 500 µl/2cm^2 Well bzw. 200 µl/0,75cm^2 Well. Die Sättigung erfolgte innerhalb einer 45minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schwenker unter leichtem Schütteln.

Markierung mit Anti-Bromodesoxyuridine-IgG: Nach 3maligem Waschen mit TNT-Puffer erfolgte die Zugabe von Maus-Anti-Bromodeoxyuridine-IgG, das in einer 1:500 Verdünnung in TNB suspendiert wurde. Zugegeben wurden 250µl/2cm^2 Well bzw.

150µl/0,75cm^2 Well. Die Inkubation betrug 2h unter leichtem Schütteln auf dem Schwenker bei Raumtemperatur. Hierdurch wird das in die DNA eingebaute BrdU detektiert.

Markierung mit Peroxydase-markierten Anti-Maus-IgG: Nach 3maligem Waschen mit TNT-Puffer erfolgte die Zugabe von peroxydase-markiertem anti-Maus-IgG, das in einer 1:500 Verdünnung in TNB suspendiert wurde. Nach Zugabe von 150µl/2cm^2 Well bzw. 150µl/0,75cm^2 Well wurden die Platten 1h unter Schwenken bei Raumtemperatur auf dem Schwenker inkubiert.

Färbung: Nach 3maligem Waschen mit TNT-Puffer wurde DTPA (20µmol in TNB, pH 7,4) zugegeben und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Zugegeben wurden 250µl/2cm^2 Well bzw. 200µl/0,75cm^2 Well.

Nach 3 weiteren Waschschritten mit TNT-Puffer wurde Europium-markiertes Streptavidin (1:1000 in TNB dilutiert), 250µl/2cm^2 Well bzw. 200µl/0,75cm^2 Well, zugegeben und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 Waschschritten mit TNT-Puffer wurde 150µl/2cm^2 Well bzw. 150µl/0,75cm^2 Well Enhancement-Solution hinzugefügt und 45min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden jeweils 100µl der Probe in Mikrotiterplatten pipettiert und die Fluoreszenz des Europium-Chelats im Delfia Victor 1420 Multilabel Counter ermittelt.

III.4 Versuche zur Toxizität der Transfektionsreagenzien

III.4.1 LDH-Assay

Zur quantifizierung der toxischen Auswirkungen der Transfektionsreagenzien auf die pankreatische Sternzelle wurde die im Überstand zu messende LDH-Freisetzung ermittelt. LDH ist ein zytosolisches Enzym und Indikator für die Vitalität der Zellen. Seine Freisetzung korreliert positiv mit dem Ausmaß des Zellunterganges. Das freigesetzte LDH im Zellüberstand wird mit einem enzymatischen Test nachgewiesen, der auf der Konversion von Tetrazolium Salz in ein rotes Formazan-Produkt beruht. Die Farbintensität ist proportional zu der Anzahl der lysierten Zellen.

Zur quantifizierung der LDH-Freisetzung wurde folgende Standardreihe erstellt, wobei je 3 Wells einer 96Well-Platte denselben Ansatz enthielten. Für die Standardreihe wurde eine bereitgestellte LDH-positiv-Kontrolle wie folgt mit Medium (DMEM/HAM´s F12 1:1,v:v) verdünnt:1.Standard: LDH-positiv-Kontrolle zu Medium entsprechend 1:1000; 2.Standard: LDH-positiv-Kontrolle zu Medium entsprechend 1:2000; 3.Standard: LDH-positiv-Kontrolle zu Medium entsprechend 1:4000; 4.Standard: LDH-positiv-Kontrolle zu

Medium entsprechend 1: 8000; 5.Standard: LDH-positiv-Kontrolle zu Medium entsprechend 1:16000; 6.Standard: LDH-positiv-Kontrolle zu Medium entsprechend 1: 32000.

Die negativ-Kontrolle bestand aus Medium (DMEM/HAM´s F12 1:1,v:v), die positiv-Kontrolle wurde wie folgt gewonnen: Zu den zu untersuchenden Zellen wurde 10µl/100µl Medium 10x Lysis-Solution hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 45min bei 37°C wurde die Lösung abpipettiert und bei 250g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand diente als positive Kontrolle.

Zur Durchführung des Assays wurde eine Säule Substrat-Mix mit 12ml Assay-Puffer gelöst. Zu je 50µl Zellüberstand der zu untersuchenden Zellansätze, die in 96Well-Platten vorpipettiert wurden, wurde 50µl/Well des Substrat-Gemisches hinzugefügt. Die Platte wurde daraufhin abgeklebt und bei Raumtemperatur und in Dunkelheit für 30min inkubiert. Anschließend wurden 50µl Stopp-Solution je Well hinzupipettiert und die Absorbance bei 490 nm (1.Os) am Victor1420 Multilabel Counter gemessen.

III.4.2 Photographische Dokumentation und Darstellung der Toxizität der verschiedenen Transfektionsreagenzien mittels Trypanblau-Färbung

Trypanblau diffundiert in toxisch geschädigte Zellen und färbt diese blau an, während vitale Zellen nicht angefärbt werden. Diese Fähigkeit erlaubt die optische und quantitative Darstellung toxisch geschädigter Zellen. Nach Aussaat der zu untersuchenden Zellen auf zuvor aus Objektträgern mit einem Diamantstift zurechtgeschnittenen, durch Abflammen steril gemachten Glasplättchen in 6Well-Platten mit je 3Glasplättchen/Well wurden die Zellen in einem Medium bestehend aus DMEM/Ham´s F12 (1:1,v:v) mit 10% FKS, 2% L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% Amphotericin bei 37°C in mit 5% CO_2 angereicherter, wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Nach erreichen einer adäquaten Konfluenz von 50-80% wurden die von den Zellen bewachsenen Glasplättchen in 24Well-Platten zu je 1 Glasplättchen/Well umgesetzt und in jeweils 500µl Transfektionsmedium aus DMEM/Ham´s F12 (1:1,v:v) mit 2% L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,1% FKS mit variierenden Konzentrationen an Transfektionsreagenz stimuliert und für 24h bei 37°C im Inkubator inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Plättchen in eine Lösung aus Trypanblau:Medium DMEM/Ham´s F12 (1:1,v:v)=1:1 gegeben und dort für 5min belassen. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden die Plättchen durch Eintauchen in PBS

gespült und sofort unter dem Mikroskop betrachtet und das Ergebnis photographisch dokumentiert.

III.5 Optimierung der Transfektion pankreatischer Sternzellen

III.5.1 Zellkulturstimulation und -transfektion

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Gewebekulturflaschen kultivierten PSC, je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen pankreatischen Sternzellen und die Passagen 3-10 von pankreatischen Sternzellen der Ratte, in Gewebekulturplatten ausgesät.

Nach durchschnittlich 24-48h war die jeweils erwünschte Zelldichte der Subkultur, die je nach Experiment einer jeweiligen Konfluenz im Bereich von ca. 65%-90% entsprach, erreicht. In einer Präinkubationsphase von 24h wurde der dem Zellkulturmedium beigemengte FKS-Anteil von 10% auf 0,1% reduziert, um die nachfolgenden Experimente möglichst wenig durch die biologischen Bestandteile des FKS zu beeinflussen als auch um durch einen Zustand verminderter Zell-Aktivität weitestgehend gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Anschließend erfolgte die Transfektion mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz und den AS-ODN I, II und III unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durch Variation der jeweiligen Parameter Transfektionsreagenzkonzentration, ODN-Konzentration sowie Inkubationszeit. Nach der zuvor festgesetzten Inkubationszeit wurde entsprechend den Versuchsprotokollen weiter verfahren. Als Kontrolle dienten PSC, die über den entsprechenden Zeitraum demselben Serum-reduzierten Medium ausgesetzt waren.

III.5.2 Transfektion pankreatischer Sternzellen mittels Dosper-Transfektionsreagenz

Dosper ist ein polykationisches Reagenz von Boehringer-Mannheim. Die kationischen Liposomen interagieren spontan mit der negativ geladenen DNA und bilden einen polykationischen Komplex. Dieser Liposom-Polynukleotid-Komplex wird unspezifisch an die negative Oberfläche der Zellen adsorbiert und von der Zelle aufgenommen.

Für die Transfektion wurde DNA in HBS suspendiert. In einem neuen Ansatz wurde das Dosper-Reagenz in vorliegendes HBS pipettiert.

Daraufhin wurden die beiden Ansätze vermengt und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15min konnte mit entsprechender Menge Medium aufgefüllt und der Ansatz zu den zu transfizierenden Zellen hinzugefügt werden.

Zur Vermeidung der Oxidation durch Luftkontakt musste das Dosper-Reagenz nach Gebrauch mit Argon überschichtet werden.

III.5.3 Transfektion pankreatischer Sternzellen mittels FuGene6-Transfektionsreagenz

Fugene6 ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz von Boehringer-Mannheim. Es besteht aus einer Mischung von Lipiden der nicht-liposomalen Galenik und anderen, nicht näher zu eruierenden Komponenten.

Für die Transfektion wurde das FuGene6-Transfektionsreagenz vorsichtig in Medium pipettiert und die Mischung für 5min inkubiert. In einem neuen Ansatz wurde konzentrierte DNA vorgelegt und das FuGene6-Medium-Gemisch tropfenweise hinzupipettiert. Daraufhin wurde die Suspension vorsichtig geschüttelt und für 15min inkubiert, bevor sie zu den zu transfizierenden Zellen hinzugefügt wurde.

III.5.4 Transfektion pankreatischer Sternzellen mittels Superfect-Transfektionsreagenz

Das Superfect Transfektionsreagenz beruht auf dem Prinzip aktivierter Dendrimere (zur Aktivierung werden Dendrimere in einem Lösungsmittel aufgenommen und hoch erhitzt). Dies führt zum Herausbrechen einiger Zweige aus dem Molekül und resultiert in höherer Flexibilität (Weber M. 1997). Die Transfektionsfähigkeit aktivierter Dendrimere ist um den Faktor 2-3 größer als die nicht aktivierter Dendrimere. Das Dendrimer-Molekül hat eine sphärische Form mit vom Zentrum ausgehenden Aufzweigungen und terminalen, geladenen Aminogruppen, die die positive Gesamtladung bewirken. Die positiven Aminogruppen des Dendrimers interagieren mit den negativen Phosphatgruppen der DNA. Der positiv geladene DNA-Dendrimer-Komplex bindet an negativ geladene Oberflächenmoleküle der Zellmembran. Die DNA befindet sich dabei in einem stark kondensierten Zustand, der am ehesten mit dem DNA-Histon-Komplex vergleichbar ist (Tang et al. 1996). Der Komplex wird anschließend durch unspezifische Endozytose in Endosomen aufgenommen, wobei die DNA durch Komplexbildung mit dem Dendrimer vor Abbau durch die im Endosom vorhandenen Nukleasen geschützt ist (direkt Endosom-stabilisierende Wirkung der Dendrimere). Durch Protonierung der Aminogruppen werden die Dendrimere im Endosom aus dem Gesamtkomplex freigesetzt. Die komprimierte DNA–Form nimmt nach der Freisetzung wieder die Molekülkonfiguration an, die stärker

hydratisiert ist, wodurch Flüssigkeit aus dem Zytosol ins Endosom dringt. Das Endosom platzt daraufhin und setzt die DNA ins Zytosol frei.
Für die Transfektion wurde DNA in Medium im Verhältnis 1:10 gemischt. In einem neuen Ansatz wurde Superfect in Medium im Verhältnis 1:10 suspendiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze vermengt und für 10sec gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10min wurde, um die angestrebte Endkonzentration zu erhalten, die entsprechende Menge Medium hinzugefügt. Die Transfektions-Mischung wurde dann den Zellen hinzugefügt.

III.5.5 Optimierung der Transfektion pankreatischer Sternzellen mit fluoreszeinmarkierten ODN und konstanter ODN-Konzentration

Die Transfektion pankreatischer Sternzellen mit fluoreszeinmarkierten ODN erfolgte nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit den Transfektionsreagenzien Dosper, Superfect und FuGene6 in 96Well-Platten mit den fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III. Die lichtempfindliche Fluoreszenzmarkierung der ODN erforderte das Arbeiten in weitgehender Lichtabwesenheit. Die Transfektion der Zellen erfolgte in Transfektionsmedium aus DMEM/Ham´s F12 (1:1,v:v) mit 2% L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,1% FKS, um die Transfektion und nachfolgende Experimente möglichst wenig durch die biologischen Bestandteile des fetalen Kälberserums zu beeinflussen.
Die Zellen wurden einen Tag vor dem Experiment in 96Well-Platten ausgesät. Nachdem die Subkultur in den 96Well-Platten einen Zustand adäquater Konfluenz erreicht hatte, in diesem Experiment einer optimalen Konfluenz von ca. 80%-90% entsprechend, wurde das Medium durch 90µl des Transfektionsmediums ersetzt und mit 10µl Transfektionssuspension, bestehend aus ODN und Transfektionsreagenz, auf die Endmenge 100µl/Well aufgefüllt. Nach 6stündiger Inkubation und gelegentlichem leichten Schwenken in Dunkelheit und bei 37°C in mit 5% CO_2 angereicherter, wasserdampfgesättigter Atmosphäre wurde die Platte 3mal mit PBS gespült, um die nicht in die Zelle gedrungenen fluoreszeinmarkierten ODN weitgehend zu eliminieren, anschließend wurde je 100µl/Well destilliertes H_2O zur Lyse der Zellen hinzupipettiert. Nach wiederholtem Mischen der Suspension durch mehrmalige Pipettensuktion wurden die in die Zelle aufgenommene und durch die Lyse mit destilliertem H_2O wieder freigesetzte Fluoreszenz-Intensität der fluoreszeinmarkierten ODN mit dem Victor–Fluoreszenzreader gemessen. Die Transfektion, Lyse und Messung erfolgten aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszeinmarkers in größtmöglicher Lichtabwesenheit.

1. Optimierung der Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen und die der Ratte mit variablen Konzentrationen des Dosper-Transfektionsreagenz

Den Empfehlungen des Hersteller-Protokolls folgend sowie die Ergebnisse aus den Experimenten der Proliferationsmessung und LDH-Release-Bestimmung beachtend, wurde die Konzentration an ODN konstant bei 2,5µg/ml gehalten, während die Konzentration des Dosper-Transfektionsreagenz in 5 Ansätzen von 2,5µg/ml bis 20µg/ml variiert wurde (entsprechend dem Verhältnis von ODN zu Transfektionsreagenz wie 1:1, 1:2, 1:4, 1: 6, 1:8). Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit den fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III. Die Transfektion und quantitative Messung der ODN-Aufnahme in die Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

2. Optimierung der Transfektion pankreatischer Sternzellen und die der Ratte mit variablen Konzentrationen des Superfect-Transfektionsreagenz

Den Empfehlungen des Hersteller-Protokolls folgend sowie die Ergebnisse aus den Experimenten der Proliferationsmessung und LDH-Release-Bestimmung beachtend, wurde die Konzentration an ODN konstant bei 5µg/ml belassen, während die Konzentration des Superfect-Transfektionsreagenz in 4 Ansätzen von 5µg/ml bis 20µg/ml variiert wurden (entsprechend dem Verhältnis von ODN zu Transfektionsreagenz wie 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4). Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit den fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III. Die Transfektion und quantitative Bestimmung der ODN-Aufnahme in die Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

3. Optimierung der Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen und die der Ratte mit variablen Konzentrationen des FuGene6-Transfektionsreagenz

Den Empfehlungen des Hersteller-Protokolls folgend sowie die Ergebnisse aus den Experimenten der Proliferationsmessung und LDH-Release-Bestimmung beachtend, wurde die Konzentration an ODN konstant bei 5µg/ml belassen, während die Konzentration des FuGene6-Transfektionsreagenz in 5 Ansätzen von 2,5µl/ml bis 20µl/ml variiert wurden (entsprechend dem Verhältnis von ODN zu Transfektionsreagenz wie 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4). Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III. Die

Transfektion und quantitative Bestimmung der ODN-Aufnahme in die Zelle erfolgte wie oben beschrieben.

III.5.6 Optimierung der Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen und die der Ratte mit variablen Konzentrationen der fluoreszeinmarkierten ODN und konstanter Konzentration des Transfektionsreagenz

1. Dosper-Transfektionsreagenz

Die Ergebnisse der Vorversuche beachtend, wurde die Konzentration an Dosper-Transfektionsreagenz bei 5µg/ml belassen. Diese Konzentration des Dosper-Transfektionsreagenz vereint, entsprechend den Vorversuchen, eine möglichst geringe Toxizität und Zellproliferationsminderung mit einer akzeptablen Transfektionseffizienz. Die Konzentration der ODN-Konzentration wurde wie folgt verändert: 1,25µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml (entsprechend dem Verhältnis von Transfektionsreagenz zu ODN wie 4:1, 2:1 und 1:1). Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III. Die Transfektion und quantitative Bestimmung der ODN-Aufnahme in die Zelle erfolgte wie oben beschrieben.

2. Superfect-Transfektionsreagenz

Die Ergebnisse der Vorversuche beachtend, wurde die Konzentration des Superfect-Transfektionsreagenz bei 2µg/ml belassen. Diese Konzentration des Superfect-Transfektionsreagenz vereint, entsprechend den Vorversuchen, eine möglichst geringe Toxizität und Zellproliferationsminderung mit einer akzeptablen Transfektionseffizienz. Die Konzentration der ODN-Konzentration wurde wie folgt variiert:
1µg/ml und 2µg/ml (entsprechend dem Verhältnis von Transfektionsreagenz zu ODN wie 2:1 und 1:1). Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III. Die Transfektion und quantitative Bestimmung der ODN-Aufnahme in die Zelle erfolgte wie oben beschrieben.

3. FuGene6-Transfektionsreagenz

Die Ergebnisse der Vorversuche beachtend, wurde die Konzentration des FuGene6-Transfektionsreagenz bei 5µg/ml belassen. Diese Konzentration des FuGene6-Transfektionsreagenz vereint, entsprechend den Vorversuchen, eine möglichst geringe

Toxizität und Zellproliferationsminderung mit einer akzeptablen Transfektionseffizienz. Die Konzentration der ODN wurde wie folgt verändert: 1,25µl/ml, 2,5µl/ml und 5µl/ml (entsprechend dem Verhältnis von Transfektionsreagenz zu ODN wie 4:1, 2:1 und 1:1). Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit fluoreszeinmarkierten AS-ODN I und III. Die Transfektion und quantitative Bestimmung der ODN-Aufnahme in die Zelle erfolgte wie oben beschrieben.

III.5.7 Bestimmung der optimalen Inkubationszeit anhand der Kinetik der Aufnahme fluoreszeinmarkierter ODN in die pankreatische Sternzelle

Die Transfektion pankreatischer Sternzellen mit fluoreszeinmarkierten ODN erfolgte nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit den Transfektionsreagenzien Dosper, Superfect und FuGene6 in 96Well-Platten mit den fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III.

Die lichtempfindliche Fluoreszeinmarkierung der ODN erforderte das Arbeiten in weitgehender Lichtabwesenheit. Die Transfektion der Zellen erfolgte in Transfektionsmedium aus DMEM/Ham´s F12 (1:1,v:v) mit 2% L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 0,1% FKS, um die Transfektion und nachfolgende Experimente möglichst wenig durch die biologischen Bestandteile des fetalen Kälberserums zu beeinflussen. Die Zellen wurden einen Tag vor dem Experiment in 96Well-Platten ausgesät. Nachdem die Subkultur in den 96Well-Platten einen Zustand adäquater Konfluenz erreicht hatte, diesem Experiment einer optimalen Konfluenz von ca. 80%-90% entsprechend, wurde das Medium durch 90µl des Transfektionsmediums ersetzt und mit 10µl Transfektionssuspension, bestehend aus ODN und Transfektionsreagenz, auf die Endmenge 100µl/Well aufgefüllt. Die Transfektion erfolgte in 9 separaten Ansätzen, wobei nach den Inkubationszeitpunkten 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16, 20h und 24h bei 37°C in mit 5% CO_2 angereicherter, wasserdampfgesättigter Atmosphäre jeweils eine Platte aus dem Inkubator entfernt und 3 mal mit PBS gespült wurde, um die nicht in die Zelle gedrungenen fluoreszeinmarkierten ODN weitgehend zu eliminieren. Daraufhin wurden je 100µl/Well destilliertes H_2O zur Lyse der Zellen hinzupipettiert. Nach wiederholtem Mischen der Suspension durch mehrmalige Pipettensuktion wurden die in die Zelle aufgenommene und durch die Lyse mit destilliertem H_2O wieder freigesetzte Fluoreszenz-Intensität der fluoreszeinmarkierten ODN mit dem Victor-Fluoreszenzreader

gemessen. Die Transfektion, Lyse und Messung erfolgten aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszeinmarkers in größtmöglicher Lichtabwesenheit.

1. 24 Stunden-Kinetik der Aufnahme fluoreszeinmarkierter AS-ODN in humane pankreatische Sternzellen und die der Ratte bei Transfektion mit der in der Optimierung eruierten Konzentrationen des Dosper-Transfektionsreagenz

Entsprechend den in den vorangegangenen Optimierungen gewonnenen Ergebnissen sowie die Ergebnisse aus den Experimenten der Proliferationsmessung und LDH-Release beachtend, wurde für die Transfektion der humanen PSC die Konzentration 5µg/ml an ODN gewählt, die Konzentration des Dosper-Transfektionsreagenz betrug 5µg/ml. Die verwendete Konzentration an ODN bei der PSC der Ratte war für AS-I und AS-III 2,5µg/ml, für AS-II ergab sich eine optimale Konzentration an ODN von 5µg/ml bei einer Konzentration an Dosper-Transfektionsreagenz von 5µg/ml bei den Ansätzen für AS-I und III, 10µg/ml bei dem Ansatz für AS-II. Die jeweils gewählten Konzentrationen an Dosper-Transfektionsreagenz und ODN-Konzentration vereinen entsprechend den Vorversuchen eine möglichst geringe Toxizität und Zellproliferationsminderung mit einer akzeptablen Transfektionseffizienz. Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit den fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III. In 9 separaten Ansätzen erfolgte die Transfektion nach der oben beschriebenen Vorgehensweise. Die quantitative Messung der zu dem jeweiligen Zeitpunkt erfolgten ODN-Aufnahme in die Zellen pro Zeiteinheit erfolgte wie oben beschrieben.

2. 24 Stunden Kinetik der Aufnahme fluoreszeinmarkierter AS-ODN in humane pankreatischer Sternzellen und die der Ratte bei Transfektion mit der in der Optimierung eruierten Konzentration des Superfect-Transfektionsreagenz

Entsprechend den in den vorangegangenen Optimierungen gewonnenen Ergebnissen sowie die Ergebnisse aus den Experimenten der Proliferationsmessung und LDH-Release-Bestimmung beachtend, ergab sich für die Transfektion der humanen PSC eine optimale ODN-Konzentration von 2µg/ml für ASI und ASIII, während für ASII die ODN-Konzentration 1µg/ml betrug. Die Konzentration des Superfect-Transfektionsreagenz wurde bei allen Ansätzen bei 2µg/ml belassen. Die verwendete Konzentration an ODN bei der PSC der Ratte betrug jeweils 2µg/ml bei einer Superfect-Transfektionsreagenz-Konzentration von 2µg/ml. Die jeweils gewählten Konzentrationen an Superfect-Transfektionsreagenz und ODN-Konzentration vereinen entsprechend den Vorversuchen

eine möglichst geringe Toxizität und Zellproliferationsminderung mit einer akzeptablen Transfektionseffizienz. Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit den fluoreszeinmarkierten AS-ODN I, II und III. In 9 separaten Ansätzen erfolgte die Transfektion nach der oben beschriebenen Vorgehensweise. Die quantitative Bestimmung der ODN-Aufnahme in die Zellen pro Zeiteinheit erfolgte wie oben beschrieben.

3. 24 Stunden Kinetik der Aufnahme fluoreszeinmarkierter AS-ODN in humane pankreatische Sternzellen und die der Ratte bei Transfektion mit der in der Optimierung eruierten Konzentration des FuGene6-Transfektionsreagenz

Entsprechend den in den vorangegangenen Optimierungen gewonnenen Ergebnissen sowie die Ergebnisse aus den Experimenten der Proliferationsmessung und LDH-Release-Bestimmung beachtend, ergab sich für die Transfektion der humanen PSC eine optimale ODN-Konzentration von 5µg/ml für ASI und ASIII, während Experimente mit ASII aufgrund der Vorexperimente nicht durchgeführt wurden. Die Konzentration des FuGene6-Transfektionsreagenz wurde bei allen 9 Ansätzen bei 5µl/ml belassen. Die verwendete ODN-Konzentration bei der PSC der Ratte betrug jeweils 5µg/ml bei einer FuGene6-Transfektionsreagenz-Konzentration von 5µl/ml. Die jeweils gewählten Konzentrationen an FuGene6-Transfektionsreagenz und ODN-Konzentration vereinen entsprechend den Vorversuchen eine möglichst geringe Toxizität und Zellproliferationsminderung mit einer akzeptablen Transfektionseffizienz. Transfiziert wurden je nach Verfügbarkeit die Passagen 2-10 von humanen PSC und die Passagen 3-10 von PSC der Ratte mit fluoreszeinmarkierten AS-ODN I und III. In 9 separaten Ansätzen erfolgte die Transfektion nach der oben beschriebenen Vorgehensweise. Die quantitative Bestimmung der ODN-Aufnahme pro Zeiteinheit in die Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

III.6 Triton Experiment

Zur Quantifizierung der in Zellkompartimenten mit saurem pH-Wert, insbesondere in Lysosomen, aufgenommenen fluoreszeinmarkierten ODN wurden humane PSC der 3. bis 9 Passage in 96Well-Platten mit 0,1% FKS und Zugabe der Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect mit fluoreszeinmarkierten ODN inkubiert. Die Transfektion erfolgte nach der oben beschriebenen Vorgehensweise. Die lichtempfindliche Fluoreszenzmarkierung der ODN erforderte das Arbeiten in weitgehender Lichtabwesenheit. Die Transfektion der Zellen erfolgte in Transfektionsmedium aus

DMEM/Ham´s F12 (1:1,v:v) mit 2% L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 0,1% FKS, um die Transfektion und nachfolgende Experimente möglichst wenig durch die biologischen Bestandteile des fetalen Kälberserums zu beeinflussen. Die Zellen wurden einen Tag vor dem Experiment in 96Well-Platten ausgesät. Nachdem die Subkultur in den 96Well-Platten einen Zustand adäquater Konfluenz erreicht hatte, diesem Experiment einer optimalen Konfluenz von ca. 80%-90% entsprechend, wurde das Medium durch 90µl des Transfektionsmediums ersetzt und mit 10µl Transfektionssuspension, bestehend aus ODN und Transfektionsreagenz jeweils in optimierter Konzentration, auf die Endmenge von 100µl/Well aufgefüllt.
Nach einer Inkubationszeit von 6h erfolgte die Lyse der Zellen mittels a) 150µl H_2O dest. b) 150µl HEPES Puffer c) 150µl einer 20%igen Triton-HEPES Puffer Lösung. Die Messung im Victor-Fluoreszenzreader erfolgte sofort als auch nach 24h.

III.7 Färbung von PSC auf Objektträgern mit Fluoreszein-markierten AS-ODN und Bisbenzimidazol-Kernfärbung

Nach Kultivierung von PSC auf ca. 1cm^2 großen Glasobjektträgern in 6Well-Platten mit je 3 Objektträgern je Vertiefung wurden diese bei Erreichen der gewünschten Konfluenz in eine neue 6Well-Platte umgesetzt. Die Stimulation erfolgte mit je 100µl/Zellplättchen einer AS-Dosper, AS-FuGene6 oder AS-Superfect Suspension in Medium mit 0,1% FKS. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit fluoreszeinmarkierten AS-ODN gegen TGFß1. Nach Eindringen der AS-ODN mit Hilfe der oben genannten Transfektionsreagenzien in die Zelle kann das Verteilungsmuster der ODN in der Zelle durch die Markierung des ODN am 5´Ende mit Fluoreszein direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Nach einer Stimulationsdauer von 6h wurden die Plättchen einmal mit PBS gewaschen, anschließend in eine 8%ige Formaldehyd-Medium-Mischung gelegt und für eine halbe Stunde im Kühlschrank fixiert.
Nach Absaugen der Fixierlösung wurden die Plättchen einmal mit PBS gewaschen. Für die anschließende Zellkernfärbung mit Bisbenzimidazol (Substanz 33258 von Hoechst), die auf der Anfärbung der im Zellkern enthaltenen DNA durch spezifische Bindung der Substanz 33258 von Hoechst an DNA erfolgt, wurden die Objektträger mit den fixierten und zuvor mit fluoreszenzmarkierten AS-ODN transfizierten Zellen mit 3ml/Well einer Bisbenzimidazol-Lösung beschichtet. Die Bisbenzimidazol-Lösung wurde zuvor aus 1mg Bisbenzimidazol, das für mindestens 3h unter fortwährendem Rühren im Kühlschrank unter Lichtabschluss in 500ml DNA-Puffer gelöst wurde, hergestellt.

Die Plättchen wurden für 30min unter bedächtigem Schwenken auf dem Rüttler und Lichtabschluss inkubiert. Nach jeweiligem Waschen der Objektträger mit PBS und destilliertem Wasser wurden sie getrocknet, auf Objektträger geklebt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es musste während der Arbeitsschritte penibel darauf geachtet werden, unter Lichtabschluss zu arbeiten.

III.8 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

III.8.1 Horizontalelektrophorese und Herstellung eines Agarosegels

Prinzip der Elektrophorese:

Die Elektrophorese beruht auf der Bewegung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Die Beweglichkeit ist abhängig einmal von der Größe und Ladung der Teilchen sowie der Viskosität des die Teilchen tragenden Mediums. Die Gelmatrix stellt insofern ein molekularsieb dar, in dem sich große Moleküle langsamer, kleine Moleküle schneller bewegen.

Herstellung eines Agarosegels und Horizontalelektrophorese:

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 1,5g Agarose in 150ml 0,5x TBE-Puffer gelöst. Die Suspension wurde innerhalb ca. 4min in der Mikrowelle zum Aufkochen gebracht. In das noch heiße Gel wurden 15µl Gelstar zupipettiert und das Gel daraufhin sofort in eine Plexiglas-Gelkammer mit Kamm für die Geltaschen gegossen. Nach ca. 30min ist das Gel auspolymerisiert und der Kamm kann vorsichtig entfernt werden. Das Gel wird dann in eine mit 0,5% TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer getaucht, so dass der Puffer das Gel allseitig reichlich umspült. Die Geltaschen besitzen ein Fassungsvermögen von ca. 25µl. Die zu untersuchenden Proben werden zu 10% mit Stopp-Puffer versetzt. Der Stopp-Puffer lässt die Nukleinsäuren in die Geltasche absinken und erlaubt zudem durch die blaue Farbe eine optische Verfolgung der Laufweite der Probe. Die an die Elektrophoresekammer angeschlossene Spannung beträgt ca. 120 V. Nach ca. 60min ist die Elektrophorese beendet.

III.8.2 RNA-Isolierung

Entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung wurden die PSC zur Gewinnung der Gesamt-RNA verwendet.

Die RNA wurde mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Boehringer-Mannheim) nach Angaben des Herstellers wie folgt isoliert: Nach 2maligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem Lyse-Puffergemisch aus 200µl PBS mit 400µl RNA Isolation Kit Lysepuffer pro Gewebekulturflasche für wenige Minuten. Daraufhin wurden

die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und die Zellsuspension durch mehrmalige Pipettensuktion homogenisiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf die Filtersäule aufgetragen und über 15sec mit 10000rpm (ca. 8000xg) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurde auf das die RNA adsorbierende Glasfaservlies 100µl einer Lösung bestehend aus 90µl DNase Inkubationspuffer mit 10µl DNase I zum Abbau kontaminierender genomischer DNA aufpipettiert und 15min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 500µl Waschpuffer I zupipettiert und die Säule 15sec bei 10000rpm (8000xg) zentrifugiert. Nachdem der Durchlauf verworfen war, wurden 500µl Waschpuffer II auf das Glasfaservlies pipettiert und die Säule wiederum 15sec bei 10000rpm (ca. 8000xg) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchlaufs wurden 200µl Waschpuffer II aufpipettiert und die Säule für 2min bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 14000xg) zentrifugiert um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Die Filtersäule wurde mit einem neuen Auffangröhrchen versehen und zur Elution der RNA für 1-2min bei Raumtemperatur mit 50µl Elutionspuffer überschichtet. Zur Gewinnung der RNA wurde abschließend 1min bei 10000rpm (ca. 8000xg) zentrifugiert. Die im Eluat enthaltene Menge an Gesamt-RNA und ihre Reinheit wurden durch Messung der Absorptionsrate bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm im Spektralphotometer beurteilt und berechnet, wozu das Eluat in einem bestimmten Verhältnis mit destilliertem Wasser verdünnt und das zu messende Probenmaterial auf Eis gelagert wurde. Der Absorptionswert bei der Wellenlänge von 260nm erlaubt die Berechnung der Gesamt-RNA, wobei eine OD von von 1 ca. 40µg RNA entsprechen. Die Reinheit der Probe kann aus dem Verhältnis der Absorptionsrate bei 260nm zu der bei 280nm (OD260/OD280) abgeschätzt werden. Reine RNA Präparationen haben OD260/OD280-Werte zwischen 1,8 und 2,0, bei Kontamination der Probe, z.B. mit Protein, ist dieser Wert signifikant erniedrigt und die genaue Berechnung der Proben-RNA-Menge ist nicht möglich.

III.8.3 PCR

Die PCR ist eine Technik zur Vermehrung gewünschter DNA-Fragmente mit bereits bekannter Sequenz, der sog. in-vitro-Amplifizierung. Sie ermöglicht den Nachweis der Anwesenheit der gesuchten DNA-Sequenz bzw. über die Synthese von cDNA durch reverse Transkriptase in der sog. RT-PCR den Nachweis von mRNA. Die PCR benötigt zwei Oligonukleotidprimer, die der Sequenz an den jeweiligen 5´-Enden der gegenüberliegenden DNA-Einzelstränge komplementär sind (Sense und Antisense) und die

die Ziel-DNA-Sequenz, die amplifiziert werden soll, einrahmen. Die Elongation des Primers wird durch die hitzestabile Taq-DNA Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium „Thermus aquaticus" isoliert wird, katalysiert. Die PCR führt zur exponentiellen Akkumulation eines bestimmten DNA-Fragmentes.

Herstellung des „Master-Mix" aus folgenden Bestandteilen:

5µl	10 x REDTaq PCR-Puffer
1µl	10 mM dNTP´s (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
0,2µl	Primer (jeweils Sense, 100pM und Antisense 100pM)
-	µl Aqua dest.
2,5µl	Taq DNA Polymerase (0,05U/µl)
-	µl cDNA

50µl Gesamtreaktionsvolumen

In PCR-Tubes wird zuerst die zu amplifizierende cDNA vorpipettiert, dann der Master-Mix hinzugefügt. Alle Proben werden bis zum Beginn der Amplifikation im Thermocycler penibelst auf Eis gehalten. Schließlich werden die Proben nach gutem Mischen und kurzem Anzentrifugieren in den Thermocycler gestellt.
Die Amplifikation der Proben erfolgte nach folgendem Schema:
Verwendeter PCR-Zyklus (26 Zyklen)

1. Denaturierung der DNA für 1min bei 94ºC
2. Hybridisierung der Primer für 2min bei 58ºC
3. Extension für 3min bei 72ºC

neuer Zyklus beginnend bei 1.
Kühlzyklus am Ende der Amplifikationszyklen bei 4ºC

Nach der Amplifikation trennt man das PCR-Produkt mittels einer Gelelekrophorese nach seinem Molekulargewicht auf. Das fertige Gel wird auf einen UV-Transmissionsschirm gelegt und photographiert. Die REDTaq Polymerase ist eine Taq DNA Polymerase, die mit einem inerten roten Tracer gemischt ist, der die Zugabe von Stopp-Puffer vor der Gelelektrophorese unnötig macht.

III.8.4 Reverse Transkription und Synthese der Komplementär-DNA (c-DNA)

Die isolierte RNA sollte sofort in c-DNA transkribiert werden, um einen Abbau der RNA durch Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Dieser Schritt ist insofern nötig, da RNA nicht direkt als Substrat für die PCR dienen kann, sondern erst die durch reverse Transkription zur jeweiligen RNA komplementäre DNA gebildet werden muss. Die cDNA ist einzelsträngige DNA, deren Basensequenz komplementär zur gespleissten mRNA ist und somit nicht der genomischen DNA entspricht, da sie keine Introns mehr enthält. Die reverse Transkriptase, die aus Retroviren gewonnen wird, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die analog der DNA-Polymerasen einen Primer zur Initiation der Polymerisation benötigt. Das als Primer verwendete Oligo-dt-Molekül hybridisiert mit dem Poly-A-Ende am 3´-OH-Ende der mRNA, das aus 100-200 Adenosinmonophosphat-Nukleotiden besteht, und dient so als Startpunkt für die Synthese der DNA durch die reverse Transkriptase.

Die durch Isolierung gewonnene RNA (11µl) wird mit 1µl (0,5µg/µl) Oligo(dT)-Primer versetzt, dann 10min auf 70°C erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Währenddessen wird ein „Master-Mix" aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

4µl 5 x RT-Puffer (First Strand)
2µl 0,1 M DTT
0,5µl 25mM dNTP´s (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
RNase-Inhibitor, 0,5unit/µl reaction
DEPC H_2O

Dieser Mastermix wird zur Probe pipettiert. Nach 2minütigem Erwärmen der Probe bei 42°C wird 1µl (200U/µl) reverse Transkriptase hinzugegeben. Nach sorgfältigem Mischen der Probe wird diese 50min bei 42°C inkubiert. Abschließend wird die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 70°C für 15min inaktiviert und die Reaktion somit beendet. Die erhaltene cDNA kann bei–20°C aufbewahrt oder sogleich der Amplifikation mittels PCR zugeführt werden.

III.9 Immunfluoreszenzfärbungen

Durch indirekte Immunfluoreszenz wurden Fibronektin, Kollagen Typ I und Kollagen Typ III der pankreatischen Sternzellen in Abhängigkeit von Stimulationsreagenz und AS-ODN

dargestellt. Dafür wurden PSC auf ca. 1cm^2 große Glasobjektträger in 6Well-Platten mit je 3 Objektträgern je Vertiefung kultiviert.

12h vor der geplanten Transfektion und bei Erreichen der gewünschten Zelldichte (Konfluenz von ca. 60%) wurden die Zellen bei 0,1% FKS inkubiert. Nachfolgend erfolgte die Transfektion mit den ODN und einem Transfektionsreagenz.

Die Zellen wurden nach einer zuvor festgelegten Stimulationsdauer entnommen, mit PBS gewaschen und in eiskaltem Aceton (-20 C) für 20min fixiert. Nach Lufttrocknen der Glasplättchen wurden diese auf Objektträger geklebt und kurz in TNT gewaschen.

Anschließend wurden die Glasobjektträger mit den fixierten Zellen über 45min in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei Raumtemperatur und unter behutsamem Schwenken mittels TNB-Puffer zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert.

Nach 10maligem Waschen der Plättchen mit TNT-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen ersten Antikörper für eine Stunde in der Feuchtkammer unter behutsamen Schwenkbewegungen.

Die Inkubation mit den jeweiligen nachfolgenden Antikörpern erfolgte unter den oben beschriebenen Bedingungen, wobei zwischen jedem Inkubationsschritt die Objektträger 10mal mit TNT-Puffer gewaschen wurden.

Als letzter Arbeitsschritt nach erfolgter Inkubation der Plättchen mit den für die jeweilige Färbung spezifischen Antikörpern erfolgte nach 10maligem Waschen der Plättchen mit TNT-Puffer die Inkubation mit FITC-markiertem Streptavidin unter oben beschriebenen Bedingungen für eine weitere Stunde.

Nach abschließendem 10maligem Waschen der Plättchen mit TNT-Puffer sowie einmaligem Spülen mit destilliertem Wasser und Trocknen wurden die immunfluoreszenzmarkierten Zytoskelettelemente unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt und photographisch dargestellt. Während dieser Arbeitsschritte musste darauf geachtet werden, die Glasplättchen feucht zu halten und vor dem Austrocknen zu bewahren.

Fakultativ und der besseren Darstellung sowie Übersicht wegen wurde bei den meisten Plättchenpräparaten eine Kernfärbung mit Bisbenzimidazol (Substanz 33258 von Hoechst) angeschlossen. Die Anfärbung der im Zellkern enthaltenen DNA beruht auf der spezifischen Bindung der Substanz 33258 von Hoechst an DNA. Hierfür wurden die Objektträger mit den fixierten und mittels Antikörperinkubation gefärbten Zellen in eine Bisbenzimidazol-Lösung aus 1mg Bisbenzimidazol, das für mindest. 3h unter fortwährendem Rühren im Kühlschrank und Lichtschutz in 500ml DNA-Puffer gelöst

wurde, für 15min unter bedächtigem Schwenken und unter Lichtabschluss inkubiert. Anschließend wurden die Plättchen 2mal kurz in destilliertem Wasser gespült, getrocknet und unter dem oben benannten Mikroskop betrachtet.

III.9.1 Kollagenfärbungen (Typ I und III)

Im Vorfeld zu diesen Experimenten wurde dem Kulturmedium bei Stimulation L(+)Ascorbinsäure (100µg/ml)zugegeben, die als Reduktionsmittel einerseits Kollagen in einer posttranslationalen Modifikation durch Vernetzung stabilisiert aber auch die Kollagensynthese durch Stimulation der Prokollagen-Genexpression und gesteigerter Kollagen mRNA Stabilität steigert.

Nach Transfektion mit ODN und einem Transfektionsreagenz wurden die Zellen nach der oben beschriebenen Vorgehensweise fixiert, gewaschen und blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper für Kollagen I, dem Anti-Kollagen I und Kollagen III, dem Anti-Kollagen III biotinmarkiert, in einer jeweiligen Verdünnung von 1:20 mit TNB Puffer unter Schwenken für 1h. Nach 5maligem Waschen mit TNT Puffer erfolgte bei der Färbung von Kollagen Typ I eine weitere 1stündige Inkubation mit dem 1:50 in PBS Puffer verdünnten Anti-Rabbit-HRP, während bei der Färbung von Kollagen III eine 1stündige Inkubation mit Streptavidin HRP in einer 1:50 Verdünnung mit PBS Puffer erfolgte. Nach 5maligem Waschen mit TNT Puffer wurden die Zellen im Anschluss mit 1:50 verdünntem Biotinyl-Tyramid für 15min und nachfolgend mit Streptavidin FITC, 1:50 mit PBS verdünnt, für weitere 45min inkubiert und abschließend 5mal in TNT Puffer gewaschen. Fakultativ schloss sich an diese Färbungen die oben beschriebene Bisbenzimid Kernfärbung an.

III.9.2 Fibronektinfärbung

Nach Transfektion mit ODN und einem Transfektionsreagenz wurden die Zellen nach der oben beschriebenen Vorgehensweise fixiert, gewaschen und blockiert.

Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper, dem Rabbit Anti-Fibronektin in einer Verdünnung von 1:50 in PBS Puffer. Nach 5maligem Waschen mit TNT Puffer erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, dem Anti-rabbit-Biotin in einer Verdünnung von 1:50 für eine weitere Stunde. Nach 5maligem Waschen mit TNT Puffer wurden die Zellen schließlich für 30min mit dem 1:50 in PBS verdünnten Streptavidin FITC inkubiert und abschließend 5mal in TNT Puffer gewaschen. Fakultativ schloss sich an diese Färbungen die oben beschriebene Bisbenzimid Kernfärbung an.

III.10 Nachweis einer Triplex-Helixbildung durch EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Doppelstrang-ODN wurden durch Erhitzen jeweils gleicher Mengen komplementärer Einzelstränge über 15min bei 71 C vorbereitet und langsam bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Duplex-ODN wurden mit [γ-32P] ATP mittels T4 Polynukleotidkinase markiert und durch eine Sephadex G25 Säule gereinigt. Etwa 1pmol des Duplex-ODN wurde in 10µl Bindungs-Puffer mit ansteigenden Konzentrationen der spezifischen ODN pipettiert. Nach 2h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mittels eines 20%igen, nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gels analysiert. Zur Stabilisierung der Triplex-Helix wurde als Puffer der oben genannte Bindungs-Puffer verwendet.

III.11 Statistische Analyse

Die quantitative Messung der c-Fibronektinsynthese, Kollagen Typ I und BrdU-Inkorporation erfolgten durch Doppelbestimmungen, der DNA Gehalt wurde dreifach bestimmt. Die Messdaten wurden gemittelt. Die Experimente zur quantitativen Bestimmung der c-Fibronektinsynthese, der DNA-Messung, BrdU-Inkorporation, Toxizität als auch Optimierung der Transfektion einschließlich kinetischen Experimenten wurden in mindestens 3 unabhängigen Versuchen durchgeführt, wobei jede Stimulationsbedingung als 3facher Ansatz ausgeführt wurde. Die Stimulationsbedingungen der Optimierung, Kinetik als auch Lyseversuche wurden jeweils als 6facher Ansatz ausgeführt. Die Versuche zur Matrixsynthese wurden in mindestens 2 unabhängigen Versuchen durchgeführt, wobei jede Stimulationsbedingung als 3facher Ansatz ausgeführt wurde. Die Bestimmung der mRNA mittels PCR erfolgte durch Doppelbestimmungen.

Aus den hierbei erhaltenen Messwerten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte einschließlich der Standardabweichungen dargestellt. Alle Mittelwerte, die sich vom Mittelwert der Kontrolle mit $p<0,05$ unterscheiden, werden als statistisch signifikant dargestellt. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Statistikprogramme StatGraphics (Version 6.0) und Matlab (Mathworks, Inc Version 5.30.10/83).

IV. Ergebnisse

IV.1 Quantitative Messung der Fibronektinkonzentration im Zellkulturüberstand

Nach Stimulation der Zellen mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz in den Konzentrationen 2, 5, 10, 15 und 20µg/ml Dosper, Superfect bzw. µl/ml FuGene6 wurde deren Einfluss auf die Fibronektinproduktion der pankreatischen Sternzellen anhand der Messung der Fibronektinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels zeitaufgelöster Immunfluoreszenz gemessen. Nach 24stündiger Inkubation der Zellkultur in Medium mit 0,1% FKS-Zusatz, um den Einfluss der im fetalen Kälberserum enthaltenen Wachstumsfaktoren zu reduzieren und die Zellen in möglichst vergleichbaren Aktivitätszustand zu versetzen, wurden die Zellen durch Zugabe des Transfektionsreagenz stimuliert. Weitere 24h nach Zugabe des Transfektionsreagenz wurden die Überstände zur Fibronektinbestimmung abpipettiert, die Monolayer gewaschen und deren DNA quantifiziert. In Abb. 1 und 2 sind die Fibronektinkonzentrationen korrigiert auf die Zellzahl (DNA) dargestellt. Die Fibronektinkonzentrationen aus den jeweiligen Zellkulturüberständen wurden der Kontrollgruppe (Medium mit 0,1% FKS-Zusatz ohne Transfektionsreagenzzugabe) gegenübergestellt. Aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen konnte für die Messreihen nach 24h und korrigiert auf die DNA eine Reduktion der Fibronektinsynthese im Vergleich zur Kontrollgruppe und in Abhängigkeit von der Transfektionsreagenzkonzentration festgestellt werden.

1. Einfluss des Transfektionsreagenz Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Fibronektinsynthese humaner pankreatischer Sternzellen

Durch diese Experimente konnte für die humanen pankreatischen Sternzellen eine Reduktion der Fibronektinsynthese auf das 0,56 fache (+/-0,02) der Kontrolle ab einer Konzentration von 15µg/ml Dosper-Transfektionsreagenz gemessen werden. Eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle fand jedoch bei keiner der getesteten Konzentrationen statt.

Bei Transfektion der PSC mit FuGene6 Transfektionsreagenz wurde eine signifikante Reduktion der Fibronektinsynthese im Vergleich zur Kontrolle bereits ab einer Konzentration von 5µl/ml FuGene6 gemessen. Die maximale Reduktion der Matrixsynthese fand bei 20µl/ml FuGene6 Transfektionsreagenz auf das 0,56fache (+/-0,002) der Kontrolle statt.

Superfect reduzierte die Fibronektinsynthese bereits ab einer Konzentration von 5µg/ml signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Bereits ab 5µg/ml Superfect Transfektionsreagenz

wurde die Fibronektinsynthese auf das 0,58fache (+/-0,04) der Kontrolle reduziert, mit progredienter weiterer Matrixinhibition bei steigenden Superfect-Konzentrationen.

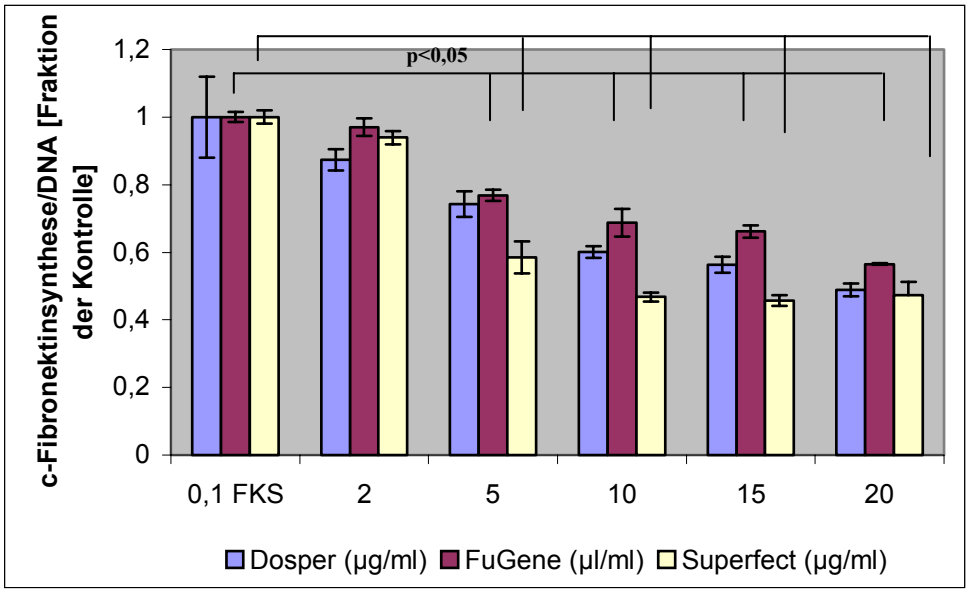


Abb. 1: Auswirkungen der Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Fibronektinsynthese humaner pankreatischer Sternzellen. Dargestellt ist die c-Fibronektinkonzentration in den Zellkulturüberständen in Bezug auf den DNA Gehalt und als Fraktion der Kontrolle (0,1% fetales Kälberserum (FKS)). Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen ermittelt worden. Signifikante Ergebnisse mit $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle wurden mit Balken markiert.

2. Einfluss der Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Fibronektinsynthese pankreatischer Sternzellen der Ratte

Bei Transfektion der rPSC mit Dosper Transfektionsreagenz konnte bei jeder der gewählten Konzentrationen ab 2µg/ml Dosper eine signifikante Reduktion der Fibronektinsynthese im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Eine Reduktion auf das 0,58fache (+/-0,03) der Kontrolle wurde ab einer Konzentration von 10µg/ml Dosper gemessen.

Auch bei der Transfektion der rPSC mit FuGene6 Transfektionsreagenz konnte bereits ab 2µl/ml FuGene6 eine signifikante Reduktion der Fibronektinsynthese im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Eine Reduktion des Fibronektins auf das 0,52 fache (+/-0,04) der Kontrolle wurde ab dem Einsatz von 15µl/ml FuGene6 gemessen.

Bei der Verwendung von Superfect wurde bis zu einer Konzentration von 10µg/ml Superfect keine signifikante Reduktion der Fibronektinsynthese berechnet, jedoch erfolgte bereits ab 5µg/ml Superfect eine Reduktion der Fibronektinsynthese auf das 0,33fache (+/-0,015) der Kontrolle.

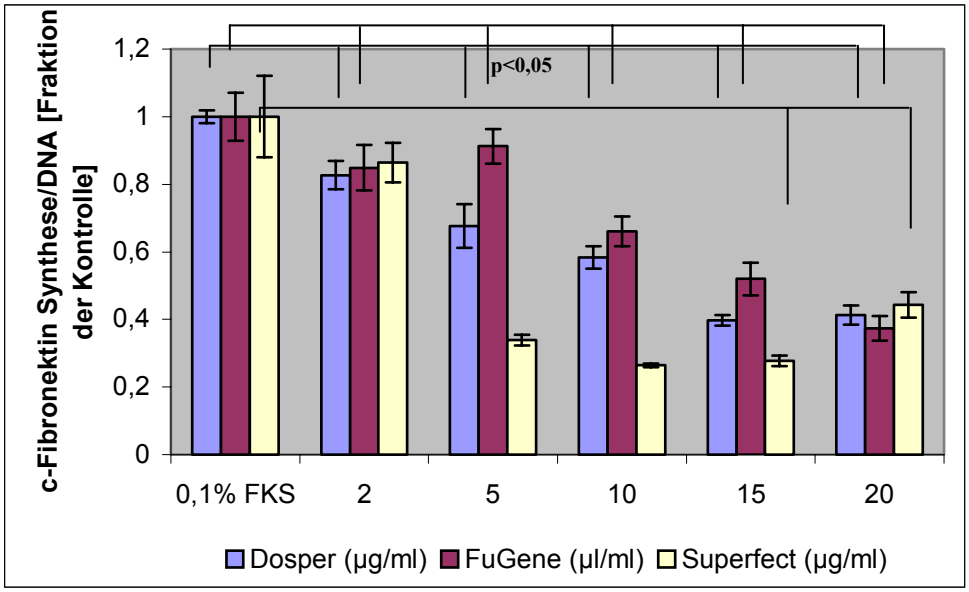


Abb. 2: Auswirkungen der Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect auf die c-Fibronektinsynthese pankreatischer Sternzellen der Ratte. Dargestellt sind die c-Fibronektinkonzentrationen in den Zellkultur-Überständen in Bezug auf den DNA Gehalt und als Fraktion der Kontrolle (0,1% fetales Kälberserum (FKS)). Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen ermittelt worden. Signifikante Ergebnisse mit $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle wurden mit Balken markiert.

Tab. 1: Auswirkungen der Konzentration der Transfektionsreagenzien auf die c-Fibronektinsynthese humaner pankreatischer Sternzellen (hPSC) und pankreatischer Sternzellen der Ratte (rPSC).

		Transfektionsreagenz-Konzentration, bei der keine signifikante Reduktion der Matrixsynthese im Vergleich zur Kontrolle erfolgte	Transfektionsreagenz-Konzentration, ab der eine Reduktion auf </= 60% der Kontrolle erfolgte
Dosper	hPSC	keine signifikante Reduktion	10 µg/ml
	rPSC	alle Proben signifikant reduziert	10µg/ml
FuGene6	hPSC	2µl/ml	20µl/ml
	rPSC	alle Proben signifikant reduziert	15µl/ml
Superfect	hPSC	2µg/ml	5µg/ml
	rPSC	10 µg/ml	5µg/ml

Kontrolle: Medium mit 0,1% FKS-Zusatz ohne Transfektionsreagenzzugabe

IV.2 Bestimmung der Proliferation pankreatischer Sternzellen durch quantitative Messung der BrdU-Inkorporation

Zur quantitativen Messung der Auswirkung verschiedener Konzentrationen an Transfektionsreagenz auf die Zellproliferation wurden subkultivierte pankreatische Sternzellen der 4. bis 8. Passage in zwei verschiedenen Versuchsreihen mit 5% FKS und 0,1% FKS sowie steigenden Konzentrationen an Transfektionsreagenz stimuliert. Hierbei wurde der Einbau des Pyrimidinanalogons in neusynthetisierte Zell-DNA anstelle von Thymidin quantitativ mittels zeitaufgelöster Immunfluoreszenz des Europiumchelates gemessen. Die Fluoreszenssignale wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=5 Kulturen errechnet und als Fraktion der Kontrolle (0,1% FKS-Zusatz bzw. 5% FKS-Zusatz) graphisch dargestellt. Um den Einfluss des FKS auf die Proliferation zu untersuchen, wurde die Proliferation unter 0,1% und 5% FKS untersucht und gegenübergestellt. Die Stimulation der Zellen erfolgte über 6h. Daraufhin folgte die Zugabe des BrdU (25µl/ml). Nach 18h wurde der Versuch mit EhOH/Essigsäure gestoppt.

IV.2.1 Proliferation pankreatischer Sternzellen in Abhängigkeit von der FKS-Konzentration

Initial wurde der Einfluss der FKS-Konzentration auf die Proliferation humaner pankreatischer Sternzellen in einem Versuch mit steigenden Konzentration (0-5%) an FKS geprüft. Mit steigender FKS-Konzentration nahm die Proliferation der pankreatischen Sternzellen progredient bis auf das 4,47fache bei Stimulation mit 5% FKS im Vergleich zur Stimulation mit 0% FKS zu.

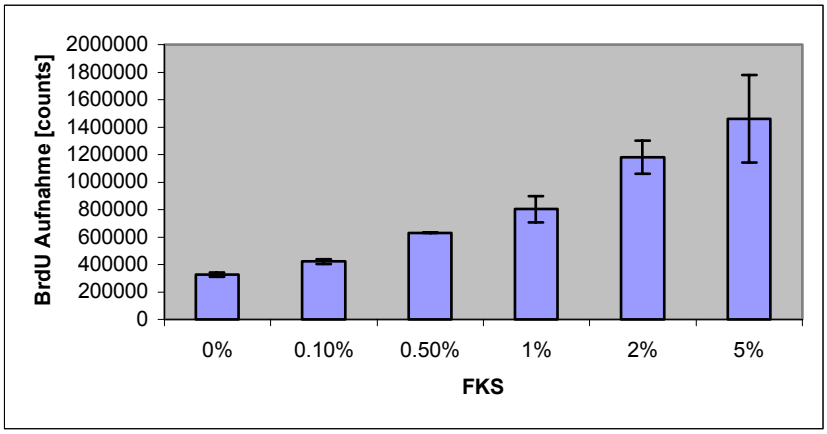


Abb. 3: Auswirkungen steigender FKS (fetales Kälberserum) Konzentrationen auf die Proliferation humaner pankreatischer Sternzellen. Die Ergebnisse wurden aus 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=5 Kulturen anhand der quantitativen Messung der Bromodeoxy-Uridin-Inkorporation (BrdU) gewonnen.

IV.2.2 Einfluss der Transfektionsreagenzien auf die Proliferation pankreatischer Sternzellen

1. Einfluss der Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Proliferation humaner PSC unter Zugabe von 5% FKS und 0,1% FKS

Die Versuche zeigten, dass die Proliferation der pankreatischen Sternzellen mit steigender Konzentration des Transfektionsreagenz abnimmt.

Die Konzentrationen von 2µg/ml des Transfektionsreagenz Dosper beeinflussten die Proliferation am geringsten, während hohe Konzentrationen an Transfektionsreagenz (20µg/ml) die Proliferation bei 5% FKS gegenüber der Kontrolle auf das 0,59fache (+/-0,0079) und bei 0,1% FKS sogar auf das 0,22fache (+/-0,0134) verringerten. Aufgrund der potentiellen Interaktion von FKS mit dem ODN/Transfektionsreagenzkomplex und konsekutiver Möglichkeit der Verringerung der Transfektionseffizienz ist eine generell niedrige FKS Konzentration anzustreben.

So konnte bei 0,1% FKS und einer Konzentration von bis zu 5µg/ml Dosper Transfektionsreagenz keine signifikante Reduktion der Proliferation gemessen werden, so dass Konzentrationen bis zu 5µg/ml sich nicht negativ auf die Proliferation der PSC auswirkten. Hingegen zeigten sich bei 5% FKS Konzentrationen bis 10µg/ml Dosper Transfektionsreagenz als nicht signifikant proliferationsreduzierend im Vergleich zur Kontrolle.

Das Transfektionsreagenz FuGene6 hingegen zeigte bei 0,1% FKS eine durchgehend akzeptable Proliferation bis 20µl/ml Transfektionsreagenz im Vergleich zur Kontrolle. Ein diskreter, jedoch nicht signifikanter proliferationssteigernder Effekt konnte bis zu einer Konzentration von 10µl/ml Transfektionsreagenz auf das 1,07fache (+/-0,029) gezeigt werden. Eine signifikante Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde bei keiner der getesteten FuGene6 Konzentrationen erreicht, wohingegen die hohen Konzentrationen 15 und 20µl/ml FuGene6 eine signifikante Proliferationsreduktion auf das 0,81fache (+/-0,012) bzw. 0,82fache (+/-0,038) im Vergleich zu den mit 5µl/ml FuGene6 transfizierten Zellen zeigten. Hingegen zeigte sich die Proliferation bei 5% FKS bereits ab einer Konzentration von 10µl/ml signifikant im Vergleich zur Kontrolle reduziert mit einer maximalen Proliferationshemmung bei 20 µl/ml auf das 0,61fache (+/-0,017). Eine proliferationsstimulierende Wirkung konnte bei Verwendung von 5% FKS nicht gesehen werden.

Das Transfektionsreagenz Superfect inhibierte die Proliferation pankreatischer Sternzellen bei 5% FKS bereits ab einer Konzentration von 10µg/ml Transfektionsreagenz auf über die

Hälfte der Kontrolle (0,45(+/-0,045)) und bei einer Zugabe von nur 0,1% FKS verringerte sich die Proliferation bereits bei einer Konzentration von 5µg/ml Transfektionsreagenz auf das 0,59 (+/-0,1)fache der Kontrolle. Eine signifikante Proliferationsreduktion ist sowohl bei 5% als auch 0,1% FKS ab einer Konzentration von 5µg/ml Transfektionsreagenz zu sehen.

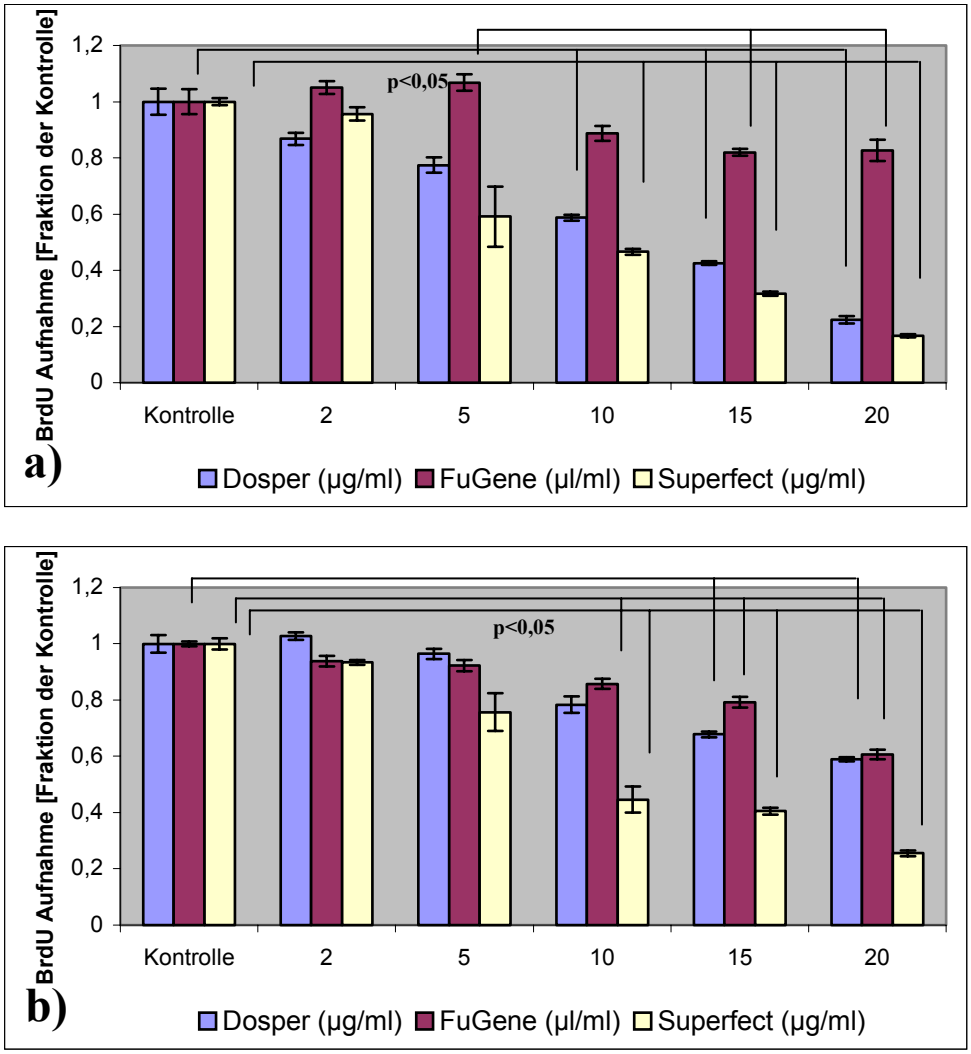


Abb. 4 a/b: Auswirkungen des Transfektionsreagenz Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Proliferation humaner pankreatischer Sternzellen unter Zugabe von a) 0,1% FKS (fetales Kälberserum) und b) 5% FKS. Die Fluoreszenssignale wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=5 Kulturen errechnet und als Fraktion der Kontrolle (0,1% FKS-Zusatz bzw. 5% FKS-Zusatz) graphisch dargestellt. Signifikante Ergebnisse ($p<0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit Balken markiert.

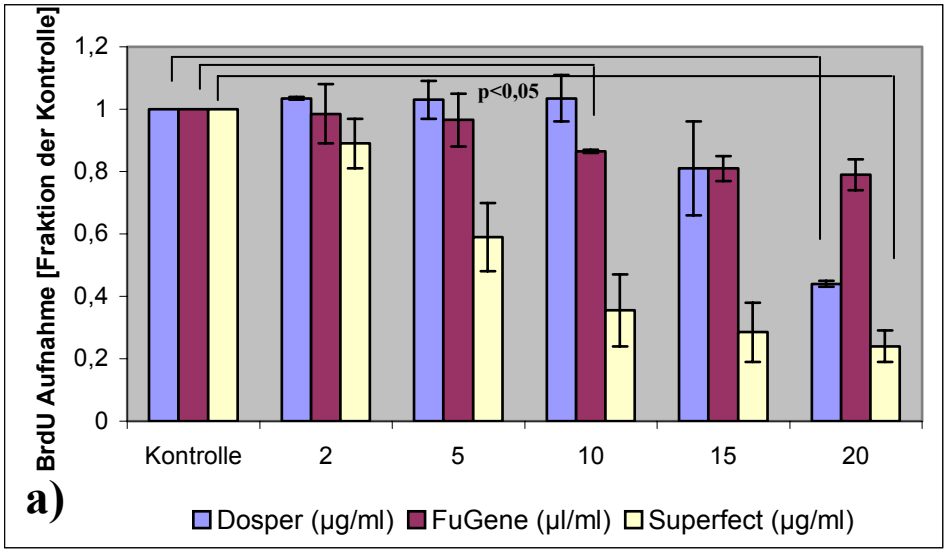
Zusammengefasst zeigten diese Versuche für das Transfektionsreagenz Dosper eine akzeptable Proliferation der pankreatischen Sternzellen bis zu einer Konzentration von

5µg/ml bei 01% FKS. Bei 5% FKS wurde selbst bei 10µg/ml Dosper Transfektionsreagenz keine signifikante Reduktion der Proliferation festgestellt.
Für das Transfektionsreagenz FuGene6 kann bei 0,1% FKS kein Einfluss auf die Proliferation bis zu einer Konzentration von 20µl/ml gemessen werden. Bei dieser FKS Konzentration scheint FuGene6 einen gewissen proliferationsstimulierenden Effekt zu besitzen. Hingegen zeigte sich die Proliferation bei 5% FKS ab einer FuGene6 Konzentration von 10µl/ml signifikant reduziert.
Das Transfektionsreagenz Superfect zeigte eine ausreichende Proliferation bis maximal 5µg/ml bei sowohl 0,1% als auch 5% FKS.
Die Proliferation ist bei dem Transfektionsreagenz Dosper unter 5% FKS besser als unter 0,1%, während bei Superfect kein signifikanter Einfluss der FKS Konzentration auf die Proliferation gesehen werden konnte und FuGene6 unter 0,1% FKS sogar einen angedeutet proliferationsstimulierenden Effekt zeigte.

Eine Transfektion unter weitestgehender Vermeidung von FKS sollte insofern angestrebt werden, da die im fetalen Kälberserum enthaltenen Wachstumsfaktoren (bFGF, PDGF, IGF, TNFα, TGFα und TGFβ) und deren Einfluss weitmöglichst reduziert werden sollten.

2. Einfluss der Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Proliferation pankreatischer Sternzellen der Ratte unter Zugabe von 5%FKS und 0,1%FKS

Während bei 0,1%FKS eine signifikante Reduktion der Proliferation erst bei 20µg/ml Dosper Transfektionsreagenz auf das 0,44 fache (+/-0,01) der Kontrolle gemessen werden konnte, hatte Dosper bei 5% FKS keine signifikante Reduktion der Proliferation zur Folge.
Auch bei der Transfektion mit FuGene6 zeigten sich bis auf eine signifikante Reduktion der Proliferation bei 10µl/ml FuGene6 in 0,1% FKS keine signifikanten Veränderungen der Proliferation.
Das Transfektionsreagenz Superfect reduzierte bereits bei einer Konzentration ab 5µg/ml die Proliferation der rPSC auf das 0,59fache (+/-0,11) der Kontrolle unter Zugabe von 0,1% FKS und auf das 0,58fache (+/-0,155) bei 5% FKS-Zugabe. Eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle wurde jedoch jeweils erst bei der Maximalkonzentration von 20µg/ml deutlich.



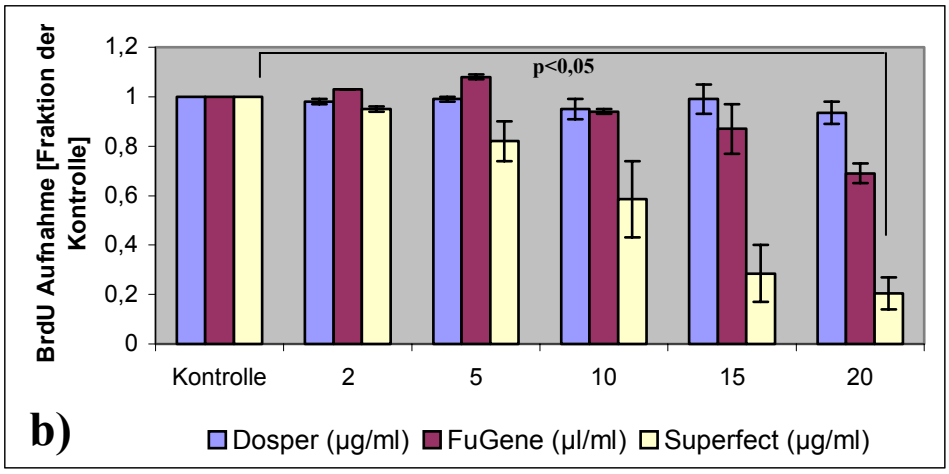


Abb. 5 a/b: Auswirkungen des Transfektionsreagenz Dosper auf die Proliferation pankreatischer Sternzellen der Ratte unter Zugabe von a) 0,1%FKS (fetales Kälberserum) und b) 5% FKS. Die Fluoreszenssignale wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=5 Kulturen errechnet und als Fraktion der Kontrolle (0,1% FKS-Zusatz bzw. 5% FKS-Zusatz) graphisch dargestellt. Signifikante Ergebnisse ($p<0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit Balken markiert.

Zusammengefasst wurde auch bei den rPSC die Proliferation der Zellen unter Dosper durch eine Reduktion der FKS-Konzentration eingeschränkt. Hingegen zeigte FuGene6 keinen Einfluss auf die Proliferation und Superfect signifikant erst bei der höchsten getesteten Konzentration von 20µg/ml.

Tab. 2: Inhibition der Proliferation humaner pankreatischer Sternzellen (hPSC) und pankreatischer Sternzellen der Ratte (rPSC) abhängig von der Konzentrationen an Transfektionsreagenz.

		Inhibition auf </= 60% der Kontrolle		**Maximal nicht signifikant proliferationsinhibierende Konzentration im Vergleich zur Kontrolle**	
		0,1%FKS	**5%FKS**	**0,1%FKS**	**5%FKS**
Dosper	**hPSC**	10 µg/ml	20 µg/ml	5µg/ml	10µg/ml
	rPSC	20 µg/ml	im getesteten Bereich keine Inhibition </= 60%	15µg/ml	im getesteten Bereich keine Inhibition bis 20µg/ml
FuGene6	**hPSC**	im getesteten Bereich keine Inhibition </= 60	20µl/ml	im getesteten Bereich keine Inhibition bis 20µl/ml	10µl/ml
	rPSC	im getesteten Bereich keine Inhibition </= 60	im getesteten Bereich keine Inhibition </= 60	im getesteten Bereich keine Inhibition bis 20µl/ml	im getesteten Bereich keine Inhibition bis 20µl/ml
Superfect	**hPSC**	5 µg/ml	10 µg/ml	5µg/ml	5µg/ml
	rPSC	5 µg/ml	10 µg/ml	15µg/ml	15µg/ml

FKS: Fetales Kälberserum, Kontrolle: Medium mit 0,1% bzw. 5% FKS-Zusatz ohne Transfektionsreagenzzugabe

IV.2.3 Vergleichende Proliferation unter 0,1% und 5% FKS bei Inkubation mit den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect bei pankreatischen Sternzellen

1. Vergleichende Proliferation unter 0,1% und 5% FKS bei Inkubation mit den Transfektionsreagenzien Dosper, Fugene6 und Superfect bei humanen pankreatischen Sternzellen

Bei der vergleichenden Proliferation humaner pankreatischer Sternzellen unter 0,1 und 5% FKS und Inkubation mit Dosper Transfektionsreagenz wurde eine signifikant bessere Proliferation bei allen getesteten Konzentrationen unter Inkubation mit 5% FKS im Vergleich zu 0,1% FKS erreicht.

Die vergleichende Proliferation humaner pankreatischer Sternzellen unter 0,1 und 5% FKS und Inkubation mit FuGene6 Transfektionsreagenz ergab bei den Konzentrationen von 2, 5 und 20µl/ml FuGene6 Transfektionsreagenz eine signifikant bessere Proliferationsrate unter 0,1%FKS als unter 5% FKS, was für einen gewissen protektiven Effekt des FuGene6 Transfektionsreagenz insbesondere bei niedrigen FKS Konzentrationen auf die humanen pankreatischen Sternzellen schließen lässt.

Bei der vergleichenden Proliferationsmessung humaner pankreatischer Sternzellen unter 0,1 und 5% FKS und Inkubation mit Superfect Transfektionsreagenz zeigte sich insbesondere bei hohen Superfect Konzentrationen von 15 bzw 20µg/ml eine signifikant reduzierte Proliferation unter 0,1% FKS im Vergleich zu 5% FKS.

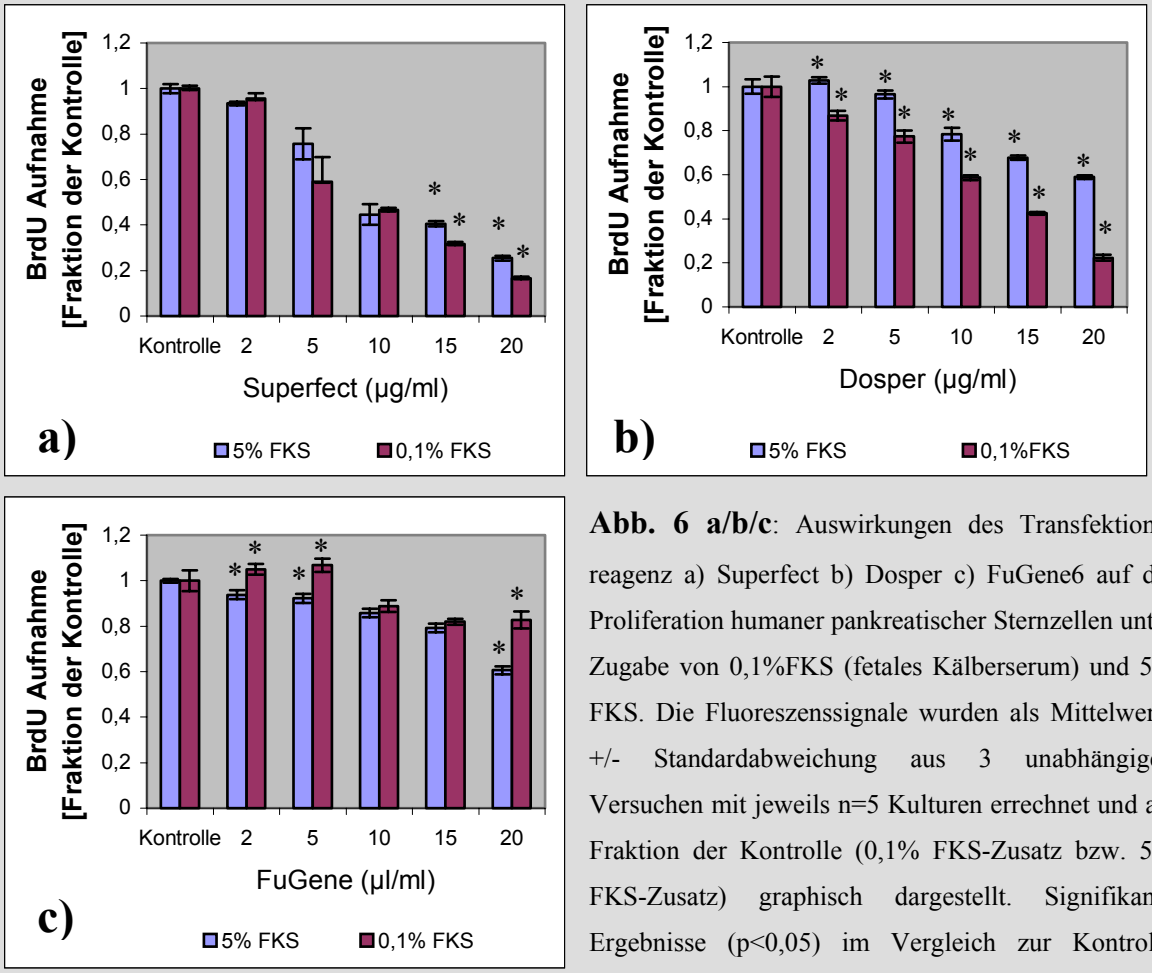


Abb. 6 a/b/c: Auswirkungen des Transfektionsreagenz a) Superfect b) Dosper c) FuGene6 auf die Proliferation humaner pankreatischer Sternzellen unter Zugabe von 0,1%FKS (fetales Kälberserum) und 5% FKS. Die Fluoreszenssignale wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=5 Kulturen errechnet und als Fraktion der Kontrolle (0,1% FKS-Zusatz bzw. 5% FKS-Zusatz) graphisch dargestellt. Signifikante Ergebnisse ($p<0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit * markiert.

2. Vergleichende Proliferation unter 0,1% und 5% FKS bei Inkubation mit den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect bei pankreatischen Sternzellen der Ratte

Die vergleichende Proliferation pankreatischer Sternzellen der Ratte unter 0,1 und 5% FKS und Inkubation mit Dosper Transfektionsreagenz ergab keine signifikanten Proliferationsunterschiede bei allen getesteten Konzentrationen unter Inkubation mit 5% FKS im Vergleich zu 0,1% FKS. Auch bei Inkubation mit FuGene6 Transfektionsreagenz wurden bis auf ein signifikant besseres Abschneiden der unter 5% FKS inkubierten rPSC unter 10µl/ml Fugene6 Transfektionsreagenz keine weiteren signifikanten Unterschiede bei Inkubation mit 5% oder 0,1% FKS und FuGene6 Transfektionsreagenz beobachtet. Letztendlich konnte auch bei dem Vergleich der mit 0,1% und 5% FKS als auch Superfect Transfektionsreagenz in steigenden Konzentrationen inkubierten rPSC kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

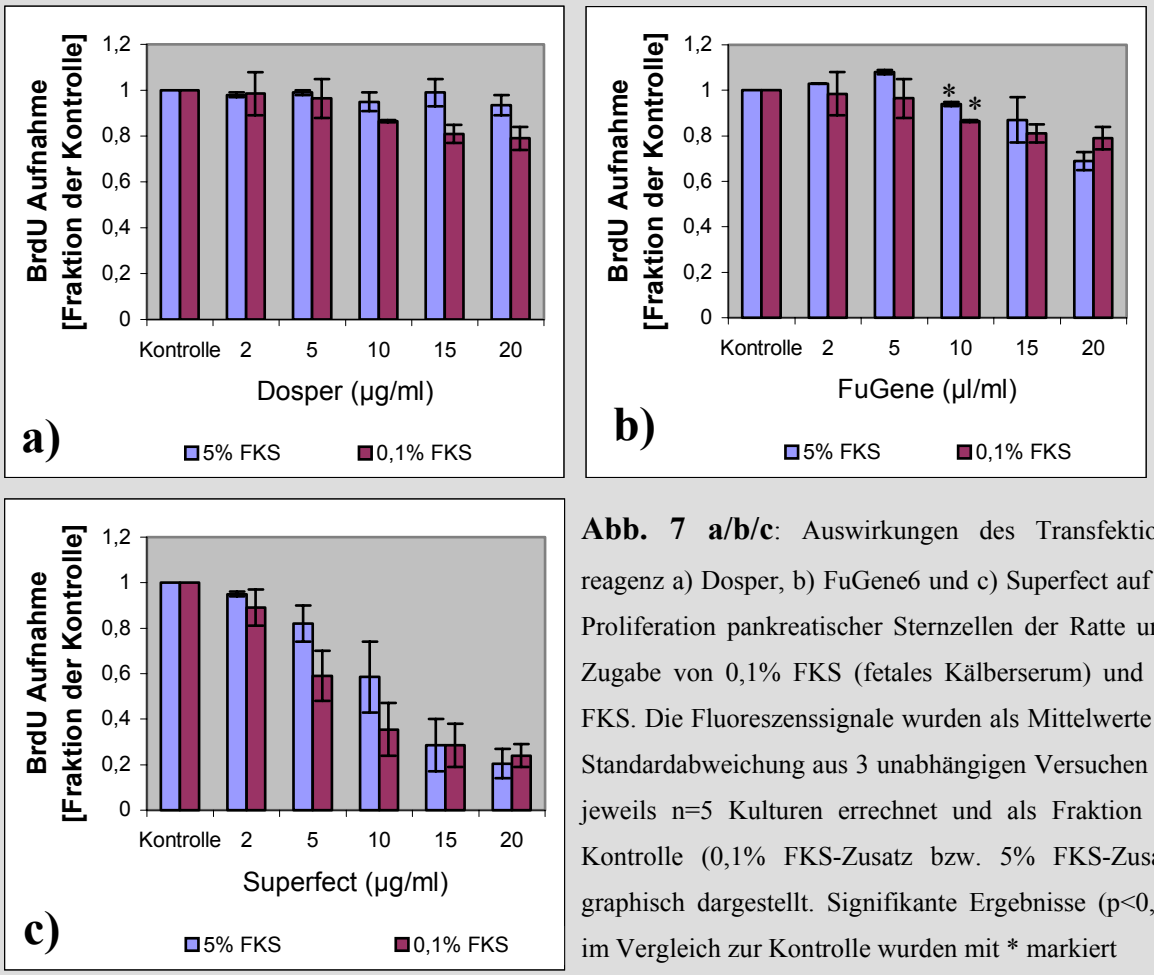


Abb. 7 a/b/c: Auswirkungen des Transfektionsreagenz a) Dosper, b) FuGene6 und c) Superfect auf die Proliferation pankreatischer Sternzellen der Ratte unter Zugabe von 0,1% FKS (fetales Kälberserum) und 5% FKS. Die Fluoreszenssignale wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=5 Kulturen errechnet und als Fraktion der Kontrolle (0,1% FKS-Zusatz bzw. 5% FKS-Zusatz) graphisch dargestellt. Signifikante Ergebnisse ($p<0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit * markiert

IV.3 Quantitative Messung der LDH-Freisetzung im Zellkulturüberstand

Zur quantitativen Messung der toxischen Wirkung der Transfektionsreagenzien wurde das unter steigender Konzentration an Transfektionsreagenz von den pankreatischen Sternzellen freigesetzte LDH im Zellkulturüberstand gemessen. Die LDH Freisetzung wurde aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen errechnet und als Fraktion der maximalen LDH-Freisetzung nach Zugabe einer Lyse-Lösung berechnet. Als Kontrolle diente die LDH Freisetzung der in 0,1% FKS ohne Transfektionsreagenz inkubierten PSC. Das Transfektionsreagenz wurde in den Konzentrationen 2, 5, 10, 15 und 20µg/ml Dosper/Superfect bzw. µl/ml FuGene6 zu den 24h zuvor ausgesäten Zellen hinzugefügt und über 6h inkubiert.

1. LDH Freisetzung bei hPSC unter Inkubation mit den Transfektionsreagenzen Dosper, FuGene6 und Superfect

Als nicht signifikant zur Kontrolle erwiesen sich Konzentrationen bis einschließlich 10µg/ml Dosper Transfektionsreagenz. Bei Verwendung von 15µg/ml Dosper wird das 0,52fache (+/-0,038) des maximalen LDH Release erreicht, während bei 20µg/ml Dosper kein signifikanter Unterschied zur maximal erreichten LDH Freisetzung mehr errechnet werden konnte.

Bei der Transfektion mit FuGene6 Transfektionsreagenz zeigten sich Konzentrationen bis 15µl/ml als nicht signifikant toxisch im Vergleich zur Kontrolle. Alle getesteten Konzentrationen einschließlich der maximal getesteten Konzentration von 20µl/ml Fugene6 zeigten ein signifikant geringeres LDH Release im Vergleich zur maximalen LDH Freisetzung. Interessanterweise findet sich hier – analog der Proliferationsergebnisse – bei den Konzentrationen 2 und 5µl/ml FuGene6 mit der 0,18fachen (+/-0,001) bzw. 0,18fachen (+/-0,002) LDH Freisetzung eine scheinbar protektive Wirkung auf die Zellen im Sinne einer geringeren LDH Release im Vergleich zur Kontrolle mit dem 0,19fachen (+/-0,005) LDH Release der Maximalkontrolle. Signifikant wurde in diesem Zusammenhang der Unterschied zwischen diesen beiden Konzentrationen und Konzentrationen ab 10µl/ml FuGene6.

Superfect erwies sich nur in der Konzentration von 2µg/ml als nicht signifikant toxisch im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Superfect Konzentration von 10µg/ml wurde das 0,56fache (+/-0,014) der maximalen LDH Freisetzung erreicht. Bei Transfektion mit der höchsten Superfect Konzentration von 20µg/ml wurde mit Erreichen von dem 0,76fachen (+/-0,017) der maximalen LDH Freisetzung noch eine signifikant geringere Toxizität erreicht im Vergleich zum Wert der maximalen LDH Freisetzung.

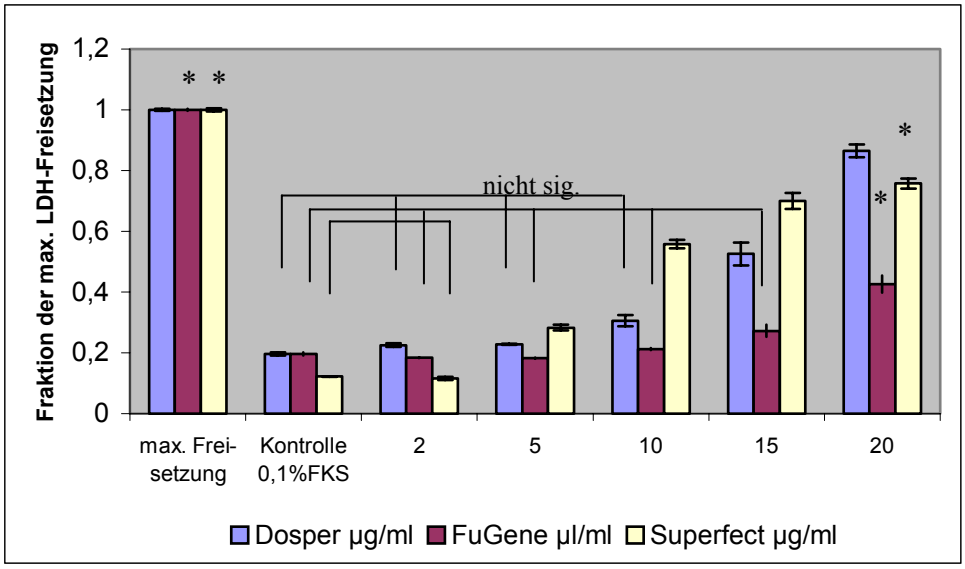


Abb. 8: Auswirkungen des Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Lactatdehydrogenase (LDH) Freisetzung kultivierter humaner pankreatischer Sternzellen. Die LDH-Freisetzung wurde als Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen errechnet und als Fraktion der maximalen Freisetzung graphisch dargestellt. Sich nicht signifikant voneinander unterscheidende Ergebnisse ($p<0,05$) wurden durch einen Balken markiert. Ein signifikantes Ergebnis ($p<0,05$) der maximal getesteten Transfektionsreagenzkonzentration im Vergleich zur maximalen LDH Freisetzung wurde mit * markiert.

2. LDH Release bei rPSC unter Inkubation mit den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect

Als nicht signifikant zur Kontrolle erwiesen sich Konzentrationen bis einschließlich 5µg/ml Dosper Transfektionsreagenz. Auch die maximal getestete Konzentration von 20µl/ml Dosper hatte eine signifikant niedrigere LDH Freisetzung mit dem 0,28fachen (+/- 0,024) des maximal freigesetzten LDH.

Bei Konzentrationen bis 15µl/ml des Transfektionsreagenz FuGene6 war die LDH Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant erhöht. Selbst die maximal getestete Konzentration an FuGene6 Transfektionsreagenz mit 20µl/ml zeigte eine signifikant niedrigere LDH Freisetzung mit dem 0,27fachen (+/-0,02) der maximalen LDH Freisetzung.

Die mit dem Transfektiosreagenz Superfect stimulierten Zellen zeigten bis zur Konzentration von 5µg/ml keine signifikant erhöhte LDH Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Die weiter mit 10 bis maximal 20µg/ml Superfect transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant toxische Wirkung des Transfektionsreagenz auf die Zelle im Vergleich zur Kontrolle. Dennoch zeigte die maximal gebrauchte

Konzentration von 20µg/ml Superfect eine signifikant geringere LDH Freisetzung mit dem 0,52 fachen (+/-0,03) der Maximalkontrolle als die maximal erreichte LDH Freisetzung.

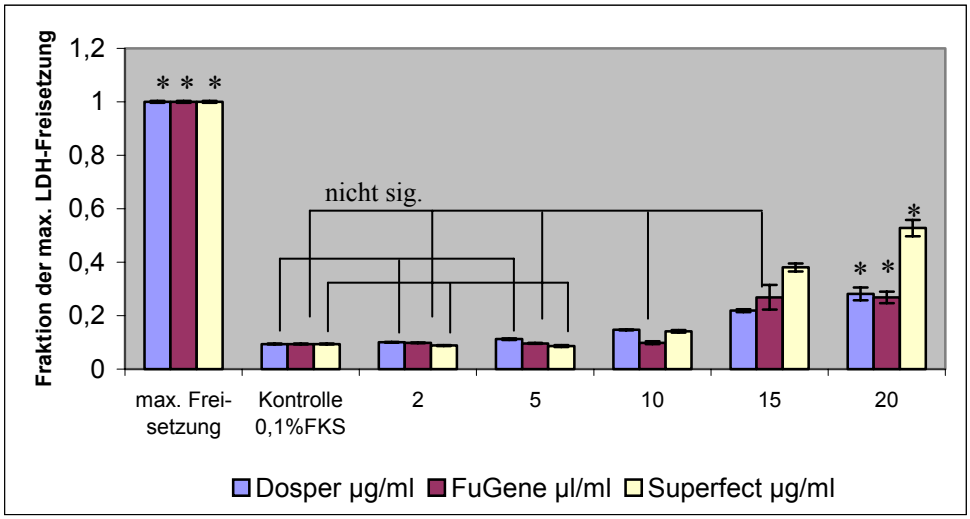


Abb. 9: Auswirkungen des Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Lactatdehydrogenase (LDH) Freisetzung kultivierter pankreatischer Sternzellen der Ratte. Die LDH Freisetzung wurde als Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen errechnet und als Fraktion der maximalen Freisetzung graphisch dargestellt. Sich nicht signifikant voneinander unterscheidende Ergebnisse ($p<0,05$) wurden durch einen Balken markiert. Ein signifikantes Ergebnis ($p<0,05$) der maximal getesteten Transfektionsreagenzkonzentration im Vergleich zur maximalen LDH Freisetzung wurde mit * markiert.

Tab. 3: Messung der LDH-Freisetzung aus hPSC und rPSC in Abhängigkeit von der Transfektionsreagenz-Konzentration

	PSC	**Maximale Konzentration des Transfektionsreagenz bei im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant erhöhter LDH Freisetzung**
Dosper	hPSC	10µg/ml
	rPSC	5µg/ml
FuGene6	hPSC	15µl/ml
	rPSC	15µl/ml
Superfect	hPSC	2 µg/ml
	rPSC	5µg/ml

LDH: Lactatdehydrogenase, hPSC: humane pankreatische Sternzelle, rPSC: pankreatische Sternzelle der Ratte, Kontrolle: LDH-Freisetzung ohne Transfektionsreagenz (0,1% FKS)

IV.4 Nachweis der toxischen Wirkung der Transfektionsreagenzien anhand der Anfärbbarkeit mit Trypanblau

Durch die Diffusion von Trypanblau in toxisch geschädigte Zellen werden diese blau angefärbt und erlauben eine Differenzierung von vitalen Zellen. Humane pankreatische Sternzellen und die der Ratte wurden in steigender Konzentration mit 2, 5, 10, 15 und 20µg/ml Dosper, Superfect und FuGene6 (µl/ml) Transfektionsreagenz inkubiert. Die toxische Wirkung dieser Transfektionsreagenzien auf die Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung dokumentiert.

1. Einfluss der Transfektionsreagenzien auf humane pankreatische Sternzellen

Humane pankreatische Sternzellen zeigten ein unauffälliges Zellbild bei Inkubation mit Dosper Transfektionsreagenz bis zu einer Konzentration vom 5µg/ml Dosper. Bereits bei 10µg/ml Dosper zeigten sich einzelne blau angefärbte Zellen, bei höheren Konzentrationen führte dies zu einem völlig destruierten Zellbild.

Mit Superfect inkubierte Zellen zeigten bei einer Konzentration von 5µg/ml bereits einzelne Anfärbungen, deutlich wurde die Zellschädigung bei Konzentrationen ab 10µg/ml Superfect Transfektionsreagenz.

FuGene6 Transfektionsreagenz scheint das am geringsten zellschädigende Reagenz zu sein, erst bei einer Konzentration von 15µl/ml FuGene6 zeigten sich einzelne blau angefärbte Zellen, die auch bei 20µl/ml nicht deutlich an Zahl zunahmen.

2. Einfluss der Transfektionsreagenzien auf pankreatische Sternzellen der Ratte

Bereits bei einer Konzentration von 5µg/ml Dosper Transfektionsreagenz zeigten sich einzelne blau angefärbte Zellen, die Schädigung wird bei höheren Konzentrationen deutlicher.

Auch die Inkubation mit Superfect zeigte bereits bei einer Konzentration von 5µg/ml deutlich geschädigte Zellen, bei höheren Konzentrationen nimmt das Ausmaß der Schädigung proportional mit steigender Konzentration zu.

Bei Inkubation mit FuGene6 Transfektionsreagenz zeigten sich erst bei einer Konzentration von 10µl/ml FuGene6 einzelne blau angefärbte Zellen, deren Zahl leicht jedoch stetig mit steigender Konzentration zunahm.

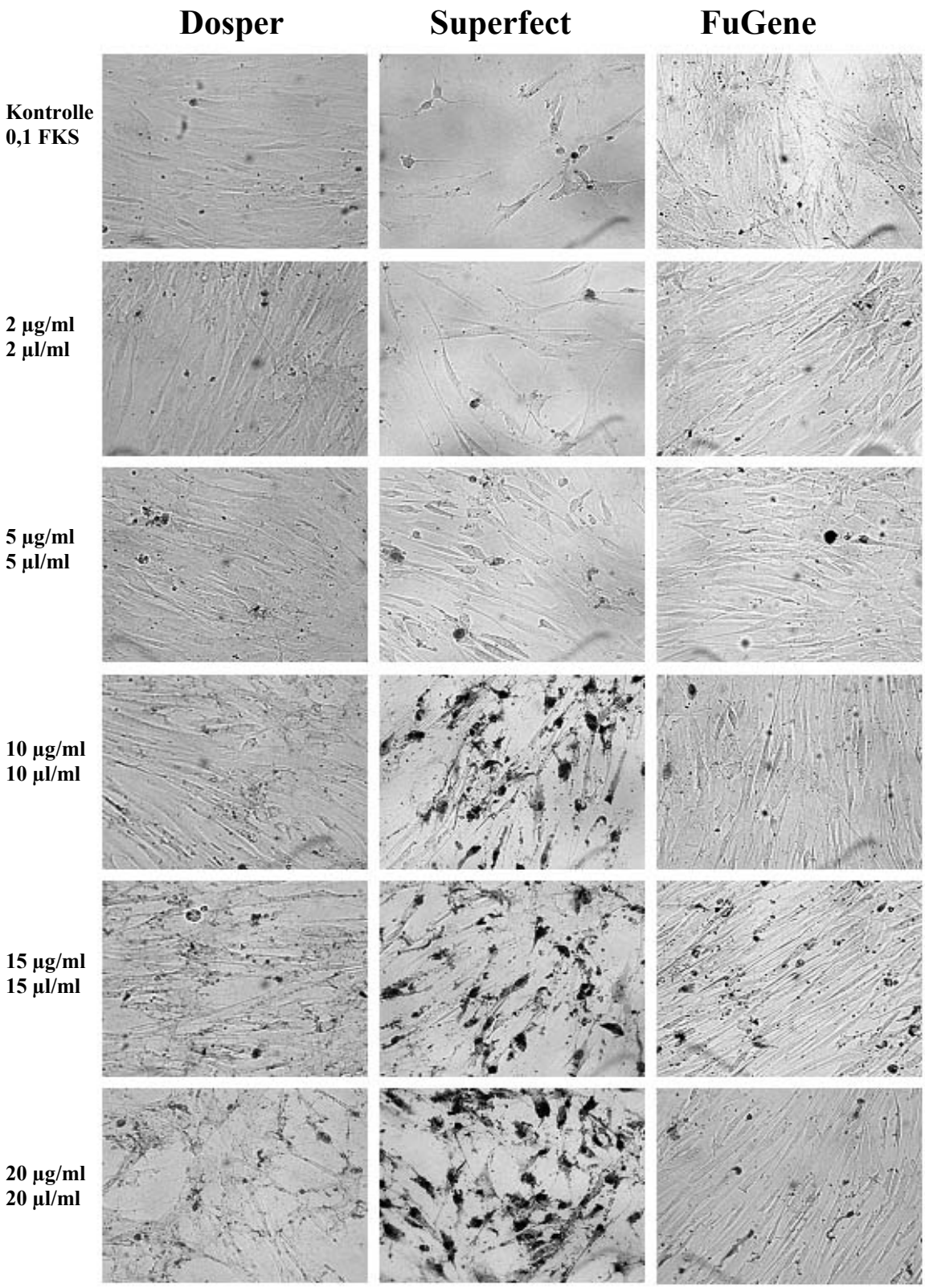


Abb. 10: Anfärbbarkeit mit Trypanblau nach Zugabe der Transfektionsreagenzien Dosper (µg/ml), FuGene6 (µl/ml) und Superfect (µg/ml) in steigenden Konzentrationen zu humanen pankreatischen Sternzellen im Vergleich zur Kontrolle (0,1 fetales Kälberserum (FKS)).

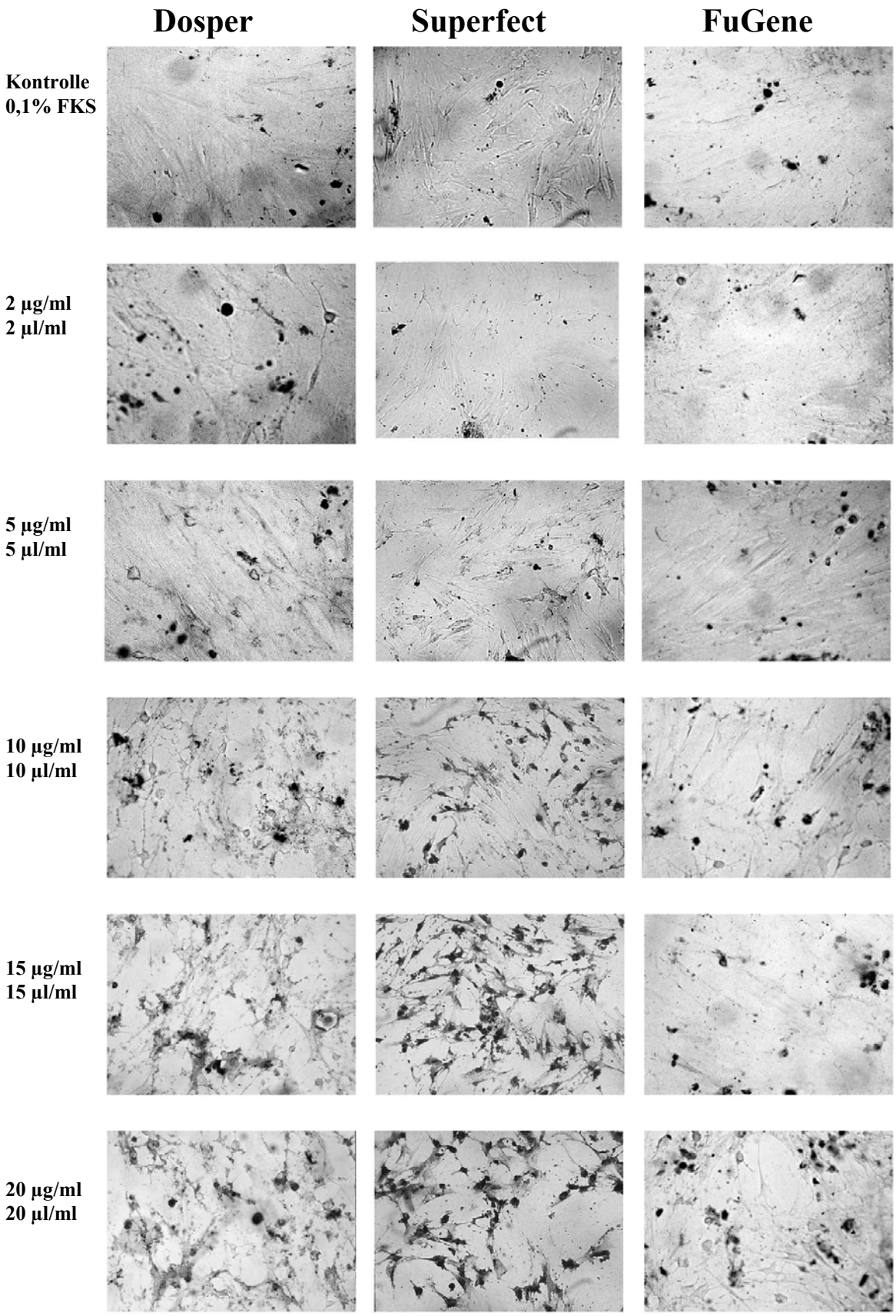


Abb. 11: Anfärbbarkeit mit Trypanblau nach Zugabe der Transfektionsreagenzien Dosper (µg/ml), FuGene6 (µl/ml) und Superfect (µg/ml) in steigenden Konzentrationen zu pankreatischen Sternzellen der Ratte im Vergleich zur Kontrolle (0,1% fetales Kälberserum (FKS)).

IV.5 Transfektion pankreatischer Sternzellen mittels Dosper, FuGene6 und Superfect

Der Einsatz FITC markierter ODN ist eine geeignete Methode zur Quantifizierung der ODN-Aufnahme in pankreatische Sternzellen, da die Menge an aufgenommenen ODN anhand der Fluoreszenzemission gemessen werden kann. Eine Differenzierung der ODN-Aufnahme in lebende und/oder tote Zellen kann durch diese Methode jedoch nicht erfolgen, genauso wenig kann eine eventuell vorhandene Zellschädigung infolge toxischer Wirkungen unterschieden werden.

Folgende Parameter wurden evaluiert:

1) Optimierung Teil 1: Das Verhältnis von ODN zu Transfektionsreagenz bei konstanter ODN- und variabler Transfektionsreagenz-Konzentration
2) Optimierung Teil 2: Das Verhältnis von ODN zu Transfektionsreagenz bei konstanter Transfektionsreagenz- und variabler ODN-Konzentration
3) Zeitkinetik der ODN-Aufnahme

Die Messungen wurden in jeweils 6 Wells/Versuchsansatz in 3 unabhängigen Versuchen durchgeführt. Als Kontrolle dienten PSC, die ohne Transfektionsreagenz stimuliert worden waren. Die Werte der Kontrolle wurden vom Ergebnis der mit Transfektionsreagenz stimulierten Zellen abgezogen.

IV.5.1 Optimierung Teil 1: Transfektion pankreatischer Sternzellen bei konstanter ODN- und variabler Transfektionsreagenzkonzentration

1. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mittels AS-ODN und Dosper Transfektionsreagenz

Die am Vortag in 96Well-Platten ausplattierten humanen pankreatischen Sternzellen der Passage 3-6 wurden am nächsten Tag bei einer Zelldichte von ca. $1x10^4$ in 0,1% FKS haltigem Medium transfiziert.

In weitgehender Lichtabwesenheit wurden 2,5µg/ml der FITC-markierten AS-ODN I, II und III mit 2,5 bis 20µg/ml des kationischen Lipids Dosper und HBS Puffer zu einem Volumen von 20µl inkubiert. Nach tropfenweisem Zugeben der Transfektionssuspension und Schwenken der Kulturplatte wurden die pankreatischen Sternzellen in einem Endvolumen von 100µl für 6h inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen gewaschen, um nicht in die Zelle aufgenommene FITC-markierte ODN zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mittels H_2O lysiert.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale variierten für AS I zwischen 10731 (+/-2050) und 39873 (+/-1383) counts abhängig von der Konzentration des Dosper Transfektionsreagenz.

Eine signifikant höhere Fluoreszenz wurde bei einem ODN/Dosper Verhältnis von 1:2 (µg/µg) gemessen.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale variierten für AS II zwischen 25873 (+/-5496) und 57674 (+/-3419) counts in Abhängigkeit von der Konzentration des Dosper Transfektionsreagenz. Ein Maximum konnte auch hier bei dem Verhältnis der ODN/Dosper Konzentration von 1:2 (µg/µg) gemessen werden.

Für AS III konnten Messsignale zwischen 8866 (+/-2570) und 31402 (+/-5596) in Abhängigkeit von der Dosper Transfektionsreagenzkonzentration mit einem Maximum bei einem Verhältnis der ODN/Dosper Konzentration von 1:2 (µg/µg) gemessen werden.

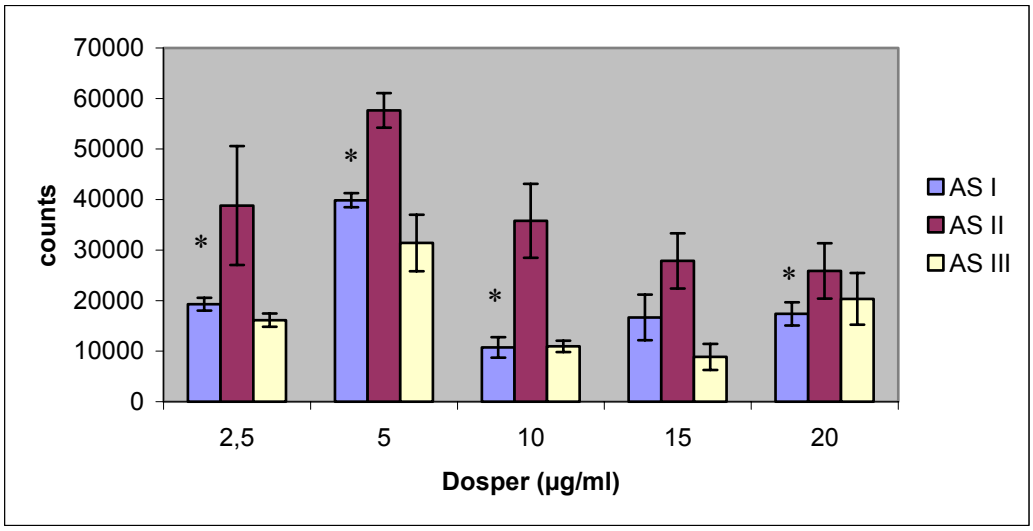


Abb. 12: Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit Dosper Transfektionsreagenz und AS I, AS II und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide). Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert.

2. Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mittels AS-ODN und Dosper Transfektionsreagenz

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden pankreatische Sternzellen der Ratte mit 2,5µg/ml der FITC markierten AS-ODN I, II und III mittels 2,5 bis 20µg/ml des kationischen Lipids Dosper transfiziert.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale variierten für AS I zwischen 10128 (+/-3307) und 27230 (+/-3071) counts abhängig von der Konzentration des Dosper Transfektionsreagenz. Eine signifikante, maximale Fluoreszenz wurde bei einem ODN/Dosper Verhältnis von 1:8 gemessen.

Die Fluoreszenzsignale bei der Transfektion mit AS II lagen zwischen 14113 (+/-9713) und 33001 (+/-8871) mit einem Maximum bei dem ODN/Dosper Verhältnis von 1:4.

Für AS III konnte ein signifikantes Maximum bei einem ODN/Dosper Verhältnis von 1:8 bei einer Spannweite der FITC-count-Werte von 10301 (+/-2726) und 22052 (+/-5209) gemessen werden.

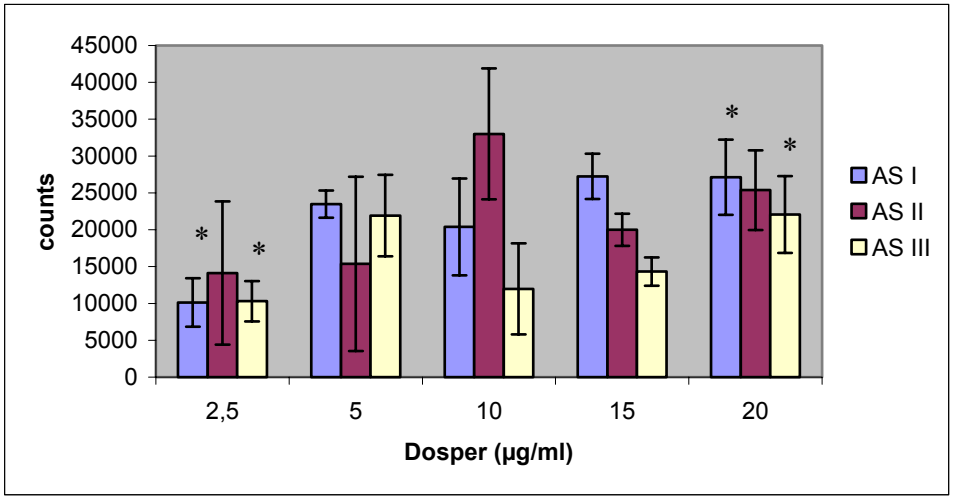


Abb. 13: Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit Dosper Transfektionsreagenz und AS I, AS II und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide). Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert.

3. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mittels AS-ODN und FuGene6 Transfektionsreagenz

Die am Vortag in 96Well-Platten ausplattierten humanen pankreatischen Sternzellen der Passage 3-6 wurden am nächsten Tag bei einer Zelldichte von ca. $1x10^4$, entsprechend einer Konfluenz von ca. 80%, in 0,1% FKS haltigem Medium transfiziert.

In weitgehender Lichtabwesenheit wurden 5µg/ml der FITC-markierten AS-ODN I, II und III mit 5 bis 20µl/ml des nicht-liposomalen Transfektionsreagenz FuGene6 inkubiert. Nach tropfenweisem Zugeben der Transfektionssuspension und Schwenken der Kulturplatte wurden die pankreatischen Sternzellen in einem Endvolumen von 100µl für 6h inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen gewaschen, um nicht in die Zelle aufgenommene FITC-markierte ODN zu entfernen und anschließend mittels H_2O lysiert.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale variierten für AS I zwischen 4366 (+/-785) und 12434 (+/-537) counts abhängig von der Konzentration des FuGene6 Transfektionsreagenz. Die maximale Fluoreszenz wurde bei einem ODN/FuGene6 Verhältnis von 1:1 (µg/µl) gemessen.

Bezüglich AS II konnten mit FuGene6 keine Fluoreszenzsignale nach Zelllyse im Vergleich zur Kontrolle mit 0.1% FKS gemessen werden. Die Detektion einer stattgehabten Transfektion fand im Rahmen der Messmöglichkeit nicht statt.

Bei AS III konnten Fluoreszenzsignale der Spannweite 7016 (+/-469) und 12856 (+/-754) counts gemessen werden. Die maximale Fluoreszenz konnte bei einem ODN/FuGene6 Verhältnis von 1:1 gemessen werden.

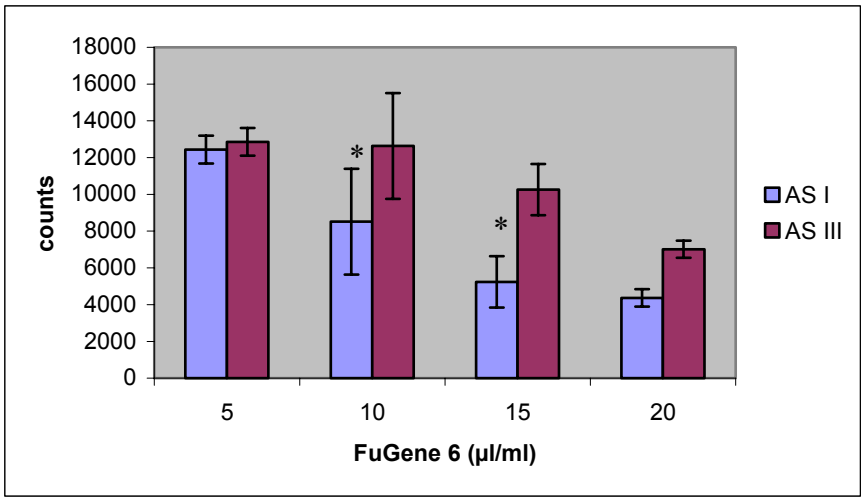


Abb. 14: Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit FuGene6 Transfektionsreagenz und AS I und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide). Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert.

4. Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mittels AS-ODN und FuGene6 Transfektionsreagenz

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden pankreatische Sternzellen der Ratte mit 5µg/ml der FITC markierten AS-ODN I, II und III mittels 5 bis 20µl/ml des nicht-liposomalen Transfektionsreagenz FuGene6 transfiziert.

Bei gemessenen Fluoreszenzwerten zwischen 5377 (+/-165) und 8974 (+/-318) counts konnte ein maximales Signal bei AS I und einem ODN/FuGene6 Verhältnis von 1:1 gemessen werden.

Eine Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit AS II und FuGene6 konnte im Vergleich zur Kontrolle mit 0,1% FKS im Rahmen der Messmöglichkeit nicht festgestellt werden.

Bei Transfektion pankreatischer Sternzellen mit AS III und FuGene6 Transfektionsreagenz konnten Fluoreszenzsignale zwischen 7443 (+/-156) und 17946 (+/-3197) counts mit einem Maximum bei einer ODN/FuGene6 Konzentration von 1:1 gemessen werden.

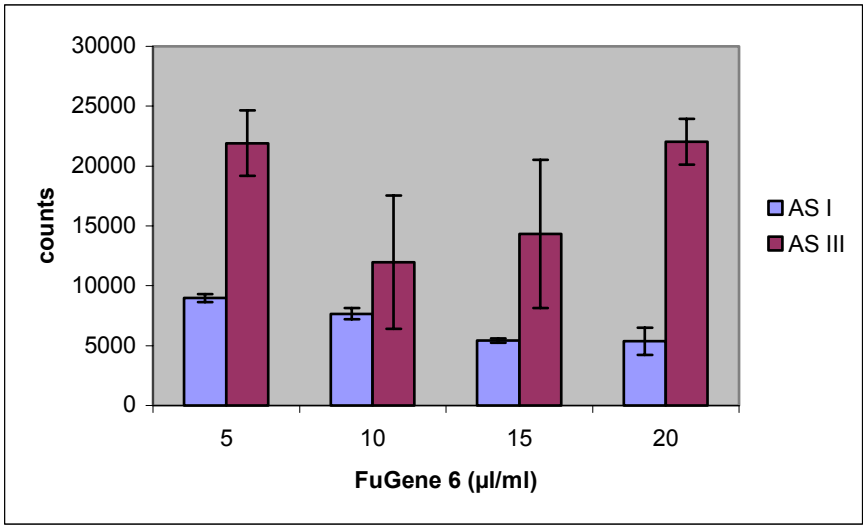


Abb. 15: Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit FuGene6 Transfektionsreagenz und AS I und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide). Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt.

5. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mittels AS-ODN und Superfect Transfektionsreagenz

Die am Vortag in 96-Well-Platten ausplattierten humanen pankreatischen Sternzellen der Passage 3-6 wurden am nächsten Tag bei einer Zelldichte von ca. $1x10^4$, entsprechend einer Konfluenz von ca. 80%, in 0,1% FKS haltigem Medium transfiziert.

In weitgehender Lichtabwesenheit wurden 5µg/ml der FITC-markierten AS-ODN I, II und III mit 5 bis 20µg/ml des Dendrimer Transfektionsreagenz Superfect zu einem Endvolumen von 100µl inkubiert. Nach Zugabe der Transfektionssuspension und Schwenken der Kulturplatte wurden die pankreatischen Sternzellen für 6h inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen gewaschen, um nicht in die Zelle aufgenommene FITC-markierte ODN zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mittels H_2O zu einem Endvolumen von 100µl lysiert.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale variierten für AS I zwischen 7247 (+/-1390) und 10491 (+/-1856) counts abhängig von der Konzentration des Superfect Transfektionsreagenz. Eine maximale Fluoreszenz wurde bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:3 (µg/µg) gemessen.

Für AS II konnten Fluoreszenzsignale einer Spannweite von 1523 (+/-2276) bis 42169 (+/-7153) counts gemessen werden. Eine Maximale Fluoreszenz konnte auch hier bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:3 (µg/µg) gemessen werden.

Bezüglich AS III ergab die Messung Fluoreszenzwerte zwischen 1090 (+/-457) und 16932 (+/-2051) counts in Abhängigkeit von der Superfect Transfektionsreagenz Konzentration. Ein maximaler Wert wurde bei dem ODN/Superfect Verhältnis 1:4 (µg/µg) erzielt.

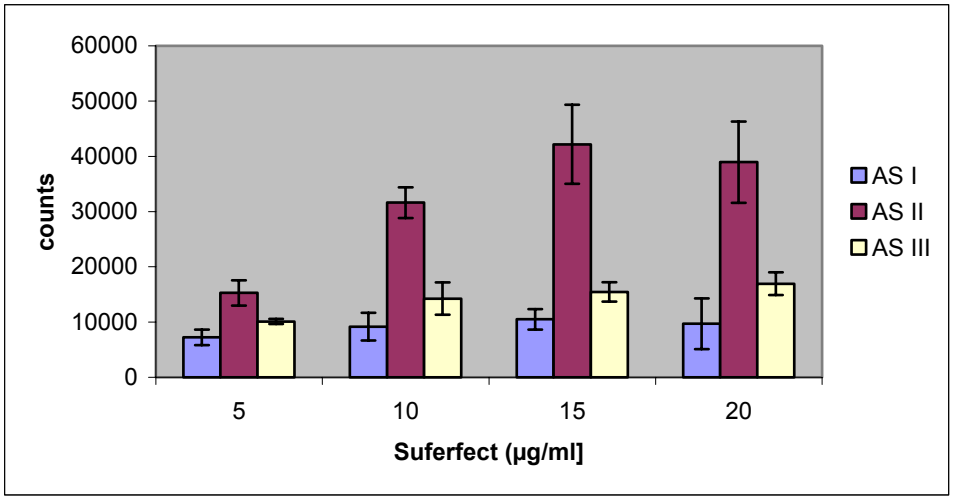


Abb. 16: Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit Superfect Transfektionsreagenz und AS I, AS II und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide). Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt.

6. Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mittels AS-ODN und Superfect Transfektionsreagenz

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden pankreatische Sternzellen der Ratte mit 5µg/ml der FITC markierten AS-ODN I, II und III mittels 5 bis 20µl/ml des Dendrimer Transfektionsreagenz Superfect transfiziert.

Bei Transfektion mit AS I wurden Fluoreszenzwerte zwischen 6606 (+/-212) und 15660 (+/-290) counts gemessen. Ein maximales, sich signifikant von den anderen Werten unterscheidendes Signal konnte bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:4 (µg/µg) gemessen werden.

Eine Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit AS II und Superfect variierten die Messwerte zwischen 9337 (+/-1894) und 30683 (+/-14665) counts mit einem Maximum bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:3 (µg/µg).

Bezüglich AS III konnten Messwerte zwischen 7196 (+/-5) und 14765 (+/- 711) counts mit einem signifikanten Maximum bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:4 gemessen werden.

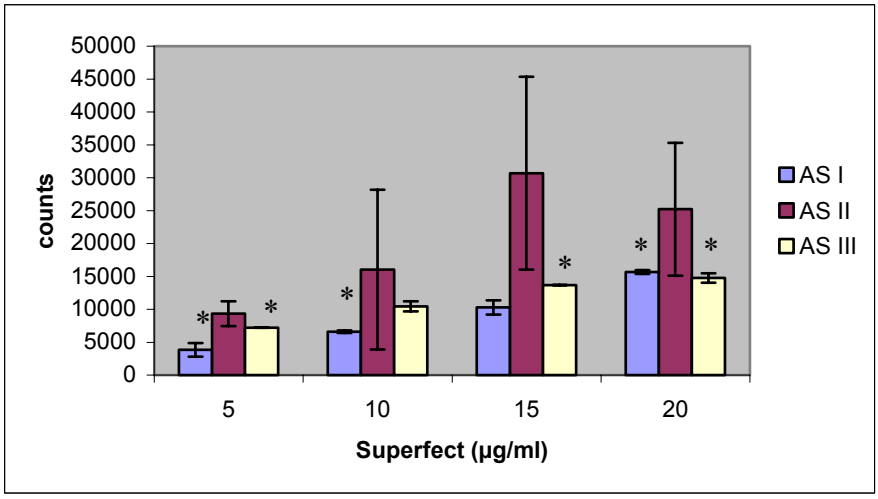


Abb. 17: Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit Superfect Transfektionsreagenz und AS I, AS II und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide). Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert.

Tab. 4: Transfektionsreagenz-Konzentration, bei der eine maximale Aufnahme der jeweiligen Oligonukleotide in die pankreatische Sternzelle erfolgte.

		AS I	**AS II**	**AS III**
Dosper (ODN jeweils 2,5µg/ml)	hPSC	5 µg/ml	5µg/ml	5µg/ml
	rPSC	15µg/ml	10µg/ml	20µg/ml
FuGene6 (ODN jeweils 5µg/ml)	hPSC	5µl/ml	-	5µl/ml
	rPSC	5µl/ml	-	5µl/ml
Superfect (ODN jeweils 5µg/ml)	hPSC	15µg/ml	15µg/ml	20µg/ml
	rPSC	20µg/ml	15µg/ml	20µg/ml

AS: Antisense-Oligonukleotid, ODN: Oligonukleotid, hPSC: humane Pankreatische Sternzelle, rPSC: Pankreatische Sternzelle der Ratte

IV.5.2 Optimierung Teil 2:Aufnahme der FITC-markierten ODN in die Zelle in Abhängigkeit von der Konzentration des ODN bei konstanter Transfektionsreagenzkonzentration

Pankreatische Sternzellen wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Proliferationsexperimente, der LDH-Freisetzung und Fibronektinsynthese als auch der vorangegangenen Optimierungsexperimente zur weiteren Optimierung mit konstanten Mengen an Transfektionsreagenz und variablen Mengen an AS-ODN transfiziert.

Tab. 5: Optimale Transfektionsreagenz-Konzentration bezogen auf das jeweilige AS-ODN nach Berücksichtigung der toxischen Effekte der Transfektionsreagenzien auf die pankreatische Sternzelle und der unter der Optimierung 1 gewonnenen Ergebnisse

		AS I	**AS II**	**AS III**
Dosper	hPSC	5 µg/ml	5µg/ml	5µg/ml
	rPSC	5µg/ml	10µg/ml	5µg/ml
FuGene6	hPSC	5µl/ml	-	5µl/ml
	rPSC	5µl/ml	-	5µl/ml
Superfect	hPSC	2µg/ml	2µg/ml	2µg/ml
	rPSC	2µg/ml	2µg/ml	2µg/ml

AS: Antisense-Oligonukleotid, hPSC: humane Pankreatische Sternzelle, rPSC: Pankreatische Sternzelle der Ratte

1. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit AS-ODN und Dosper Transfektionsreagenz

Die am Vortag in 96Well-Platten ausplattierten humanen pankreatischen Sternzellen der Passage 3-6 wurden am nächsten Tag bei einer Zelldichte von ca. $1x10^4$, entsprechend einer Konfluenz von ca. 80%, in 0,1% FKS haltigem Medium transfiziert.

In weitgehender Lichtabwesenheit wurden 1,25 bis 5µg/ml der FITC-markierten AS-ODN I, II und III mit 5µg/ml des kationischen Lipids Dosper und HBS Puffer zu einem Volumen von 20µl inkubiert. Nach tropfenweisem Zugeben der Transfektionssuspension und Schwenken der Kulturplatte wurden die pankreatischen Sternzellen in einem Endvolumen von 100µl für 6h inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen gewaschen, um nicht in die Zelle aufgenommene FITC-markierte Oligonukleotide zu entfernen und anschließend mittels H_2O zu einem Endvolumen von 100µl lysiert.

Sowohl bei AS I als auch II und III konnte die höchste mittels FITC markierter AS-ODN gemessene Transfektionseffizienz bei einem Verhältnis des ODN/Dosper von 1:1 gemessen werden. Die jeweils maximale Fluoreszenz war bei AS I 28311 (+/-1250), AS II 33947 (+/-4901) und AS III 25480 (+/-1540) counts. Ein signifikanter Unterschied bestand bei allen AS-ODN jeweils zu der minimal getesteten ODN Konzentration, während kein signifikanter Unterschied zwischen 2,5 und 5µg/ml ODN bestand.

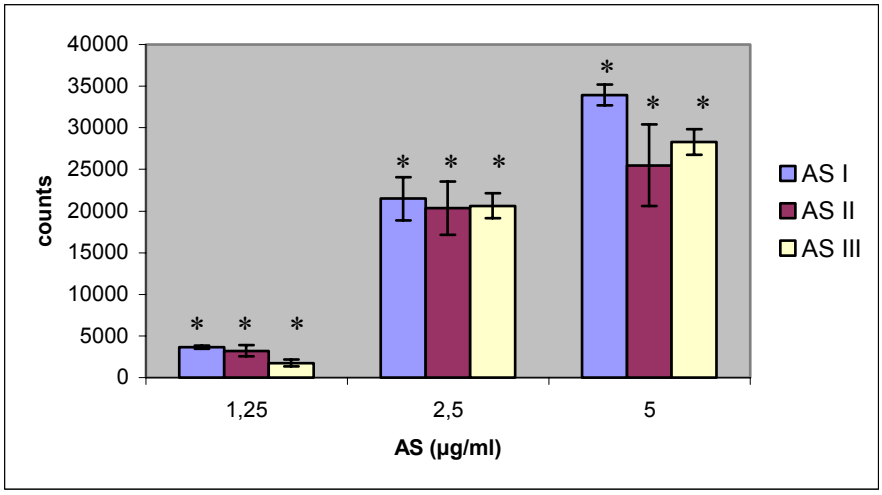


Abb. 18: Zelluläre Aufnahme verschiedener Konzentrationen an FITC-markierten AS I, AS II und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide) in die humane pankreatische Sternzelle bei konstanter Menge des Transfektionsreagenz Dosper. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert.

2. Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit AS-ODN und Dosper Transfektionsreagenz

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden pankreatische Sternzellen der Ratte mit jeweils 1,25 bis 5µg/ml der FITC markierten AS-ODN I und III mittels 5µg/ml Dosper transfiziert, während 5 bis 10µg/ml des AS-ODN II mittels 10µg/ml des Transfektionsreagenz Dosper transfiziert wurden.

Bei AS I konnte durch eine weitere Steigerung der ODN Konzentration keine Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht werden, so dass ein ODN/Dosper Verhältnis von 1:2 (µg/µg) bei 13427 (+/-513) counts optimal war. Auch zeigte sich zur geringsten ODN Konzentration von 1,25µg/ml eine signifikant gesteigerte ODN Aufnahme bei 2,5µg/ml, während bei weiterer Steigerung der ODN Konzentration keine signifikante Verbesserung der ODN Aufnahme gemessen werden konnte.

Bei AS II konnte eine maximale Fluoreszenz bei einem ODN/Dosper Verhältnis von 1:2 mit 37229 (+/-895) counts gemessen werden, zumal keine signifikanten Unterschiede bei höheren ODN Konzentrationen gemessen werden konnten.

Auch bei AS III konnte durch eine weitere Steigerung der AS Konzentration über das Verhältnis 1:2 keine Steigerung der Transfektionseffizienz beobachtet werden, auch war bei weiterer Steigerung keine signifikante Zunahme der Fluoreszenzsignale zu beobachten, so dass ein ODN/Dosper Verhältnis von 1:2 bei 16914 (+/-661) counts als optimal einzustufen war.

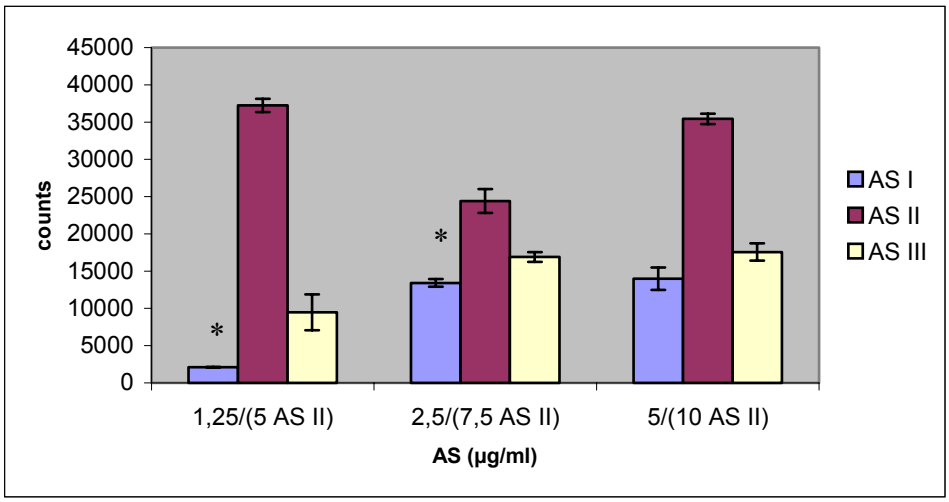


Abb. 19: Zelluläre Aufnahme verschiedener Konzentrationen an FITC-markierten AS I, AS II und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide) in die pankreatische Sternzellen der Ratte bei konstanter Menge des Transfektionsreagenz Dosper. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert.

3. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mittels AS-ODN und FuGene6 Transfektionsreagenz

Die am Vortag in 96Well-Platten ausplattierten humanen pankreatischen Sternzellen der Passage 3-6 wurden am nächsten Tag bei einer Zelldichte von ca. $1x10^4$, entsprechend einer Konfluenz von ca. 80%, in 0,1% FKS haltigem Medium transfiziert.

In weitgehender Lichtabwesenheit wurden 1,25 bis 5µg/ml der FITC-markierten AS-ODN I, II und III mit 5µl/ml des nicht-liposomalen Transfektionsreagenz FuGene6 inkubiert. Nach tropfenweisem Zugeben der Transfektionssuspension und Schwenken der Kulturplatte wurden die pankreatischen Sternzellen in einem Endvolumen von 100µl für 6h inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen gewaschen, um nicht in die Zelle

aufgenommene FITC-markierte ODN zu entfernen und anschließend mittels H_2O zu einem Endvolumen von 100µl lysiert.

Die maximal gemessenen Fluoreszenzsignale für AS I waren 7128 (+/-1599) counts bei einem ODN/FuGene6 Verhältnis von 1:1 (µg/µl), jedoch ohne signifikante Unterschiede in der Transfektionseffizienz bei Verwendung steigender FuGene6 Konzentrationen.

Bezüglich AS II konnten mit FuGene6 keine Fluoreszenzsignale nach Zelllyse im Vergleich zur Kontrolle mit 0.1% FKS gemessen werden. Eine Transfektion fand im Rahmen der Messmöglichkeit nicht statt.

Bei AS III konnten maximale Fluoreszenzsignale bei einem ODN/FuGene6 Verhältnis von 1:1 und 6179 (+/-607) counts gemessen werden, ab der ODN Konzentration von 1,25µg/ml wurden signifikant höhere Fluoreszenzsignale erreicht.

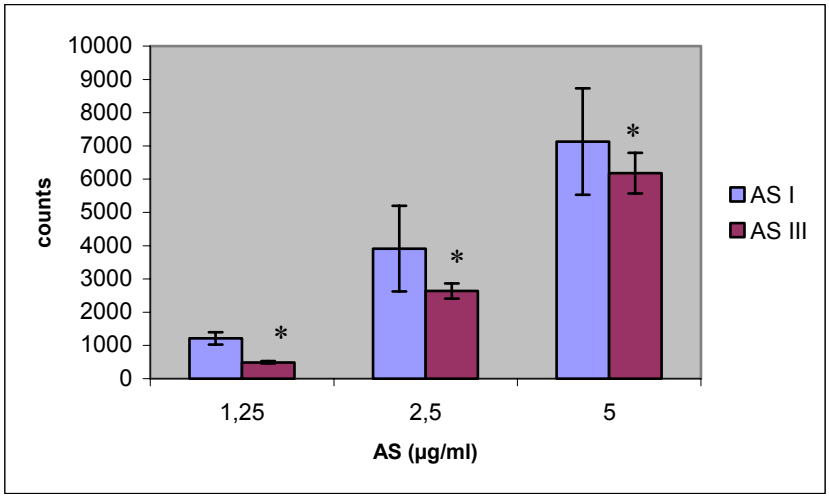


Abb. 20: Zelluläre Aufnahme verschiedener Konzentrationen an FITC-markierten AS I und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide) in humane pankreatische Sternzellen bei konstanter Menge des Transfektionsreagenz FuGene6. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert.

4. Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mittels AS-ODN und FuGene6 Transfektionsreagenz

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden pankreatische Sternzellen der Ratte mit 1,25 bis 5µg/ml der FITC markierten AS-ODN I, II und III mittels 5µl/ml des nicht-liposomalen Transfektionsreagenz FuGene6 transfiziert.

Bei einem maximal gemessenen Fluoreszenzwert von 23127 (+/-745) counts konnte ein maximales und im Vergleich zu den anderen getesteten ODN Konzentrationen signifikantes Signal bei AS I und einem ODN/FuGene6 Verhältnis von 1:1 gemessen werden.

Eine Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit AS II und FuGene6 konnte im Vergleich zur Kontrolle mit 0,1% FKS im Rahmen der Messmöglichkeit nicht festgestellt werden.

Bei Transfektion pankreatischer Sternzellen mit AS III und FuGene6 Transfektionsreagenz wurde bei einer ODN/FuGene6 Konzentration von 1:1 eine maximales Fluoreszenzsignal von 28994 (+/-2360) counts gemessen, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zu den weiteren getesteten ODN Konzentrationen zu zeigen.

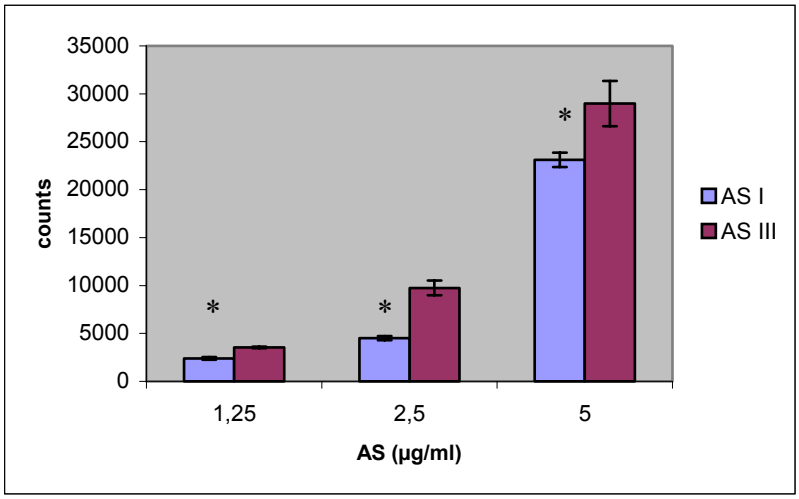


Abb. 21: Zelluläre Aufnahme verschiedener Konzentrationen an FITC-markierten AS I und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide) in pankreatische Sternzellen der Ratte bei konstanter Menge des Transfektionsreagenz FuGene6. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert.

5. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mittels AS-ODN und Superfect Transfektionsreagenz

Die am Vortag in 96Well-Platten ausplattierten humanen pankreatischen Sternzellen der Passage 3-6 wurden am nächsten Tag bei einer Zelldichte von ca. $1x10^4$, entsprechend einer Konfluenz von ca. 80%, in 0,1% FKS haltigem Medium transfiziert.

In weitgehender Lichtabwesenheit wurden 1 bis 2µg/ml der FITC-markierten AS-ODN I, II und III mit 2µg/ml des Dendrimer Transfektionsreagenz Superfect zu einem Endvolumen von 100µl inkubiert. Nach Zugabe der Transfektionssuspension und Schwenken der Kulturplatte wurden die pankreatischen Sternzellen für 6h inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen gewaschen, um nicht in die Zelle aufgenommene FITC-markierte ODN zu entfernen und anschließend mittels H_2O zu einem Endvolumen von 100µl lysiert.

Die maximalen, signifikant höher gemessenen Fluoreszenzsignale für AS I konnten bei 2367 (+/-149) counts bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:1 (µg/µg) gemessen werden.

Für AS II konnten maximale, signifikant höhere Fluoreszenzsignale bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:2 (µg/µg) bei 516 (+/-93) counts gemessen werden.

Bezüglich AS III ergab die Messung annähernd identische, sich nicht signifikant voneinander unterscheidende Fluoreszenzwerte bei den getesteten ODN Konzentrationen. Ein optimaler Wert kann für ein ODN/Superfect Verhältnis von 1:1 (µg/µg) bei 1617 (+/-136) counts angenommen werden.

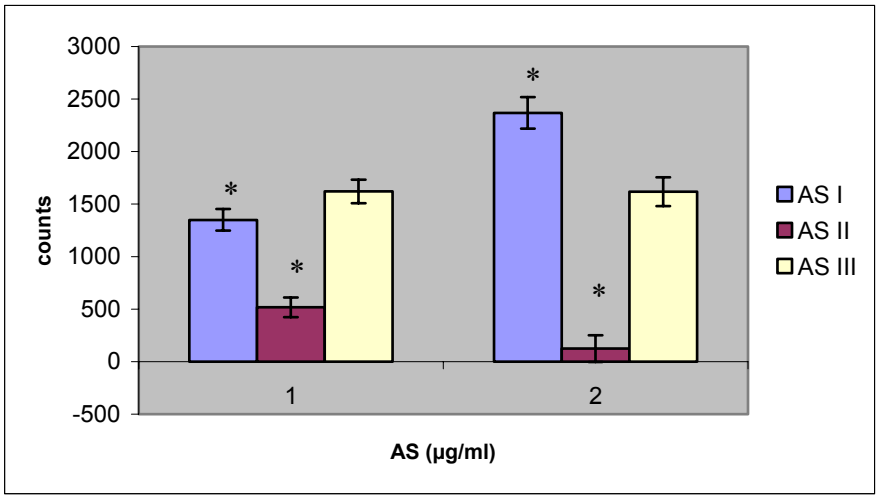


Abb. 22: Zelluläre Aufnahme verschiedener Konzentrationen an FITC-markierten AS I, AS II und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide) in humane pankreatische Sternzellen bei konstanter Menge des Transfektionsreagenz Superfect. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit Stern markiert**.**

6. Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mittels AS-ODN und Superfect Transfektionsreagenz

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden pankreatische Sternzellen der Ratte mit 1 bis 2µg/ml der FITC markierten AS-ODN I, II und III mittels 2µl/ml des Dendromer Transfektionsreagenz Superfect transfiziert.

Bei maximalen Fluoreszenzwerten von 1490 (+/-276) counts konnte für AS I ein maximales, jedoch zu den anderen getesteten Konzentrationen nicht signifikantes Signal bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:1 (µg/µg) gemessen werden.

Bei Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit AS II und Superfect wurde im Vergleich zu den weiteren getesteten ODN Konzentrationen ein nicht signifikantes

Maximum bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:1 (µg/µg) bei 1734 (+/-861) counts erzielt.

Bezüglich AS III konnte ein im Vergleich zu den weiteren getesteten Konzentrationen ein nicht signifikantes Maximum bei einem ODN/Superfect Verhältnis von 1:1 bei 2376 (+/-1122) counts gemessen werden.

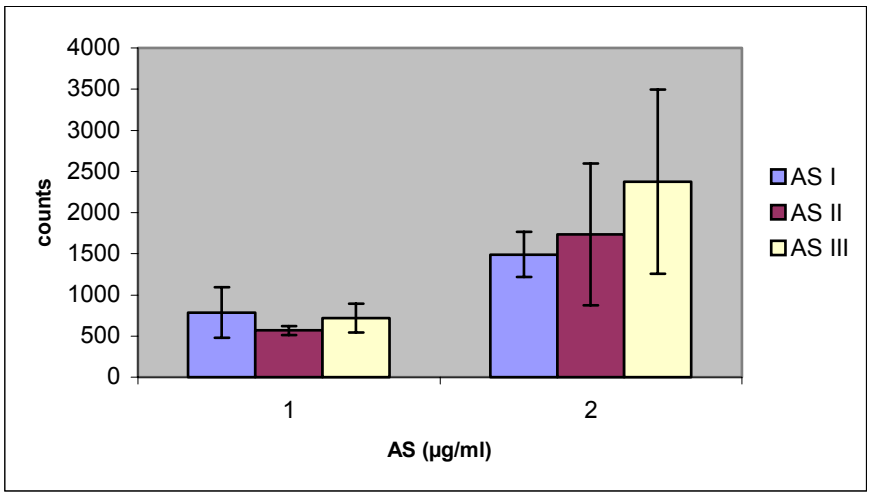


Abb. 23: Zelluläre Aufnahme verschiedener Konzentrationen an FITC-markierten AS I, AS II und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotide) in pankreatische Sternzellen der Ratte bei konstanter Menge des Transfektionsreagenz Superfect. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt.

Tab. 6: Optimales Oligonukleotid zu Transfektionsreagenz-Konzentration Verhältnis für die Transfektion der pankreatischen Sternzelle

		AS I(µg/ml) / Transfektions-reagenz konzentration	**AS II(µg/ml)/ Transfektions-reagenz konzentration**	**AS III(µg/ml)/ Transfektions-reagenz konzentration**
Dosper (µg/ml)	hPSC	5 /5	5/5	5/5
	rPSC	2,5/5	5/10	2,5/5
FuGene6 (µl/ml)	hPSC	5/5	-	5/5
	rPSC	5/5	-	5/5
Superfect (µg/ml)	hPSC	2/2	1/2	2/2
	rPSC	2/2	2/2	2/2

AS: Antisense-Oligonukleotid, hPSC: humane Pankreatische Sternzelle, rPSC: Pankreatische Sternzelle der Ratte

IV.5.3 Kinetik der ODN-Aufnahme in humane pankreatische Sternzellen bei Transfektion mit den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect

Zur Erfassung des Zeitverlaufes der ODN Aufnahme wurden humane pankreatische Sternzellen und pankreatische Sternzellen der Ratte zwischen 30min und 24h mit den optimierten Konzentrationen an ODN/Transfektionsreagenz in 0,1% FKS haltigem Medium inkubiert.

1. Kinetik der AS-ODN Aufnahme in hPSC mittels Dosper Transfektionsreagenz

Bei Verwendung des Transfektionsreagenz Dosper erfolgt innerhalb der ersten 8-12h, bei AS III bis 16h nach Transfektion die maximale Aufnahme der ODN in die Zelle, bevor es zu einem progredienten Abfall der Fluoreszenzsignale kommt.

Bei AS I kann von einer optimalen Inkubationszeit von 8 bis 12h ausgegangen werden.

Bei AS II wurde die maximale Fluoreszenz innerhalb der ersten 2h nach Transfektion beobachtet. Danach kam es zu einem progredienten Abfall der zellassoziierten Fluoreszenz, ca. 50% des maximalen Wertes wurden im Zeitraum von 4 bis 8h nach Transfektion beobachtet.

AS III erreichte ca. 50% der maximalen Fluoreszenz innerhalb der ersten 2h, mit einem Maximum zwischen 12 und 16h nach Transfektion.

2. Kinetik der AS-ODN Aufnahme in hPSC mittels FuGene6 Transfektionsreagenz

Die maximale ODN Aufnahme in die Zelle bei Verwendung des FuGene6 Transfektionsreagenz erfolgt zwischen 8 bis 12h nach Transfektion.

Bei AS I kommt es innerhalb der ersten 8h zu einem progredienten Anstieg der Fluoreszenzsignale. Während der folgenden 16h erfolgt die intrazelluläre ODN Aufnahme in einem deutlich geringeren Ausmaß, so dass von einer ausreichenden Inkubationszeit von 4-8h ausgegangen werden kann.

AS II wurde aufgrund der in den Vorversuchen festgestellten insuffizienten Transfektion nicht in die Versuchsreihe mit eingeschlossen.

Bei AS III kann nach 8h Inkubationszeit eine maximale Fluoreszenz gemessen werden, wonach es zu einem progredienten Abfall des Signales kommt.

3. Kinetik der AS-ODN Aufnahme in hPSC mittels Superfect Transfektionsreagenz

Die Kinetik der Transfektion von hPSC mittels Superfect zeigt ein sehr heterogenes Bild: während AS I eine maximale zellassoziierte Fluoreszenz bei 12h nach Transfektion erfährt,

wird ein maximales Signal bei AS II bereits innerhalb der ersten 30min nach Transfektion erreicht mit nachfolgend progredientem Abfall des Fluoreszenzsignals und einem 50% Wert bei 8h.
AS III zeigt wiederum eine erste maximale ODN Aufnahme nach 2h und nachfolgend progredientem Anstieg der Fluoreszenzsignale innerhalb des Messzeitraumes um maximal 28% des 2 Stundenwertes.

Zusammenfassend kann von einer optimalen ODN Aufnahme in hPSC im Zeitraum von 6-12h nach Transfektion ausgegangen werden. Die Kinetik von AS-ODN II mit maximalen Werten innerhalb der ersten 2h und danach progredientem Abfall der Fluoreszenzsignale spricht für eine rasche Inaktivierung und Abbau des AS II in der Zelle. Ursächlich hierfür könnte sein, dass hPSC nicht mit AS II zu transfizieren sind. Hierfür spricht auch die fehlende Signaldetektion bei Transfektion mit FuGene6.

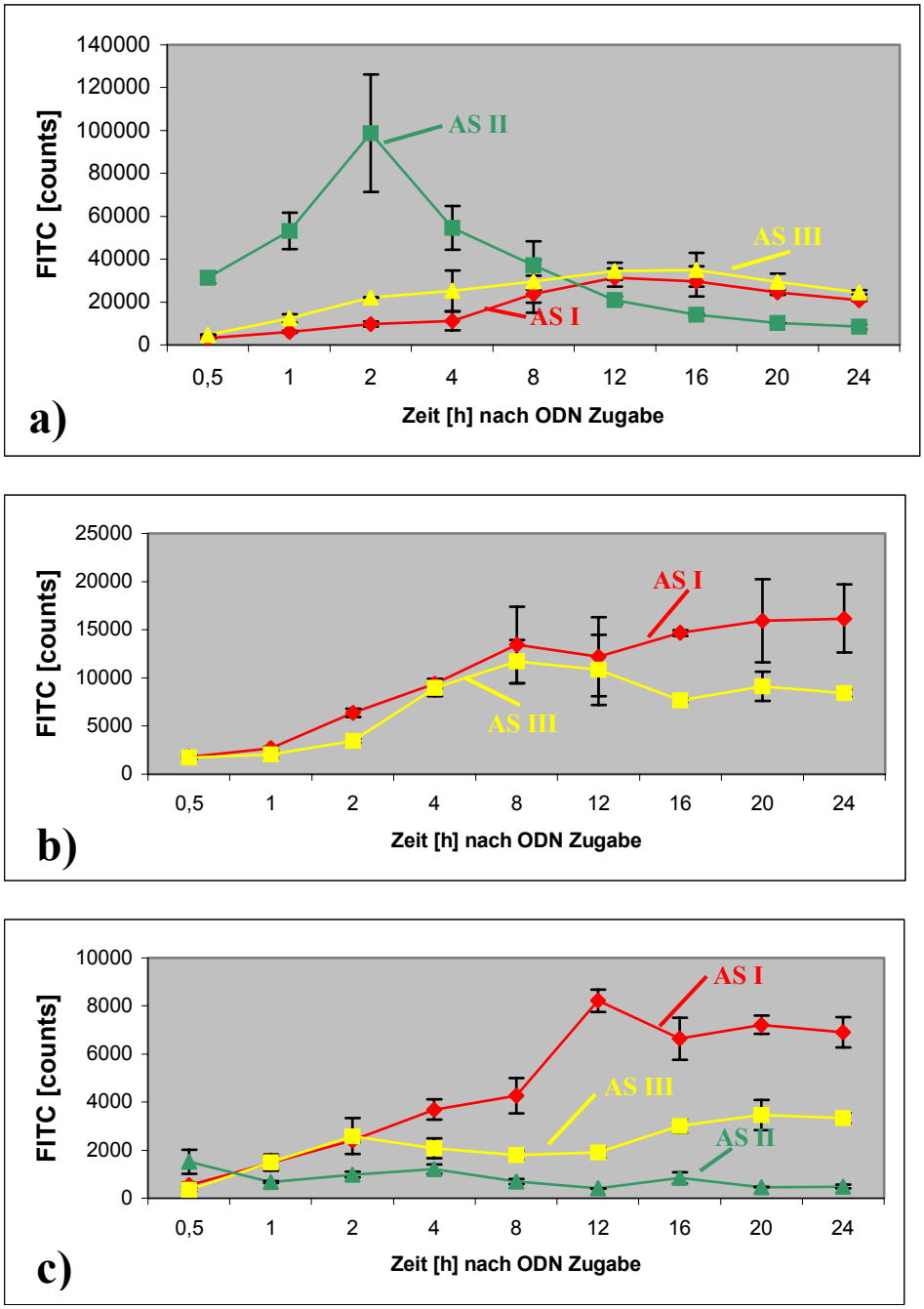


Abb. 24 a/b/c:
Kinetik der ODN Aufnahme in humane pankreatische Sternzellen mittels Transfektion durch das Transfektionsreagenz a) Dosper b) FuGene6 c) Superfect.
Die Fluoreszenzsignale (FITC) wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt.

4. Kinetik der AS-ODN Aufnahme in rPSC mittels Dosper Transfektionsreagenz

Bereits innerhalb der ersten 2h werden bis zu 86% des AS I ODN in die Zelle aufgenommen. In den folgenden 6h erfolgt ein langsamer progredienter Anstieg der zellassoziierten Fluoreszenz bis zu einer maximalen ODN Aufnahme bei 8h. Die späteren Zeitpunkte zeigen einen langsamen Abfall der Fluoreszenzsignale mit fortschreitender Zeit.

Eine analoge Kinetik zeigt AS II mit einer maximalen zellassoziierten Fluoreszenz innerhalb der ersten 2h nach Transfektion und nachfolgend progredientem Fluoreszenzverlust. Nach 8h können noch 84% maximalen Fluoreszenz gemessen werden.
76% der AS III ODN werden innerhalb der ersten 2h in die Zelle aufgenommen. Ein progredienter Anstieg der Fluoreszenzsignale ist bis 8h nach Transfektion nachweisbar, bevor es zu einer allmählichen Signalverminderung kommt.

5. Kinetik zur AS Aufnahme in rPSC durch FuGene6 Transfektionsreagenz

AS I wird nach Transfektion progredient bis zu einem Maximum bei 16h in die Zelle aufgenommen.
AS II wurde aufgrund der in den Vorversuchen festgestellten insuffizienten Transfektion nicht in die Versuchsreihe mit eingeschlossen.
Analog AS I wird AS III progredient bis zu einem Maximalwert bei 16h aufgenommen, wonach es zu einer langsamen Abnahme der Fluoreszenzsignale kommt.

6. Kinetik zur Aufnahme der AS-ODN in rPSC mittels Superfect Transfektionsreagenz

Bei AS I kann eine progrediente Fluoreszenzsignalzunahme bis zu einem Zeitpunkt von 20h nach Transfektion beobachtet werden. 58 % der AS-ODN werden innerhalb der ersten 12h nach Transfektion in die Zelle aufgenommen.
AS II zeigt eine maximale ODN Aufnahme innerhalb der ersten 2h nach Transfektion, wonach es zu einem progredienten Fluoreszenzverlust kommt. Nach 8h kann noch 63% der zellassoziierten Fluoreszenz nachgewiesen werden.
Die Kinetik des AS III ODN verläuft analog AS I, mit einem progredienten Anstieg der Fluoreszenzsignale bis zu einem Zeitpunkt von 20h nach Transfektion. Nach 12h kann bereits 80% der Gesamtfluoreszenz der Zellen gemessen werden.

Zusammenfassend kann von einer optimalen ODN Aufnahme in rPSC im Zeitraum von 6-16h nach Transfektion ausgegangen werden. Die Kinetik von AS-ODN II mit maximalen Werten innerhalb der ersten 2h und danach progredientem Abfall der Fluoreszenzsignale spricht für eine rasche Inaktivierung und Abbau des AS II in der Zelle. Ursächlich hierfür könnte sein, dass rPSC nicht mit AS II transfizierbar sind. Hierfür spricht auch die fehlende Signaldetektion bei Transfektion mit FuGene6.

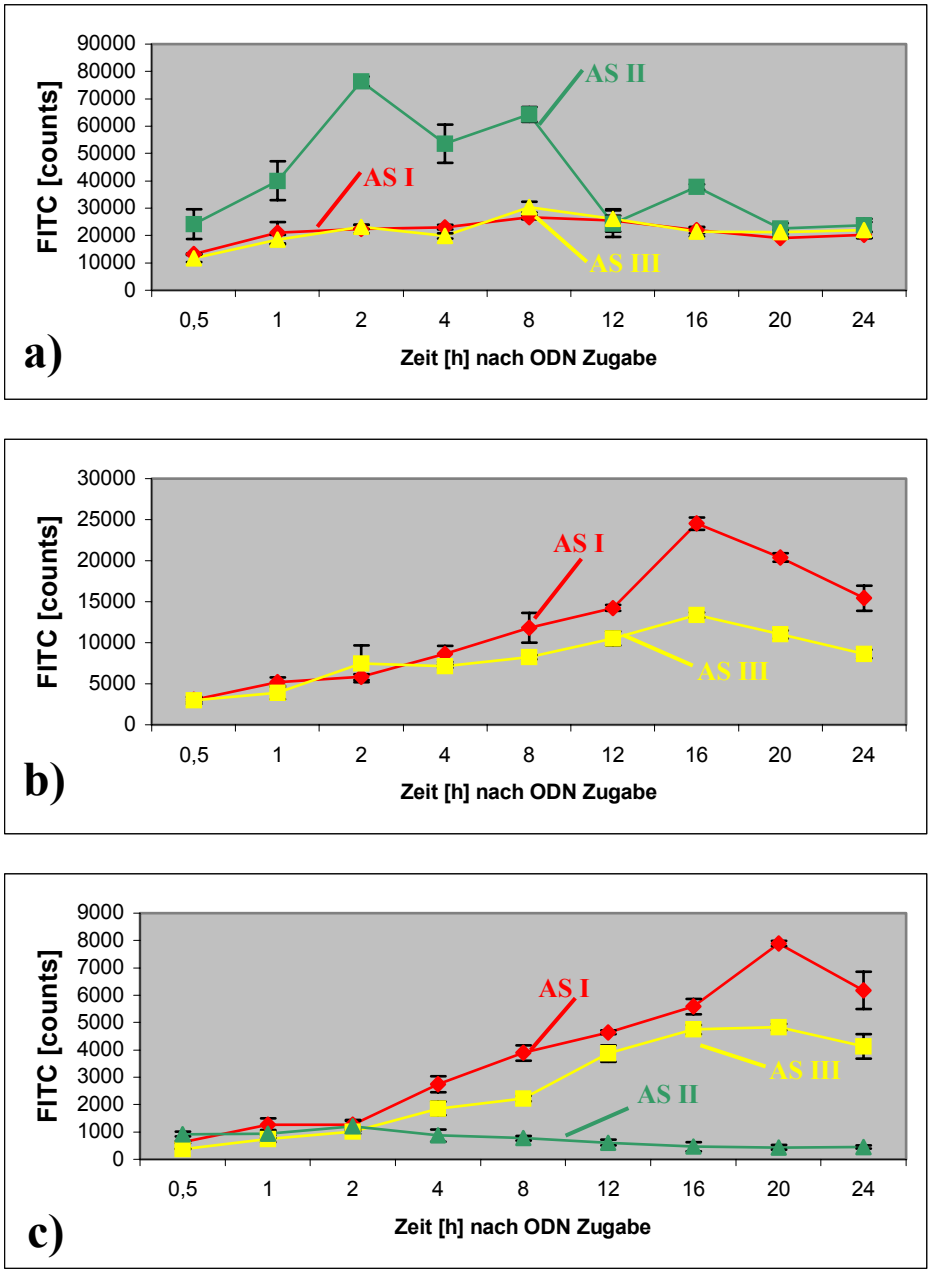


Abb. 25 a/b/c: Kinetik der ODN-Aufnahme in pan-kreatische Sternzellen der Ratte mittels Transfektion durch die Transfektionsreagenzien a) Dosper , b) FuGene6, c) Superfect
Die Fluoreszenzsignale (FITC) wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt.

IV.6 Vergleich verschiedener Zelllyseansätze

Triton ist ein nicht-ionisches Tensid, das häufig zur Gewinnung von Membrankomponenten verwendet wird. Es löst Membranproteine auf, ohne denaturierend zu wirken. Bereits eine 0,1%ige Triton Lösung in Wasser kann Zellen lysieren.

Das Experiment soll das Ausmaß der in Lysosomen und anderen Zellkompartimenten mit niedrigem pH Wert gelangten fluoreszeinmarkierten ODN bestimmen. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da in der Literatur von einer veränderten Emissionsintensität des FITC in Abhängigkeit vom pH Wert ausgegangen wird und dies eine exakte Quantifizierung der FITC-markierten ODN-Aufnahme erschwert. Insofern besteht die Gefahr, dass in Zellkompartimenten mit niedrigem pH Wert wie in Lysosomen die Menge

an intrazellulären FITC-markierten ODN als zu gering bestimmt wird. In diesem Versuch sollte einerseits die Auswirkung verschiedener Möglichkeiten der Zelllyse auf die Messung der Fluoreszenz durch Lyse aller Membrankomponenten der Zelle und damit Freisetzung der ODN aus den Zellkompartimenten mittels Triton-Behandlung der Zellen im Vergleich zur Lyse mit H_2O dest. oder HEPES bestimmt werden. Andererseits sollte die Auswirkung des Lysezeitpunktes auf die gemessenen Fluoreszenzsignale gemessen werden. Die Messungen erfolgten jeweils 30min als auch 24h nach Zelllyse.

IV.6.1 Vergleich der mit Wasser, HEPES oder Triton lysierten Zellen

1. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit FITC-markierten AS I ODN und den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect mit nachfolgender Lyse durch H_2Odest., HEPES oder Triton

Bei der Transfektion der Sternzellen mit AS I und Dosper Transfektionsreagenz konnte sowohl bei der Lyse nach 30min als auch nach 24h kein signifikanter Unterschied bei der Lyse durch Wasser oder Triton festgestellt werden.

Bei der Transfektion mit Superfect Transfektionsreagenz zeigten sich signifikante Unterschiede in der Fluoreszenz sowohl bei der ersten als auch späteren Messung. Interessanterweise lagen die Fluoreszenzsignale der mit H_2Odest. lysierten Zellen um das 6,7fache (1.Messung) bzw. 10,5fache (2.Messung) höher als die mittels HEPES oder Triton lysierten Zellen. Einen signifikanten Unterschied zwischen den durch HEPES oder Triton lysierten Zellen gab es nicht.

Bei der Transfektion mit FuGene6 Transfektionsreagenz zeigte sich wiederum kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenz bei Lyse durch H_2O oder Triton, unabhängig von dem Messzeitpunkt.

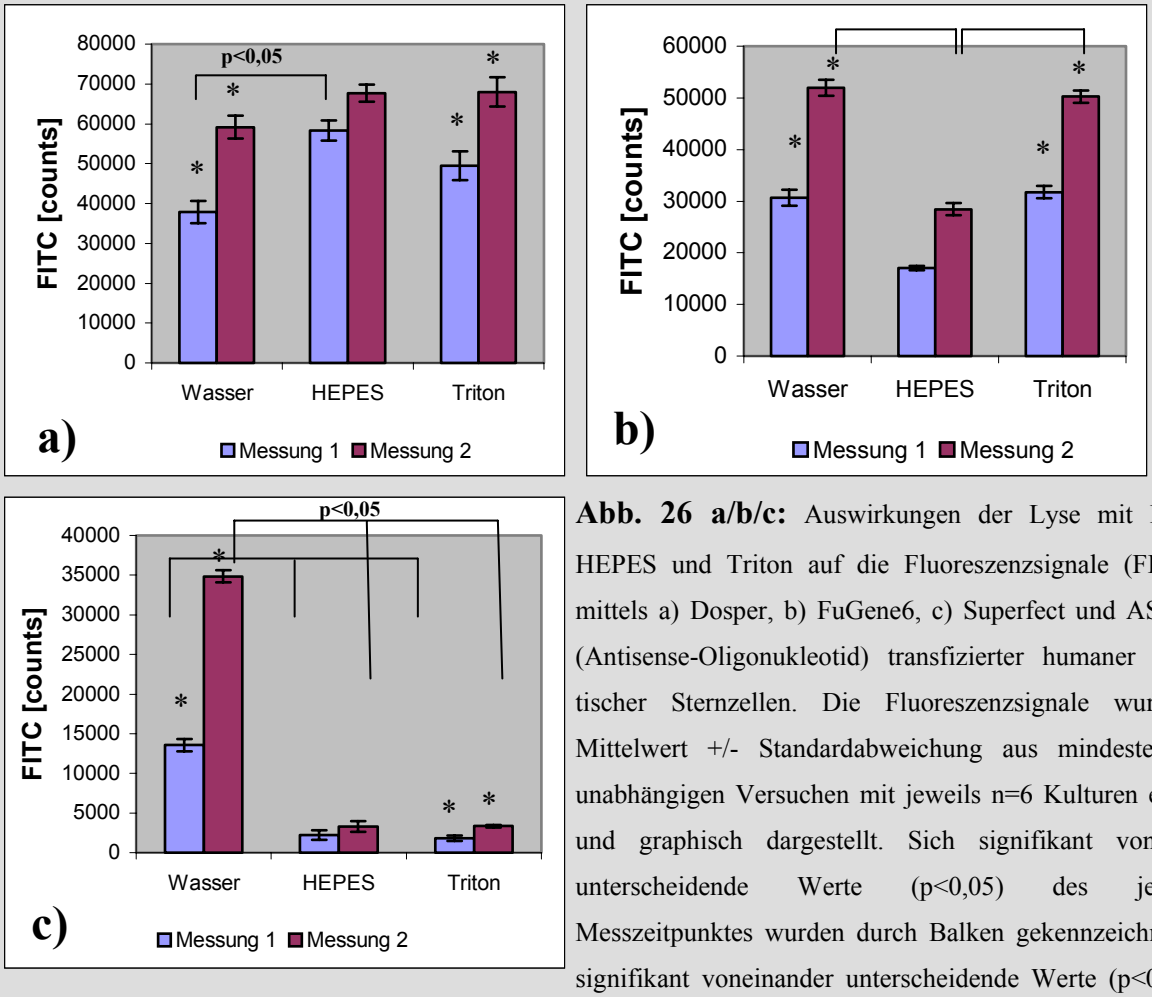


Abb. 26 a/b/c: Auswirkungen der Lyse mit H_20dest., HEPES und Triton auf die Fluoreszenzsignale (FITC) der mittels a) Dosper, b) FuGene6, c) Superfect und AS I ODN (Antisense-Oligonukleotid) transfizierter humaner pankreatischer Sternzellen. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) des jeweiligen Messzeitpunktes wurden durch Balken gekennzeichnet. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) der ersten vom zweiten Messzeitpunktes wurden mit * markiert.

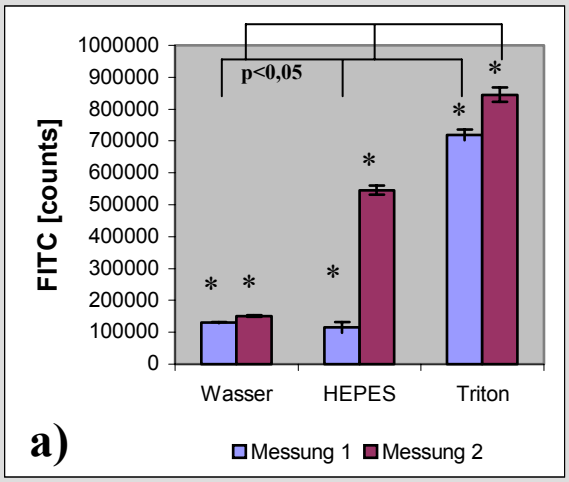
2. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit FITC-markierten AS II ODN und den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect mit nachfolgender Lyse durch H_2Odest., HEPES oder Triton

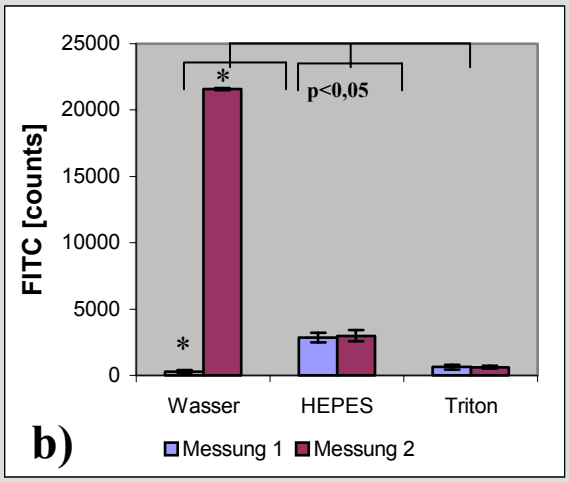
Bei Transfektion der Sternzellen mit AS II und Dosper Transfektionsreagenz zeigte sich bei der Lyse nach 30min als auch nach 24h ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lyse mittels H_2O oder Triton. Bei den durch Triton lysierten Zellen konnten um das 5,5fache (Messung 1 und 2) höhere Fluoreszenzsignale gemessen werden.

Bei der Transfektion mit Superfect Transfektionsreagenz zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Lyse mittels H_2O oder Triton. Nicht signifikant waren die Unterschiede bei der Lyse zwischen HEPES und Triton. Hier lagen die Fluoreszenzsignale der mittels H_2O lysierten Zellen um das 19,9fache (1.Messung) bzw. 16fache (2.Messung) höher als die der durch Triton lysierten Zellen.

Bei Transfektion mit FuGene6 Transfektionsreagenz zeigte die initiale Messung keine signifikanten Unterschiede bei der Lyse mittels H_2O oder Triton. Nach 24h jedoch zeigten

die mit H_2O lysierten Zellen eine signifikante, 35fach höhere Fluoreszenz als die mit Triton lysierten Zellen.





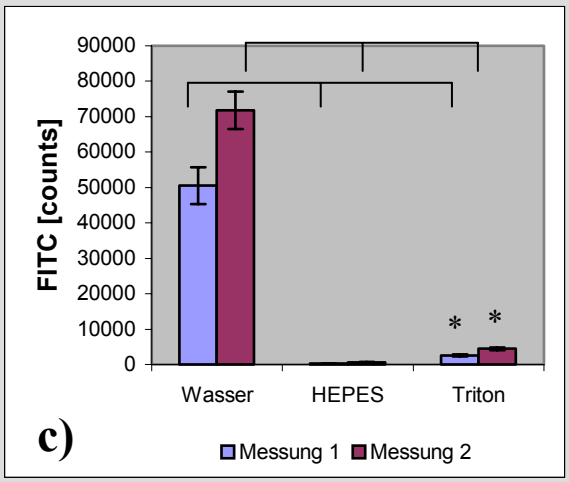


Abb. 27 a/b/c: Auswirkungen der Lyse mit $H_2$0dest., HEPES und Triton auf die Fluoreszenzsignale (FITC) mittels a) Dosper, b) FuGene6, c) Superfect und AS II ODN (Antisense-Oligonukleotid) transfizierter humaner pankreatischer Sternzellen. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) des jeweiligen Messzeitpunktes wurden durch Balken gekennzeichnet. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) der ersten vom zweiten Messzeitpunktes wurden mit * markiert.

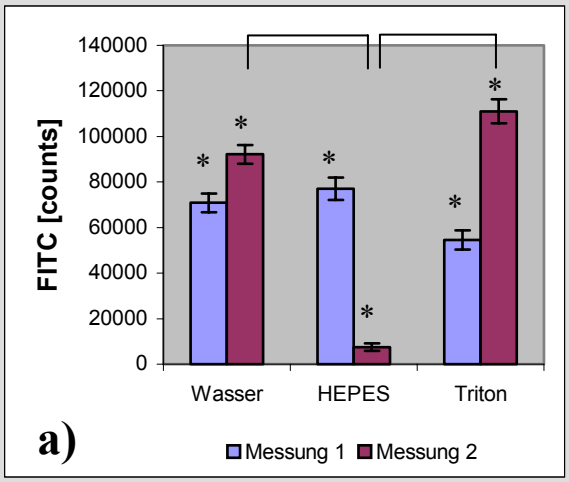
3. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit FITC-markierten AS-ODN III und den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect mit nachfolgender Lyse durch H_2Odest., HEPES oder Triton

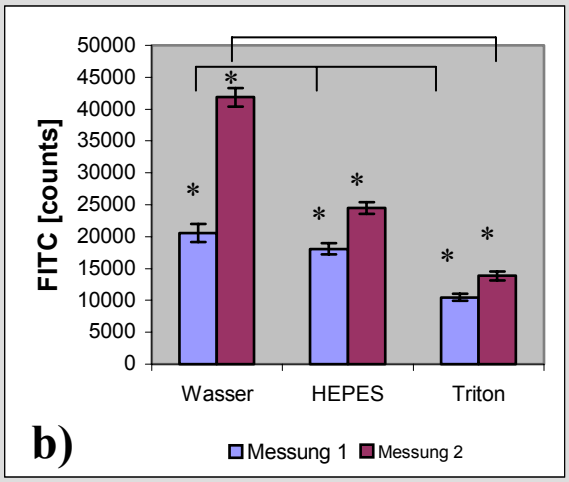
Bei Transfektion der Sternzellen mit AS III und Dosper Transfektionsreagenz zeigte sowohl die erste als auch 2. Messung keine signifikanten Unterschiede bei der Lyse mittels H_2O oder Triton.

Bei Transfektion mit Superfect Transfektionsreagenz zeigte sich nach 30min ein signifikanter Unterschied bei Lyse der Zellen mittels H_2O oder Triton, der nach 24h nicht mehr nachweisbar war. Auch hier waren bei Lyse mit H_2O die Fluoreszenzsignale um das 3,2fache bzw. 1,5fache höher als bei der Lyse mit Triton.

Unter FuGene6 Transfektionsreagenz zeigte sich bei Lyse sowohl nach 30min als auch 24h ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lyse mittels H_2O oder Triton. Bei Lyse mit

H_2O waren die Fluoreszenzsignale um das 1,9fache nach 30min bzw. 3fache nach 24h höher als bei der Lyse mit Triton.





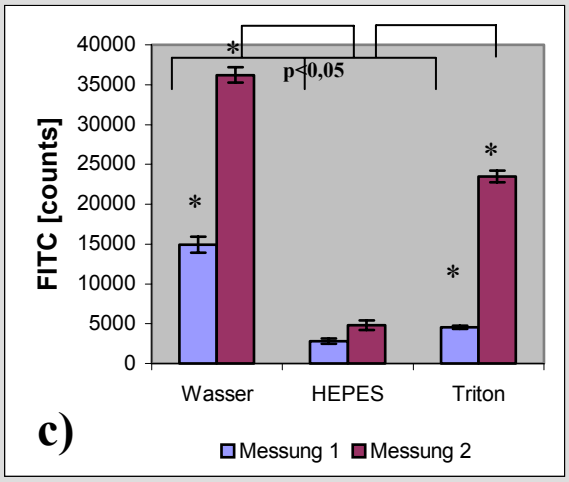


Abb. 28 a/b/c: Auswirkungen der Lyse mit H_20dest., HEPES und Triton auf die Fluoreszenzsignale (FITC) mittels a) Dosper, b) FuGene6, c) Superfect und AS III ODN (Antisense-Oligonukleotid) transfizierter humaner pankreatischer Sternzellen. Die Fluoreszenzsignale wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen errechnet und graphisch dargestellt. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) des jeweiligen Messzeitpunktes wurden durch Balken gekennzeichnet. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) der ersten vom zweiten Messzeitpunktes wurden mit * markiert.

III.6.2 Vergleich der Messzeitpunkte in Abhängigkeit von fluoreszenzmarkiertem AS-ODN und Transfektionsreagenz

1. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit FITC-markierten AS I ODN und den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect mit nachfolgender Lyse durch H_2Odest., HEPES oder Triton

Die mittels H_2O und Triton lysierten Zellen zeigten einen signifikanten Unterschied mit höheren Messwerten bei der Messung nach 24h.

Nicht signifikant war der Unterschied der ersten und zweiten Messung der mittels HEPES lysierten Zellen.

2. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit FITC-markierten AS II ODN und den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect mit nachfolgender Lyse durch H_2Odest., HEPES oder Triton

Die mittels H_2O lysierten Zellen zeigten mit Ausnahme der mit Superfect transfizierten Zellen signifikant höhere Fluoreszenzsignale bei Messung nach 24h. Signifikant waren auch die Unterschiede bei Lyse mit Triton, ausgenommen der mittels FuGene6 transfizierten Zellen.

3. Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit FITC-markierten AS III ODN und den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect mit nachfolgender Lyse durch H_2Odest., HEPES oder Triton

Die mittels H_2O und Triton lysierten Zellen zeigten einen signifikanten Unterschied mit höheren Messwerten bei der Messung nach 24h. Analog hierzu waren die Ergebnisse bei den mit HEPES lysierten Zellen, wobei die durch Superfect transfizierten Zellen eine Ausnahme mit nicht signifikanter Fluoreszenzzunahme bei Messung nach 24h zeigten.

IV.7 Färbung von PSC mit FITC markierten AS-ODN

Humane pankreatische Sternzellen und die der Ratte wurden mit den AS-ODN I, II und III vermittels der Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect nach oben beschriebener Vorgehensweise transfiziert und für 6h inkubiert. Nach Fixierung der Zellen konnten im Fluoreszenzmikroskop bei Transfektion mit Dosper und Superfect Transfektionsreagenz perinukleäre distinkte Anreicherungen gesehen werden, die durch ihre Lokalisation und Form am ehesten FITC markieren ODN entsprechen, die sich in Zellkompartimenten befinden. Zusätzlich konnte ein leichter homogener Fluoreszenzschleier im Zytosol der Zellen gesehen werden, der die Zelle diskret vom Untergrund abhob. Dies entspricht am ehesten ins Zytosol freigesetzten FITC markierten ODN. Auch innerhalb des Zellkerns konnten distinkte FITC angereicherte Bereiche gesehen werden, die bei Anfärbung des Zellkerns mit Bisbenzimidazol eine Unterscheidung von zytosolischen und nukleären Anreicherungen erlaubt. Insbesondere bei Untersuchung der mit Dosper und AS III transfizierten Zellen, das an die Promotorregion des TGFβ1 Genes bindet, konnte eine deutliche intranukleäre Anreicherung der Fluoreszenz gesehen werden, die sowohl distinkte Bereiche als auch eine homogene Färbung des Zellkerns begreift.

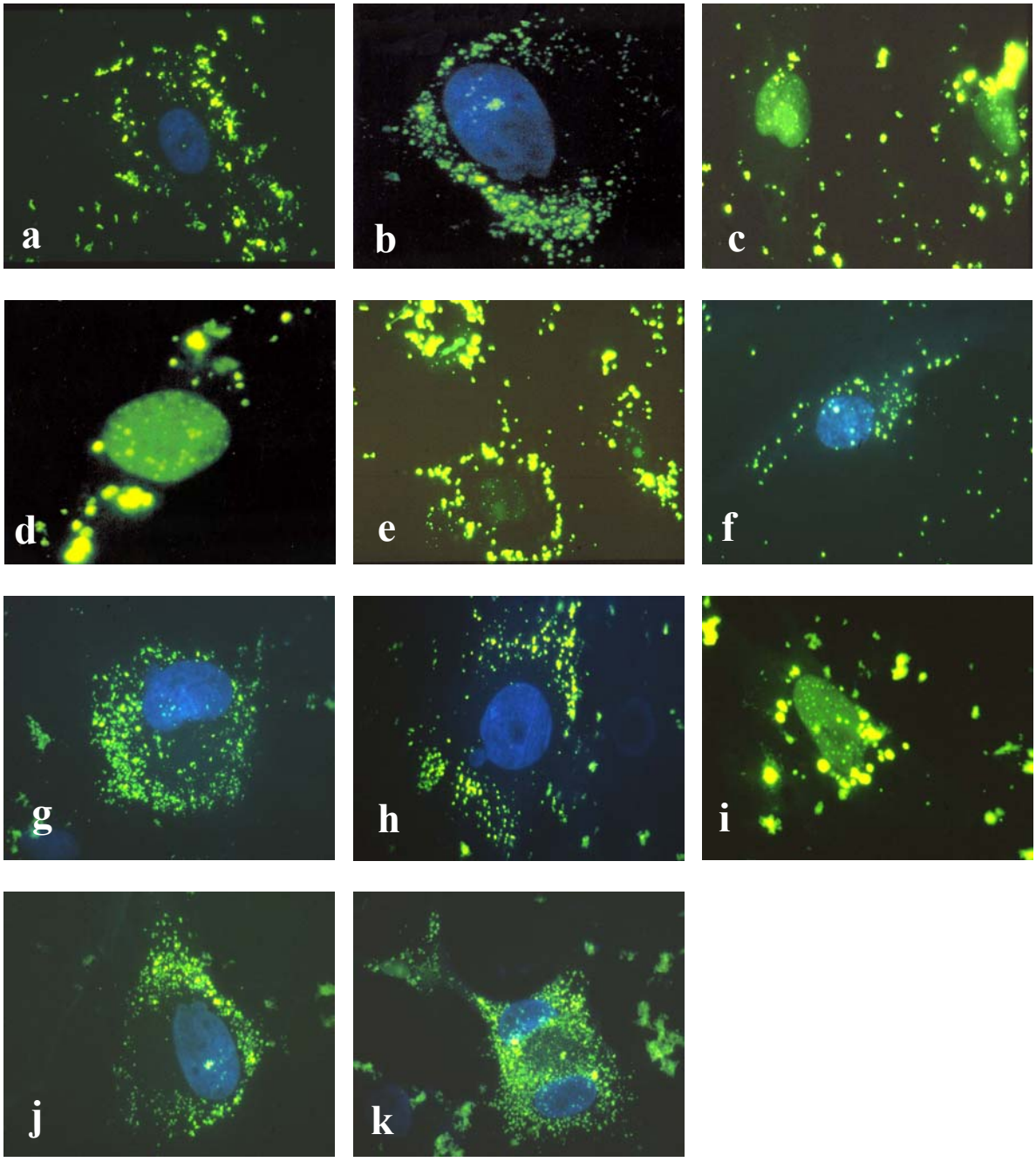


Abb. 29: Färbungen von pankreatischen Sternzellen mit FITC-markierten AS-ODN

a: hPSC Dosper AS I

b/c: hPSC Dosper AS II

d: hPSC Dosper AS III

e: hPSC Superfect AS I

f: hPSC Superfect AS II

g: rPSC Dosper AS I

h/i: rPSC Dosper AS II

j: rPSC Superfect AS I

k: rPSC Superfect AS II

IV.8 Transfektionseffizienz nach Transfektion mit optimierten Konzentrationen

IV.8.1 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Transfektionsreagenz

Um das optimale Transfektionsreagenz für das jeweilige AS-ODN bestimmen zu können, wurden die Werte, die unter optimierten Bedingungen ermittelt wurden, gegenübergestellt:
Unter optimierten Bedingungen ergaben die Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit 5µg/ml Dosper und 5µl/ml FuGene6 Transfektionsreagenz und jeweils 5µg/ml AS-ODN I bzw. 2µg/ml Superfect Transfektionsreagenz und 2µg/ml AS-ODN I die beste Transfektionseffizienz mit Dosper (34093 (+/-1316) counts), gefolgt von FuGene6 (9781 (+/-1069) counts) Transfektionsreagenz für AS I.
Bei AS II konnten ebenfalls deutlich höhere Fluoreszenzsignale bei Transfektion mit Dosper (5µg/ml Dosper:5µg/ml AS II, 54811 (+/-4160) counts) als bei Transfektion mit Superfect (2µg/ml Superfect:1µg/ml AS II, 517 (+/-93) counts) gemessen werden. Da mit FuGene6 keine Fluoreszenzsignale im Vergleich zur Kontrolle mit 0,1% FKS gemessen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass im Rahmen der Messmöglichkeit keine effektive Transfektion stattfand.
Auch AS III konnte am besten mit Dosper (5µg/ml Dosper:5µg/ml AS III, 28441 (+/-3569) counts) im Vergleich zu FuGene6 (5µl/ml FuGene6:5µg/ml AS III, 9518 (+/-681) counts) oder Superfect (2µg/ml Superfect:2µg/ml AS III, 1617 (+/-136) counts) transfiziert werden.
Zusammengefasst lassen sich AS I, II und III bei hPSC am effektivsten mit Dosper transfizieren.

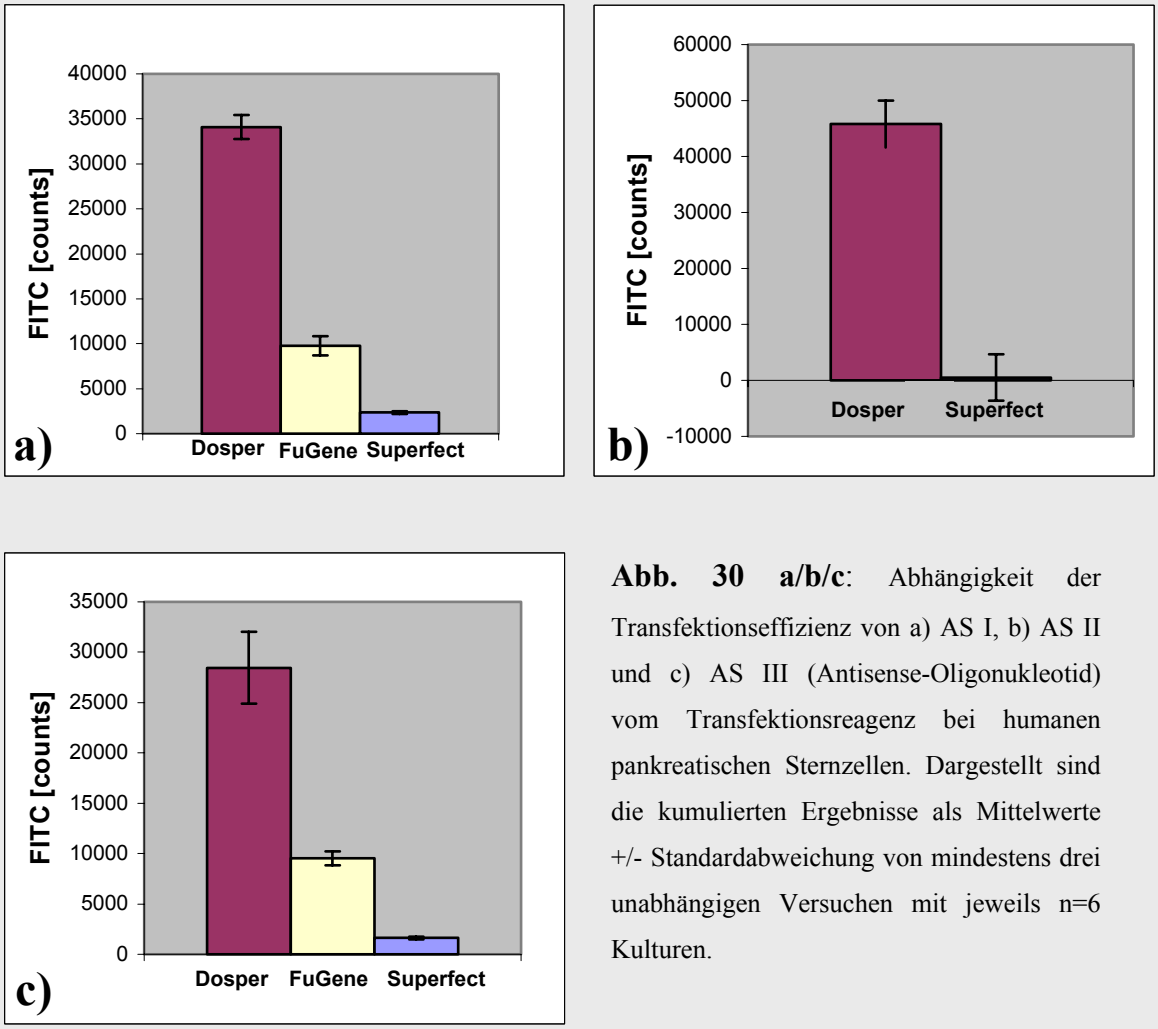


Abb. 30 a/b/c: Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von a) AS I, b) AS II und c) AS III (Antisense-Oligonukleotid) vom Transfektionsreagenz bei humanen pankreatischen Sternzellen. Dargestellt sind die kumulierten Ergebnisse als Mittelwerte +/- Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen.

Bei der optimierten Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit 2,5µg/ml Dosper und 5µl/ml FuGene6 Transfektionsreagenz und jeweils 5µg/ml AS-ODN I bzw. 2µg/ml Superfect Transfektionsreagenz und 2µg/ml AS-ODN I konnte die beste Transfektion-seffizienz mit FuGene6 (16051 (+/-532) counts), gefolgt von Dosper (11778 (+/-1911) counts) Transfektionsreagenz für AS I gemessen werden.

Bei AS II konnten deutlich höhere Fluoreszenzsignale bei Transfektion mit Dosper (10µg/ml Dosper:5µg/ml AS II, 37229 (+/-895) counts) als bei Transfektion mit Superfect (2µg/ml Superfect:2µg/ml AS II, 1735 (+/-862) counts) gemessen werden. Da mit FuGene6 keine Fluoreszenzsignale im Vergleich zur Kontrolle mit 0,1% FKS gemessen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass im Rahmen der Messmöglichkeit keine effektive Transfektion stattfand.

AS III konnte am besten mit FuGene6 (5µl/ml FuGene6:5µg/ml AS III, 23470 (+/-2779) counts) im Vergleich zu Dosper (5µg/ml Dosper:2,5µg/ml AS III, 13608 (+/-1694) counts)

oder Superfect (2µg/ml Superfect:2µg/ml AS III, 2376 (+/-1122) counts) transfiziert werden.

Zusammengefasst lassen sich AS I und III bei rPSC am effektivsten mit FuGene6, AS II mit Dosper transfizieren.

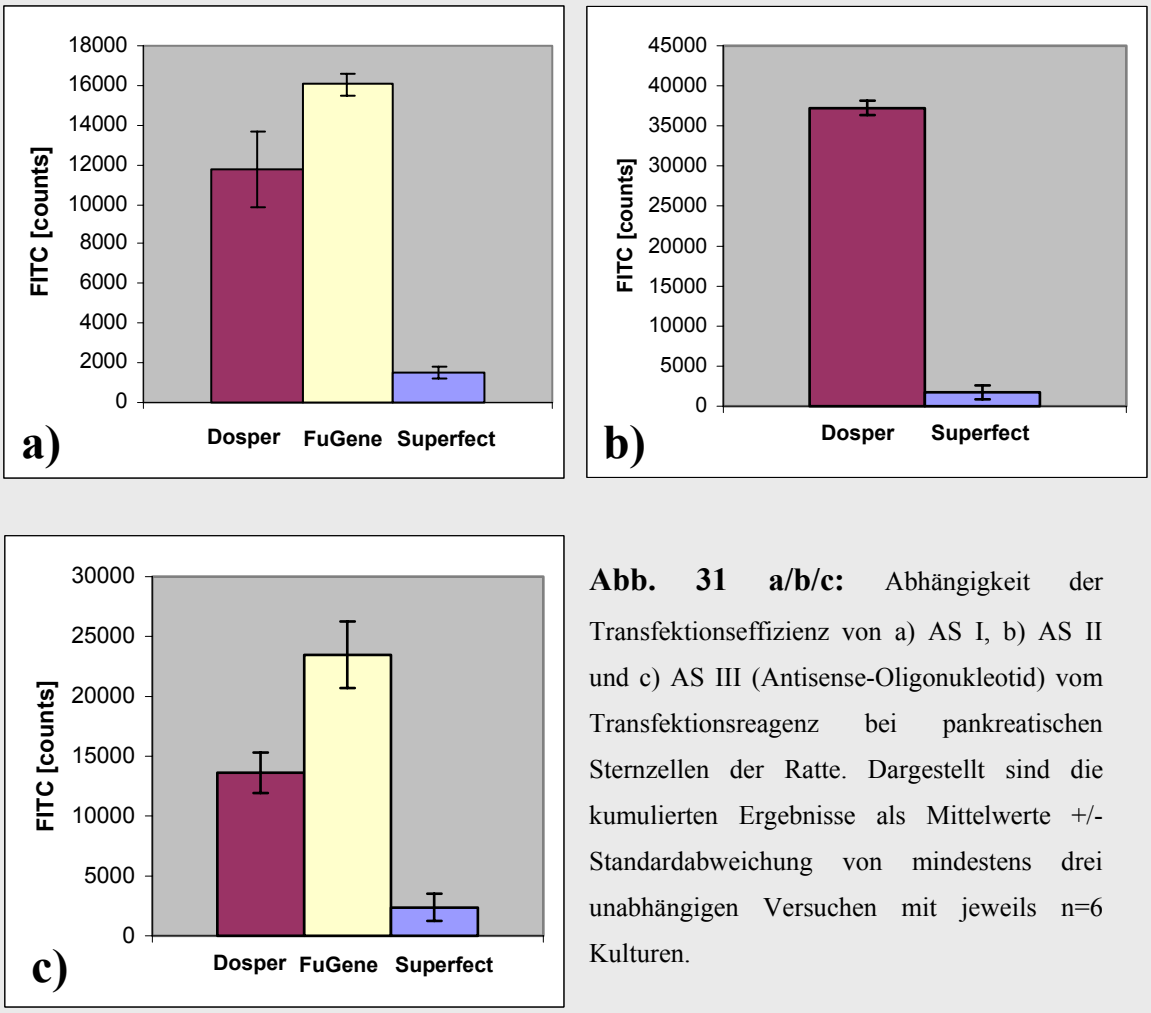


Abb. 31 a/b/c: Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von a) AS I, b) AS II und c) AS III (Antisense-Oligonukleotid) vom Transfektionsreagenz bei pankreatischen Sternzellen der Ratte. Dargestellt sind die kumulierten Ergebnisse als Mittelwerte +/- Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen.

IV.8.2 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom verwendeten ODN

Um Aussagen über die Menge des in die Zellen gelangten ODN treffen zu können, wurden die unter optimierten Bedingungen ermittelten Werte gegenübergestellt.

Unter optimierten Bedingungen konnten bei der Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit 5µg/ml Dosper Transfektionsreagenz und jeweils 5µg/ml AS-ODN I, II und III für AS II die höchsten FITC count Werte ermittelt werden (45811(+/-4160) counts), gefolgt von AS I (34093 (+/-1317) counts) und AS III (28441(+/-3569) counts).

Bei Transfektion mit FuGene6 Transfektionsreagenz (jeweils im Verhältnis von 5µl/ml FuGene6:5µg/ml ASI und III) konnten höhere Werte bei Transfektion mit AS I (9781 (+/-1069) counts) im Vergleich zu AS III (9518 (+/-681) counts) gesehen werden. Da mit der

Kombination von FuGene6 und AS II keine Fluoreszenzsignale im Vergleich zur Kontrolle mit 0,1% FKS gemessen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass im Rahmen der Messmöglichkeit keine effektive Transfektion stattfand.

Bei Transfektion mit Superfect (jeweils 2µg/ml Superfect und 2µg/ml AS I und AS III, 1µg/ml AS II) konnte mit AS I (2368 (+/-150) counts) am effektivsten transfiziert werden, gefolgt von AS III (1617 (+/-136) counts) und schließlich AS II (517 (+/-93) counts).

Zusammengefasst konnten hPSC bei Verwendung von Dosper Transfektionsreagenz am effektivsten transfiziert werden.

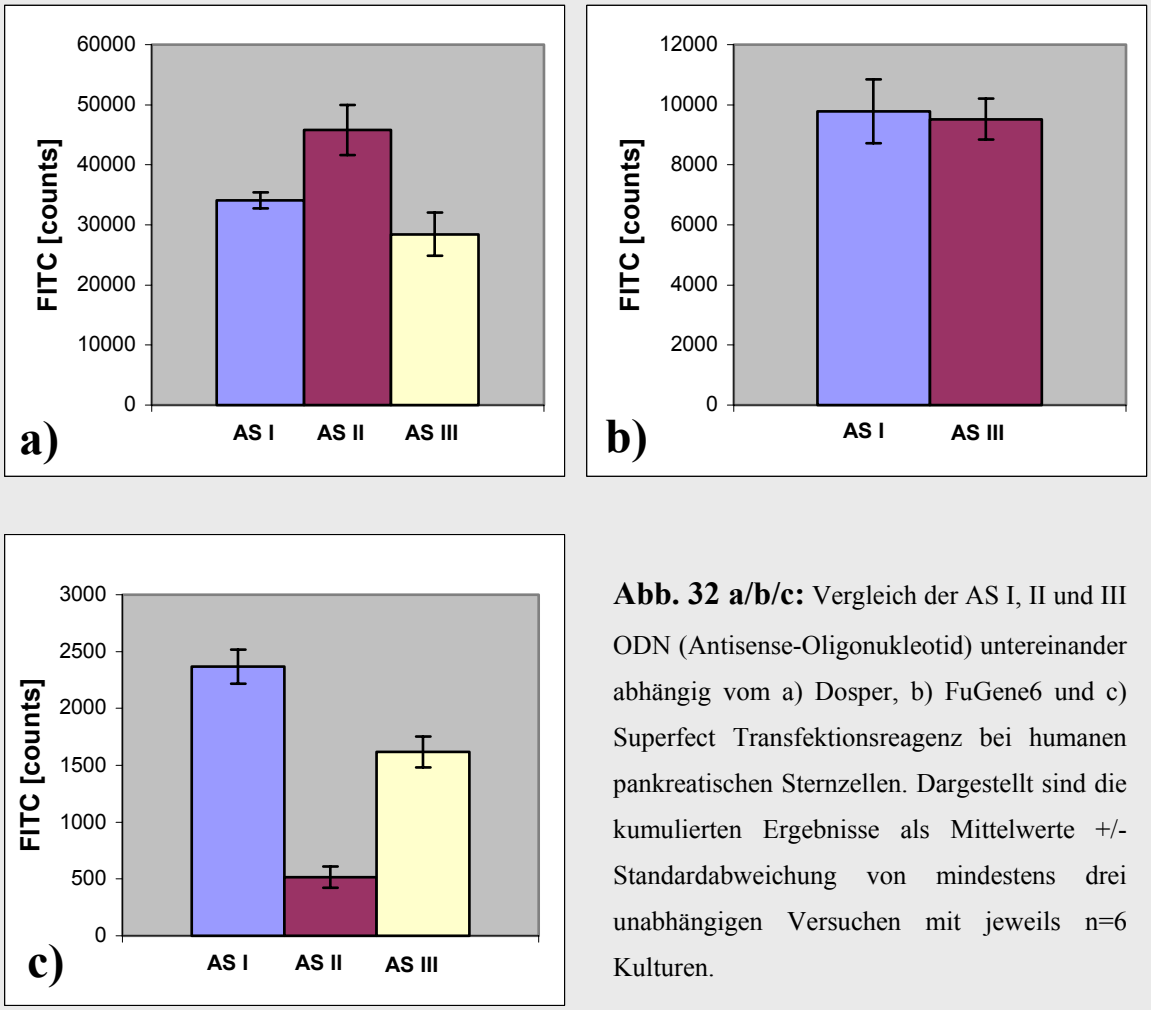


Abb. 32 a/b/c: Vergleich der AS I, II und III ODN (Antisense-Oligonukleotid) untereinander abhängig vom a) Dosper, b) FuGene6 und c) Superfect Transfektionsreagenz bei humanen pankreatischen Sternzellen. Dargestellt sind die kumulierten Ergebnisse als Mittelwerte +/- Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen.

Bei der Transfektion pankreatischer Sternzellen der Ratte mit 2,5µg/ml Dosper Transfektionsreagenz und jeweils 5µg/ml AS-ODN I und III, bzw. 5µg/ml Dosper und 10µg/ml AS II konnten für AS II die höchsten FITC count Werte ermittelt werden (37229(+/-895) counts), gefolgt von AS III (13608 (+/-1694) counts) und AS I (11778(+/-1911) counts).

Bei Transfektion mit FuGene6 Transfektionsreagenz (jeweils im Verhältnis von 5µl/ml FuGene6:5µg/ml ASI und III) konnten höhere Werte bei Transfektion mit AS III (23470

(+/-2779) counts) im Vergleich zu AS I (16051 (+/-532) counts) gesehen werden. Da mit der Kombination von FuGene6 und AS II keine Fluoreszenzsignale im Vergleich zur Kontrolle mit 0,1% FKS gemessen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass im Rahmen der Messmöglichkeit keine effektive Transfektion stattfand.

Bei Transfektion mit Superfect (jeweils 2µg/ml Superfect und 2µg/ml AS I, AS II und AS III) konnte mit AS III (2376 (+/-1122) counts) am effektivsten transfiziert werden, gefolgt von AS II (1735 (+/-862) counts) und schließlich AS I (1490 (+/-276) counts).

Zusammengefasst konnten rPSC bei Verwendung von Dosper Transfektionsreagenz am effektivsten transfiziert werden.

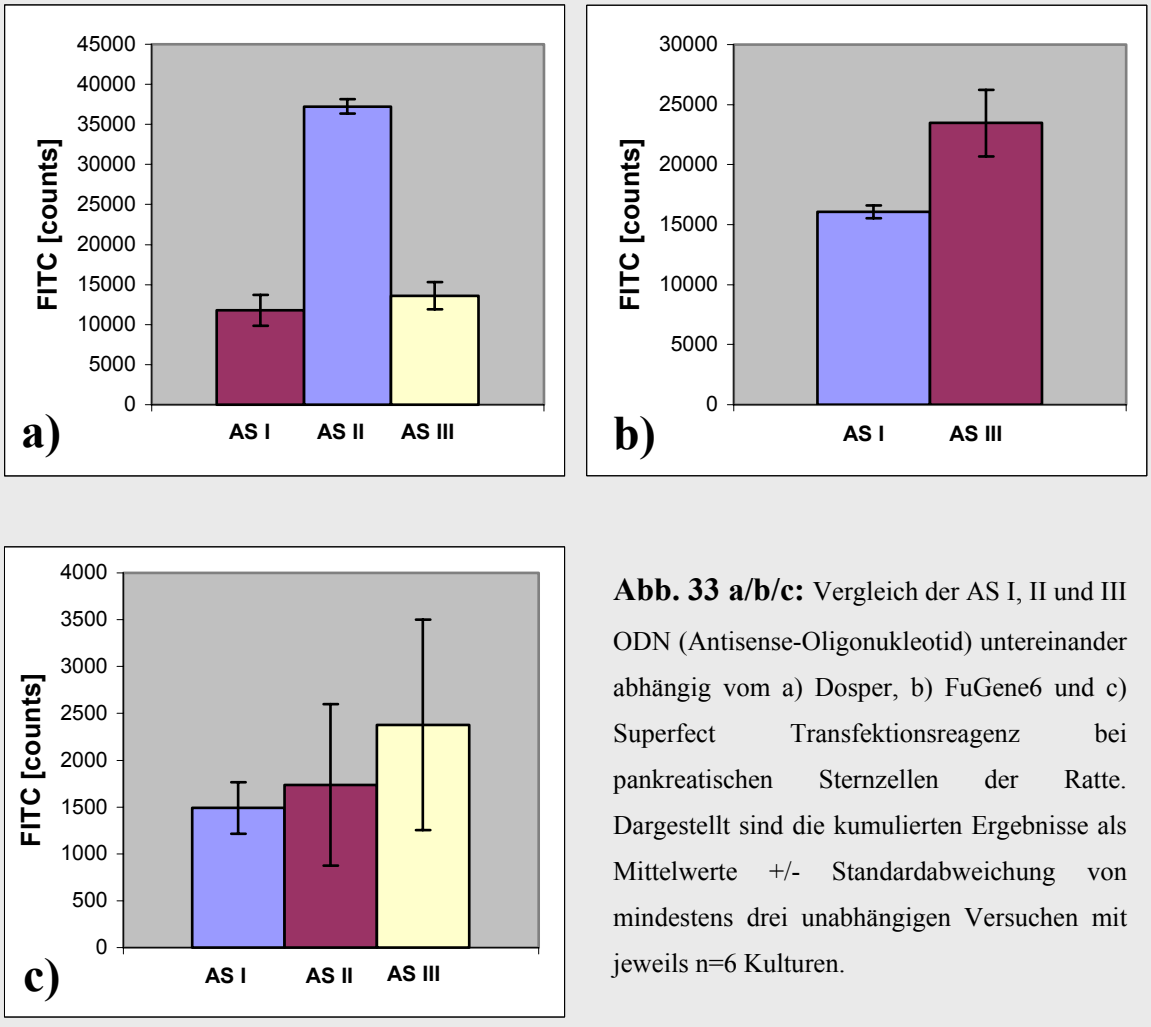


Abb. 33 a/b/c: Vergleich der AS I, II und III ODN (Antisense-Oligonukleotid) untereinander abhängig vom a) Dosper, b) FuGene6 und c) Superfect Transfektionsreagenz bei pankreatischen Sternzellen der Ratte. Dargestellt sind die kumulierten Ergebnisse als Mittelwerte +/- Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=6 Kulturen.

IV.9 Quantitative Messung der extrazellulären Matrixsynthese nach AS I Zugabe

IV.9.1 Quantitative Messung der Fibronektinkonzentration im Zellkulturüberstand nach Zugabe von AS I

Der Einfluss des AS I ODN auf die Fibronektinproduktion der pankreatischen Sternzellen wurde anhand der Messung der Fibronektinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels zeitaufgelöster Immunfluoreszenz gemessen. Nach 12stündiger Inkubation der Zellkultur in Medium mit 0,1% FKS-Zusatz, um den Einfluss der im fetalen Kälberserum enthaltenen Wachstumsfaktoren zu reduzieren und die Zellen in möglichst vergleichbaren Aktivitätszustand zu versetzen, wurden ein Teil der Zellen in 0,1% FKS haltigem Medium belassen, während der andere Anteil der Zellen mittels phosphorothioatmarkierten AS I ODN und Dosper Transfektionsreagenz in optimierten Konzentrationen transfiziert wurden. Am Tag der Transfektion wurde erneut das Medium gegen 0,1% FKS haltiges Medium ausgetauscht, das zusätzlich mit Vitamin C (10µg/ml) und ß-APN (10µl/ml) angereichert war. Nach der ersten Stimulation erfolgte nach 8h die zweite Stimulation. Die Fibronektin-Bestimmung erfolgte nach insgesamt 28h Inkubationszeit.
Die Fibronektinkonzentrationen aus den jeweiligen Zellkulturüberständen wurden der Kontrollgruppe (allein mit Dosper stimulierte pankreatische Sternzellen/allein mit 0,1% FKS stimulierte Zellen) gegenübergestellt.

1. Einfluss von AS I auf die Matrixsynthese humaner pankreatischer Sternzellen

Die zelluläre Fibronektinproduktion von mit AS I stimulierten humanen pankreatischen Sternzellen ist niedriger (11508 +/-272) als bei Zellen, die mit SE I stimuliert wurden (12659 +/-469). Die Fibronektinproduktion der mit SE I stimulierten Zellen ist annähernd dieselbe der mit 0,1% FKS stimulierten Kontrollgruppe (12733 +/-198). Im Vergleich zu der mit Dosper allein stimulierten Zellen, die eine höhere Fibronektinproduktion zeigten (14936+/-20), war der Unterschied zu den mit AS I stimulierten Zellen signifikant, nicht jedoch der Unterschied zu den mit SE I stimulierten Zellen. Bezogen auf die DNA, zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Matrixsynthese durch AS I ODN im Vergleich zu SE I ODN und den mit Dosper allein stimulierten Zellen.

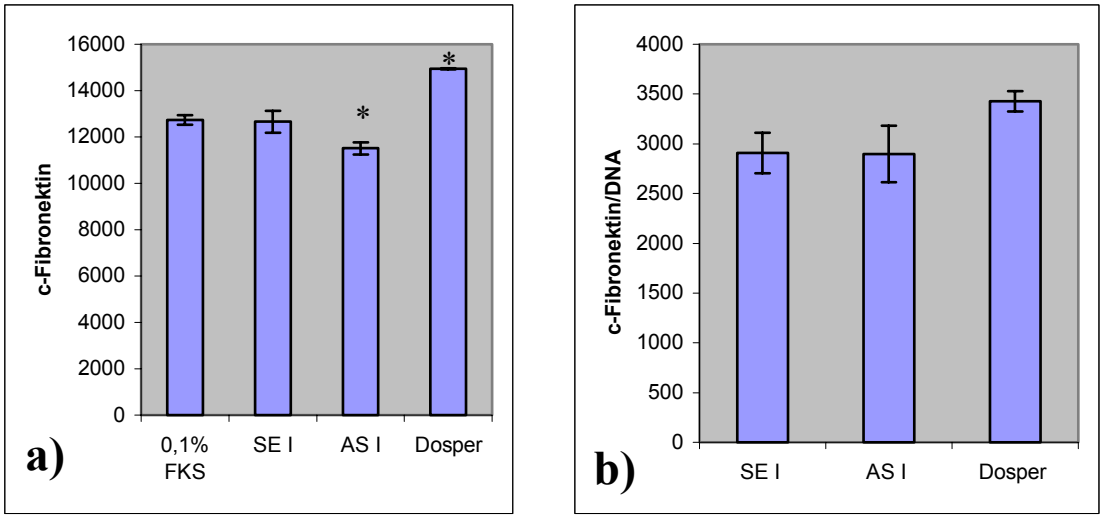


Abb. 34 a/b: Zelluläre Fibronektinsynthese (c-Fibronektin) humaner pankreatischer Sternzellen bei Transfektion mit AS (Antisense) I ODN (Oligonukleotid), SE (Sense) I ODN und Dosper Transfektionsreagenz. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit * markiert.

2. Einfluss von AS I auf die Matrixproduktion pankreatischer Sternzellen der Ratte

Die zelluläre Fibronektinproduktion/DNA von mit AS I stimulierten pankreatischen Sternzellen der Ratte ist signifikant niedriger (1117 +/-25,5) als die mit SE I stimulierten pankreatischen Sternzellen (1872+/-75,8). Signifikant ist weiterhin die Reduktion der Matrixsynthese der mit AS I stimulierten Zellen im Vergleich zu den mit 0,1% FKS stimulierten Zellen. Nicht signifikant hingegen ist die Matrixreduktion der mit SE I stimulierten Zellen im Vergleich zu den mit 0,1% FKS stimulierten Zellen. Nicht signifikant ist der Unterschied in der Matrixsynthese von mit 0,1% FKS und Dosper stimulierten Zellen.

Eine signifikant niedrigere c-Fibronektinproduktion/DNA zeigt sich bei den sowohl mit SE I als auch AS I stimulierten Zellen im Vergleich mit den allein mit Dosper stimulierten Zellen.

Bezogen auf Dosper Transfektionsreagenz ist die Fibronektinproduktion der mit AS I transfizierten Zellen signifikant niedriger als der mit SE I transfizierten Zellen. Eine signifikante Matrixreduktion findet sich zudem bei den mit AS I stimulierten Zellen im Vergleich zu den mit Dosper und 0,1% FKS stimulierten Zellen. Kein signifikanter Unterschied besteht bei den mit SE I stimulierten Zellen im Vergleich zu den in 0,1% FKS inkubierten Zellen, jedoch besteht eine signifikante Matrixreduktion im Vergleich zu den mit Dosper stimulierten Zellen. Nicht signifikant ist der Unterschied zwischen den mit 0,1% FKS und Dosper stimulierten Zellen.

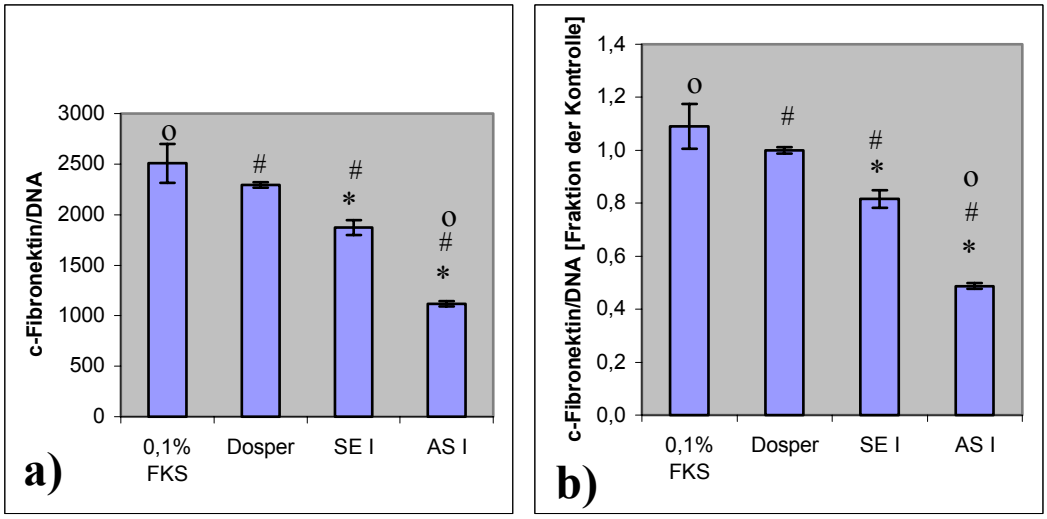


Abb. 35 a/b: Zelluläre Fibronektinsynthese (c-Fibronektin) pankreatischer Sternzellen der Ratte bei Transfektion mit AS I ODN (Antisense-Oligonukleotid) und SE I ODN (Sense-Oligonukleotid) im Vergleich zu Inkubation mit 0,1% FKS (fetalem Kälberserum) und Dosper Transfektionsreagenz. Sich signifikant voneinander unterscheidende Werte ($p<0,05$) wurden mit */#/o markiert.

IV.9.2 TGF-β mRNA bei Transfektion pankreatischer Sternzellen mit AS I

Eine signifikante Reduktion der TGFβ mRNA bei Zellen, die nur mit Dosper Transfektionsreagenz als auch Dosper Transfektionsreagenz und AS I bzw II transfiziert wurden, konnte sowohl bei humanen pankreatischen Sternzellen als auch Sternzellen der Ratte nicht festgestellt werden. Das TGFβ wurde auf β-Actin bezogen und in Prozent β-Actin dargestellt.

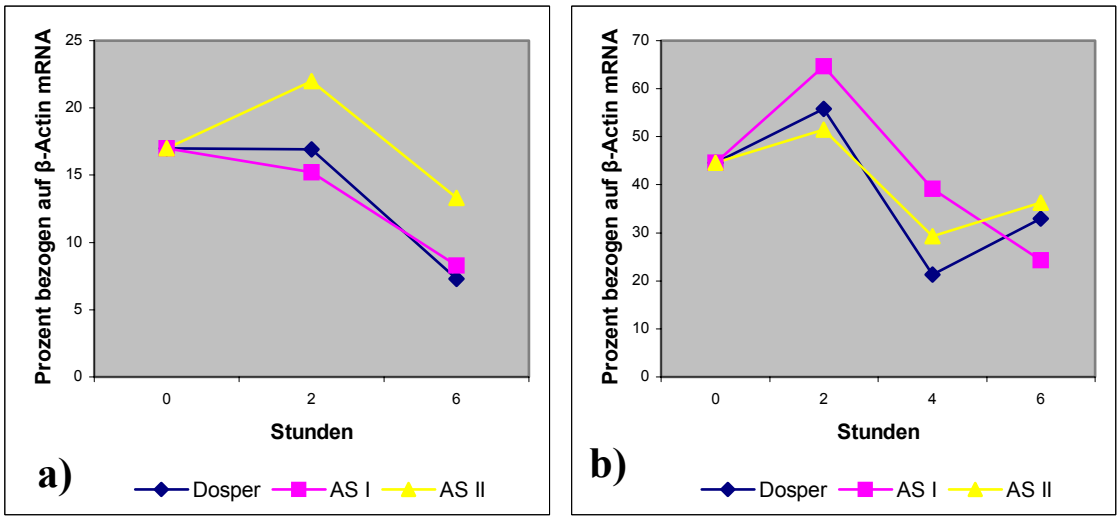


Abb. 36 a/b: Vergleich der TGFβ mRNA bei Transfektion a) humaner pankreatischer Sternzellen b) pankreatische Sternzellen der Ratte mit AS I und AS II (Antisense-Oligonukleotid) im Vergleich zur Dosper Kontrolle.

IV.10 Quantitative Messung der extrazellulären Matrixsynthese nach Zugabe von gegen die Promotorregion des TGFβ 1 gerichteten ODN (Versuch1)

IV.10.1 Quantitative Messung der Fibronektin-Synthese im Zellkulturüberstand nach Zugabe von an die Promotorregion des TGFβ1 bindenden ODN

Der Einfluss der gegen die Promotorregion des TGFβ1 gerichteten ODN auf die Fibronektinproduktion der pankreatischen Sternzellen wurde anhand der Messung der Fibronektinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels zeitaufgelöster Immunfluoreszenz gemessen. Nach Aussaat der Zellen in 24Well-Kulturplatten wurde nach Erreichen adäquater Konfluenz (ca. 90%) das Kulturmedium gegen Medium mit 0,1% FKS-Zusatz ausgetauscht und die Zellen für 12h darin belassen, um den Einfluss der im fetalen Kälberserum enthaltenen Wachstumsfaktoren zu reduzieren und die Zellen in möglichst vergleichbaren Aktivitätszustand zu versetzen.

Nach Wechsel des Kulturmediums wurde ein Teil der Zellen in 0,1% FKS haltigem Kulturmedium unter Zugabe von Ascorbinsäure und β-APN belassen, während der andere Anteil der Zellen mittels Phosphorothioat markierten SE III, AS III, SCR III ODN und Dosper Transfektionsreagenz transfiziert wurden.

Die Überstände zur Fibronektinbestimmung wurden jeweils zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72h abpipettiert und ein Mediumwechsel nach oben beschriebenem Schema vollzogen. Abschließend wurden die Monolayer gewaschen und deren DNA quantifiziert.

Die Fibronektinkonzentrationen aus den jeweiligen Zellkulturüberständen wurden der Kontrollgruppe (Medium mit 0,1% FKS Zusatz ohne Transfektionsreagenzzugabe) gegenübergestellt, bei hPSC wurden die Ergebnisse zusätzlich auf die DNA bezogen und das Ergebnis als Vielfaches der Kontrolle bei Transfektion nach 24h (in Klammern) angegeben.

Aus bis zu 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen konnte für die Messreihen im Zeitverlauf im Vergleich zur 0,1% FKS Kontrolle eine Reduktion der Fibronektinsynthese der mit SE III transfizierten Zellen im Vergleich der mit AS III gesehen werden.

Bereits nach 24h Inkubationszeit kann eine signifikante Inhibition der Fibronektinsynthese bei humanen pankreatischen Sternzellen durch Transfektion mit SE III ODN auf 56,5 µg/ml (+/-1,84) (0,69, +/-0,048) im Vergleich zur Transfektion mit AS III ODN 86,17 µg/ml (+/-4,24) (0,89, +/-0,54) bezogen auf die in 0,1%FKS inkubierten Zellen mit 85,08 µ/ml (+/-3,37) gesehen werden. Nicht signifikant sind die Unterschiede von der mit AS III transfizierten Zellen zur Kontrollzellpopulation (Abb.37).

Deutlich signifikant wird eine Reduktion der Fibronektinsynthese nach 48h der mit SE III transfizierten Zellen auf 97,5 µg/ml (+/-3,57) (0,52 ,+/-0,027), im Vergleich zu den mit AS III transfizierten Zellen mit 196,5 µg/ml (+/-8,48) (0,87,+/-0,04) und der Kontrollzellen mit 195 µg/ml (+/-6,99). Nicht signifikant sind die Unterschiede von der mit AS III transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Nach 72h ist eine weiterhin signifikante Reduktion der mit SE III ODN transfizierten Zellen auf 158,33 µg/ml (+/-9,75) (0,52, +/-0,043) im Vergleich der mit AS III transfizierten Zellen auf 245,16 µg/ml (+/-13,38) (0,71, +/-0,034) im Bezug zu den Kontrollzellen mit 340,44 (+/-16,69) zu beobachten. Signifikant untereinander sind hier alle Ergebnisse.

Bezogen auf die DNA und berechnet als Fraktion der Kontrolle, die die allein in 0,1%FKS inkubierten Zellen nach einer Inkubationszeit von 24h darstellen, ergibt sich eine Reduktion der Fibronektinsynthese mit SE III auf 0,699 (+/-0,048) der Kontrolle im Vergleich mit AS III transfizierten Zellen auf 0,89 (+/-0,054) der Kontrolle, nach 48h Inkubation kann eine signifikante Reduktion des Fibronektins auf 1,09 (+/-0,057) der Kontrolle der mit SE III transfizierten Zellen im Vergleich auf 1,81 (+/-0,084) der mit AS III transfizierten Zellen gemessen werden. Signifikant ist auch die Reduktion nach 72h der mit SE III transfizierten Zellen auf das 1,69 (+/-0,14)fache der Kontrolle im Vergleich zu den mit AS III tranfizierten Zellen mit dem 2,28 (+/-0,11) fachen der Kontrolle.

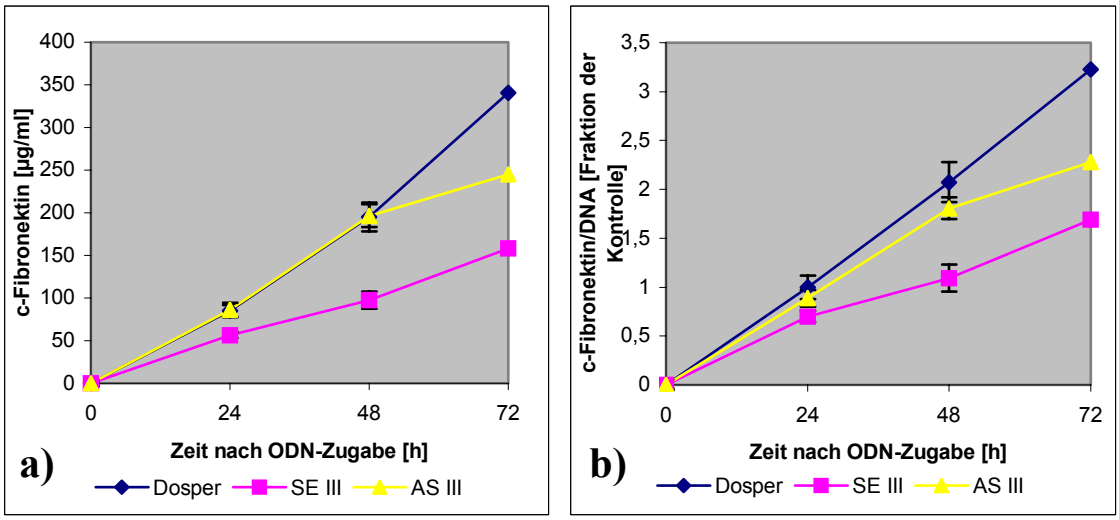


Abb. 37 a/b: Zelluläre Fibronektinkonzentration (c-Fibronektin) im Zellkulturüberstand humaner pankreatischer Sternzellen nach Zugabe von an die Promotorregion des TGFβ1 bindender AS-ODN III (Antisense-Oligonukleotid) und SE-ODN III (Sense-Oligonukleotid)

2. Einfluss von SE/AS III ODN auf die Fibronektinsynthese pankreatischer Sternzellen der Ratte nach Transfektion mittels Dosper Transfektionsreagenz

Analog hierzu konnte bereits eine Reduktion der Fibronektinsynthese bis auf 46% (4,86µg/ml, +/-0,24) der Kontrollzellen (10,66µg/ml,+/-0,25) in pankreatischen Sternzellen der Ratte mittels Transfektion mit SE III ODN und Dosper Transfektionsreagenz in optimierten Konzentrationen im Vergleich zu mit AS III transfizierten Zellen (9,93µg/ml,+/-0,25) nach 24h Inkubationszeit gemessen werden. Nach 48h kann eine Reduktion der Fibronektinsynthese durch SE III ODN auf 9,82 µg/ml (+/-1,21) im Vergleich zur Kontrolle mit 27,92 µg/ml (+/-0,61) und 26,75 µg/ml(+/-1,02) Fibronektin der mit AS III transfizierten Zellen gesehen werden. Schließlich wird nach 72h eine Reduktion der Fibronektinsynthese durch SE III auf 14,73µg/ml (+/-2,19) Fibronektin im Vergleich zu den mit AS III transfizierten Zellen mit 32,07 µg/ml (+/-0,78) und 36,53µg/ml (+/-0,91) der Kontrollzellen gemessen.

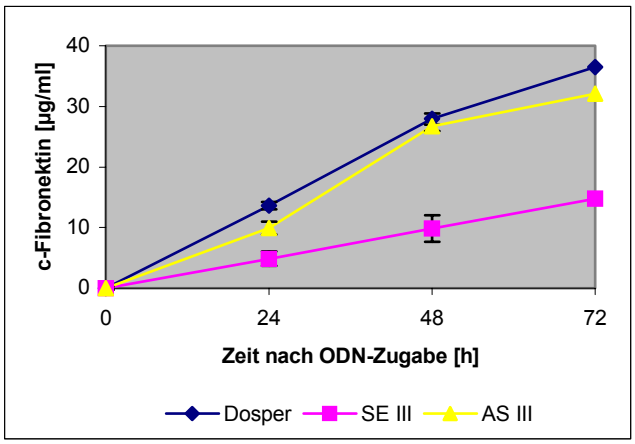


Abb. 38: Zelluläre Fibronektin-konzentration im Zellkulturüberstand pankreatischer Sternzellen der Ratte nach Zugabe von an die Promotorregion des TGFβ1 bindender AS-ODN III (Antisense-Oligonukleotid und SE-ODN III (Sense-Oligonukleotid)

IV.10.2 Quantitative Messung der Fibronektin-Synthese im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit gegen die Promotorregion des TGF β1 gerichteten ODN (Versuch2)

Nach Stimulation humaner pankreatischer Sternzellen mit dem Transfektionsreagenz Dosper und SE III, AS III und SCR III ODN in optimierter Konzentration wurde deren Einfluss auf die Fibronektin Synthese anhand der Messung des Fibronektin Gehaltes im Zellkulturüberstand mittels zeitaufgelöster Immunfluoreszenz gemessen.

Nach Aussaat der Zellen in 24Well-Kulturplatten, wurde nach Erreichen adäquater Konfluenz (ca. 90%) das Kulturmedium gegen Medium mit 0,1% FKS-Zusatz ausgetauscht und die Zellen 12h darin belassen. Nach 12h Inkubation in 0,1%FKS haltigem Kulturmedium erfolgte ein Mediumwechsel in Medium mit 0,1% FKS unter Zugabe von Ascorbinsäure und β-APN. Die Zellen wurden mit SE III, AS III und SCR III ODN und Dosper Transfektionsreagenz transfiziert. Nach jeweils 24, 48 und 72h wurden

die Zellkulturüberstände abpipettiert und jeweils ein Mediumwechsel nach oben beschriebenem Schema vollzogen.

In Abb.39 sind die Fibronektin Konzentrationen, berechnet als Fraktion der Dosper-Kontrolle, dargestellt.

Aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen konnte für die Messreihen im Zeitverlauf, angegeben als Fraktion der Kontrollzellkultur, die allein mit Dosper Transfektionsreagenz stimuliert wurde, eine signifikante Reduktion der Fibronektin Synthese zu jedem Messzeitpunkt der mit SE III transfizierten Zellen im Vergleich der mit AS III oder SCR III transfizierten Zellen und im Vergleich zur Dosper Kontrolle gesehen werden. Nicht signifikant hingegen waren jeweils die Unterschiede zwischen den mit Dosper stimulierten Zellen und der mit AS III oder SCR III transfizierten Zellen.

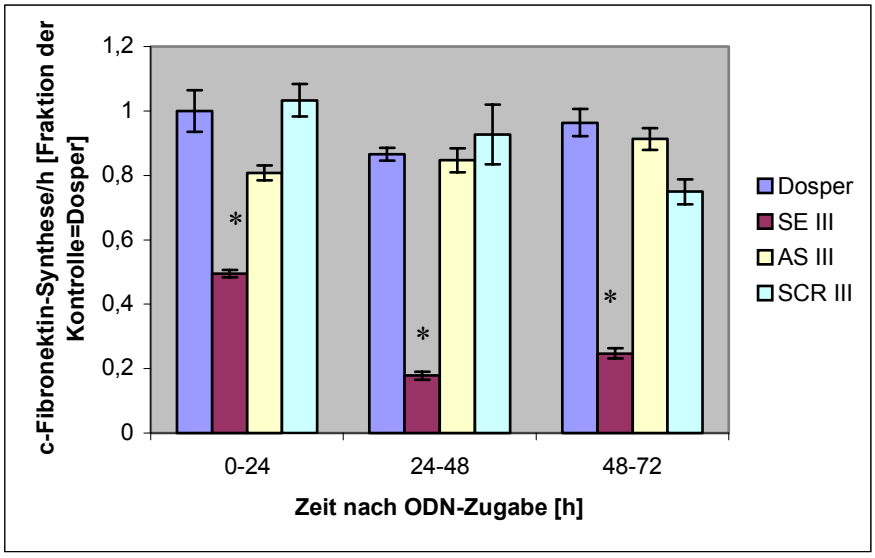


Abb. 39: Auswirkungen der Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit gegen die Promotorregion des TGFβ1 gerichteter ODN (AS III, SE III, SCR III) (Antisense, Sense, Scrambled Oligonukleotide) auf die zelluläre Fibronektin-Synthese (c-Fibronektin) im Verlauf der Zeit. Dargestellt sind die c-Fibronektinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen als Fraktion der Kontrolle (Dosper). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung von 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen ermittelt worden. Signifikante Ergebnisse ($p<0,05$) wurden mit * markiert.

IV.10.3 Quantitative Messung der Kollagen Typ I Synthese im Zellkulturüberstand

Nach Stimulation humaner pankreatischer Sternzellen mit dem Transfektionsreagenz Dosper und SE III, AS III und SCR III ODN in optimierter Konzentration wurde deren Einfluss auf die Kollagen Typ I Synthese anhand der Messung des Kollagen Typ I Gehaltes im Zellkulturüberstand mittels zeitaufgelöster Immunfluoreszenz gemessen.

Nach Aussaat der Zellen in 24Well-Kulturplatten, wurde nach Erreichen adäquater Konfluenz (ca. 90%) das Kulturmedium gegen Medium mit 0,1% FKS-Zusatz

ausgetauscht und die Zellen 12h darin belassen. Nach Wechsel des Kulturmediums nach 12h Inkubation in 0,1% FKS haltigem Kulturmedium in Medium mit 0,1% FKS unter Zugabe von Ascorbinsäure und β-APN wurden die Zellen mit SE III, AS III und SCR III ODN und Dosper Transfektionsreagenz transfiziert. Nach jeweils 24, 48 und 72h wurden die Zellkulturüberstände abpipettiert und jeweils ein Mediumwechsel nach oben beschriebenem Schema vollzogen. Abschließend wurden die Monolayer gewaschen und deren DNA quantifiziert.

In Abb. 40 sind die Kollagen Typ I Konzentrationen, berechnet als Fraktion der Dosper-Kontrolle und korrigiert auf die Zellzahl (DNA) dargestellt.

Aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen konnte für die Messreihen im Zeitverlauf und korrigiert auf die DNA, angegeben als Fraktion der Kontrollzellkultur, die allein mit Dosper Transfektionsreagenz stimuliert wurde, eine Reduktion der Kollagen Typ I Synthese der mit SE III transfizierten Zellen im Vergleich der mit AS III oder SCR III transfizierten Zelle und im Vergleich zur Dosper Kontrolle gesehen werden. Der Unterschied von mit SE/ASIII transfizierten Zellen ist ab 24h Inkubationszeit signifikant und beträgt für mit SE III transfizierte Zellen nach 48h 0,289 (+/-0,035), nach 72h 0,32 (+/-0,025) der Dosper Kontrolle, hingegen betragen die Vergleichswerte für mit AS III transfizierte Zellen nach 48h 1,11 (+/-0,11) bzw. nach 72h 2,52 (+/-0,25) der Dosper-Kontrolle. Auch bezüglich der mit SCR III transfizierten Zellen und im Vergleich zur Dosper Kontrolle zeigt sich eine signifikante Reduktion der Kollagen-Typ I Synthese der mit SE III transfizierten Zellen im Zeitverlauf.

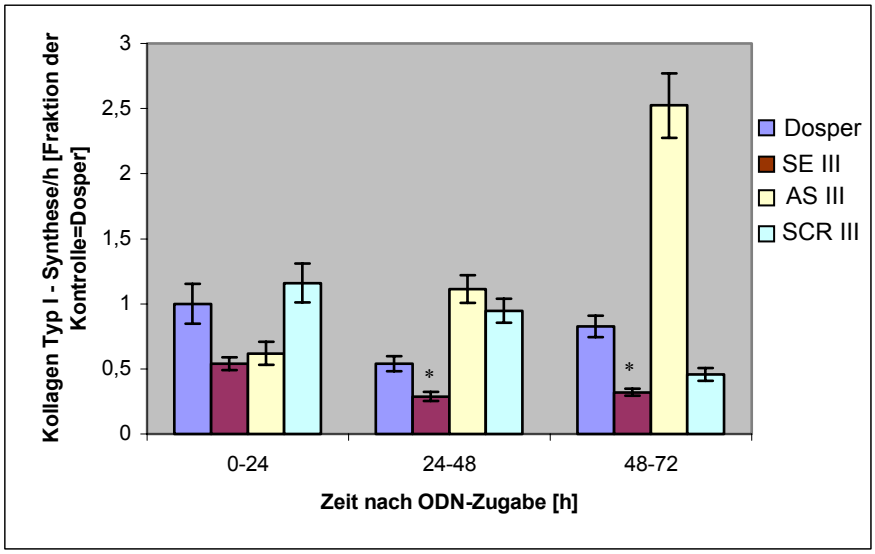


Abb. 40: Auswirkungen der Transfektion humaner pankreatischer Sternzellen mit gegen die Promotorregion des TGFβ1 gerichteter ODN (AS III, SE III, SCR III) (Antisense, Sense, Scrambled Oligonukleotide) auf die Kollagen Typ I-Synthese im Verlauf der Zeit. Dargestellt sind die Kollagen Typ I-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen als Fraktion der Kontrolle (Dosper) und bezogen auf den DNA-Gehalt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung von 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils n=3 Kulturen ermittelt worden. Signifikante Ergebnisse ($p<0,05$) wurden mit * markiert.

III.11 Nachweis einer Triple-Helix-Bildung durch gegen die Promotorregion des TGFβ1 gerichteter ODN

Mittels Gel-Shift Assay konnte eine Triple-Helix Bildung der gegen die Promotorregion des TGFβ1 Genes gerichteten Oligonukleotide (AS III) nachgewiesen werden.

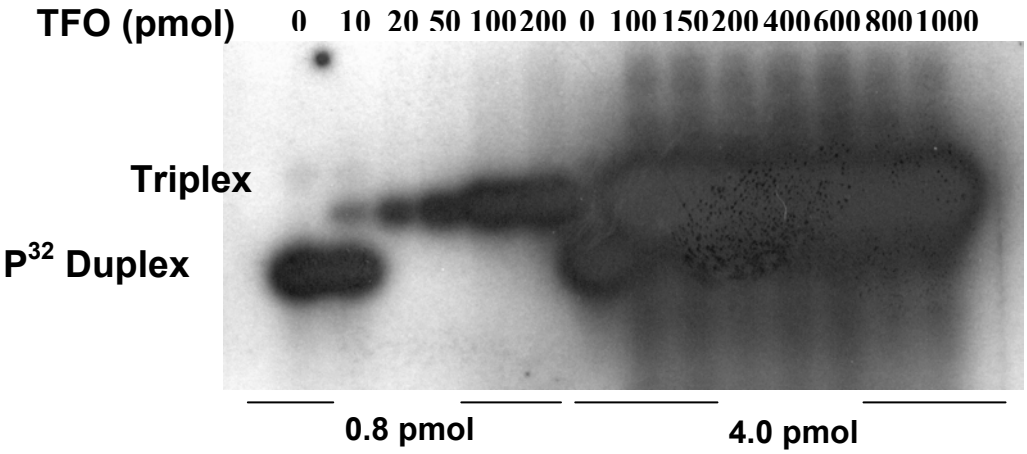


Abb. 41: Gel-Shift Assay des gegen die Promotorregion des TGFß1 gerichteten AS-ODN III (Antisense-Oligonukleotid) mit Nachweis der Triple-Helix Bildung (TFO:Triplex Forming Oligonucleotide).

III.12 PCR der mRNA extrazellulärer Matrixproteine bei Transfektion mit ODN III

IV.12.1 Nachweis von Fibronektin mittels PCR bei Transfektion mit Dosper Transfektionsreagenz und SE/AS III ODN

Zum Nachweis der Fibronektinsynthese in PSC in Abhängigkeit von der Transfektion mittels Dosper und SE/AS III ODN wurden humane pankreatische Sternzellen bis zur adäquaten Konfluenz in 24Well-Platten kultiviert. Nach Mediumwechsel erfolgte eine Transfektion der Zellen mit phosphorothioatmarkierten SE/AS III ODN mittels Dosper Transfektionsreagenz im Verhältnis 1:2. Nach den Zeitabständen 0, 2, 4, 6, 9h wurden die Zellen zur Gewinnung der Gesamt-RNA herangezogen. Nach Erstellung der cDNA wurde eine PCR der gewonnenen Proben durchgeführt.

Berechnet wurde das Verhältnis Fibronektin zu β-Actin. Es konnte eine deutliche Reduktion der Fibronektin mRNA bei Transfektion mittels SE III ODN (34,9% Fibronektin nach 6h) im Vergleich zu Transfektion mit AS III (87,6% Fibronektin nach 6h) bzw. der Kontrolle (75%) festgestellt werden.

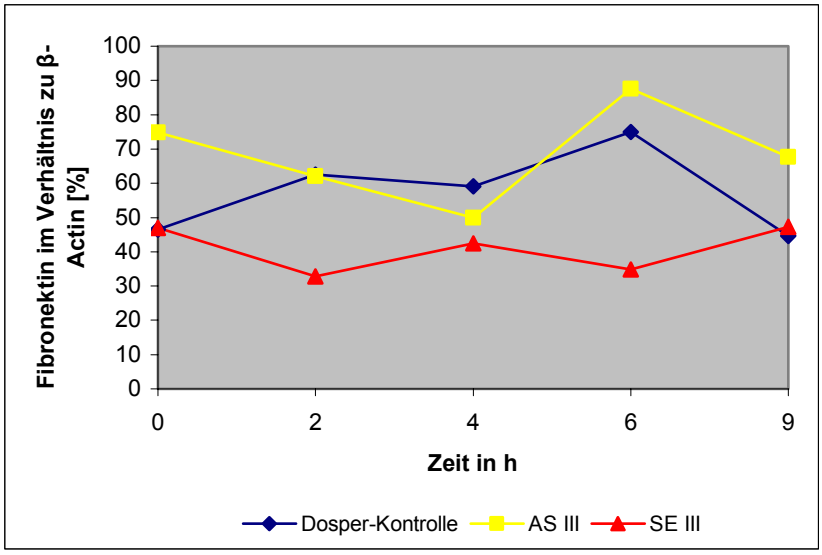


Abb. 42: Nachweis der Fibronektinsynthese auf mRNA Ebene durch PCR in humanen Pankreatischen Sternzellen in Abhängigkeit von der Transfektion mittels Dosper, SE III, AS III ODN (Sense, Antisense-Oligonukleotide) und Inkubationszeit. Dargestellt ist die Fibronektin-mRNA Konzentration im Verhältnis zu ß-Actin-mRNA Konzentration.

IV.12.2 Nachweis von Kollagen Typ I mRNA mittels PCR bei Transfektion mit Dosper Transfektionsreagenz und SE/AS III ODN

Zum Nachweis der Kollagen Typ I Synthese in PSC in Abhängigkeit von der Transfektion mittels Dosper und SE/AS III ODN wurden humane pankreatische Sternzellen bis zur adäquaten Konfluenz in 24Well-Platten kultiviert. Nach Mediumwechsel erfolgte eine Transfektion der Zellen mit phosphorothioatmarkierten SE/AS III ODN mittels Dosper

Nach den Zeitabständen 0, 2, 4, 9h wurden die Zellen zur Gewinnung der Gesamt-RNA herangezogen.

Nach Erstellung der cDNA wurde eine PCR der gewonnenen Proben durchgeführt.

Berechnet wurde das Verhältnis Kollagen Typ I zu β-Actin. Es konnte eine deutliche Reduktion der Kollagen mRNA bei Transfektion mittels SE III ODN (23,7% Kollagen Typ I nach 9h) im Vergleich zu Transfektion mit AS III (46% Kollagen Typ I nach 9h) bzw. der Kontrolle (44,8%) festgestellt werden.

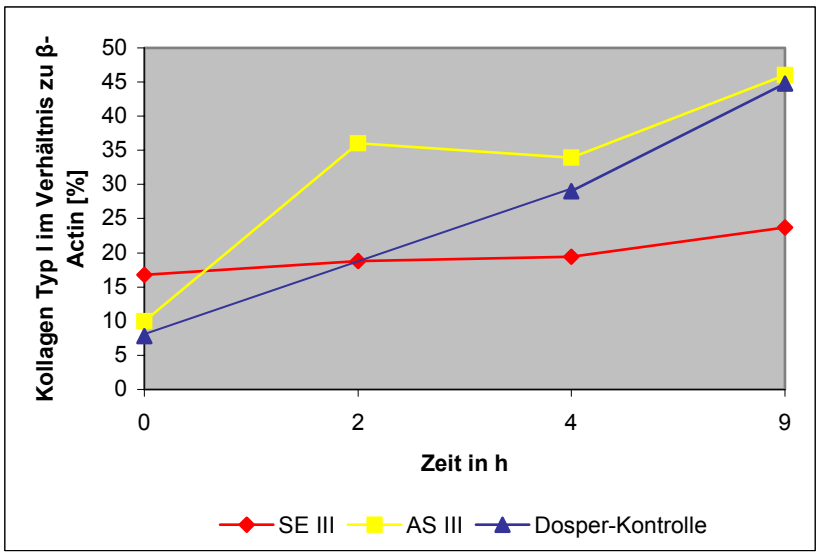


Abb. 43: Nachweis der Kollagen Typ I Synthese auf mRNA Ebene durch PCR in humanen Pankreatischen Sternzellen in Abhängigkeit von der Transfektion mittels Dosper, SE III, AS III ODN (Sense, Antisense-Oligonukleotide) und Inkubationszeit. Dargestellt ist die Kollagen Typ I-mRNA Konzentration im Verhältnis zu ß-Actin-mRNA Konzentration.

IV.13 Immunfluoreszenz von Kollagen Typ I, III und Fibronektin

Zur Darstellung der Matrixsynthese bei Stimulation mit dem gegen die Promotorregion des TGFβ1 gerichteten ODN wurden humane pankreatische Sternzellen in 6Well-Platten auf Glasplättchen ausgesät und bei Erreichen adäquater Konfluenz 12h vor Stimulationsbeginn in 0,1% FKS haltigem Medium inkubiert. Zum Inkubationszeitpunkt wurden Zellen bei 0,1% FKS belassen, allein mit Dosper Transfektionsreagenz als auch jeweils mit den ODN AS III, SE III in Kombination mit Dosper Transfektionsreagenz über 48h inkubiert. Alle 12h wurde im Rahmen eines Kulturmediumwechsels in 0,1% FKS erneut stimuliert. Bei Experiment-Ende wurden die Glasplättchen fixiert und das enthaltende Fibronektin, Kollagen Typ I und III durch Immunfluoreszenzfärbung dargestellt.

Im Vergleich zur Kontrolle mit 0,1% FKS bzw. Dosper Transfektionsreagenz kann bei Inkubation mit dem SE III ODN eine deutliche Reduktion der Matrixsynthese sowohl bei Fibronektin als auch Kollagen Typ I und III im Vergleich zu den ODN AS III gesehen

werden. Hingegen scheint die Matrixsynthese bei Inkubation in 0,1% FKS und Dosper Transfektionsreagenz adäquat der mit AS III transfizierten Zellen zu sein.

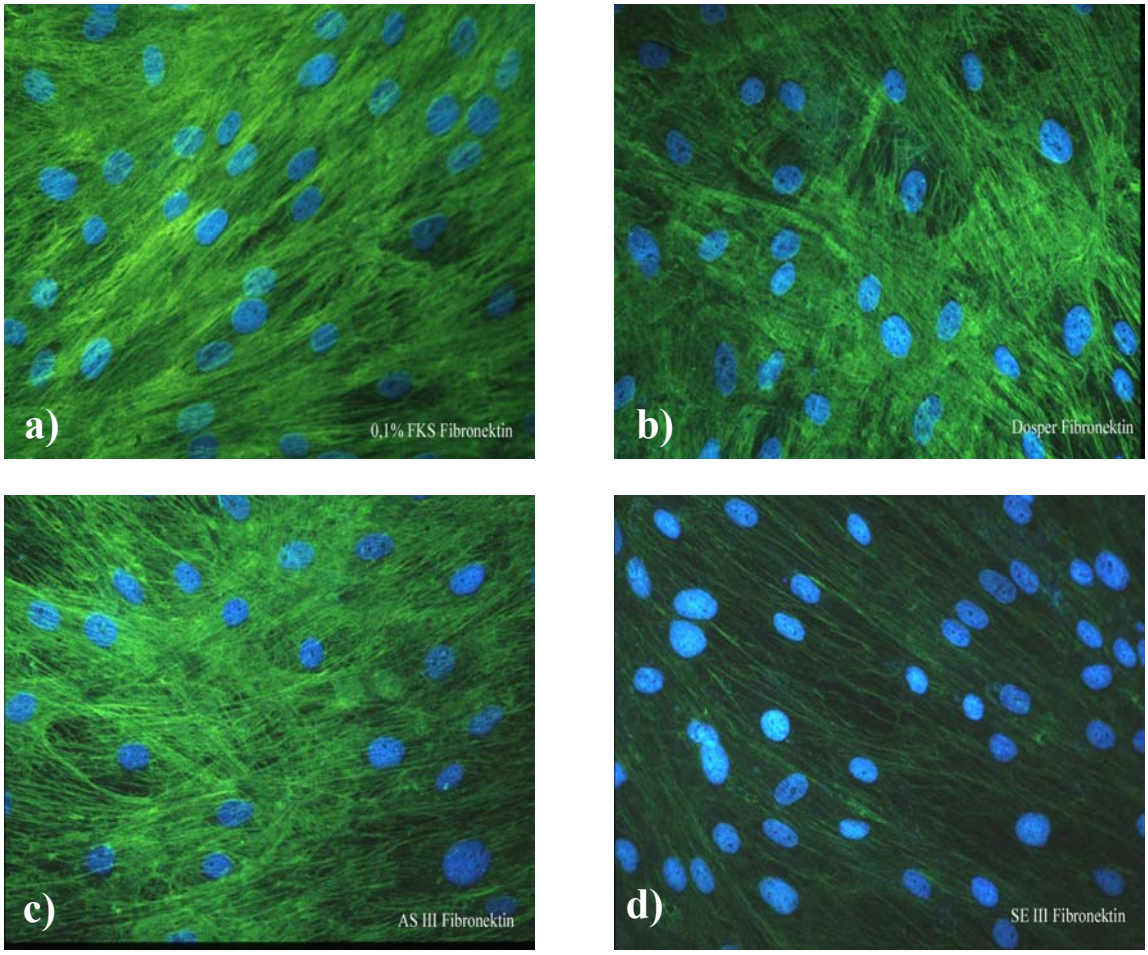


Abb. 44: Darstellung des Fibronektins durch Immunfluoreszenzfärbung nach Inkubation von humanen Pankreatischen Sternzellen mit a) 0,1% FKS (fetales Kälberserum), b) Dosper Transfektionsreagenz c) AS (Antisense) III, d) SE (Sense) III.

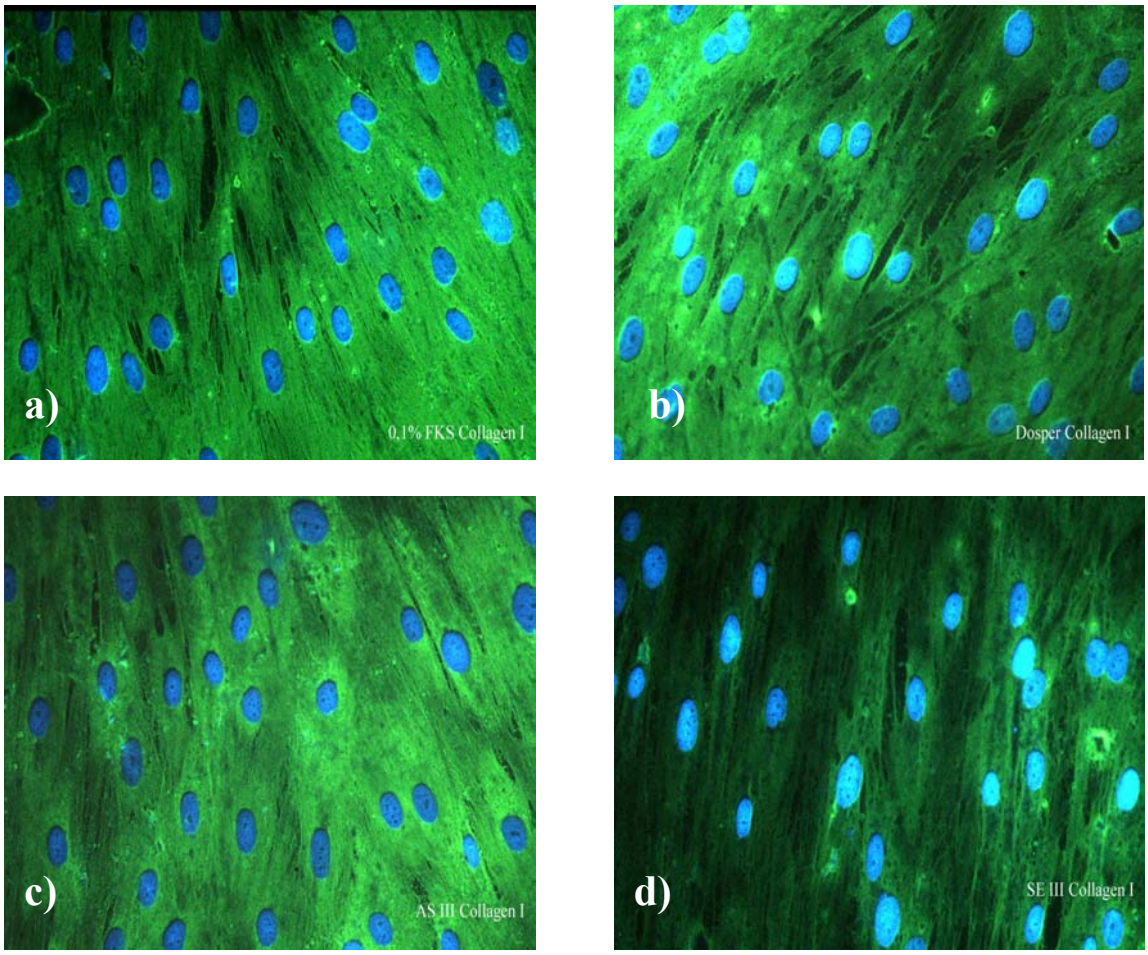


Abb. 45: Darstellung des Kollagen Typ I durch Immunfluoreszenzfärbung nach Inkubation von humanen Pankreatischen Sternzellen mit a) 0,1% FKS (fetalem Kälberserum), b) Dosper Transfektionsreagenz c) AS (Antisense) III, d) SE (Sense) III.

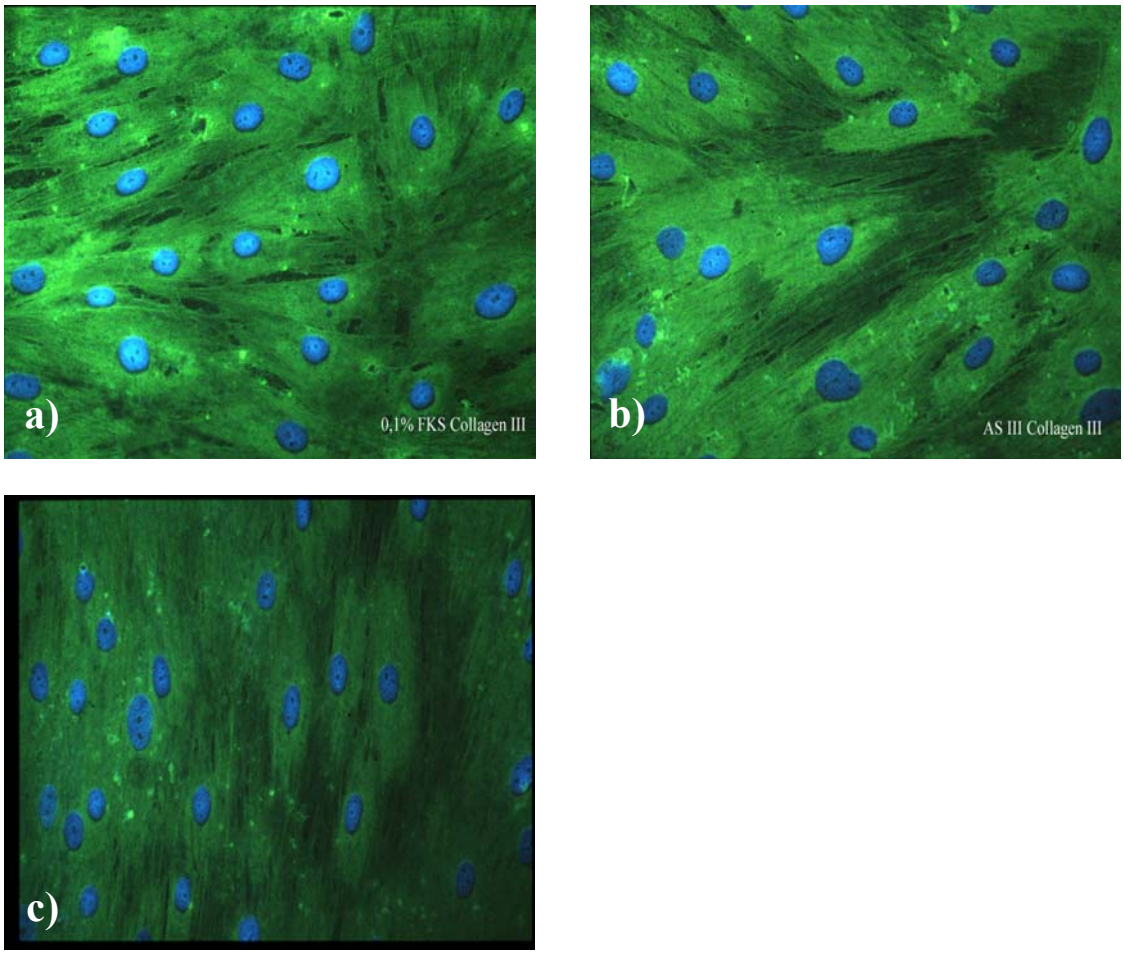


Abb. 46: Darstellung des Kollagen Typ III durch Immunfluoreszenzfärbung nach Inkubation von humanen Pankreatischen Sternzellen mit a) 0,1% FKS (fetalem Kälberserum), b) AS (Antisense) III, c) SE (Sense) III.

V. Diskussion

V.1 Autokrine Stimulationsmechanismen der pankreatischen Sternzelle

Die autokrine Stimulation ist dahingehend definiert, dass die Zelle einen löslichen Faktor produziert und sezerniert, der dann wiederum auf die ihn produzierende Zelle über Rezeptoren zurückwirkt. Durch diese eigenständige Stimulation gewinnen die Zellen das Potential der Unabhängigkeit von exogenen Kontrollmechanismen. Eine Autoinduktion des TGFβ, wobei TGFβ1 die eigene Expression steigert, wurde 1989 durch Kim (Kim et al. 1990) nachgewiesen. Bei der Pathogenese der Glomerulonephritis konnte Border bereits 1990 einen durch TGFβ induzierten autokrinen Mechanismus nachweisen, der die Erkrankung unterhält (Border und Ruoslahti 1990) und auch bei der hepatischen Sternzelle konnte im Rahmen der fibrotischen Umbauvorgänge bei Leberzirrhose eine autokrine Stimulationskomponente nachgewiesen werden (Gressner und Bachem 1995). Seit langem sind autokrine Wachstumsfaktoren bei bestimmten malignen Krebsformen aufgrund Mutationen der Kontrollgene, sog. Onkogene, bekannt (Sporn und Roberts 1985).
Bei der autokrinen Stimulation muss der Wachstumsfaktor nicht in den Extrazellulärraum sezerniert werden, um die Zelle zu stimulieren, es genügt eine Interaktion mit einem spezifischen intrazellulären Rezeptor. Kandenwein konnte einen autokrinen Stimulationsmechanismus bei der pankreatischen Sternzelle nachweisen, jedoch gelang die Suppression der autokrin stimulierten Synthese von c-Fibronektin durch Zugabe von Anti-TGFβ nur um ca. 39,7% (Kandenwein 2000). Eine Ursache hierfür könnte das Ablaufen autokriner Mechanismen bereits intrazellulär sein. Intrazellulär ablaufende autokrine Mechanismen können von monoklonalen Antikörpern nicht direkt beeinflusst werden. Die Interpretation der biologischen Relevanz von Antikörper-Versuchen wird von manchen Autoren als schwierig eingestuft, da nur ein Teil des sezernierten TGFß in aktiver Form vorhanden ist und nur dieses von Antikörpern gebunden werden kann (Jachimczak et al. 1996; Gharaee-Kermani et al. 1996). Auch könnten noch nicht bekannte Aktivierungsmechanismen eine Rolle bei der TGFß Aktivierung spielen, die durch Antikörper nicht beeinflusst werden können. Und schließlich können durch Antikörper zwar die externen TGFß Wirkmechanismen beeinflusst werden, jedoch lässt sich daraus nicht auf die intrazellulären Regulationsmechanismen rückschließen.

Antisense ODN hemmen bereits auf mRNA Ebene intrazellulär die Translation des Zielproteins. Erste Erfolge wurden bereits von Hartmann 1996 beschrieben, dem die Blockade der TNFα Synthese durch AS-ODN gelang (Hartmann et al. 1996). Agaki

gelang eine Hemmung der extrazellulären Matrixsynthese durch TGFβ1 AS-ODN bei der experimentellen Glomerulonephritis (Akagi et al. 1996) und Schüftan und Bachem zeigten in einer Arbeit zur Leberfibrose durch Zugabe von TGFβ1 AS-Phosphorothioat-ODN eine Hemmung der Fibronektinsynthese bei hepatischen Sternzellen um 43% (Schuftan und Bachem 1999).
1996 konnte Khanna die Expression des TGFβ1 Genes in humanen Adenokarzinomzellen verhindern (Khanna et al. 1996) und Jachimczak gelang die Reduktion der TGFβ1 Proteinsekretion durch Antisense-Technologie in peripheren Blutmonozyten (Jachimczak et al. 1995).
Zwischenzeitlich wurden bereits Fortschritte auch in der in-vivo Applikation der Antisense-Technologie gemacht und erste therapeutische Anwendungen durchgeführt (Gewirtz et al. 1998).
Analog dieser Experimente ist das Ziel dieser Arbeit die Optimierung der Transfektion pankreatischer Sternzellen mit TGFß1-Antisense-Oligonukleotiden und nachfolgend der Nachweis autokriner Stimulationsmechanismen über TGFß1 durch die intrazelluläre Unterbrechung der autokrinen TGFβ1 Stimulation durch Antisense Technologie.

Zwei bedeutende Transkriptionsstartpunkte für humane TGFβ1 mRNA, die 271 Nukleotide entfernt voneinander liegen, wurden beschrieben: Die erste Promotorregion liegt zwischen den Nukleotiden –454 bis –323, die andere zwischen den Nukleotiden +1 bis +271 (Kim et al. 1989; Kim et al. 1990; Roberts et al. 1990).

Die multiplen Funktionen des TGFβ und dessen zentrale Rolle bei fibrogenen Prozessen in Kombination mit dessen Induktion durch autokrine Stimulationsmechanismen (Sudarshan et al. 1998) bei der Pathogenese der chronischen Pankreatitis lassen nach Möglichkeiten suchen, die TGFβ Expression zu inhibieren. Hier wurden verschiedene Methoden entwickelt wie

- Blockade des TGFβ durch Zugabe von neutralisierenden Antikörpern
- Zugabe von TGFβ1–LAP
- Zugabe von Antikörpern gegen den TGFβ Rezeptor

Ein Nachteil der Antikörpertherapie besteht insbesondere bei dem hier angesprochenen Modell der Pankreasfibrose mit dem Konzept der intrazellulären autokrinen Stimulation in der Unzugänglichkeit einer Antikörpertherapie.

Wie in verschiedenen Experimenten gezeigt, sind phosphorothioatmarkierte ODN gegen TGFβ (Jachimczak et al. 1993; Khanna et al. 1996; Akagi et al. 1996), PDGF-A und bFGF (Behl et al. 1993) in der Lage, die spezifische Expression der Zielproteine zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei gegen humanes TGFβ1 wirksame AS-ODN (AS-I, II und III) verwendet, die in publizierten Experimenten bereits Effekte gezeigt hatten. Analog hierzu und abhängig vom Experiment, wurden die entsprechenden SE-ODN (SE-I, II und III) verwendet (Akagi et al. 1996; Jachimczak et al. 1995; Jachimczak et al. 1996; Khanna et al. 1994).

Akagi (Akagi et al. 1996) zeigte eine TGFβ Suppression und Verringerung der extrazellulären Matrixakkumulation im Mausmodell der experimentellen Glomerulonephritis. Als Kontrollen verwendete er SE, SCR und Reverse ODN, die jeweils nicht den TGFβ inhibierenden Effekt zeigten. Der spezifische Effekt des TGFβ1 ODN war zuvor bei Itoh beobachtet worden, der den inhibierenden Effekt desselben ODN an kultivierten glatten Muskelzellen zeigte (Itoh et al. 1993). Die ODN wurden phosphorothioatmarkiert und mittels Liposomen transfiziert (Akagi et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die etablierte ODN-Sequenz des AS-ODN I weitgehend übernommen und nach Datenbankrecherche für das humane TGFβ1 Gen auch bei humanen pankreatischen Sternzellen angewandt.

Jachimczak zeigte mittels Transfektion peripherer mononukleärer Zellen und später auch Gliomzellen mit einem phosphorothioatmarkierten AS-ODN im Vergleich zu einem SCR-ODN eine Reduktion der TGFβ1 Proteinsekretion (Jachimczak et al. 1995; Jachimczak et al. 1996). Analog hierzu wurde das AS-ODN II entworfen und übernommen.

Khanna schließlich beobachtete durch ein phosphorothioatmarkiertes TGFβ1 AS-ODN, das komplementär zu dem ersten Transkriptionsstartpunkt des TGFβ1 Genes ist, im Vergleich zu einem SE- und SCR-ODN eine verminderte TGFβ1 Sekretion in humanen Adonokarzinomzellen (Khanna et al. 1994; Khanna et al. 1996). Entsprechend diesen Ergebnissen wurde das AS-ODN III übernommen.

Analog hierzu erfolgte die Auswahl und Synthese der ODN gegen das TGFβ1 der Ratte. Während AS-I und II an die TGFβ1 mRNA binden, bindet ODN III an die Promotorregion des TGFβ1 Genes. Verwendet wurden die Passagen 3-9 der pankreatischen Sternzellen. Um den Einfluss der im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Experimente möglichst gering zu halten, wurde ein Großteil der Experimente unter Zugabe von nur 0,1% fetalem Kälberserum durchgeführt.

V.2 Antisense Oligonukleotide

Der Gedanke, dass Genexpression durch exogen zugeführte Nukleinsäuren modifiziert werden kann, stammt aus von Paterson durchgeführten Studien, der Einzelstrang DNA zur Inhibition der Translation der Komplementären RNA in einem zellfreien System einsetzte (Paterson et al. 1977). Bereits 1978 zeigte Zamecnik, dass eine kurzes, 13 Nukleotide langes DNA Molekül, das antisense zum Rous Sarcoma Virus ist, die virale Replikation in Kultur verhindern kann (Zamecnik und Stephenson 1978). AS-ODN werden zumeist in einer Länge von 7 bis 30 Nukleotiden variabler Basenabfolge hergestellt (Wagner et al. 1996). Analog hierzu wurden in den vorliegenden Experimenten ODN der Länge von 14 bis 17 Basenpaaren verwendet.

AS-ODN sind kurze, einzelsträngige DNA oder modifizierte DNA Stränge, die eine komplementäre Basensequenz zur Ziel-RNA (dem Sense-Strang) zeigen. Die ODN werden extrazellulär zu den Zellen hinzugefügt, dringen dann in die Zelle ein und hybridisieren selektiv zur Zielsequenz durch Watson-Crick-hydrogengebundene Basenpaarung, was zur Duplexbildung führt. Dies interferiert mit der RNA Funktion auf der Ebene der Transkription, pre-mRNA Prozessing, mRNA Stabilität im Zytoplasma und Translation durch Blockade des RNA Transportes, Splicing oder Translation im Sinne der Verminderung genetischen Informationsflusses (Helene und Toulme 1990).

Bindet das AS-ODN an eine Ziel-RNA, wird die hybridisierte RNA-ODN Form Substrat für RNase H, die selektiv den hybridisierten RNA-ODN Teil hydrolysiert und somit die RNA inaktiviert (Wagner und Flanagan 1997).

Insofern bietet der Einsatz von AS-ODN durch spezifische Basenpaarung zwischen Nukleinsäuren eines extern zugeführten ODN und der Zielnukleinsäure im Zellinneren die Möglichkeit, gezielt Genexpressionen zu unterbrechen. Aus diesem Grund sind sie ideal zur Studie bestimmter Genfunktionen und das Ziel ist ihr therapeutischer Einsatz bei Erkrankungen, denen eine vermehrte Genexpression zugrunde liegt (Stein und Cheng 1993; Crooke und Bennett 1996; Wagner und Flanagan 1997), was bei der hier untersuchten Funktion der pankreatischen Sternzelle im Rahmen der chronischen Pankreatitis für das TGFβ zutrifft.

Studien zeigten, dass eine effektive Wirkung der ODN einerseits von der adäquaten Zielsequenz und andererseits von einer ausreichenden intrazellulären Konzentration abhängt (Ho et al. 1996; Kronenwett et al. 1996).

Die intrazelluläre Konzentration hängt von dem Ausmaß der Aufnahme der ODN in die Zelle, der intrazellulären Verteilung und dem Grad der ODN-Degradation durch Serum-

und zytoplasmatische Nukleasen ab (Stein und Cheng 1993). Unmodifizierte ODN werden durch extrazelluläre und intrazelluläre Nukleasen rasch degradiert. Phosphorothioat Modifikationen können den Abbau der ODN durch intrazelluläre Enzyme verhindern (Zon 1995). Hinsichtlich beschriebener nicht-sequenz-abhängiger Effekte der ODN aufgrund Interaktionen der Phosphorothioate mit Proteinen (Stein und Narayanan 1994; Wagner und Flanagan 1997) scheint die alleinige 3´und 5´Markierung mit Phosphorothioaten, wie in den vorliegenden Experimenten verwendet, ein idealer Kompromiss zu sein (Thierry und Dritschilo 1992).
Die Experimente wurden mit fluoreszein- und phosphorothioatmarkierten ODN, die eine Schwefel-Substitution an einem nicht bindenden Sauerstoff des Phosphatrückgrates haben, was zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Nukleasen führt, durchgeführt.

DNA Aufnahme in die Zelle ist ein per se physiologisch vorkommender Mechanismus. Jedoch sind native und phosphorothioatmarkierte ODN anionische Moleküle und insofern nicht in der Lage, in ausreichender Menge durch Zellmembranen zu diffundieren. (Loke et al. 1989; Yakubov et al. 1989; Beltinger et al. 1995; Gao et al. 1993). Sobald ODN aus dem endosomalen Kompartiment freigesetzt wurden, gelangen sie schnell, wahrscheinlich durch Diffusion, in den Nukleus (Clarenc et al. 1993). Nachfolgend werden die ODN an nukleäre Bindungsproteine gebunden (Gao et al. 1993). Insofern ist aufgrund der limitierenden Kapazität des Endozytose-Prozesses und lysosomaler Degradation nur eine kleine Menge extrazellulärer Nukleotide im Zytosol der Zielzelle verfügbar. Demzufolge ist ein limitierender Faktor der Wirksamkeit die nur ungenügende Aufnahme der ODN in die Zielzelle. Neueste Studien zeigten, dass eine hohe Aufnahme der ODN in die Zelle die Effektivität der AS-ODN-basierten Therapie wesentlich verbessern kann.
Um die Aufnahme der ODN in die Zelle zu verbessern, wurden verschiedene Methoden entwickelt:

- Mikroinjektion (Leonetti et al. 1991; Stephens und Pepperkok 2001)
- Elektroporation (Flanagan und Wagner 1997; Bergan et al. 1993; Stephens und Pepperkok 2001)
- Streptolysin O, das Zellmembranen permeabilisiert (Stephens und Pepperkok 2001; Walev et al. 2001; Giles et al. 1998)
- Calzium (Wu-Pong et al. 1994; Wu-Pong 1996)

Der Nachteil dieser Methoden ist ihre Verwendung ausschließlich ex vivo aufgrund zellschädigender Wirkungen.

Virale Vektoren sind für den klinischen Gebrauch aufgrund potentieller Virämie und nachteiligen Immunreaktionen, toxischen Auswirkungen, des Risikos der Rekombination mit Wild-Typ Virus, die Biosicherheit betreffenden Gesichtspunkten und unbekannten Langezeiteffekten nur unter Vorbehalt einzusetzen (Miller 1992; Morgan und Anderson 1993; Schofield und Caskey 1995). Auf Grund der genannten Nachteile der verschiedenen Transfektionsmethoden wurde in den vorliegenden Experimenten die bereits etablierte Transfektion vermittels Transfektionsreagenzien gewählt.

Experimente zeigten, dass die Aufnahme der ODN nicht nur zeit- und temperaturabhängig ist, aber auch wesentlich vom Zelltyp, Zellkulturbedingungen, Kulturmedien, Sequenzen und Oligonukleotidlängen abhängt (Crooke und Bennett 1996; Gao et al. 1993). Zusätzlich ist es notwendig, verschiedene Antisense Sequenzen, die zu verschiedenen Regionen entlang der RNA komplementär sind, zu testen, um diejenigen herauszufinden, die effektiv sind (Wagner und Flanagan 1997). Eine Ursache der Ineffektivität mancher AS-ODN wird auf die Unzugänglichkeit der Ziel-RNA aufgrund sekundärer oder tertiärer Strukturbildung der RNA und/oder RNA-gebundener Proteine zurückgeführt (Bennett und Cowsert 1999). Um den oben genannten Vorgaben zu entsprechen, wurde hier eine Optimierung der Transfektion pankreatischer Sternzellen des Menschen als auch denen der Ratte mit den Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect mit drei gegen verschiedene Sequenzanteile des TGFβ1 Genes und dessen mRNA synthetisierten ODN durchgeführt, die in bereits publizierten Studien eine Antisense-Wirkung gezeigt hatten.
Zu diesem Zweck wurden drei Transfektionsreagenzien mit jeweils verschiedenen Transfektionsmechanismen getestet und miteinander verglichen: Diese Arbeit untersucht den Einfluss der kationischen Transfektionsreagenzien Dosper und FuGene6 als auch dem Dendrimer Superfect auf die humane pankreatische Sternzelle und die der Ratte unter ex vivo Kulturbedingungen und deren Einfluss auf die Aufnahme der ODN.
Die getesteten Transfektionsreagenzien vereinen, laut Angaben der Hersteller, eine hohe in vitro Transfektionskapazität für verschiedene Säugetierzelllinien mit einer geringen Toxizität.
Liposomen vermittelte Transfektion (Lipofektion) ist eine einfache und effektive Methode, um DNA in Säugetierzellen einzuschleusen (Felgner et al. 1987; Hug und Sleight 1991; Kronenwett et al. 1998). Die Transfektionseffizienz ist von der DNA-Konzentration, dem Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz und der Zellart abhängig. Nachteile der Lipofektion sind die Toxizität und eine deutlich verringerte Aktivität in Anwesenheit von

Serum. Viele Studien konnten zeigen, dass kationische Lipide vor einer Degradation durch Nukleasen schützen und den Transport der ODN in verschiedene Zelltypen, hauptsächlich mittels Endozytose und bei ausgewählten liposomalen Transfektionsreagenzien selbst in Anwesenheit von Humanserum erleichtern (Bennett et al. 1992; Capaccioli et al. 1993; Zhou und Huang 1994).
Trotz dieser Studienergebnisse erfolgten die Experimente in weitgehender Abwesenheit von fetalem Kälberserum. In den vorliegenden Experimenten wurde mit möglichst geringer fetaler Kälberserum-Konzentration (0,1%) gearbeitet, einerseits um mögliche Interaktionen des Serums mit dem Transfektionsreagenz zu verhindern als auch dem im fetalen Kälberserum vorhanden TGFβ und dessen Effekte, insbesondere der durch TGFβ verursachten parakrinen Stimulationsmechanismen, vorzubeugen.
Uchida et al. bestätigten in kürzlich erfolgten Experimenten die geringere Transfektionseffizienz verschiedener nicht-viraler Vektoren, darunter auch FuGene und Superfect in Anwesenheit von Serum (Uchida et al. 2002).

Das hier verwendete Transfektionsreagenz Dosper von Boehringer-Mannheim ist ein polykationisches liposomales Reagenz. Gute Transfektionseffizienz gepaart mit geringer Toxizität wurden in Experimenten berichtet (Armeanu et al. 2000).
FuGene6 wird vom Hersteller Boehringer-Mannheim als nicht-liposomale Rezeptur durch Mixtur von Lipiden und anderen Komponenten in 80% Ethanol bezeichnet. Gute Transfektionseffizienz in Kombination mit geringer Toxizität wurden für FuGene mehrfach beschrieben (Wiesenhofer et al. 1999; Wiesenhofer und Humpel 2000; Hellgren et al. 2000).
Dendrimere, wie sie beim Superfect vorkommen, sind sphärische Moleküle mit vom Zentrum ausgehenden Aufzweigungen. In vielen Experimenten wird die Effektivität der dendrimer-vermittelten Transfektion beschrieben (Yoo und Juliano 2000).

Viele Faktoren beeinflussen die Effektivität und Sicherheit nicht-viraler Transfektionsmethoden, einschließlich die Struktur, Ladung und Galenik des Transfektionsreagenz (Kichler et al. 1998; Yang und Huang 1998) und des DNA-Transfektionsreagenzkomplexes: Transfektionsratio, Ladung und Größe des Komplexes (Son et al. 2000; Ross und Hui 1999), Transfektionszeit und Interaktion mit Serumkomponenten (Escriou et al. 1998). Einer der wichtigsten Faktoren, der die Transfektion beeinflusst, ist der Zelltyp (Uchida et al. 2002; Armeanu et al. 2000; Dodds et

al. 1998). Eine sorgfältige Optimierung der Transfektion hinsichtlich der Effizienz, Sicherheit und Toxizität bezüglich Transfektionsreagenz und ODN muss demnach für jeden Zelltyp gesondert erfolgen.

V.3 Einfluss des Transfektionsreagenz auf Proliferation, Matrixsynthese und Toxizität pankreatischer Sternzellen

Die Proliferation wurde mittels BrdU-Inkorporation in neu synthetisierte Zell-DNA quantitativ mittels zeitaufgelöster Immunfluoreszenz unter steigenden Transfektionsreagenzkonzentrationen nach der von Bachem et al. beschriebenen Methode bestimmt (Bachem et al. 1995). In einem Vorversuch wurde die steigende Proliferation abhängig von der FKS-Konzentration dargestellt, die bei der Stimulation der Zellen mit 5% FKS 3,5fach höher liegt als bei Stimulation mit 0,1% FKS. In vergleichenden Versuchen mit steigenden Transfektionsreagenzmengen unter 0,1% und 5% FKS zeigten wie erwartet die mit 5% FKS inkubierten humanen pankreatischen Sternzellen bei Verwendung des Dosper und Superfect Transfektionsreagenz eine bessere Proliferation bei dem mit 5% FKS im Vergleich zu den mit 0,1% FKS inkubierten Zellen. Interessanterweise zeigte sich bei den mit FuGene6 inkubierten Zellen eine signifikant bessere Proliferation bei den mit 0,1% FKS im Vergleich mit 5% FKS inkubierten Zellen, was für einen gewissen protektiven Effekt des FuGene6 Transfektionsreagenz auf die pankreatischen Sternzellen oder proliferationsinhibierenden Effekt des FuGene6 in Kombination mit Serumbestandteilen schließen lässt. Hingegen konnten bei pankreatischen Sternzellen der Ratte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der FKS-Konzentration auf die Proliferation eruiert werden. So hatte FuGene6 sowohl bei humanen pankreatischen Sternzellen als auch Sternzellen der Ratte keinen proliferationsinhibierenden Effekt im getesteten Bereich unter Inkubation von 0,1% FKS. Dosper und Superfect zeigten sich bereits ab Konzentrationen von 5µg/ml inhibitorisch auf humane pankraeatische Sternzellen, während die Sternzellen der Ratte erst bei Konzentrationen über 15µg/ml Transfektionsreagenz signifikant proliferationsinhibiert wurden. Insofern sind pankreatische Sternzellen der Ratte hinsichtlich der Proliferationsrate gegenüber den getesteten Transfektionsreagenzien unempfindlicher als humane pankreatische Sternzellen.

Die Matrixsynthese wurde anhand des im Zellkulturüberstand unter steigenden Konzentrationen des Transfektionsreagenz gemessenen zellulären Fibronektins, bezogen

auf die entsprechende DNA Menge mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektrophotometrie basierend auf der Quantifizierung des Europium-Chelates gemessen (Kropf et al. 1991; Diamandis 1988). Während unter Transfektion mit Dosper bei humanen pankreatischen Sternzellen keine signifikante Reduktion der c-Fibronektinsynthese beobachtet werden konnte, zeigte sich bei den Transfektionsreagenzien FuGene6 und Superfect eine signifikante Reduktion der Matrixsynthese bereits ab Konzentrationen von 5µl/ml bzw. 5µg/ml Transfektonsreagenz. Hingegen wurde bei den pankreatischen Sternzellen der Ratte eine signifikante Reduktion der Matrixsynthese bereits ab 2µg/ml Dosper bzw. 2µl/ml FuGene6 und ab 5µg/ml Superfect-Transfektionsreagenz beobachtet. Jedoch erfolgte bei Transfektion mit FuGene6 eine Reduktion der c-Fibronektinsynthese auf unter 60% der Kontrolle erst bei FuGene6 Konzentrationen über 15µl/ml, während eine Reduktion unter 60% der Kontrolle mit Dosper und Superfect bei bereits wesentlich niedrigeren Konzentrationen gemessen werden konnten.

Die Messung des LDH ist eine sensitive Methode zur Messung der Zelltoxizität infolge Zellmembranschäden und ist bei der Messung der Toxizität von Transfektionsmethoden etabliert (Fischer et al. 1999; Lappalainen et al. 1997; Uchida et al. 2002). Die Toxizität der in den Experimenten verwendeten Transfektionsreagenzien wurde durch die Messung des LDH im Zellkulturüberstand bestimmt und der maximalen LDH Freisetzung bei Lyse aller Zellen gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass FuGene6 sowohl bei humanen als auch pankreatischen Sternzellen der Ratte eine nur geringe Toxizität aufweist. Dies ist in Konsens mit den Experimenten von Wiesenhofer et al. an C6 Gliomzellen, die keine toxischen Wirkungen des FuGene, auch bei hohen Konzentrationen, feststellen konnten (Wiesenhofer et al. 1999). Dosper hingegen zeigte sich bei humanen pankreatischen Sternzellen bis zu Konzentrationen von 10µg/ml nicht signifikant toxisch, während pankreatische Sternzellen der Ratte bei bereits 5µg/ml Dosper signifikant toxische Auswirkungen zeigten. Das am stärksten toxische Transfektionsreagenz bei pankreatischen Sternzellen war Superfect. Veranschaulicht wurden diese Ergebnisse durch Anfärbexperimente mit Trypanblau, das toxisch geschädigte Zellen anfärbt. Analog zu den Ergebnissen der Messung der Zelltoxizität mittels LDH Freisetzung zeigten humane pankreatische Sternzellen eine nur geringe Anfärbbarkeit bei Verwendung der Transfektionsreagenzien FuGene6 und Dosper, jedoch eine hohe Zelltoxizität bei bereits geringen Konzentrationen des Superfect Transfektionsreagenz. Hingegen zeigten die pankreatischen Sternzellen der Ratte sowohl bei Dosper als auch Superfect

Transfektionsreagenz eine stark toxische Reaktion bei bereits geringen Konzentrationen, während unter FuGene6 erst bei Konzentrationen über 10 µl/ml FuGene6 anfärbbare Zellen nachweisbar waren.

Zusammengefasst zeigte Dosper bei humanen PSC eine geringere Reduktion der Matrixsynthese, jedoch verminderte Proliferation und höhere Toxizität als FuGene6. Superfect hingegen hemmte die Proliferation und Matrixsynthese und war bereits bei geringen Konzentrationen toxisch. Bei pankreatischen Sternzellen der Ratte zeigte sich kein Unterschied zwischen Dosper und FuGene6 hinsichtlich der Matrixsynthese, jedoch verminderte Dosper im Vergleich zu FuGene6 die Proliferation und war toxischer. Superfect zeigte sich sowohl proliferations-, matrixinhibierend als auch toxisch bei z.T. bereits geringen Konzentrationen.

V.4 Optimierung der Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden

Zunächst wurde eine bestimmte Menge an FITC-markierten AS ODN I, II oder III mit steigenden Konzentrationen an Transfektionsreagenz inkubiert. Der Einsatz FITC markierter ODN ist eine geeignete Methode zur Quantifizierung der ODN Aufnahme in Zellen, da die Menge an aufgenommenen ODN anhand der Fluoreszenzemission gemessen werden kann. Da eine Differenzierung der ODN Aufnahme in lebende und/oder tote Zellen als auch Zellschädigungen infolge toxischer Wirkungen anhand der Fluoreszenzsignale nicht erfolgen kann, wurden zuvor die oben aufgeführten, auf die Toxizität der Transfektionsreagenzien abzielende Experimente durchgeführt. Die Fluoreszenzsignal-Werte der Kontrollzellpopulation wurden von den Gesamtwerten abgezogen und die Fluoreszenzsignale einer Experimentreihe untereinander verglichen.
Hierbei zeigte sich, dass sich bei Transfektion mit AS II und FuGene6 weder bei den humanen pankreatischen Sternzellen noch bei PSC der Ratte keine von der Kontrolle unterscheidenden Fluoreszenzsignale messen ließen. Da es bei AS II unter Transfektion mit FuGene6 Transfektionsreagenz offensichtlich zu Interaktionen kam, die eine ODN Aufnahme in die Zelle verhinderten, wurden im Folgenden diese betreffenden Experimente ausgelassen.

In einem zweiten Experiment wurde die Aufnahme der FITC-markierten ODN in Abhängigkeit von der Konzentration des ODN bei konstanter Menge des Transfektionsreagenz gemessen. Zur Bemessung der Transfektionsreagenzmenge wurden

die Ergebnisse der vorhergehenden Experimente herangezogen. Erst nach sorgfältiger Abwägung der in den Experimenten zur extrazellulären Matrixsynthese, der Proliferation und der Zytotoxizität gewonnen Ergebnisse in Kombination mit den Experimenten zur Transfektionseffizienz wurde die Menge an Transfektionsreagenz festgelegt. Dieses Vorgehen hatte sich in verschiedenen Experimenten bereits bewährt (Takeshita et al. 1994b; Takeshita et al. 1994a; Dodds et al. 1998; Zhou und Huang 1994; Gao und Huang 1991; Hellgren et al. 2000).

Die Experimente ergaben für humane pankreatische Sternzellen eine optimale Konzentration von ODN:Transfektionsreagenz von 1:1 sowohl bei Dosper als auch FuGene6. Hingegen fand Wiesenhofer bei der Transfektion von C6 Gliomzellen eine optimales Verhältnis von 100-160ng DNA pro 1µl FuGene, entsprechend ca. 1:10 (Wiesenhofer et al. 1999), Takeshita fand bei der Optimierung der Transfektion einer arteriellen Organkultur eine optimale DNA:Liposomkonzentration von 1:4 (Takeshita et al. 1994b; Takeshita et al. 1994a) und Dodds transfizierte C2C12 Myoblasten mit Dosper und fand ein optimales DNA: Dosper Verhältnis von 1:2 (Dodds et al. 1998).

Hingegen zeigte die Transfektion mit Superfect bei AS II ein optimales Verhältnis von ODN zu Transfektionsreagenz von 1:2, bei AS I und AS III ein optimales Verhältnis von 1:1. Die pankreatischen Sternzellen der Ratte lassen sich mit Dosper in einem Verhältnis von ODN zu Transfektionsreagenz von 1:2 optimal transfizieren, während bei FuGene6 und Superfect jeweils ein Verhältnis von 1:1 gewählt werden sollte.

Zusammengefasst konnten humane pankreatische Sternzellen am effektivsten mit Dosper Transfektionsreagenz transfiziert werden, während die pankreatischen Sternzellen der Ratte am effektivsten mittels FuGene6 Transfektionsreagenz zu transfizieren waren. Analog hierzu fand Hellgren eine durch FuGene schwerer zu transfizierende Population an humanen Fibroblasten im Vergleich zu Hasen-Fibroblasten, die mittels FuGene effektiv transfiziert werden konnten (Hellgren et al. 2000). Wiesenhofer fand, dass C6 Gliomzellen am effektivsten mit FuGene im Vergleich zu Dosper oder Superfect Transfektionsreagenz zu transfizieren sind (Wiesenhofer et al. 1999). Auch Ohan et al. fanden FuGene als effektivstes Transfektionsreagenz bei der Transfektion von humanen und porcinen mesothelialen Zellen im Vergleich zu Dosper oder Dotap (Ohan et al. 2001).

In einer von Uchida durchgeführten, Toxizität und Transfektionseffizienz vergleichenden Studie mit 6 nicht-viralen Vektoren an einer Reihe verschiedener Zellen (HeLa, HUVEC, HUVSMC, K-562, 293, HuH-7, HL 60, IM-9, HSFB, NB-1, CCD-14Br, SBC-1, A-172, U

937, Jurkat) bewirkte Superfect unter serumfreien Bedingungen höhere Genexpressionen als die anderen verwendeten Transfektionsreagenzien (Uchida et al. 2002). Pankreatische Sternzellen jedoch waren nicht unter den getesteten Zellen. Auch Jong fand bei Hamster Lungenfibroblastzellen und Maus-Bindegewebszellen eine sehr gute Transfektionseffizienz in Kombination mit nur geringer Toxizität bei der Transfektion mit Superfect verglichen mit FuGene (de Jong et al. 2001).

Die in der internationalen Literatur vorliegende, unterschiedlich beschriebene Effizienz und Toxizität der Transfektionsreagenzien in Abhängigkeit des zu transfizierenden Zelltyps unterstreicht die Notwendigkeit der für jeden Zelltyp individuell durchzuführenden Transfektionsoptimierung. Die in den vorliegenden Experimenten gewonnenen Ergebnisse gehen mit den in der Literatur gefundenen Ergebnissen konform.
Wie in vorhergehenden Experimenten (Gao und Huang 1991; Wiesenhofer et al. 1999; Hellgren et al. 2000) beschrieben, steigt die Transfektionseffektivität nicht proportional zur hinzugefügten DNA-Menge, was auch in den hier durchgeführten Experimenten beobachtet werden konnte. Auch ist eine möglichst geringe ODN Konzentration wünschenswert, da dadurch die Mehrheit der nicht-sequenzspezifischen Effekte verhindert werden kann (Stein 1995). Insofern ist die Verwendung einer möglichst niedrigen ODN-Menge anzustreben.

In einem weiteren Experiment wurde die Zeitkinetik mit optimiertem Ansatz anhand der Aufnahme FITC markierter ODN in die Zelle ermittelt. Zusammengefasst kann von einer maximalen Aufnahme der ODN in die pankreatische Sternzelle 6 bis 12h nach Transfektion ausgegangen werden, wonach die Fluoreszenz langsam abnimmt, wohl aufgrund Abbau der FITC-markierten ODN innerhalb der Zelle. Dies entspricht auch der von Wiesenhofer et al. gefundenen maximalen ODN-Aufnahmezeit (Wiesenhofer et al. 1999). Die Kinetik von AS II mit maximalen Werten innerhalb der ersten 2h und danach progredientem Abfall der Fluoreszenzsignale spricht für eine rasche Inaktivierung und Abbau des AS II in der Zelle. Dies könnte Ausdruck dessen sein, dass PSC nicht effektiv mit dem Oligonukleotid AS II transfiziert werden können. Hierfür spricht auch die in den Optimierungsexperimenten beobachtete ineffektive Transfektion von AS II mit FuGene6.
Um den Einfluss des Zeitpunktes der Zelllyse als auch eventuelle pH Einflüsse auf die Fluoreszenzsignale zu ermitteln, wurden im Rahmen eines Experimentes pankreatische Sternzellen mit optimierten Konzentrationen transfiziert und mittels destilliertem Wasser, HEPES oder Triton lysiert. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Tensid, das aufgrund

seines hydrophoben Charakters in der Lage ist, Lipidmembranen aufzulösen (Lasch et al. 1990; Partearroyo et al. 1992; Ruiz et al. 1988). Bei einer mit diesem Tensid behandelten Zelle werden alle Membranen aufgelöst, einschließlich der Lysosomen, die daraufhin das darin enthaltene Material freigeben. Da die Fluoreszenz des FITC vom umgebenden pH abhängt (Tonkinson und Stein 1994; Maxfield 1982) kann hiermit festgestellt werden, inwiefern sich die in Lysosomen befindlichen, allein durch destilliertes Wasser nicht freigesetzten FITC markierten ODN auf die Fluoreszenzergebnisse auswirken. Bei mit Dosper und AS I oder III transfizierten Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Lyse der Zellen mit Wasser oder Triton. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch bezüglich AS II mit höheren Werten der mittels Triton lysierten Zellen. Dies spricht für eine Kumulation FITC markierter ODN im sauren Milieu wie z.B. Lysosomen. Jeweils signifikant höhere Fluoreszenzwerte erhielt man durch Lyse der mit Superfect transfizierten Zellen mit Wasser im Vergleich zu Triton. Nicht unterschiedlich waren die Werte der mittels HEPES und Triton lysierten Zellen.
Die Ergebnisse der mit Superfect durchgeführten Experimente kann durch die toxischen Auswirkungen des Transfektionsreagenz auf die PSC mit konsekutiven Veränderungen des pH Wertes und der dadurch veränderten Fluoreszenz der FITC markierten ODN erklärt werden. Hierfür spricht insbesondere, dass sich im gepufferten System niedrigere Fluoreszenzwerte messen lassen.
Bei der Transfektion mit FuGene6 zeigten sich insbesondere bei der 2. Messung nach 24h der mit Wasser lysierten Zellen signifikante Unterschiede zu den mit Triton lysierten Zellen. Hierfür ist eine Veränderung des pH Wertes und somit der Fluoreszenz am ehesten auf die Wirkung des Transfektionsreagenz FuGene6 zurückzuführen, zumal die initialen Messwerte sich nicht signifikant von den mittels Triton lysierten Zellen unterschieden. Generell zeigten sich, wie erwartet, signifikant höhere Messwerte bei den nach 24Stunden erfolgten Messungen.

Schließlich zeigten mikroskopische Versuche mit FITC markierten ODN die Aufnahme der ODN in die Zelle und insbesondere auch in den Zellkern der pankreatischen Sternzellen. Lappalainen zeigte, dass ODN/Liposomen Komplexe schnell und effektiv durch Endozytose aufgenommen und ins Zytosol freigesetzt wurden (Lappalainen et al. 1997). Entgegen der Theorie, dass die endgültige Ladung des DNA-Liposomen Komplexes positiv sein muss, um DNA in die Zelle zu transportieren (Zhou und Huang 1994) zeigte sich eine effektive Aufnahme auch bei negativ geladenen ODN-Liposom Komplexen,

jedoch scheint bei positiv geladenen Komplexen eine schnellere Freisetzung aus intrazellulären Vesikeln ins Zytosol zu erfolgen. Bei Akagi (Akagi et al. 1996), Beltinger (Beltinger et al. 1995) und hier zeigten sich deutliche ODN Anreicherungen unter anderem auch im Zellkern, während Lappalainen et al. nur einen kleinen Anteil der ODN im Nukleus der von Lappalainen et al. transfizierten CaSki Zellen lokalisiert fand (Lappalainen et al. 1997). Die Ergebnisse sind aufgrund verschiedener Detektionsmethoden, Transfektionsmethoden und Zelltypen nur schwer vergleichbar.

V.5 Reduktion der Matrixsynthese durch Antisense-Oligonukleotide

Reduktion der Matrixsynthese durch AS I ODN

Für die Versuche zur Matrixreduktion durch ODN wurde eine Technik angewandt, bei der die Transfektion durch die mehrmalige Gabe des Transfektionsreagenz-DNA-Gemisches in 3 aufeinander folgenden Schritten erfolgte. Durch wiederholte Transfektion erhöht sich die Chance, diejenigen ODN in die Zellen zu transferieren, die während der ersten oder zweiten Gabe nicht transfiziert wurden. Ein solches Vorgehen wurde mehrfach beschrieben (Wiesenhofer et al. 1999; Wiesenhofer und Humpel 2000).

Nachdem Itoh die TGFβ1 AS I Sequenz erfolgreich bei kultivierten glatten Muskelzellen erprobt hatte (Itoh et al. 1993), konnte Akagi mittels derselben Sequenz eine Reduktion der extrazellulären Matrixsynthese bei der experimentellen Glomerulonephritis nachvollziehen (Akagi et al. 1996). In den folgenden Experimenten wurde die bereits etablierte ODN Sequenz verwendet und phosphorothioatmarkiert, um die Stabilität gegenüber zellulären und Serumnukleasen zu erhöhen (Stein 1995). Die extrazelluläre Matrixakkumulation konnte bei Agaki im Vergleich zu den unbehandelten, mit SCR, SE oder Reverse ODN transfizierten Zellen der Ratte durch AS ODN um ca. 37% signifikant gesenkt werden (Akagi et al. 1996).

Signifikante Reduktion des c-Fibronektin mittels AS I gelang bei den humanen pankreatischen Sternzellen nur um 23% im Vergleich zur Kontrolle der allein mit Dosper Transfektionsreagenz stimulierten Zellen. Hingegen zeigte sich bei den pankreatischen Sternzellen der Ratte eine signifikante Reduktion auf 48,7% der allein mit Dosper stimulierten Zellen, was einer Reduktion analog der von Akagi gewonnen Ergebnisse darstellt (Akagi et al. 1996). Im Vergleich hierzu gelang Kandenwein eine Suppression der c-Fibronektinsynthese bei humanen pankreatischen Sternzellen durch Zugabe von Anti-TGFβ um ca. 39,7% (Kandenwein 2000). Zwar liegen die hier gewonnen Ergebnisse bei humanen pankreatischen Sternzellen unter diesem Wert, die Ergebnisse an den Zellen der

Ratte jedoch zeigten im Vergleich eine höhere Effizienz. Insofern untermauern die hier gewonnen Ergebnisse das Modell der autokrinenWachstumskontrolle.

Mittels PCR konnten keine Veränderungen des Gehaltes an TGFβ1 mRNA nachgewiesen werden. Insofern ist der Antisense Effekt nicht auf eine Regulation auf Transkriptions- sondern auf der Translationsebene zu vermuten. Auch Shen kam bei seinen Experimenten zu TGFβ2 bei Osteoblasten zu demselben Schluss (Shen et al. 2001).

V.6 Triple Helix

Eine weitere Möglichkeit, Genexpression bereits bei der Transkription zu unterbrechen, setzt ODN ein, die in der Lage sind, spezifisch mit der Doppelstrang DNA zu hybridisieren, so genannte TFO (Triple-helix Forming Oligodeoxynucleotide) (Maher, III et al. 1989; Maher, III 1996; Chan und Glazer 1997). Solche Triple-Strang Moleküle werden bevorzugt innerhalb der großen Kurvatur der Helix gebildet (Moser und Dervan 1987), wenn auch Triplettbildungen an der kleinen Kurvatur beschrieben wurden (Afonina et al. 1996).

TFO sind einerseits in der Lage, die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor des Gens und somit eine Transkription zu verhindern, alternativ kann durch Veränderung der physikalischen Gegebenheiten der Promotor-DNA die Duplexentwindung beim Transkriptionsvorgang beeinträchtigt und somit die Transkription der Gene innerhalb der Triplexformation verhindert werden (Grigoriev et al. 1992; Maher, III 1992). TFOs wurden u.a. dazu genutzt, gezielt permanente und vererbbare Mutationen mit Veränderungen bestimmter Genexpressionen zu induzieren (Havre et al. 1993; Sandor und Bredberg 1994; Vasquez et al. 1999; Vasquez et al. 2000; Barre et al. 2000). Jede Base muss in der Lage sein, 2 Hydrogenbindungen mit der komplementären Base in der Duplex einzugehen, so genannte Hoogsteen Bindungen (Faucon et al. 1996; Chan und Glazer 1997; Praseuth et al. 1999).

In den hier erfolgten Experimenten zeigte sich eine gute Funktion des Pyrimidin-Motives in Zellkulturbedingungen trotz der in der Literatur beschriebenen, mit dem pH steigenden Triplex-Instabilität (Helene und Toulme 1990; Lavelle und Fresco 1995). Die Stabilität der Triple-Helix hängt einerseits von der Länge des TFO ab, wobei ein Minimum an 13 Nukleotiden (Svinarchuk et al. 1994) empfohlen wird und der Anwesenheit von „Mismatch“ Nukleotiden. Selbst nicht-modifizierte ODN zeigten sich, einmal in die Zelle gelangt, als stabil (Svinarchuk et al. 1996). ODN, die an alternierende Stränge der

Doppelhelix binden, umgehen die Voraussetzung einer Polypurin-Polypyrimidin Sequenz innerhalb der Ziel DNA (de Bizemont et al. 1996).

Insofern existieren zumindest zwei strukturelle Klassen von TFO, die sich in Sequenzzusammensetzung und relativer Orientierung des Phosphat-Deoxyribose-Rückgrates unterscheiden: Beim Pyrimidinmotiv bindet der dritte Strang parallel zum Purinstrang der Duplex (T.A*T und C.G*C-Triplets) (Moser und Dervan 1987; de los et al. 1989; Rajagopal und Feigon 1989). Das Cytosin muss protoniert werden, was nur unter sauren Bedingungen (pH kleiner 7) stattfinden kann und diese Triplex sehr pH abhängig macht (Lavelle und Fresco 1995; Husler und Klump 1995). Trotz dieses Nachteils wurden DNA Triplexe dieses Motivs bei neutralem pH berichtet (Lee et al. 1984; Xodo et al. 1991).

Das Purin Motiv bindet an den Purin Strang der Duplex durch reverse Hoogsteen Hydrogen Bindungen (C.G*G, T.A*A, T.A*T). ODN, die G und T beinhalten, können auch parallel orientiert an eine Polypurin Zielsequenz binden, insofern ist die Orientierung der G und T-haltigen ODN sequenzabhängig. Diese Triplexe benötigen häufig eine hohe kationische Konzentration. Zusätzlich ist der dritte, G-reiche Strang geneigt, intra- oder intermolekulare Strukturen mit der Bildung von G-Tetraden auszubilden. Solche Strukturen werden durch physiologische Konzentrationen monovalenter Kationen (z.B. Kalium) stabilisiert, was die Selbst-Assoziation in vivo wahrscheinlich macht. Insofern ist die Fähigkeit des TFOs, an seine Zielsequenz zu binden, reduziert (Cheng und Van Dyke 1993; Milligan et al. 1993; Olivas und Maher, III 1995). Purin ODN haben das Potential, eine weitere konkurrierende Struktur zu bilden, eine G.A Parallel-Duplex (Noonberg et al. 1995).

Die stabilsten Triplexe werden geformt, wenn der dritte Strang antiparallel zum nativen homologen Strang bindet. ODN sind in der Lage, zwischen DNA Sequenzen, die sich durch ein Basenpaar unterscheiden, zu diskriminieren. Eine falsche Base in der Mitte des ODN destabilisiert das ODN stärker als eine peripher gelegene Unstimmigkeit (Frank-Kamenetskii und Mirkin 1995; Beal und Dervan 1991; Mergny et al. 1991; Durland et al. 1991).

Ein TFO, das an Promotoren eines Genes bindet, kann die Formation des Transkriptions-Initiations-Komplexes durch Bindung an einen Polypurin-polypyrimidin Trakt eines Genpromotors oder die Transkriptionselongation verhindern (Kim et al. 1998).

Einige Studien konnten zeigen, dass durch die Bindung von TFOs an verschiedene Promotoren mit konsekutiver Triple-Helix-Bildung die Expression klinisch wichtiger Gene

inhibiert wurden (Olivas und Maher, III 1996; Ebbinghaus et al. 1999; Kim und Miller 1998; Kochetkova et al. 1997; Joseph et al. 1997; Ritchie et al. 2000). Weiterhin konnte in zahlreichen Studien eine Inhibition der Transkription durch TFOs auch in Säugetierzellen gezeigt werden (Faria et al. 2000; Ing et al. 1993): Triplexbildung mit dem humanen c-myc Promotor inhibiert auch die Bindung des Regulators und blockierte die Transkription von c-myc in einem in vitro-Transkriptionssystem (Kim und Miller 1995; Kim et al. 1998; Kim und Miller 1998). Kürzlich konnte Datta Triplex-induzierte Rekombination in zellfreien Systemen nachweisen und schlägt den Gebrauch von TFOs zu gezielten Genveränderung in humanen Zellen vor (Datta et al. 2001). Studien jedoch zeigten auch, dass Triplex-Formation mutagen wirken kann (Wang et al. 1996).

Khanna et al. zeigten 1994 zum ersten Mal, dass ein gegen die Promotorregion des TGFβ1 Genes gerichtetes, phosphorothioatmarkiertes ODN die TGFβ1 Expression in humanen A-549 Adenokarzinomzellen verhinderte. Eine Triple-Helix Bildung wurde den genannten Effekten als wahrscheinlich zugrunde gelegt (Khanna et al. 1994; Khanna et al. 1996). Seither konnte in multiplen weiteren Versuchen dieser Wirkmechanismus genutzt und belegt werden (Kim et al. 1998; Kim und Miller 1998; Faria et al. 2000; Ing et al. 1993).

Nach diesem Prinzip ist eine Wirkung des AS III ODN zu erwarten. Durch einen Gel-Shift Assay konnte die Triplex-Bildungsfähigkeit des AS III dargestellt werden. In den daraufhin folgenden Experimenten konnte jedoch für das AS III nicht die erwartete Matrixreduktion nachgewiesen werden. SE III hingegen war in der Lage, die Matrixbildung zu reduzieren. Dies konnte sowohl in Versuchen zur Synthese der Matrixkomponenten Fibronektin und Kollagen Typ I als auch vermittels PCR auf mRNA Ebene und anschaulich durch Immunfluoreszenzen von Kollagen Typ I, III und Fibronektin dargestellt werden. Ursache hierfür können einerseits eine nicht-sequenzspezifische Interaktion des SE III sein, die konsekutiv zu verminderter Matrixsynthese führt. Auch könnte eine Verwechslung der SE/AS Proben im Rahmen des Herstellungsverfahrens zu den unerwartet abweichenden Ergebnissen geführt haben.

Auch nicht-sequenzspezifische Effekte der AS-ODN können therapeutisch nutzbare Eigenschaften haben. Insbesondere im Rahmen der HIV Forschung konnte die Bindung des HIV an Zielproteine der Zelle durch derartige Mechanismen verhindert werden (Levin 1999; Wyatt et al. 1994). In diesem Zusammenhang betont Stein, dass auch nicht-sequenzspezifische Effekte der ODN potentiell ebenso therapeutisch wertvoll und nutzbar sein können wie sequenzspezifische Effekte (Stein 1995).

V.7 ODN als Therapieoption

AS-ODN sind zur wirksamen und spezifischen Inhibition der Genexpression in vitro und in vivo imstande (Bennett 1998; Dean und McKay 1994). Außer als wissenschaftliches Instrument zur Erforschung von Genfunktionen in vitro und in vivo bietet sich die Nutzung der AS-Eigenschaften zur Therapie bestimmter, mit veränderter Genexpression einhergehender Erkrankungen an (Bennett und Cowsert 1999).

Die Antisense Technologie wurde in verschiedenen Studien bereits angewandt, insbesondere gegen virale Pathogene wie HIV, CMV und HPV als auch gegen Tumorwachstum als Anti-neoplastische Agenzien mit teils ermutigenden Ergebnissen (Wagner et al. 1996). Als erstes AS-Arzneimittel wurde Fomivirsen zur intravitrealen Injektion zur Therapie der CMV-Retinitis bei AIDS von der FDA zugelassen. AS-ODN wurden bei HIV (Zhang et al. 1995), M. Crohn (Robertson 1997), zur Knochenmarkbearbeitung (Calabretta et al. 1991) bereits angewandt, ein großes Feld therapeutischer Anwendungen liegt in der Hämatologie (Vaerman et al. 1995; de Fabritis et al. 1995; Skorski et al. 1997). ODN als Antikoagulanzien wurden ebenfalls beschrieben (Tasset et al. 1997) mit eventueller therapeutischer Anwendbarkeit bei Patienten mit heparin-induzierter Thrombozytopenie.

AS-ODN in vivo scheinen sowohl über intravenösen Weg (Temsamani et al. 1997), subcutan (Leeds et al. 2000) als auch, in geringerem Ausmaß, gastrointestinal (Agrawal et al. 1995; Geary et al. 2001) aufgenommen zu werden. Die schwache Korrelation der in vitro und in vivo Transfektionsaktivität (Yoshimura et al. 1992) kann zum Teil auf vorzeitige Freisetzung der DNA in vivo zurückgeführt werden (Xu und Szoka, Jr. 1996). Studien an Menschen mit Leukämie (Iversen et al. 1995; Bayever et al. 1993) und Acqired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (Zhang et al. 1995) zeigten kürzere Halbwertszeiten der AS-ODN als tierexperimentell beobachtet, was am ehesten auf artspezifische Unterschiede in der metabolischen Kapazität, renalen Clearance und Serumproteinbindung zurückgeführt werden kann. Der zögerliche Metabolismus der ODN wird durch den langsamen Abbau durch Exo- und Endonukleasen erklärt (Crooke und Bennett 1996).

Als Nebenwirkungen bei ALL Patienten wurden leichte Erhöhungen der yGT, vorübergehend metallischer Geschmack, Übelkeit und Erbrechen beschrieben (Bayever et al. 1993). Weitere Nebenwirkungen, die bei der Therapie mit AS-ODN in Betracht gezogen werden müssen, sind Effekte – abhängig von der Zielsequenz der ODN - mit Suppression der Genexpression nicht nur der Zielzellen aber auch gesunder Zellen. Weiterhin wurden nicht-spezifische Nebenwirkungen wie Thrombozytopenie bei

phosphorothioatmarkierten ODN beschrieben (Stein und Cheng 1993). Kardiovaskuläre Toxizität und Todesfälle bei Affen nach intravenöser Applikation von phosphorothioatmarkierten ODN wurden ebenfalls beschrieben (Galbraith et al. 1994), wobei diese Nebenwirkungen nur bei hohen Dosen (5-10mg/kg) und nach schneller Bolusinfusion beobachtet wurden. Die toxischen Effekte wurden am ehesten auf Komplementaktivierungen zurückgeführt, jedoch könnten auch Anaphylatoxine, Eicosanoide, Leukotriene oder Zytokine eine Rolle spielen (Gewirtz et al. 1998; Crooke und Bennett 1996). Insgesamt wird das toxische Potential von phosphorothioatmarkierten ODN als eher gering und zunehmend kalkulierbar eingestuft (Iversen et al. 1995; Levin 1999). Zahlreiche Studien konnten die Selektivität der Phosphorothioat ODN für das Zielprotein zeigen (Stein und Cheng 1993; Stein und Narayanan 1994). Nicht-sequenzspezifische und toxische Effekte der Phosphorothioat ODN sind häufig vermutlich auf das ODN selbst mit konsekutiv fehlender Spezifität und ungenügender Reinheit zurückzuführen (Krieg et al. 1991).

Ein weiterer Mechanismus, der bei Experimenten mit AS ODN beobachtet wurde, sind unspezifische (aptamerische) Effekte, die jedoch gleichsam nützlich wie spezifische AS Effekte hinsichtlich des Erreichens des gewünschten biologischen Effektes sein können (Gewirtz et al. 1998). U.a. sind ODN in der Lage, an Proteine zu binden und dort durch sequenz-spezifische, z.B. an Thrombin, sequenz-unspezifische, z.B. Serumalbumin als auch strukturspezifische Bindungsereignisse antisense-ähnliche Wirkungen hervorzurufen (Crooke und Bennett 1996).

Nukleinsäurebasierte Therapeutika mit ihrer Potenz zu hoher molekularer Spezifität bei nur geringer Toxizität (San et al. 1993) sind attraktive pharmazeutische und therapeutische Perspektiven zur Therapie der verschiedensten, mit genetischen Aberrationen oder Überexpression von bestimmten Transkriptionsprodukten einhergehenden Erkrankungen.

Dean gelang durch Antisense gegen ProteinKinase C-α der Beweis systemischer Antisense-Aktivität und potentieller Spezifität solcher Medikamente (Dean und McKay 1994). In vielen weiteren Experimenten konnte dies bestätigt werden (Wagner 1994; Stepkowski et al. 1994).

Ein wichtiger Meilenstein in der therapeutischen Anwendung von AS ODN ist einerseits der Transport der ODN durch die Zellmembran mit Erreichen der Zielsequenz in einer bioaktiven Form und andererseits die Konstruktion eines effektiven AS-ODN, das im Stande ist, an einer komplex gefalteten RNA oder DNA anzugreifen. Dies erfordert initial die Optimierung der Transfektionsbedingungen hinsichtlich optimalem

Transfektionsreagenz, Matrixsynthese, Proliferation, Toxizität, optimaler ODN:Transfektions-Ratio und Kinetik für die jeweils gewählte Zellart. Anschließend kann die Transfektion mit verschiedenen ODN und konsekutivem Beweis der AS-Funktion durch Reduktion der Proteinexpression erfolgen. Diese experimentellen Schritte wurden im Rahmen der hier vorgestellten Experimente an der pankreatischen Sternzelle des Menschen und der Ratte vollzogen. Der nächste Schritt ist die in-vivo Untersuchung der Effizienz der ODN. Insofern bereiteten die Experimente eine potentielle klinische Anwendung im Rahmen der chronischen Pankreatitis vor. Dies wurde durch die Optimierung der Transfektionsbedingungen, insbesondere im Hinblick auf die Toxizität, vorbereitet und in Experimenten zur Wirkung der ODN auf die extrazelluläre Matrixsynthese realisiert. Durch ODN gegen TGFβ konnte die extrazelluläre Matrixsynthese sowohl bei pankreatischen Sternzellen des Menschen als auch der Ratte inhibiert werden, was u.a. durch Immunfluoreszenzfärbungen und Reduktion der Matrixsynthese gezeigt werden konnte.

VI. Zusammenfassung

Pankreatische Sternzellen (PSC) sind verantwortlich für die exzessive extrazelluläre Matrixsynthese bei chronischer Pankreatitis und dem duktalen Adenokarzinom des Pankreas. Neuere Befunde deuten darauf hin, dass Transforming Growth Factor ß1 (TGFß1) über parakrine und autokrine Mechanismen die extrazelluläre Matrixsynthese von PSC stimuliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die autokrine Stimulation der Matrixsynthese über TGFß1 bei kultivierten PSC des Menschen und der Ratte durch den Einsatz von Anti-Sense-Oligonukleotiden (AS-ODN) gegen TGFβ1 nachzuweisen.

Da verschiedene Zellpopulationen stark variierende Empfindlichkeiten gegenüber unterschiedlichen Transfektionsreagenzien aufweisen, wurden zunächst die Auswirkungen der Transfektionsreagenzien Dosper, FuGene6 und Superfect auf die Zellproliferation und Matrixsynthese untersucht. Gleichzeitig wurden die optimalen Konzentrationen (höchste Transfektionseffizienz bei geringster Zellschädigung) der verschiedenen Transfektionsreagenzien ermittelt. Die Auswirkungen auf die Proliferation wurden durch quantitative Messung der Bromodeoxy-Uridin-Inkorporation gemessen. Die Beeinflussung der extrazellulären Matrixsynthese wurde durch Bestimmung der Fibronektinkonzentration und durch Immunfluoreszenzfärbungen von Kollagen und Fibronektin untersucht. Zellschädigende Effekte der Transfektionsreagenzien (und AS-ODNs) wurden durch quantitative Messung des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) und durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Mit Hilfe fluoreszeinmarkierter ODNs wurde die Transfektionseffizienz ermittelt und durch Fluoreszenzmikroskopie konnten die aufgenommenen ODNs in den PSC lokalisiert werden. Drei verschiedene in der Literatur beschriebene TGFß1 AS-ODNs wurden eingesetzt. Eines dieser AS-ODNs (AS-III) bildet eine dreifach-Helix mit dem TGFß1-Promoter und inhibiert somit die Transkription. Die beiden anderen AS-ODNs (AS-I und AS-II) sollen nach Literaturangaben die Degradation der TGFß1-mRNA beschleunigen bzw. den Transport der TGFß1-mRNA aus dem Zellkern hemmen.

Ergebnisse: Das Transfektionsreagenz Dosper beeinflusst bei hPSC die Matrixsynthese nicht, während Superfect und FuGene6 bereits ab Konzentrationen von 5µg/ml bzw. 5µl/ml die Fibronektinsynthese signifikant reduzieren. Bei kultivierten rPSC war die Fibronektinsynthese bereits bei 2µg/ml Dosper bzw. FuGene6 und 15µg/ml Superfect signifikant vermindert. FuGene6 inhibierte die Proliferation weder bei hPSC noch bei rPSC, während Dosper und Superfect bereits ab Konzentrationen von 5µg/ml bei hPSC und 15µg/ml bei rPSC eine proliferationsinhibierende Wirkung aufwiesen. Superfect war

das am stärksten toxische Transfektionsreagenz. FuGene6 wies eine nur geringe Toxizität auf und Dosper wirkte bei hPSC ab 10µg/ml und bei rPSC ab 5µg/ml zytotoxisch.
In Optimierungsexperimenten mit den drei verschiedenen fluoreszeinmarkierten AS-ODNs wurden bei folgenden optimalen Transfektionsraten ermittelt. Bei hPSC: AS-ODN:Dosper = 1:1; AS-ODN:Fugene6 = 1:1; AS-ODN:Superfect = 1:2 für ASII, 1:1 für ASI und ASIII. Bei rPSC: AS-ODN:Dosper = 1:2; AS-ODN:FuGene6 = 1:1; AS-ODN:Superfect = 1:1. hPSC konnten am effektivsten mit Dosper, rPSC am effektivsten mit FuGene6 transfiziert werden. In kinetischen Studien wurde der zeitliche Verlauf der Oligonukleotidaufnahme ermittelt. Die maximale Aufnahme der ODN in die PSC fand sich in den ersten 6 bis 12 Stunden nach Transfektion.
Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten verschiedener Zelllyseansätze wies darauf hin, dass AS I und III im Zytosol und AS II wahrscheinlich in Lysosomen kumulieren. Mikroskopisch konnte die Aufnahme fluoreszeinmarkierter ODN in die Zelle und insbesondere auch in den Zellkern der PSC gezeigt werden.
Basierend auf den Ergebnissen der Optimierungsexperimente wurden sodann die PSC mit zwei verschiedenen AS-ODNs transfiziert und die Fibronektinsynthese gemessen. Das TGFß1-AS-ODN I reduzierte bei rPSC die Fibronektinsynthese auf 48,7%, bei hPSC um 23%. Messungen der TGFß1-mRNA Konzentration nach Transfektion mit dem AS-ODN I deuten darauf hin, dass der Antisense-Effekt durch eine Regulation auf Translationsebene erfolgte.
Durch Gel-Shift Assay konnte die Dreifach-Helix-Bildung des AS-ODN III nachgewiesen werden. Für AS-ODN III fand sich jedoch nicht die erwartete Matrixreduktion. Hingegen war SE-ODN III (Sense) in der Lage, die Matrixbildung zu reduzieren, was anhand der Immunfluoreszenzmikroskopie von Fibronektin, Kollagen Typ I und Kollagen Typ III als auch auf mRNA Ebene nachgewiesen wurde. Ursächlich hierfür könnte eine nicht-sequenzspezifische Interaktion des SE-ODN III sein, die konsekutiv zu einer verminderten Matrixsynthese führt.
Insgesamt belegen die hier erarbeiteten Ergebnisse, dass pankreatische Sternzellen unter Verwendung bestimmter Transfektionsreagenzien effektiv mit AS-ODNs zu transfizieren sind. Das TGFß1-inhibierende AS-ODN I war in der Lage, die autokrin stimulierte Matrixsynthese bei PSCs der Ratte und des Menschen zu reduzieren. Somit untermauern die Experimente das Modell einer autokrin stimulierten Fibrogenese über TGFß1 bei pankreatischen Sternzellen im Rahmen einer chronischen Pankreatitis.

VII. Literatur

Abe, M., Oda, N., Sato, Y.: Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. J Cell Physiol 174: 186-193 (1998)

Adler, G. und Schmid, R.M.: Chronic pancreatitis: still puzzling? Gastroenterology 112: 1762-1765 (1997)

Afonina, I., Kutyavin, I., Lukhtanov, E., Meyer, R.B., Gamper, H.: Sequence-specific arrest of primer extension on single-stranded DNA by an oligonucleotide-minor groove binder conjugate. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 3199-3204 (1996)

Agrawal, S., Zhang, X., Lu, Z., Zhao, H., Tamburin, J.M., Yan, J., Cai, H., Diasio, R.B., Habus, I., Jiang, Z.: Absorption, tissue distribution and in vivo stability in rats of a hybrid antisense oligonucleotide following oral administration. Biochem Pharmacol 50: 571-576 (1995)

Akagi, Y., Isaka, Y., Arai, M., Kaneko, T., Takenaka, M., Moriyama, T., Kaneda, Y., Ando, A., Orita, Y., Kamada, T., Ueda, N., Imai, E.: Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. Kidney Int 50: 148-155 (1996)

Alvarez, R.J., Sun, M.J., Haverty, T.P., Iozzo, R.V., Myers, J.C., Neilson, E.G.: Biosynthetic and proliferative characteristics of tubulointerstitial fibroblasts probed with paracrine cytokines. Kidney Int 41: 14-23 (1992)

Ammann, R.W.: A clinically based classification system for alcoholic chronic pancreatitis: summary of an international workshop on chronic pancreatitis. Pancreas 14: 215-221 (1997)

Ammann, R.W., Akovbiantz, A., Largiader, F., Schueler, G.: Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients. Gastroenterology 86: 820-828 (1984)

Ammann, R.W., Heitz, P.U., Kloppel, G.: Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study. Gastroenterology 111: 224-231 (1996)

Ammann, R.W. und Muellhaupt, B.: The natural history of pain in alcoholic chronic pancreatitis. Gastroenterology 116: 1132-1140 (1999)

Ammann, R.W., Muellhaupt, B., Meyenberger, C., Heitz, P.U.: Alcoholic nonprogressive chronic pancreatitis: prospective long-term study of a large cohort with alcoholic acute pancreatitis (1976-1992). Pancreas 9: 365-373 (1994)

Andres, J.L., Stanley, K., Cheifetz, S., Massague, J.: Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. J Cell Biol 109: 3137-3145 (1989)

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

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

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

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

Armeanu, S., Pelisek, J., Krausz, E., Fuchs, A., Groth, D., Curth, R., Keil, O., Quilici, J., Rolland, P.H., Reszka, R., Nikol, S.: Optimization of nonviral gene transfer of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. Mol Ther 1: 366-375 (2000)

Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., Sporn, M.B.: Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. J Biol Chem 258: 7155-7160 (1983)

Atherton, B.T. und Hynes, R.O.: A difference between plasma and cellular fibronectins located with monoclonal antibodies. Cell 25: 133-141 (1981)

Bachem, M., Dietz, R., Gressner, A.M.: Quantitative determination of cell proliferation using incorporation fo 5-bromo-2-deoxyuridine, monoclonal antibody against 5-bromo-2-deoxyuridine and time-resolved fluorometry fo europium chelate. Eur J Clin Chem Clin Biochem 33 (1995)

Bachem, M.G., Meyer, D., Schafer, W., Riess, U., Melchior, R., Sell, K.M., Gressner, A.M.: The response of rat liver perisinusoidal lipocytes to polypeptide growth regulator changes with their transdifferentiation into myofibroblast-like cells in culture. J Hepatol 18: 40-52 (1993a)

Bachem, M.G., Riess, U., Melchior, R., Sell, K.M., Gressner, A.M.: Transforming growth factors (TGF alpha and TGF beta 1) stimulate chondroitin sulfate and hyaluronate synthesis in cultured rat liver fat storing cells. FEBS Lett 257: 134-137 (1989)

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

Bachem, M.G., Schuftan, G., Schirrmacher, P., Gressner, A.M.: Feedback mechanisms between alpha 2M and TGF beta 1 reduce extracellular matrix synthesis of liver fat-storing cells. Ann N Y Acad Sci 737: 421-424 (1994)

Bachem, M.G., Sell, K.M., Melchior, R., Kropf, J., Eller, T., Gressner, A.M.: Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 63: 123-130 (1993b)

Ballardini, G., Fallani, M., Biagini, G., Bianchi, F.B., Pisi, E.: Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 56: 45-49 (1988)

Barre, F.X., Ait-Si-Ali, S., Giovannangeli, C., Luis, R., Robin, P., Pritchard, L.L., Helene, C., Harel-Bellan, A.: Unambiguous demonstration of triple-helix-directed gene modification. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 3084-3088 (2000)

Bassols, A. und Massague, J.: Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. J Biol Chem 263: 3039-3045 (1988)

Battegay, E.J., Raines, E.W., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Ross, R.: TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. Cell 63: 515-524 (1990)

Bayever, E., Iversen, P.L., Bishop, M.R., Sharp, J.G., Tewary, H.K., Arneson, M.A., Pirruccello, S.J., Ruddon, R.W., Kessinger, A., Zon, G., .: Systemic administration of a phosphorothioate oligonucleotide with a sequence complementary to p53 for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: initial results of a phase I trial. Antisense Res Dev 3: 383-390 (1993)

Beal, P.A. und Dervan, P.B.: Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation. Science 251: 1360-1363 (1991)

Bedossa, P., Lemaigre, G., Bacci, J., Martin, E.: Quantitative estimation of the collagen content in normal and pathologic pancreas tissue. Digestion 44: 7-13 (1989)

Bedossa, P. und Paradis, V.: Transforming growth factor-beta (TGF-beta): a key-role in liver fibrogenesis. J Hepatol 22: 37-42 (1995)

Behl, C., Winkler, J., Bogdahn, U., Meixensberger, J., Schligensiepen, K.H., Brysch, W.: Autocrine growth regulation in neuroectodermal tumors as detected with oligodeoxynucleotide antisense molecules. Neurosurgery 33: 679-684 (1993)

Beltinger, C., Saragovi, H.U., Smith, R.M., LeSauteur, L., Shah, N., DeDionisio, L., Christensen, L., Raible, A., Jarett, L., Gewirtz, A.M.: Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides. J Clin Invest 95: 1814-1823 (1995)

Bennett, C.F.: Antisense oligonucleotides: is the glass half full or half empty? Biochem Pharmacol 55: 9-19 (1998)

Bennett, C.F., Chiang, M.Y., Chan, H., Shoemaker, J.E., Mirabelli, C.K.: Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. Mol Pharmacol 41: 1023-1033 (1992)

Bennett, C.F. und Cowsert, L.M.: Antisense oligonucleotides as a tool for gene functionalization and target validation. Biochim Biophys Acta 1489: 19-30 (1999)

Bergan, R., Connell, Y., Fahmy, B., Neckers, L.: Electroporation enhances c-myc antisense oligodeoxynucleotide efficacy. Nucleic Acids Res 21: 3567-3573 (1993)

Bertelli, R., Valenti, F., Oleggini, R., Caridi, G., Altieri, P., Coviello, D.A., Botti, G., Ravazzolo, R., Ghiggeri, G.M.: Cell-specific regulation of alpha1(III) and alpha2(V) collagen by TGF-beta1 in tubulointerstitial cell models. Nephrol Dial Transplant 13: 573-579 (1998)

Bhatia, E., Choudhuri, G., Sikora, S.S., Landt, O., Kage, A., Becker, M., Witt, H.: Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. Gastroenterology 123: 1020-1025 (2002)

Bimmler, D., Graf, R., Scheele, G.A., Frick, T.W.: Lithostatine is a Crystal Inhibitor in Vitro, but is it a relevant Inhibitor In Vivo. International Journal of Pancreatology 19: 213 (1996)

Bockman, D.E., Buchler, M., Beger, H.G.: Ultrastructure of human acute pancreatitis. Int J Pancreatol 1: 141-153 (1986)

Bockman, D.E., Buchler, M., Malfertheiner, P., Beger, H.G.: Analysis of nerves in chronic pancreatitis. Gastroenterology 94: 1459-1469 (1988)

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

Bordalo, O., Goncalves, D., Noronha, M., Cristina, M.L., Salgadinho, A., Dreiling, D.A.: Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis. Am J Gastroenterol 68: 278-285 (1977)

Border, W.A. und Ruoslahti, E.: Transforming growth factor-beta 1 induces extracellular matrix formation in glomerulonephritis. Cell Differ Dev 32: 425-431 (1990)

Bradley, E.L., III: A clinically based classification system for acute pancreatitis. Ann Chir 47: 537-541 (1993)

Braganza, J.M.: Pancreatic disease: a casualty of hepatic "detoxification"? Lancet 2: 1000-1003 (1983)

Braganza, J.M.: The pathogenesis of chronic pancreatitis. The Quarterly Journal of Medicine 89: 243-250 (1996)

Broekelmann, T.J., Limper, A.H., Colby, T.V., McDonald, J.A.: Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 6642-6646 (1991)

Burger, A., Wagner, C., Viedt, C., Reis, B., Hug, F., Hansch, G.M.: Fibronectin synthesis by human tubular epithelial cells in culture: effects of PDGF and TGF-beta on synthesis and splicing. Kidney Int 54: 407-415 (1998)

Bursch, W., Oberhammer, F., Jirtle, R.L., Askari, M., Sedivy, R., Grasl-Kraupp, B., Purchio, A.F., Schulte-Hermann, R.: Transforming growth factor-beta 1 as a signal for induction of cell death by apoptosis. Br J Cancer 67: 531-536 (1993)

Calabretta, B., Sims, R.B., Valtieri, M., Caracciolo, D., Szczylik, C., Venturelli, D., Ratajczak, M., Beran, M., Gewirtz, A.M.: Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myb antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 2351-2355 (1991)

Capaccioli, S., Di Pasquale, G., Mini, E., Mazzei, T., Quattrone, A.: Cationic lipids improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum. Biochem Biophys Res Commun 197: 818-825 (1993)

Casini, A., Pinzani, M., Milani, S., Grappone, C., Galli, G., Jezequel, A.M., Schuppan, D., Rotella, C.M., Surrenti, C.: Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor beta 1 in human fat-storing cells. Gastroenterology 105: 245-253 (1993)

Cavallini, G., Bovo, P., Vaona, B., DiFrancesco, V., Frulloni, L., Rigo, L., Brunori, M.P., Andreaus, M.C., Tebaldi, M., Sgarbi, D., Angelini, G., Talamini, G., Procacci, C., Pederzoli, P., Filippini, M.: Chronic obstructive pancreatitis in humans is a lithiasic disease. Pancreas 13: 66-70 (1996)

Cavallini, G., Frulloni, L., Pederzoli, P., Talamini, G., Bovo, P., Bassi, C., Di, F., V, Vaona, B., Falconi, M., Sartori, N., Angelini, G., Brunori, M.P., Filippini, M.: Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis in Italy. Scand J Gastroenterol 33: 880-889 (1998)

Chan, P.P. und Glazer, P.M.: Triplex DNA: fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy. J Mol Med 75: 267-282 (1997)

Chari, S.T. und Singer, M.V.: The problem of classification and staging of chronic pancreatitis. Proposals based on current knowledge of its natural history. Scand J Gastroenterol 29: 949-960 (1994)

Cheifetz, S., Bassols, A., Stanley, K., Ohta, M., Greenberger, J., Massague, J.: Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. J Biol Chem 263: 10783-10789 (1988a)

Cheifetz, S., Ling, N., Guillemin, R., Massague, J.: A surface component on GH3 pituitary cells that recognizes transforming growth factor-beta, activin, and inhibin. J Biol Chem 263: 17225-17228 (1988b)

Cheifetz, S., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L., Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas, R., Massague, J.: The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. Cell 48: 409-415 (1987)

Chen, S.J., Yuan, W., Lo, S., Trojanowska, M., Varga, J.: Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human alpha2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. J Cell Physiol 183: 381-392 (2000)

Cheng, A.J. und Van Dyke, M.W.: Monovalent cation effects on intermolecular purine-purine-pyrimidine triple-helix formation. Nucleic Acids Res 21: 5630-5635 (1993)

Clarenc, J.P., Lebleu, B., Leonetti, J.P.: Characterization of the nuclear binding sites of oligodeoxyribonucleotides and their analogs. J Biol Chem 268: 5600-5604 (1993)

Coffey, R.J., Jr., Bascom, C.C., Sipes, N.J., Graves-Deal, R., Weissman, B.E., Moses, H.L.: Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. Mol Cell Biol 8: 3088-3093 (1988)

Cohn, J.A., Friedman, K.J., Noone, P.G., Knowles, M.R., Silverman, L.M., Jowell, P.S.: Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. N Engl J Med 339: 653-658 (1998)

Comfort, M.W., Gambrill, E.E., Baggenstoss, A.H.: Chronic relapsing pancreatitis. A study of twenty-nine cases without associated disease of the biliary or gastro-intestinal tract. Gastroenterology 6: 239-285 (1946)

Connor, T.B., Jr., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Danielpour, D., Dart, L.L., Michels, R.G., de Bustros, S., Enger, C., Kato, H., Lansing, M.: Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. J Clin Invest 83: 1661-1666 (1989)

Crooke, S.T. und Bennett, C.F.: Progress in antisense oligonucleotide therapeutics. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 107-129 (1996)

Czaja, M.J., Weiner, F.R., Flanders, K.C., Giambrone, M.A., Wind, R., Biempica, L., Zern, M.A.: In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. J Cell Biol 108: 2477-2482 (1989)

Datta, H.J., Chan, P.P., Vasquez, K.M., Gupta, R.C., Glazer, P.M.: Triplex-induced recombination in human cell-free extracts. Dependence on XPA and HsRad51. J Biol Chem 276: 18018-18023 (2001)

De Bizemont, T., Duval-Valentin, G., Sun, J.S., Bisagni, E., Garestier, T., Helene, C.: Alternate strand recognition of double-helical DNA by (T,G)-containing oligonucleotides in the presence of a triple helix-specific ligand. Nucleic Acids Res 24: 1136-1143 (1996)

De Caestecker, M.P., Piek, E., Roberts, A.B.: Role of tranforming growth factor beta signalin in cancer. J Natl Cancer Inst 92: 1388-1402 (2000)

De Caro, A., Multigner, L., Lafont, H., Lombardo, D., Sarles, H.: The molecular characteristics of a human pancreatic acidic phosphoprotein that inhibits calcium carbonate crystal growth. Biochem J 222: 669-677 (1984)

De Fabritis, P., Amadori, S., Petti, M.C., Mancini, M., Montefusco, E., Picardi, A., Geiser, T., Campbell, K., Calabretta, B., Mandelli, F.: In vitro purging with BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides does not prevent haematologic reconstitution after autologous bone marrow transplantation. Leukemia 9: 662-664 (1995)

De Jong, G., Telenius, A., Vanderbyl, S., Meitz, A., Drayer, J.: Efficient in-vitro transfer of a 60-Mb mammalian artificial chromosome into murine and hamster cells using cationic lipids and dendrimers. Chromosome Res 9: 475-485 (2001)

De Larco, J.E. und Todaro, G.J.: Sarcoma growth factor (SGF): specific binding to epidermal growth factor (EGF) membrane receptors. J Cell Physiol 102: 267-277 (1980)

De los Santos, .C., Rosen, M., Patel, D.: NMR studies of DNA (R+)n.(Y-)n.(Y+)n triple helices in solution: imino and amino proton markers of T.A.T and C.G.C+ base-triple formation. Biochemistry 28: 7282-7289 (1989)

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

Dean, N.M. und McKay, R.: Inhibition of protein kinase C-alpha expression in mice after systemic administration of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 11762-11766 (1994)

Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., Gauthier, J.M.: Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. The EMBO Journal 17: 3091-3100 (1998)

Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Goeddel, D.V.: Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. Nature 316: 701-705 (1985)

Derynck, R., Lindquist, P.B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J.L., Rhee, L., Mason, A.J., Miller, D.A., Coffey, R.J.: A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. The EMBO Journal 7: 3737-3743 (1988)

Derynck, R., Rhee, L., Chen, E.Y., Van Tilburg, A.: Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene. Nucleic Acids Res 15: 3188-3189 (1987)

Derynck, R. und Zhang, Y.: Intracellular signalling: the mad way to do it. Curr Biol 6: 1226-1229 (1996)

Derynck, R., Zhang, Y., Feng, X.H.: Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. Cell 95: 737-740 (1998)

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

Di Sebastiano, P., Fink, T., Weihe, E., Friess, H., Innocenti, P., Beger, H.G., Buchler, M.W.: Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis. Gastroenterology 112: 1648-1655 (1997)

Diamandis, E.P.: Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: principles and applications. Clin Biochem 21: 139-150 (1988)

Dimagno, E.P.: Toward understanding (and management) of painful chronic pancreatitis. Gastroenterology 116: 1252-1257 (1999)

Dimagno, E.P.: Gene mutations and idiopathic chronic pancreatitis: clinical implications and testing. Gastroenterology 121: 1508-1512 (2001)

Dimagno, E.P., Go, V.L., Summerskill, W.H.: Relations between pancreatic enzyme ouputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. N Engl J Med 288 (16): 813-815 (1973)

Dodds, E., Dunckley, M.G., Naujoks, K., Michaelis, U., Dickson, G.: Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. Gene Ther 5: 542-551 (1998)

Dreiling, D.A., Bordalo, O.R., Noronha, M., Greenstein, R.: Update: Big duct, little duct or toxi metabolic pathogenesis of pancreatitis. Am J Gastroenterol 71: 424-426 (1979)

Durbec, J.P. und Sarles, H.: Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreaitis and alcohol, protein and lipid consumption. Digestion 18: 337-350 (1978)

Durland, R.H., Kessler, D.J., Gunnell, S., Duvic, M., Pettitt, B.M., Hogan, M.E.: Binding of triple helix forming oligonucleotides to sites in gene promoters. Biochemistry 30: 9246-9255 (1991)

Ebbinghaus, S.W., Fortinberry, H., Gamper, H.B., Jr.: Inhibition of transcription elongation in the HER-2/neu coding sequence by triplex-directed covalent modification of the template strand. Biochemistry 38: 619-628 (1999)

Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J., Angel, P., Heath, J.K.: Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. The EMBO Journal 6: 1899-1904 (1987)

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

Escriou, V., Ciolina, C., Lacroix, F., Byk, G., Scherman, D., Wils, P.: Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. Biochim Biophys Acta 1368 (2): 276-288 (1998)

Etemad, B. und Whitcomb, D.C.: Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. Gastroenterology 120: 682-707 (2001)

Faria, M., Wood, C.D., Perrouault, L., Nelson, J.S., Winter, A., White, M.R., Helene, C., Giovannangeli, C.: Targeted inhibition of transcription elongation in cells mediated by triplex-forming oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 3862-3867 (2000)

Faucon, B., Mergny, J.L., Helene, C.: Effect of third strand composition on the triple helix formation: purine versus pyrimidine oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 24: 3181-3188 (1996)

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M.: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 7413-7417 (1987)

Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsasser, H.P., Kissel, T.: A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. Pharm Res 16: 1273-1279 (1999)

Flanagan, W.M. und Wagner, R.W.: Potent and selective gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. Mol Cell Biochem 172: 213-225 (1997)

Flaumenhaft, R., Abe, M., Sato, Y., Miyazono, K., Harpel, J., Heldin, C.H., Rifkin, D.B.: Role of the latent TGF-beta binding protein in the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. J Cell Biol 120: 995-1002 (1993)

Foitzik, T. und Buhr, H.J.: New aspects in the pathophysiology of chronic pancreatitis. Chirurg 68: 855-864 (1997)

Frank-Kamenetskii, M.D. und Mirkin, S.M.: Triplex DNA structures. Annu Rev Biochem 64: 65-95 (1995)

Frick, T.W., Fernandez-del Castillo, C., Bimmler, D., Warshaw, A.L.: Elevated calcium and activation of trypsinogen in rat pancreatic acini. Gut 41: 339-343 (1997)

Friedman, S.L.: Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med 328: 1828-1835 (1993)

Friess, H., Kobrin, M., Korc, M.: Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors and Their Receptors are expressed in the human pancreas. Pancreas 7: 737 (1992)

Galbraith, W.M., Hobson, W.C., Giclas, P.C., Schechter, P.J., Agrawal, S.: Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey. Antisense Res Dev 4: 201-206 (1994)

Gao, C., Gressner, G., Zoremba, M., Gressner, A.M.: Transforming growth factor beta (TGF-beta) expression in isolated and cultured rat hepatocytes. J Cell Physiol 167: 394-405 (1996)

Gao, W.Y., Storm, C., Egan, W., Cheng, Y.C.: Cellular pharmacology of phosphorothioate homooligodeoxynucleotides in human cells. Mol Pharmacol 43: 45-50 (1993)

Gao, X. und Huang, L.: A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 179: 280-285 (1991)

Geary, R.S., Khatsenko, O., Bunker, K., Crooke, R., Moore, M., Burckin, T., Truong, L., Sasmor, H., Levin, A.A.: Absolute bioavailability of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified antisense oligonucleotides following intraduodenal instillation in rats. J Pharmacol Exp Ther 296: 898-904 (2001)

Geerts, A., Vrijsen, R., Rauterberg, J., Burt, A., Schellinck, P., Wisse, E.: In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. J Hepatol 9: 59-68 (1989)

Gentry, L.E., Lioubin, M.N., Purchio, A.F., Marquardt, H.: Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. Mol Cell Biol 8: 4162-4168 (1988)

Gentry, L.E., Twardzik, D.R., Lim, G.J., Ranchalis, J.E., Lee, D.C.: Expression and characterization of transforming growth factor alpha precursor protein in transfected mammalian cells. Mol Cell Biol 7: 1585-1591 (1987)

Gewirtz, A.M., Sokol, D.L., Ratajczak, M.Z.: Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects. Blood 92: 712-736 (1998)

Gharaee-Kermani, M., Denholm, E.M., Phan, S.H.: Costimulation of Fibroblast Collagen and Transforming Growth Factor beta 1 Gene Expression by Monocyte Chemoattractant Protein-1 via Specific Receptors. J Biol Chem 271: 17779-17784 (1996)

Giles, R.V., Spiller, D.G., Grzybowski, J., Clark, R.E., Nicklin, P., Tidd, D.M.: Selecting optimal oligonucleotide composition for maximal antisense effect following streptolysin O-mediated delivery into human leukaemia cells. Nucleic Acids Res 26: 1567-1575 (1998)

Gorry, M.C., Gabbaizedeh, D., Furey, W., Gates, L.K., Jr., Preston, R.A., Aston, C.E., Zhang, Y., Ulrich, C., Ehrlich, G.D., Whitcomb, D.C.: Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. Gastroenterology 113: 1063-1068 (1997)

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

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

Gress, T.M., Muller-Pillasch, F., Lerch, M.M., Friess, H., Buchler, M., Beger, H.G., Adler, G.: Balance of expression of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in chronic pancreatitis. Z Gastroenterol 32: 221-225 (1994b)

Gressner, A.M.: Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. Z Gastroenterol 30 Suppl 1: 5-16 (1992)

Gressner, A.M.: Mediators of hepatic fibrogenesis. Hepatogastroenterology 43: 92-103 (1996a)

Gressner, A.M.: Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. Kidney Int Suppl 54: S39-S45 (1996b)

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

Gressner, A.M., Krull, N., Bachem, M.G.: Regulation of proteoglycan expression in fibrotic liver and cultured fat-storing cells. Pathol Res Pract 190: 864-882 (1994)

Gressner, A.M., Polzar, B., Lahme, B., Mannherz, H.G.: Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts via transforming growth factor beta. Hepatology 23: 571-581 (1996c)

Grigoriev, M., Praseuth, D., Robin, P., Hemar, A., Saison-Behmoaras, T., Dautry-Varsat, A., Thuong, N.T., Helene, C., Harel-Bellan, A.: A triple helix-forming oligonucleotide-intercalator conjugate acts as a transcriptional repressor via inhibition of NF kappa B binding to interleukin-2 receptor alpha-regulatory sequence. J Biol Chem 267: 3389-3395 (1992)

Gruschwitz, M., Muller, P.U., Sepp, N., Hofer, E., Fontana, A., Wick, G.: Transcription and expression of transforming growth factor type beta in the skin of progressive systemic sclerosis: a mediator of fibrosis? J Invest Dermatol 94: 197-203 (1990)

Gullo, L., Barbara, L., Labo, G.: Effect of cessation of alcohol use on the course of pancreatic dysfunction in alcoholic pancreatitis. Gastroenterology 95: 1063-1068 (1988)

Guy, O., Robles-Diaz, G., Adrich, Z., Sahel, J., Sarles, H.: Protein content of precipitates present in pancreatic juice of alcoholic subjects and patients with chronic calcifying pancreatitis. Gastroenterology 84: 102-107 (1983)

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

Hartmann, G., Krug, A., Eigler, A., Moeller, J., Murphy, J., Albrecht, R., Endres, S.: Specific suppression of human tumor necrosis factor-alpha synthesis by antisense oligodeoxynucleotides. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6: 291-299 (1996)

Hautekeete, M.L. und Geerts, A.: The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. Virchows Arch 430: 195-207 (1997)

Havre, P.A., Gunther, E.J., Gasparro, F.P., Glazer, P.M.: Targeted mutagenesis of DNA using triple helix-forming oligonucleotides linked to psoralen. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 7879-7883 (1993)

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., Falb, D.: The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. Cell 89: 1165-1173 (1997)

Heino, J., Ignotz, R.A., Hemler, M.E., Crouse, C., Massague, J.: Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. J Biol Chem 264: 380-388 (1989)

Helene, C. und Toulme, J.J.: Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. Biochim Biophys Acta 1049: 99-125 (1990)

Hellgren, I., Drvota, V., Pieper, R., Enoksson, S., Blomberg, P., Islam, K.B., Sylven, C.: Highly efficient cell-mediated gene transfer using non-viral vectors and FuGene6: in vitro and in vivo studies. Cell Mol Life Sci 57: 1326-1333 (2000)

Ho, S.P., Britton, D.H., Stone, B.A., Behrens, D.L., Leffet, L.M., Hobbs, F.W., Miller, J.A., Trainor, G.L.: Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. Nucleic Acids Res 24: 1901-1907 (1996)

Hug, P. und Sleight, R.G.: Liposomes for the transformation of eukaryotic cells. Biochim Biophys Acta 1097: 1-17 (1991)

Hunger, R.E., Mueller, C., Z'graggen, K., Friess, H., Buchler, M.W.: Cytotoxic cells are activated in cellular infiltrates of alcoholic chronic pancreatitis. Gastroenterology 112: 1656-1663 (1997)

Husler, P.L. und Klump, H.H.: Prediction of pH-dependent properties of DNA triple helices. Arch Biochem Biophys 317: 46-56 (1995)

Hynes, R.O.: Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 48: 549-554 (1987)

Ignotz, R.A., Endo, T., Massague, J.: Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. J Biol Chem 262: 6443-6446 (1987a)

Ignotz, R.A. und Massague, J.: Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem 261: 4337-4345 (1986)

Ignotz, R.A. und Massague, J.: Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. Cell 51: 189-197 (1987b)

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

Ing, N.H., Beekman, J.M., Kessler, D.J., Murphy, M., Jayaraman, K., Zendegui, J.G., Hogan, M.E., O'Malley, B.W., Tsai, M.J.: In vivo transcription of a progesterone-responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. Nucleic Acids Res 21: 2789-2796 (1993)

Ishihara, T., Hayasaka, A., Yamaguchi, T., Kondo, F., Saisho, H.: Immunohistochemical study of transforming growth factor-beta 1, matrix metalloproteinase-2,9, tissue inhibitors of metalloproteinase-1,2, and basement membrane components at pancreatic ducts in chronic pancreatitis. Pancreas 17: 412-418 (1998)

Itoh, H., Mukoyama, M., Pratt, R.E., Gibbons, G.H., Dzau, V.J.: Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. J Clin Invest 91: 2268-2274 (1993)

Iversen, P.L., Copple, B.L., Tewary, H.K.: Pharmacology and toxicology of phosphorothioate oligonucleotides in the mouse, rat, monkey and man. Toxicol Lett 82-83: 425-430 (1995)

Jachimczak, P., Bogdahn, U., Schneider, J., Behl, C., Meixensberger, J., Apfel, R., Dorries, R., Schlingensiepen, K.H., Brysch, W.: The effect of transforming growth factor-beta 2-specific phosphorothioate-anti-sense oligodeoxynucleotides in reversing cellular immunosuppression in malignant glioma. J Neurosurg 78: 944-951 (1993)

Jachimczak, P., Fabel-Schulte, K., Hessdorfer, B., Brysch, W., Schlingensiepen, K.H., Blesch, A., Bogdahn, U.: Transforming growth factor-beta-mediated regulation of human peripheral blood mononuclear cell proliferation as detected with phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. Cell Immunol 165: 125-133 (1995)

Jachimczak, P., Hessdorfer, B., Fabel-Schulte, K., Wismeth, C., Brysch, W., Schlingensiepen, K.H., Bauer, A., Blesch, A., Bogdahn, U.: Transforming growth factor-beta-mediated autocrine growth regulation of gliomas as detected with phosphorothioate antisense oligonucleotides. Int J Cancer 65: 332-337 (1996)

Jalleh, R.P., Gilbertson, J.A., Williamson, R.C., Slater, S.D., Foster, C.S.: Expression of major histocompatibility antigens in human chronic pancreatitis. Gut 34: 1452-1457 (1993)

Jhappan, C., Stahle, C., Harkins, R.N., Fausto, N., Smith, G.H., Merlino, G.T.: TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. Cell 61: 1137-1146 (1990)

Jiang, C., Ting, A.T., Seed, B.: PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature 391: 82-86 (1998)

Joseph, J., Kandala, J.C., Veerapanane, D., Weber, K.T., Guntaka, R.V.: Antiparallel polypurine phosphorothioate oligonucleotides form stable triplexes with the rat alpha1(I) collagen gene promoter and inhibit transcription in cultured rat fibroblasts. Nucleic Acids Res 25: 2182-2188 (1997)

Kandenwein, J.A.: Nachweis einer autokrinen Stimulation der extrazellulären Matrixsynthese bei kultivierten humanen pankreatischen Sternzellen über TGFβ1. Med Dissertation, Universität Ulm (2000)

Kanzaki, T., Olofsson, A., Moren, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Miyazono, K., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H.: TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. Cell 61: 1051-1061 (1990)

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

Keski-Oja, J., Leof, E.B., Lyons, R.M., Coffey, R.J., Jr., Moses, H.L.: Transforming growth factors and control of neoplastic cell growth. J Cell Biochem 33: 95-107 (1987)

Khalil, N., Bereznay, O., Sporn, M., Greenberg, A.H.: Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. J Exp Med 170: 727-737 (1989)

Khanna, A., Li, B., Li, P., Suthanthiran, M.: Regulation of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression with a novel TGF-beta 1 complementary DNA. Biochem Biophys Res Commun 204: 1061-1066 (1994)

Khanna, A., Li, B., Li, P., Suthanthiran, M.: Transforming growth factor-beta 1: regulation with a TGF-beta 1 antisense oligomer. Kidney Int Suppl 53: S2-S6 (1996)

Kichler, A., Zauner, W., Ogris, M., Wagner, E.: Influence of the DNA complexation medium on the transfection efficiency of lipospermine/DNA particles. Gene Ther 5: 855-860 (1998)

Kim, H.G. und Miller, D.M.: Inhibition of in vitro transcription by a triplex-forming oligonucleotide targeted to human c-myc P2 promoter. Biochemistry 34: 8165-8171 (1995)

Kim, H.G. und Miller, D.M.: A novel triplex-forming oligonucleotide targeted to human cyclin D1 (bcl-1, proto-oncogene) promoter inhibits transcription in HeLa cells. Biochemistry 37: 2666-2672 (1998)

Kim, H.G., Reddoch, J.F., Mayfield, C., Ebbinghaus, S., Vigneswaran, N., Thomas, S., Jones, D.E., Jr., Miller, D.M.: Inhibition of transcription of the human c-myc protooncogene by intermolecular triplex. Biochemistry 37: 2299-2304 (1998)

Kim, S.J., Angel, P., Lafyatis, R., Hattori, K., Kim, K.Y., Sporn, M.B., Karin, M., Roberts, A.B.: Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. Mol Cell Biol 10: 1492-1497 (1990)

Kim, S.J., Glick, A., Sporn, M.B., Roberts, A.B.: Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. J Biol Chem 264: 402-408 (1989)

Kimura, Y., Torimura, T., Ueno, T., Inuzuka, S., Tanikawa, K.: Transforming growth factor beta 1, extracellular matrix, and inflammatory cells in wound repair using a closed duodenal loop pancreatitis model rat. Immunohistochemical study. Scand J Gastroenterol 30: 707-714 (1995)

Kloppel, G. und Maillet, B.: Pseudocysts in chronic pancreatitis: a morphological analysis of 57 resection specimens and 9 autopsy pancreata. Pancreas 6: 266-274 (1991)

Kloppel, G. und Maillet, B.: The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 420: 1-4 (1992)

Kloppel, G. und Maillet, B.: Pathology of acute and chronic pancreatitis. Pancreas 8: 659-670 (1993)

Kloppel, G. und Maillet, B.: [Development of chronic pancreatitis from acute pancreatitis: a pathogenetic concept]. Zentralbl Chir 120: 274-277 (1995)

Knittel, T., Kobold, D., Saile, B., Grundmann, A., Neubauer, K., Piscaglia, F., Ramadori, G.: Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. Gastroenterology 117: 1205-1221 (1999)

Knittel, T., Schuppan, D., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Ramadori, G.: Differential expression of collagen types I, III, and IV by fat-storing (Ito) cells in vitro. Gastroenterology 102: 1724-1735 (1992)

Kochetkova, M., Iversen, P.O., Lopez, A.F., Shannon, M.F.: Deoxyribonucleic acid triplex formation inhibits granulocyte macrophage colony-stimulating factor gene expression and suppresses growth in juvenile myelomonocytic leukemic cells. J Clin Invest 99: 3000-3008 (1997)

Krieg, A.M., Gmelig-Meyling, F., Gourley, M.F., Kisch, W.J., Chrisey, L.A., Steinberg, A.D.: Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible. Antisense Res Dev 1: 161-171 (1991)

Kronenwett, R., Haas, R., Sczakiel, G.: Kinetic selectivity of complementary nucleic acids: bcr-abl-directed antisense RNA and ribozymes. J Mol Biol 259: 632-644 (1996)

Kronenwett, R., Steidl, U., Kirsch, M., Sczakiel, G., Haas, R.: Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. Blood 91: 852-862 (1998)

Kropf, J., Quitte, E., Gressner, A.M.: Time-resolved immunofluorometric assays with measurement of a europium chelate in solution: application for sensitive determination of fibronectin. Anal Biochem 197: 258-265 (1991)

Krupsky, M., Fine, A., Kuang, P.P., Berk, J.L., Goldstein, R.H.: Regulation of type I collagen production by insulin and transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts. Connect Tissue Res 34: 53-62 (1996)

Kuwahara, M., Takeda, M., Takeuchi, Y., Kuwahara, M., Harada, T., Maita, K.: Transforming growth factor beta production by spontaneous malignant mesothelioma cell lines derived from Fisher 344 rats. Virchows Arch 438: 492-497 (2001)

Laiho, M., Saksela, O., Andreasen, P.A., Keski-Oja, J.: Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta. J Cell Biol 103: 2403-2410 (1986)

Laiho, M., Saksela, O., Keski-Oja, J.: Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. J Biol Chem 262: 17467-17474 (1987)

Lankisch, P.G., Lohr-Happe, A., Otto, J., Creutzfeldt, W.: Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease. Digestion 54: 148-155 (1993)

Lankisch, P.G., Seidensticker, F., Lohr-Happe, A., Otto, J., Creutzfeldt, W.: The course of pain is the same in alcohol- and nonalcohol-induced chronic pancreatitis. Pancreas 10: 338-341 (1995)

Lappalainen, K., Miettinen, R., Kellokoski, J., Jaaskelainen, I., Syrjanen, S.: Intracellular distribution of oligonucleotides delivered by cationic liposomes: light and electron microscopic study. J Histochem Cytochem 45: 265-274 (1997)

Larisch-Bloch, S. und Sulitzeanu, D.: LAK cells release a novel form of directly acting TGF beta, tightly bound to a high molecular weight carrier(s). Growth Factors 8: 177-186 (1993)

Lasch, J., Hoffmann, J., Omelyanenko, W.G., Klibanov, A.A., Torchilin, V.P., Binder, H., Gawrisch, K.: Interaction of Triton X-100 and octyl glucoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations. Spectroscopic studies. Biochim Biophys Acta 1022: 171-180 (1990)

Lavelle, L. und Fresco, J.R.: UV spectroscopic identification and thermodynamic analysis of protonated third strand deoxycytidine residues at neutrality in the triplex d(C(+)-T)6:[d(A-G)6.d(C-T)6]; evidence for a proton switch. Nucleic Acids Res 23: 2692-2705 (1995)

Layer, P., Yamamoto, H., Kalthoff, L., Clain, J.E., Bakken, L.J., Dimagno, E.P.: The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. Gastroenterology 107: 1481-1487 (1994)

Lee, J.S., Woodsworth, M.L., Latimer, L.J., Morgan, A.R.: Poly(pyrimidine) . poly(purine) synthetic DNAs containing 5-methylcytosine form stable triplexes at neutral pH. Nucleic Acids Res 12: 6603-6614 (1984)

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

Leeds, J.M., Henry, S.P., Geary, R., Burckin, T., Levin, A.A.: Comparison of the pharmacokinetics of subcutaneous and intravenous administration of a phosphorothioate oligodeoxynucleotide in cynomolgus monkeys. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10: 435-441 (2000)

Leonetti, J.P., Mechti, N., Degols, G., Gagnor, C., Lebleu, B.: Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 2702-2706 (1991)

Levin, A.A.: A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. Biochim Biophys Acta 1489: 69-84 (1999)

Lin, H.Y., Wang, X.F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A., Lodish, H.F.: Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. Cell 68: 775-785 (1992)

Liu, J.M. und Davidson, J.M.: The elastogenic effect of recombinant transforming growth factor-beta on porcine aortic smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 154: 895-901 (1988)

Liu, X., Sun, Y., Constantinescu, S.N., Karam, E., Weinberg, R.A., Lodish, H.F.: Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 10669-10674 (1997)

Loke, S.L., Stein, C.A., Zhang, X.H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J.S., Neckers, L.M.: Characterization of oligonucleotide transport into living cells. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 3474-3478 (1989)

Longnecker, D.S.: Pathology and pathogenesis of diseases of the pancreas. Am J Pathol 107: 103-121 (1982)

Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R.W., Lankisch, P.G., Andersen, J.R., Dimagno, E.P., Andren-Sandberg, A., Domellof, L.: Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. N Engl J Med 328: 1433-1437 (1993)

Luthen, R. und Niederau, C.: Pathophysiology of acute pancreatitis. Z Gastroenterol 28: 211-221 (1990)

Luttenberger, T., Schmid-Kotsas, A., Menke, A., Siech, M., Beger, H., Adler, G., Grunert, A., Bachem, M.G.: Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. Lab Invest 80: 47-55 (2000)

Lyons, R.M. und Moses, H.L.: Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. Eur J Biochem 187: 467-473 (1990)

Madri, J.A., Pratt, B.M., Tucker, A.M.: Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. J Cell Biol 106: 1375-1384 (1988)

Maher, L.J., III: Inhibition of T7 RNA polymerase initiation by triple-helical DNA complexes: a model for artificial gene repression. Biochemistry 31: 7587-7594 (1992)

Maher, L.J., III: Prospects for the therapeutic use of antigene oligonucleotides. Cancer Invest 14: 66-82 (1996)

Maher, L.J., III, Wold, B., Dervan, P.B.: Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation. Science 245: 725-730 (1989)

Masamune, A., Kikuta, K., Satoh, M., Sakai, Y., Satoh, A., Shimosegawa, T.: Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma block activation of pancreatic stellate cells. J Biol Chem 277: 141-147 (2002)

Massague, J.: The transforming growth factor-beta family. Annu Rev Cell Biol 6: 597-641 (1990)

Massague, J., Cheifetz, S., Boyd, F.T., Andres, J.L.: TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. Ann N Y Acad Sci 593: 59-72 (1990)

Massague, J., Cheifetz, S., Laiho, M., Ralph, D.A., Weis, F.M., Zentella, A.: Transforming growth factor-beta. Cancer Surv 12: 81-103 (1992)

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

Maxfield, F.R.: Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. J Cell Biol 95: 676-681 (1982)

McCartney-Francis, N.L. und Wahl, S.M.: Transforming growth factor beta: a matter of life and death. J Leukoc Biol 55: 401-409 (1994)

McWhirter, A., Colosetti, P., Rubin, K., Miyazono, K., Black, C.: Collagen type I is not under autocrine control by transforming growth factor-beta 1 in normal and scleroderma fibroblasts. Lab Invest 71: 885-894 (1994)

Menke, A., Yamaguchi, H., Gress, T.M., Adler, G.: Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor beta1 in pancreatitis in the rat. Gastroenterology 113: 295-303 (1997)

Mergener, K. und Baillie, J.: Acute pancreatitis. British Medical Journal 316: 44-48 (1998)

Mergny, J.L., Sun, J.S., Rougee, M., Montenay-Garestier, T., Barcelo, F., Chomilier, J., Helene, C.: Sequence specificity in triple-helix formation: experimental and theoretical studies of the effect of mismatches on triplex stability. Biochemistry 30: 9791-9798 (1991)

Mestries, P., Alexakis, C., Papy-Garcia, D., Duchesnay, A., Barritault, D., Caruelle, J.P., Kern, P.: Specific RGTA increases collagen V expression by cultured aortic smooth muscle cells via activation and protection of transforming growth factor-beta1. Matrix Biol 20: 171-181 (2001)

Mews, P., Phillips, P., Fahmy, R., Korsten, M., Pirola, R., Wilson, J., Apte, M.: Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. Gut 50: 535-541 (2002)

Michalopoulos, G.K.: Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. Official Publication of the Federation of American Society for Experimental Biology (FASEB J) 4: 176-87 (1990)

Miller, A.D.: Human gene therapy comes of age. Nature 357: 455-460 (1992)

Milligan, J.F., Krawczyk, S.H., Wadwani, S., Matteucci, M.D.: An anti-parallel triple helix motif with oligodeoxynucleotides containing 2'-deoxyguanosine and 7-deaza-2'-deoxyxanthosine. Nucleic Acids Res 21: 327-333 (1993)

Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C., Heldin, C.H.: Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. J Biol Chem 263: 6407-6415 (1988)

Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., Heldin, C.H.: A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. The EMBO Journal 10: 1091-1101 (1991)

Montalto, G., Bonicel, J., Multigner, L., Rovery, M., Sarles, H., De Caro, A.: Partial amino acid sequence of human pancreatic stone protein, a novel pancreatic secretory protein. Biochem J 238: 227-232 (1986)

Morgan, R.A. und Anderson, W.F.: Human gene therapy. Annu Rev Biochem 62: 191-217 (1993)

Moser, H.E. und Dervan, P.B.: Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. Science 238: 645-650 (1987)

Moses, H.L., Branum, E.L., Proper, J.A., Robinson, R.A.: Transforming growth factor production by chemically transformed cells. Cancer Res 41: 2842-2848 (1981)

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

Multigner, L., Figarella, C., Sarles, H.: Diagnosis of chronic pancreatitis by measurement of lactoferrin in duodenal juice. Gut 22: 350-354 (1981)

Multigner, L., Sarles, H., Lombardo, D., De Caro, A.: Pancreatic stone protein. II. Implication in stone formation during the course of chronic calcifying pancreatitis. Gastroenterology 89: 387-391 (1985)

Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M.B., Deuel, T.F.: Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. Science 237: 1333-1336 (1987)

Naruse, S., Kitagawa, M., Ishiguro, H., Nakae, Y., Kondo, T., Hayakawa, T.: Chronic pancreatitis: overview of medical aspects. Pancreas 16: 323-328 (1998)

Nath, K.A.: Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. Am J Kidney Dis 20: 1-17 (1992)

Noda, M. und Rodan, G.A.: Type beta transforming growth factor (TGF beta) regulation of alkaline phosphatase expression and other phenotype-related mRNAs in osteoblastic rat osteosarcoma cells. J Cell Physiol 133: 426-437 (1987)

Noda, M., Yoon, K., Prince, C.W., Butler, W.T., Rodan, G.A.: Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type beta transforming growth factor. J Biol Chem 263: 13916-13921 (1988)

Noonberg, S.B., Francois, J.C., Garestier, T., Helene, C.: Effect of competing self-structure on triplex formation with purine-rich oligodeoxynucleotides containing GA repeats. Nucleic Acids Res 23: 1956-1963 (1995)

Noronha, M., Salgadinho, A., Ferreira De Almeida, M.J., Dreiling, D.A., Bordalo, O.: Alcohol and the pancreas. I. Clinical associations and histopathology of minimal pancreatic inflammation. Am J Gastroenterol 76: 114-119 (1981)

Oertel, J.E.: The pancreas. Nonneoplastic alterations. Am J Surg Pathol 13 Suppl 1: 50-65 (1989)

Ohan, J., Gilbert, M.A., Leseche, G., Panis, Y., Midoux, P., Drouet, L.: Nonviral gene transfer into primary cultures of human and porcine mesothelial cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim 37: 402-407 (2001)

Okuda, S., Languino, L.R., Ruoslahti, E., Border, W.A.: Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. J Clin Invest 86: 453-462 (1990)

Olivas, W.M. und Maher, L.J., III: Competitive triplex/quadruplex equilibria involving guanine-rich oligonucleotides. Biochemistry 34: 278-284 (1995)

Olivas, W.M. und Maher, L.J., III: Binding of DNA oligonucleotides to sequences in the promoter of the human bc1-2 gene. Nucleic Acids Res 24: 1758-1764 (1996)

Overall, C.M., Wrana, J.L., Sodek, J.: Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. J Biol Chem 264: 1860-1869 (1989)

Paralkar, V.M., Vukicevic, S., Reddi, A.H.: Transforming growth factor beta type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. Dev Biol 143: 303-308 (1991)

Partearroyo, M.A., Urbaneja, M.A., Goni, F.M.: Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100. FEBS Lett 302: 138-140 (1992)

Paterson, B.M., Roberts, B.E., Kuff, E.L.: Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 4370-4374 (1977)

Pearson, C.A., Pearson, D., Shibahara, S., Hofsteenge, J., Chiquet-Ehrismann, R.: Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. The EMBO Journal 7: 2977-2982 (1988)

Penttinen, R.P., Kobayashi, S., Bornstein, P.: Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 1105-1108 (1988)

Pitchumoni, C.S. und Bordalo, O.: Evaluation of hypotheses on pathogenesis of alcoholic pancreatitis. Am J Gastroenterol 91: 637-647 (1996)

Poncelet, A.C. und Schnaper, H.W.: Regulation of human mesangial cell collagen expression by transforming growth factor-beta1. Am J Physiol 275: F458-F466 (1998)

Praseuth, D., Guieysse, A.C., Helene, C.: Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression. Biochim Biophys Acta 1489: 181-206 (1999)

Qian, S.W., Kondaiah, P., Roberts, A.B., Sporn, M.B.: cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor beta-1. Nucleic Acids Res 18: 3059 (1990)

Raghow, R., Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L., Kang, A.H.: Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. J Clin Invest 79: 1285-1288 (1987)

Raghu, G., Masta, S., Meyers, D., Narayanan, A.S.: Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor-beta. Am Rev Respir Dis 140: 95-100 (1989)

Rajagopal, P. und Feigon, J.: Triple-strand formation in the homopurine:homopyrimidine DNA oligonucleotides d(G-A)4 and d(T-C)4. Nature 339: 637-640 (1989)

Ramadori, G.: The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 61: 147-158 (1991)

Ramadori, G., Knittel, T., Odenthal, M., Schwogler, S., Neubauer, K., Meyer zum Buschenfelde, K.H.: Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat-storing (Ito) cells: regulation by cytokines. Gastroenterology 103: 1313-1321 (1992)

Reber, P.U., Uhl, W., Buchler, M.W.: [Pancreatic pseudocysts in chronic pancreatitis. Differential diagnosis and therapy]. Chirurg 68: 881-887 (1997)

Redini, F., Lafuma, C., Pujol, J.P., Robert, L., Hornebeck, W.: Effect of cytokines and growth factors on the expression of elastase activity by human synoviocytes, dermal fibroblasts and rabbit articular chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun 155: 786-793 (1988)

Renner, I.G., Rinderknecht, H., Valenzuela, J.E., Douglas, A.P.: Studies of pure pancreatic secretions in chronic alcoholic subjects without pancreatic insufficiency. Scand J Gastroenterol 15: 241-244 (1980)

Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K.: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. Nature 391: 79-82 (1998)

Riggins, G.J., Thiagalingam, S., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.: Mad-related genes in the human. Nat Genet 13: 347-349 (1996)

Rinderknecht H.: Pancratic secretory enzymes. In: Go, V. W. L., Dimagno, E. P., Gardner, J. D., Lebenthal, E., Reber, H. A., Scheele, G. A. (Hrsg) Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease, 2. Aufl, Raven Press, New York, S. 219-251 (1993)

Rinderknecht, H.: Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? Int J Pancreatol 3: 105-112 (1988)

Ritchie, S., Boyd, F.M., Wong, J., Bonham, K.: Transcription of the human c-Src promoter is dependent on Sp1, a novel pyrimidine binding factor SPy, and can be inhibited by triplex-forming oligonucleotides. J Biol Chem 275: 847-854 (2000)

Roberts, A.B., Heine, U.I., Flanders, K.C., Sporn, M.B.: Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. Ann N Y Acad Sci 580: 225-232 (1990a)

Roberts, A.B., Kim, S.J., Kondaiah, P., Jakowlew, S.B., Denhez, F., Glick, A.B., Geiser, A.G., Watanabe, S., Noma, T., Lechleider, R.: Transcriptional control of expression of the TGF-betas. Ann N Y Acad Sci 593: 43-50 (1990b)

Roberts, A.B., Lamb, L.C., Newton, D.L., Sporn, M.B., de Larco, J.E., Todaro, G.J.: Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. Proc Natl Acad Sci U S A 77: 3494-3498 (1980)

Roberts, A.B., McCune, B.K., Sporn, M.B.: TGF-beta: regulation of extracellular matrix. Kidney Int 41: 557-559 (1992)

Robertson, D.: Crohn's trial shows the pros of antisense. Nat Biotechnol 15: 209 (1997)

Rosen, D.M., Stempien, S.A., Thompson, A.Y., Seyedin, S.M.: Transforming growth factor-beta modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro. J Cell Physiol 134: 337-346 (1988)

Ross, P.C. und Hui, S.W.: Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. Gene Ther 6: 651-659 (1999)

Roth, S., Michel, K., Gressner, A.M.: (Latent) transforming growth factor beta in liver parenchymal cells, its injury-dependent release, and paracrine effects on rat hepatic stellate cells. Hepatology 27: 1003-1012 (1998)

Rudnicka, L., Varga, J., Christiano, A.M., Iozzo, R.V., Jimenez, S.A., Uitto, J.: Elevated expression of type VII collagen in the skin of patients with systemic sclerosis. Regulation by transforming growth factor-beta. J Clin Invest 93: 1709-1715 (1994)

Ruiz, J., Goni, F.M., Alonso, A.: Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. Biochim Biophys Acta 937: 127-134 (1988)

Ruoslahti, E.: Integrins. J Clin Invest 87: 1-5 (1991)

Saharinen, J., Taipale, J., Monni, O., Keski-Oja, J.: Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-beta-binding protein, LTBP-4. J Biol Chem 273: 18459-18469 (1998)

Sahel, J. und Sarles, H.: Modifications of pure human pancreatic juice induced by chronic alcohol consumption. Dig Dis Sci 24: 897-905 (1979)

San, H., Yang, Z.Y., Pompili, V.J., Jaffe, M.L., Plautz, G.E., Xu, L., Felgner, J.H., Wheeler, C.J., Felgner, P.L., Gao, X.: Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. Hum Gene Ther 4: 781-788 (1993)

Sandor, Z. und Bredberg, A.: Repair of triple helix directed psoralen adducts in human cells. Nucleic Acids Res 22: 2051-2056 (1994)

Sanfey, H., Sarr, M.G., Bulkley, G.B., Cameron, J.L.: Oxygen-derived free radicals and acute pancreatitis: a review. Acta Physiol Scand Suppl 548: 109-118 (1986)

Santana, A., Saxena, B., Noble, N.A., Gold, L.I., Marshall, B.C.: Increased expression of transforming growth factor beta isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 13: 34-44 (1995)

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

Sarles, H.: Pancreatitis. Symposium Marseille April 25-26,1963. S. Karger, Basel-New York. Bibliotheca Gastroenterologica (1965) .

Sarles, H.: Epidemiology and physiopathology of chronic pancreatitis and the role of the pancreatic stone protein. Clin Gastroenterol 13: 895-912 (1984)

Sarles, H.: Definitions and classifications of pancreatitis. Pancreas 6: 470-474 (1991)

Sarles, H., Adler, G., Dani, R., Frey, C., Gullo, H., Harada, H., Martin, E., Norohna, M., Scuro, L.A.: The Pancreatitis Classification of Marseille-Rome 1988. Scand J Gastroenterol 24: 641-642 (1989)

Sarles, H., Adler, G., Dani, R., Frey, C., Gullo, L., Harada, H., Martin, E., Norohna, M., Scuro, L.A.: Classifications of pancreatitis and definition of pancreatic diseases. Digestion 43: 234-236 (1989a)

Sarles, H., Bernard, J.P., Gullo, L.: Pathogenesis of chronic pancreatitis. Gut 31: 629-632 (1990)

Sarles, H., Bernard, J.P., Johnson, C.: Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis. Annu Rev Med 40:453-68.: 453-468 (1989b)

Sarles, H., Cros, R.C., Bidart, J.M.: A multicenter inquiry into the etiology of pancreatic diseases. Digestion 19: 110-125 (1979)

Sarles, H., Sarles, J.C., Camatte, R., Muratore, R., Gaini, M., Guien, C., Pastor, J., Le Roy, F.: Observations on 205 confirmed cases of acute pancreatitis, recurring pancreatitis, and chronic pancreatitis. Gut 6: 545-559 (1965)

Sarner, M.: Pancreatic inflammatory disease. Gut 37: 455-456 (1995)

Schmid-Kotsas, A., Gross, H.J., Menke, A., Weidenbach, H., Adler, G., Siech, M., Beger, H., Grunert, A., Bachem, M.G.: Lipopolysaccharide-activated macrophages stimulate the synthesis of collagen type I and C-fibronectin in cultured pancreatic stellate cells. Am J Pathol 155: 1749-1758 (1999)

Schmiegel, W., Burchert, M., Kalthoff, H., Roeder, C., Butzow, G., Grimm, H., Kremer, B., Soehendra, N., Schreiber, H.W., Thiele, H.G.: Immunochemical characterization and quantitative distribution of pancreatic stone protein in sera and pancreatic secretions in pancreatic disorders. Gastroenterology 99: 1421-1430 (1990)

Schneider, E., Schmid-Kotsas, A., Zhao, J., Weidenbach, H., Schmid, R.M., Menke, A., Adler, G., Waltenberger, J., Grunert, A., Bachem, M.G.: Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. Am J Physiol Cell Physiol 281: C532-C543 (2001)

Schofield, J.P. und Caskey, C.T.: Non-viral approaches to gene therapy. Br Med Bull 51: 56-71 (1995)

Schuftan, G.G. und Bachem, M.G.: Alpha2-macroglobulin reduces paracrine- and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultured rat hepatic stellate cells. Eur J Clin Invest 29: 519-528 (1999)

Secknus, R. und Mossner, J.: Changes in incidence and prevalence of acute and chronic pancreatitis in Germany. Chirurg 71: 249-252 (2000)

Segarini, P.R.: TGF-beta receptors: a complicated system of multiple binding proteins. Biochim Biophys Acta 1155: 269-275 (1993)

Shah, M., Foreman, D.M., Ferguson, M.W.: Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. Lancet 339: 213-214 (1992)

Sharer, N., Schwarz, M., Malone, G., Howarth, A., Painter, J., Super, M., Braganza, J.: Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. N Engl J Med 339: 645-652 (1998)

Sharma, K. und Ziyadeh, F.N.: The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases. Am J Physiol 266: F829-F842 (1994)

Shen, Z.J., Kim, S.K., Kwon, O.S., Lee, Y.S., Moon, B.J.: Specific inhibition of transforming growth factor-beta2 expression in human osteoblast cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides. Eur J Biochem 268: 2331-2337 (2001)

Shimoyama, S., Gansauge, F., Gansauge, S., Oohara, T., Beger, H.G.: Altered expression of extracellular matrix molecules and their receptors in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma in comparison with normal pancreas. Int J Pancreatol 18: 227-234 (1995)

Shipley, G.D., Pittelkow, M.R., Wille, J.J., Jr., Scott, R.E., Moses, H.L.: Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. Cancer Res 46: 2068-2071 (1986)

Sieweke, M.H. und Bissell, M.J.: The tumor-promoting effect of wounding: a possible role for TGF-beta-induced stromal alterations. Crit Rev Oncog 5: 297-311 (1994)

Singer, M.V., Gyr, K., Sarles, H.: Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. Gastroenterology 89: 683-685 (1985)

Singh, M.: Alcoholic pancreatitis. Possible role of digestive enzyme and lysosomal hydrolase colocalization and abnormal trafficking of proteins after exit site at trans Golgi network (TGN). Int J Pancreatol 8: 111-118 (1991)

Singh, M.: Effect of chronic ethanol feeding on factors leading to inappropriate intrapancreatic activation of zymogens in the rat pancreas. Digestion 53: 114-120 (1992)

Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D., Gabbiani, G.: A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. J Cell Biol 103: 2787-2796 (1986)

Skorski, T., Nieborowska-Skorski, M., Wlodarski, P., Perrotti, D., Hoser, G., Kawiak, J., Majewski, M., Christensen, L., Iozzo, R.V., Calabretta, B.: Treatment of Philadelphia leukemia in severe combined immunodeficient mice by combination of cyclophosphamide and bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides. J Natl Cancer Inst 89: 124-133 (1997)

Slater, S.D., Williamson, R.C., Foster, C.S.: Expression of transforming growth factor-beta 1 in chronic pancreatitis. Digestion 56: 237-241 (1995)

Son, K.K., Patel, D.H., Tkach, D., Park, A.: Cationic liposome and plasmid DNA complexes formed in serum-free medium under optimum transfection condition are negatively charged. Biochim Biophys Acta 1466: 11-15 (2000)

Sporn, M.B. und Roberts, A.B.: Autocrine growth factors and cancer. Nature 313: 745-747 (1985)

Sporn, M.B. und Roberts, A.B.: Peptide growth factors are multifunctional. Nature 332: 217-219 (1988)

Sporn, M.B. und Roberts, A.B.: The transforming growth factor-betas: past, present, and future. Ann N Y Acad Sci 593: 1-6 (1990)

Sporn, M.B. und Roberts, A.B.: Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. J Cell Biol 119: 1017-1021 (1992)

Steer, M.L., Waxman, I., Freedman, S.: Chronic pancreatitis. N Engl J Med 332: 1482-1490 (1995)

Stein, C.A.: Does antisense exist? Nat Med 1: 1119-1121 (1995)

Stein, C.A. und Cheng, Y.C.: Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? Science 261: 1004-1012 (1993)

Stein, C.A. und Narayanan, R.: Antisense oligodeoxynucleotides. Curr Opin Oncol 6: 587-594 (1994)

Stephens, D.J. und Pepperkok, R.: The many ways to cross the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 4295-4298 (2001)

Stepkowski, S.M., Tu, Y., Condon, T.P., Bennett, C.F.: Blocking of heart allograft rejection by intercellular adhesion molecule-1 antisense oligonucleotides alone or in combination with other immunosuppressive modalities. J Immunol 153: 5336-5346 (1994)

Suda, K., Mogaki, M., Oyama, T., Matsumoto, Y.: Histopathologic and immunohistochemical studies on alcoholic pancreatitis and chronic obstructive pancreatitis: special emphasis on ductal obstruction and genesis of pancreatitis. Am J Gastroenterol 85: 271-276 (1990)

Sudarshan, C., Yaswen, L., Kulkarni, A., Raghow, R.: Phenotypic consequences of transforming growth factor beta1 gene ablation in murine embryonic fibroblasts: autocrine control of cell proliferation and extracellular matrix biosynthesis. J Cell Physiol 176: 67-75 (1998)

Svinarchuk, F., Bertrand, J.R., Malvy, C.: A short purine oligonucleotide forms a highly stable triple helix with the promoter of the murine c-pim-1 proto-oncogene. Nucleic Acids Res 22: 3742-3747 (1994)

Svinarchuk, F., Debin, A., Bertrand, J.R., Malvy, C.: Investigation of the intracellular stability and formation of a triple helix formed with a short purine oligonucleotide targeted to the murine c-pim-1 proto-oncogene promotor. Nucleic Acids Res 24: 295-302 (1996)

Taipale, J., Koli, K., Keski-Oja, J.: Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. J Biol Chem 267: 25378-25384 (1992)

Takeshita, S., Gal, D., Leclerc, G., Pickering, J.G., Riessen, R., Weir, L., Isner, J.M.: Increased gene expression after liposome-mediated arterial gene transfer associated with intimal smooth muscle cell proliferation. In vitro and in vivo findings in a rabbit model of vascular injury. J Clin Invest 93: 652-661 (1994a)

Takeshita, S., Losordo, D.W., Kearney, M., Rossow, S.T., Isner, J.M.: Time course of recombinant protein secretion after liposome-mediated gene transfer in a rabbit arterial organ culture model. Lab Invest 71: 387-391 (1994b)

Tang, M.X., Redemann, C.T., Szoka, F.C., Jr.: In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. Bioconjug Chem 7: 703-714 (1996)

Tasset, D.M., Kubik, M.F., Steiner, W.: Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. J Mol Biol 272: 688-698 (1997)

Temsamani, J., Roskey, A., Chaix, C., Agrawal, S.: In vivo metabolic profile of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7: 159-165 (1997)

Thierry, A.R. und Dritschilo, A.: Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. Nucleic Acids Res 20: 5691-5698 (1992)

Todaro, G.J. und de Larco, J.E.: Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells. Cancer Res 38: 4147-4154 (1978)

Tonkinson, J.L. und Stein, C.A.: Patterns of intracellular compartmentalization, trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells. Nucleic Acids Res 22: 4268-4275 (1994)

Tucker, R.F., Branum, E.L., Shipley, G.D., Ryan, R.J., Moses, H.L.: Specific binding to cultured cells of 125I-labeled type beta transforming growth factor from human platelets. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 6757-6761 (1984)

Uchida, E., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Hayakawa, T.: Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. Biol Pharm Bull 25: 891-897 (2002)

Ueki, N., Ohkawa, T., Yamamura, H., Takahashi, K., Tsutsui, T., Kawai, Y., Yokoyama, Y., Amuro, Y., Hada, T., Higashino, K.: Induction of calponin-h1 by transforming growth factor-beta1 in cultured human ito cells, LI90. Biochim Biophys Acta 1403: 28-36 (1998)

Usui, T., Takase, M., Kaji, Y., Suzuki, K., Ishida, K., Tsuru, T., Miyata, K., Kawabata, M., Yamashita, H.: Extracellular matrix production regulation by TGF-beta in corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 39: 1981-1989 (1998)

Vaerman, J.L., Lammineur, C., Moureau, P., Lewalle, P., Deldime, F., Blumenfeld, M., Martiat, P.: BCR-ABL antisense oligodeoxyribonucleotides suppress the growth of leukemic and normal hematopoietic cells by a sequence-specific but nonantisense mechanism. Blood 86: 3891-3896 (1995)

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

van Laethem, J.L., Robberecht, P., Resibois, A., Deviere, J.: Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice. Gastroenterology 110: 576-582 (1996)

Varga, J., Rosenbloom, J., Jimenez, S.A.: Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. Biochem J 247: 597-604 (1987)

Vasquez, K.M., Narayanan, L., Glazer, P.M.: Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. Science 290: 530-533 (2000)

Vasquez, K.M., Wang, G., Havre, P.A., Glazer, P.M.: Chromosomal mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mammalian cells. Nucleic Acids Res 27: 1176-1181 (1999)

Vogelmann, R., Ruf, D., Wagner, M., Adler, G., Menke, A.: Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGF-beta1 transgenic mouse model. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280: G164-G172 (2001)

Vyalov, S.L., Gabbiani, G., Kapanci, Y.: Rat alveolar myofibroblasts acquire alpha-smooth muscle actin expression during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Pathol 143: 1754-1765 (1993)

Wagner, R.W.: Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. Nature 372: 333-335 (1994)

Wagner, R.W. und Flanagan, W.M.: Antisense technology and prospects for therapy of viral infections and cancer. Mol Med Today 3: 31-38 (1997)

Wagner, R.W., Matteucci, M.D., Grant, D., Huang, T., Froehler, B.C.: Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide. Nat Biotechnol 14: 840-844 (1996)

Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wakefield, L.M., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Roberts, A.B., Sporn, M.B.: Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 5788-5792 (1987)

Wakefield, L.M., Smith, D.M., Flanders, K.C., Sporn, M.B.: Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. J Biol Chem 263: 7646-7654 (1988)

Walev, I., Bhakdi, S.C., Hofmann, F., Djonder, N., Valeva, A., Aktories, K., Bhakdi, S.: Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 3185-3190 (2001)

Wang, G., Seidman, M.M., Glazer, P.M.: Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. Science 271: 802-805 (1996)

Watari, N., Hotta, Y., Mabuchi, Y.: Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. Okajimas Folia Anat Jpn 58: 837-858 (1982)

Weber M.: Aktivierte Dendrimere-eine neue Transfektionstechnik. Biospektrum 3: 64-65 (1997)

Wells, R.G. und Crawford, J.M.: Pancreatic stellate cells: the new stars of chronic pancreatitis? Gastroenterology 115: 491-493 (1998)

Whitcomb, D.C., Gorry, M.C., Preston, R.A., Furey, W., Sossenheimer, M.J., Ulrich, C.D., Martin, S.P., Gates, L.K., Jr., Amann, S.T., Toskes, P.P., Liddle, R., McGrath, K., Uomo, G., Post, J.C., Ehrlich, G.D.: Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. Nat Genet 14: 141-145 (1996)

Wiesenhofer, B. und Humpel, C.: Lipid-mediated gene transfer into primary neurons using FuGene: comparison to C6 glioma cells and primary glia. Exp Neurol 164: 38-44 (2000)

Wiesenhofer, B., Kaufmann, W.A., Humpel, C.: Improved lipid-mediated gene transfer in C6 glioma cells and primary glial cells using FuGene. J Neurosci Methods 92: 145-152 (1999)

Willemer, S. und Adler, G.: Histochemical and ultrastructural characteristics of tubular complexes in human acute pancreatitis. Dig Dis Sci 34: 46-55 (1989)

Wilson, J.S., Korsten, M.A., Apte, M.V., Thomas, M.C., Haber, P.S., Pirola, R.C.: Both ethanol consumption and protein deficiency increase the fragility of pancreatic lysosomes. J Lab Clin Med 115: 749-755 (1990)

Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., Massague, J.: TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. Cell 71: 1003-1014 (1992)

Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massague, J.: Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature 370: 341-347 (1994)

Wu-Pong, S.: Calcium-dependent oligonucleotide cellular uptake. Biochimie 78: 33-38 (1996)

Wu-Pong, S., Weiss, T.L., Hunt, C.A.: Calcium dependent cellular uptake of a c-myc antisense oligonucleotide. Cell Mol Biol (Noisy -le-grand) 40: 843-850 (1994)

Wyatt, J.R., Vickers, T.A., Roberson, J.L., Buckheit, R.W., Jr., Klimkait, T., DeBaets, E., Davis, P.W., Rayner, B., Imbach, J.L., Ecker, D.J.: Combinatorially selected guanosine-quartet structure is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus envelope-mediated cell fusion. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 1356-1360 (1994)

Xodo, L.E., Manzini, G., Quadrifoglio, F., van der Marel, G.A., van Boom, J.H.: Effect of 5-methylcytosine on the stability of triple-stranded DNA--a thermodynamic study. Nucleic Acids Res 19: 5625-5631 (1991)

Xu, Y. und Szoka, F.C., Jr.: Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. Biochemistry 35: 5616-5623 (1996)

Xu, Y.D., Hua, J., Mui, A., O'Connor, R., Grotendorst, G., Khalil, N.: Release of biologically active TGF-{beta}1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285: L527-539 (2003)

Yakubov, L.A., Deeva, E.A., Zarytova, V.F., Ivanova, E.M., Ryte, A.S., Yurchenko, L.V., Vlassov, V.V.: Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? Proc Natl Acad Sci U S A 86: 6454-6458 (1989)

Yamaguchi, Y., Mann, D.M., Ruoslahti, E.: Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. Nature 346: 281-284 (1990)

Yamamoto, H., Hirayama, M., Genyea, C., Kaplan, J.: TGF-beta mediates natural suppressor activity of IL-2-activated lymphocytes. J Immunol 152: 3842-3847 (1994a)

Yamamoto, T., Noble, N.A., Miller, D.E., Border, W.A.: Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. Kidney Int 45: 916-927 (1994b)

Yang, J.P. und Huang, L.: Time-dependent maturation of cationic liposome-DNA complex for serum resistance. Gene Ther 5: 380-387 (1998)

Yang, Y., Mumy, M., Romeo, D., Wakefield, L.M.: Identification of the start sites for the 1.9- and 1.4-kb rat transforming growth factor-beta1 transcripts and their effect on translational efficiency. Gene 219: 81-89 (1998)

Yokoi, H., Sugawara, A., Mukoyama, M., Mori, K., Makino, H., Suganami, T., Nagae, T., Yahata, K., Fujinaga, Y., Tanaka, I., Nakao, K.: Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis. Am J Kidney Dis 38: S134-S138 (2001)

Yoo, H. und Juliano, R.L.: Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. Nucleic Acids Res 28: 4225-4231 (2000)

Yoshida, K., Toki, F., Takeuchi, T., Watanabe, S., Shiratori, K., Hayashi, N.: Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. Dig Dis Sci 40: 1561-1568 (1995)

Yoshimura, K., Rosenfeld, M.A., Nakamura, H., Scherer, E.M., Pavirani, A., Lecocq, J.P., Crystal, R.G.: Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. Nucleic Acids Res 20: 3233-3240 (1992)

Zamecnik, P.C. und Stephenson, M.L.: Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proc Natl Acad Sci U S A 75: 280-284 (1978)

Zdunek, M., Silbiger, S., Lei, J., Neugarten, J.: Protein kinase CK2 mediates TGF-beta1-stimulated type IV collagen gene transcription and its reversal by estradiol. Kidney Int 60: 2097-2108 (2001)

Zhang, J.C., Fabry, A., Paucz, L., Wojta, J., Binder, B.R.: Human fibroblasts downregulate plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human macrovascular and microvascular endothelial cells. Blood 88: 3880-3886 (1996)

Zhang, K., Rekhter, M.D., Gordon, D., Phan, S.H.: Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. Am J Pathol 145: 114-125 (1994)

Zhang, R., Yan, J., Shahinian, H., Amin, G., Lu, Z., Liu, T., Saag, M.S., Jiang, Z., Temsamani, J., Martin, R.R.: Pharmacokinetics of an anti-human immunodeficiency virus antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate (GEM 91) in HIV-infected subjects. Clin Pharmacol Ther 58: 44-53 (1995)

Zhang, Y., Feng, X.H., Derynck, R.: Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. Nature 394: 909-913 (1998)

Zhou, X. und Huang, L.: DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. Biochim Biophys Acta 1189: 195-203 (1994)

Zon, G.: Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides: introductory concepts and possible molecular mechanisms of toxicity. Toxicol Lett 82-83: 419-424 (1995)

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Betreuern, Mitarbeitern und Freunden bedanken, die mir bei dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, mich motivierten und unterstützten.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. M.G. Bachem danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und wissenschaftliche Beratung.

Für die praktische Betreuung während der Arbeiten, für die Ideen, Planung und Unterstützung danke ich insbesondere Frau Dr. Alexandra Schmid-Kotsas.

Danken möchte ich auch Privatdozent Dr. Georg Grön für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung klinische Chemie danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und das Engagement. Hier möchte ich insbesondere M. de Groot danken, die mir viele neue Techniken zeigte und mir mit viel Geduld zur Seite stand. Auch M. Adam möchte ich an dieser Stelle für die Unterstützung bei den Arbeiten und das Engagement danken.