Zentrale Einrichtung Klinische Chemie, Universitätsklinikum Ulm
Albert-Einstein-Allee 23
89070 Ulm
Prof. Dr. Hans-Jürgen Groß

Aktivierung von Akt (Proteinkinase B) in humanen pankreatischen Sternzellen (hPSC) durch Pankreaskarzinomzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Amely Berit Heinrich
aus Geislingen an der Steige

2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Groß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Tag der Promotion: 19.1.2018

In Gedenken an

Prof. Dr. med. Dr. troph. Dr. h.c. Max Georg Bachem

1952-2014

I Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Allgemeines zum Pankreaskarzinom 1

1.2 Desmoplastische Reaktion 1

1.3 Vaskuläre Strukturen des Pankreaskarzinoms und PSC 3

1.4 Der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg 4

1.5 Small interfering RNAs 5

1.6 Der PDPK1-Inhibitor GSK 2334470 6

1.7 Ziel der Arbeit 6

2 Material und Methoden 7

2.1 Material 7

2.2 Methoden 16

3 Ergebnisse 28

3.1 Transfektionseffizienz der siRNA 28

3.2 siRNA Knockdown 31

3.3 Zellviabilität nach Inkubation von hPSC mit GSK2334470 33

3.4 Phosphorylierung von Akt 34

3.5 Untersuchung der Migration von hPSC 46

3.6 Gesamte Proteinexpression 48

3.7 Evaluation der Proliferation mittels EdU-Färbung 49

3.8 Expression der Matrixmetalloprotease-2 (MMP-2) 51

3.9 Expression von Vimentin, Fibronektin, Kollagen-1, Kollagen-3 und α-Smooth-Muscle-Aktin 52

4 Diskussion 57

4.1 Transfektionseffizienz der siRNA und siRNA Knockdown 57

4.2 Die Aktivierung von Akt durch Pankreaskarzinomzellen, H6C7 und HUVEC wird durch GSK233447 gehemmt 59

4.3 Die Tumorzell-induzierte Migration und Proliferation von hPSC wird durch GSK gehemmt 62

4.4 Proteinsynthese von hPSC 63
4.5 Expression von Matrixmetalloproteasen 65
4.6 Expression von Vimentin, Fibronektin, Kollagen-1, Kollagen-3 und α-Smooth-Muscle-Aktin 66
4.7 Schlussfolgerung 66
5 Zusammenfassung 68
6 Literaturverzeichnis 70
7 Tabellenverzeichnis 78
8 Abbildungsverzeichnis 79

II Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
ddH_2O	double distilled water (zweifach destilliertes Wasser)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
PBS	Dulbecco’s Phopshate Buffered Saline 1x
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethenyl-2'-deoxyuridin
et al.	Lat.: et alii (und andere)
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum)
HCl	Salzsäure
hPSC	human pancreatic stellate cells (pankreatische Sternzellen)
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCC	pancreatic cancer cells (Pankreaskarzinomzellen)
PCC-SN	Tumorzellüberstand
PDGF-BB	Platelet-derived Growth Factor).
PDPK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
RT	Raumtemperatur
SB	Sodium Borate
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA (Ribonukleinsäure)
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
Thr-308	Threonin-308
Ser-473	Serin-473
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zum Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Die 2014 in den *Annals of Oncology* veröffentlichten Daten zur Vorhersage der krebsspezifischen Mortalität in der EU verdeutlichen dessen hohe Relevanz: Trotz sinkender Mortalität bei den meisten Krebsarten, ist diese beim Pankreaskarzinom in der EU bei beiden Geschlechtern steigend. [1–3] Das Pankreaskarzinom besitzt mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 8 % eine der schlechtesten Prognosen aller Krebsarten [1]. Im Frühstadium treten keine oder nur unspezifische Symptome auf, was dazu führt, dass sich mehr als die Hälfte der Fälle zum Diagnosezeitpunkt bereits in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium befinden und weniger als 10 % für eine operative Entfernung des Tumors in Frage kommen [4,1,5]. Ein weiterer Grund für die hohe Mortalität des Pankreaskarzinoms ist das geringe Ansprechen auf Chemotherapeutika und das häufige Auftreten von Rezidiven nach chirurgischer Resektion [5]. Mehr als 90 % der Pankreaskarzinome sind duktale Adenokarzinome [6]. Bekannte Risikofaktoren für die Entstehung sind Alkoholmissbrauch, Tabakkonsum, Adipositas, chronische Pankreatitis, zystische Raumforderungen des Pankreas, Diabetes mellitus sowie eine genetische Vorbelastung [7–10,6].

1.2 Desmoplastische Reaktion

Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat gezeigt, dass die unmittelbare Umgebung von Tumoren einen größeren Stellenwert in der Tumorgenese hat, als bis dato angenommen wurde [7]. Diese Mikroumgebung besteht beim Pankreaskarzinom unter anderem aus pankreatischen Sternzellen, Endothelzellen, Immunzellen und endokrin aktiven Zellen, die untereinander und mit den Tumorzellen kommunizieren. Ein Charakteristikum des Pankreaskarzinoms ist die ausgeprägte fibrotische Mitreaktion des umgebenden Stromas, die sogenannte desmoplastische Reaktion, zu der die pankreatischen Sternzellen entscheidend beitragen [8]. 1998 beschrieben Apte et al. die den hepatischen Sternzellen ähnlichen, sternförmigen pankreatischen Zellen bei Ratten. Im gleichen Jahr wurden sie von Bachem et al. im menschlichen Pankreas isoliert, kultiviert und charakterisiert [9,10]. Sie besitzen

zwei Aktivierungszustände: Ruhende Sternzellen dienen als Retinol- und Fettspeicher. Durch Schädigung des Pankreas und Entzündung entwickeln sie sich zu myofibroblastenähnlichen Zellen [10]. Im Vergleich zu ruhenden PSC verlieren sie ihren Retinolspeicher, exprimieren nun Alpha-Smooth-Muscle-Actin und Desmin, proliferieren und synthetisieren erhöhte Mengen an Extrazellulärmatrix (EZM), beispielsweise Kollagene und Adhäsionsproteine wie Fibronektin [10,9].

Studien zeigten ihre große Bedeutung für das Tumorwachstum und die Invasivität des Pankreaskarzinoms [11–13]. *In vitro* und *in vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombination aus Chemotherapie und „anti-stromaler" Therapie der Monotherapie mit Chemotherapeutika überlegen ist [14].

1.2.1 MMP-2-Produktion durch PSC

Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind eine Gruppe extrazellulärer Peptidasen, deren Bedeutung für die Tumorprogression in den letzten Jahren immer deutlicher wurde. Sie tragen durch Umbau der Extrazellulärmatrix und durch Beeinflussung der Proliferation und Migration von Zellen sowie der Angiogenese entscheidend zum Wachstum, der Invasivität und der Metastasierung von Tumoren bei [15,16]. Sie wurden außerdem in Zusammenhang mit der Chemoresistenz von Tumoren gebracht [17].

Es wird angenommen, dass die Matrixmetalloprotease-2 (MMP-2, auch Typ IV Kollagenase oder Gelatinase A) eine Schlüsselrolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren spielt und dass dies vor allem über die Degradierung von Kollagen IV der Basalmembran geschieht [18,19,11,20]. Studien zeigten eine vermehrte Expression von MMP-2 vor allem im Randbereich von Pankreaskarzinomen. Diese korreliert mit einer vermehrten desmoplastischen Reaktion, einer erhöhten vaskulären Infiltration, einer erhöhten Rate an Fernmetastasen, einer größeren Entdifferenzierung der Tumorzellen und einer schlechten Prognose. [21–26]

Pankreatische Sternzellen wurden als die MMP-2 produzierenden Zellen identifiziert. Aktivierte PSC produzieren mehr MMP-2 als ruhende und werden hierzu von Pankreaskarzinomzellen via EMMPRIN (extracellular matrixmetalloproteinase inducer) und durch Transforming growth factor beta (TGF-β) und Interleukin-6 (IL-6) stimuliert. [27,13,28]

1.2.2 Proliferation und Migration von PSC

Die erhöhte Anzahl von PSC im Stroma des Pankreaskarzinoms kommt vermutlich einerseits durch eine gesteigerte lokale Proliferation und andererseits durch eine vermehrte Migration von PSC aus umliegenden Bereichen zustande [29]. Es wurde nachgewiesen, dass die Proliferation und Migration von PSC durch Pankreaskarzinomzellen stimuliert wird und dass die Migration von PSC zumindest teilweise abhängig von der Proliferation ist [29–33]. Humane PSC wurden in Metastasen des Pankreaskarzinoms nachgewiesen, was die Vermutung nahelegt, dass hPSC, durch Karzinomzellen stimuliert, mit diesen migrieren, um am Ort der Metastasen eine für die Karzinomzellen förderliche Umgebung zu schaffen [31].

1.3 Vaskuläre Strukturen des Pankreaskarzinoms und PSC

Tumore sind häufig gut vaskularisiert und besitzen Gefäßstrukturen mit abnormem Blutfluss, gesteigertem Gefäßwachstum und Veränderungen in Endothelzellen, wie interzelluläre Lücken und gestörte Endothelzellbarrieren [34,35]. Es ist anerkannt, dass die Regulation der Angiogenese entscheidend durch Stromazellen beeinflusst wird [36]. Beim Pankreaskarzinom zeigt sich im Gegensatz zu anderen Tumoren jedoch eine Hypovaskularisation, wobei vor allem die zentralen Areale des Tumors schlecht perfundiert und hypoxisch sind, und nur der Randbereich eine Neoangiogenese aufweist [37]. Die veränderte Durchblutung wird mitverantwortlich für das geringe Ansprechen des Pankreaskarzinoms auf Chemotherapeutika gemacht [38]. Anders als bei schlechter Durchblutung zu erwarten, ist jedoch beispielsweise die Glukoseaufnahme von Pankreaskarzinomen normal. Es wurden basale Microvilli in Endothelzellen beim Pankreaskarzinom entdeckt, die die Gesamtoberfläche der Gefäße erweitern und eine erhöhte Glukoseaufnahme im Vergleich zum restlichen Gewebe zeigen. Diese basalen Microvilli sind in gesundem Pankreasgewebe nicht zu finden und somit wahrscheinlich ein Anpassungsmechanismus, um den Tumor mit den benötigten Nährstoffen zu versorgen. [39]

Dass PSC einen Effekt auf die Angiogenese haben, wurde bereits nachgewiesen: So stimulieren PSC die Angiogenese beim Pankreaskarzinom im orthotopen Mausmodell und die Röhrenbildung von Endothelzellen und deren Proliferation unter normoxischen Bedingungen durch VEGF (Vascular Endothelial Growth

Factor) *in vitro* [40,31]. Im Gegensatz dazu wurde die Proliferation von Endothelzellen nach Kokultur mit PCC alleine oder in Kombination mit PSC jedoch supprimiert [37]. Die genaue Rolle der PSC in der Angiogenese des Pankreaskarzinoms und die Mechanismen der Interaktion von PSC und Endothelzellen bleiben aktuell also bislang unklar und bedürfen weiterer Klärung.

1.4 Der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg

Phosphoinositid-3-Kinasen(PI3K) der Klasse Ia sind Heterodimere mit einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit. Extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren katalysieren beispielsweise über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder das Onkogen Ras die Rekrutierung von PI3K an die Zellmembran sowie deren Phosphorylierung und somit Aktivierung. Die aktivierten PI3K phosphorylieren das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ($PI(4,5)P_2$) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat ($PI(3,4,5)P_3$). Signalproteine mit einer Pleckstrin-Homologie-Domäne wie die Serin-Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) und die 3-phosphoinositide dependent Protein Kinase-1 (PDPK1) binden direkt an ($PI(3,4,5)P_3$). Durch diese Kolokalisation kann Akt durch Phosphorylierung aktiviert werden. [41] Die Isoformen der Proteinkinase B (Akt) nehmen wie in Abbildung 1 dargestellt eine zentrale Rolle im Downstream des Signalwegs ein.

Die Phosphorylierung der Akt erfolgt an zwei Bindungsstellen: an Threonin-308 (Thr-308), im sogenannten T-Loop der Kinase, und an Serin-473 (Ser-473), am sogenannten hydrophoben Motiv. Die Phosphorylierung an Thr-308 ist essentiell für die maximale Aktivierung der Akt. Es konnte gezeigt werden, dass diese durch die PDPK1 erfolgt. [42]

Der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg beeinflusst neben der Proliferation und Migration von Zellen viele weitere wichtige zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Apoptose, Proteinsynthese und den Stoffwechsel von Zellen [43]. Mutationen in Genen, die zu Veränderungen im PI3K/Akt-Signalweg führen, finden sich in multiplen humanen Tumoren und tragen entscheidend zur Tumorgenese bei [44,43].

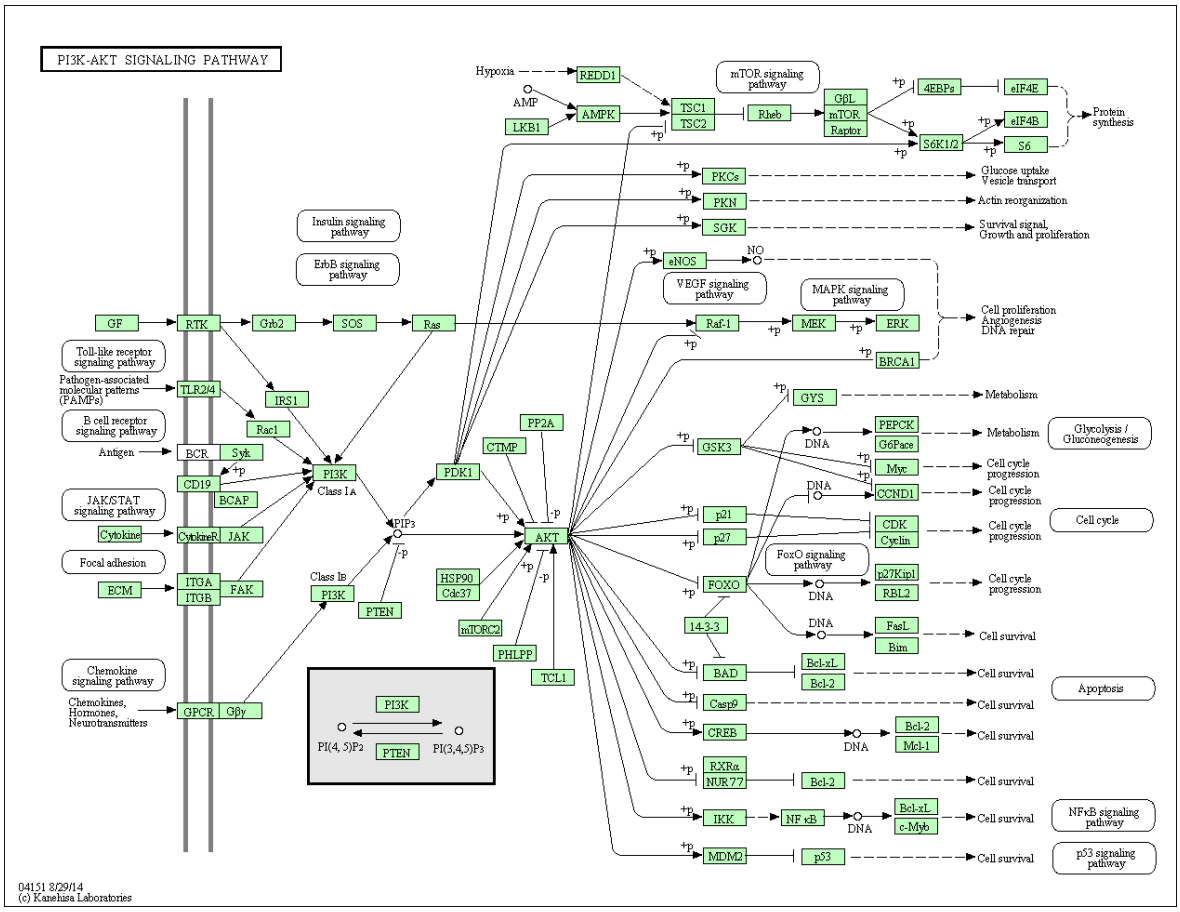


Abbildung 1: PI3-AKT-Signalweg [45–47]

1.5 Small interfering RNAs

siRNAs (small interfering RNAs) sind kleine, nicht kodierende doppelsträngige RNAs mit 20-30 Nukleotiden, die über RNA-Interferenz (RNAi) unter anderem die Transkription von Genen und die Replikation von Viren inhibieren [48]. Die Entdeckung der RNAi durch Andrew Z. Fire und Craig C. Mello wurde 2006 mit den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet [49]. siRNA wurden auch in humanen Zellen nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass spezifische synthetische siRNAs in humane und andere Zellen eingebracht werden können und im Zytoplasma über den Abbau von mRNAs die Synthese des jeweiligen Proteins ausschalten oder hemmen [50,51]. Es gibt diverse Möglichkeiten, siRNAs in Zellen einzuschleusen [52]. In dieser Arbeit wurden hPSC durch das HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) mittels Lipofektion transfiziert. Die Kombination aus kationischen und neutralen Lipiden im Transfektionsreagenz bindet Nukleinsäuren und schleust die siRNA über die Bildung von Liposomen, die mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle ein [53,54].

1.6 Der PDPK1-Inhibitor GSK 2334470

GSK 2334470 ist ein selektiver, direkter Inhibitor der PDPK1 und verhindert die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der Akt. [55]

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des PI3-Kinase-Wegs in humanen pankreatischen Sternzellen für die Interaktion zwischen diesen und Pankreaskarzinomzellen weiter zu untersuchen. Es wurde geprüft, ob die im PI3-Kinase-Weg zentrale Aktivierung der Akt in humanen pankreatischen Sternzellen durch Pankreaskarzinomzellen gesteigert wird und ob sich diese Steigerung durch Hemmung der PDPK1 beeinflussen lässt. Hierfür wurden zwei verschiedene siRNAs und der direkte PDPK1-Inhibitor GSK 233470 getestet.

Im Anschluss wurden die Effekte dieser Hemmung auf die Migration, die Zellproliferation, die gesamte Proteinexpression, die Expression der Matrixmetalloprotease 2 und die Expression von Vimentin (einem Intermediärilament der Gruppe der Desmine), α-Smooth-Muscle-Aktin, Fibronektin, Kollagen-1 und Kollagen-3 untersucht.

Fragestellung:

(i) Wird die Aktivierung von Akt in hPSC durch Pankreaskarzinomzellen stimuliert?

(ii) Wird die PDPK1 durch siRNA oder GSK effektiv gehemmt?

(iii) Hat die Hemmung der PDPK1 Auswirkungen auf die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Akt?

(iv) Hat die Hemmung der Aktivierung von Akt Auswirkungen auf die Zellmotilität, die Proteinexpression, die Zellproliferation, die Expression von Matrixmetalloprotease 2 (MMP-2) und die Expression von Vimentin, α-Smooth-Muscle-Aktin, Fibronektin, Kollagen-1 und Kollagen-3 von hPSC?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Nährmedien

4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin
Amplification Diluent	NEN Life Science Products, Boston, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories, Österreich
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad, USA
Dimethlysulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x (PBS)	GIBCO by life technologies, NZ
Dulbecco's modified Eagle Medium(DMEM)/HAMs F12 (1:1) w/o L-Glutamine	PAA Laboratories, Österreich
EDTA – Dinatriumsalz-Dihydrat	PanReac AppliChem, USA
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum)	GIBCO by life technologies, NZ
Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Laemmli Probenpuffer, 6fach reduzierend	Bio-RAD, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamine (200 mM) with Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Österreich
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na_3VO_3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin 100x	Biochrom AG, Berlin
Pepstatin	Biochrom AG, Berlin
Phosphate Buffered Saline Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
Rotiophorese 10x SDS Page	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel B	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS Solution, 20 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Schwerte
TRIS Ultrapure	USB Corporation, USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim

Trypsin-EDTA (1x) UV irradiated 0,05 %/0,02 % in PBS	PAA Laboratories, Österreich
TSA Biotin System Reagent	NEN Life Science Products, Boston, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zymogram Development Buffer 10x	Bio-Rad, USA
Zymogram Renaturation Buffer 10x	Bio-Rad, USA
Zymogram Sample Buffer	Bio-Rad, USA

2.1.2 Puffer und Rezepte

3 % BSA in in 0,1 % PBS-T Waschpuffer:

3 g BSA

100 ml PBS-T 0,1 % Waschpuffer

4 % PFA in PBS:

4 g PFA + 60 ml PBS + einige Tropfen (5-10) NaOH bei 60 °C ca. 1 h lösen, bis die Lösung klar wird. PH auf 7,0-7,4 einstellen. Mit PBS auf 100 ml auffüllen und filtern.

5 % BSA in 0,1 % PBS-T Waschpuffer:

10 g BSA

200 ml PBS-T 0,1 % Waschpuffer

BSA auf dem Magnetrührer in PBS-T lösen und anschließend filtern.

Coomassie-Blau (500 ml):

1,7 g Coomassie Brilliant Blue R-250

200 ml Methanol

mit Parafilm bedecken und 1 h auf dem Magnetrührer rühren, dann filtern.

250 ml ddH_2O

50 ml Essigsäure

DNA-Puffer:

50mM NaH2PO4

2M NaCl

mit NaOH pH-Wert auf 7,4 einstellen

Entfärber Zymographie (2 L):

800 ml	Methanol
200 ml	Essigsäure
1 l	ddH_2O

Lämmli Loading Puffer 6-fach reduzierend:

12 %	SDS
0,05 %	Bromphenolblau
60 %	Glycol
12 %	Beta-Mercaptoethanol
1,5 M	Tris-HCl pH 6,8

Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese:

100 ml	Rotiophorese 10 x SDS-Page
900 ml	ddH_2O

PBS-T (Phosphate Buffered Saline-Tween) 0,1 % Waschpuffer:

9,55 g/l	PBS
1 ml / l	Tween® 20
1 l/l	ddH_2O

RIPA-Puffer:

80 ml	ddH_2O

790 mg Tris-HCl

900 mg NaCl

pH auf 7,4 einstellen

1 ml Triton-X-100

2,5 ml Na-Deoxycholat (10 %; 1g auf 10 ml ddH_2O) zugeben, gut schütteln.

EDTA 1M lösen: 292,25 mg auf 700 µl ddH2O und 300 µl 8 NaOH

ad 100 ml ddH2O

100 µl Aprotinin (1 mg/ml in ddH2O)

100 µl Leupeptin (1 mg/ml in ddH2O)

100 µl Pepstatin (1 mg/ml in Methanol)

500 µl Na_3VO_4 (aktiviert)

Bei -20 °C aufbewahren, vor Gebrauch AEBSF zusetzen

Sammelgel für Gelelektrophorese und Zymographie: (ausreichend für 2 Gele)

933 µl Rotiophorese Gel A

736 µl Rotiophorese Gel B

50 µl 20 % SDS

1250 µl Tris-HCl 0,625 M

730 µl ddH_2O

100 µl APS

10 µl Temed

Semi-Dry Transferpuffer für Westernblot:

2,93 g/l Glycin

5,81 g/l Tris-HCl

1,88 ml/l 20 % SDS

200 ml/l Methanol

800 ml ddH_2O

TNB-Puffer:

0,1 M	Tris-HCl
0,15 M	NaCl
0,5 %	Bovines Serum Albumin

auf pH 7,5 einstellen

Trenngel 10 % für Gelelektrophorese: (ausreichend für 2 Gele)

4 ml	Rotiophorese Gel A
2,5 ml	Rotiophorese Gel B
45,5 µl	20 % SDS
4,525 ml	Tris-HCl 0,75 M
1,428 ml	ddH_2O
100 µl	APS
7,5 µl	Temed

Trenngel 7,5 % für Zymographie: (ausreichend für 2 Gele)

2,38 ml	Rotiophorese Gel A
1,875 ml	Rotiophorese Gel B
1,875 ml	20 % SDS
3,94 ml	Tris-HCl 0,75 M
0,754 ml	ddH_2O
1 ml	Gelatine
80 µl	APS
6 µl	Temed

Tris-HCl-Puffer pH 6,8 / 0,625 M:

37,85 g/ 500 ml	Tris
500 ml	ddH_2O

Mit HCl auf pH 6,8 einstellen.

Tris-HCl-Puffer pH 8,8 / 0,75 M:

90,85 g/l Tris

1000 ml ddH_2O

Mit HCl auf pH 8,8 einstellen.

2.1.3 Antikörper

Polyclonal rabbit PDK1 Antibody	Cell Signaling Technology, USA	3062
Polyclonal Rabbit Phospho-Akt (Ser473) Antibody	Cell Signaling Technology, USA	9271S
Monoclonal Rabbit Phospho-Akt (Thr308)	Cell Signaling Technology, USA	9088
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako, Hamburg	P0260
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako, Hamburg	P0217
Monoclonal Mouse Anti-β-Actin antibody Clone AC-15	Sigma-Aldrich, Steinheim	A5441
Polyclonal Rabbit Akt-antibody	Cell Signaling Technology, USA	9272
Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone V9	Dako, Hamburg	M0725
Rabbit Anti-human Fibronectin	Dade Behring, USA	192C30
Rabbit Anti-Human Collagen Type I Polyclonal Antibody	Merck Millipore, Darmstadt	AB745
SA-FITC (Peroxidase konjugiertes Streptavidin)	Dako, Hamburg	F0422
SA-Alexa Fluor (Alexa-Fluor konjugiertes Streptavidin)	Thermo Fisher Scientific, USA	R 568

Polyclonal Antibody to Collagen type III alpha 1 chain-Biotin (COL3A1)	Acris Antikörper, Göttingen	R1040B
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4	Dako, Hamburg	M0851
Polyclonal rabbit anti-mouse Immunoglobulins	Dako, Hamburg	Z0259
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotinylated Swine F(ab')2	Dako, Hamburg	E0421
Streptavidin/HRP (Peroxidase konjugiertes Streptavidin)	Dako, Hamburg	P0397

2.1.4 Inhibitoren von Signalwegen

AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, NL
GSK 2334470	Tocris Bioscience, USA
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, NL
Hs_PDPK1_5 FlexiTube siRNA	Qiagen, NL
Hs_PDPK1_7 FlexiTube siRNA	Qiagen, NL

2.1.5 Assay kits

DC™ Protein Assay	Bio-Rad, USA
AllStars Negative siRNA AF 488 (5 nmol)	Qiagen, NL
Click-iT® EdU Alexa Flour® 488 Imaging Kit	Invitrogen, USA

2.1.6 Geräte und Ausstattung

6-/12-/24-Well Miktrotiterplatten	BD, USA
CL-XPosure™ Film	Thermo Scientific, USA
CO_2-Inkubator Typ BB-6220	Haraeus Holding, Hanau
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad, USA

Falcon 15 ml und 50 ml	BD, USA
Falcon 250 ml cell culture flask (75 cm²)	BD, USA
Fluoreszenzmikroskop AxioCam MRm	Carl Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus, Japan
Gel Doc 1000	Bio-Rad, USA
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Immobilon-P Membran	Merck Millipore, Darmstadt
Magnetrührer Ikamag Reo basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Telaval31	Carl Zeiss, Oberkochen
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad, USA
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidholph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Plattformschüttler Unimax 2010	Heidholph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Scanner CanoScan8400F	Canon, Japan
Short Plates	Bio-Rad, USA
Sterile Werkbank Herasafe HS 18/2	Heraeus Holding, Hanau
Stickstofftank Model 8038 S/N 14830.59	Thermo Scientific Forma, USA
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic	Bio-Rad, USA
Transfer Cell Blotkammer	Bio-Rad, USA
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Victor™ 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer / Wallac, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Waage LC 2201P	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen

Zellschaber	Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifuge b415 C	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos	Haraeus Holding, Hanau
Zentrifuge Heraeus Sepatech Biofuge A	Haraeus Holding, Hanau
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen

2.1.7 Software

Microsoft Excel für Windows	
ImageJ	Freeware unter http://imagej.nih.gov/ij/
Past (Freeware)	Freeware unter http://folk.uio.no/ohammer/past/

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolierung

hPSC wurden im Anschluss an Pankreasresektionen wie in Bachem et al. 1998 beschrieben isoliert und *in vitro* kultiviert [10]. hPSC von insgesamt 11 verschiedenen Patienten wurden untersucht. Die Zustimmung der Patienten und einer Ethikkommission lagen vor.

Konditionierter Überstand von PCC (AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, MIA PaCa-2, Panc-1, Panc-89 und ULA-PaCa) und Überstand von hPSC mesenchymalen Ursprungs, von Endothelzellen (HUVEC), sowie von H6C7-Zellen, einer immortalisierten, epithelialen, nicht tumorösen Pankreaszelllinie, wurde zur Stimulation von hPSC verwendet. Die Gewinnung des Überstandes erfolgte wie in Bachem et al. 2005 beschrieben [32]. Die Zelllinien AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, MIA PaCa-2, Panc-1, Panc-89 sowie HUVEC wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen, ULA-PaCa wurden im eigenen Labor isoliert [56]. H6C7-Zellen, die retroviral mit dem Rb-Gen transfiziert und dadurch immortalisiert wurden, wurden unserem Labor freundlicherweise von Ming-Sound Tsao zur Verfügung gestellt [57].

2.2.2 Zellkultur

Wenn nicht anders angegeben, wurde als Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/HAMs F12 unter Zugabe von 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 125 ng/ml Amphotericin B verwendet. Die Inkubation aller behandelten Zellen erfolgte stets in einem Brutschrank bei 37°C unter 5 % CO_2-Begasung und 95 %iger Luftfeuchtigkeit.

Nach Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die eingefrorenen Zellen angetaut und rasch in das Nährmedium überführt. Zur Entfernung des Dimethlysulfoxid (DMSO) folgte eine dreiminütige Zentrifugation mit 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei Raumtemperatur (RT). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10 ml Nährmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS) resuspendiert. Die Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen überführt und weiter kultiviert. Das Nährmedium wurde jeden zweiten Tag nach zweimaligem Spülen mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x (PBS) zum Entfernen von Rückständen gewechselt. Bei Erreichen einer rund 70 %igen Konfluenz der Zellen wurden diese durch eine zweiminütige Inkubation bei 37 °C mit 3 ml 0,25 % Trypsin-Lösung mit 0,01 % Ethylendiamintetraacetat (EDTA) abgelöst, nach mikroskopischer Kontrolle in ein 50 ml-Falcon überführt und bei 2000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Sediment in Nährmedium mit FBS resuspendiert und anschließend in Kulturflaschen, respektive auf 6-,12- oder 24-Well-Mikrotiterplatten subkultiviert. Die Zellen wurden nach Anwachsen zweimalig mit PBS gewaschen und für 24 h in Nährmedium ohne Zusatz von FBS inkubiert.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Um die Effekte von PCC-Überstand auf die Stimulierung von Akt in hPSC zu untersuchen, wurden diese mit oder ohne FBS, mit oder ohne 50 % Serum-freiem PCC-Überstand (Kultivierung von PCC und Gewinnung des Überstands siehe Abschnitt 2.2.1) sowie mit verschiedenen Konzentrationen (0-10 µM) GSK über verschiedene Zeiträume inkubiert. Die exakten Inkubationsbedingungen sind im Kontext der einzelnen Experimente angeführt.

2.2.3 Zelllyse und Probengewinnung

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium aus den Wells abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mittels RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay)-Puffer lysiert. Hierfür wurde 1 ml RIPA-Puffer mit 10 µl 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF) versetzt und davon je 150 µl in jedes Well pipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 30 Minuten schwenkend auf Eis inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch gelöst. Das so gewonnene Lysat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C und 13 000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um nicht lösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in 30 µl-Portionen bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung des Proteingehalts der Proben der einzelnen Versuche erfolgte durch den kolorimetrischen Bio-Rad DC™ Protein Assay.

Als Standards diente in RIPA-Puffer verdünntes Bovines-Serum-Albumin (BSA) mit Konzentrationen von 0,062-1,5 mg/ml.

In jedes Well einer Mikrotiterplatte wurden zunächst 5 µl Standard beziehungsweise 5 µl Probe in Doppelbestimmung pipettiert. Von einem Gemisch aus 1000 µl Reagenz A und 20 µl Reagenz S wurden jeweils 25 µl in jedes Well gegeben. Pro Well wurden 200 µl Reagenz B hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion am Victor™ 1420 Multilabel Counter Wallac mit dem Programm Wallac 1420 Workstation bei 650 nm gemessen. Anhand der Standardkurven wurde aus den Extinktionskurven der gemessenen Proben der zugehörige Konzentrationswert mittels linearer Regression bestimmt.

2.2.5 DNA-Bestimmung

Zur Bestimmung der Ladevolumina der Gelelektrophorese wurde die DNA-Menge der auf den Wells vorhanden Zellen bestimmt. Hierfür wurden die Mikrotiterplatten aufgetaut, 600 µl DNA-Puffer + 300 µl Trypsin-EDTA gemischt, 150 µl pro Well pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das so entstandene Lysat wurde homogenisiert und in Reaktionsgefäße überführt. Von jeder Probe wurden, in Doppelbestimmung, je 40 µl Lysat mit 360 µl DNA-Puffer in einer 24-Well-

Mikrotiterplatte versetzt. Dazu wurden 1600 µl Bisbenzimid (final 2 µg/ml) zugegeben. Als Standard dienten jeweils 40 µl verdünnte Kalbsthymus-DNA (final 0 bis 10 µg/ml), deren Konzentration zuvor photometrisch bei 260 nm gemessen wurde (wobei 1 OD (optional densitiy) einer Konzentration von 50 µg/ml DNA entspricht). Danach wurden die Proben 30 min lichtgeschützt inkubiert und schließlich am Viktor die Fluoreszenz bei 460 nm gemessen. Aus den entsprechenden Standardkurven (Fluoreszenz der Standards in AU (Arbitrary units) versus DNA-Konzentration) wurden aus den Fluoreszenzintensitäten der Proben mittels linearer Regression deren DNA-Konzentrationen bestimmt.

2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page). Hierfür wurde zunächst Rotiophorese 10x SDS Page-Laufpuffer 1:10 mit zweifach destilliertem Wasser (ddH_2O) verdünnt und bis zur Verwendung bei 4 °C gekühlt aufbewahrt. Für die Gelelektrophorese wurde das Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3 Cell-System verwendet. Da Phospho-Akt und Akt ein Molekulargewicht von ungefähr 60 Kilodalton (kDa) haben, wurde ein 10%iges Trenngel hergestellt und davon je 4,5 ml zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Um eine gleichmäßige horizontale Kante zu erhalten, wurde das Trenngel vorsichtig mit ddH_2O überschichtet. Nach 30 min Aushärtungszeit konnte das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert werden. Das Proteinlysat der zu messenden Proben wurde auf Eis aufgetaut. Die zur Gewährleistung äquivalenter aufgetragener Proteinmengen berechneten Volumina wurden mit 6x reduzierendem Sodium Borate (SB)-Puffer gemischt. Die Proben wurden 5 Minuten bei 90 °C auf einem Heizblock aufgekocht und bei 2000 rpm für 1 min zentrifugiert. In die Taschen des Sammelgels wurden als Referenz je 5 µl des jeweiligen Precision Plus Protein™ Dual Color Standards von Bio-Rad mit bekanntem Molekulargewicht beziehungsweise 36 µl der jeweiligen Probe pipettiert. Pro Spur wurden in den Versuchen so Proteinmengen von 6 bis 14 µg aufgetragen. Nach Einsetzen von 2 Gelen in die Gelkammer wurde diese mit Laufpuffer aufgefüllt und die Gelelektrophorese bei 25 mA und maximal 150 Volt für 2 ½ h durchgeführt.

2.2.7 Western Blot

Der Proteintransfer auf die Trägermembran erfolgte per Semi-dry-Westernblot. Hierfür wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore) zugeschnitten und zum Aktivieren unter dem Abzug für einige Sekunden in Methanol und anschließend in Semi-Dry-Transferpuffer gelegt. Die Trans-Blot® SD Cell Blotkammer sowie das ebenfalls zugeschnittene Blotpapier (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad) wurden mit Semi-Dry-Transferpuffer befeuchtet. Das Blotpapier wurde auf die Blotkammer gelegt. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen, das Sammelgel abgeschabt und das Trenngel vorsichtig in Semi-Dry-Transferpuffer überführt und anschließend möglichst ohne Lufteinschlüsse, um einen gleichmäßigen Proteintransfer zu gewährleisten, auf dem Blotpapier platziert. Der Semy-Dry-Westernblot wurde bei 109 mA und maximal 100 Volt für 1,5 h durchgeführt.

2.2.8 Nachweis der Matrixmetalloprotease-2 (MMP-2) durch Zymographie

Die Quantifizierung von Matrixmetalloprotease-2 (MMP-2) im Zellkulturüberstand erfolgte mittels Zymographie. hPSC wurden auf eine 6-Well-Mikrotiterplatte umgesetzt, für 24 h ohne Serum inkubiert und für 48 h mit den entsprechenden Bedinungen inkubiert. Der Überstand wurde nach Ende der Inkubationszeit von den Wells abgenommen, in 1,5 ml- Reaktionsgefäßen überführt, für 5 min bei 1000 rpm und RT zentrifugiert, portioniert und bei -20 °C gelagert. Die Mikrotiterplatten wurden zur späteren DNA-Bestimmung ebenfalls bei -20 °C zwischengelagert.

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde zunächst ein 7,5%iges Polyacrylamid-Trenngel mit 2 % Gelatine gegossen. Die Gelatine diente als Substrat für MMP-2, welche eine Gelatinase ist. Für 2 Gele wurden 20 mg Gelatine in 1 ml ddH_2O gelöst, auf dem Heizblock für 15 min auf 90 °C erhitzt und für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Über das Trenngel wurde, wie im Abschnitt Westernblot beschrieben, ein Sammelgel gegossen. Die zu messenden Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer (Zymogram Sample Buffer, Bio-Rad) verdünnt, auf dem Vortex gut vermischt und für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Probengemische wurden nicht aufgekocht, um eine Denaturierung der Proteine und somit einen Verlust der Proteaseaktivität der MMP-2 zu verhindern. Die Gelelektrophorese wurde auf Eis bei konstanten 90 Volt für circa 1,5 h durchgeführt, bis das Farbband das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Zwei Gele wurden je zweimalig für jeweils 15 min in 100 ml Renaturierungspuffer auf einem Schüttler inkubiert. Die Molekulargewichtsstandards wurden anschließend durch Ausstanzen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze markiert und die Gele über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C in Developementpuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gele für etwa 1 h vollständig in Comassie-Blau-Färbelösung eingefärbt und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt. Areale, an denen die Gelatine durch MMP-2 abgebaut worden war, wurden hierbei wieder als weiße Banden auf dem Blau gefärbten Gel sichtbar.

2.2.9 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurden zunächst 3 % Bovine Serum Albumin in Phosphate Buffered Saline-Tween (PBS-T) 0,1 %-Waschpuffer gelöst und die Membran darin zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen für 30 min geblockt. Dann wurde die Membran mit dem in 3 % BSA/PBS-T-Lösung verdünnten spezifischen Primärantikörper inkubiert: PDPK1-, Phospho-Akt Thr-308- und Phospho-Akt Ser-473-Antikörper (alle 1:1000) über Nacht bei 4 °C. Die Membranen wurden dreimal für 5 min in PBST 0,1 % gewaschen. Dann wurden die Membranen auf dem Schüttler zur Entfernung ungebundener Antikörper für 45 min bei RT mit einem Merrettichperoxidase (HRP)-markierten spezifischem sekundären Antikörper inkubiert (Anti-rabbit-IgG 1:4000 bei PDPK1-Antikörper bzw. 1:10 000 bei Total-Akt-Antikörper, Anti-mouse-IgG 1:2000). Nach einem weiteren Waschschritt in PBST 0,1 % erfolgte die Inkubation mit Luminol im Mischungsverhältnis 1:1 mit Hydrogen Peroxid (Thermo Scientific, Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution und Super Signal West Pico Luminol Enhancer). Die durch die Peroxidase-markierten Antikörper ausgelöste Chemilumineszenz wurde über die Belichtung und Entwicklung eines Röntgenfilms detektiert. Der Film wurde jeweils so lange in der Röntgenkassette belichtet, bis die Banden deutlich auf dem Film zu erkennen waren. In der Regel waren dies 3 bis 10 Minuten. Die Größenstandards wurden zur Kontrolle des Molekulargewichts mit Filzstift auf dem Röntgenfilm markiert.

Zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinladung erfolgte die Normierung auf β-Aktin beziehungsweise Total-Akt. Die Membran wurde hierfür in PBST 0,1 % gewaschen und anschließend für 30 min mit Stripping Buffer (Thermo Scientific) inkubiert, um alle gebundenen Antikörper zu entfernen. Nach einem weiteren

Waschschritt in PBST 0,1 % wurde die Membran wiederum mit primärem (β-Actin-Antikörper 1:4000 für 45 min bei RT, Total-Akt-Antikörper 1:1000 über Nacht bei 4 °C) und sekundärem Antikörper (Anti-mouse-IgG 1:2000), sowie Chemilumineszenz inkubiert und ein Röntgenfilm belichtet.

2.2.10 Quantifzierung der Banden mittels ImageJ

Zur Quantifizierung der Banden wurden die belichteten Röntgenfilme (Westernblot) mit dem CanonScan8400F beziehungsweise die Gelatinegele (Zymographie) mit dem Gel Doc 1000 eingescannt. Die Bilder wurden in ImageJ geöffnet und ein Dichteverteilungsprogramm der einzelnen Banden erstellt. Die Zymographiegele mussten hierfür zunächst invertiert werden, um schwarze Banden zu erhalten. Die Fläche unter den Intensitätsmaxima der Banden (Area under the curve, AUC) wurde gemessen. Zur Normierung auf β-Aktin beziehungsweise Total-Akt wurde hierfür ebenfalls die AUC bestimmt und ins Verhältnis zur AUC der jeweiligen PDPK1-, Phospho-Akt Thr-308- und Phospho-Akt Ser-473-Bande gesetzt. Die Banden der Zymographie wurden auf die DNA-Menge der Proben normiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Einzelversuche untereinander wurden die Werte jeweils auf die Referenzprobe (=1) normiert.

2.2.11 Inkubation mit siRNA

2.2.11.1 Transfektionseffizienz der siRNA

Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen von hPSC mit siRNA wurden zunächst unterschiedliche Verhältnisse von Alexa Fluor 488-markierter siRNA zu HiPerFect® Transfection Reagent (jeweils aus dem AllStars Neagtive siRNA AF 488 Control Kit, Qiagen) mit unterschiedlicher Inkubationsdauer getestet.

Die Zellen wurden hierfür auf eine 24-Well-Mikrotiterplatte mit einer Dichte von ca. 4000 Zellen / cm² ausgesät, nach dem Anwachsen (circa 3-4 h) mit PBS gewaschen und für 24 h mit Medium ohne FBS inkubiert. In Eppendorfreaktionsgefäßen wurden die unterschiedlichen Transfektionsbedingungen angesetzt und die Zellen nachfolgend bei 37 °C transfiziert (500 µl Gesamtvolumen pro Well). Die Zellen wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Hierfür wurden Hoechst Bisbenzimid 33258 2 mg/ml ddH_2O 1:2000 verdünnt und auf jedes Well 150 µl pipettiert und für

30 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden nun in PBS gelagert und die Lichtemission der so gefärbten Kerne sowie der Alexa Fluor 488-markierten siRNA mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus IX81) fotografiert. Pro Well wurden zwei Aufnahmen gemacht. Die so entstandenen Bilder wurden mit ImageJ geöffnet. Die erfolgreich transfizierten Zellen (also die Alexa Fluor 488-positiven Zellen), sowie die insgesamt vorhandenen Zellen (also die Bisbenzimid-positiven Zellen) wurden über den Programmpunkt „Cell counter“ gezählt und so der prozentuale Anteil transfizierter Zellen ermittelt.

2.2.11.2 siRNA Knockdown

Zur Untersuchung des Knockdowns der PDPK1 durch siRNA wurden hPSC mit zwei verschiedenen, spezifisch gegen PDPK1 gerichteten siRNAs in Kombination mit HiPerFect® Transfection Reagent in An- und Abwesenheit von FBS inkubiert. Die Zellen wurden auf einer 6-Well-Mikrotiterplatte mit einer Dichte von etwa 16.000 Zellen / cm² ausgesät, nach dem Anwachsen (circa 3-4 h) mit PBS gewaschen und für 24 h ohne FBS inkubiert. Danach wurden die Zellen in 2,5 ml Gesamtvolumen mit den siRNAs in unterschiedlichen Konzentration versetzt und 24 h inkubiert, danach lysiert und die Proben, wie im Abschnitt „Zelllyse und Probengewinnung“ (Kapitel 2.2.3.) beschrieben, gewonnen. Anschließend wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Expression der PDPK1 mittels Westernblot quantifiziert.

2.2.12 Zellviabilität nach Inkubation von hPSC mit GSK2334470

Die Toxizität des PDPK1-Inhibitors GSK234470 wurde anhand einer Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Propidiumiodid (PI) und Bisbenzimid bestimmt. Hierfür wurden hPSC auf eine 12-Well-Mikrotiterplatte umgesetzt. In Reaktionsgefäßen wurden Inhibitorkonzentrationen zwischen 0 nM – 10 000 nM angesetzt. Verdünnt wurde mit Medium ohne FBS. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 500 µl der jeweiligen Inhibitorkonzentration in Doppelbestimmung überschichtet. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit PI und Bisbenzimid gefärbt. Dafür wurde ein Gemisch von 20 µl Medium ohne FBS, 20 µl PI (20 µg/ml) und 1 µl Bisbenzimid (4 µg/ml) pro Well hinzugegeben und die Zellen damit für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden danach

in PBS gelagert und die Lichtemission der mit Bisbenzimid gefärbten Kerne, sowie der mit PI gefärbten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops fotografiert. Pro Well wurden zwei Aufnahmen gemacht. Der Anteil an nicht vitalen Zellen (also die PI-positiven Zellen) an den insgesamt vorhandenen Zellen (also die Bisbenzimid-positiven Zellen) wurde mittels Zählung mit ImageJ über den Programmpunkt „Cell counter“ ermittelt.

2.2.13 Untersuchung der Migration von hPSC durch Time-Lapse-Mikroskopie

Die Untersuchung der Zellmigration erfolgte durch Time-Lapse-Mikroskopie am Olympus IX81-Mikroskop. Hierfür wurden zunächst hPSC mit einer Dichte von circa 15.000 Zellen / cm² auf einer 12-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach dem Anwachsen ohne FBS inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Inkubation mit oder ohne FBS- und PCC-Überstand, sowie unterschiedlichen GSK2334470-Konzentrationen. GSK2334470 wurde in DMSO gelöst. Die höchste DMSO-Konzentration betrug 5 %. Am Mikroskop wurden nun pro Well je zwei Positionen gespeichert, an denen eine gleichmäßige Verteilung der Zellen vorlag. Über die nächsten 24 h wurde an jeder Position alle 30 min ein Einzelbild aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ. Zunächst wurden alle Zellen mit dem Programmpunkt „Cell counter“ auf dem ersten und letzten Bild gezählt und hieraus die Proliferationsrate der Zellen berechnet. Anschließend wurden diese Bilder ebenfalls mit ImageJ (über das Plugin AVI Reader) im Zeitraffer ausgewertet. Die Koordinaten von 30 Einzelzellen wurden über die Bildfolge hinweg aufgezeichnet: Hierfür wurde der jeweilige Zellmittelpunkt/Zellkern durch Klicken auf jedem Bild der Bildfolge markiert und aus den so aufgezeichneten Koordinaten mittels eines Excel-Macros unter anderem die Durchschnittsgeschwindigkeit der Zellen berechnet.

2.2.14 Untersuchung der Zellproliferation durch EdU-Färbung

Die Untersuchung der Zellproliferation erfolgt mittels 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU)-Färbung. Die Färbung wurde mit dem Click-iT® EdU Alexa Flour® 488 Imaging Kit (Invitrogen®) durchgeführt. Die Herstellung der einzelnen Komponenten erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

hPSC wurden auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät, nach dem Anwachsen mit Medium ohne FBS für 24 h inkubiert und danach für 24h in Doppelbestimmung

mit 10 µM EdU und mit oder ohne FBS und PCC-Überstand sowie unterschiedlichen siRNAs und verschiedenen GSK2334470-Konzentrationen inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen der Wells mit kaltem PBS für 15 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit PBS, dann wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS + 3 %igem BSA gewaschen. Jedes Well wurde dann für 20 min mit 1 ml 0,5 % Triton X-100 gelöst in PBS inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der 10 x Click iT® EdU buffer additive 1:10 in ddH_2O verdünnt, der Click iT® reaction cocktail zubereitet, die Zellen zweimal mit kaltem PBS + 3 %igem BSA gewaschen und 150 µl des Click iT® reaction cocktail auf jedes Well pipettiert und für 30 min inkubiert. Ab hier fand jeder nachfolgende Arbeitsschritt lichtgeschützt statt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, Hoechst 33342 (Component G) 1:2000 in PBS verdünnt und die Zellkerne damit für 30 min gefärbt. Die Zellen wurden nun in PBS gelagert und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ über den Programmpunkt „Cell counter“. Hierbei wurden die Bisbenzimid-positiven Zellen (also alle auf dem fotografierten Ausschnitt vorhandenen) Zellen, sowie die EdU-positiven Zellen (also alle proliferierenden Zellen) gezählt und daraus die Proliferationsrate bestimmt. Pro Well wurden dabei mindestens 100 Zellen ausgezählt.

2.2.15 Immunfluoreszenzfärbung

Die Messung der Expression von Vimentin, Fibronektin, Kollagen-1, Kollagen-2 und α-Smooth-Muscle-Aktin erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung von hPSC. Pro Well von zwei 6-Well-Mikrotiterplatten wurde je 3 quadratische Glasplättchen zur Keimreduktion unter dem Bunsenbrenner erhitzt, in das Well gelegt und die Zellen darauf ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen für 24 h mit Medium ohne FBS inkubiert und anschließend für 48 h ohne FBS und mit oder ohne PCC-Überstand und GSK inkubiert. Jedem Well wurden außerdem, wie in Bachem et al. 1998 beschrieben, 1 % β-Aminopropionitril (β-APN) und 1 % Ascorbinsäure (ASC) zugesetzt, um die Prolinhydroxylierung zu erhöhen und Kollagenquervernetzungen zu verhindern [10]. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und bei 4 °C für 20 Minuten mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Aus jedem Well wurde ein Glasplättchen mit gleichmäßiger Zellverteilung unter dem Mikroskop ausgewählt und mit Silikonkleber

auf einem Objektträger fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PSB erfolgten 30 Minuten Blockierung unspezifischer Banden mit TNB-Puffer bei RT. Da Vimentin und α-Smooth-Muscle-Aktin intrazelluläre Proteine sind, ging der Blockierung eine Behandlung mit 0,2 % Triton-X100 für 30 min zur Permeabilisierung der Zellmembranen voraus. Bei den extrazellulär gelegenen Proteinen Kollagen-1, Kollagen-3 und Fibronektin entfiel dieser Schritt. Es folgte 45 Minuten Inkubation mit den spezifischen primären Antikörpern und nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBS 45 Minuten Inkubation mit den sekundären Antikörpern. Die Verdünnung aller Antikörper erfolgt in TNB-Puffer. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBS erfolgte für α-Smooth-Muscle-Aktin, Kollagen-1 und Kollagen-3 eine Signalverstärkung für 15 Minuten mittels TSA-Biotinyl-Tyramid, welches 1:500 mit Amplifikation-Diluent verdünnt wurde. Darauf folgte ein weiterer Waschschritt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten lichtgeschützt. Die Zellen wurden anschließend für 30 min mit dem entsprechenden Fluoreszenzregaenz inkubiert. Die verwendeten Antikörper (primärer Antikörper - sekundärer Antikörper - Detektionsreagenz) und ihre Verdünnung waren dabei wie folgt:

Vimentin: Monoclonal Mouse Anti-Vimentin (1:50) - Poly rabbit anti-mouse IgG Biotin (1:50) - SA-FITC (1:100);

Fibronektin: Rabbit anti-human Fibronectin (1:100) - Schwein anti-rabbit IgG Biotin (1:100) - SA-Alexa Fluor R 568 (1:200);

Kollagen-1: Rabbit Anti-Human Collagen Type I Polyclonal Antibody (1:20) - Schwein anti-rabbit IgG HRP (1:50) - SA-Alexa Fluor R 568 (1:200);

Kollagen-3: Rabbit Anti-Human Collagen Type I Polyclonal Antibody (1:20) - Schwein anti-rabbit IgG HRP (1:50) - SA-Alexa Fluor R 568 (1:200);

α-Smooth-Muscle-Aktin: Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone (1:100) -Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (1:100) - SA-Alexa Fluor R 568 (1:200).

Die Zellkerne wurden anschließend mittels Bisbenzimid (2 mg/ml mit ddH_2O 1:500 verdünnt) angefärbt. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen einmalig mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

Das Fluoreszenzsignal wurde über das AxioCam MRm Fluoreszenzmikroskop detektiert und mittels ImageJ [4] quantifiziert.

2.2.16 Statistische Auswertung

Die einzelnen Ergebnisse wurden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert mit Standardabweichung aus je drei Versuchen berechnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen wurde mittels One-Way-ANOVA über die Freeware Past berechnet. Ein Ergebnis mit Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Transfektionseffizienz der siRNA

In diesem Vorversuch sollten zunächst die optimalen Transfektionsbedingungen von hPSC mit siRNA ermittelt werden. hPSC wurden hierfür nach 24 h Stimulation mit Medium ohne FBS mit 500 µl Medium mit FBS oder ohne FBS und verschiedenen Kombinationen von HiPerFect ® Transfection Reagent und Alexa Fluor 488-markierter siRNA mit unterschiedlicher Inkubationsdauer getestet. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid angefärbt und die Zellen anschließend unter dem Epifluoreszenzmikroskop fotografiert. Mittels ImageJ wurden die Bisbenzimid-positiven (also alle vorhandenen) und die Alexa Fluor 488-positiven (also erfolgreich transfizierten) Zellen ausgezählt. Bei diesem Vorversuch ging es um eine grobe Einschätzung der optimalen Transfektionsbedingungen. Daher wurde er nur einmal durchgeführt. Der Prozentsatz an erfolgreich transfizierten Zellen der jeweiligen Kombinationen ist in Tabelle 1 aufgelistet. Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Darstellung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Das beste Transfektionsergebnis wurde durch die Kombination von 1 µl siRNA und 6 µl HiPerFect® Transfection Reagent bei einer Inkubationsdauer von 24 h erreicht. Eine Erhöhung der Konzentration der siRNA und des Transfektionsreagenz führten zwar oft auch zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz, jedoch war dies nicht durchgehend zu beobachten. Die Einzelwerte unterlagen starken Schwankungen. Bei einer Inkubationszeit zwischen 4 h und 24 h scheint die Dauer der Inkubation keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz zu haben, hier wurden Höchstwerte von 92 % und 93 % erreicht. Nach 48 h Inkubationsdauer sank der Höchstwert der erfolgreich transfizierten Zellen auf 80 % ab. Nach 120 h lag er bei 73 %. Im Gesamtschnitt wurden lediglich 37 % der hPSC erfolgreich mit siRNA transfiziert. Durch die verwendeten Bedingungen ließ sich also nicht die gewünschte konstante Transfektionseffizienz erreichen.

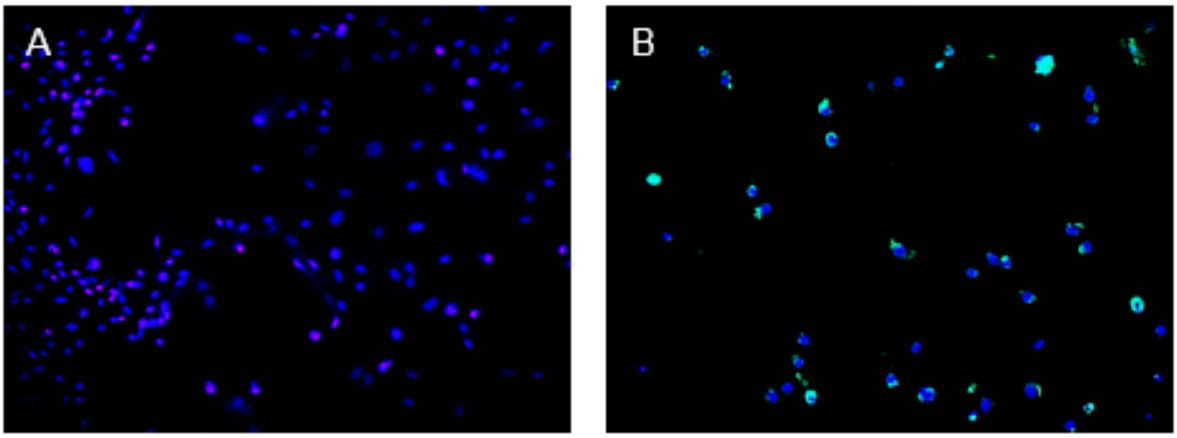


Abbildung 2: hPSC unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Inkubation mit Alexa Fluor 488-markierter siRNA

hPSC wurden nach 24 h Stimulation mit Medium ohne FBS mit 500 µl Medium mit oder ohne FBS und verschiedenen Kombinationen von HiPerFect® Transfection Reagent und Alexa Fluor 488-markierter siRNA unterschiedlich lang inkubiert, um die optimalen Transfektionsbedingungen einzuschätzen. Die Zellkerne wurden, wie im Abschnitt Methoden beschrieben, mit Bisbenzimid angefärbt. Die Zellen wurden unter dem Epifluoreszenzmikroskop fotografiert. Mittels ImageJ wurden die Bisbenzimid positiven (also alle vorhandenen) und die Alexa Fluor 488-positiven (also erfolgreich transfizierten) Zellen ausgezählt und die Transfektionseffizienz berechnet. A und B zeigen beispielhaft die Darstellung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Kombinationen aus siRNA und Transfektionsreagenz: **A:** hPSC, die mit 0,5 µl Alexa Fluor 488-markierter siRNA und ohne Transfektionsreagenz inkubiert wurden. Es sind nur die mit Bisbenzimid blau gefärbten Zellkerne zu erkennen. **B:** hPSC, die mit 1 µl Alexa Fluor 488-markierter siRNA und 6 µl Transfektionsreagenz inkubiert wurden. Es sind sowohl die mit Bisbenzimid blau gefärbten Zellkerne, als auch die grün fluoreszierenden erfolgreich mit siRNA transfizierten Zellen zu erkennen.

Tabelle 1: Transfektionseffizienz siRNA

hPSC wurden nach 24 h Stimulation mit Medium ohne FBS mit 500 µl Medium mit oder ohne FBS (markiert mit „-FBS“) und verschiedenen Kombinationen von HiPerFect® Transfection Reagent und Alexa Fluor 488-markierter siRNA unterschiedlich lang inkubiert. Die Zellkerne wurden, wie im Abschnitt Methoden beschrieben, mit Bisbenzimid angefärbt. Die Zellen wurden unter dem Epifluoreszenzmikroskop fotografiert. Mittels ImageJ wurden die Bisbenzimid-positiven (also alle vorhandenen) und die Alexa Fluor 488-positiven (also erfolgreich transfizierten) Zellen ausgezählt. Die Tabelle gibt die unterschiedlichen Kombinationen aus Alexa Fluor 488-markierter siRNA und HiPerFect® Transfection Reagent mit unterschiedlicher Inkubationsdauer an. Die erfolgreich transfizierten Zellen der jeweiligen Kombination sind in Prozent angegeben. Dieser Vorversuch diente zur groben Einschätzung der optimalen Transfektionsbedingungen und wurde deshalb nur einmal durchgeführt. Die beste Transfektionseffizienz mit 93 % wurde durch 1 µl/ml siRNA und 6 µl/ml HiPerFect® Transfection Reagent bei einer Inkubationsdauer von 24 h erreicht.

Inkubationszeit	HiPerFect ® (µl)	siRNA (µl) 0	0,2	0,5	1	Gesamtergebnis
4h	**0**	0 %		0 %		0 %
	1,5		26 %	35 %	46 %	36 %
	3	0 %	55% (-FBS)	55 %	54 %	41 %
	4,5		53%	41 %	92 %	62 %
4h Ergebnis		0 %	4 5%	33 %	64 %	**38 %**
24h	**0**	0%		0 %		0 %
	1,5		41 %	31 %	57 %	43 %
	3	0 %	23 % (-FBS)	51 %	52 %	33 %
	4,5		31 %	63 %	55 %	49 %
	6			79 %	**93 %**	86 %
	7,5				87 %	87 %
24h Ergebnis		0 %	30 %	40 %	63 %	**37 %**
48h	**0**	0 %		13 %		5 %
	1,5		20%	28 %	40 %	29 %
	3	0 %	44 % (-FBS)	37 %	57 %	40 %
	4,5		35 %	57 %	31 %	42 %
	6			46 %	62 %	54 %
	7,5				80 %	80 %
48h Ergebnis		0 %	35 %	35 %	51 %	**34 %**
120h	**0**	0 %		0 %		0 %
	1,5		54 %	53 %	43 %	49 %
	3		66 % (-FBS)	70 %	51 %	63 %
	4,5		51 %	78 %		69 %
	7,5				73 %	73 %
120h Ergebnis		0 %	60 %	50 %	52 %	**46 %**
Gesamtergebnis		0 %	36 %	39 %	57 %	**37 %**

3.2 siRNA Knockdown

Zur Untersuchung des Knockdowns der PDPK1 durch siRNA wurden hPSC nach 24 h Stimulation mit Medium mit und ohne FBS und zwei verschiedenen, spezifisch gegen PDPK1 gerichteten siRNAs (siRNA5 und siRNA7) in zwei verschiedenen Konzentrationen und in Kombination mit 15 µl HiPerFect® Transfection Reagent für 24 h inkubiert und die Expression der PDPK1 anschließend mittels Westernblot quantifiziert. Die Expression der PDPK1 wurde in Relation zur Kontrollprobe ohne FBS und ohne siRNA gesetzt. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung wurden die Banden auf Beta-Aktin normiert. Außerdem wurde zum Vergleich jeweils eine Probe mit 10 % FBS und ohne siRNA mitgemessen. Der Versuch diente zur orientierenden Untersuchung, welchen Effekt die Inkubation mit den beiden siRNAs auf die Expression der PDPK1 hat und wurde deshalb mit FBS zweimalig und ohne FBS nur einmal durchgeführt. Die Expression der PDPK1 ist in Abbildung 3 nach Inkubation ohne FBS (A) und mit FBS (B, als Mittelwert der beiden Einzelversuche) dargestellt. Die Inkubation mit siRNA in Abwesenheit von FBS zeigte (bei einmaliger Versuchsdurchführung) bei der Verwendung von 5 µl siRNA5 zwar eine leichte Reduktion der PDPK1-Expression, bei 15 µl der siRNA5 und bei 5 µl und 15 µl der siRNA7 kam es jedoch sogar zu einer circa fünffachen Zunahme der PDPK1-Expression. Bei der Inkubation von hPSC in Anwesenheit von Serum zeigte sich gemittelt über zwei Einzelversuche durch 1 µl und 5 µl siRNA5 nur eine leichte der PDPK1-Expression und durch 1 µl und 5 µl siRNA wiederum eine Zunahme der PDPK1-Expression um etwa 30 %, welche jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war, als bei den ohne Serum inkubierten Zellen.

Zusammenfassend wurde durch die getesteten siRNAs unter den verwendeten Bedingungen keine (ausreichende) Hemmung der Expression der PDPK1 erreicht. Es kam im Gegenteil sogar teilweise zu einer Steigerung der Expression.

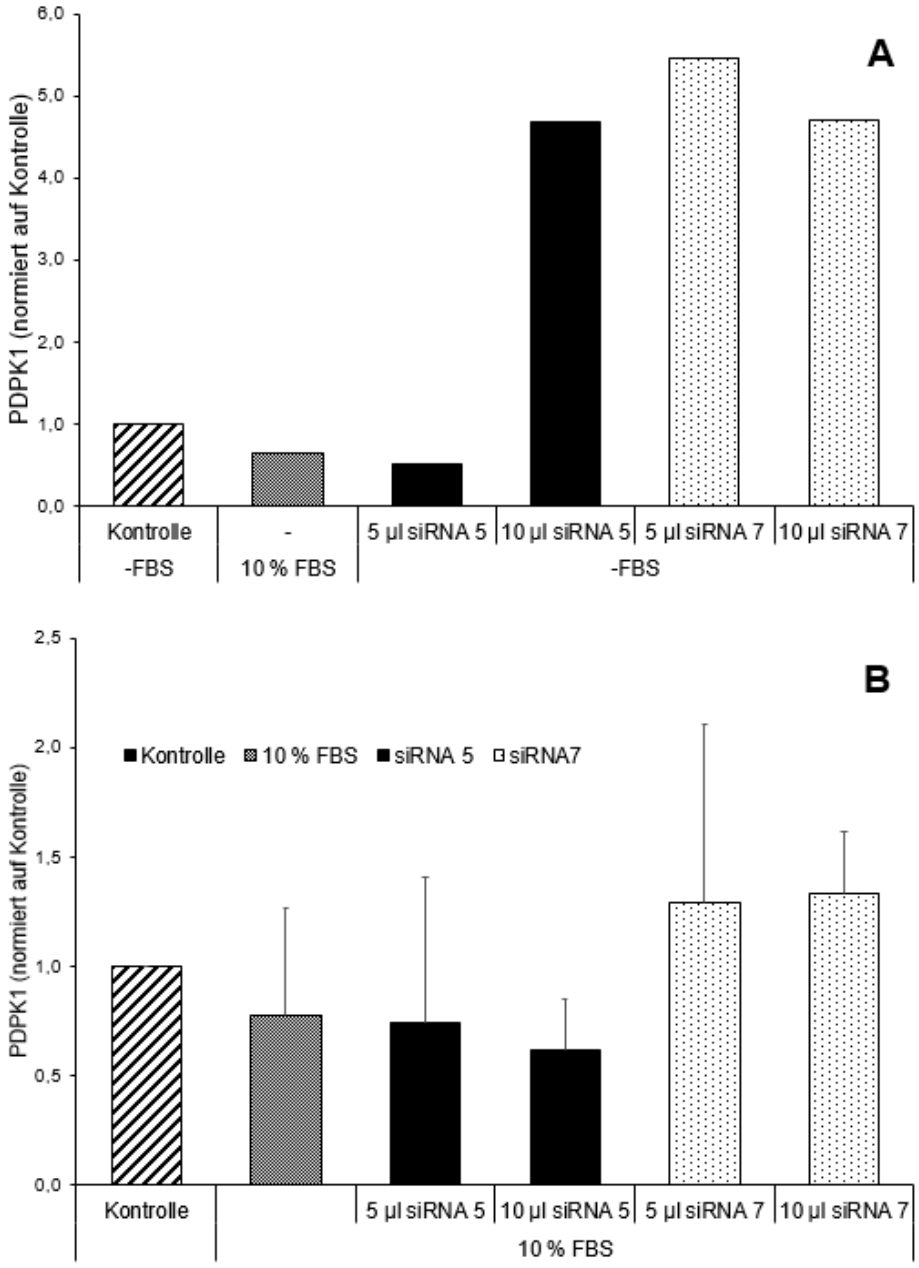


Abbildung 3: Expression der PDPK1 nach Inkubation von hPSC mit siRNA

Zur Untersuchung des Knockdowns der PDPK1 durch siRNA wurden hPSC nach 24 h Stimulation mit Medium ohne fetales Kälberserum (FBS) mit zwei verschiedenen, spezifisch gegen PDPK1 gerichteten siRNAs (siRNA5 und siRNA7) in zwei verschiedenen Konzentrationen und in Kombination mit 15 µl HiPerFect® Transfection Reagent und 2,5 ml Medium ohne oder mit 10 % FBS für 24 h inkubiert und die Expression der PDPK1 anschließend mittels Westernblot quantifiziert. Die Expression der PDPK1 wurde in Relation zur Kontrollprobe ohne FBS und ohne siRNA gesetzt. Ladungskontrolle über Beta-Aktin. Außerdem wurde jeweils eine Probe mit 10 % FBS und ohne siRNA mitgemessen. Der Versuch diente zur orientierenden Untersuchung, welchen Effekt die Inkubation mit den beiden siRNAs auf die Expression der PDPK1 hat und wurde deshalb mit FBS zweimalig und ohne FBS nur einmal durchgeführt. A: Expression der PDPK1 nach Inkubation mit siRNA in Abwesenheit von FBS: Es zeigte sich (bei einmaliger Versuchsdurchführung) bei der Verwendung von 5 µl siRNA5 zwar eine leichte Reduktion der PDPK1-Expression, bei 15 µl der siRNA5 und bei 5 µl und 15 µl der siRNA7 kam es jedoch sogar zu einer circa fünffachen Zunahme der PDPK1-Expression (n=1). B: Expression der PDPK1 nach

Inkubation mit 10 % FBS: Es zeigte sich durch 1 µl und 5 µl siRNA5 nur eine leichte der PDPK1-Expression und durch 1 µl und 5 µl siRNA wiederum eine Zunahme der PDPK1-Expression um etwa 30 %, welche jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war, als bei den ohne Serum inkubierten Zellen. Die Werte sind als Mittelwert aus zwei Einzelversuchen mit Standardabweichung dargestellt. Zusammenfassend wurde durch die getesteten siRNAs unter den verwendeten Bedingungen keine (ausreichende) Hemmung der Expression der PDPK1 erreicht. Es kam im Gegenteil sogar teilweise zu einer Steigerung der Expression.

3.3 Zellviabilität nach Inkubation von hPSC mit GSK2334470

Um einen eventuell vorhandenen toxischen Effekt des direkten PDPK1-Inhibitors GSK2334470 zu messen, wurden hPSC mit GSK-Konzentrationen zwischen 0 – 10000 nM für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit Bisbenzimid, alle nicht vitalen Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Der Anteil der nicht vitalen an der Gesamtzellzahl der Zellen ist in Abbildung 5 dargestellt. Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Darstellung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Der durchschnittliche Prozentsatz nicht vitaler Zellen betrug 4,9 % und bei der höchsten GSK-Konzentration nur 6,6 %. Insgesamt war keine konzentrationsabhängige Toxizität zu beobachten. Es ist somit bei den in den nachfolgenden Versuchen verwendeten Konzentrationsbereichen zwischen 0,1 µM und 5 µM von keinem toxischen Effekt von GSK2334470 auf hPSC auszugehen.

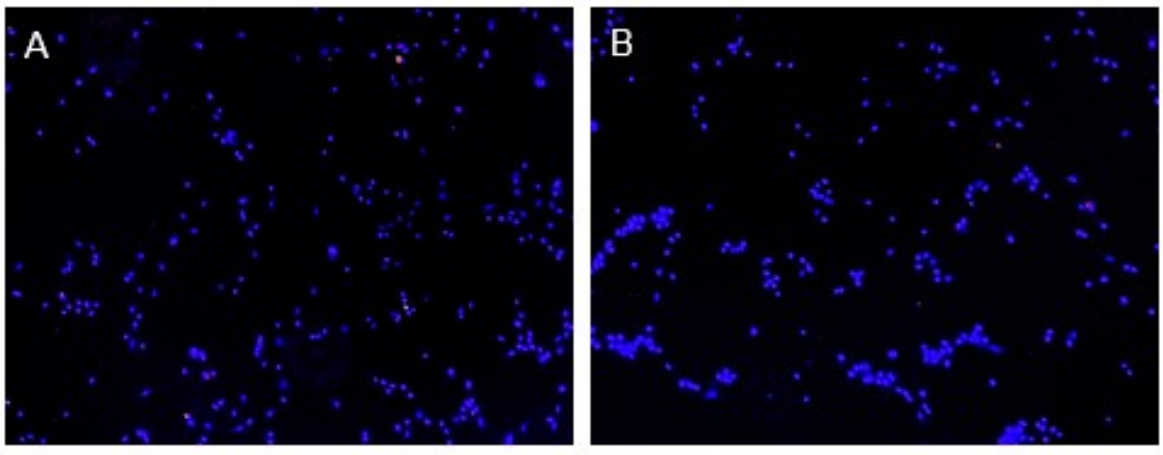


Abbildung 4: Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung von hPSC mit Propidiumiodid (PI) und Bisbenzimid
Um einen eventuell vorhandenen toxischen Effekt des direkten PDPK1-Inhibitors GSK2334470 zu messen, wurden hPSC mit GSK-Konzentrationen zwischen 0 – 10.000 nM für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit Bisbenzimid (blau), alle nicht vitalen Zellen mit Propidiumiodid (rot) gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Fluoreszenzfärbung nach Inkubation ohne GSK (A) und mit 10.000 nM GSK (B). Insgesamt war keine konzentrationsabhängige Toxizität zu beobachten.

.

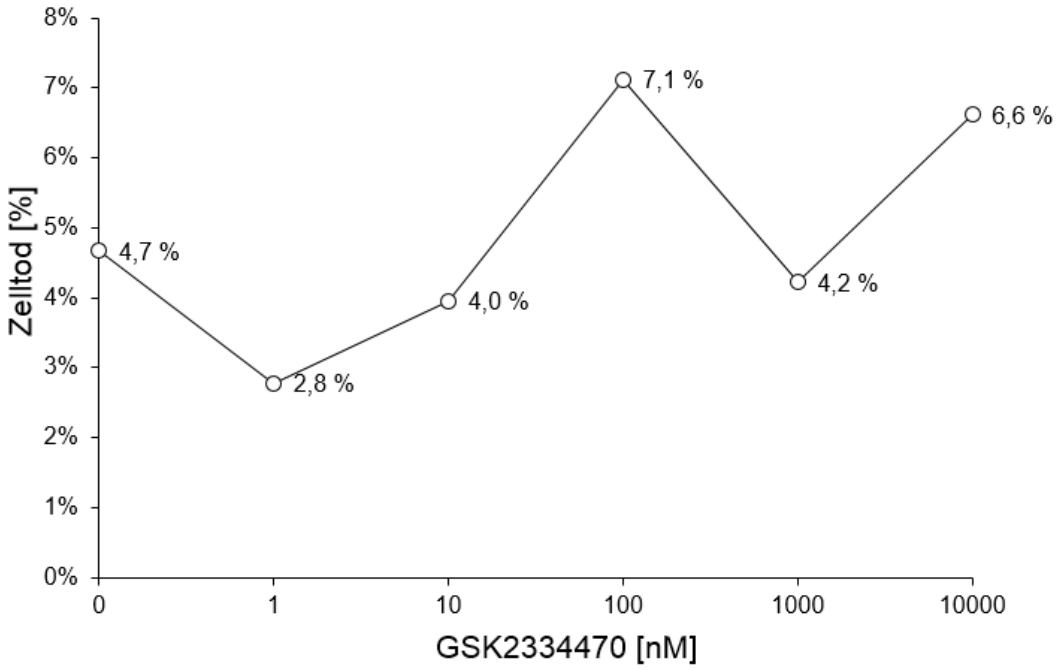


Abbildung 5: Zellviabilität nach Inkubation von hPSC mit GSK2334470

Um einen eventuell vorhandenen toxischen Effekt des direkten PDPK1-Inhibitors GSK2334470 zu messen, wurden hPSC mit GSK-Konzentrationen zwischen 0 – 10000 nM für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit Bisbenzimid, alle nicht vitalen Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Der Anteil der nicht vitalen an der Gesamtzellzahl ist dargestellt. Der durchschnittliche Prozentsatz nicht vitaler Zellen betrug 4,9 % und bei der höchsten GSK-Konzentration nur 6,6 %. Insgesamt war keine konzentrationsabhängige Toxizität zu beobachten.

3.4 Phosphorylierung von Akt

3.4.1 Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von Mia-SN und GSK

Um zu untersuchen, ob der Zusatz des von Pankreastumorzellüberstand von MiaPaCa-2 beziehungsweise der Zusatz von FBS eine Steigerung der Phosphorylierung der Akt an den Aminosäuren Threonin-308 (Thr-308) und Serin-473 (Ser-473) bewirkt, und ob sich eine eventuelle Steigerung der Phosphorylierung durch den direkten PDPK1 Inhibitor GSK2334470 wiederum hemmen lässt, wurden hPSC mit Medium ohne FBS inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Nährmediums und die Zellen wurden für eine Stunde ohne FBS vorinkubiert und dann mit Medium ohne Zusatz von FBS, Medium mit Zusatz von 10 % FBS und mit

Medium mit Zusatz von 50 % Pankreastumorzellüberstand von MiaPaCa-2 jeweils mit und ohne 1 µM GSK2334470 für 15 min inkubiert. Die Ruhezeit sollte eine stressbedingte Hochregulierung der Akt-Phosphorylierung vermeiden und somit gewährleisten, dass die gemessenen Werte tatsächlich auf die Inkubation mit Tumorzellüberstand zurückzuführen sind. Die Phosphorylierung wurde durch einen Westernblot und die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 als Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei (für Thr-308) beziehungsweise zwei (für Ser-473) Einzelversuchen dargestellt. Die Werte wurden auf die Probe ohne FBS normiert. Als Ladungskontrolle wurde zusätzlich die Expression der Gesamt-Akt mittels Westernblot quantifiziert und die Banden der Phospho-Akt darauf normiert.

Die Phosphorylierung der Akt an Thr-308 wird durch 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand im Vergleich zur Probe ohne Serum sehr stark auf das etwa 200-fache gesteigert. Diese Steigerung lässt sich durch 1 µM GSK wiederum auf die Hälfte hemmen. Die Steigerung der Phosphorylierung durch Zusatz von FBS im Vergleich zur Probe ohne FBS und deren Hemmung durch GSK ist zwar schwächer, eine klare Tendenz ist aber erkennbar, die auch in den jeweiligen Einzelversuchen klar zu reproduzieren war.

50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand steigert ebenfalls die Phosphorylierung der Akt an Ser-473 im Vergleich zur Probe ohne Serum signifikant. Hierbei ist der Effekt jedoch geringer (ca. 30-fach). Diese Steigerung lässt sich durch GSK im Mittel nicht signifikant, jedoch mit klarer in den Einzelversuchen reproduzierbarer Tendenz um ein Drittel hemmen. Die Steigerung der Phosphorylierung durch Zusatz von FBS im Vergleich zur Probe ohne FBS und deren Hemmung durch GSK ist nicht statistisch signifikant, jedoch wurde auch hier eine klare reproduzierbare Tendenz ähnlich der von Tumorzellüberstand gemessen.

Insgesamt zeigt sich, dass Serum zu einer Aktivierung von Akt in Sternzellen führt, die im Fall von MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand noch deutlich stärker ausfällt. Zudem kann diese Aktivierung deutlich, wenn auch nicht vollständig, durch den PDPK1-Inhibitor GSK gehemmt werden.

Nicht alle Effekte sind statistisch signifikant. Dies liegt vermutlich daran, dass die densitometrische Auswertung von Westernblots, die viele Arbeitsschritte umfasst und somit zu einer relativ großen Streuung der Absolutwerte führt (siehe Standardabweichung in den Diagrammen), eine nicht allzu exakte quantitative

Methode ist. Die densitometrische Auswertung des Westernblots liefert willkürliche Einheiten (AU, arbitray units). Der Absolutwert ist dabei beispielsweise unter anderem von der gewählten Belichtungszeit abhängig. Nur der relative Unterschied zwischen den unterschiedlichen Versuchsbedingungen ist biologisch determiniert. Da das Verhältnis von Phospho-Akt zur Gesamt-Akt der Einzelversuche so zwar eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Proben innerhalb eines Versuches ermöglicht, jedoch keine vergleichbaren Ergebnisse zwischen den Einzelversuchen liefert, wurden alle Werte jeweils auf die Messwerte ohne Stimulierung, also die Probe ohne Serum normiert. Zudem ist nicht bekannt, wie stark die basale Akt-Phosphorylierung (also unter unstimulierten Bedingungen) schwankt, und damit der Divisor für die Normierung. Bei einer höheren Versuchsanzahl wären vermutlich noch mehr Unterschiede signifikant. Da sich die relativen Unterschiede in jedem Versuch reproduzieren ließen und zahlreiche weitere Versuche sowohl die Effekte von Tumorzellüberstand als auch von GSK auf Akt bestätigten, wurde auf eine größere Versuchsanzahl verzichtet, da hieraus kein zusätzlicher Erkenntnisgewinn zu erreichen wäre.

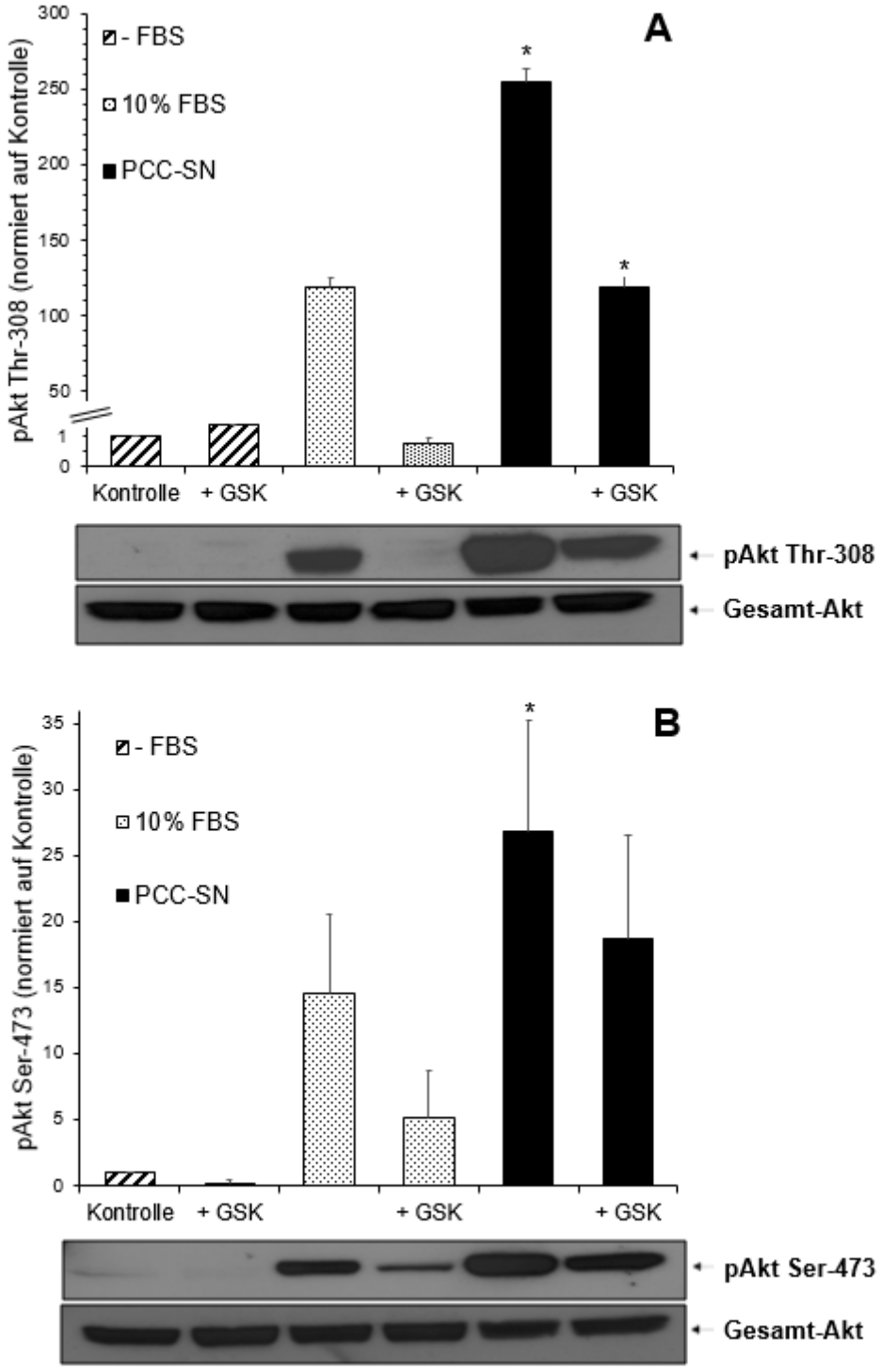


Abbildung 6: Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von MIA-SN und GSK

hPSC wurden mit Medium ohne Zusatz von FBS, Medium mit Zusatz von 10 % FBS mit Medium mit Zusatz von und 50 % Pankreastumorzellüberstand von MiaPaCa-2 jeweils mit und ohne 1 µM GSK2334470 inkubiert. Die Phosphorylierung der Akt an den Aminosäuren Threonin-308 (Thr-308) und Serin-473 (Ser-473 wurde mittels Westernblot quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei (für Thr-308, **A**) beziehungsweise zwei (für Ser-473, **B**) Einzelversuchen dargestellt. Die Werte wurden auf die Probe ohne FBS normiert. Als Ladungskontrolle wurde zusätzlich die Expression der Gesamt-Akt mittels Westernblot quantifiziert und die Banden der Phospho-Akt darauf normiert. Unter den Balkendiagrammen sind exemplarisch die

entsprechenden Westernblotbanden aus der Versuchsreihe dargestellt. Die Phosphorylierung der Akt an Thr-308 wird durch 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand im Vergleich zur Probe ohne Serum sehr stark auf etwa das 200-fache gesteigert. Diese Steigerung lässt sich durch 1 µM GSK wiederum auf die Hälfte hemmen. Die Steigerung der Phosphorylierung durch Zusatz von FBS im Vergleich zur Probe ohne FBS und deren Hemmung durch GSK ist zwar schwächer, eine klare Tendenz ist aber erkennbar, die auch in den jeweiligen Einzelversuchen klar zu reproduzieren war. 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand steigert auch die Phosphorylierung der Akt an Ser-473 im Vergleich zur Probe ohne Serum signifikant. Hierbei ist aber der Effekt geringer. Diese Steigerung lässt sich durch GSK im Mittel nicht signifikant, jedoch mit klarer in den Einzelversuchen reproduzierbarer Tendenz um ein Drittel hemmen. Die Steigerung der Phosphorylierung durch Zusatz von FBS im Vergleich zur Probe ohne FBS und deren Hemmung durch GSK ist nicht statistisch signifikant, jedoch wurde auch hier eine klare reproduzierbare Tendenz ähnlich der von Tumorzellüberstand gemessen. Insgesamt zeigt sich, dass Serum zu einer Aktivierung von Akt in Sternzellen führt, die im Fall von Tumorzellüberstand noch deutlich stärker ausfällt. Zudem kann diese Aktivierung deutlich, wenn auch nicht vollständig, durch den PDPK1-Inhibitor GSK gehemmt werden. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3.4.2 GSK-Konzentrationstest

Um zu untersuchen, ob die Hemmung der durch MiaPaCa-2-Tumorzellüberstand stimulierten Phosphorylierung der Akt durch GSK2334470 konzentrationsabhängig ist, wurden hPSC mit Medium ohne FBS inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Nährmediums und die Zellen wurden für eine Stunde ohne FBS vorinkubiert, um eine stressbedingte Hochregulierung der Akt-Phosphorylierung zu vermeiden, und dann in Abwesenheit von FBS und, bis auf die Referenzprobe, mit Zusatz von 50 % Pankreastumorzellüberstand von MiaPaCa-2 und GSK2334470 in Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 3 µM für 15 min inkubiert. Die Phosphorylierung wurde durch einen Westernblot und densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten quantifiziert. Die Ergebnisse sind Abbildung 7 als Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Einzelversuchen dargestellt, die Werte wurden auf die Probe ohne FBS normiert. Als Ladungskontrolle wurde zusätzlich die Expression der Gesamt-Akt mittels Westernblot quantifiziert und die Banden der Phospho-Akt darauf normiert.

Dieser Versuch zeigte noch einmal, dass 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand die Phosphorylierung an Thr-308 (auf das etwa 20-fache) und Ser-473 (auf das etwa 200-fache) der Akt signifikant steigert. Es zeigt sich bei beiden Phosphorylierungsstellen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung, bereits ab einer Konzentration von 0,1 µM. Höhere GSK-Konzentrationen bewirken eine noch stärkere Hemmung der Phosphorylierung. Die

Phosphorylierung an Thr-308 wird dabei ab einer Konzentration von 1 µM statistisch signifikant gehemmt, die Phosphorylierung an Ser-473 ab einer Konzentration von 3 µM. Die durch MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand stimulierte Phosphorylierung der Akt an Thr-308 und Ser-473 kann also durch GSK2334470 konzentrationsabhängig, jedoch (im verwendeten Konzentrationsbereich) nicht vollständig, gehemmt werden.

Wie im Abschnitt „Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von Mia-SN und GSK“ (Kapitel 3.4.1.) bereits erläutert, sind die Standardabweichungen aufgrund der densitometrischen Auswertung der Westernblotbanden relativ hoch. Eine größere Versuchsanzahl würde wahrscheinlich zu mehr statistisch signifikant unterschiedlichen Ergebnissen führen. Da sich die relativen Unterschiede jedoch in den Einzelversuchen reproduzieren ließen, und eine höhere Anzahl an Einzelversuchen deshalb keinen weiteren Erkenntnisgewinn gebracht hätte, wurde hiervon abgesehen.

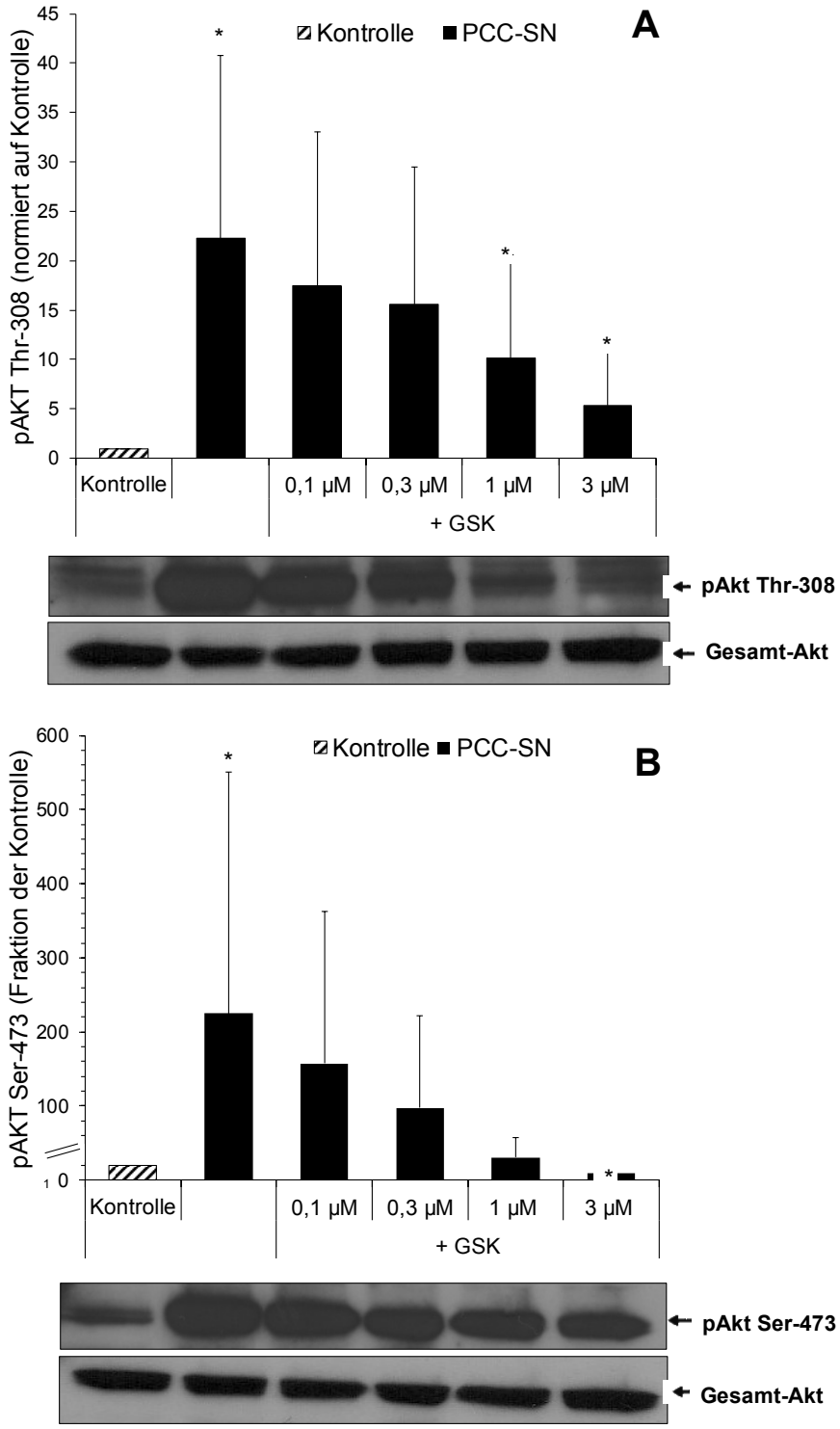


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von Akt nach Inkubation mit GSK

hPSC wurden mit Medium ohne FBS inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Nährmediums und die Zellen wurden für eine Stunde ohne FBS vorinkubiert und dann in Abwesenheit von FBS und, bis auf die Referenzprobe, mit Zusatz von 50 % Pankreastumorzellüberstand von MiaPaCa-2 und GSK2334470 in Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 3 µM für 15 min inkubiert. Die Ruhezeit sollte eine stressbedingte Hochregulierung der Akt-Phosphorylierung vermeiden. Die Phosphorylierung wurde mittels Westernblot und densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten quantifiziert. Die Phosphorylierung der Akt an Thr-308

(**A**) und Ser-473 (**B**) sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Einzelversuchen dargestellt, die Werte wurden auf die Probe ohne FBS normiert. Als Ladungskontrolle wurde zusätzlich die Expression der Gesamt-Akt mittels Westernblot quantifiziert und die Banden der Phospho-Akt darauf normiert. Unter den Balkendiagrammen sind exemplarisch die entsprechenden Westernblotbanden aus der Versuchsreihe dargestellt. 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand stimuliert die Phosphorylierung an Thr-308 und Ser-473 der Akt signifikant. Die durch MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand stimulierte Phosphorylierung der Akt an Thr-308 und Ser-473 kann durch GSK2334470 konzentrationsabhängig, jedoch nicht vollständig, gehemmt werden. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3.4.3 Phosphorylierung von Akt nach Inkubation mit Überstand weiterer Pankreaskarzinomzelllinien, von HUVEC und H6C7

Da in vorausgegangen Versuchen gezeigt wurde, dass die Phosphorylierung der Akt an Thr-308 und Ser-473 durch MiaPaCa-2 Tumorzellüberstand gesteigert wird und sich dies durch GSK konzentrationsabhängig hemmen lässt, wurde untersucht, ob die Inkubation von hPSC mit weiteren Pankreastumorzellüberständen, sowie Überständen von hPSC selbst, Überständen einer immortalisierten pankreatischen duktalen Zelllinie (H6C7) und von Endothelzellen (HUVEC) ebenfalls einen Effekt auf die Phosphorylierung der Akt hat. hPSC wurden mit Medium ohne FBS inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Nährmediums und die Zellen wurden für eine Stunde ohne FBS vorinkubiert, um eine stressbedingte Hochregulierung der Akt-Phosphorylierung zu vermeiden, und dann in Abwesenheit von FBS und, bis auf die Referenzprobe, mit Zusatz verschiedener Tumorzellüberstände aus Pankreaskarzinomzelllinien sowie Überständen von hPSC selbst, Überständen von H6C7 und HUVEC, jeweils mit und ohne Zusatz von 1 µM GSK2334470 für 15 min inkubiert. Die Phosphorylierung der Akt an Thr-308 und Ser-473 wurde durch einen Westernblot und densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten quantifiziert und ist in Abbildung 9 als Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei Einzelversuchen dargestellt. Die Werte wurden auf die Probe ohne FBS normiert. Als Ladungskontrolle wurde zusätzlich die Expression der Gesamt-Akt mittels Westernblot quantifiziert und die Banden der Phospho-Akt darauf normiert.

Die Inkubation von hPSC mit Überstand aus Tumorzellen zeigte bei allen verwendeten Überständen eine Steigerung der Phosphorylierung der Akt an Thr-308 und Ser-473. Diese fiel jedoch unterschiedlich stark aus. Die Überstände von Panc-89, Panc-1, UlaPaCa und MIA PaCa-2 zeigten dabei den deutlichsten Effekt mit einer Steigerung der Phosphorylierung an Thr-308 um das Neun- bis

Fünfzehnfache und um das etwa Zwölffache an Ser-473. Überstand von BxPC-3 führte sowohl an Thr-308, als auch an Ser-473 zu einer Steigerung der Phosphorylierung um das etwa Sechsfache. Überstand aus Capan-1 zeigte an Thr-308 nur eine minimale Erhöhung der Phosphorylierung. An Ser-473 war diese durch Capan-1 Überstand jedoch wiederum um das Siebenfache erhöht.

Die Steigerung der Phosphorylierung der Akt ließ sich durch 1 µM GSK bei allen verwendeten Tumorzellüberständen deutlich hemmen, im Mittel um 58 %. Die Hemmung unterlag jedoch je nach Überstand Schwankungen zwischen 26 % und 91 %.

Nach Inkubation mit Überstand aus H6C7 wurde eine deutlich erhöhte Phosphorylierung gemessen. An Thr-308 wurde diese, mehr als durch alle verwendeten Tumorzellüberstände, auf das Zwanzigfache gesteigert, an Ser-473 um das Elffache. Dies ließ sich wiederum durch 1 µM GSK auf 33 % (an Thr-308) beziehungsweise 44 % (an Ser-473) hemmen.

HUVEC Überstand führte ebenfalls zu einer Steigerung der Phosphorylierung von Akt: an Thr-308 um das Sechsfache, an Ser-473 um das Fünffache. Durch Inkubation mit 1 µM wurde dies deutlich, wenn auch nicht vollständig, gehemmt.

Die Inkubation mit Überstand aus PSC selbst zeigte eine um das 1,6-fache leichte Erhöhung der Phosphorylierung an Thr-308. Die Inkubation von PSC ohne FBS und mit 1 µM GSK zeigte an Thr-308 ebenfalls eine Erhöhung der Phosphorylierung um das 1,9-fache, an Ser-473 wurde diese jedoch um 30 % reduziert. Dies könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass die basale Akt-Phosphorylierung unter unstimulierten Bedingungen bereits Schwankungen unterliegt. Da die gemessene Stimulierung der Phosphorylierung von Akt durch Tumorzellüberstand jedoch (bis auf die Phosphorylierung an Thr-309 durch Capan-1) deutlich ausgeprägter und in den Einzelversuchen reproduzierbar war, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um echte Effekte durch die Überstände handelt.

Die Hemmung der Phosphorylierung durch GSK war jeweils deutlich messbar, jedoch nicht vollständig. Wie gezeigt wurde, erfolgt die Hemmung durch GSK konzentrationsabhängig. Demnach könnten höhere GSK-Konzentrationen eventuell zu einer vollständigen oder zumindest noch deutlich ausgeprägteren Hemmung führen.

Insgesamt zeigt sich durch Tumorzellüberstände von AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, MIA PaCa-2, UlaPaca, Panc-1 und Panc-98, als auch durch Überstände von nicht tumorösen pankreatischen duktalen Zellen und von Endothelzellen eine Aktivierung von Akt in PSC, die jedoch unterschiedlich stark ausfällt. Dies ließ sich durch den PDPK1-Inhibitor GSK deutlich, wenn auch nicht vollständig, hemmen.

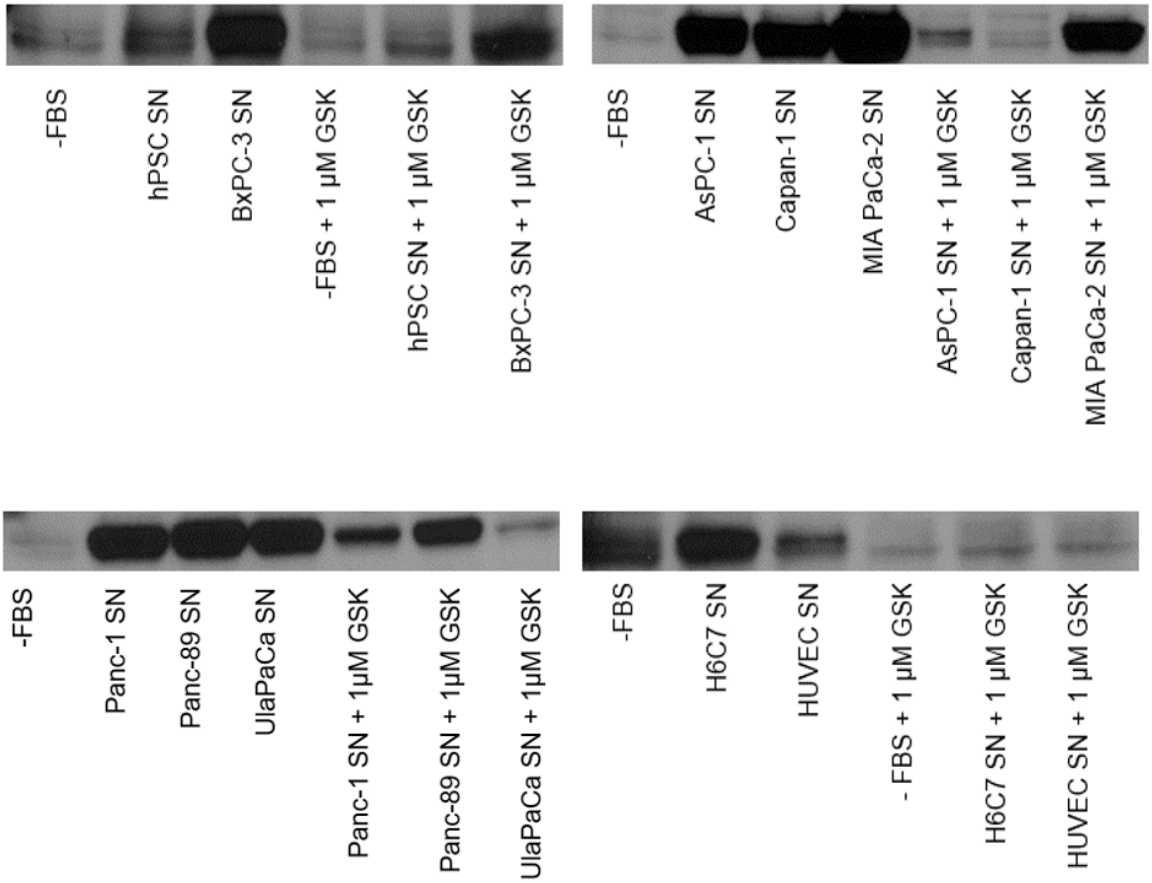


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Westernblotbanden aus einem Einzelversuch der Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von verschiedenen Tumorzellüberständen, hPSC-, H6C7- und HUVEC-Überstand und GSK

hPSC wurden mit Medium ohne Zusatz von FBS und Medium mit Zusatz von 50 % Überstand von unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien**,** sowie hPSC-, H6C7- und HUVEC-Überstand, jeweils mit und ohne 1 µM GSK2334470 inkubiert. Die Phosphorylierung der Akt wurde mittels Westernblot quantifiziert. Die Inkubation von hPSC mit Überstand aus Tumorzellen zeigte bei allen verwendeten Überständen eine unterschiedlich ausgeprägte Steigerung der Phosphorylierung der Akt. Die Steigerung der Phosphorylierung der Akt ließ sich durch 1 µM GSK bei allen verwendeten Tumorzellüberständen deutlich hemmen. Überstand aus H6C7 führte zu einer deutlich erhöhten Phosphorylierung von Akt. HUVEC Überstand führte ebenfalls zu einer Steigerung der Phosphorylierung von Akt an beiden Phosphorylierungsstellen. Durch Inkubation mit 1 µM GSK wurde dies jeweils deutlich gehemmt.

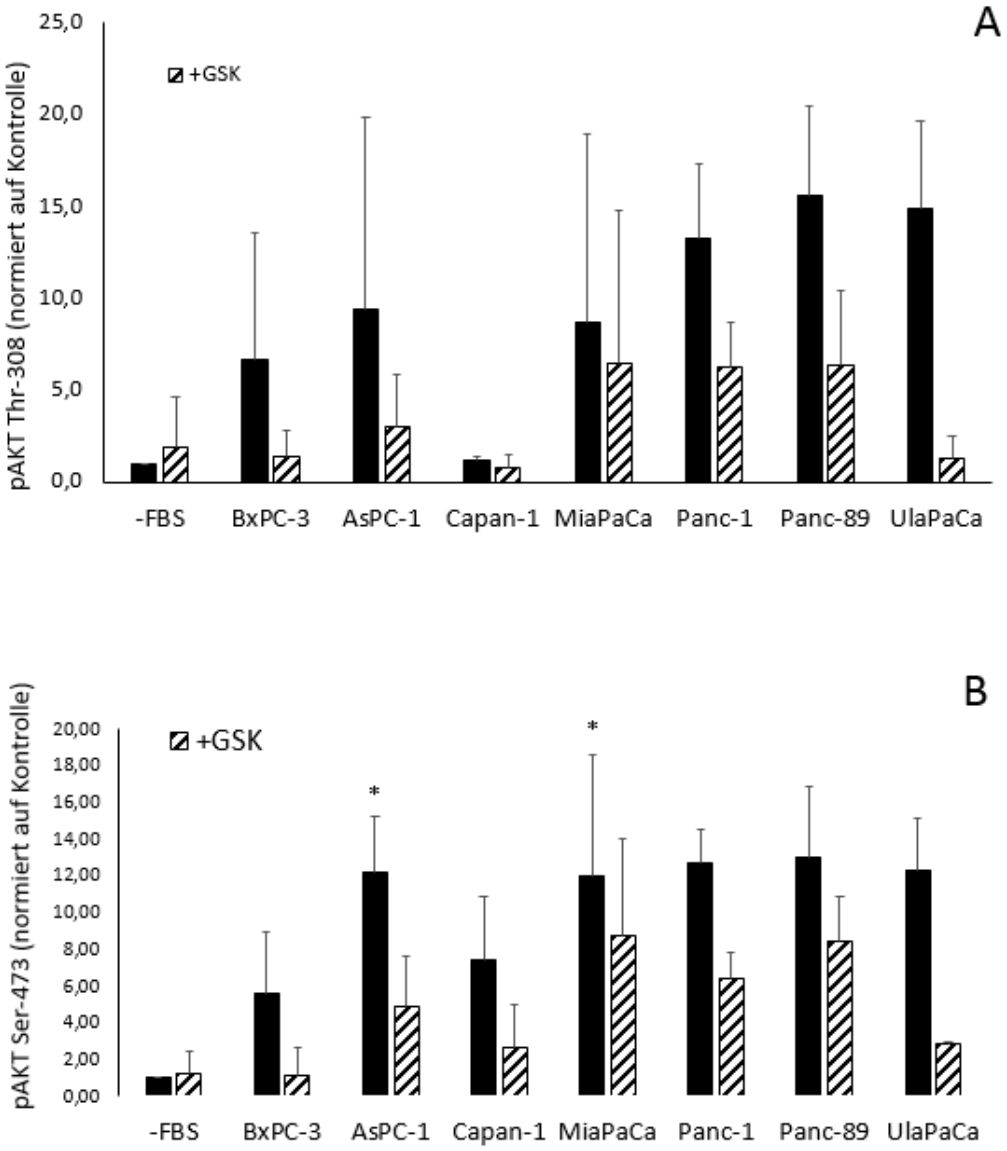


Abbildung 9: Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von verschiedenen Tumorzellüberständen und GSK

hPSC wurden mit Medium ohne Zusatz von FBS und Medium mit Zusatz von 50 % Überstand von unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien, jeweils mit und ohne 1 µM GSK2334470, inkubiert. Die Phosphorylierung der Akt an den Aminosäuren Threonin-308 (Thr-308) und Serin-473 (Ser-473 wurde mittels Westernblot quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei Einzelversuchen dargestellt. Die Werte wurden auf die Probe ohne FBS normiert. Als Ladungskontrolle wurde zusätzlich die Expression der Gesamt-Akt mittels Westernblot quantifiziert und die Banden der Phospho-Akt darauf normiert. Die Inkubation von hPSC mit Überstand aus Tumorzellen zeigte bei allen verwendeten Überständen eine unterschiedlich ausgeprägte Steigerung der Phosphorylierung der Akt an Thr-308 (**A**) und Ser-473 (**B**). (* $p < 0,05$ vs. -FBS). Die Steigerung der Phosphorylierung der Akt ließ sich durch 1 µM GSK bei allen verwendeten Tumorzellüberständen deutlich hemmen, im Mittel um 58 %, jedoch mit deutlichen Schwankungen zwischen den verwendeten Überständen. (n=2)

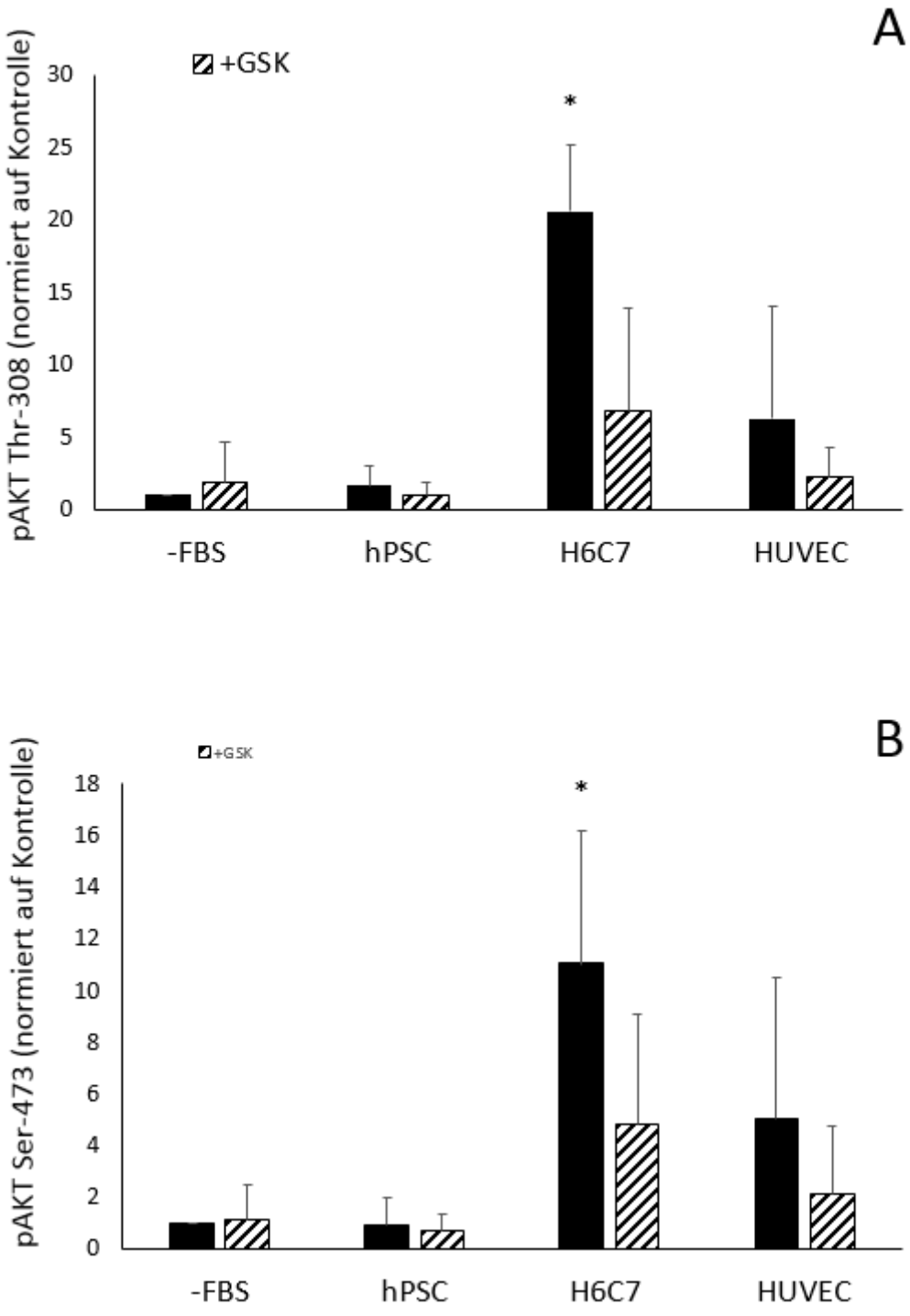


Abbildung 10: Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von hPSC-, H6C7- und HUVEC-Überstand und GSK

hPSC wurden mit Medium ohne Zusatz von FBS und Medium mit Zusatz von 50 % Überstand von unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien, jeweils mit und ohne 1 µM GSK2334470, inkubiert. Die Phosphorylierung der Akt an den Aminosäuren Threonin-308 (Thr-308) und Serin-473 (Ser-473 wurde mittels Westernblot quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei Einzelversuchen dargestellt. Die Werte wurden auf die Probe ohne FBS normiert. Als Ladungskontrolle wurde zusätzlich die Expression der Gesamt-Akt mittels Westernblot quantifiziert und die Banden der Phospho-Akt darauf normiert. Überstand aus H6C7 führte an Thr-308 (A) und Ser-473 (B) zu einer deutlich erhöhten

Phosphorylierung von Akt (* p < 0,05 vs. -FBS). Dies ließ sich wiederum jeweils durch 1 µM GSK hemmen. HUVEC Überstand führte ebenfalls zu einer Steigerung der Phosphorylierung von Akt an beiden Phosphorylierungsstellen. Durch Inkubation mit 1 µM GSK wurde dies wiederum deutlich gehemmt. Die Inkubation mit Überstand aus PSC selbst zeigte eine leichte Erhöhung der Phosphorylierung an Thr-308. Die Inkubation von PSC ohne FBS und mit 1 µM GSK zeigte an Thr-308 ebenfalls eine Erhöhung der Phosphorylierung um das 1,9-fache, an Ser-473 wurde diese jedoch um 30 % reduziert. Dies könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass die basale Akt-Phosphorylierung unter unstimulierten Bedingungen bereits Schwankungen unterliegt. (n=2)

3.5 Untersuchung der Migration von hPSC

Der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg spielt eine große Rolle bei der Stimulation der Motilität von Zellen durch den Wachstumsfaktor PDGF-BB (platelet-derived growth factor). Es sollte deshalb in diesem Versuch untersucht werden, ob die Motilität von hPSC durch Tumorzellen erhöht wird und ob sich dies wiederum mittels GSK hemmen lässt. Durch Timelapse-Mikroskopie wurde die Auswirkung der Inkubation mit Medium ohne FBS, mit 10 % FBS oder 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von GSK auf die Zellmotilität von hPSC untersucht. Hierfür wurden hPSC nach 24 h Inkubation ohne Serum mit den entsprechenden Bedingungen inkubiert und für die nächsten 24 h alle 30 Minuten unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Über die so entstehende Bildfolge wurde die Durschnittgeschwindigkeit der Zellen ermittelt. Abbildung 11 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus einer Bildfolge der hPSC in der Timelapse-Mikroskopie. Die Zellmotilität ist in Abbildung 12 als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Einzelversuchen dargestellt.

Die Zellmotilität beträgt unter unstimulierten Bedingungen im Schnitt 16 µm/h. Sie wird durch Zusatz von 10 % FBS statistisch signifikant auf 28 µm/h und durch Zusatz von 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand ebenfalls statistisch signifikant auf 26 µm/h gesteigert. Sowohl bei den mit, als auch ohne FBS inkubierten Zellen lässt durch GSK eine leichte konzentrationsabhängige Hemmung der Zellmotilität durch GSK beobachten. Bei den mit Tumorzellüberstand inkubierten hPSC zeigt sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung durch GSK, die ab 5 µM GSK statistisch signifikant messbar ist.

Die Zellmotilität wird also sowohl durch Zusatz von FBS, als auch durch MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand etwa gleich stark stimuliert. Unter allen Bedingungen lässt sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellmotilität durch GSK

beobachten, die jedoch nur bei den mit Tumorzellinduzierten Zellen statistisch signifikant ausfällt.

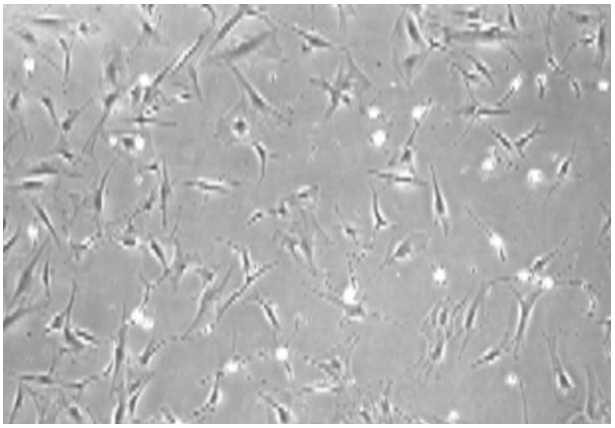


Abbildung 11: hPSC in der Timelapse-Mikroskopie

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer Bildfolge der hPSC in der Timelapse-Mikroskopie. hPSC wurden nach 24 h Inkubation ohne Serum mit und Serum und MiaPaCa-2 Tumorzellüberstand, jeweils mit und ohne GSK inkubiert. Über die nächsten 24 h wurde alle 30 Minuten ein Bild mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und die Durschnittgeschwindigkeit der Zellen über die so entstehende Bildfolge ermittelt. (100-fache Vergrößerung).

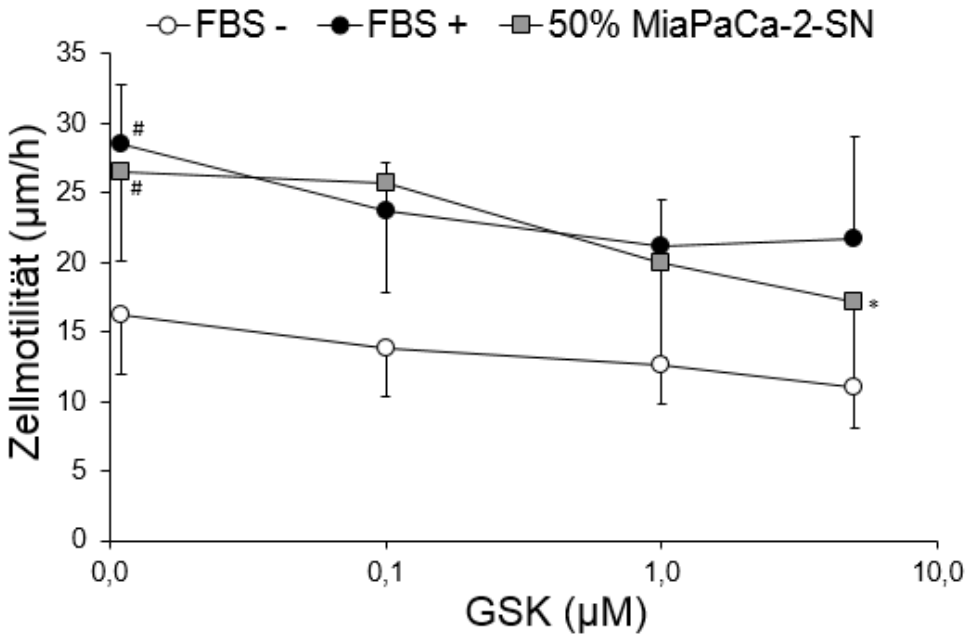


Abbildung 12: Migration von hPSC

hPSC wurden mit Medium ohne FBS (FBS-), mit 10 % FBS (FBS+) und 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand (MiaPaCa-2-SN) mit jeweils unterschiedlichen GSK-Konzentrationen inkubiert. Die y-Achse gibt die durchschnittliche Zellmotilität, die x-Achse die GSK-Konzentration an. Die Zellmotilität wird sowohl durch Zusatz

von 10 % FBS, als auch durch 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand statistisch signifikant gesteigert (# p < 0,05 vs. FBS-). Bei den ohne FBS und mit 10 % FBS inkubierten Zellen lässt sich keine statistisch signifikante Hemmung der Motilität durch GSK erreichen. Bei den mit 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand zeigt sich ab einer Konzentration von 5 µM GSK eine statistisch signifikante Hemmung (* p < 0,05 vs. ohne GSK). (n=3)

3.6 Gesamte Proteinexpression

Da Akt eine wichtige Rolle im Proteinsynthese-Stoffwechsel von Zellen spielt (siehe auch Abbildung 1), wurden hPSC in diesem Versuch mit Medium ohne Zusatz von FBS, mit Zusatz von 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand und Medium mit Zusatz von 10 % FBS jeweils mit und ohne 1 µM GSK2334470 inkubiert, nach 72 h lysiert und die gesamte Proteinkonzentration der Zellen gemessen. Die Expression des Gesamtproteins ist in Abbildung 13 als Mittelwert mit Standardabweichung aus vier Einzelversuchen dargestellt.

Die Gesamtproteinkonzentration ist nach Zusatz von 10 % FBS signifikant um den Faktor 3 erhöht. Diese Erhöhung lässt sich durch Zugabe von GSK 1 µM wiederum statistisch signifikant auf fast basales Niveau hemmen. Der Zusatz von 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand hat keinen Effekt auf die Gesamtproteinkonzentration der hPSC. Ebenso lässt sich diese nicht durch Zugabe von GSK 1 µM hemmen. Die basale Proteinkonzentration nach Inkubation mit Medium ohne FBS lässt sich durch Zusatz von 1 µM GSK ebenfalls nicht hemmen. Um eine unspezifische Bindung von Proteinen aus FBS an hPSC zu minimieren, wurden die Zellen vor der Lyse zur Proteinbestimmung dreimal gründlich mit PBS gewaschen. Dies schließt eine unspezifische Proteinbindung zwar nicht vollständig aus. Eine Hemmung dieser Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration durch GSK hingegen lässt sich nur durch eine Hemmung des PDPK1/Akt-Signaltransduktionsweges erklären.

Zusammenfassend lässt sich die Serum-induzierte Erhöhung der Proteinsynthese in hPSC also durch eine Hemmung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges durch den direkten PDPK1-Inhibitor GSK hemmen. PCC-Überstand zeigt keinen Effekt auf die Gesamtproteinsynthese von hPSC.

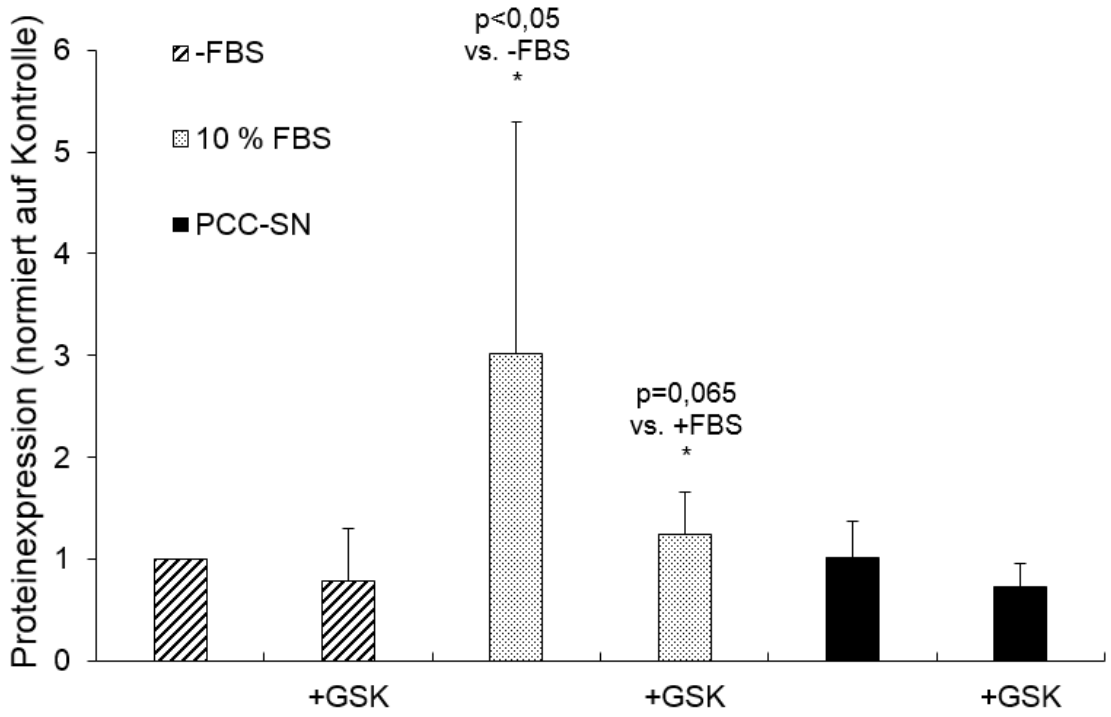


Abbildung 13: Gesamte Proteinexpression von hPSC

HPSC wurden ohne FBS, mit 10 % FBS und mit 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand (MIA-SN) inkubiert. Das Balkendiagramm gibt die Proteinkonzentration an. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Probe ohne FBS und ohne GSK normalisiert. Die Proteinexpression der Zellen wird durch 10 % FBS signifikant gesteigert, was durch GSK 1 µM wiederum signifikant gehemmt wird (markiert mit *). MIA-Überstand hat keinen Effekt auf die gesamte Proteinexpression. (n=4)

3.7 Evaluation der Proliferation mittels EdU-Färbung

Die Untersuchung der Zellproliferation erfolgt mittels 5-Ethynyl-2′-Deoxyuridin (EdU)-Färbung. hPSC wurden mit Medium ohne FBS, mit Medium mit Zusatz von 10 % FBS und mit Zusatz von 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand inkubiert jeweils mit Zusatz von EdU und je nach Bedingung mit GSK beziehungsweise siRNA. Die EdU-positiven, also die proliferierenden Zellen, wurden am Fluoreszenzmikroskop detektiert und ihr Verhältnis an allen vorhandenen Zellen berechnet. Die Abbildungen 15 und 16 enthalten die prozentualen Proliferationsraten der Zellen nach Inkubation mit siRNA beziehungsweise GSK. Der Zusatz von 10 % FBS hat eine signifikante Stimulation der Proliferationsrate zur Folge. 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand stimuliert die Proliferationsrate nur tendenziell, nicht jedoch statistisch signifikant. Die Proliferationsrate wird sowohl in

Anwesenheit von 10 % FBS, als auch bei 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand durch GSK 1 µM statistisch signifikant gehemmt. Die siRNA hat keinen Effekt auf die Proliferationsrate. Abbildung 14 zeigt exemplarisch Zellen in der EdU-Färbung.

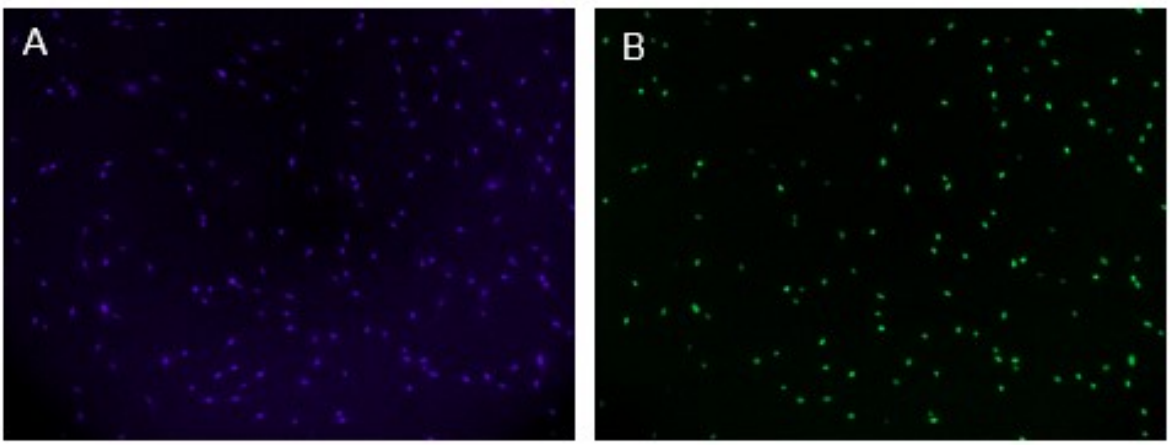


Abbildung 14: hPSC: 5-Ethynyl-*2'*-Deoxyuridin (EdU)-Färbung

Die Abbildung zeigt mittels EdU-Färbung gefärbte hPSC. A: Im linken Bild sind die mit Bisbenzimid gefärbten Zellkerne aller vorhanden Zellen zu sehen. B: Das rechte Bild zeigt die proliferierenden Zellen, die EdU inkorporiert haben.

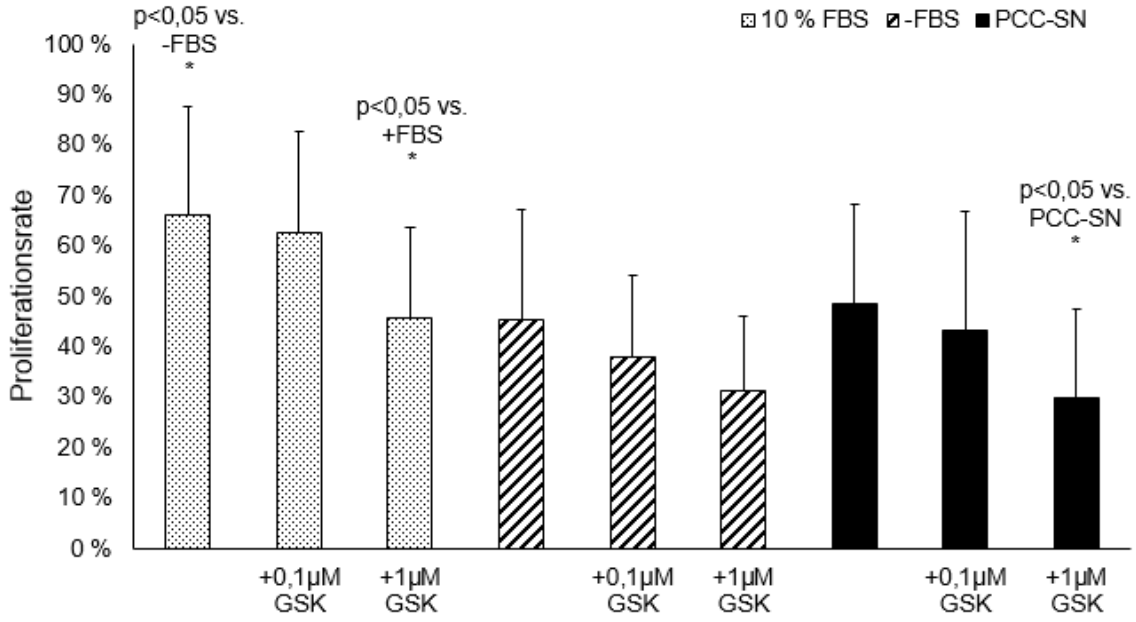


Abbildung 15: Hemmung der Proliferationsrate von hPSC mittels GSK

Prozentuale Proliferationsrate von hPSC nach Inkubation mit Medium ohne FBS, mit Zusatz von 10 % FBS, von 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand und GSK. Der Zusatz von 10 % FBS stimuliert die Proliferationsrate

signifikant, 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand nur tendenziell. Die Proliferationsrate wird sowohl in Anwesenheit von 10 % FBS als auch bei 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand durch GSK 1 µM statistisch signifikant gehemmt (signifikante Ergebnisse mit * markiert; n=3)

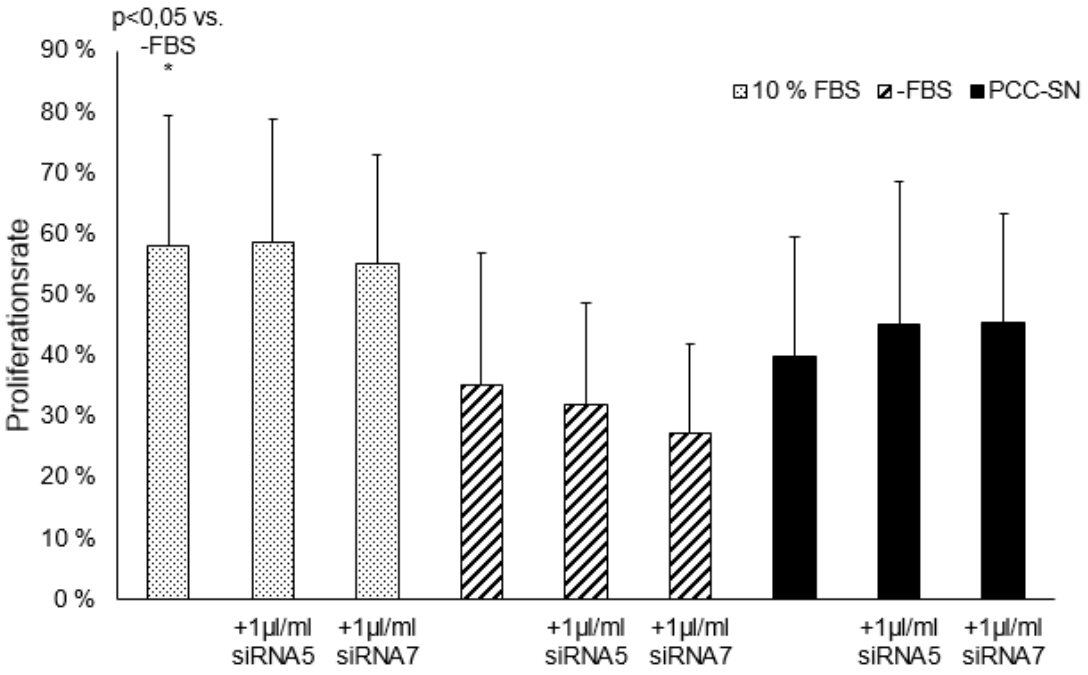


Abbildung 16: Proliferationsrate von hPSC nach Inkubation mit siRNA

Prozentuale Proliferationsrate von hPSC nach Inkubation mit Medium ohne FBS, mit Zusatz von 10 % FBS, von 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand und siRNA 5 und 7 (Qiagen). Der Zusatz von 10 % FBS stimuliert die Proliferationsrate signifikant, 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand nur tendenziell. Die siRNA hat keinen Effekt auf die Proliferationsrate (n=3).

3.8 Expression der Matrixmetalloprotease-2 (MMP-2)

hPSC wurden in Abwesenheit von FBS und je nach Bedingung mit Zusatz von 50 % MiaPaCa-2 Tumorzellüberstand und GSK inkubiert. Die Quantifizierung der Produktion von Matrixmetalloproteasen erfolgte über die Proteaseaktivität mittels Zymographie. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. 50 % MiaPaCa-2 Tumorzellüberstand stimuliert die Expression der MMP-2 signifikant. Durch GSK wird im Konzentrationsbereich von 1 µM - 3 µM keine Hemmung dieser Hochregulierung erreicht.

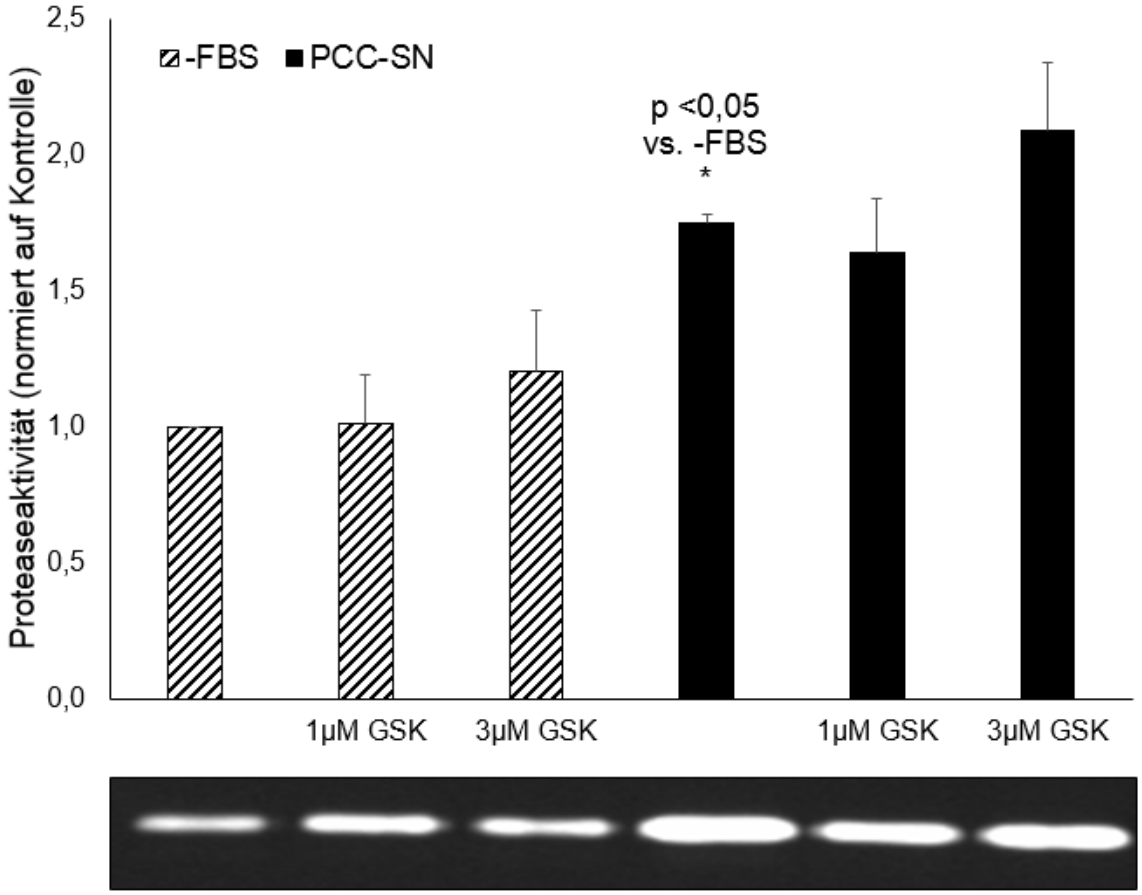


Abbildung 17: Expression der Matrixmetalloprotease-2 (MMP-2)

hPSC wurden ohne Serum, mit 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand und GSK inkubiert. Die MMP-2 Proteaseaktivität ist in dem Balkendiagramm dargestellt. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Probe ohne FBS und ohne GSK normalisiert. MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand stimuliert die MMP-2 Expression signifikant. Die MMP-2 Expression lässt sich durch GSK nicht hemmen. Unter dem Balkendiagramm ist exemplarisch der Ausschnitt aus dem gefärbten Zymographie-Gel eines Einzelversuchs dargestellt. (n=3)

3.9 Expression von Vimentin, Fibronektin, Kollagen-1, Kollagen-3 und α-Smooth-Muscle-Aktin

Die Messung der Expression von Vimentin, Fibronektin, Kollagen-1, Kollagen-3 und α-Smooth-Muscle-Aktin erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung von hPSC, nachdem diese ohne FBS, mit 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand und GSK inkubiert worden waren. Dazu wurde das Fluoreszenzsignal der aufgenommenen Bilder mittels ImageJ [4] quantifiziert.

3.9.1 Expression von Vimentin, α-SMA und Fibronektin

Die Expression von Vimentin, Fibronektin und α-Smooth-Muscle-Aktin ist in Abbildung 19 als Balkendiagramm dargestellt. Die Zugabe von 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand hat keinen Effekt auf die Expression der drei Proteine, ebenso ist keine Hemmung der Expression durch GSK 1 µM und 3 µM zu erkennen. Die Darstellung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ist exemplarisch in Abbildung 18 zu sehen.

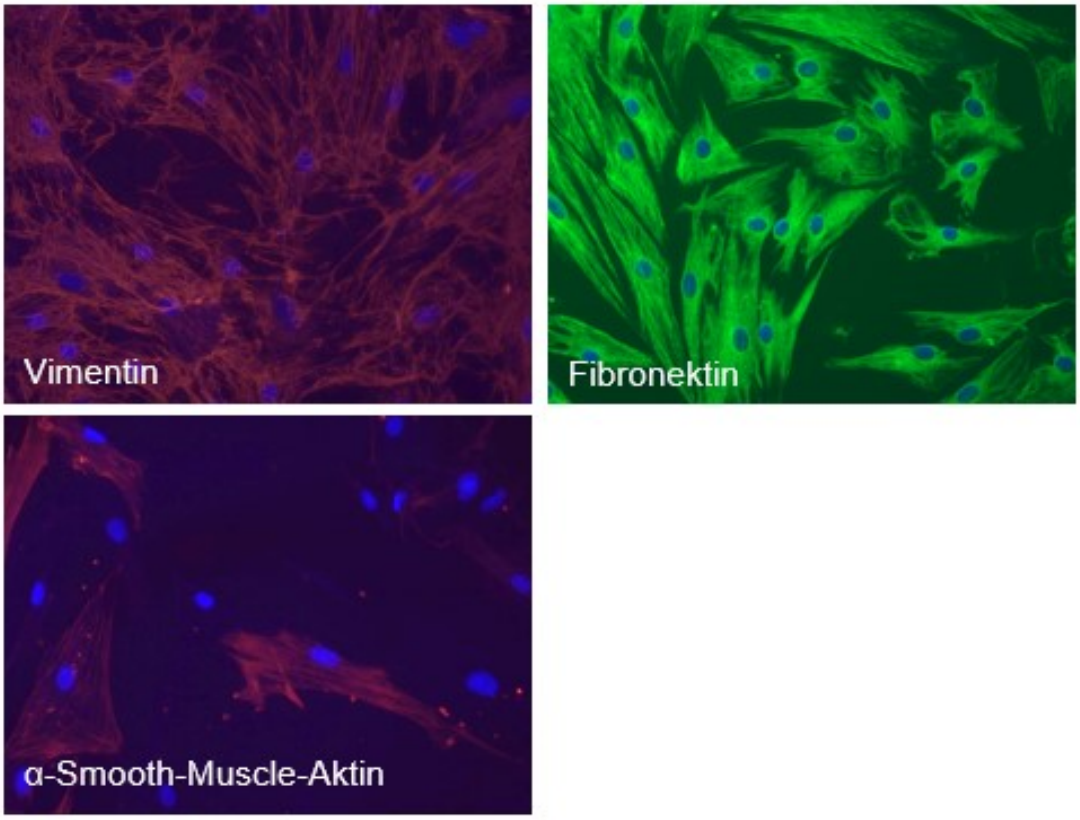


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von hPSC: Vimentin, Fibronektin und α-Smooth-Muscle-Aktin

Die Abbildung zeigt Vimentin und α-Smooth-Muscle-Aktin rot und Fibronektin grün fluoreszierend. Die mit Bisbenzimid gefärbten Zellkerne stellen sich blau fluoreszierend dar.

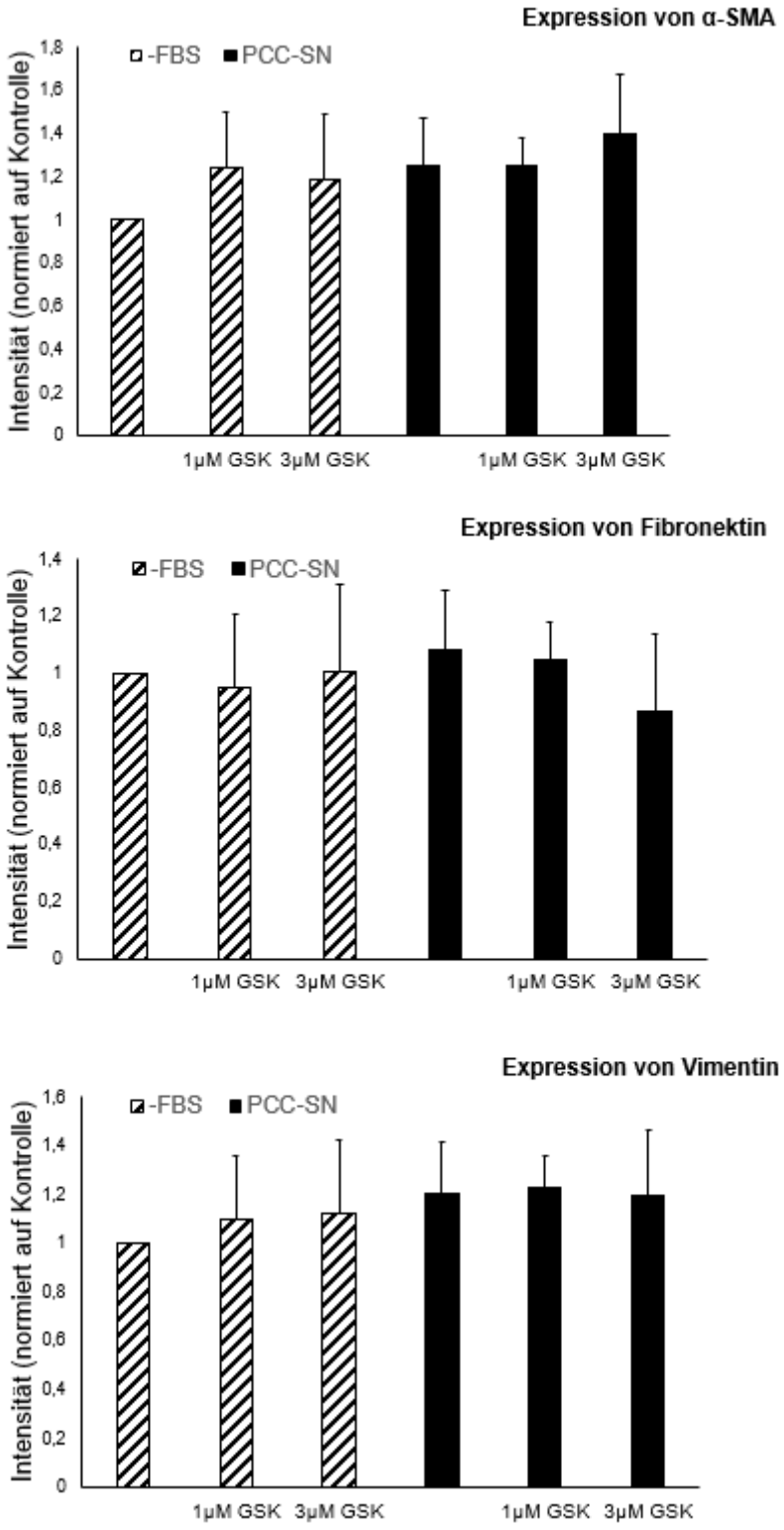


Abbildung 19: Expression von Vimentin, Fibronektin und α-Smooth-Muscle-Aktin in hPSC

hPSC wurden ohne FBS, mit 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand und GSK inkubiert. Verschiedene Strukturproteine wurden über eine Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Die Expression von Vimentin, Fibronektin und α-Smooth-Muscle-Aktin ist in den Balkendiagrammen dargestellt. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Probe ohne FBS, MIA und GSK normalisiert (erster Balken). Es ist kein Effekt durch MIA Tumorzellüberstand oder GSK auf die Expression von Vimentin, Fibronektin und α-Smooth-Muscle-Aktin zu erkennen. (n=3)

3.9.2 Expression von Kollagen-1 und Kollagen-3

Die Expression von Kollagen-1 und Kollagen-3 ist in Abbildung 21 als Balkendiagramm dargestellt. Es ist keine signifikante Stimulation der Expression von Kollagen-1 und -3 durch 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand zu erkennen, jedoch zeigt sich eine tendenzielle, jedoch nicht statistisch signifikante, Hemmung der Expression von Kollagen-1 und -3 durch GSK 1 µM und 3 µM in Anwesenheit von MIA Tumorzellüberstand. Die Darstellung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ist in Abbildung 20 zu sehen.

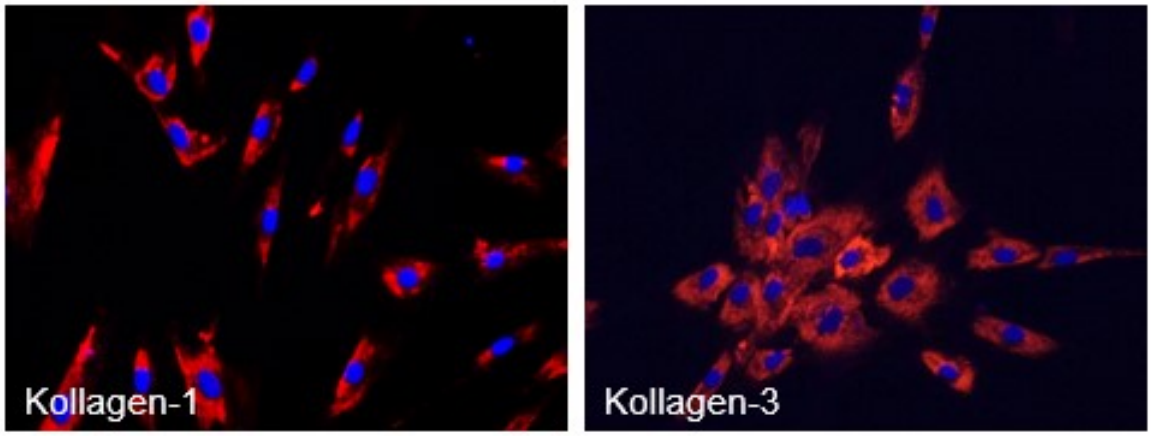


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von hPSC: Kollagen-1 und Kollagen-3

Die Abbildung zeigt Kollagen-1 und Kollagen-3 rot fluoreszierend. Die mit Bisbenzimid gefärbten Zellkerne stellen sich blau fluoreszierend dar.

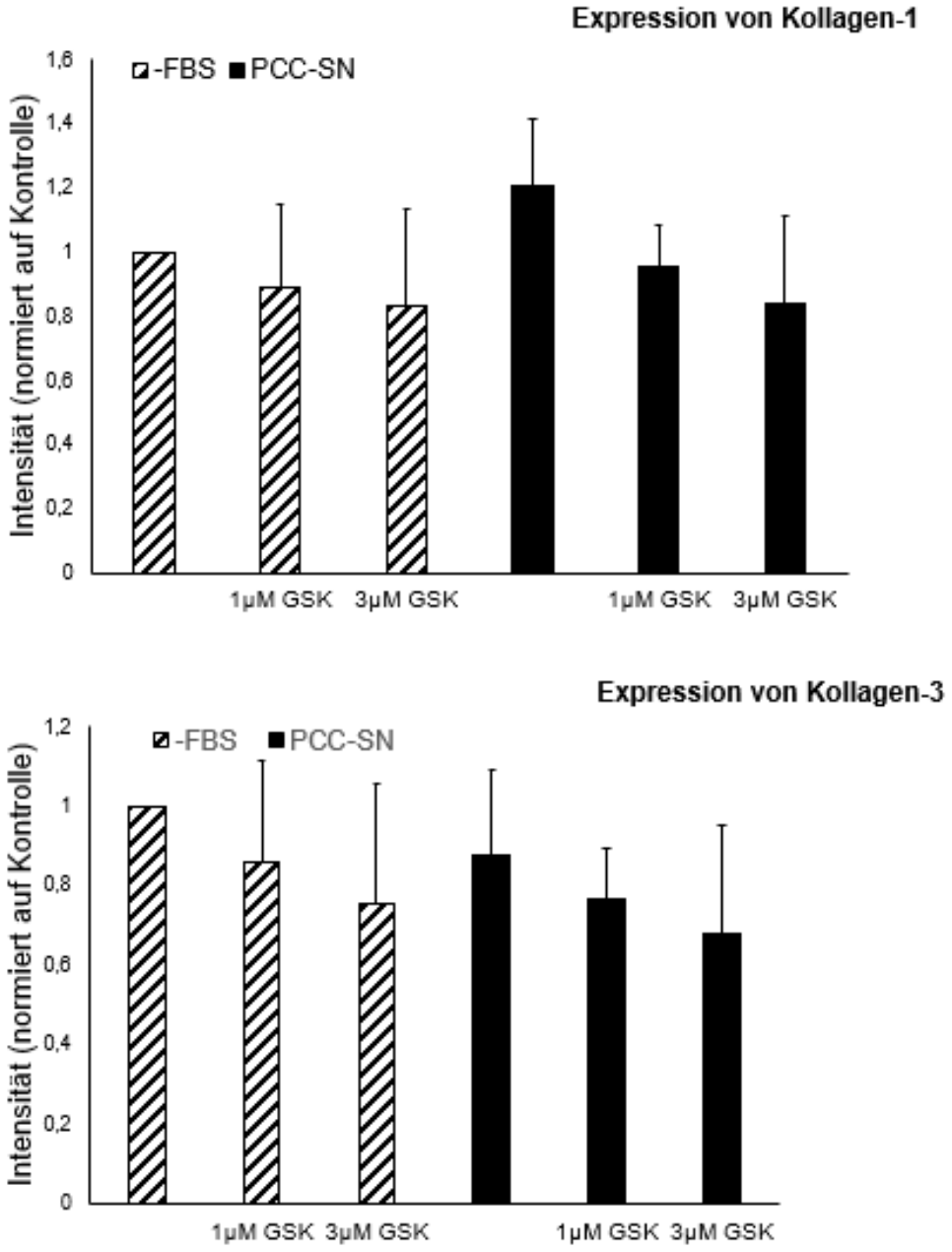


Abbildung 21: Expression von Kollagen-1 und Kollagen-3

hPSC wurden ohne FBS, mit 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand und GSK inkubiert. Verschiedene Strukturproteine wurden über eine Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Die Expression von Kollagen-1 und -3 ist in den Balkendiagrammen dargestellt. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Probe ohne FBS, MIA und GSK normalisiert (erster Balken). Es ist kein Effekt durch MIA Tumorzellüberstand oder GSK auf die Expression von Vimentin, Fibronektin und α-Smooth-Muscle-Aktin zu erkennen. Es ist keine signifikante Stimulation der Expression von Kollagen-1 und -3 durch 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand zu erkennen, aber eine tendenzielle statistisch nicht signifikante Hemmung der Expression von Kollagen-1 und -3 durch GSK 1 µM und 3 µM in Anwesenheit von MIA Tumorzellüberstand. (n=3)

4 Diskussion

4.1 Transfektionseffizienz der siRNA und siRNA Knockdown

Zur Evaluierung der Effekte einer Hemmung der PDPK1 und somit der Hemmung der Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) in hPSC wurde untersucht, ob sich die Expression der PDPK1 durch siRNAs vermindern lässt. In einem Vorversuch wurden zunächst die besten Bedingungen für die Transfektion von hPSC mit Alexa Fluor-markierter siRNA untersucht. Hierbei ließ sich keine ausreichend konstante Transfektion der Zellen erreichen. Im Gesamtschnitt wurden lediglich 37 % der Zellen erfolgreich transfiziert. Die Transfektion der Zellen unterlag außerdem starken Schwankungen. Ab 48 h Inkubationsdauer sank der Anteil erfolgreich transfizierten Zellen ab. Dies könnte einerseits daran liegen, dass die siRNA nach dieser Zeit bereits teilweise degradiert wurde, eine andere Erklärung hierfür wäre, dass die zur Transfektion verwendeten Lipide auch einen toxischen Effekt haben können [58] und dieser über die längere Inkubationsdauer zu einem Verlust der Zellviabilität und somit zu einer verminderten Aufnahme der siRNA geführt haben könnte.

hPSC wurden mit zwei verschiedenen, spezifisch gegen PDPK1 gerichteten siRNAs ohne oder mit 10 % FBS inkubiert. Die Inkubation mit siRNA zeigte in An- und Abwesenheit von FBS teilweise eine leichte Reduktion der PDPK1-Expression. Es kam jedoch zum Teil auch zu einer Zunahme der PDPK1-Expression, welche bei den ohne Serum inkubierten Zellen deutlich stärker ausgeprägt war.

Die Transfektion von Zellen hängt von verschiedenen Faktoren ab: Einige Zelltypen wie primäre Zellen gelten allgemein als schwer zu transfizieren. Die in dieser Arbeit verwendeten hPSC sind primäre Zelllinien aus Pankreasresektionen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die erschwerte Transfektion. Des Weiteren ist die Transfektionseffizienz (auch laut Herstellerangaben) von der verwendeten siRNA an sich, Konzentration der siRNA und des Transfektionsreagenz, deren Verhältnis, der Zelldichte, der Zellviabilität und der Anzahl der Passagen der Zelllinie abhängig.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene siRNA getestet, eventuell müssten für eine erfolgreiche Transfektion von hPSC weitere siRNAs untersucht werden oder die Konzentration und das Verhältnis der verwendeten siRNAs und des Transfektionsreagenz verändert werden. Die Zelldichte der zu transfizierenden

Zellen betrug circa 4000 Zellen / cm² auf einer 24-well Mikrotiterplatte bei der Transfektion mit Alexa Fluor-markierter siRNA und etwa 16000 Zellen / cm² auf einer 6-well Mikrotiterplatte bei der Transfektion mit den spezifisch gegen PDPK1 gerichteten siRNAs. Eine andere Zelldichte könnte eventuell ebenfalls zu einer Verbesserung der Transfektion führen. Ein weiterer Faktor, der die Transfektion von Zellen beeinflusst, ist die An- oder Abwesenheit von Serum im Nährmedium. Einerseits kann die Anwesenheit von Serum, durch Aufrechterhaltung der Membranpermeabilität, die Transfektion mittels Lipofektion erleichtern. Andererseits führt dies jedoch auch zu einer erhöhten intrazellulären Kumulation der potentiell toxischen Lipide und von eventuell im Nährmedium vorhandenen, ebenfalls toxischen Antibiotka, was wiederum die Zellviabilität vermindern kann. Die Serumbestandteile können jedoch auch mit den Lipiden des Transfektionsreagenz reagieren und so den Transport der siRNA über die Zellmembran verhindern. [59] Der in dieser Arbeit verwendete Zelltyp und die vielen Faktoren, von denen eine erfolgreiche Zelltransfektion abhängt, könnten also die erschwerte Transfektion der hPSC und die fehlende Hemmung der PDPK1 durch die verwendeten siRNAs erklären. Es kam jedoch auch teilweise zu einer Steigerung der PDPK1, welche bei den ohne Serum inkubierten Zellen deutlich stärker ausgeprägt war. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass siRNAs, wie Studien der letzten Jahre immer mehr zeigen, nicht nur spezifisch die Synthese eines Proteines inhibieren, sondern auch Nebeneffekte in Zellen, wie beispielsweise eine Interferonantwort, auslösen [60]. Der PI3K/Akt-Signalweg ist unter anderem auch an der Interferonantwort in Zellen beteiligt [60,61]. Es könnte sein, dass dieser über die siRNA aktiviert wurde und es dadurch zu einer Erhöhung der PDPK-1 Expression kam. Dass die Steigerung in der PDPDK1-Expression in den mit Serum inkubierten Zellen schwächer ausfiel, lässt sich wiederum eventuell dadurch erklären, dass die Nebeneffekte der siRNA nicht so stark zum Tragen kamen, da die Transfektion der Zellen, wie oben beschrieben, durch die Anwesenheit von Serum bereits vermindert war. Da dies jedoch nur Vermutungen sind, müssten die optimalen Transfektionsbedingungen und die Gründe für den fehlenden Knockdown beziehungsweise eine gesteigerte PDPK1-Expression genauer untersucht werden. In dieser Arbeit wurde darauf verzichtet und der direkte PDPK1-Inhibitor GSK 2334470 in weiteren Versuchen zur Hemmung der Phosphorylierung der Akt verwendet.

4.2 Die Aktivierung von Akt durch Pankreaskarzinomzellen, H6C7 und HUVEC wird durch GSK233447 gehemmt

hPSC wurden zunächst mit und ohne fetales Kälberserum beziehungsweise mit Zusatz von Pankreastumorzellüberstand von MiaPaCa-2 inkubiert und untersucht, ob es dadurch zu einer Aktivierung der Akt in PSC kommt. Als Marker hierfür wurde die Phosphorylierung der Akt an den Aminosäuren Thr-308 und Ser-473 durch einen Westernblot und die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten quantifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Serum zu einer Aktivierung von Akt in hPSC führt. Dies lässt sich durch Zusatz des direkten PDPK1-Inhibitors GSK233447 hemmen. Überstand aus MiaPaCa-2 führte zu einer noch stärker ausgeprägten Aktivierung der Akt, welche sich wiederum durch GSK deutlich inhibieren lässt. Die Hemmung der Aktivierung findet dabei jeweils sowohl über eine verminderte Phosphorylierung an Thr-308, als auch an Ser-473 statt.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Hemmung der Tumorzell-induzierten Aktivierung der Akt durch GSK konzentrationsabhängig erfolgt. Höhere GSK-Konzentrationen bewirken eine noch stärkere Hemmung der Phosphorylierung. Diese war in allen Versuchen deutlich messbar. Sie erfolgte jedoch nicht vollständig. Da die Hemmung konzentrationsabhängig erfolgte, könnten höhere GSK-Konzentrationen aber eventuell zu einer vollständigen beziehungsweise noch deutlicher ausgeprägten Hemmung führen.

PDPK1 ist für die Phosphorylierung von Akt an Thr-308 verantwortlich [42]. Die Phosphorylierung der Akt an Ser-473 war lange Zeit umstritten. Es wird jedoch angenommen, dass PDPK1, trotz seiner Fähigkeit, die Akt an Ser-473 zu phosphorylieren, hierfür nicht notwendig ist und dass die Phosphorylierung an Ser-473 physiologisch unabhängig von der Phosphorylierung an T-308 durch ein anderes Enzym erfolgt [62–65]. Dies könnte erklären, warum die Hemmung der Phosphorylierung von Akt an Thr-308 bereits ab einer GSK-Konzentration von 1 µM und an Ser-473 erst ab 3 µM statistisch signifikant war. Die Phosphorylierung an Ser-473 in hPSC scheint jedoch zumindest teilweise durch die PDPK1 zu erfolgen beziehungsweise von dieser abhängig zu sein, da durch Hemmung der PDPK1 ebenfalls eine Reduktion der Phosphorylierung an dieser Aminosäure erfolgte.

Anschließend wurde untersucht, ob der Aktivierungszustand von Akt auch durch weitere Pankreastumorzellüberstände, sowie Überständen von hPSC selbst, Überständen einer immortalisierten pankreatischen duktalen Zelllinie (H6C7) und von Endothelzellen (HUVEC) beeinflusst wird. Bei den verwendeten Tumorzellüberständen der Zelllinien AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, MIA PaCa-2, UlaPaca, Panc-1 und Panc-98 kam es ebenfalls zu einer deutlichen Aktivierung der Akt in hPSC. Hieraus lässt sich schließen, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse nicht nur auf die Aktvierung der Akt in hPSC durch MiaPaCa-2 zurückzuführen sind, sondern dass sich diese aller Wahrscheinlichkeit nach auf Tumorzellen im Allgemeinen anwenden lassen. Die unterschiedlich stark ausfallende Aktivierung der Akt spricht dennoch für eine Heterogenität zwischen einzelnen Tumorzellen.

Interessanterweise zeigte sich nicht nur durch PCC, sondern auch durch nicht tumoröse pankreatische duktale Epithelzellen (H6C7) und durch Endothelzellen (HUVEC) eine Aktivierung der Akt in hPSC, welche sich durch GSK hemmen ließ.

Pankreaskarzinome besitzen im Gegensatz zu anderen, gut vaskularisierten Tumoren eine Hypovaskularisation, welche auch für das schlechte Ansprechen auf Chemotherapeutika verantwortlich gemacht wird [37,66,67]. Es gibt jedoch auch beim Pankreaskarzinom Anpassungsmechanismen, die zu einer adäquaten Nährstoffversorgung des Tumors führen, wie beispielsweise die erst kürzlich entdeckten basalen Mikrovilli in Endothelzellen, die in gesundem Pankreasgewebe nicht zu finden sind [39]. Es ist anerkannt, dass die Regulation der Angiogenese von Tumoren entscheidend durch Stromazellen beeinflusst wird [36]. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein wichtiger Faktor in der Angiogenese, der die Differenzierung, Migration und Proliferation von Endothelzellen fördert [68,69]. Eine erhöhte Expression von VEGF ist beim Pankreaskarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert [70]. PSC produzieren VEGF und stimulieren dadurch die Angiogenese beim Pankreaskarzinom im orthotopen Mausmodell sowie die Ausbildung Gefäß-ähnlicher Strukturen von Endothelzellen und deren Proliferation unter normoxischen Bedingungen durch VEGF *in vitro* [31,40,68]. Die Produktion von VEGF in PSC wird durch Hypoxie stimuliert [68,69]. Allerdings supprimieren PCC allein oder in Kombination mit PSC wiederum die Proliferation von Endothelzellen [37]. Die genaue Rolle von PSC in der Angiogenese des Pankreaskarzinoms und die Mechanismen der Interaktion von PSC und

Endothelzellen sind also nicht vollständig geklärt. Beim Lungenkarzinom wurde gezeigt, dass die Tumorzell-induzierte Angiogenese über den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt wird [71]. Es könnte sein, dass der PI3K/Akt-Signalweg in PSC ebenfalls eine wichtige Rolle für die VEGF-Expression spielt und die Aktivierung des Signalwegs durch Endothelzellen zu einer vermehrten VEGF-Expression führt, was wiederum zu einer vermehrten Angiogenese beitragen könnte. Die genauen Auswirkungen der Aktivierung der Akt in PSC auf die VEGF-Expression beziehungsweise die Angiogenese bedürfen jedoch weiterer Untersuchung.

Studien deuten darauf hin, dass die maligne Transformation von pankreatischen duktalen Epithelzellen bereits früh in der Tumorgenese stattfindet und dass die Interaktion von PSC und Epithelzellen hier eine entscheidende Rolle spielt: Die Kokultur von PSC und nicht tumorösen duktalen Epithelzellen (H6C7) führte in diesen zu epithelial-mesenchymaler Transition (EMT), verbunden mit einem chemoresistenten und migratorischen Phänotyp der Zellen [72]. Wurden H6C7 in Kombination mit PSC intrapankreatisch inokuliert, führte dies zur Entstehung eines Tumors. H6C7 alleine besaßen diesen Effekt nicht [72]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Inkubation mit Überstand von H6C7 zu einer Aktivierung der Akt in hPSC führt, welche sich durch GSK hemmen lässt. Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs in PSC scheint also eine frühe Veränderung in der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms darzustellen. Es ist von großer Bedeutung mehr über diese frühen Veränderungen beim Pankreaskarzinom zu erfahren, da die überaus schlechte Prognose auch großteils mit dem späten Diagnosezeitpunkt in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium zusammenhängt [5].

Nicht alle Effekte in den Versuchen sind statistisch signifikant. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die densitometrische Auswertung von Westernblots zu einer relativ großen Streuung der Absolutwerte führt, da sie viele Arbeitsschritte umfasst und somit eine nicht allzu exakte quantitative Methode darstellt. Die densitometrische Auswertung des Westernblots liefert willkürliche Einheiten (AU, arbitray units), welche beispielsweise unter anderem von der gewählten Belichtungszeit abhängig sind. Hinzu kommt, dass nicht bekannt ist, wie stark die basale Akt-Phosphorylierung schwankt. Damit variiert auch der Divisor für die Normierung. Der relative Unterschied zwischen den unterschiedlichen Versuchsbedingungen eines einzelnen Versuchs ist jedoch biologisch determiniert und das Verhältnis von Phospho-Akt zur Gesamt-Akt liefert somit eine gute

Vergleichbarkeit der einzelnen Proben innerhalb eines Versuches. Um vergleichbare Ergebnisse zwischen den Einzelversuchen zu erhalten, wurden alle Werte jeweils auf die Messwerte ohne Stimulierung, also die Probe ohne Serum normiert. Durch eine höhere Versuchsanzahl wären vermutlich mehr statistisch signifikant unterschiedliche Werte gemessen worden. Da sich die relativen Unterschiede aber in jedem Versuch reproduzieren ließen und weitere Versuche dieser Arbeit sowohl die Effekte von Tumorzellüberstand als auch von GSK auf Akt bestätigten, wurde auf eine größere Versuchsanzahl verzichtet, da hieraus kein zusätzlicher Erkenntnisgewinn zu erreichen wäre.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es durch PCC, durch Endothelzellen (HUVEC) und durch nicht tumoröse pankreatische duktale Epithelzellen (H6C7) zu einer Aktivierung der Akt in hPSC kommt, welche jeweils über den direkten PDPDK1-Inhibitor GSK deutlich, jedoch im verwendeten Konzentrationsbereich bis 3 µM nicht vollständig, gehemmt werden kann.

4.3 Die Tumorzell-induzierte Migration und Proliferation von hPSC wird durch GSK gehemmt

Die Migration und Proliferation von PSC wird durch Pankreaskarzinomzellen stimuliert [30,31,29,32,33]. Der PI3/Akt-Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle für die Zellproliferation von hepatischen und pankreatischen Sternzellen [73–75]. Es wurde deshalb untersucht, ob sich die Zellmotiliät und die Proliferation nach Inkubation mit und ohne Serum, sowie mit Überstand von MIA PaCa-2 durch GSK und (die Proliferation) durch spezifisch gegen PDPK1 gerichtete siRNA hemmen lassen.

Die Proliferation in hPSC wird durch FBS-Zusatz signifikant und durch MIA PaCa2-Überstand tendenziell gesteigert. Die Proliferationsrate wird sowohl in Anwesenheit von 10 % FBS als auch bei 50 % MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand durch GSK 1 µM statistisch signifikant gehemmt. Masamune et al. kamen zu dem Schluss, dass der ERK1/2-Signalweg intrazellulär die Proliferation und die Motilität, der PI3K/Akt-Signalweg vor allem die Migration, nicht jedoch die Proliferation reguliert, da in dieser Studie durch die Inhibition der PI3K durch Wortmannin und LY29400 kein Effekt auf die Proliferation beobachtet wurde [73]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen im Gegensatz dazu jedoch eine Beteiligung des PI3K/Akt-Signalweges in

hPSC für die Proliferation nahe. Die Inkubation mit siRNA zeigte keinen eindeutigen Effekt auf die Proliferationsrate von hPSC.

Die Zellmotilität wird sowohl durch Zusatz von FBS, als auch durch MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand stimuliert. Nach Inkubation mit und ohne Serum, sowie mit Überstand von MIA PaCa-2 lässt sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellmotilität durch GSK beobachten, die jedoch nur bei den mit Tumorzellüberstand inkubierten Zellen statistisch signifikant ausfällt. Dies bestätigt die Bedeutung des PI3K-Signaltransduktionsweges und speziell von Akt für die Motilität von hPSC. Dieser Signalweg scheint insbesondere bei der durch Tumorzellüberstand stimulierten Motilität eine große Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Bedeutung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges sowohl für die Proliferation, als auch die Migration von hPSC nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass sich die durch Überstand von Pankreaskarzinomzellen stimulierte Motilität und Proliferationsrate von hPSC durch eine Inhibition der Akt via GSK hemmen lässt. Da die erhöhte Anzahl von PSC in der Mikroumgebung des Pankreaskarzinoms wahrscheinlich durch eine erhöhte lokale Proliferation in Kombination mit einer vermehrten Migration aus umliegenden Bereichen zustande kommt [29], und aufgrund der Bedeutung der Migration und Proliferation von PSC für die Metastasierung des Pankreaskarzinoms [31], wäre deren Hemmung durch GSK somit ein möglicher Ansatz zur Störung der Interaktion von PSC und PCC.

4.4 Proteinsynthese von hPSC

Da Akt eine wichtige Rolle im Proteinsynthese-Stoffwechsel von Zellen spielt (siehe auch Abbildung 1, Akt-Signaltransduktion), wurde untersucht, ob die Gesamtproteinsynthese von hPSC durch Zusatz von FBS beziehungsweise PCC-Überstand erhöht wird.

Die basale Proteinsynthese in Zellen lässt sich nicht durch GSK hemmen. Das liegt vermutlich daran, dass die Regulierung der Synthese von Proteinen in Zellen komplex ist und durch viele weitere intrazelluläre Signaltransduktionswege beeinflusst wird. Der Zusatz von fetalem Kälberserum zum Nährmedium führt jedoch zu einer um das Dreifache erhöhten Proteinsynthese in hPSC. Die Zusammensetzung von fetalem Kälberserum ist komplex und nicht genau bekannt,

es enthält jedoch unter anderem Wachstumsfaktoren und Nährstoffe [76], die für die Proteinbiosynthese in Zellen wichtig sind, wodurch sich diese Erhöhung erklären ließe. Dass sich die Serum-induzierte Erhöhung der Proteinsynthese durch GSK fast auf das basale Niveau hemmen lässt, zeigt, dass die Steigerung der Proteinsynthese mittels Serum durch eine Stimulierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges zustande kommt. Eine unspezifische Bindung von Proteinen aus FBS an hPSC lässt sich trotz gründlichem dreimaligen Waschen mit PBS zwar nicht vollständig ausschließen, eine Hemmung der Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration durch GSK hingegen lässt sich jedoch nur durch eine Hemmung des PDPK1/Akt-Signaltransduktionsweges erklären.

Der Zusatz von MIA PaCa-2 Tumorzellüberstand hat keinen Effekt auf die Gesamtproteinkonzentration der hPSC und lässt sich durch GSK auch nicht hemmen. Dies liegt zum einen daran, dass die Gewinnung des Tumorzellüberstands ohne FBS erfolgte [32] und die Proteinsynthese, wie oben beschrieben, nicht nur über den Akt-Signaltransduktionsweg stimuliert wird. Da jedoch in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Akt durch Überstand aus Pankreaskarzinomzellen aktiviert wird, wäre eine Erhöhung der gesamten Proteinkonzentration zumindest nicht unwahrscheinlich. Dass Tumorzellüberstand dennoch nicht zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration führt, lässt sich unter Umständen dadurch erklären, dass Tumorzellen auf viele weitere Signaltransduktionswege in PSC Einfluss nehmen, wovon noch nicht alle bekannt sind und dort teilweise auch inhibitorische Effekte ausüben könnten. Hierdurch käme es zu einer teilweise auch verminderten Proteinexpression. Ein weiterer Faktor könnten intrazelluläre Feedbackmechanismen sein, die eventuell nach Inkubation mit Tumorzellüberstand aktiviert werden und die wiederum die Proteinexpression beeinflussen. Ebenfalls könnte die basale Proteinsynthese in PSC durch Tumorzellüberstand vermindert sein, da die Tumorzellen vor Gewinnung des Überstandes bereits Nährstoffe und Wachstumsfaktoren aus diesem verbraucht haben könnten und es zusätzlich zu einer Anhäufung von Metaboliten, die die Proteinsynthese hemmen, gekommen sein könnte. Durch Überlagerung der Aktivierung von Signalwegen und den oben genannten Effekten, lässt sich eine in der Summe gleichbleibende gesamte Proteinsynthese von hPSC nach Inkubation mit Tumorzellüberstand erklären.

4.5 Expression von Matrixmetalloproteasen

Die Expression der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) durch pankreatische Sternzellen und der durch sie erfolgende Umbau der Extrazellulärmatrix wird in direkten Zusammenhang mit der schlechten Prognose von duktalen Adenokarzinomen des Pankreas gebracht [22]. Eine Hemmung der MMP-2 Produktion ist somit ein möglicher Ansatzpunkt, um das Fortschreiten des Pankreaskarzinoms zu verhindern. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Inhibition der MMP-2 und MMP-9 *in vitro* zu einer Apoptose von humanen Pankreaskarzinomzellen führt und das Tumorwachstum inhibiert [77], wenngleich klinische Studien bislang ausbleibende Effekt zeigen [78] [79].

Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich die MMP-2 Produktion von hPSC über die Inhibition der PDPK1 hemmen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass 50 % Überstand aus MIA PaCa-2 Karzinomzelllinien die Expression der MMP-2 signifikant steigert, was sich auch mit den Ergebnissen älteren Studien deckt [13]. Die Inhibition der Akt durch den PDPK1-Inhibitor GSK zeigt im Konzentrationsbereich von 1 µM - 3 µM jedoch keine Hemmung dieser Hochregulierung.

Die Regulation der MMPs im Allgemeinen und speziell der MMP2 ist Gegenstand aktueller Forschung. Bislang gibt es hierzu unterschiedliche Ergebnisse. Einige Studien legen dar, dass insbesondere der MAP-Kinase-Weg für die Expression von MMP-2 in Tumoren essentiell zu sein scheint [80–84]. Beim Mammakarzinom zeigte sich beispielsweise durch die Inhibierung von ERK eine erniedrigte Aktivität von MMP2 [85]. Weitere Studien zeigen hingegen, dass die Regulation von MMP-2 über den PI3-Kinase-Weg erfolgt [86,87]. In einer Arbeit von Tang et al. hemmte ein PI3-Kinase-Inhibitor die MMP-2-Produktion beim hepatozellulären Karzinom [88] . Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der die Hemmung des PI3-Kinase-Wegs via Akt keine Reduktion der MMP-2-Levels zeigte.

Die genaue Regulation der MMP-2, insbesondere beim Pankreaskarzinom, bedarf also weiterer Untersuchung. Die aktuelle Studienlage kommt zu unterschiedlichen Ergebnissen, deutet jedoch darauf hin, dass sowohl der MAP-Kinase-Weg als auch der PI3-Kinase-Weg an der Regulation beteiligt sind. Des Weiteren gibt es zwischen diesen Signalwegen auch enge Querverbindungen [89], weshalb die alleinige

Inhibierung von einem dieser Signalwege gegebenenfalls nicht ausreicht, um die MMP-2 Produktion ausreichend zu hemmen.

4.6 Expression von Vimentin, Fibronektin, Kollagen-1, Kollagen-3 und α-Smooth-Muscle-Aktin

Im Vergleich zu ruhenden hPSC exprimieren aktivierte hPSC α-Smooth-Muscle-Actin und Desmin und synthetisieren erhöhte Mengen an Extrazellulärmatrix (EZM), beispielsweise Kollagene und Adhäsionsproteine wie Fibronektin. Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob dies durch Hemmung der Akt via PDPK1 beeinflusst werden kann. Es wurde in hPSC eine Immunfluoreszenzfärbung auf Vimentin (einem Typ-3 Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine), Fibronektin, Kollagen-1, Kollagen-3 und α-Smooth-Muscle-Aktin durchgeführt. Es konnte jedoch, anderes als in anderen Studien gezeigt, nach Inkubation der Zellen keine Steigerung der Expression der untersuchten Proteinen beobachtet werden [90,10,32,9]. In dieser Arbeit wurden im Gegensatz zu früheren Untersuchungen [72,32,10] keine frisch isolierten hPSC verwendet. Die hohe Passagezahl der hPSC könnte ein Grund sein, dass sich die Expressionssteigerung nicht mehr unter dem Fluoreszenmikroskop nachweisen lässt. Des Weiteren könnte die Auswertung mittels Immunquantifizierung technisch nicht genau genug sein, da die gemessen Werte nicht auf die Gesamtakt, sondern nur auf die gezählten Zellkerne normiert werden können. Um signifikante Werte zu erhalten, müsste man vermutlich aus mehr Versuchen eine sehr viel größere Anzahl an Zellen und Bildern auswerten.

4.7 Schlussfolgerung

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Akt und somit der PI3-Kinase-Weg in pankreatischen Sternzellen durch Pankreaskarzinomzellen aktiviert wird. Eine Hemmung der Akt über siRNAs brachte im verwendeten Konzentrationsbereich keinen messbaren Effekt. Die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der Akt lassen sich über den direkten PDPK1-Inhibitor GSK 233470 im verwendeten Konzentrationsbereich deutlich, wenn auch nicht vollständig, hemmen. Dies gilt auch für die durch Tumorzellüberstand induzierte Aktivierung der Akt in hPSC.

Der PI3-Kinase-Weg in hPSC wird auch durch eine pankreatische duktale Zelllinie (H6C7) und durch Endothelzellen (HUVEC) aktiviert.

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Proliferation von hPSC durch den Zusatz von Serum und durch Pankreaskarzinomzellen gesteigert wird. Beides lässt sich durch Hemmung der Akt durch den PDPK1-Inhibitor GSK 233470 hemmen.

Die Motilität von hPSC wird ebenfalls durch Zusatz von Serum und durch Pankreaskarzinomstellen stimuliert. Die Hemmung des PI3-Kinase-Wegs zeigte wiederum eine Reduktion der Motilität, insbesondere bei den durch PCC stimulierten hPSC. Die gesamte Proteinproduktion von hPSC wurde durch Zusatz von Serum über den PI3-Kinase-Weg gesteigert, blieb jedoch von PCC unbeeinflusst.

In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass PCC die Expression von MMP-2 in hPSC steigern. Dies lässt sich jedoch nicht über eine Hemmung der Akt beeinflussen.

5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gewinnt unter anderem aufgrund der überaus schlechten 5-Jahres-Überlebensrate immer mehr an Bedeutung und stellt aktuell die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland dar. Dies liegt unter anderem auch am schlechten Ansprechen auf Chemotherapeutika. Aufgrund der fehlenden frühen Symptome erfolgt eine Diagnose meist in einem nicht mehr kurativ behandelbaren Stadium.

Seit der Entdeckung der humanen pankreatischen Sternzellen (human pancreatic stellate cells (hPSC)) wird deren Bedeutung für die Tumorgenese des Pankreaskarzinoms immer deutlicher. hPSC sind entscheidend an der desmoplastischen Reaktion des Pankreaskarzinoms beteiligt. Sie scheinen außerdem eine wichtige Rolle bei der Metastasenbildung und der Vaskularisierung von Pankreaskarzinomen zu spielen. Die Interaktion zwischen hPSC und Pankreaskarzinomzellen (pancreatic cancer cells (PCC)) und die daran beteiligten intrazellulären Signalwege wurden daher in den letzten Jahren intensiv erforscht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3)-Kinase-Wegs in humanen pankreatischen Sternzellen für die Interaktion zwischen diesen und Pankreaskarzinomzellen weiter zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass Proteinkinase B (Akt) und somit der PI3-Kinase-Weg in pankreatischen Sternzellen durch Pankreaskarzinomzellen aktiviert wird. Versuche, Akt über zwei verschiedene, spezifisch gegen die messenger RNA (mRNA) von Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDPK-1) gerichtete small interfering RNAs (siRNAs) zu hemmen, brachte im verwendeten Konzentrationsbereich keinen messbaren Effekt. Die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der Akt lassen sich über den direkten PDPK1-Inhibitor GSK 233470 im verwendeten Konzentrationsbereich tendenziell, wenn auch nicht vollständig, hemmen. Dies gilt auch für die durch Tumorzellüberstand induzierte Aktivierung der Akt in hPSC.

Der PI3-Kinase-Weg in hPSC wird auch durch eine pankreatische duktale Zelllinie (H6C7) aktiviert. Dies könnte eine frühe Veränderung in hPSC bei der Entstehung eines Pankreaskarzinoms sein und gegebenenfalls einen therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

Des Weiteren wird der PI3-Kinase-Weg in hPSC von Endothelzellen (HUVEC) aktiviert. Die genaue Bedeutung von hPSC für die Vaskularisierung von Tumoren

ist bislang unklar. Es wurde jedoch beispielsweise gezeigt, dass hPSC die Proliferation von Endothelzellen beeinflussen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der PI3-Kinase-Weg in hPSC nach Kokultur mit Endothelzellen aktiviert wird, hPSC selbst also ebenso durch Endothelzellen beeinflusst werden.

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Proliferation von hPSC durch den Zusatz von Serum und durch Pankreaskarzinomzellen gesteigert wird. Beides lässt sich durch Hemmung der Akt durch den PDPK1-Inhibitor GSK 233470 hemmen, was nahelegt, dass der PI3-Kinase-Weg die Proliferation von hPSC mitreguliert.

Die Motilität von hPSC wird ebenfalls durch Zusatz von Serum und durch Pankreaskarzinomstellen stimuliert. Die Hemmung des PI3-Kinase-Wegs zeigte wiederum eine Reduktion der Motilität, insbesondere bei den durch PCC stimulierten hPSC. Der PI3-Kinase-Weg scheint also insbesondere bei der durch Tumorzellen stimulierten Motilität von hPSC eine Rolle zu spielen. Da die Proliferation und Migration von hPSC für die Metastasierung des Pankreaskarzinoms bedeutend sind, könnte der PI3-Kinase-Weg ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt sein, um diese zu vermindern.

Die gesamte Proteinproduktion von hPSC wurde durch Zusatz von Serum über den PI3-Kinase-Weg gesteigert, blieb jedoch von PCC unbeeinflusst.

In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass PCC die Expression von Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) in hPSC steigern. Dies lässt sich jedoch nicht über eine Hemmung der Akt beeinflussen und zeigt, dass der PI3-Kinase-Weg nicht beziehungsweise nicht als einziger intrazellulärer Signalweg an der Regulation der Expression von Matrixmetalloproteasen beteiligt ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Bedeutung des PI3-Kinase-Wegs für die Interaktion zwischen hPSC und PCC gezeigt und bestätigt werden. Da in den letzten Jahren die Bedeutung des umgebenden Stromas für das Tumorwachstum des Pankreaskarzinoms immer ersichtlicher wurde, sind intrazelluläre Signalwege nicht nur in PCC, sondern ebenso in hPSC ein wichtiger potentieller therapeutischer Angriffspunkt. Insbesondere die Migration und Proliferation von hPSC und PCC, sowie die Vaskularisierung von Pankreaskarzinomen könnten über den PI3-Kinase-Weg beeinflusst werden.

6 Literaturverzeichnis

[1] http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf (20.11.16).

[2] Malvezzi M, Bertuccio P., Levi F, La Vecchia C, Negri E: European cancer mortality predictions for the year 2014. Ann Oncol 25: 1650–1656 (2014).

[3] https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Krebserkrankungen.html (04.09.16).

[4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, 2015. CA Cancer 65: 5–29 (2015).

[5] Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Löhr J-M, Neoptolemos J, Real FX, van Laethem J-L, Heinemann V: Addressing the challenges of pancreatic cancer: Future directions for improving outcomes. Pancreatology 15: 8–18 (2015).

[6] Herold G, Mitarbeiter: Pankreaskarzinom. In: Herold, Gerd (Hrsg) Herold Innere Medizin, 2016, Eigenverlag, Köln, S. 512-513; 2016.

[7] Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144: 646–674 (2011).

[8] Klöppel, Go, Vay Liang W: Fine Structure of Human Pancreatic Adenocarcinoma. In: Klöppel (Hrsg) The Pancreas: Biology, pathobiology, and disease 2. Auflage, Raven Press, New York, 857-870; 1993.

[9] Apte MV, Haber PS, Applegat TL, Norton ID, McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola RC, Wilson JS: Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 43: 128–133 (1998).

[10] Bachem MG, Schneider E, Groß H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G: Identification, Culture, and Characterization of Pancreatic Stellate Cells in Rats and Humans. Gastroenterology 115: 421–432 (1998).

[11] Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keog g, Merret N, Pirola R, Wilson JS: Desmoplastic Reaction in Pancreatic Cancer Role of Pancreatic Stellate Cells. Pancreas 29: 179–187 (2004).

[12] Yen T, Aardal NP, Bronner MP, Thorning, Savard CE, Lee SP, Bell RH Jr.: Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. Surgery 131: 129–134 (2001).

[13] Schneiderhan W, Diaz F, Fundel M, Zhou S, Siech M, Hasel C, Möller P, Gschwend JE, Seufferlein T, Gress T, Adler G, Bachem MG: Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. J Cell Sci 120: 512–519 (2007).

[14] Carapuca EF, Gemenetzidis E, Feig C, Bapiro TE, Williams MD, Wilson AS, Delvecchio FR, Arumugam P, Grose RP, Lemoine NR, Richards FM, Kocher HM: Anti-stromal treatment together with chemotherapy targets multiple signalling pathways in pancreatic adenocarcinoma. J Pathol 239: 286–296 (2016).

[15] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z: Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell 141: 52–67 (2010).

[16] Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2: 161–174 (2002).

[17] Dangi-Garimella S, Krantz SB, Barron MR, Shields MA, Heiferman MJ, Grippo PJ, Bentrem DJ, Munshi HG: Three-dimensional collagen I promotes gemcitabine resistance in pancreatic cancer through MT1-MMP-mediated expression of HMGA2. Cancer res 71: 1019–1028 (2011).

[18] Liotta L, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membran collagen. Nature 284: 67–68 (1980).

[19] Salo T, Liotta A, Tryggvason K: Purification and Characterization of a Murine Basement Membran Collagen-degradign Enzyme Secreted by Meastatic Tumor Cells. J Biol Chem 258 (1983).

[20] Satoh K, Ohtani H, Shimosegawa T, Koizumi M, Sawai T, Toyota T: Infrequent Stromal Expression of Gelatinase A and Intact Basement Membrane in Intradructal Neoplasms of the Pancreas. Gastroenterol 107: 1488–1495 (1994).

[21] Bramhall SR, Stamp GW, Dunn J, Lemoine NR, Neoptolemos JP: Expression of collagenase (MMP2), stromelysin (MMP3) and tissue inhibitor of

the metalloproteinases (TIMP1) in pancreatic and ampullary disease. Br J Cancer 73: 927–978 (1996).

[22] Xu L, Ding X, Tan H, Qian J: Correlation between B7-H3 expression and matrix metalloproteinases 2 expression in pancreatic cancer. Cancer Cell Int 13: 81 (2013).

[23] Gong YL, XU GM, Huang WD, Chen LB: Expression of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of metalloproteinases and their local invasiveness and metastasis in Chinese human pancreatic cancer. J Surg Oncol 73: 95–99.

[24] Gu MJ, Bae YK, Choi JH: Expression of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Korean J Pathol 38: 73–78 (2004).

[25] Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Meke A, Boeck W, Wagner M, Wilda M, Friess H, Büchler M, Adler G, Gress T: Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. Int J Cancer 85: 14–20 (2000).

[26] Kuniyasu H, Ellis LM, Evans DB, Abbruzzese JL, Fenoglop CJ, Bucana CD, Cleary KR, Tahara E, Fidler IJ: Relative Expression of E-Cadherin and Type IV Collagenase Genes Predicts Disease Outcome in Patients with Resectable Pancreatic Carcinoma. Clin Cancer Res 5: 25–33 (1999).

[27] P A Phillips, J A McCarroll, S Park, M-J Wu, R Pirola, M Korsten, J S Wilson, M V Apte: Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. Gut 52: 275–282 (2003).

[28] Tjomsland V, Pomianowska E, Aasrum M, Sandnes D, Verbeke CS, Gladhaug IP: Profile of MMP and TIMP Expression in Human Pancreatic Stellate Cells: Regulation by IL-1α and TGFβ and Implications for Migration of Pancreatic Cancer Cells. Neoplasia 18: 447–456 (2016).

[29] McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV: Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-kinase) pathway. Biochem Pharmacol 67: 1215–1225 (2004).

[30] Rosendahl AH, Gundewar C, Said Hilmersson K, Ni L, Saleem MA, Andersson R: Conditionally immortalized human pancreatic stellate cell lines demonstrate enhanced proliferation and migration in response to IGF-I. Exp Cell Res 330: 300–310 (2015).

[31] Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Fiala-Beer E, Zhang X, Yang L, Biankin AV, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV: Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. Am J Pathol 177: 2585–2596 (2010).

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

[33] Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grünert A, Bachem MG: Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. Am J Physiol Cell Physiol 281: C532-C543 (2001).

[34] Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z: Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. Dev Cell 18: 884–901 (2010).

[35] Dudley AC: Tumor endothelial cells. Cold Spring Harb Perspect Med 2: a006536 (2012).

[36] Baeriswyl V, Christofori G: The angiogenic switch in carcinogenesis. Semin Cancer Biol 19: 329–337 (2009).

[37] Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski C, Deucker S, Sauliunaite D, Streit S, Esposito I, Friess H, Kleef J: Cancer-Stellate Cell Interactins Perpatuate the Hypoxia-Fibrosis Cycle in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Neoplasia 11: 497–508 (2009).

[38] Borowa-Mazgaj: [Pancreatic cancer--mechanisms of chemoresistance]. Postepy Hig Med Dosw (Online) 70: 169–179.

[39] Saiyin H, Ardito-Abraham CM, Wu Y, Wei Y, Fang Y, Han X, Li J, Zhou P, Yi Q, Maitra A, Liu JO, Tuveson DA, Lou W, Yu L: Identification of novel vascular projections with cellular trafficking abilities on the microvasculature of pancreatic ductal adenocarcinoma. J Pathol 236: 142–154 (2015).

[40] Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Deucker S, Sauliunaite D, Streit S, Esposito I, Friess H, Kleeff J: Cancer-Stellate Cell Interactions Perpetuate the Hypoxia-Fibrosis Cycle in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Neoplasia 11: 498–508 (2009).

[41] Cantley, Lewis C., et al.: The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296: 1655–1657 (2002).

[42] Alessi DR: Discovery of PDKI, One of the Missing Links in Insulin Signal Transduction. Biochem Soc Trans 29: 1–14 (2001).

[43] Warfel NA, Kraft AS: PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors. Pharmacol Ther 151: 41–49 (2015).

[44] Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer 2: 489–501 (2002).

[45] http://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04151&keyword=pi3k (05.09.16).

[46] Kanehisa M, Goto S.: KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleid Acids Res 28: 27–30 (2000).

[47] M K, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M: KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. Nucleic Acids Res 44: 457–462 (2016).

[48] Siomi H, Siomi MC: On the road to reading the RNA-interference code. Nature 457: 396–404 (2009).

[49] Fire A, Xu S, Montgomery, Mary K., Kostas, Steven A., Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 39: 806–811 (1998).

[50] Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ: Small Interfering RNA–Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. Science 305: 1289–1292 (2004).

[51] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschi T: Duplexes of 21±nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411: 494–498 (2011).

[52] Rosario FJ, Sadovsky Y, Jansson T: Gene targeting in primary human trophoblasts. Placenta 33: 754–762 (2012).

[53] Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin, M, Felgner, P: Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formilations. J Biol Chem 269: 2550–2561 (1994).

[54] Felgner P, Gadek R: Lipofection: A higly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7413–7417 (1987).

[55] http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=283217 (26.03.15).

[56] Haag C, Stadel D, Zhou S, Bachem MG, Möller P, Debatin K-M, Fulda S: Identification of c-FLIP(L) and c-FLIP(S) as critical regulators of death receptor-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. Gut 60: 225–237 (2011).

[57] Ouyang H, Mou LJ, Liu N, Karaskova J, Squire J, Tsao MS: Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. Am J Pathol 157: 1623–1631 (2000).

[58] Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J: Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. J Control Release 114: 100–109 (2006).

[59] Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Moore ML: Transfection of cultured eukaryotic cells using cationic lipid reagents. Curr Protoc Mol Bio 9: Unit 9.4 (2008).

[60] Sledz CA, Holko M, de Veer, Michael J, Silverman RH, Williams, Bryan R G: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol 5: 834–839 (2003).

[61] Kaur S, Sassano A, Joseph AM, Majchrzak-Kita B, Eklund EA, Verma A, Brachmann SM, Fish EN, Platanias LC: Dual Regulatory Roles of Phosphatidylinositol 3-Kinase in IFN Signaling. J Immunol 181: 7316–7323 (2008).

[62] Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, Downes C, Alessi DR: PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. Curr Biol 9: 393–404 (1999).

[63] Williams, Arthur JS, Balendran A, van der Kaay J, Plo V, Cohen P, Alessi: The role of 3-phopshoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. Current Biology 10: 439–448 (2000).

[64] Allesi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA: Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J 15: 6541–6551 (1996).

[65] Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA: Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. J Biol Chem 279: 41189–41196 (2004).

[66] Bondar VM, Sweeney-Gotsch B, Andreeff M, Mills GB, McConkey DJ: Inhibition of the Phosphatidylinositol 3′-Kinase-AKT Pathway Induces Apoptosis

in Pancreatic Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo. Mol Cancer Ther 1: 989–997 (2002).

[67] Giovanetti E, Mey V, Nannizzi S, Pasqualetti G, Del Tacca M, Danesi R: Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. - PubMed - NCBI. Mol Cancer Ther 6: 1387–1395 (2006).

[68] Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Shimosegawa T: Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295: G709-717 (2008).

[69] Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev 25: 581–611 (2004).

[70] Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K: High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. Cancer 88: 2239–2245 (2000).

[71] Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, Rao JS: MMP-2 alters VEGF expression via alphaVbeta3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. Int J Cancer 5127: 1081–1095 (2010).

[72] Schäfer H, Geismann C, Heneweer C, Egberts J-H, Korniienko O, Kiefel H, Moldenhauer G, Bachem MG, Kalthoff H, Altevogt P, Sebens S: Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent. Carcinogenesis 33: 84–93 (2012).

[73] Masamune A, Kikuta K, Satoh, M, Kume K, Shomosegawa T: Differential Roles of Singalling Pathways for Proliferation and Migration of Rat Pancreatic Stellte Cells. Tohoku J Exp Med 199: 69–84 (2003).

[74] Marra F, Gentilini A, Pinzani M, Choudhury GG, Parola M, Herbst H, Dianzani MU, Laffi G, Abboud HE, Gentilini P: PII: Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Required for Platelet-Derived Growth Factor's Actions on Hepatic Stellate Cells. Gastroenterol 112: 1297–1306 (1997).

[75] Gentilini A, Marra F, Gentilini P, Pinzani M: Phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated kinase mediate the chemotactic and mitogenic effects of insulin-like growth factor-I in human hepatic stellate cells. J Hepatol 32: 227–234 (2000).

[76] van der Valk, J, Brunner D, Smet K de, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G: Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. Toxicol vitro 24: 1053–1063 (2010).

[77] Gao C-C, Gong B-G, Wu J-B, Cheng P-G, Xu H-Y, Song D-K, Li F: MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, promotes apoptosis in human pancreatic cancer. Med Oncol 32: 418 (2015).

[78] Bramhall SR, Schulz, J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JA: A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advaced pancreatic cancer. Br J Cancer 87: 161–167 (2002).

[79] Moore MJ, Hamm J, Dancey J, Eisenberg PD, Dagenais M, Fileds A, Hagan K, Greenberg B, Colwell B, Zee B, Tu D, Ottaway J, Humphrey R, Seymour L: Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinicla Trials Group. J Clin Oncol 21: 3296–32302 (2003).

[80] Thant AA, Sein TT, Liu E, Machida K, Kikkawa F, Koike T, Seiki M, Satoru M, Hamaguchi M: Ras pathway is required for the activation of MMP-2 secretion and for the invasion of src-transformed 3Y1. Oncogene 18: 6555–6563 (1999).

[81] Lou M, Liu Qingyu, He M, Yu Z, Pi R, Li M, Yang X, Wang S, Liu A: Gartanin induces cell cycle arrest and autophagy and suppresses migration involving PI3K/Akt/mTOR and MAPK signalling pathway in human glioma cells. J Cell Mol Med Epub ahead of print (2016).

[82] Binod Kumar, Sweaty Koul, Jane Petersen, Lakshmipathi Khandrika, Jeong S. Hwa, Randall B. Meacham, Shandra Wilson, Hari K. Koul: p38 Mitogen-Activated Protein Kinase–Driven MAPKAPK2 Regulates Invasion of Bladder Cancer by Modulation of MMP-2 and MMP-9 Activity. Cancer res 70: 832–841 (2010).

[83] Pillinger MH, Marjanovic N, Kim S-Y, Scher JU, Izmirly P, Tolani S, Dinsell V, Lee Y-C, Blaser MJ, Abramson SB: Matrix Metalloproteinase Secretion by Gastric Epithelial Cells Is Regulated by E Prostaglandins and MAPKs. J Biol Chem 280: 9973–9979 (2005).

[84] Cheng G, Gao F, Sun X, Bi H, Zhu, Y: Paris saponin VII suppresses osteosarcoma cell migration and invasion by inhibiting MMP-2/9 production via the p38 MAPK signaling pathway. Mol Med Rep 14: 3199–3205 (2016).

[85] Lee YB, Ko KC, Shi MD, Liao YC, Chiang TA, Wu PE, Shih YX, Shih YQ: α-Mangostin, A Novel Dietary Xanthone, Suppresses TPA-Mediated MMP-2 and MMP-9 Expressions through the ERK Signaling Pathway in MCF-7 Human Breast Adenocarcinoma Cells. J Food Sci 75: H13-H23 (2009).

[86] Yuan M, Guo H, Li J, Sui C, Qin Y, Wang, J, Khan, YH, Ye L, Xie F, Wang H, Yuan L, Ye J: Slit2 and Robo1 induce opposing effects on metastasis of hepatocellular carcinoma Sk-hep-1 cells. Int J Oncol 49: 305–315 (2016).

[87] Chang L, Zhao D, Liu HB, Wang QS, Zhang P, Li CL, Du Z, Wang HJ, Liu X, Zhang ZR, Jiang CL: Activation of sonic hedgehog signaling enhances cell migration and invasion by induction of matrix metalloproteinase-2 and -9 via the phosphoinositide-3 kinase/AKT signaling pathway in glioblastoma. Mol Med Rep 12: 6702–6710 (2015).

[88] Tang Y, Lv p, Sun Z, Han L, Zhou W: 14-3-3β Promotes Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Modulating Expression of MMP2 and MMP9 through PI3K/Akt/NF-κB Pathway. PloS one 11: e0146070 (2016).

[89] Mendoza MC, Er EE, Blenis J: The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. Trends Biochem Sci 36: 320–328 (2011).

[90] Schmid-Kotsas A, Gross H-J, Menke A, Weidenbach H, Adler G, Siech M, Beger H, Grünert A, Bachem MG: 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).

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Transfektionseffizienz siRNA 30

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PI3-AKT-Signalweg [45–47] 5
Abbildung 2: hPSC unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Inkubation mit Alexa Fluor 488-markierter siRNA 29
Abbildung 3: Expression der PDPK1 nach Inkubation von hPSC mit siRNA 32
Abbildung 4: Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung von hPSC mit Propidiumiodid (PI) und Bisbenzimid 33
Abbildung 5: Zellviabilität nach Inkubation von hPSC mit GSK2334470 34
Abbildung 6: Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von MIA-SN und GSK ... 37
Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von Akt nach Inkubation mit GSK 40
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Westernblotbanden der Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von verschiedenen Tumorzellüberständen, hPSC-, H6C7- und HUVEC-Überstand und GSK ....**Fehler! Textmarke nicht definiert.**
Abbildung 9: Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von verschiedenen Tumorzellüberständen und GSK 44
Abbildung 10: Phosphorylierung von Akt in Anwesenheit von hPSC-, H6C7- und HUVEC-Überstand und GSK 45
Abbildung 11: hPSC in der Timelapse-Mikroskopie 47
Abbildung 12: Migration von hPSC 47
Abbildung 13: Gesamte Proteinexpression von hPSC 49
Abbildung 14: hPSC: 5-Ethynyl-2′-Deoxyuridin (EdU)-Färbung 50
Abbildung 15: Hemmung der Proliferationsrate von hPSC mittels GSK 50
Abbildung 16: Proliferationsrate von hPSC nach Inkubation mit siRNA 51
Abbildung 17: Expression der Matrixmetalloprotease-2 (MMP-2) 52
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von hPSC: Vimentin, Fibronektin und α-Smooth-Muscle-Aktin 53
Abbildung 19: Expression von Vimentin, Fibronektin und α-Smooth-Muscle-Aktin in hPSC 54
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von hPSC: Kollagen-1 und Kollagen-3 55
Abbildung 21: Expression von Kollagen-1 und Kollagen-3 56

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Groß möchte ich herzlich für die problemlose Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit nach dem plötzlichen Tod von Prof. Dr. med. Dr. troph. Dr. h.c. Max Georg Bachem danken.

Mein größter Dank gilt Dr. Hansjörg Habisch für die großartige Betreuung meiner Doktorarbeit. Für die Vermittlung von Wissen, die Zeit, die Geduld und die vielen guten Ratschläge.

Danken möchte ich außerdem Frau Gisela Sailer, Frau Dr. Shaoxia Zhou, und Frau Dr. Jing Lu, die sich durch ihre große Hilfsbereitschaft auszeichnen.

Meinem Partner, Tobias Mayer, danke ich für den großen Rückhalt, die Motivation und die Kraft.

Mein Dank gilt außerdem meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung während meines Studiums und der Bearbeitung meiner Dissertation.

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt