

Aus der Klinik für Innere Medizin (Gastroenterologie)

Titel der Arbeit:

**Der Einfluss von cis-Hydroxy-L-Prolin (CHP) auf die
Pankreaskarzinom-Zelllinie DSL6A der Ratte**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Christoph Müller
aus Bergisch Gladbach

Rostock, Oktober 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0218-8

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 6

1 Einführung 8

1.1	PANKREASKARZINOM	8
1.2	CIS-4-HYDROXY-L-PROLIN (CHP)	9
1.3	ENDOPLASMATISCHER RETIKULUM (ER)-STRESS	11
1.4	FOCAL ADHESION KINASE (FAK)	12
1.5	ZIEL DER ARBEIT	14

2 Material und Methoden 16

2.1	ZELLKULTUR	16
2.1.1	Verwendete Zelllinien	16
2.1.2	Zellkulturmedium	17
2.2	ANZUCHT DER ZELLEN	17
2.2.1	Allgemeine Arbeitsbedingungen	17
2.2.2	Arbeitsablauf	17
2.2.3	Zellzahlbestimmung	18
2.2.4	Kultivierung der Zellen in Suspension	18
2.2.5	CHP- und Prolin-Stammlösungen	19
2.3	UNTERSUCHUNG DER ZELLPROLIFERATION	19
2.3.1	Auswahl der Methode und Prinzip des BrdU-ELISA	19
2.3.2	Ansatz und Inkubation mit CHP	19
2.3.3	Durchführung des BrdU-ELISA	20
2.4	ZELL-VITALITÄTSTEST	20
2.5	NACHWEIS VON APOTOSE	20
2.5.1	Nachweis der Degradation genomicscher DNA	20
2.5.2	Nachweis von PARP-Degradation und Caspase3-Aktivierung	21
2.6	REVERSE TRANSKRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)	21
2.6.1	Allgemeines Prinzip der RT-PCR	21
2.6.2	Ansatz der Versuche und Gewinnung der RNA	22
2.6.3	RT	22
2.6.4	PCR	22
2.6.5	Arbeitsablauf PCR und Gelelektrophorese	23
2.7	WESTERN-BLOT	23
2.7.1	Prinzip des Western Blot	23
2.7.1.1	Gewinnung der Proteine	24
2.7.1.2	Ansetzen der Gele, Elektrophorese und Blotten:	24
2.7.2	Inkubation mit Antikörper	24
2.7.3	Entwickeln und Re-Probing:	25
2.8	IMMUNFLUORESZENZ	25
2.8.1	Allgemeines Prinzip	25
2.8.2	Ansatz und Durchführung	25
2.9	ELECTRO MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)	26
2.9.1	Herstellung von Kernextrakten	26
2.9.2	Markierung mit ³² P und Bindungsreaktion	27
2.9.3	Elektrophorese:	27
2.10	ANALYSE DER ERGEBNISSE	28

3 Ergebnisse 29

3.1	DSL6A-ZELLEN	29
3.1.1	CHP induzierte morphologische Veränderung der DSL6A Zellen	29
3.1.2	Wirkung von CHP auf Proliferation und Überleben der Zellen	30
3.1.3	Einfluss auf mRNA-Expression von Kollagen und HSP47	33
3.1.4	Einfluss auf die Expression der ER-Stress Proteine GRP78 und GADD153	34

3.1.5	<i>Reversibilität der CHP-Effekte</i>	35
3.1.6	<i>Einfluss auf NF-κB</i>	37
3.1.7	<i>Einfluss von CHP auf focal adhesion kinase (FAK)</i>	37
3.1.8	<i>Einfluss von CHP auf FAK-Lokalisation</i>	39
3.1.9	<i>Einfluss von CHP auf Apoptose</i>	40
3.1.10	<i>Verlust der Adhärenz und Überleben</i>	42
3.2	HUMANE KARZINOM-ZELLINNEN	44
3.3	PANKREATISCHE STELLATE-ZELLEN	48
4	Diskussion	51
4.1	DSL6A-ZELLEN	51
4.1.1	<i>Wachstumshemmung und Adhärenzverlust</i>	51
4.1.2	<i>Kollagensynthese und Induktion von HSP47</i>	52
4.1.3	<i>ER-Stress</i>	53
4.1.4	<i>Reversibilität</i>	54
4.1.5	<i>FAK-Proteolyse</i>	55
4.1.6	<i>ER-Stress: Zelltod-Induktion</i>	58
4.1.7	<i>ER-Stress: Aktivierung von Proteasen</i>	59
4.1.8	<i>Modell der CHP-induzierten Signalkaskade bei DSL6A-Zellen</i>	60
4.2	HUMANE KARZINOMZELLEN	62
4.3	PANKREATISCHE STELLATE-ZELLEN	63
4.4	KÜNSTLIGE FRAGESTELLUNGEN	64
5	Zusammenfassung	65
6	Thesen	67
7	Literatur	70
8	Anhang	85
8.1	HERKUNFT DER MATERIALEN	85
8.1.1	<i>Basismaterialien</i>	85
8.1.2	<i>Antikörper</i>	86
8.1.3	<i>Kits</i>	87
8.2	LÖSUNGEN, PUFFER UND HERSTELLUNG DER REAKTIONSGEMISCHE	87
8.2.1	<i>RT-PCR</i>	87
8.2.2	<i>Western-Blot</i>	89
8.2.3	<i>Electro Mobility Shift Asssay (EMSA)</i>	91
9	Veröffentlichungen:	93
10	Danksagung	94
11	Curriculum vitae	95
12	Selbstständigkeitserklärung	96

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-bromo-2'-desoxyuridine
BSA	Bovine serum albumine
cDNA	complementary DNA
CHP	cis-4-Hydroxy-L-Prolin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dC	Desoxycytidin
dI	Desoxyinosin
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphoshat
dT	Thymidin
DTT	Dithiothreithol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay
EMSA	Electro Mobility Shift Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAK	Focal adhesion kinase
FKS	Fetales Kälberserum
FRNK	FAK-related non kinase
GADD153	Growth arrest and DNA damage 153
GRP78	Glucose related protein 78

Abkürzungsverzeichnis

HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
KF	Kontrollfragment
kD	Kilo-Dalton
mRNA	Messenger RNA
NP40	Nonidet P40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
RNA	Ribonucleinacid
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Taq	Thermus aquaticus
TBS	TRIS buffered saline
TE	TRIS-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiaamin
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate
UV	Ultraviolett
zDEVD-fmk	benzyloxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylketone

1 Einführung

1.1 **Pankreaskarzinom**

Das Pankreaskarzinom gehört neben den kolorektalen Karzinomen zu den häufigsten Neoplasien des Gastrointestinaltraktes. Bei den tumorbedingten, organbezogenen Todesursachen der westlichen Industrieländer liegt das Pankreaskarzinom an vierter Stelle. Die Inzidenz liegt bei ca. 10/100000 pro Jahr¹. Dabei sind Inzidenz und Mortalitätsrate fast identisch, womit die außerordentlich schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms gekennzeichnet wird.

Da Frühsymptome oft fehlen, werden die meisten Karzinome für eine kurative Resektion zu spät diagnostiziert. Trotz Verbesserung palliativer Maßnahmen hinsichtlich der Chemotherapie und chirurgischer Intervention zu Erhöhung der Lebensqualität bleibt die Situation unbefriedigend. So liegt bei nicht-operablen Karzinomen die 5-Jahres-Überlebensrate bei unter 5% mit einer medianen Überlebenszeit von 4-10 Monaten. Aktuell gilt Gemcitabine als Chemotherapeutikum der ersten Wahl, wobei kürzlich die Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib zugelassen wurde. Auch mit Capecitabine konnte eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden²⁻⁵.

Als Risikofaktor für die Entstehung des Pankreaskarzinoms gelten die chronische Pankreatitis, Nikotinabusus, Alkoholabusus, die Exposition gegenüber chemischen Noxen sowie eine familiäre Disposition¹.

Die Mehrzahl der Pankreaskarzinome sind Adenokarzinome duktalen Phänotyps, die mit ihrer atypischen Drüsenformation die mittelgroßen und kleinen Pankreasgänge imitieren. Überwiegend sind diese Karzinome im Pankreaskopf lokalisiert. Sie zeichnen sich durch hohe Resistenz gegen Chemotherapeutika und frühe lokale Invasion bzw. Metastasierung aus⁶.

Ätiologie und Pathogenese des Pankreaskarzinoms sind weiterhin unbekannt. Ähnlich zur Adenom-Karzinom-Sequenz beim Kolonkarzinom wird beim Pankreaskarzinom eine Tumorprogression vom Normalgewebe über präneoplastische Gangläsionen [sogenannte pankreatische intraduktale Neoplasien, (PanINs)] zum duktalen Adenokarzinom angenommen. Hierbei soll es zur Akkumulation verschiedener Genmutationen kommen, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen wie p53, DPC und p16 sowie zur Aktivierung von Onkogenen wie K-ras führen. Hierbei zeigt das Pankreaskarzinom eine starke intratumorale genetische Heterogenität. Zusätzlich zeichnet sich das Pankreaskarzinom allgemein durch genetische Instabilität aus, die sich in Aneuploidie sowie komplexem zytogenetischen Rearrangement widerspiegelt. Genetische Heterogenität sowie Instabilität werden für die hohe Therapieresistenz des Pankreaskarzinoms verantwortlich gemacht. Weiterhin kommt es während der Karzinomentwicklung zur Verkürzung der Telomere, wodurch ein chromosomales Rearrangement gefördert wird. Im späteren Stadium ist eine Reaktivierung der Telomerase essentiell für die Entstehung von immortalisierten Zellen⁷.

Als ein weiterer, neuer Aspekt der Pathogenese werden Mutationen bzw. Missregulationen im Hedgehog-Signalweg sowie im Notch-Signalweg diskutiert, beides essentielle Signalwege für die normale, embryonale Entwicklung des Pankreas^{8,9}. Veränderungen in diesen Signalwegen sollen so für die Initiierung und Aufrechterhaltung des Pankreaskarzinoms eine kritische Rolle spielen^{10,11}.

Weiterhin ungeklärt ist die Frage, welcher Zelltyp als Ursprung des Adenokarzinoms anzusehen ist. Da die verschiedenen Zelltypen des Pankreas, d.h. duktale Zellen, Azinus-Zellen und endokrine Zellen, ein hohes Transdifferenzierungspotential besitzen, kommen diese Zelltypen als Ursprung der Karzinomentstehung in Frage^{7,12,13}. Zusätzlich deuten neuere

Studien auf die Bedeutung von multipotenten Stammzellen innerhalb des adulten Pankreas bei der Karzinogenese hin. Diese Stammzellen sollen normalerweise der begrenzten Regeneration des Pankreas bzw. dem Turnover der endokrinen Inselzellen dienen¹²⁻¹⁵.

1.2 Cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP)

Cis-Hydroxy-L-Prolin (CHP) ist ein natürlich vorkommendes Analogon von Prolin, das sich z.B. in *Santalum album* (Sandalholz) Arten findet^{16,17}. Außerdem ist es Bestandteil von Phalloidin und der meisten anderen Phallotoxine. Diese Gruppe cyclischer Heptapeptide wird z.B. von *Amanita phalloides* (Grüner Knollenblätterpilz) produziert¹⁸.

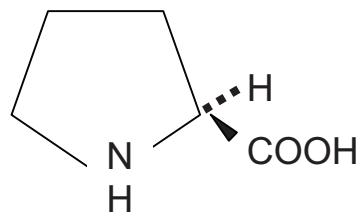
CHP ist ein Stereoisomer des in tierischen Proteinen normalerweise enthalten trans-4-Hydroxy-L-Proline (THP), bei dem sich die Hydroxygruppe in 4R-Stellung befindet, bei CHP in 4S-Stellung¹⁹ (Abb.1.1).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CHP statt Prolin in neu entstehende Proteine eingebaut wird²⁰. Dies wurde vor allem für Kollagen beschrieben, ein Protein mit einem hohen Prolin- und Hydroxyprolin-Anteil. In der Zelle wird Prolin jedoch erst posttranslational zu THP hydroxyliert.

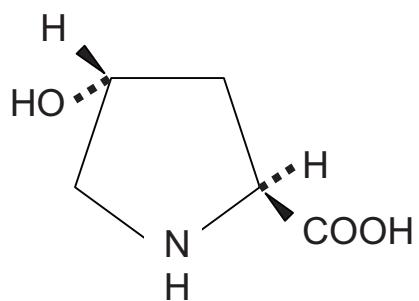
Tierische Aminoacyl-tRNA-Synthetasen können nicht zwischen Prolin und CHP unterscheiden, so dass CHP eingebaut werden kann. Dieser CHP-Einbau als Ersatz für Prolin stört die Faltung der Prokollagen-Ketten und damit die Ausbildung der korrekten Raumstruktur mit der typischen Triplehelix. Dieses falschgefaltete Prokollagen wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten. So kommt es zur Hemmung der Kollagensynthese²⁰⁻²².

Untersuchungen zur biologischen Wirkung zeigten, dass CHP auch hemmende Effekte auf Proliferation, Adhäsion und Migration verschiedener Zelltypen hat. Dies wurde für Fibroblasten, Epithelzellen, Karzinomzellen und auch im Tiermodell beschrieben²³⁻²⁵. Im Gegensatz dazu beobachteten Tan et al. keine oder sogar ein proliferationsfördernde Wirkung auf Tumore²⁶.

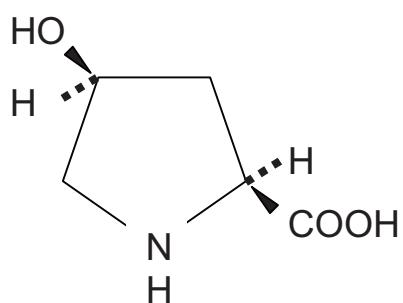
Gemeinsam war früheren Arbeiten trotz unterschiedlicher Resultate jedoch, dass die biologischen Effekte von CHP ausschließlich auf die Hemmung der Kollagensynthese zurückgeführt wurden. Weitergehende Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen waren zu dieser Zeit noch nicht möglich bzw. erfolgten nicht.



L-Prolin
(*(2S)*-Pyrrolidin-2-carbonsäure)



trans-4-Hydroxy-L-Prolin (THP)
(*(2S,4R)*-4-Hydroxypyrrolidin-2-carbonsäure)



cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP)
(*(2S,4S)*-4-Hydroxypyrrolidin-2-carbonsäure)

Abbildung 1.1 Struktur von L-Prolin und der Stereoisomere von 4-Hydroxy-L-Prolin (nach ¹⁹).

1.3 Endoplasmatischer Retikulum (ER)-Stress

Das endoplasmatische Retikulum (ER) dient als Ort der Synthese, Faltung und Modifikation von Proteinen. Weiterhin ist es wichtiger intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher mit Einfluss auf Ca^{2+} -abhängige Signalwege²⁷⁻²⁹.

Störungen der ER-Homeostase und damit der ER-Funktionen werden gemeinsam unter dem Begriff ER-Stress zusammengefasst²⁷. ER-Stress kann dabei durch vielfältige Faktoren ausgelöst werden, zum Beispiel durch Störungen im Ca^{2+} - oder Glukose-Haushalt sowie durch Veränderungen der Proteinsynthese. Eine durch Hemmstoffe wie Tunicamycin veränderte Glykolysestörung stört die Ausbildung der korrekten Raumstruktur. Dies führt zu Anhäufung von falschgefalteten Proteinen und so zur Auslösung von ER-Stress^{27,30}.

Die Zelle reagiert unter einer Stress-Situation mit der so genannten *ER-stress response*. Im Rahmen dieser Reaktion kommt es zu einer Aktivierung von verschiedenen Signalwegen.

Das gemeinsame Ziel dieser Wege ist es, zu verhindern, dass falschgefaltete, unphysiologische Proteine die Zelle verlassen. Entweder beheben diese Korrekturmechanismen den Schaden und sichern damit das Überleben der Zelle oder sie induzieren den Tod der Zelle. Im Verlauf des ER-Stress werden dazu eine Reihe pro- und anti-apoptotischer Faktoren aktiviert. Letztlich entscheidet das relative Überwiegen einer Gruppe dieser Faktoren über das Schicksal der Zelle (Abb.1.2)^{27,31-33}.

Durch ER-Stress aktivierte Signalwege sind z.B. die *unfolded protein response* (UPR) und die *ER overload response* (EOR).

Im Rahmen des UPR kommt es sowohl zur Induktion des Chaperon *glucose regulated protein* (GRP)78 als auch des pro-apoptotisch wirksamen *growth arrest and DNA damage inducible* (GADD)153 Faktors. GRP78 dient als Faltungshelferprotein (Chaperon) dazu, falschgefaltete Proteine zu binden und im ER zurückzuhalten. Der Anstieg von GRP78 während des ER-Stress erhöht die Faltungskapazität des ER und soll so helfen, der Zelle das Überleben zu sichern^{34,35}. Eine ähnliche Funktion erfüllt die Induktion von Enzymen wie der *protein disulfid isomerase* (PDI) oder ER-Strukturkomponenten wie der *sarcoplasmic ER CA²⁺-ATPase* (SERCA)2³⁶.

Die Herabregulation der Translation durch Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 α reduziert die Neusynthese von Proteinen und verhindert damit die weitere Akkumulation falschgefalteter Proteine, welche das ER belasten. Zusätzlich wird auch die Synthese von Aminosäure (AS)-Transportern, von Gluthathion und verschiedenen, anderen protektiven Faktoren erhöht³¹.

GRP78 wirkt außerdem als eine Art Sensor; nach Bindung an falschgefaltete Proteine löst es verschiedene Signalwege aus, die vor allem anti-apoptotische Wirkung haben sollen.

Im weiteren Verlauf des ER-Stress werden zum Überleben der Zelle auch Komponenten des *ER-associated degradation* (ERAD) Systems verstärkt exprimiert, um so die strukturell veränderten Proteine im ER mit Hilfe des Ubiquitin-Proteasom-Systems abzubauen³¹.

Die EOR ist ein weiterer Signalweg, der in Folge eines ER-Stress aktiviert wird. Unter anderem kommt es zur NF- κ B Aktivierung, die ebenfalls anti-apoptotisch wirken soll^{27,37,38}.

Zu den proapoptotischen Faktoren gehört hingegen GADD153 sowie die Aktivierung des cJUN NH2-terminal kinase (JNK)-Signalwegs^{39,40}. Die Aktivierung der Caspase-Kaskade durch prolongierten ER-Stress wurde ebenfalls beschrieben^{41,42}.

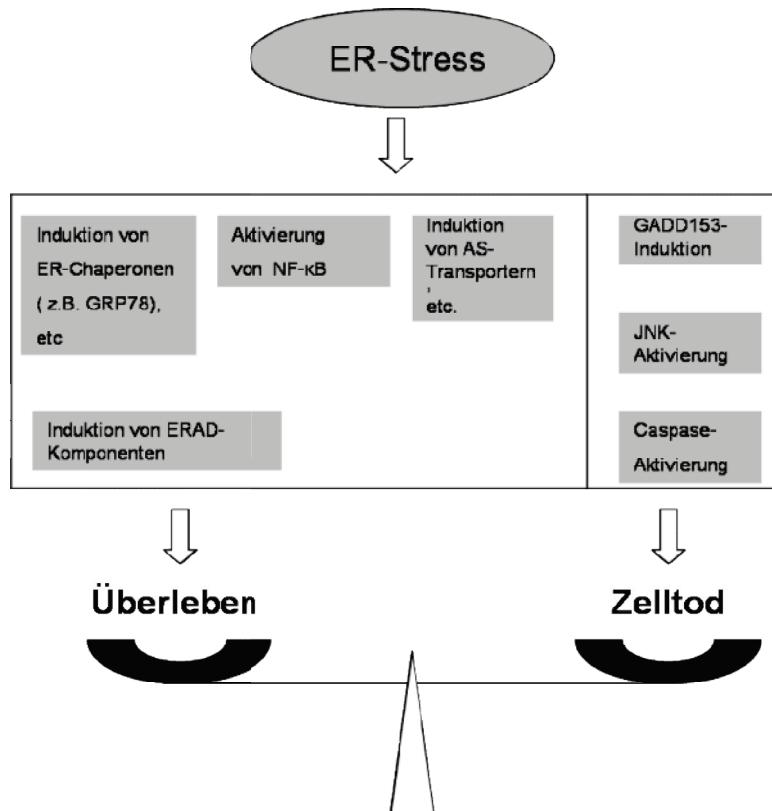


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des *ER-stress response* und seine Auswirkung auf das Schicksal der Zelle (nach³⁹).

1.4 Focal adhesion kinase (FAK)

Die *focal adhesion kinase* (FAK) ist eine 125 kD Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase. Das Enzym wird durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Als Aktivatoren können Wachstumsfaktoren und die Bindung der Zelle an die extrazelluläre Matrix (EZM) dienen. Entsprechend liegt die FAK in adhärenten Zellen als aktivierte, d.h. tyrosin-phosphoryliertes Protein vor. Dabei ist die FAK in Bereichen der Interaktion von Integrinen und Zytoskelett mit der EZM, sogenannten *focal adhesion* oder auch *focal contacts*, lokalisiert (Abb.1.3)⁴³⁻⁴⁵. Phosphorylierte FAK bildet Komplexe mit Kinasen der Src-Familie und anderen Kinasen. Es folgt die Aktivierung von verschiedenen, komplexen Signalwegen. Diese sind an Zellproliferation und – überleben beteiligt⁴⁶.

Weiterhin ist die FAK infolge ihrer Aktivität als Kinase und als Adapterprotein an der Regulation des *Turnovers* von *focal adhesions* und damit der Migration der Zelle beteiligt. In diesem Zusammenhang scheint die Modulation der Aktivität von GTPasen wie RhoA oder Rac durch FAK eine wesentliche Rolle zu spielen. Nach Hsia et al unterscheiden sich dabei die durch FAK aktivierte Signalwege im Rahmen normaler Zellmigration von denen bei Invasion von Karzinomzellen⁴⁷.

Sowohl in Präkanzerosen als auch in Karzinomen mit invasivem Phänotyp und starker Metastasierungsrate ist FAK oft überexprimiert und stark phosphoryliert⁴⁸⁻⁵⁰.

Die Interaktionen der FAK mit bekannten Onkogenen wie Src,Crk, PI3 Kinase unterstützen die Bedeutung von FAK in Zusammenhang mit der Tumor-Pathogenese⁴⁸.

Darüber hinaus beeinflussen von FAK ausgehende Signalwege positiv die Expression der *matrix metalloproteinase* (MMP)9, welche durch Degradation der Basalmembran die Invasion von Karzinomzellen begünstigt^{48,51}. Diese Befunde weisen auf die Bedeutung der FAK für Wachstum, Invasion und Metastasierung von Karzinomen hin^{52,53}.

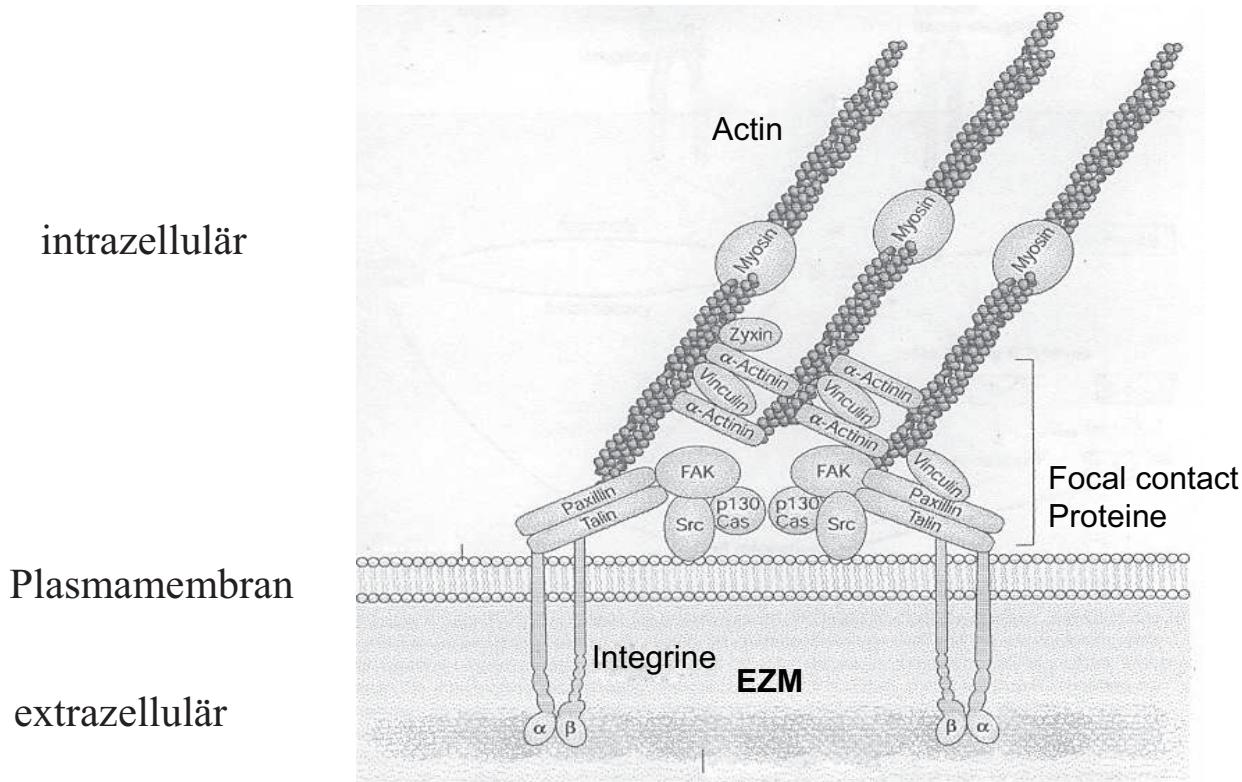


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des *focal adhesion*-Aufbaus (nach⁴⁵).

Die Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Matrix (EZM) findet in speziellen Bereichen, sogenannten *focal adhesions* oder *focal contacts*, statt. Diese bilden sich aus Integrin-Clustern, Struktur-, Signal- und Zytoskelettproteinen. Das Adapterprotein p130Cas und die Kinase Src sind nach Bindung an FAK an der Regulation verschiedener, komplexer Signalwege beteiligt. Hierbei spielen auch verschiedene, kleine GTPase Proteine wie Ras, Rho und Rac eine Rolle. Der genaue Aufbau der *focal adhesions* ist dynamisch und auch vom Zelltyp abhängig.

Die Inaktivierung der FAK erfolgt durch Bindung anderer zellulärer Proteine wie *FAK-interacting protein* (FIP)200 und Protein-Tyrosinphosphatasen. Die Möglichkeit einer proteolytischen Inaktivierung der FAK durch Caspase oder auch Calpain wurde ebenso beschrieben^{45,54-56}. Durch FAK-Proteolyse scheint auch die Bildung der *FAK-related non-kinase* (FRNK; p41/p43) möglich⁵⁷, einer nicht-katalytischen Domäne der FAK, die selbst eine FAK-Inaktivierung bewirkt und sonst durch einen alternativen Promoter und Startpunkt reguliert wird.

1.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund der unbefriedigenden therapeutischen Möglichkeiten und der schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms ist eine intensive Suche nach alternativen Behandlungsstrategien erforderlich. Hier könnte die zelluläre Proteinbiosynthese Angriffsziele bieten. Ein histologisches Charakteristikum der Adenokarzinome des Pankreas ist die Desmoplasie, eine Reaktion des Bindegewebes mit starker Kollagenvermehrung, die auch in einigen anderen Tumoren wie Mamma- und Prostatakarzinom beobachtet wird^{6,58,59}.

Es zeigen sich vermehrt Hinweise, dass das juxtatumorale Stroma ein Produkt sowohl neoplastischer als auch nicht-neoplastischer Zellen ist. Als nicht-neoplastische Zellen spielen hier vor allem myofibroblastäre Zellen wie pankreatische Stellatezellen (PSZ) eine Rolle, die für den Hauptanteil der Bindegewebsproduktion verantwortlich sind. Trotz weiterhin kontroverser Diskussion zeigen mehrere Arbeiten, dass das Stroma zum Tumorwachstum beiträgt. Hierbei soll es als Wachstumsfaktor-Reservoir, Barriere gegen das Immunsystem und Stimulator der Angiogenese dienen. Weiterhin scheint das Tumor-Stroma auch an der Induktion der Chemoresistenz beteiligt zu sein⁶⁰. Diese Barrierefunktion könnte auch für zukünftige Therapieansätze wie Gen- und Immuntherapie ein ernsthaftes Hindernis darstellen^{7,61,62}. Außerdem scheinen die Stromazellen über die von ihnen produzierten Wachstumsfaktoren direkt das Tumorwachstum zu fördern^{7,58,62}. Als an der Stromareaktion beteiligte Faktoren sind z.B. *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* (TGF) und *insulin like growth factor* (IGF) bekannt⁷.

Vor diesem Hintergrund könnte CHP eine neue Therapiestrategie des Pankreaskarzinoms darstellen. Die Hemmung der Kollagensynthese durch CHP ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden. Darüber hinaus konnte auch eine Wachstumshemmung von Fibroblasten und Karzinomzellen durch CHP nachgewiesen werden. Die Untersuchungen beschränkten sich jedoch auf die biologischen Effekte von CHP.

Als Erklärung der Wachstumshemmung von Zellen wurde bisher ausschließlich die Hemmung der Kollagensynthese angesehen. Das somit fehlende Substrat für eine Zelladhäsion sollte für die Wachstumshemmung verantwortlich sein. Weitere Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der CHP-Effekte wurden in den vergangenen Jahren nicht durchgeführt. Außerdem fanden alle Versuche an nicht-pankreatischen Zellen statt. Der Einfluss von CHP auf Zellen des Pankreas ist somit bislang unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der biologischen Effekte von CHP auf verschiedene Zell-Populationen des Pankreas. Dabei erfolgte die Analyse der Wirkung von CHP auf Zellproliferation, Überleben und Apoptose.

Weiterhin sollten die molekularen Mechanismen der CHP-Wirkung untersucht werden. Da bekannt war, dass CHP die korrekte Faltung von Proteinen stört, wurde die Untersuchung einer möglichen Auslösung von ER-Stress durch CHP einbezogen.

Aufgrund der in früheren Arbeiten beobachteten Hemmung der Zelladhäsion ließ sich vermuten, dass hier molekulare Ursachen der CHP-Effekte zu finden sind. So wurde auch auf eine Beteiligung der *focal adhesion kinase* (FAK) untersucht, einem an der Zelladhäsion wesentlich beteiligten Enzym.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Pankreaskarzinom-Zelllinie der Ratte DSL6A. Diese Zelllinie wurde gewählt, da sie im Tiermodell zur Etablierung eines Pankreaskarzinoms gut geeignet ist. So würden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an der Zellkultur als Grundlage für die Forschung am Tiermodell zur Verfügung stehen.

Da sich Ergebnisse von Versuchen an tierischen und humanen Zellen oft unterscheiden, wurde die Wirkung von CHP auch auf humane Pankreaskarzinom-Zelllinien untersucht. Neben den zellbiologischen Effekten standen hierbei die molekularen Mechanismen im Mittelpunkt des Interesses.

Wie oben beschrieben, kommt auch der Hemmung der Stromasynthese bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms eine mögliche Bedeutung zu. Aus diesem Grund wurden primäre pankreatische Stellatezellen (PSZ) sowie immortalisierte pankreatischen Stellatezelllinien in die Untersuchungen einbezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die Untersuchung der Wirkung von CHP wurde eine Tumorzelllinie der Ratte, DSL6A, sowie primäre (PSZ) und immortalisierte (LTZ14) Stellate-Zellen des Rattenpankreas gewählt. Zusätzlich dienten humane Adenokarzinom-Zelllinien (Capan2, Panc1, MiaPaCa) des Pankreas als Vergleich. In Tabelle 2.1 sind die Charakteristika der Zellen und Zelllinien dargestellt.

Tab. 2.1 Charakteristika der verwendeten Zellen.

DSL6A	DSL6A/C1-Zellen (ATCC CRL-2132) ¹ . Ursprünglich von einem Azaserin-induzierten Azinuszellkarzinom des Rattenpankreas stammend; durch Langzeit-Kultivierung verloren diese ihren azinären Phänotyp und erlangten duktale Charakteristika ^{63,64} .
PSZ	Primäre pankreatische Stellate-Zellen der Ratte. Die Isolation dieser Zellen erfolgte aus männlichen Lewis-Ratten durch enzymatische Vereinzelung der Pankreaszellen und anschließender Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Kultivierung der Zellen führt zur ihrer Aktivierung mit z.B. erhöhter Kollagenproduktion ^{65,66} .
LTZ14	Immortalisierung von PSZ 14 Tage nach Isolierung aus dem Rattenpankreas mittels retroviralem Gentransfer von SV40 largeT-Antigen. Morphologische und funktionelle Eigenschaften entsprechen denen aktiverter PSZs ⁶⁷ .
Capan2	Humane Adenokarzinom-Zelllinie des Pankreas (ATCC HTB-80) ¹ . Aus einem Pankreas-Primärtumor gewonnen, Differenzierungsgrad G1, Mutation von K-ras und p16 ^{68,69} .
Panc1	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1469) ¹ . Aus einem Pankreas-Primärtumor gewonnen, Differenzierungsgrad G3, Mutation von K-ras, p53 und p16 ^{68,69} .
MiaPaCa2	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1420) ¹ . Aus einem Pankreas-Primärtumor gewonnen, Differenzierungsgrad G3, Mutation von K-ras, p53 und p16 ^{68,69} .

¹ Angabe der American Type Culture Collection (ATCC)- Katalog-Nummer. Weitere Angaben zu den Zellen: <http://www.lgcromochem.com/atcc/>

2.1.2 Zellkulturmedium

Alle verwendeten Tumor-Zelllinien wurden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) kultiviert. Für die Zellkultur der pankreatischen Stellate-Zellen (PSZ und LTZ) wurde *Iscove's modified Dulbecco medium* (IMDM) verwendet.

Da IMDM L-Prolin enthält - nach Zugabe nicht-essentieller Aminosäuren etwa 0,45mM-, musste für die CHP-Experimente ausschließlich L-Prolin freies DMEM verwendet werden.

Den Medien wurden hinzugefügt:

- Antibiotika: Penicillin 100U /ml, Streptomycin 100 μ g/ml
- 10% fetales Kälberserum (FKS)

Für einige Versuche mit den Karzinom-Zelllinien wurde auf den Zusatz von FKS verzichtet, um eventuell störende Einflüsse des FKS auf die Signaltransduktion auszuschließen.

Vor Gebrauch wurde das Serum im 56°C warmen Wasserbad für 30 Minuten inkubiert, um das Komplementsystem zu inaktivieren.

2.2 Anzucht der Zellen

2.2.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen

Sterilität:

- Alle Arbeiten mit den Zellen wurden an einer Reinraumwerkbank [LaminAir, Heraeus Instruments, Hanau] durchgeführt
- Zellkulturmedien und – gefäße wurden steril geliefert
- Autoklavieren der verwendeten Pipettenspitzen
- Filtration der verwendeten Stammlösungen mit 0,2 μ m Filter

Das Zentrifugieren der Zellsuspensionen erfolgte bei 700g für 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank [Heraus Instruments] gehalten.

2.2.2 Arbeitsablauf

Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigen Stickstoff. Nach dem Auftauen der entsprechenden Zellprobe im Wasserbad bei 37°C wurde langsam und tropfenweise das Zellkulturmedium zugegeben, um so die allmähliche Diffusion des Gefrierschutzmittels DMSO aus den Zellen zu ermöglichen. Nach Zentrifugation der Zellen und anschließendem Verwerfen des Mediums wurde das Zellpellet in frischen Kulturmedium resuspendiert und auf zwei 5ml Zellkulturflaschen verteilt. Am folgenden Tag erfolgte ein Wechsel des

Material und Methoden

Mediums, um tote, nicht adhärente Zellen sowie mögliche Reste des Einfriermediums zu entfernen.

Konfluente Zellrasen wurden so lange in größere Zellkulturflaschen umgesetzt, bis eine ausreichende Anzahl zur Einsaat in Zellkulturplatten oder -schalen vorhanden war.

Zum Ablösen der adhärenen Zellen wurden diese nach Entfernen des Mediums und Spülen mit PBS mit 0,1%-Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet. Nach etwa 5-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und mikroskopischer Kontrolle der Ablösung wurden die Zellen in Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und in das für den jeweiligen Versuch bzw. Weiterkultivierung entsprechende Kulturgefäß eingesetzt.

Neben der Anzucht der Zellen für Versuche wurde ein Teil der Zellen nach etwa 3-6 Passagen wieder eingefroren, um jeweils ein genügend großen Vorrat zu Verfügung zu haben. Dazu wurde aus einer konfluent bewachsenen Kulturflasche wie oben beschrieben eine Zellsuspension gewonnen und das Pellet nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes in Einfriermedium (15% DMSO - FKS) resuspendiert. Diese Suspension wurde in Kryoröhrchen aufgeteilt und langsam eingefroren. Danach folgte die endgültige Lagerung der Proben in flüssigem Stickstoff (-196°C).

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach Zusatz von 4% Trypanblau-Lösung. Dieser Farbstoff ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Die intakte Zellmembran lebender Zellen verhindert die Farbstoffaufnahme, tote Zellen färben sich blau.

Ein Teil der Zellen wurde vor der Einsaat 1:10 vorverdünnt, danach in Trypanblau 1:4 verdünnt. Die Zellzahl wurde nun mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Dabei entsprach die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension der Anzahl von Zellen in vier großen Quadranten der Kammer multipliziert mit dem Faktor der Vorverdünnung, d.h. 10, und dem Faktor 5000.

Berechnung: Anzahl Zellen in vier großen Quadranten x 10 (Vorverdünnung) x 5000

2.2.4 Kultivierung der Zellen in Suspension

Um Karzinom-Zellen in Suspension zu halten, wurden die entsprechenden Kulturplatten vor der Einsaat mit 2% Agarose beschichtet, um ein Anheften der Zellen zu verhindern⁷⁰. Dazu mußte die entsprechende Menge Agarose in PBS aufgenommen, gekocht und mittels Pipette vorsichtig aufgetragen werden. Nach Aushärten der Agarose erfolgte die Einsaat der Zellen wie oben beschrieben, wobei immer DMEM mit 10% FKS (im folgenden DMEM 10% FKS) als Kulturmedium diente.

2.2.5 CHP- und Prolin-Stammlösungen

CHP und L-Prolin wurden als sterile 1M Stammlösung in PBS bei -20°C aufbewahrt.

2.3 Untersuchung der Zellproliferation

2.3.1 Auswahl der Methode und Prinzip des BrdU-ELISA

Zur Messung der Zellproliferation wurde der *BrdU-labelling Cell Proliferation ELISA Kit* [Roche, Mannheim] verwendet. Ein Vorteil dieser Methode lag darin, dass sie im Gegensatz zur Messung von ^3H -Thymidin nicht radioaktiv war.

Die Methode basiert auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogon 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) statt Thymidin in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen. Das eingegebene BrdU wird schließlich durch *enzyme linked immunoabsorbent assay* (ELISA) nachgewiesen. Dazu dient ein mit Peroxidase gekoppelter Antikörper, der an die vorher denaturierte, BrdU-haltige DNA der fixierten Zellen bindet. Durch das an den Antikörper gekoppelte Enzym Peroxidase wird der Nachweis der an BrdU gebundenen Antikörper-Menge möglich. Substratzugabe (Tetramethylbenzidin) führt zu Farbveränderung, die spektrophotometrisch gemessen wird. Dabei ist die Farbintensität direkt proportional zum BrdU-Einbau.

2.3.2 Ansatz und Inkubation mit CHP

Zunächst wurden die Zellen passagiert und mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung gezählt. Eine 96-well-Platte (100 μl Medium/ well) wurde mit 1×10^4 Zellen/well (DSL6A, Capan2, PSZ) bzw. 3×10^3 Zellen/well (LTZ14) eingesät. Die Zellen wurden einen Tag nach der Einsaat mit CHP inkubiert. Die Zugabe von CHP erfolgte je nach Versuchsaufbau direkt aus der 1M Stammlösung oder aus einer Verdünnungsreihe.

Außerdem wurden als Kontrolle unbehandelte Zellen, d.h. nur Zugabe von 100 μl Medium / Well, genutzt. Zur Bestimmung des Hintergrundes des Assays dienten Randwells, die ohne Zellen zu enthalten mit 100 μl Medium gefüllt und bei dem ELISA mitgeführt wurden. Alle restlichen Randwells wurden mit 100 μl PBS gefüllt.

Je nach Versuchsaufbau dienten als Zellkulturmedium DMEM mit oder ohne 10% FKS.

2.3.3 Durchführung des BrdU-ELISA

Die BrdU-Zugabe erfolgte aus einer Stammlösung. Nach einer 1:100 Verdünnung wurden aus dieser Lösung dann 10 μ l /well zugegeben, entsprechend einer 1:1000 Gesamtverdünnung. Die BrdU-Zugabe erfolgte zeitlich so, dass die Zellen 20 Stunden mit BrdU inkubiert waren.

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde die 96-well-Platte 10 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert und das Medium entfernt. Durch die Zentrifugation wurden auch abgelöste, aber noch vitale Zellen in den Versuch miteinbezogen, um größere Zellzahlunterschiede zwischen Kontrolle und behandelten Proben zu vermeiden. Nach 15-minütiger Trocknung erfolgte das Fixieren der Zellen und die Zugabe von 100 μ l Antikörper-Lösung pro Well. Schließlich wurde die Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Danach wurden die Wells dreimal mit Waschlösung gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe der Substratlösung und nach Erreichen genügender Farbentwicklung (blau) die weitere Zugabe von 25 μ l 2N Schwefelsäure. So wurde ein Farbumschlag (gelb) erreicht, was die Messung im ELISA-Reader (Multiwell-Spektrophotometer) bei 450nm ermöglicht.

2.4 Zell-Vitalitätstest

Zur Bestimmung der Anzahl metabolisch aktiver und damit lebender Zellen wurde der *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* [Promega, Mannheim] benutzt. Der Test basiert auf der Umwandlung des Tetrazolium-Salzes MTS zu Formazan durch Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen. Die entstandene Formazan-Menge lässt sich durch Messung der Absorption bei 490nm spektrophotometrisch bestimmen und ist direkt proportional zu Anzahl lebender Zellen.

Die Testdurchführung entsprach dem für den BrdU-ELISA beschrieben Ansatz. Den Zellen auf der 96-well-Platte wurde 20 μ l der CellTiter-Lösung zum Medium hinzugefügt. Nach 4 Stunden Inkubation mit der CellTiter-Lösung im Zellkultur-Brutschrank wurde nun die Farbveränderung wie oben beschrieben gemessen.

2.5 Nachweis von Apoptose

2.5.1 Nachweis der Degradation genomicscher DNA

Im Gegensatz zur Nekrose kommt es während der Apoptose zu einem organisierten Ablauf des Zelltods. Endonuklease-Aktivierung im Rahmen der Apoptose führt zur Degradation der genomicschen DNA in Multimere von etwa 200bp⁷¹. Diese entstehen, da die 180-200bp DNA um den Histon-Komplex vor dem Nuklease-Abbau geschützt sind. In der Gelelektrophorese sind diese Multimere charakteristischer Größe als so genannte DNA-Leiter nachweisbar⁷¹.

Zum Nachweis dieses Apoptose-Merkmales wurde unter Benutzung des *Suicide-Track DNA Ladder Isolation Kit* [Calbiochem, Mannheim] die DNA der untersuchten Zellen gewonnen, durch Elektrophorese in Ethidiumbromid-haltigem Agarosegel aufgetrennt und im UV-Licht sichtbar gemacht.

Für den Test wurden sowohl die adhärenen als auch die im Überstand vorhandenen Zellen einer konfluenter bewachsenen 6-well-Platte verwendet. Nach Inkubation mit CHP und Lyse der Zellen auf Eis wurde das Zelllysat durch Zentrifugation in fragmentierte und hochmolekulare, intakte DNA aufgetrennt. Nun folgten in mehreren Schritten Nuklease-Inaktivierung, RNA-Degradation, Alkohol-Präzipitation und Färbung des DNA-Pellets mit der fragmentierten DNA.

Die so gewonnene DNA wurde in einem 1,5%, Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt; neben den Proben wurde auch ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Anschließend erfolgte die Visualisierung der durch Ethidiumbromid-gefärbten DNA im UV-Licht mittels einer speziellen Kamera und dem EASY-Programm [beides von Herolab, Wiesloch].

2.5.2 Nachweis von PARP-Degradation und Caspase3-Aktivierung

Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Aktivierung charakteristischer Enzyme. Hier spielt vor allem die Familie der Caspaseen eine wichtige Rolle, wobei die Aktivierung von Caspase3 von besonderer Bedeutung ist. Durch diese Protease werden andere, wesentliche Enzyme wie Endonukleasen aktiviert oder wichtige Zellbestandteile degradiert. So gehört die Caspase3 auch zu den Proteasen, welche die Poly (ADP Ribose) Polymerase (PARP), ein DNA-Reparaturenzym, im Verlauf der Apoptose abbauen können. PARP-Degradation und Caspase3-Aktivierung können somit zum Nachweis von Apoptose dienen⁷². Der Nachweis von PARP-Degradation und Caspase3-Aktivierung erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot (siehe Kapitel 2.8).

2.6 Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.6.1 Allgemeines Prinzip der RT-PCR

Diese Methode diente zur Untersuchung der Effekte von CHP auf die Transkription. Dazu wurde die Gesamt-RNA der Zelle isoliert und mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) sowie mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben. Diese Primer binden an den für mRNA typischen PolyA-Schwanz. Entsprechend ist die synthetisierte DNA somit komplementär zur mRNA.

Die cDNA diente dann als Ausgangsmaterial zur Amplifikation durch die *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hierbei handelt es sich um eine in vitro-Amplifizierung von spezifischen Sequenzen eines DNA-Doppelstranges durch Benutzung synthetischer Oligonucleotid-Primer für das untersuchte Genprodukt.

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei einer Temperatur von 95°C denaturiert. Darauf folgt eine Abkühlung des Gemisches auf 60°C-65°C, wobei es zur Anheftung (*Annealing*) der Primer kommt. Diese Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der DNA-Primer Komplexe (Berechnung erfolgt nach Gehalt der Basenpaare GC (je 4°C) und AT (je 2°C)).

Die Primer sind der Sequenz der 5'-Enden des DNA-Einzelstranges komplementär und werden bei etwa 72°C durch die thermostabile *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase zum

entsprechenden Doppelstrang komplementiert. Danach werden diese Schritte, d.h. Denaturierung, Anheftung der Primer, Bildung der neuen Doppelstränge mehrfach (20-35mal) wiederholt. Die ganze Reaktion wird in programmierbaren PCR-Thermocyclern durchgeführt.

Schließlich werden die PCR-Produkte in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die resultierenden Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die Identifizierung erfolgt anhand der bekannten Größe der PCR-Produkte und einem zusätzlich aufgetragenen 100bp-Marker.

2.6.2 Ansatz der Versuche und Gewinnung der RNA

Die Zellen wurden auf 60mm-Zellkulturschalen eingesät. Nachdem die Schalen konfluent bewachsen waren, begann die Inkubation mit CHP bzw. L-Prolin für die jeweils gewünschten Zeiten und Konzentrationen. Als Kulturmedium diente DMEM mit oder ohne 10% FKS.

Nach Entfernen des Zellkulturmediums wurde die gesamte zelluläre RNA mittels des *RNeasy extraction Kit* gewonnen. Nach Lyse der Zellen und Zugabe von 70% Ethanol wurde die Kulturschale abgeschabt und die im Lysispuffer enthaltenen Zellen auf Säulen des Kits gegeben. Diese besitzen Membranen, Nukleinsäuren zu binden. Um die DNA zu beseitigen, wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Nach mehreren Waschschritten wurde die Gesamt-RNA eluiert. Durch anschließende Messung im Spektrophotometer bei 260nm konnte die RNA-Konzentration der Probe berechnet werden. Die Aufbewahrung der RNA-Proben erfolgte im Kühlschrank bei -80°C.

2.6.3 RT

Für die RT wurden 3µg RNA eingesetzt. Um das gewünschte Reaktionsvolumen von 40µl zu erreichen, wurde jeweils die fehlende Menge mit RNase freiem Wasser (im folgendem nur als Wasser bezeichnet) aufgefüllt. Das gesamte Volumen je Probe (Lösungen s. Anhang) setzte sich aus 17,5µl Reaktionsgemisch, 0,5µl Oligo(dT), RNA und Wasser zusammen, entsprechend 40µl Gesamtvolumen.

Zunächst erfolgte im ersten Schritt mit RNA + Oligo(dT) + Wasser für 10 Minuten bei 70°C die Denaturierung der RNA. Nach Zusatz des oben beschriebenen Reaktions-Mix wurde die eigentliche RT dann 60 Minuten bei 37°C im Zykler durchgeführt. Abschließend erfolgte die Denaturierung des Enzyms für 4 Minuten bei 95°C. Die so gewonnenen cDNA-Proben wurden im Kühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

2.6.4 PCR

Um die verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurden die cDNA-Mengen auf der Grundlage ihres β-Actin-Gehaltes mit Hilfe der kompetitiven PCR eingestellt.

Dazu diente ein synthetisches DNA-Fragment als interner Standard. Dieses Kontroll-Fragment enthielt Primer-Sequenzen, unter anderem auch für β-Actin. Das PCR-Produkt unterschied sich in der Größe von der Zell-cDNA. Es wurde zusammen mit der cDNA der Proben in dem PCR-Reaktionsgemisch mitgeführt. Die Proben konnten so in Bezug auf ihren DNA-Gehalt abgeglichen werden, bevor sie auf Unterschiede hinsichtlich der eigentlich zu untersuchenden Gen-Transkription analysiert wurden.

2.6.5 Arbeitsablauf PCR und Gelelektrophorese

Die Ansätze wurden auf Eis durchgeführt. Außerdem erfolgten alle Arbeiten mit Gummihandschuhen am PCR-Arbeitsplatz unter einer Sicherheitshaube [Herolab, Wiesloch], um so die Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden.

Das Reaktionsgemisch wurde wie im Anhang beschrieben fertig gestellt, wobei die Taq-Polymerase erst kurz vor Anwendung zugegeben werden musste. Für die PCR wurde $1\mu\text{l}$ cDNA der jeweiligen Probe verwendet. Als Kontrolle diente jeweils ein Leerwert, d.h. nur Reaktionsgemisch ohne cDNA.

Die Durchführung der PCR erfolgte in den vorher entsprechend programmierten PCR-Thermocycler (Tab. 2).

Nach Ablauf des Programms wurden den Proben der Farbstoff Orange G zugegeben, um sie auf ein vorbereitetes 1,8%-Agarosegel aufzutragen und elektrophoretisch zu trennen. Mit Hilfe des Farbstoffes konnte der Lauf der Proben im Gel während der Elektrophorese nachvollzogen werden. Die Elektrophorese wurde mit 50-70mV durchgeführt, zur Identifizierung der Größe der Banden wurde vorher ein 100bp-Marker aufgetragen. Anschließend erfolgte die Visualisierung und Auswertung im UV-Licht mittels einer speziellen Kamera und dem EASY-Programm [beides von Herolab, Wiesloch].

2.7 Western-Blot

2.7.1 Prinzip des Western Blot

Die Western Blot Technik diente der Identifizierung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper nach Auftrennung in der Gel-Elektrophorese. Dazu wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die Proteine wurden vorher in einer SDS-haltigen Lösung aufgenommen. Durch Bindung des SDS an hydrophobe Protein-Bereiche kam es zur Denaturierung der Proteine.

Weiterhin führt dieses stark anionische Detergens zur Nivellierung der Protein-Eigenladung, so dass schließlich alle Proteine im alkalischen pH-Bereich der hier verwendeten Gele/Puffer gleich stark negativ geladen sind.

Der Zusatz einer reduzierenden Thioverbindung wie β -Mercaptoethanol zerstört Disulfidbrücken. So handelt es sich hier um eine denaturierende und reduzierende Gel-Elektrophorese, nach deren Ablauf die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht (MG) aufgetrennt sind. Die Proteine mit dem kleinsten MG sind der Anode am nächsten.

Nun wird ein Transfer der Proteine (blot) auf eine Nitrocellulose- oder Nylon-Membran durchgeführt. Durch Inkubation dieser Membran mit einem entsprechenden, primären Antikörper (AK) gegen das gesuchte Protein und folgender Inkubation mit einem gegen den ersten AK gerichteten, Peroxidase-gekoppelten zweiten AK erfolgt die Erkennung des gewünschten Proteins. Der Zusatz eines entsprechenden Substrats [*ECL plus kit*, siehe 2.7.3] führt zu Belichtung eines Films, so dass die gebundenen AK und damit das gesuchte Protein als Bande sichtbar wird.

2.7.1.1 Gewinnung der Proteine

Die Zellen wurden in 6-well-Platten eingesät. Nachdem diese konfluent bewachsen waren, begann die Inkubation der Zellen mit CHP, Prolin, dem Breitspektrum-Proteaseinhibitor-[Protease Arrest] oder dem Caspase-Inhibitor zDEVD-fmk. Als Medium diente DMEM 10% FKS oder DMEM ohne FKS.

Vor Verwendung des Probenpuffers erfolgte die Zugabe von 5% Mercaptoethanol und anschließend die Erhitzung auf 100°C (Herstellung des Probenpuffers s. Anhang 8.2, Seite 89).

Zur Gewinnung der gesamten zellulären Proteine wurden sowohl die adhärenen Zellen als auch der Überstand der Platten verwendet, da es sonst durch die CHP bedingte Ablösung der Zellen zu größeren Unterschieden zwischen den Proben gekommen wäre.

Nach Überführung des Platten-Überstandes in ein Reaktionsgefäß und kurzer Zentrifugation, wurde dieser Überstand verworfen und das so gewonnene Zell-Pellet weiterverwendet. Auf die adhärenen Zellen des Wells wurde 400µl kochender Proben-Puffer gegeben, die Platte abgeschabt und das Gemisch in das Reaktionsgefäß mit dem entsprechenden Pellet gegeben, das so auch resuspendiert wurde. Danach wurde die Probe anschließend entweder weiterverwendet oder zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden die Proben einige Sekunden zentrifugiert, um die eventuell vorhandenen Verunreinigungen durch Zellreste zu vermeiden.

2.7.1.2 Ansetzen der Gele, Elektrophorese und Blotten:

Das Ansetzen der beiden Gele erfolgte nacheinander. Nach der Polymerisation des Trengels wurde das Sammelgel gegossen und der Kamm gesetzt. Nach dessen Polymerisation erfolgten in der mit Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer das Entfernen von vorhandenen Luftblasen und der Auftrag der Protein-Proben. Außerdem wurden 25µl Marker mit aufgetragen, danach erfolgte die vertikale Elektrophorese.

Das Blotten wurde als Tank-Blot im Kühlschrank bei 4°C bei 400mA für 4 Stunden oder bei 200mA über Nacht durchgeführt. Dazu wurde ein Transfer-Puffer mit 6g TRIS und 29g Glycin auf 2 l Aqua dest. verwendet.

2.7.2 Inkubation mit Antikörper

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose-Membran 3mal 10 Minuten in 0,1% PBS-TWEEN gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurde die Membran mit 0,1% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper, 1:1000 in 0,1% BSA verdünnt, für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Nun wurde der Blot wieder 3mal in 0,1% PBS-TWEEN für 10 Minuten gewaschen und daraufhin mit dem entsprechenden zweiten Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Peroxidase-gekoppelte, zweite Antikörper wurde 1:5000 in 0,1% BSA verdünnt.

Schließlich folgte das Waschen des Blots (2mal 10 Minuten in 0,1% PBS-TWEEN, danach 10 Minuten in 0,1% PBS) und dann abschließend die Visualisierung der Banden mittels ECL-Lösung (s. Abschnitt 2.7.3).

Um eine in etwa gleiche Proteinbeladung der Proben nachzuweisen, erfolgte zusätzlich im Western Blot die Analyse der Proben in Bezug auf das Housekeeping-Protein β -Actin mit einem spezifischen Antikörper.

2.7.3 Entwickeln und Re-Probing:

Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem Substrat, welches durch Reaktion mit der an den zweiten AK gebundenen Peroxidase zur Belichtung der Filme führt und so die gesuchten Proteine als Bande sichtbar werden ließ.

Hierfür wurde das ECL Plus Kit und entsprechende Filme verwendet. In der alkalischen ECL-Lösung sind neben dem *Lumigen PS-3 Acridan* (Diacylhydrazide-Derivat) als Substrat auch Peroxide enthalten. Peroxidase-vermittelt entsteht ein Acridinium-Ester, der durch Reaktion mit Peroxiden Licht produziert.

Der Blot wurde mit der ECL-Lösung 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in einer Folie in eine Film-Kassette gelegt. In der Dunkelkammer erfolgten dann die Belichtung und das Entwickeln der Filme. Nach dem Entwickeln wurde der Blot mit PBS-TWEEN in einer Folie eingeschweißt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Um die Blots erneut für den Nachweis anderer Proteine benutzen zu können, wurden die gebundenen Antikörper entfernt. Dies wird auch als „Stripping“ bezeichnet.

Der Blot wurde mit der Stripping-Lösung(s. Anhang 7.2.2, Seite 90) für 30 Minuten im Wasserbad bei 50°C inkubiert. Danach erfolgte das Waschen mit 0,1% PBS-TWEEN sowie zum Blocken unspezifischer Bindungen erneut eine 60-minütige Inkubation mit 0,1% BSA. Nun wurde wie oben beschrieben die Inkubation mit neuem Antikörper durchgeführt.

2.8 Immunfluoreszenz

2.8.1 Allgemeines Prinzip

Die Immunfluoreszenz-Färbung dient zur Lokalisierung des gewünschten Proteins in der Zelle. Dazu werden fixierte Zellen mit einem spezifischen ersten Antikörper inkubiert. Nun erfolgt die Inkubation mit einem zweiten, gegen den ersten Antikörper gerichteten und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper. Durch ein Fluoreszenz- oder LASER-Scanning Mikroskop kann diese Bindung der Antikörper nachgewiesen werden.

2.8.2 Ansatz und Durchführung

Die Zellen wurden in 12-well-Platten auf Glas-Plättchen kultiviert und mit CHP inkubiert. Als Zellkulturmedium diente DMEM 10% FKS.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Plättchen entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und 5 Minuten mit 0,1% PBS-Tween inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Es folgte die Fixierung mit eiskaltem Methanol für 10 Minuten bei -20°C.

Nach Waschen folgte das Blocken unspezifischer Bindungen mit 0,1% BSA für 45 Minuten bei Raumtemperatur, danach die Inkubation mit dem Anti-FAK-Ak. 1:100 verdünnt in 0,1% BSA, für 30 Minuten (siehe unter Western Blot, Kapitel 2.7). Nun folgte nach erneutem

Waschen die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:300 verdünnt in 0,1% BSA) in Dunkelheit für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Als zweiten Antikörper diente der *Alexa Fluor488 anti-Maus IgG-Ak*. Nach Einbettung der Plättchen auf einen Objektträger wurde die Bindung des zweiten Antikörpers an den ersten mit Hilfe eines konfokalen LASER-scanning Mikroskops [TCS SP2 AOBS, Leica] sichtbar gemacht.

2.9 Electro Mobility Shift Asssay (EMSA)

Ein EMSA ist eine *in vitro*-Methode zum Nachweis von Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA-Bindungsstellen.

Während der Aktivierung von Transkriptionsfaktor kommt es zur Translokation des Faktors vom Zytoplasma in den Zellkern. Hier erfolgt die Bindung des Transkriptionsfaktors an DNA-Sequenzen.

Bei der Analyse mittels EMSA werden Kernextrakte der zu untersuchenden Zellen hergestellt und lysiert. Die so gewonnenen Kernproteine werden mit ^{32}P radioaktiv markierten Doppelstrang-Oligonukleotiden (Sonden) inkubiert. Diese enthalten eine Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors. Nach Inkubation von Sonde und Kernproteinen erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Proben in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel. Wenn der Faktor im Zellkern vorhanden ist, kommt es zur Bindung des Faktors an die Oligonukleotid-Sonde mit Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes. Dieser Komplex hat in der Gel-Elektrophorese aufgrund des höheren Molekulargewichts eine deutlich langsamere Wanderungsgeschwindigkeit als die ungebundene Oligonukleotid-Sonde. Dies wird durch Autoradiografie sichtbar.

Zur genaueren Identifizierung der Bindung dient die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper, der gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor gerichtet ist. Die Antikörper-Bindung an den Komplex erhöht das Molekulargewicht. So wird die Wanderungsgeschwindigkeit bei der Gel-Elektrophorese nochmals verlangsamt. Dies führt zu einem *Shift* der Bande im Gel. Dadurch verschwindet die induzierbare Bande, eine neue, höher molekulare Bande erscheint auf dem Röntgenbild. Durch diese Supershift genannte Methode wird die Identifizierung des Transkriptionsfaktors ermöglicht. Weiterhin können durch Verwendung entsprechender Antikörper auch die Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors aus möglichen Untereinheiten analysiert werden.

2.9.1 Herstellung von Kernextrakten

Zur Herstellung der Kernextrakte benutzt man die hypotone Lyse der Zellen, gefolgt von der hypertonen Lyse der Zellkerne mittels zweier verschiedener Puffer (Zusammensetzung und genaue Abfolge der Schritte s. Anhang 7.2.3, Seite 90ff).

Als Ausgangsmaterial diente ein konfluentes well einer 6-well-Platte mit max. 2ml Medium pro well. Die Zellen wurden 6 Stunden serumfrei vorinkubiert, dann erfolgte die Inkubation mit 10mM CHP nach Versuchsschema.

2.9.2 Markierung mit ^{32}P und Bindungsreaktion

Zur Vorbereitung der Oligonukleotid-Sonde erfolgte in einem 0,5ml-Reaktionsgefäß der Ansatz von 80 μl Aqua dest. mit je 10 μl Oligonucleotid 1 (sense) und je 10 μl Oligonucleotid 2 (antisense) (Stammlösungen 50 picomol/ μl). Nach Erhitzen für 10 Minuten auf 80°C wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 300 μl Aqua dest. auf 400 μl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Zur Markierung mit ^{32}P erfolgte nach Ansatz der Probe (s. Anhang 7.2.3, Seite 91) eine 30 Minuten Inkubation bei 37°C. Anschließend erfolgte dann die Sephadex-Säulenreinigung. Hierzu wurde die Säule mit 3ml TE-Puffer äquilibriert, die Probe geladen und zunächst 100 μl , dann 300 μl TE zugegeben. Das aufgefangene Eluat wurde verworfen (radioaktiver Abfall). Als Sonde wurde das durch abschließende Zugabe von 400 μl TE-Puffer entstehende Eluat verwendet. Nach Aufteilung in 10 μl Aliquots und Messung im β -Counter (erwartet werden mind. mehrere Zehntausend cpm) erfolgte die unmittelbare Verwendung oder die Lagerung bei -20°C.

Zur Durchführung der Bindungsreaktion wurde zunächst das Reaktionsgemisch (s. Anhang 7.2.3, Seite 92) mit Ausnahme der Kernextrakte hergestellt und entsprechend aufgeteilt. Durch Zugabe der Kernextrakte startete die eigentliche Bindungsreaktion. Für 30 Minuten wurde nun eine Inkubation bei Raumtemperatur vollzogen.

Für die Supershift-Analysen erfolgte die Zugabe von 1 μg Antikörper und 20 Minuten Inkubation auf Eis.

2.9.3 Elektrophorese:

Zunächst erfolgte das Gießen eines 6%-Polyacrylamidgels nach folgendem Ansatz aus 6ml Acrylamid / Bis (40%, 29:1), 1ml 10 X TBE-Puffer (GIBCO), 33ml Aqua dest., 240 μl APS 10% und 80 μl TEMED.

Die vertikale Elektrophorese erfolgte bei 300V, als Marker diente eine Bahn mit 1 μl Bromphenolblau.

In der Dunkelkammer erfolgte dann die Belichtung der Filme, in dem diese für verschiedene Zeiten in der Film-Kassette auf den Blot gelegt wurden. Ebenfalls in der Dunkelkammer erfolgte dann das Entwickeln der Filme.

2.10 Analyse der Ergebnisse

Die Ergebnisse der BrdU-ELISA und der CellTiter Assays wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Die Daten wurden mit Hilfe des Wilcoxon's Rangsummentests analysiert ($p<0,05$ als statistisch signifikant). Rangsummentests haben schwächere Voraussetzungen als t-Tests und damit ein breiteres Anwendungsspektrum.

Bei Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben werden Mediane verglichen. Er funktioniert nach folgendem Schema (nach ⁷³). Für jedes Merkmalspaar aus den beiden Stichproben werden Differenzen $d_i = x_i - y_i$ gebildet und die Werte d_i werden nach Größe des Betrags sortiert und mit Rangsummen versehen. Die Rangzahlen der positiven und negativen Differenzen werden getrennt addiert, R^+ und R^- . Die kleinere der beiden ist die Testgröße R . Diese wird mit dem Wert aus einer entsprechenden Tabelle verglichen. Ist hierbei R kleiner als der kritische Wert, wird die Alternativhypothese angenommen, d.h. die Mediane der Stichproben unterscheiden sich signifikant.

Zur Durchführung des Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben bei einseitiger Fragestellung muss die Anzahl der Stichproben gleich oder größer fünf sein, d.h. $n \geq 5$.

3 Ergebnisse

3.1 DSL6A-Zellen

3.1.1 CHP induzierte morphologische Veränderung der DSL6A-Zellen

Um einen ersten Überblick über die Effekte von CHP auf die Pankreaskarzinom-Zelllinie DSL6A zu gewinnen, erfolgte zunächst die Beobachtung der Zellen im Phasenkontrastmikroskop. Die Inkubation mit 10mM CHP in 10% FKS enthaltendem DMEM führte nach 6 Stunden zur Abrundung der adhären wachsenden Zellen, die sich nach 24 Stunden ablösten (Abb.3.1b). Eine Zugabe von 20mM L-Prolin konnte diese Effekte verhindern (Abb. 3.1c). Außerdem führte die Zugabe von 20mM L-Prolin auch zur Erholung von Zellen, die sich durch vorherige 24-stündige Inkubation mit CHP bereits abgerundet bzw. abgelöst hatten (Abb.3.1d).

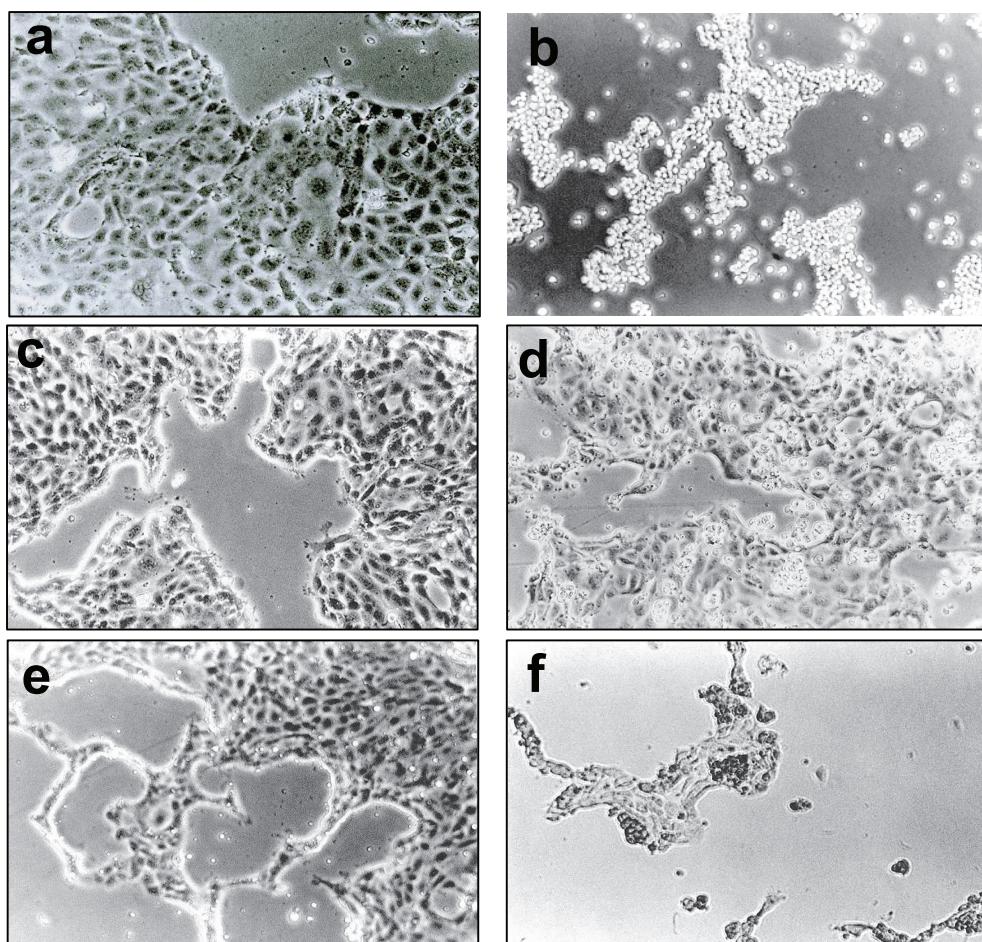


Abbildung 3. 1 Einfluss von CHP auf die Morphologie der DSL6A-Zellen.

Adhären wachsende Kontrolle der DSL6A unter Kultivierung in DMEM 10% FKS (a) und IMDM 10% FKS (e). Inkubation mit 10mM CHP für 24 Stunden in DMEM 10% FKS (b) verursacht Abrunden bzw. Ablösen der Zellen, während dieses Verhalten unter gleicher Behandlung der Zellen in IMDM 10% FKS (f) wesentlich schwächer ausgeprägt ist. (c) Gleichzeitige Zugabe von 10mM CHP und 20mM L-Prolin zu den in DMEM 10% FKS kultivierten DSL6A-Zellen verhinderte vollständig die CHP-Effekte. (d) CHP-behandelte Zellen (in DMEM 10% FKS) wurden weitere 48 Stunden mit 20mM L-Prolin kultiviert, was zum Wiederanheften der Zellen führte (Phasenkontrast-Mikroskopie, 100fache Vergrößerung).

Wurde anstelle des DMEM 10% FKS IMDM 10% FKS als Zellkulturmedium verwendet, fielen die CHP-Effekte deutlich schwächer aus. So führte die Inkubation mit 10mM CHP in diesem L-Prolin haltigen Medium zwar auch zu einer sichtbaren Wachstumshemmung der Zellkultur, es waren jedoch weniger Zellen von Abrundung bzw. Ablösung betroffen als im L-Prolin freien DMEM (Abb. 3.1f).

3.1.2 Wirkung von CHP auf Proliferation und Überleben der Zellen

Nach Charakterisierung der morphologischen Veränderungen wurde der Einfluss von CHP auf Proliferation und Überleben der DSL6A-Zellen untersucht. Abbildung 3.2 und 3.3 zeigt zusammenfassend den Einfluss von CHP auf die S-Phase des Zellzyklus, gemessen mit einem ELISA basierend auf den BrdU-Einbau in die DNA der Zellen. Hier zeigte sich, dass CHP signifikant die Proliferation zeit- und konzentrationsabhängig hemmt. (Abb.3.2 und 3.3).

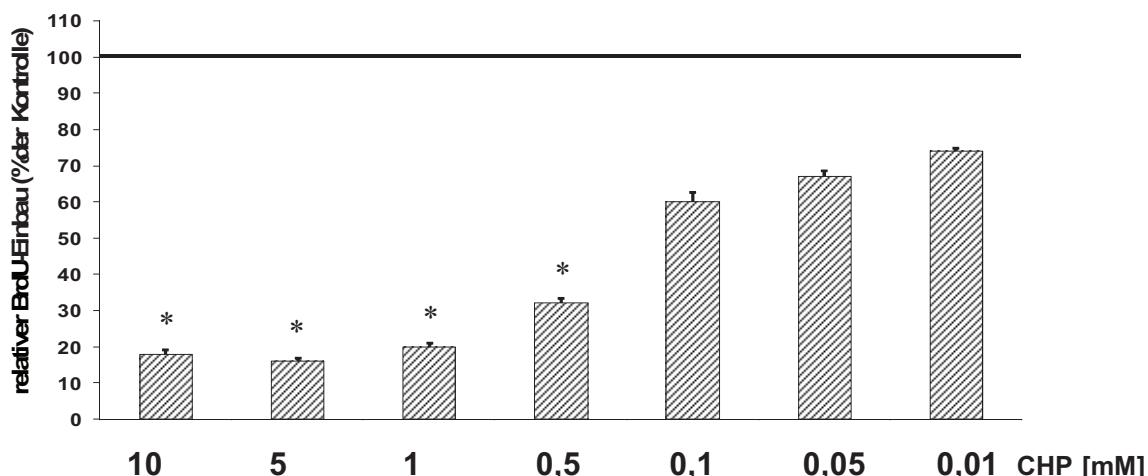


Abbildung 3. 2 Hemmung der Proliferation der DSL6A Zellen durch CHP.

(A) Messung der Proliferation mittels BrdU-Einbau nach 24 Stunden. Inkubation mit CHP in den jeweiligen Konzentrationen. Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler relativ zu den unbehandelten Kontrollen dargestellt (n=6, *p< 0,05).

Bei einer CHP-Konzentration von 10mM wurde die Proliferation um 80% des Kontrollwertes reduziert. Ab einer Konzentration von 0,1mM oder noch niedriger kam es dann zu einem deutlichen Nachlassen der Proliferationshemmung (Abb.3.2). Die Bedeutung der Zeitabhängigkeit der CHP-Wirkung zeigt Abbildung 3.3. So führt eine 48-stündige Inkubation mit 10mM CHP zur fast vollständigen Hemmung der Proliferation.

Ergebnisse

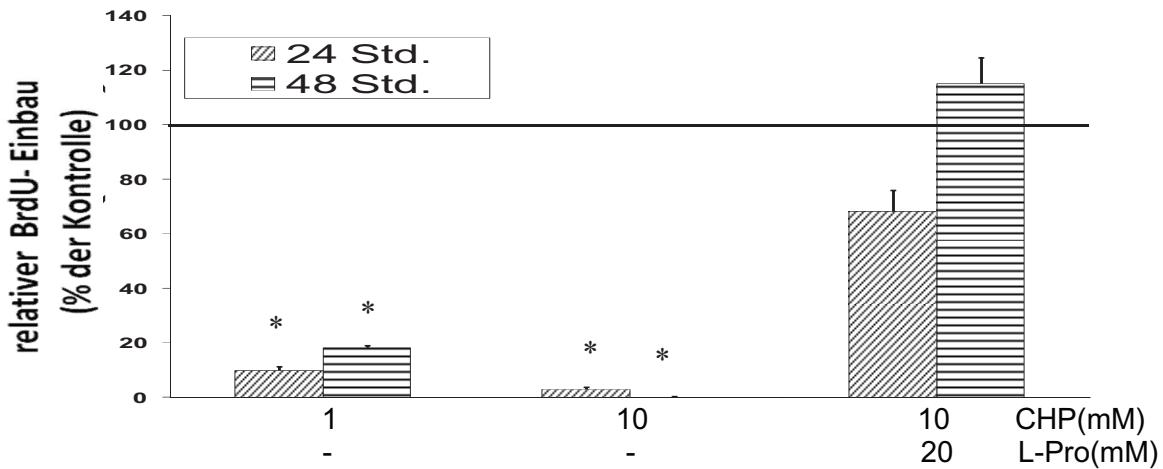


Abbildung 3.3 Zeitabhängige Hemmung der Proliferation der DSL6A Zellen durch CHP.

Messung der Proliferation mittels BrdU-Einbau nach 24 Stunden und 48 Stunden. Inkubation mit CHP bzw. L-Prolin in den jeweiligen Konzentrationen. Ergebnisse von sind als Mittelwerte \pm Standardfehler relativ zu den unbehandelten Kontrollen dargestellt (n=6, *p< 0,05).

Die Bestimmung der metabolisch aktiven Zellen mittels Analyse des MTS-Umsatzes zeigte, dass CHP auch die Zahl lebender Zellen reduzierte. Diese Beeinflussung der Überlebensrate war jedoch geringer ausgeprägt als die vorher beobachtete Proliferationshemmung. Während so der BrdU-Einbau durch 10mM CHP für 24 Stunden auf 20% der Kontrolle gesenkt wurde, lag die Anzahl lebender Zellen unter gleichen Bedingungen bei noch 50% des Kontrollwertes (Abb. 3.4).

Auch in Bezug auf das Zellüberleben zeigt sich eine Zeitabhängigkeit des CHP-Effektes. So wurde auch die Abnahme lebender Zellen im Verlauf der CHP-Inkubation stärker (Abb.3.4).

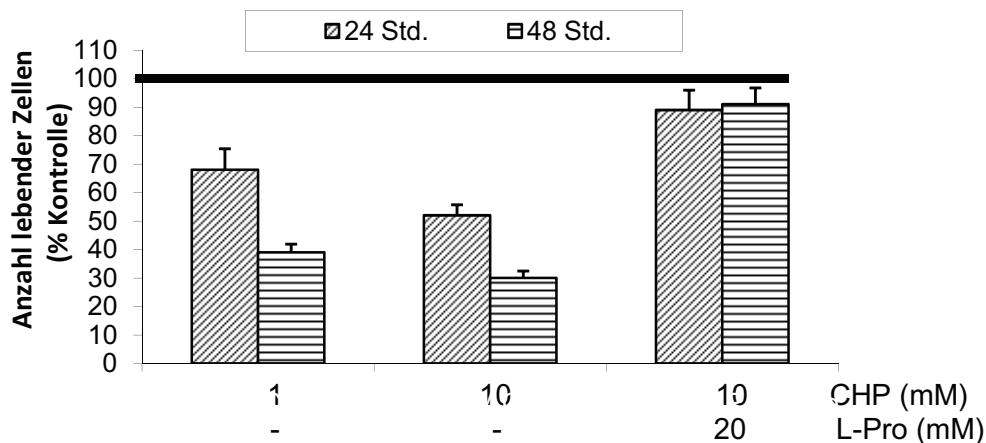


Abbildung 3.4 Hemmung des Überlebens der DSL6A Zellen durch CHP.

Stunden nach Zugabe der CellTiter-AQueous Lösung wurde der Umsatz des MTS Salzes gemessen. Die Ergebnisse von sind als Mittelwerte \pm Standardfehler relativ zu den unbehandelten Kontrollen dargestellt (n=4).

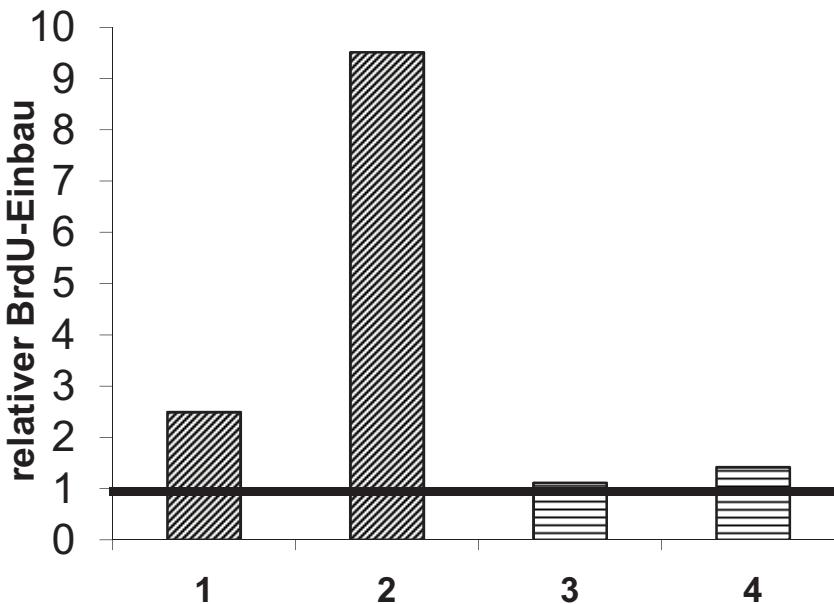


Abbildung 3.5 Reversibilität der CHP induzierten Wachstumshemmung.

DSL6A-Zellen wurden 24 Stunden mit 10mM CHP in DMEM 10% FKS behandelt, dann erfolgte der Wechsel des Medium mit DMEM 10% FKS ohne CHP (1) oder die Zugabe von 20mM L-Prolin zu dem CHP enthaltenen Medium (2) Hier wurden sowohl die adhärenten Zellen als auch die bereits abgelösten Zellen verwendet. Parallel dazu zeigen die Reihen 3 bzw. 4 die gleiche Versuchsanordnung wie 1 und 2, jedoch nur unter Verwendung der adhärenten Zellen. Nach 24 Stunden Weiterkultivierung inklusive 20 Stunden BrdU-Inkubation erfolgte die Messung des BrdU-Einbaus. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler relativ zu CHP behandelten Zellen (10mM CHP für 24 Stunden) dargestellt (n=3).

Die Diskrepanz zwischen Proliferationshemmung und metabolisch aktiven Zellen führte zur Frage nach der Reversibilität der CHP-Effekte.

Dazu wurde 24 Stunden nach Beginn der CHP-Inkubation L-Prolin zugegeben oder es wurde die gesamten, d.h. auch die abgelösten Zellen in neuem, CHP freien Medium (DMEM 10% FKS) weiter kultiviert.

Nach anschließender 24-stündiger Kultivierung erfolgte die Messung der Zell-Proliferation. Wie Abbildung 3.5 zeigt, steigt der BrdU-Einbau vor allem in den mit L-Prolin behandelten Zellen wieder an. Der Anstieg des BrdU-Einbaus bei den Zellen nach Mediumwechsel fiel dagegen schwächer aus, da es sich bei DMEM um ein Prolin-freies Zellkulturmedium handelt.

Um zu untersuchen, ob sich die im BrdU-ELISA gemessene Wachstumshemmung auch auf der Ebene der regulatorischen Zellzyklus-Proteine widerspiegelt, wurde der CyclinD1-Proteinspiegel mittels Western Blotting analysiert.

Es zeigte sich, dass CHP eine Abnahme des CyclinD1-Proteinlevels verursacht, die nach 48-stündiger Inkubation deutlich ausgeprägt war (Abb.3.6). Der Breitspektrum-Proteaseinhibitor war auch hier in der Lage, diesen Effekt abzuschwächen.

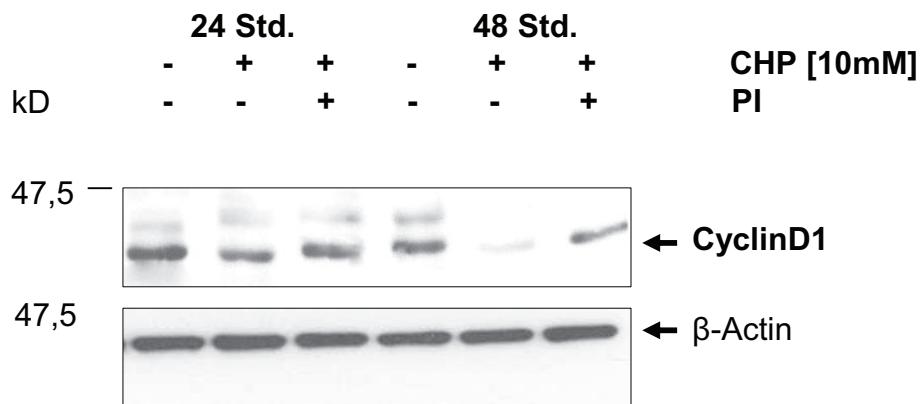


Abbildung 3. 6 Analyse der CyclinD1-Expression.

Immunoblotting von DSL6A-Proteinextrakten mittels eines CyclinD1 spezifischen Antikörpers.

3.1.3 Einfluss auf mRNA-Expression von Kollagen und HSP47

CHP ist als Inhibitor der normalen Kollagen-Faltung beschrieben worden^{21,22,24}. Daher wurde die mRNA-Expression von Kollagen IV der DSL6A-Zellen unter CHP-Inkubation untersucht. Wie Abbildung 3.7 zeigt, kommt es durch CHP zu einer leichten Steigerung des Kollagen IV-Expression. Kollagen I war in DSL-Zellen nicht nachweisbar (Abb. 3.8). Als externe Methodenkontrolle dienten pankreatische Stellate-Zellen (PSZ), die eine hohe Expression von Kollagen IV und Kollagen I aufweisen⁶⁷

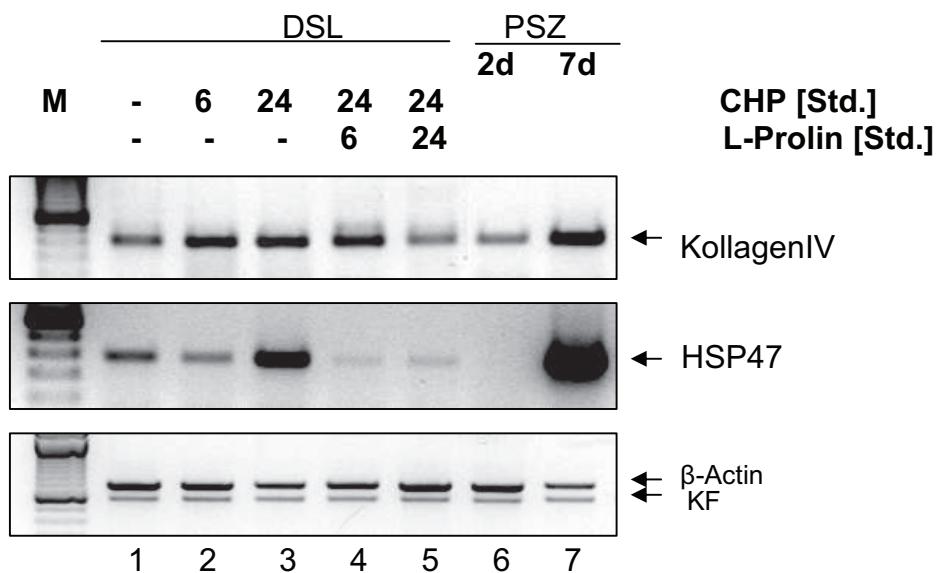


Abbildung 3. 7. Einfluss von CHP auf die mRNA-Expression von HSP47 und Kollagen IV.

Die cDNA-Proben wurden mittels PCR unter Benutzung spezifischer Primer für Kollagen IV und HSP47 amplifiziert. Die DSL6A-Zellen wurden ohne (1) oder mit 10mM CHP für 6 Stunden (2) bzw. 24 Stunden (3) inkubiert. Andere Proben wurden nach 24-stündiger Behandlung mit 10mM CHP für weitere 6 Stunden (4) bzw. 24 Stunden (5) mit 20mM L-Prolin behandelt. cDNA-Proben von 2 Tage (6) bzw. 7 Tage (7) in Kultur gehaltenen PSZ-Zellen.

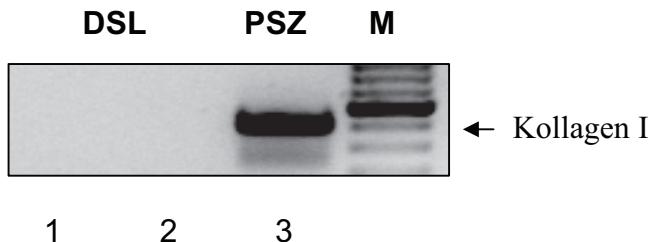


Abbildung 3.8 Analyse der mRNA-Expression von Kollagen I.

Zwei verschiedene cDNA-Proben von unbehandelten DSL6A-Zellen (1,2) sowie eine cDNA-Probe von 7 Tage (3) in Kultur gehaltenen PSZ wurden mittels PCR unter Benutzung eines spezifischen Primer für Kollagen I amplifiziert.

Im Zusammenhang mit der Kollagensynthese wurde das für die Kollagensynthese essentielle Chaperon *heat shock protein* (HSP) 47 untersucht.

Die Inkubation mit CHP führt zu einer deutlichen, zeitabhängigen Induktion der HSP47-Expression. Ähnlich wie bei Kollagen IV kommt es durch L-Prolin bei den mit CHP vorbehandelten Zellen zur Reduktion der HSP47-Expression (Abb. 3.7). Die PSZ dienten wiederum als Kontrolle.

3.1.4 Einfluss auf die Expression der ER-Stress-Proteine GRP78 und GADD153

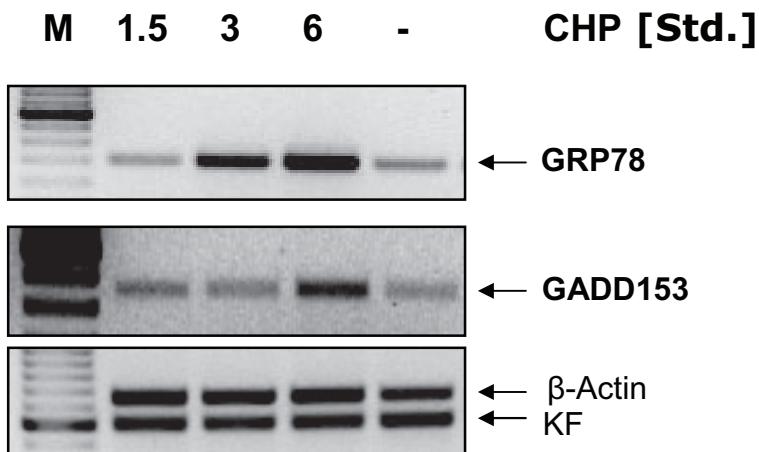
Die CHP vermittelte Induktion von HSP47 wies auf eine Beteiligung des ER hin. So zeigte die erhöhte HSP47-Expression (Abb.3.7), dass es unter CHP-Inkubation zu einer Anhäufung von falschgefalteten Kollagenketten kommt, wie dies auch in früheren Arbeiten beschrieben wurde²². Dadurch kann ER-Stress ausgelöst werden.

Um zu testen, ob die CHP-Wirkung durch ER-Stress vermittelt ist, wurde die Expression von GRP78 und GADD153 analysiert. Dabei handelt es sich um zwei Proteine, deren Hochregulation als Teil des UPR und damit des ER-Stress Signalweges beschrieben wurde^{33,36,39}.

Wie Abbildung 3.9 zeigt, induzierte CHP die mRNA Expression der beiden ER-Stress-Marker.

Die GRP78-Expression stieg 3 Stunden nach Zugabe von CHP an, während die Hochregulation von GADD153 erst nach 6 Stunden nachweisbar war. Die CHP-induzierte GRP78-Expression wurde zusätzlich auf Proteinebene durch Western Blotting bestätigt. Hier konnte das Protein 6 Stunden nach CHP-Zugabe nachgewiesen werden. In den unbehandelten Kontrollen wurden keine nachweisbaren Proteinspiegel gefunden (Abb. 3.9). Im Verlauf der CHP-Inkubation stieg die GRP78-Proteinsynthese an, um nach 24 Stunden ein Maximum zu erreichen (Abb.3.9).

A



B

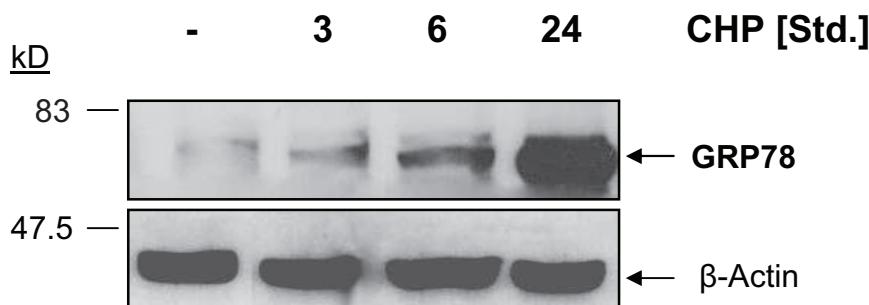


Abbildung 3.9 Einfluss von CHP auf die Expression von GRP78 und GADD153.

A RT-PCR. M, 100-bp Molekulargewichts-Marker. B Western Blot. Proteinextrakte der DSL6A-Zellen wurden mittels Immunoblotting mit einem spezifischen GRP78-Antikörper untersucht. Es wurde jeweils 10mM CHP für die angegebene Zeitdauer verwendet.

3.1.5 Reversibilität der CHP-Effekte

Um zu testen, ob sich die durch L-Prolin verursachte Wiederherstellung der Zellfunktionen auch auf molekularer Ebene widerspiegelt, wurde die Expression von GRP78 und GADD153 während L-Prolin Zugabe zu CHP vorbehandelten Zellen untersucht. Dazu mussten die Zellen 24 Stunden mit CHP inkubiert werden. Wie Abbildung 3.10 zeigt, war die Expression beider Proteine 6 Stunden nach L-Prolin Zugabe niedriger, um dann nach 24 Stunden fast wieder die Kontrollwerte zu erreichen. Dagegen dauerte die Reduktion von GRP78 auf Proteinebene 48 Stunden. Hier wurde nach 72 Stunden wieder das Niveau der Kontrolle erreicht (Abb. 3.11). Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass L-Prolin zur zeitabhängigen Wiederherstellung der intakten FAK und gleichzeitiger Abnahme der Protein-Fragmente führt (Abb. 3.11).

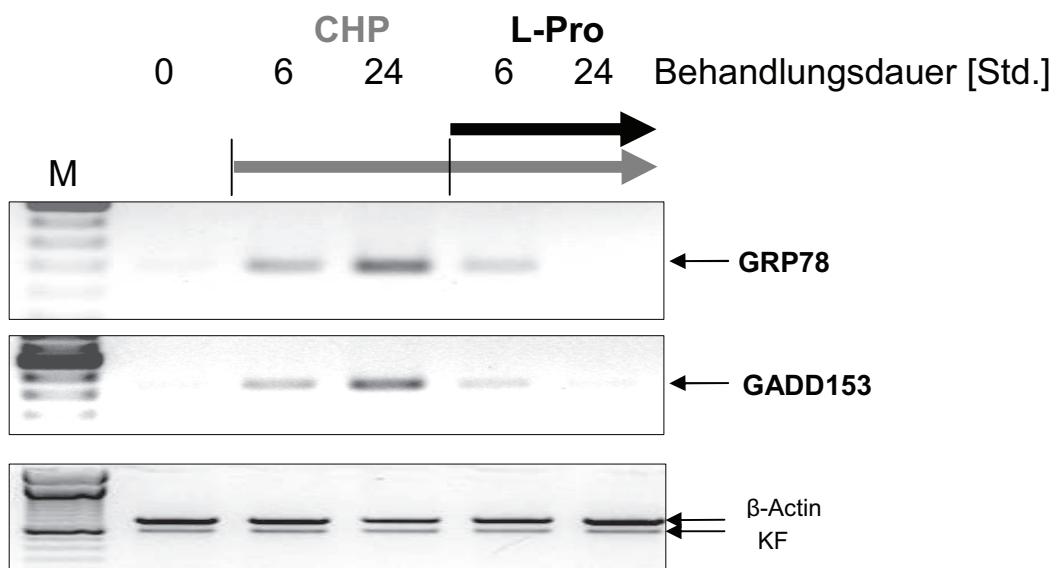


Abbildung 3.10 Reversibilität der CHP-Effekte durch L-Prolin auf mRNA-Ebene.

Die cDNA-Proben wurden mittels PCR unter Benutzung spezifischer Primer für GRP78 und GADD153 amplifiziert. Die DSL6A-Zellen wurden ohne oder mit 10mM CHP für 6 Stunden bzw. 24 Stunden inkubiert. Andere Proben wurden nach 24-stündiger Behandlung mit 10mM CHP für weitere 6 Stunden bzw. Stunden mit 20mM L-Prolin behandelt.

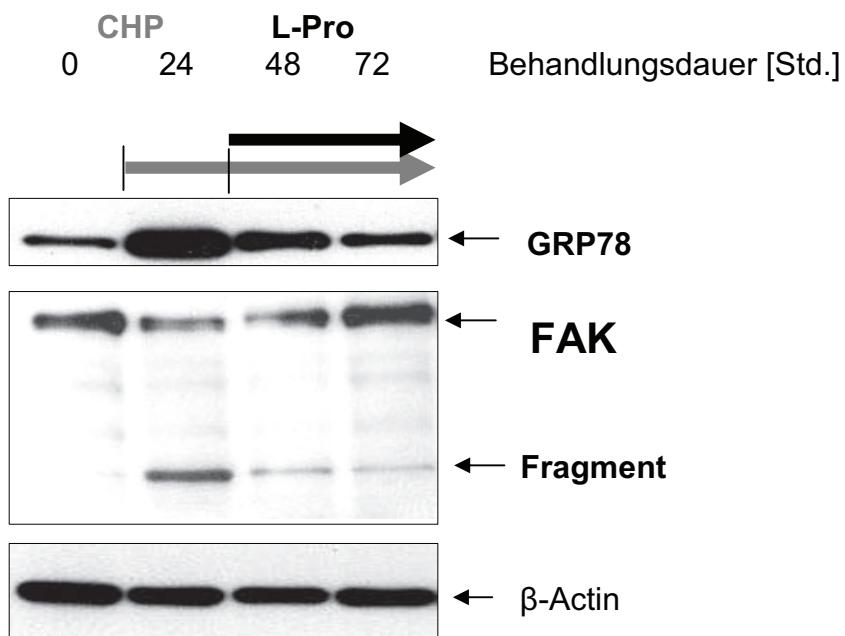


Abbildung 3.11 Reversibilität der CHP-Effekte durch L-Prolin auf Proteinebene.

Die Western Blot Analyse der GRP78 und FAK Protein Spiegel. Nach 24-stündiger Behandlung mit 10mM CHP wurden die DSL6A-Zellen weitere 48 Stunden bzw. 72 Stunden mit 20mM L-Prolin kultiviert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

3.1.6 Einfluss auf NF-κB

Als weiterer Bestandteil der ER-Stress-Signaltransduktion wurde im Rahmen des EOR eine NF-κB Aktivierung beschrieben²⁷. Um diese Aktivierung nachzuweisen, wurden Kernextrakte CHP inkubierter Zellen im EMSA mit einer entsprechenden Sonde untersucht. Hier zeigte sich schon in unbehandelten Zellen eine hohe Basalaktivität, die sich durch CHP nicht wesentlich beeinflussen ließ (Abb. 3.12).

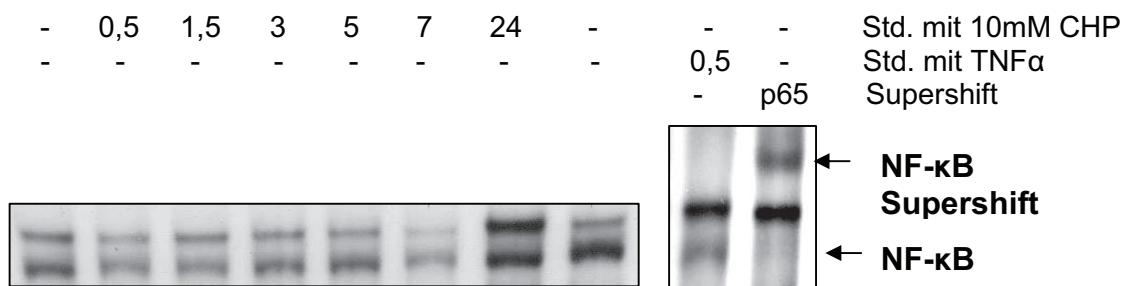


Abbildung 3.12 Einfluss von CHP auf NF-κB.

Die Zellen wurden mit 10mM CHP in DMEM ohne FCS für die angegebenen Zeiten inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle, des Weiteren wurden DSL6A-Zellen zum Vergleich mit TNF α (10ng/ml) für 30 Minuten inkubiert. Für die Supershift-Analyse erfolgte die Bindungsreaktion unter Zugabe eines p65RelA-Antikörpers.

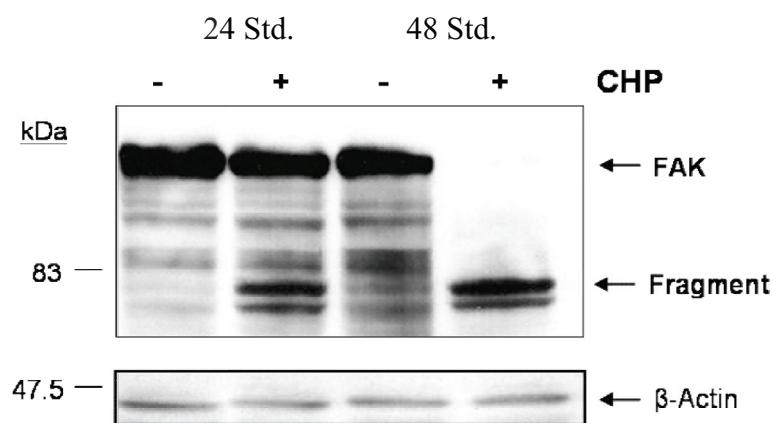
3.1.7 Einfluss von CHP auf *focal adhesion kinase* (FAK)

Die unter CHP beobachtete starke Hemmung der Zell-Adhärenz legte einen Zusammenhang mit der FAK nahe⁷⁴. Die Analyse der FAK mittels Western-Blot-Technik zeigte das erwartete 125kD Protein. Die Behandlung der Zellen mit CHP führte zur zeitabhängigen Abnahme des FAK-Signals und dem gleichzeitigen Auftreten eines Fragments von etwa 80kD (Abb. 3.13A). Diese Ergebnisse ließen einen proteolytischen Abbau der FAK vermuten.

Basierend auf der Hypothese, dass CHP zur FAK-Inaktivierung durch enzymatische Proteolyse führt, wurde der Einfluss eines Breitspektrum-Proteaseinhibitors getestet. Dieser verhinderte die durch CHP verursachte FAK-Degradation (Abb. 3.13B) Zusätzlich konnte durch Vorbehandlung der Zellen mit diesem Inhibitor auch das CHP induzierte Abrunden und Ablösen der Zellen inhibiert werden (Abb. 3.14a).

Im Gegensatz dazu beeinflusste die Vorbehandlung mit dem Caspase-Inhibitor zDEVD-fmk, der die Caspase-3, -6 und -7 hemmt, weder die FAK-Degradation noch das Ablösen der Zellen (Abb. 3.13B und 3.14b).

A



B

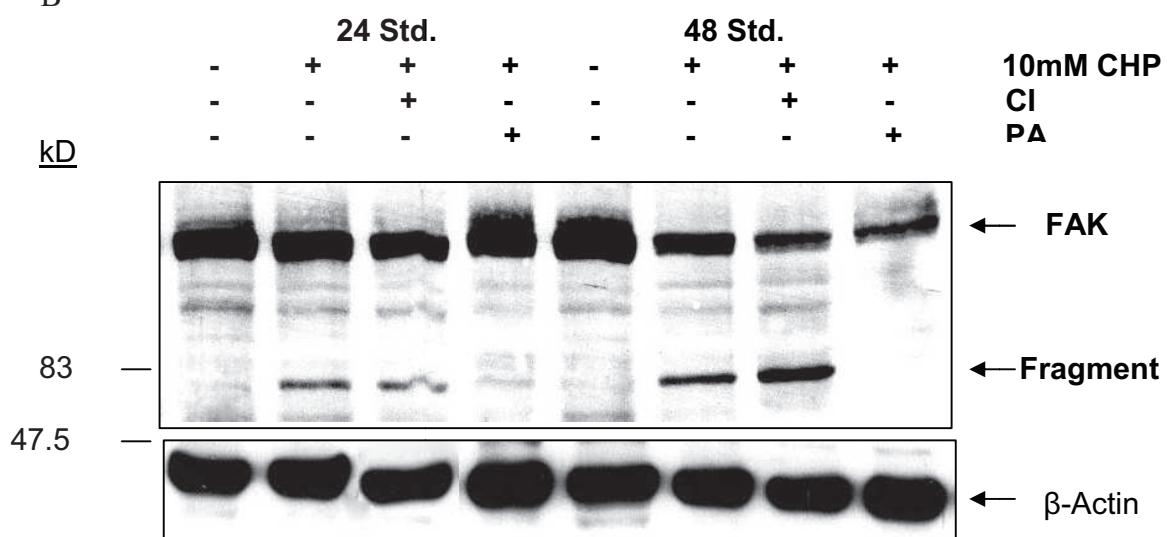


Abbildung 3.13 CHP induzierte FAK-Fragmentierung in DSL6A-Zellen.

(A) Nach Herstellung von Proteinextrakten erfolgte die Analyse mittels Immunoblotting unter Benutzung eines FAK spezifischen Antikörpers. (B) Vorbehandlung der Zellen mit dem Proteaseinhibitor (PI) schwächte die FAK-Degradation ab, dagegen zeigt die Vorbehandlung mit dem Caspase-Inhibitor (CI) zDEVD-fmk (100 μ M) keine Wirkung.

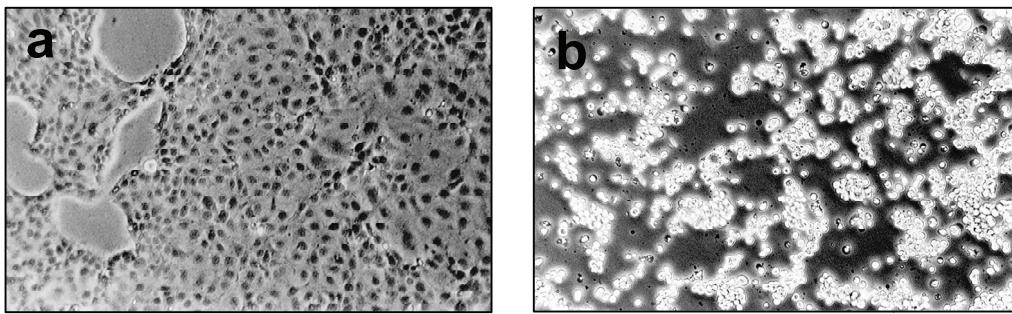


Abbildung 3.14 Einfluss des Proteaseinhibitors auf CHP-induzierte morphologische Veränderungen. Vorbehandlung der DSL6A-Zellen mit einem Breitspektrum-Proteaseinhibitor (PI, Protease Arrest Reagent) verhinderte den CHP verursachten Adhärenzverlust (a), während der Caspase-Inhibitor (CI) zDEVD-fmk (100 μ M) das Ablösen der Zellen nicht verhindern kann (b) (Phasenkontrast-Mikroskopie, 100fache Vergrößerung).

3.1.8 Einfluss von CHP auf FAK-Lokalisation

Da die FAK in adhärenten Zellen in *focal adhesions* lokalisiert ist, wurde der Einfluss von CHP auf die intrazelluläre Verteilung der FAK untersucht. Dazu erfolgte eine Immunfluroreszenz-Färbung und anschließend die LASER Scanning Mikroskopie. Abbildung. 3.15a zeigt deutlich die in *focal adhesions* lokalisierte FAK in unbehandelten Zellen. Dagegen findet sich in den CHP behandelten Zellen eine diffuse FAK-Verteilung (Abb. 3.15b).

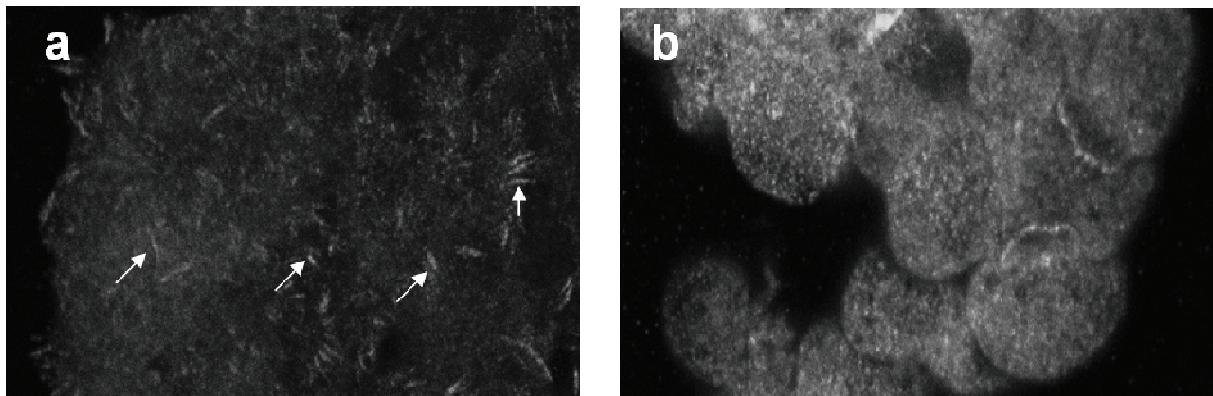


Abbildung 3.15 Nachweis der FAK-Lokalisation mittels Immunfloreszenz.

Nach Inkubation mit dem FAK spezifischen Antikörpers wurde die Bindung des primären Antikörpers durch einen AlexaFluorTM-gelabelten Antikörper nachgewiesen. Die Analyse erfolgte durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie (Leica TCS SP[“] AOBS). *Pfeile, focal adhesions*.

3.1.9 Einfluss von CHP auf Apoptose

Die Abnahme der Zahl vitaler Zellen unter CHP-Behandlung deutete auf eine mögliche Induktion von Apoptose durch CHP hin. Mit Hilfe der Western-Blot-Technik wurde die Aktivierung von Caspase3 untersucht, um so Apoptose nachweisen zu können. Die Aktivierung von Caspase3 verläuft in zwei Schritten. Procaspsase3 mit einem Molekulargewicht von 32kD (p32) wird zunächst proteolytisch in die beiden Untereinheiten p12 und p20 gespalten. Aus dem 20 kD-Fragment wird in einem zweiten Proteolyseschritt die aktive Caspase3 von 17kD (p17) gebildet. Während der erste Schritt unspezifisch von verschiedenen Proteasen und auch Nicht-Caspasen katalysiert werden kann, erfolgt der zweite Schritt vor allem autokatalytisch^{75,76}.

In den über 24 Stunden mit CHP inkubierten Zellen konnte das für aktivierte Caspase3 typische Protein von 17kD gefunden werden. Die Expression dieses an Apoptoseprozessen beteiligten Enzyms war nach 48 Stunden deutlich erhöht (Abb.3.16).

Der Caspase3-Inhibitor zDEVD-fmk konnte die Autoprozessierung zur aktiven p17-Untereinheit verhindern. Dementsprechend nahm die Expression der p20-Untereinheit zu (Abb.3.16). Dies zeigte, dass die initiale Proteolyse des Enzyms nicht Caspase3 abhängig war.

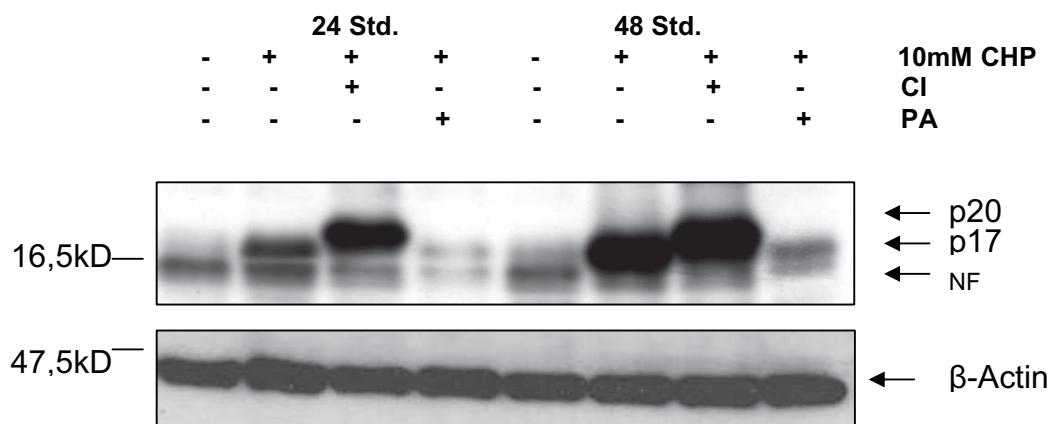


Abbildung 3. 16 Analyse der Caspase-Aktivierung.

Nach Herstellung von Proteinextrakten folgte die Analyse mittels Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern gegen aktivierte Caspase3. PI, Proteaseinhibitor. CI, Caspase-Inhibitor zDEVD-fmk (100µM) .

Ein weiteres, charakteristisches Zeichen der Apoptose ist die Degradation der genomischen DNA in multiple Fragmente, die als DNA-Leiter dargestellt werden kann. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA aus 24 Stunden oder 48 Stunden mit 10mM CHP behandelten Zellen zeigte die typische DNA-Leiter, die in den unbehandelten Kontrollen nicht nachzuweisen war (Abb. 3.17).

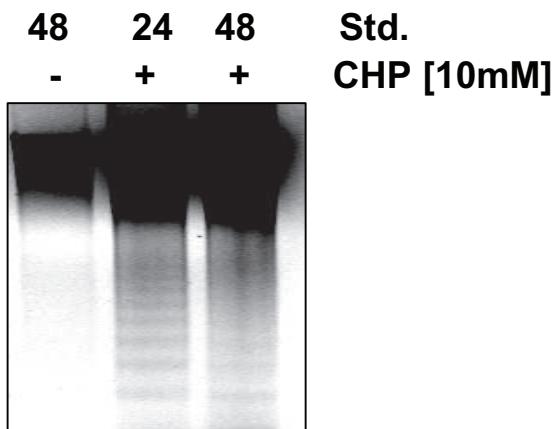


Abbildung 3.17 DNA-Degradation.

Die isolierte DNA wurde in einem 1,5%, Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Weiterhin wurde der Einfluss von CHP auf das anti-apoptotische Protein Bcl2 untersucht. Der Nachweis mittels Western Blotting zeigte, dass es nach 48-stündiger Inkubation mit CHP zu einer Spaltung und Inaktivierung des Bcl2 Proteins mit Erscheinen eines Fragments von etwa 17 kD kommt (Abb. 3.18). Parallel dazu konnte auch das gespaltene PARP-Protein von 85 kD nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Dies stellt ebenfalls ein für die Apoptose charakteristisches Merkmal dar. Die durch Degradation von Caspase3 und PARP sowie die Bcl2-Spaltung nachgewiesene, CHP-induzierte Apoptose, konnte durch Vorbehandlung der Zellen mit einem Breitspektrum-Proteaseinhibitor verhindert werden (Abb. 3.16 und Abb. 3.18). Während die Fragmentierung von Caspase3 die Aktivierung des Enzyms bewirkte, resultierte aus der Degradation von PARP und Bcl2 die Inaktivierung dieser anti-apoptotischen Proteinfaktoren. Insgesamt konnte aus der CHP-induzierten Fragmentierung dieser drei Proteine eine pro-apoptotische Wirkung abgeleitet werden.

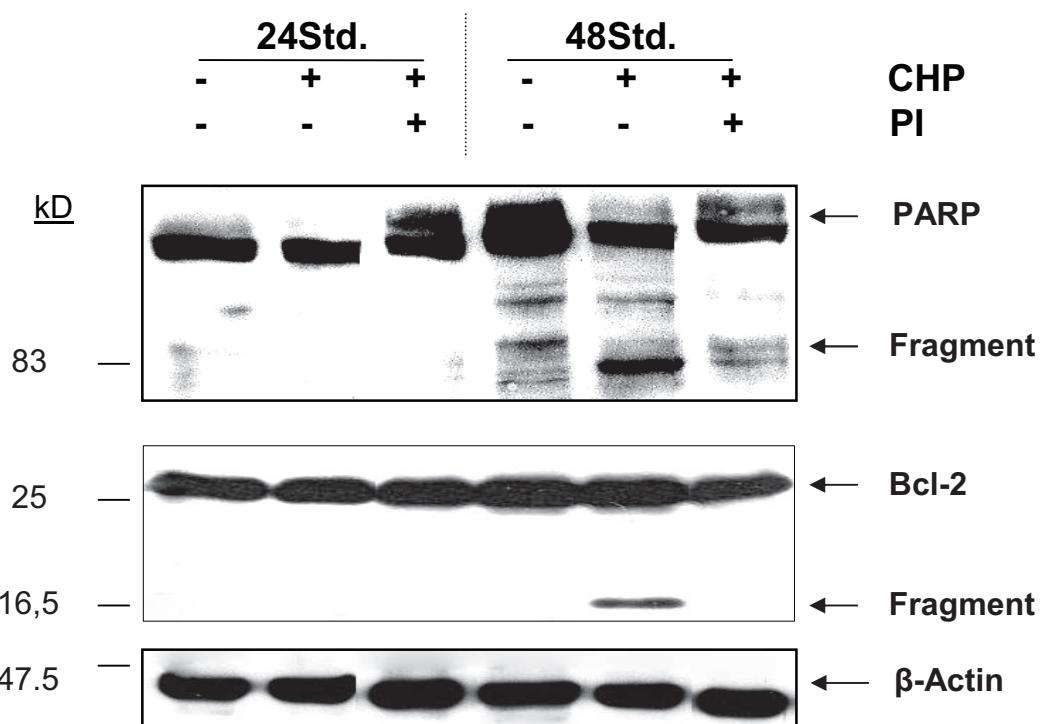


Abbildung 3.18 Induktion von Apoptose durch CHP. Analayse von PARP und Bcl2.

Nach Herstellung von Proteinextrakten folgte die Analyse mittels Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern gegen (poly (ADP) ribose polymerase (PARP) und Bcl2. PI, Proteaseinhibitor. CI, Caspase-Inhibitor zDEVD-fmk (100 μ M) .

3.1.10 Verlust der Adhärenz und Überleben

Um zu zeigen, dass die CHP induzierte Apoptose nicht eine Folge des Adhärenzverlustes ist, wurde das Überleben der Zellen in Suspensionskulturen mit denen in Monolayer-Kulturen verglichen. Da die Zellen den gleichzeitigen Entzug von FCS und Adhärenz nicht vertrugen, wurden diese Versuche mit 10% FKS enthaltenem DMEM als Zellkulturmedium durchgeführt.

Die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen war in der Suspension tatsächlich um etwa 15% geringer als in der Monolayer-Kultur. Allerdings war die Abnahme nach CHP-Behandlung mit etwa 40% deutlich stärker, wobei die CHP-vermittelte Reduktion der Abnahme durch CHP in der Suspensions- und Monolayer-Kultur keinen signifikanten Unterschied aufwies (Abb. 3.19).

Mikroskopisch zeigte sich, dass die Zellen in Suspensionskultur stark zu Aggregation neigten und Sphäroid-ähnliche Strukturen bildeten (Abb. 3.20a). CHP verhinderte diese Reaktion, so dass die Suspensionszellen größtenteils vereinzelt blieben (Abb. 3.20b).

Auch bei der Untersuchung der FAK konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen Monolayer- und Suspensionszellen nachgewiesen werden (Abb. 3.21).

Ergebnisse

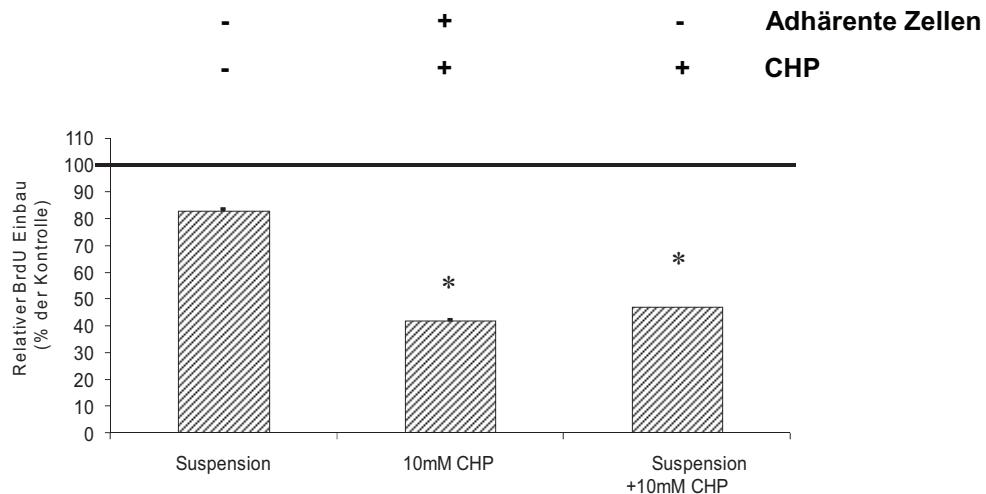


Abbildung 3.19 Verhalten der DSL6A-Zellen in Suspension.

Um das Anheften der Zellen zu verhindern, wurden die wells der Platte vorher mit 2% Agarose beschichtet. Das Überleben der Zellen wurde 4 Stunden nach Zugabe der CellTiterAQueous Lösung an Hand des Umsatz des MTS Salzes gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler relativ zu den unbehandelten, adhärenen wachsenden Kontrollen dargestellt (n=6); *p< 0,05.

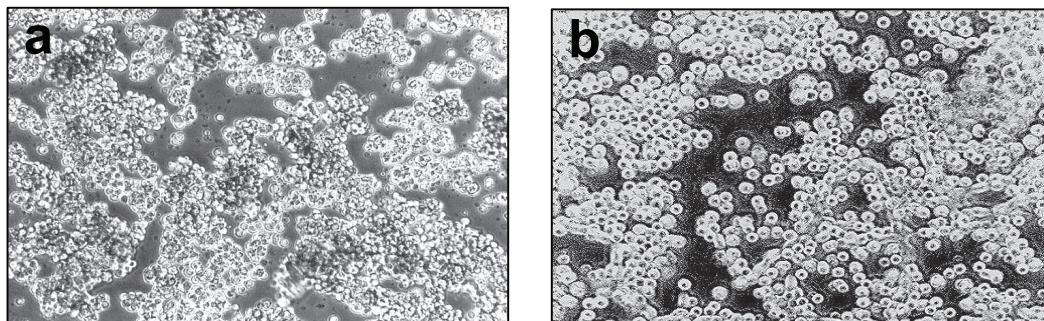


Abbildung 3.20 Verhalten der DSL6A-Zellen in Suspension.

Einfluss von CHP auf die Morphologie der DSL6A-Zellen in Suspension. Die Zellen wurden in 6well-Platten eingesät, die wie unter Abb. 3.19 beschrieben mit Agarose beschichtet waren (a) Kontrolle (b) Zusatz von 10mM CHP (Phasenkontrast-Mikroskopie, 100fache Vergrößerung).

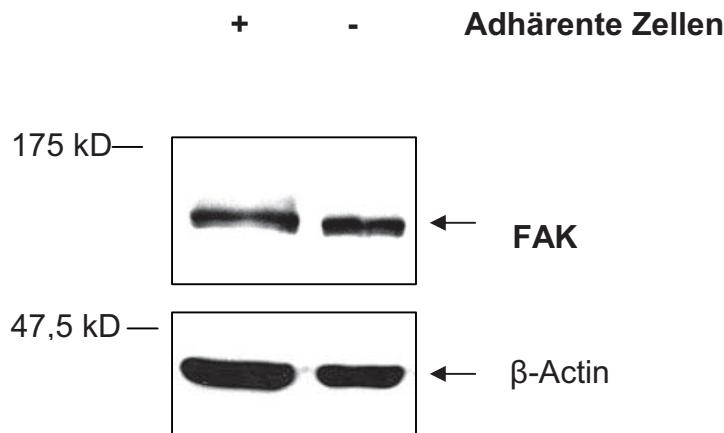


Abbildung 3.21 Analyse des FAK-Levels bei Wachstum der Zellen in Suspension.

Nach Herstellung von Proteinextrakten erfolgte die Analyse mittels Immunoblotting unter Benutzung eines FAK spezifischen Antikörpers.

3.2 Humane Karzinom-Zelllinien

Nach den Ergebnissen mit der Ratten-Zelllinie DSL6A wurden die Versuche auf humane Karzinom-Zelllinien ausgedehnt, um hier die CHP-Wirkung zu bestätigen oder gegebenenfalls mögliche Unterschiede zu finden. Wir verwendeten die Zelllinien Capan2, Panc1 und MiaPaCa. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres Differenzierungsgrads (Capan2: G1, MiaPaCa und Panc1: G3) und weisen verschiedene Mutationen in Tumorsuppressor- bzw. Onkogenen auf (siehe Material und Methoden, Zellkultur, Tab. 2.1). Schon in der mikroskopischen Verlaufsbeobachtung der CHP-Wirkung zeigten sich Unterschiede zu den DSL6A-Zellen. Wie in Abbildung 3.22b zu erkennen, begann erst nach vier Tagen unter CHP die Abrundung der Capan2-Zellen. Dies war ein deutlich längeres Zeitintervall verglichen mit den DSL6A-Zellen. Dort begann der Ablöseprozess schon nach 8 Stunden und betraf nach 24 Stunden fast alle Zellen.

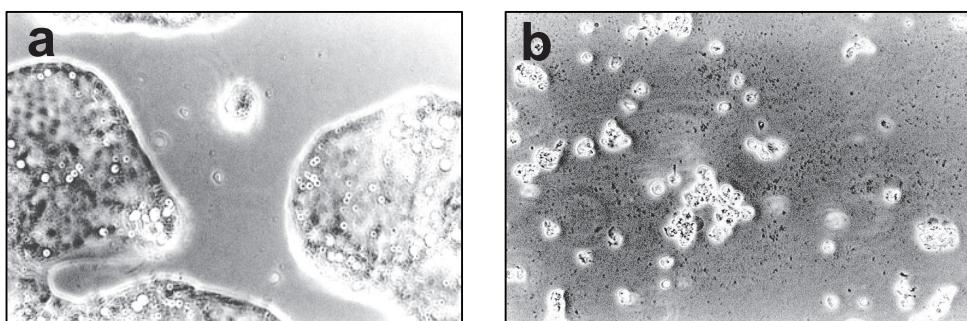


Abbildung 3.22 Einfluss von CHP auf Morphologie der Capan2-Zellen.

a) Kontrolle b) 4 Tage 10mM CHP (Phasenkontrast-Mikroskopie, 100fache Vergrößerung).

Ergebnisse

Neben der Differenz bei der Zeitabhängigkeit der CHP-Wirkung auf morphologischer Ebene unterschied sich auch das Resultat des Zellproliferationstests von den DSL-Zellen.

Unter gleichen Bedingungen zeigte sich zwar auch bei den Capan2-Zellen eine CHP verursachte Hemmung der Proliferation, jedoch war diese wesentlich schwächer ausgeprägt. Nach 24-stündiger Inkubation mit 10mM CHP fand sich eine Reduktion des BrdU-Einbau auf 44% des Kontrollwerts (Abb. 3.23), bei den DSL-6A Zellen auf etwa 20%.

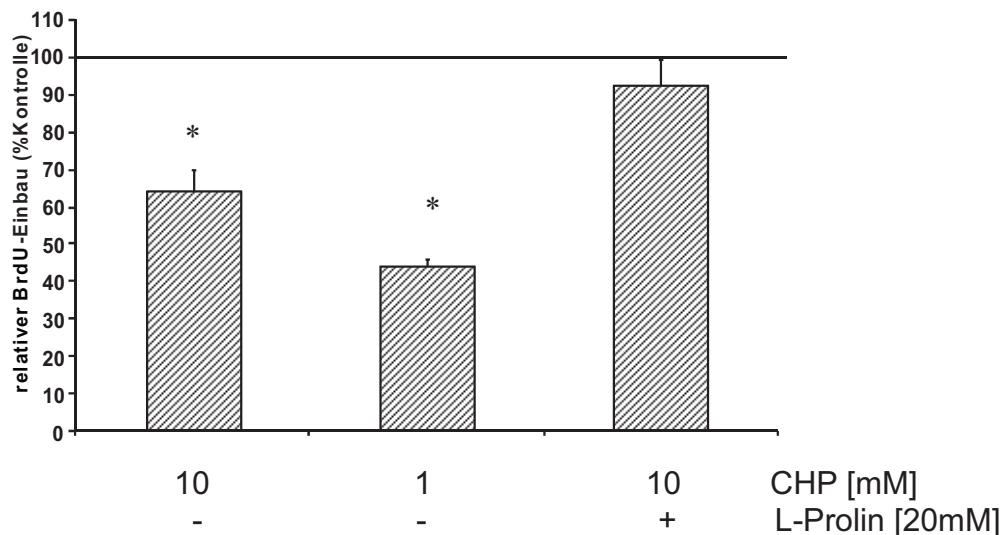


Abbildung 3.23 Hemmung der Proliferation der Capan2-Zellen.

Messung des BrdU-Einbau von Capan2-Zellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler relativ zu den unbehandelten, adhären wachsenden Kontrollen dargestellt ($n=6$); $*p < 0,05$.

Diese Resultate und Beobachtungen ließen auch in der Signaltransduktion Unterschiede erwarten, so dass nun auch die humanen Karzinomzellen auf ER-Stress und FAK-Proteolyse untersucht wurden. Hier zeigte sich bei den Capan2-Zellen im Western Blotting eine hohe konstitutive Expression des GRP78, die durch CHP nicht beeinflussbar war (Abb.3.24).

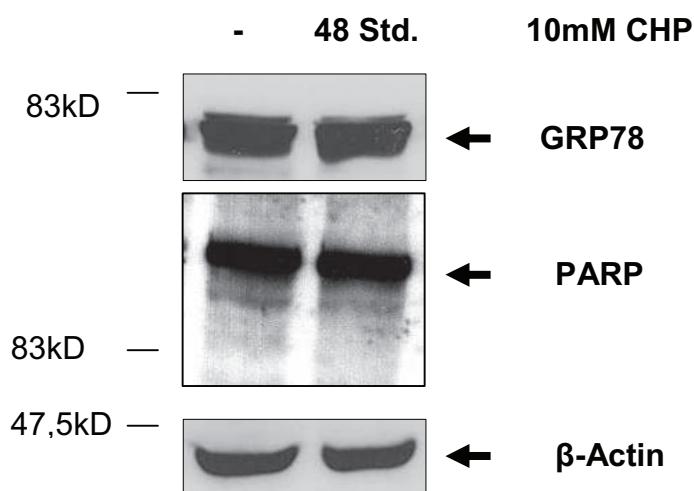


Abbildung 3.24 Einfluss von CHP auf Capan2-Zellen.

Einfluss von CHP auf GRP78 und PARP. Nach Herstellung von Proteinextrakten erfolgte die Analyse mittels Immunoblotting unter Benutzung eines GRP78 bzw. PARP spezifischen Antikörpers.

Ergebnisse

Auch die Panc1-Zellen zeigten ein basales GRP78-Signal in unbehandelten Zellen, hier kam es aber unter CHP zu einer Steigerung der GRP78-Expression auf Proteinebene. Der Anstieg der GRP78-Expression war im Verlauf jedoch schwächer und dauerte deutlich länger als bei den DSL6A-Zellen.

So war ein Anstieg des GRP78-Signals erst nach 24 Stunden unter 10mM CHP nachweisbar, um schließlich nach 72-stündiger CHP-Inkubation deutlich zu zunehmen (Abb.3.26). Im Vergleich dazu fand sich bei den DSL6A-Zellen schon nach 6 Stunden unter 10mM CHP ein deutlicher Anstieg der GRP78-Expression, die nach 24-stündiger CHP-Inkubation schon ihr Maximum erreichte.

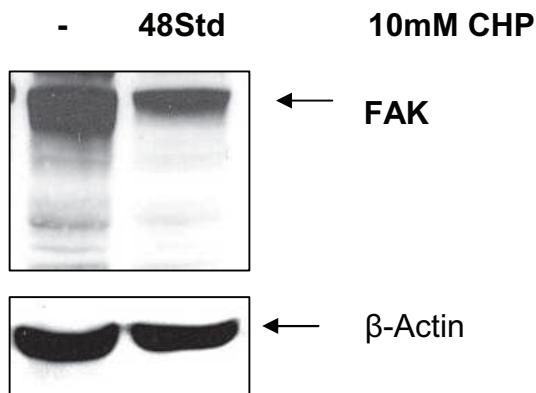


Abbildung 3.25 Analyse des FAK-Levels bei Capan2-Zellen.

Analyse mittels Immunoblotting unter Benutzung eines FAK spezifischen Antikörpers. Zum Nachweis gleicher Proteinbeladung wurden die Membranen gestript und mit einem für β-Actin spezifischen Antikörper reprobt.

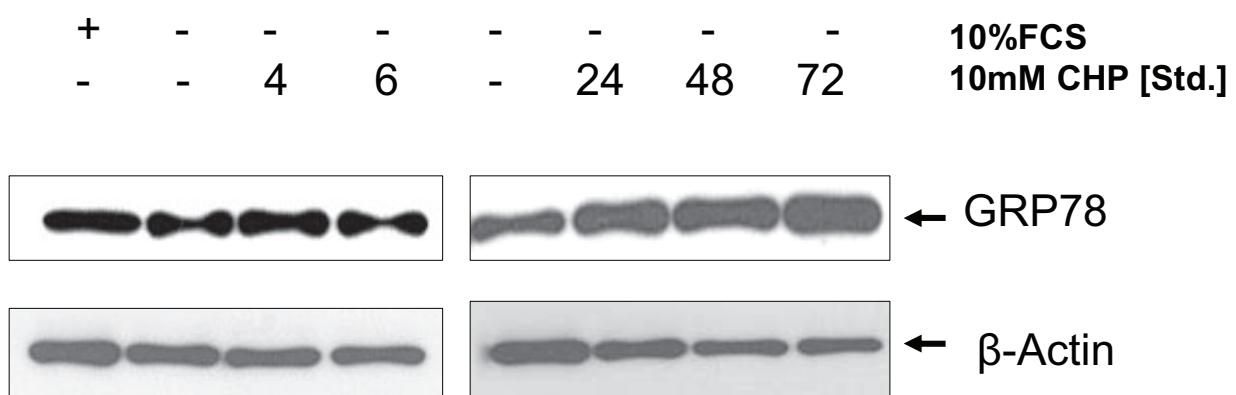


Abbildung 3.26 Einfluss von CHP auf GRP78 bei Panc1-Zellen.

Nach Herstellung von Proteinextrakten erfolgte die Analyse mittels Immunoblotting unter Benutzung eines GRP78 spezifischen Antikörpers. Zum Nachweis gleicher Proteinbeladung wurden die Membranen gestript und mit einem für β-Actin spezifischen Antikörper reprobt.

Hinsichtlich des PARP-Signals kommt es bei den Capan2-Zellen unter CHP zu keiner Veränderung (Abb. 3.24).

Ähnlich wie die Capan2-Zellen verhielten sich auch die MiaPaCa-Zellen in Bezug auf GRP78. Diese Zellen besitzen ebenfalls eine basale GRP78-Expression, die sich unter CHP Inkubation, ob mit oder ohne FCS, nicht veränderte (Abb. 3.27).

Hinsichtlich des FAK-Signalweges zeigten die MiaPaCa-Zellen Ähnlichkeiten zu den DSL6A-Zellen. CHP führte zur Abnahme des FAK-Proteinexpression mit zeitgleicher Fragmentierung, wobei sich jedoch die Fragmentgröße unterschied (Abb. 3.27). Weiterhin fiel auf, dass sich bei MiaPaCa-Zellen, die mit bzw. ohne FKS-haltigem Medium inkubiert wurden, unterschiedliche Fragmente nachweisen ließen. So zeigte sich ein Fragment von etwa 90 kD nur bei den MiaPaCa-Zellen, die mit 10mM CHP in FKS-haltigem Medium inkubiert worden waren. Im Gegensatz dazu trat bei den mit Medium ohne FKS inkubierten MiaPaCa-Zellen ein Fragment mit kleinerem Molekulargewicht in den Vordergrund. Es war schon in den unbehandelten Zellen nachweisbar, nahm aber unter CHP-Behandlung in seiner Intensität ab. Dagegen zeigte dieses Fragment bei Zellen in FKS-haltigem Medium keine Veränderung unter CHP.

Wie Abbildung 3.25 zeigt, besitzen Capan-2 Zellen eine starke FAK-Expression, die unter 48-stündiger CHP-Inkubation kaum abnimmt. Auch eine durch CHP verursachte Fragmentierung der FAK war nicht erkennbar.

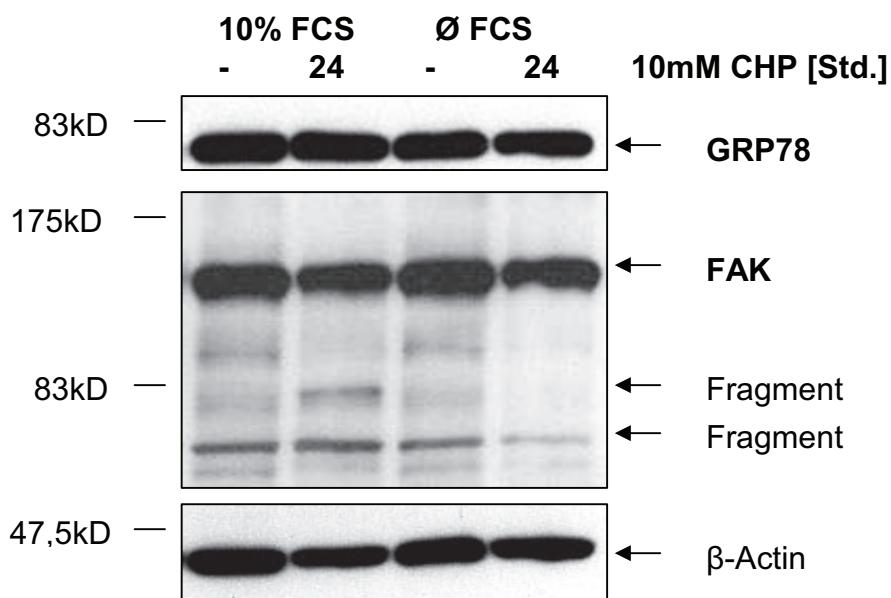


Abbildung 3.27 Analyse des FAK-Levels und GRP78-Levels bei MiaPaCa-Zellen.

Nach Herstellung von Proteinextrakten erfolgte die Analyse mittels Immunoblotting unter Benutzung eines FAK spezifischen Antikörpers. Zum Nachweis gleicher Proteinbeladung wurden die Membranen gestript und mit einem für β -Actin spezifischen Antikörper reprobt.

3.3 Pankreatische Stellate-Zellen

Um auch die biologischen Wirkung von CHP auf eine Fibroblastenpopulation zu analysieren, wurden zusätzlich Versuche mit Stellate-Zellen des Ratten-Pankreas unternommen. Diesen Zellen wird auch eine Bedeutung für die Entwicklung des Pankreaskarzinoms zugeschrieben (siehe Einleitung).

Im Vergleich zu den Karzinom-Zelllinien waren die morphologischen Veränderungen sowohl primärer (PSZ) als auch immortalisierter (LTZ14) Stellate-Zellen während der CHP-Inkubation weniger deutlich ausgeprägt. PSZ bildeten auch nach 24 Stunden einen geschlossenen Monolayer, bei den LTZ14 hatte sich nur ein geringer Teil abgerundet oder abgelöst (Abb. 3.28 a-d).

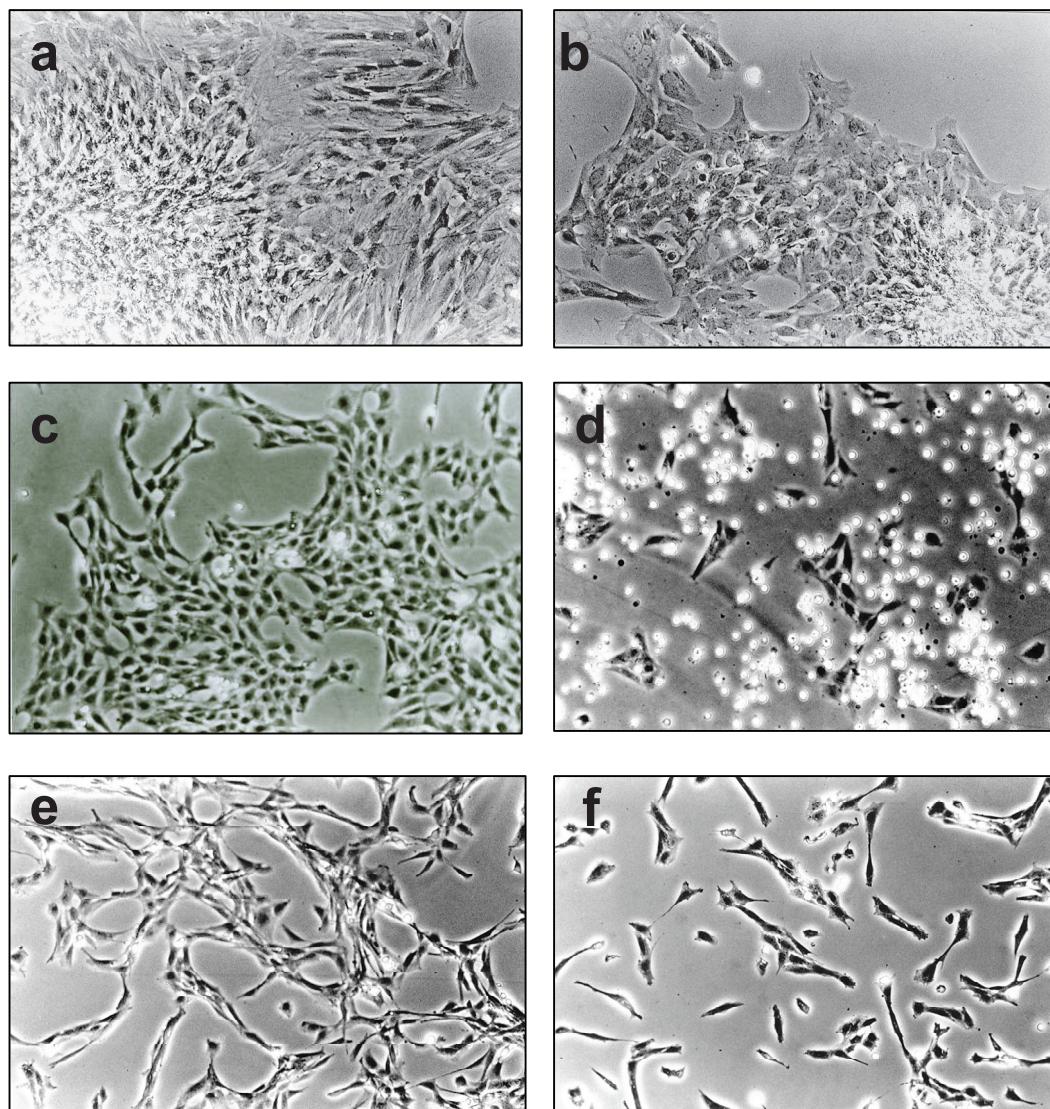


Abbildung 3.28 Einfluss von CHP auf Morphologie von Stellate-Zellen.

Adhärent wachsende Kontrolle der pankreatischen Stellate-Zellen (PSZ) (a) und Inkubation der PSZ mit 10mM CHP für 24 Stunden (b). Adhärent wachsende Kontrolle der immortalisierten, pankreatischen Stellate-Zelllinie LTZ14 (c) und Inkubation der LTZ14 mit 10mM CHP(d), 10ng/ml PDGF(e) und CHP + PDGF(f) (Phasenkontrast-Mikroskopie, 100fache Vergrößerung).

Ergebnisse

Die Untersuchung der Proliferation erbrachte eine zeit- und dosisabhängige Hemmung des BrdU-Einbaus durch CHP. Die PSZ reagierten bei CHP-Dosen von 10mM mit einer etwas stärkeren Hemmung als die LTZ14 (Abb. 3.29 und 3.30).

Dagegen war eine Dosis von 0,1mM CHP bei den primären Stellate-Zellen fast wirkungslos, während die LTZ14 auf diese Konzentration mit einer Abnahme des BrdU-Einbau auf etwa 75% des Kontrollwertes reagierten (Abb. 3.30).

PDGF ist als Stimulator der Stellatezell-Proliferation beschrieben worden^{66,67,77,78}. Dieser Wachstumsfaktor wurde nun zusammen mit CHP untersucht. Wie erwartet, führte die alleinige Inkubation mit 10ng/ml bzw. 1ng/ml PDGF zu einer dosisabhängigen, signifikanten Steigerung des BrdU-Einbaus auf über 250% bzw. 150% des Kontrollwertes. Wurden die LTZ14 jedoch mit 10mM CHP und PDGF zusammen inkubiert, konnte die wachstumsstimulierende Wirkung von PDGF durch CHP überwunden werden (Abb. 3.31).

In der Phasenkontrast-Mikroskopie zeigte sich, dass die PDGF-Gabe zu einem „gitternetzartigen“ Wachstum der Stellate-Zellen führte. Die zusätzliche CHP-Gabe verhinderte auch vollständig dieses Wachstumsverhalten der Zellen (Abb. 3.28a e, f).

So hemmte CHP auch die durch PDGF stimulierte Proliferation der Stellate-Zellen.

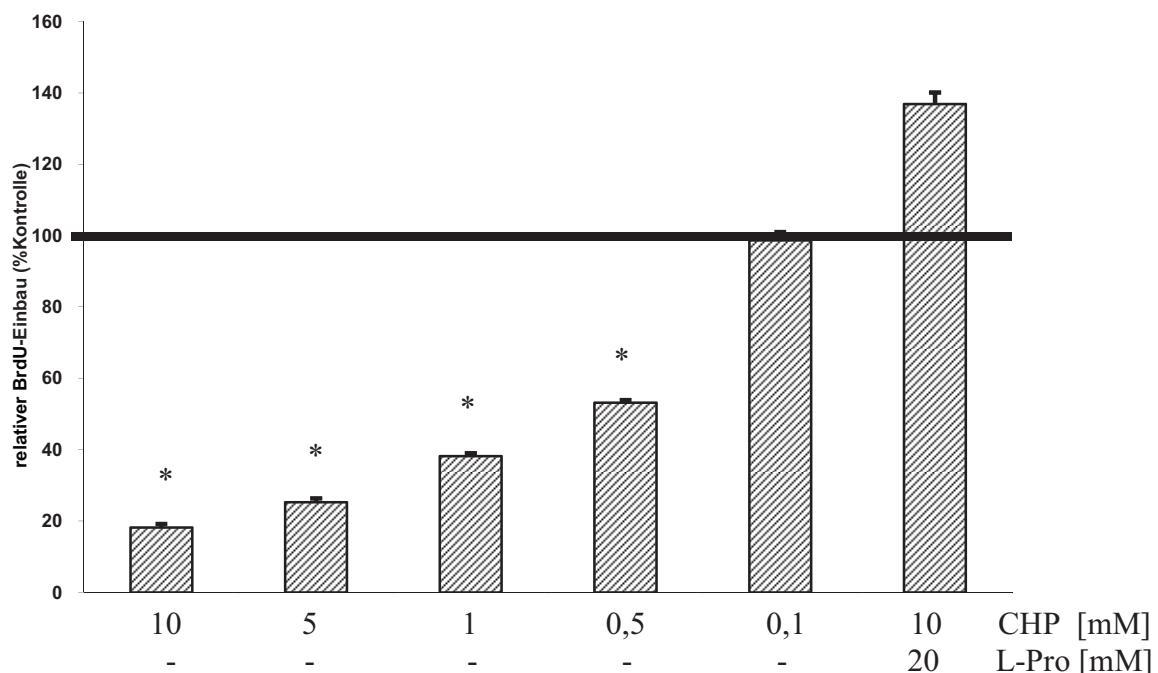


Abbildung 3.29 Einfluss von CHP auf die Proliferation von PSZ.

Die Zellen wurden in 10% FKS enthaltendem DMEM suspendiert und in 96well Zellkultur-Platten eingesät (1x 10⁴ Zellen/well Adhärente Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 10mM CHP und 10mM CHP + 20mM L-Prolin inkubiert. Die Zugabe von BrdU erfolgte zeitlich so, dass die Zellen insgesamt 20 Stunden mit BrdU inkubiert waren. Dann wurde der BrdU-Einbau quantifiziert.

Ergebnisse

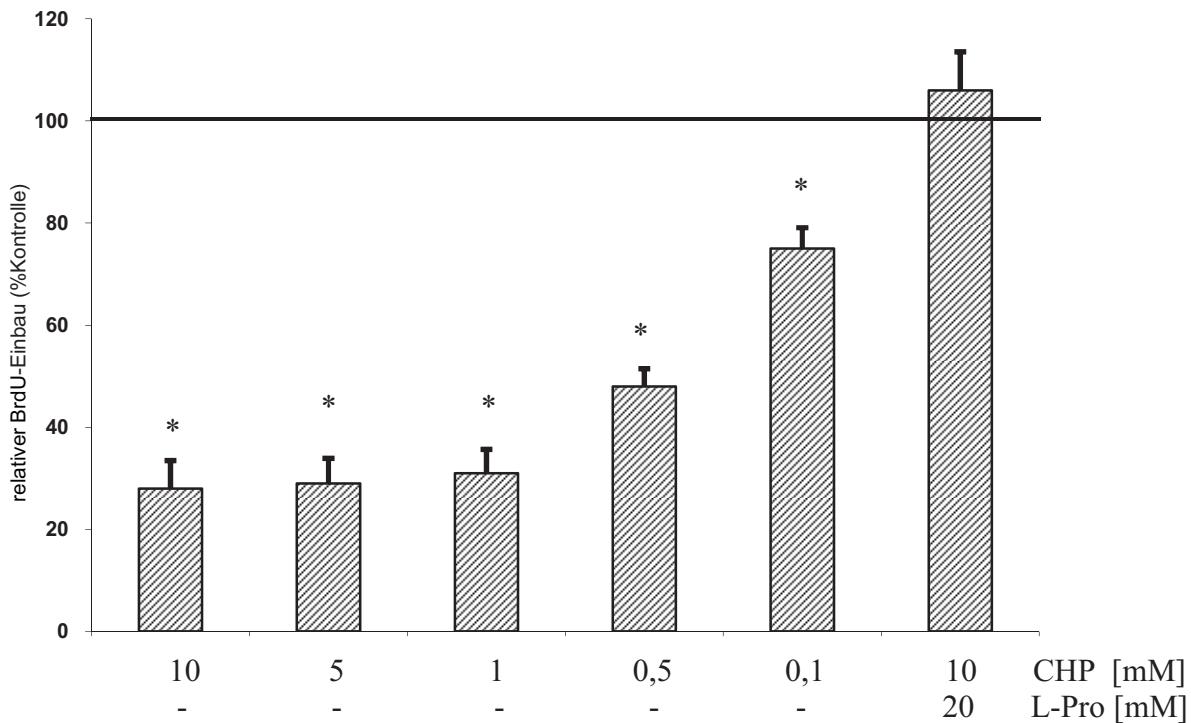


Abbildung 3.30 Einfluss von CHP auf die Proliferation LTZ14-Zellen.

Die Zellen wurden in 10% FKS enthaltendem DMEM suspendiert und in 96well Zellkultur-Platten eingesetzt (3×10^3 Zellen/well). Adhäsente Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 10mM CHP und 10mM CHP + 20mM L-Prolin inkubiert. Die Zugabe von BrdU erfolgte zeitlich so, dass die Zellen insgesamt 20 Stunden mit BrdU inkubiert waren. Dann wurde der BrdU-Einbau quantifiziert.

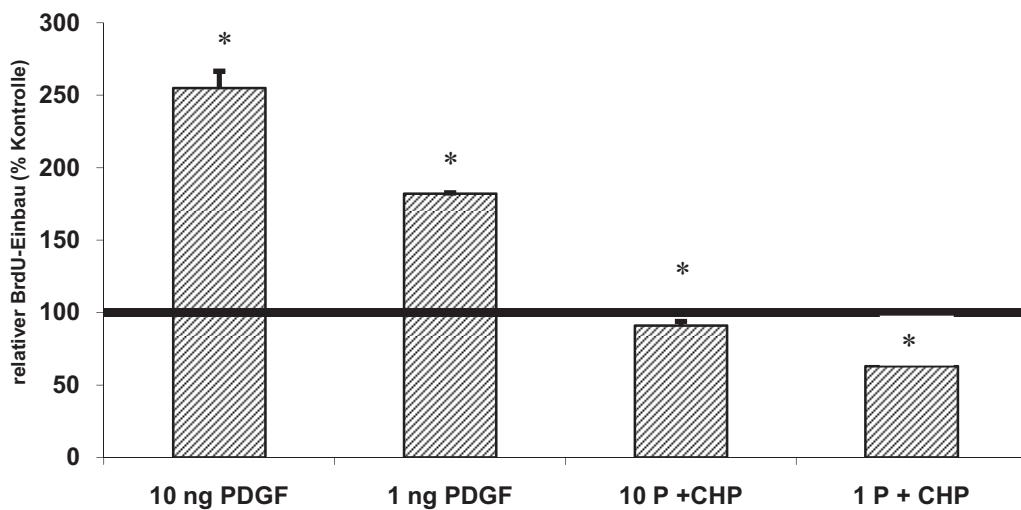


Abbildung 3.31 Einfluss von CHP auf Morphologie und Proliferation von Stellate-Zellen.

Einfluss von CHP und PDGF auf Proliferation der LTZ14. Die Zellen wurden wie unter (B) beschrieben kultiviert und mit 10ng/ml bzw. 1 ng/ml PDGF ohne oder mit 10mM CHP behandelt. Danach folgten die Inkubation mit BrdU (siehe unter (B)) und die Messung des BrdU-Einbaus. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler relativ zu den unbehandelten, adhäsent wachsenden Kontrollen dargestellt (n=6); * p < 0,05.

4 Diskussion

4.1 DSL6A-Zellen

4.1.1 Wachstumshemmung und Adhärenzverlust

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Prolinanalogon *cis*-Hydroxyprolin (CHP) eine wachstumshemmende Wirkung auf Tumorzellen sowie auf Fibroblasten hat, wobei die wirksamen Konzentrationen und die erforderlichen Inkubationszeiten deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Zellpopulationen aufwiesen. Diese Differenzen konnten im Rahmen der vorgestellten Experimente auf zellspezifische molekulare Mechanismen zurückgeführt werden.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Pankreaskarzinom-Zelllinie der Ratte DSL6A. Dadurch wurde die Option geschaffen, Ergebnisse der *in vitro* – Experimente im orthotopen tierexperimentellen Modell unter Verwendung immunkompetenter Ratten *in vivo* zu überprüfen.

Der wachstumshemmende Einfluss von CHP auf die DSL6A-Zellen zeigte eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit. Diese Ergebnisse stimmen mit früher beschriebenen Resultaten bei Fibroblasten, Mammakarzinom- und Retinaepithel-Zellen überein^{24,25}.

Die beschriebene Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Reduktion des Zellwachstums durch CHP ist besonders vor dem Hintergrund einer potentiellen therapeutischen *in vivo*-Anwendung von Bedeutung und muss bei Behandlungskonzepten berücksichtigt werden.

Ein charakteristisches Merkmal des CHP-Effektes war der Adhärenzverlust der DSL6A-Zellen. Dieses Phänomen begann ca. 6 Stunden nach CHP-Inkubation mit dem Abrunden der Zellen, nach 24 Stunden hatten sich etwa 90% der Zellen abgelöst.

In Epithelzellen führt der Verlust der Adhärenz nach kurzer Zeit zur Induktion von Apoptose, der so genannten Anoikis (griech. Heimatlosigkeit). Im Gegensatz dazu wurde bei Karzinomzellen eine Resistenz gegenüber Anoikis beschrieben^{79,80}. Auch die DSL6A-Zellen besitzen eine solche Resistenz, die es möglich machte, die Zellen in Agarose beschichteten Platten als Suspensionskultur zu halten.

Wurden die DSL6A-Zellen in Suspension gehalten, ohne dass eine gleichzeitige Inkubation mit CHP erfolgte, überlebten der größte Teil der Zellen 48 Stunden. Bei gleichzeitigem Entzug von FKS jedoch war die Kultivierung der Zellen in Suspension nicht möglich. Ebenso reagierten die in Suspension kultivierten Zellen empfindlicher auf CHP als die Zellen in Monolayer-Kultur.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der durch CHP verursachte Adhärenzverlust der DSL6A-Zellen weder die Folge von Apoptose noch unmittelbar assoziiert mit dem Absterben der Zellen war. Es handelte sich bei den aufgrund der CHP-Inkubation abgelösten Zellen zum großen Teil um vitale Zellen. Erst längere Inkubationszeiten von mehr als 48 Stunden mit CHP führten bei den DSL6A-Zellen zum Zelltod.

Insgesamt zeigte dies, dass diese Tumorzellen über Mechanismen verfügen, die ihnen erlauben, sich der Anoikis zu entziehen. Das CHP-induzierte Absterben der DSL6A-Zellen ist somit die Konsequenz komplexer (CHP-induzierter) Signalwege und nicht nur die Folge des Adhärenzverlustes.

Weder Adhärenzverlust, d.h. Kultivierung in Suspension, noch Entzug von Serum und damit Wachstumsfaktoren bewirkten allein ein verstärktes Absterben der Zellen. Werden jedoch beide Faktoren bei der Zellkultivierung verbunden oder kommt eine Inkubation mit CHP hinzu, so resultiert ein verstärktes Absterben der Zellen.

Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die durch CHP induzierten Signalwege mit Integrinen und Wachstumsfaktoren interagieren.

Für einen gewissen Zeitraum kann offenbar der Ausfall bzw. die Aktivierung eines Signalweges durch die Zellen kompensiert werden. Hingegen ist beim gleichzeitigen Auftreten von zwei der oben genannten Faktoren eine Kompensation nicht möglich. Die Untersuchung der Auswirkung von Inhibitoren von Wachstumsfaktoren- oder Integrin-Signalwegen in Kombination mit CHP sollte somit einen Ansatz für weitere Versuche bieten.

Um zu untersuchen, ob sich die Wachstumshemmung auch auf der Ebene der regulatorischen Zellzyklus-Proteine widerspiegelt, wurde das für den Übergang von der G1 zur S-Phase notwendige CyclinD1 mittels Western Blotting analysiert. Eine Bedeutung von CyclinD1 für das humane Pankreaskarzinom beschrieben Bankin et al, die eine Überexpression in fortgeschrittenen PanIn-Formen und im invasiven Karzinom zeigen konnten⁸¹.

CHP verursachte eine Abnahme des CyclinD1-Proteinspiegels, die nach 48-stündiger Inkubation am stärksten ausgeprägt war. Dieser Verlauf zeigte sich somit parallel zur der im BrdU-ELISA gemessene Wachstumshemmung und ging mit dem Abrunden bzw. dann auch dem Ablösen der Zellen einher.

Interessant war hier die Tatsache, dass der Breitspektrum-Proteaseinhibitor diesen Effekt abschwächen konnte. Dieser Befund lässt eine Regulation durch Proteolyse vermuten.

4.1.2 Kollagensynthese und Induktion von HSP47

Verschiedene Autoren sahen die Hemmung der Kollagensynthese und insbesondere von Kollagen Typ IV mit entsprechender Hemmung des Basalmembranaufbaus als Erklärung für die CHP-induzierte Wachstumshemmung bei Epithel- und Karzinomzellen an^{23,25}.

Bereits 1975 wurde von Uitto et al. gezeigt, dass nicht-helikales, CHP-haltiges Prokollagen im ER von tierischen Zellen zurückgehalten wird²². Die molekularen Konsequenzen dieser Beobachtung konnten die Autoren zu dieser Zeit jedoch noch nicht nachweisen.

Neuere Untersuchungen zur Proteinsynthese haben gezeigt, dass das *heat shock protein* (HSP)47 eine essentielle Komponente für die Generierung einer korrekten räumlichen Kollagenstruktur in der Zelle darstellt. In Bezug auf die Kollagensynthese liegt die Rolle dieses im ER-Lumen lokalisierten Proteins in der korrekten Faltung der Prokollagen-Ketten. Bei Untersuchungen zur Fibrose der Leber korrelierte die Syntheserate von HSP47 mit der Kollegenexpression^{82,83} bzw. der Anhäufung falsch-gefalteten Kollagens im ER-Lumen^{82,84-87}. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stieg unter dem Einfluss von CHP in den DSL6A-Zellen der mRNA-Spiegel von HSP47 an. Im Gegensatz zu den Literaturdaten war jedoch kein Einfluss von CHP auf die Expression von Kollagen Typ IV nachweisbar. Berücksichtigt man weiterhin, dass DSL6A-Zellen kein Kollagen Typ I synthetisieren, so ist eine ausschließlich Korrelation zwischen Steigerung der HSP47-Expression und vermehrter Kollagensynthese eher unwahrscheinlich.

Somit scheint die Erhöhung des HSP47-Spiegel unter CHP eine Anhäufung falschgefalteter Proteine im ER widerzuspiegeln.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Prolinanaloge nicht nur in Kollagen, sondern auch in andere Proteine eingebaut werden^{88,89}. Baum et al. beschrieben so den Einbau des Prolinanalogons L-Azetidine-2-Carbonsäure in Hämoglobin bei Kaninchen-Retikulozyten⁸⁸.

Dies lässt vermuten, dass auch CHP nicht nur in Kollagen, sondern auch in alle anderen von der Zelle synthetisierten Proteine eingebaut wird.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass CHP über komplexe Mechanismen zur Störung des zellulären Proteinsynthese-Apparates führt.

4.1.3 ER-Stress

Wie bereits ausgeführt, ist eine ausschließliche Wirkung von CHP auf die Kollagensynthese in den DSL6A-Zellen unwahrscheinlich. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die Beeinträchtigung der Synthese Prolin-haltiger Proteine durch CHP zu einer komplexen Störung des zellulären Proteinstrukturaufbaus und -metabolismus führt. Die Anhäufung strukturell veränderter Proteine im endoplasmatischen Retikulum durch CHP kann eine Stress-Situation in den Zellorganellen induzieren.

Ein Teil der ER-Stress-Maschinerie stellt die *unfolded protein response* (UPR) dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CHP in den DSL6A-Zellen die Expression von GRP78 und GADD153 induziert. Beide Proteine sind als Indikatoren des UPR (einem Teil des ER-Stress-Signalwegs) beschrieben worden^{27,36,39}. Dabei waren die Veränderungen auf der molekularen Ebene - im Gegensatz zu den zellbiologischen Effekten - wenige Stunden nach CHP-Zugabe nachweisbar. Erhöhte GRP78-Transkriptspiegel fanden sich bereits nach 3-stündiger Inkubation. Innerhalb von 6 Stunden kam es zu einer deutlichen Induktion beider Stress-Proteine mit einem Maximum nach 24 Stunden. Die Proteinspiegel von GRP78 in den Zellen korrelierten mit der mRNA-Konzentration.

Der zeitliche Verlauf des ER-Stress entsprach dem, der von anderen Autoren beschrieben wurde. Caspersen et al. fanden in der neuroendokrinen Rattenzelllinie PC12 unter dem Einfluss von Tunicamycin nach 6 Stunden eine Induktion von GRP78 und SERCA2b, bei Anwendung von DTT sogar schon nach 2-stündiger Inkubation³⁶.

Die von anderen Autoren beschriebene Aktivierung von NF-κB infolge einer ER-Stress-Reaktion im Rahmen der *ER overload response* konnte bei Inkubation der DSL6A-Zellen mit CHP nicht beobachtet werden^{7,37,38,90 27}. Dies lag an der hohen basalen NF-κB-Aktivität in den Zellen, die durch CHP nicht weiter gesteigert werden konnte. Eine konstitutive NF-κB-Aktivierung wurde auch von anderen Autoren in Zusammenhang mit dem humanen Pankreaskarzinom bzw. für Pankreaskarzinom-Zelllinien beschrieben^{91,92}.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur HSP47-Expression und der Beteiligung von ER-Stress können so über die Aspekte der früheren Veröffentlichungen aus den 70ziger und 80ziger Jahren hinaus die Wirkung von CHP auf Zellen erklären. Wurde damals die Wirkung von CHP ausschließlich mit der Störung der Kollagensynthese begründet²³⁻²⁵, ist dies nun in Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse nur ein Aspekt der CHP-Wirkung.

Die Inkubation von Zellen mit CHP führt über den Einbau in Kollagen und wahrscheinlich andere Proteine zur Störung der zellulären Proteinsynthese. Diese Störung bezieht sich vor allem auf die räumliche Proteinstruktur und führt zur Anhäufung falschgefalteter Protein im ER. Diese Bedingungen lösen nun ER-Stress und entsprechende Signalwege wie die *unfolded protein response* (UPR) aus.

4.1.4 Reversibilität

L-Prolin war in der Lage, die durch CHP verursachten Effekte zu verhindern. Dies konnte bei der Kombination einer Aminosäure mit deren Analogon wie im Falle des CHP über eine Kompetition in Bezug auf den Einbau in neu entstehende Proteine erwartet werden.

Wesentlich interessanter war jedoch die Beobachtung, dass die Zugabe von L-Prolin auch den CHP induzierten ER-Stress stoppen und die zelluläre Homeostase wiederherstellen konnte. Die von CHP verursachte Zellschädigung war bis zu 24 Stunden reversibel.

Die zellbiologischen Effekte spiegelten sich auch auf der molekularen Ebene wider. Die Transkriptspiegel von GRP78 erreichten 6 Stunden nach Prolin-Gabe wieder das Kontrollniveau, während dies auf Proteinebene mehr als 2 Tage dauerte. Nach den Beobachtungen von Liu et al. ist diese verspätete Abnahme des Proteins auf die lange Halbwertszeit von GRP78 zurückzuführen³⁴.

Im Verlauf der ER-Stress-Signalkaskade scheint es einen Punkt zu geben, nach dessen Überschreiten eine Reparatur des Schadens und damit das Weiterleben der Zelle auch nach Beseitigung der Ursache nicht mehr möglich ist. Dieser '*point of no return*' umfasste wahrscheinlich verschiedene Faktoren. So könnten die kompensatorischen Maßnahmen der Zelle - wie z.B. die Induktion des GRP78 - nach längerer Dauer des ER-Stress erschöpft sein und es könnte als Folge der Zelltod eingeleitet werden.

Für diese Annahme in Bezug auf den Verlauf von ER-Stress bei den DSL6A-Zellen sprachen zwei Beobachtungen. So war nach 24 Stunden Inkubation mit CHP einerseits das Maximum des GRP78-Proteinlevel erreicht, anderseits konnte nach 48-stündiger CHP-Inkubation eine Reversibilität durch L-Prolin nicht mehr beobachtet werden.

Die Verhinderung bzw. Beseitigung der CHP-Effekte durch L-Prolin muss bei dem Einsatz von CHP zur Entwicklung neuer zytostatischer oder anti-fibrotischer Therapiestrategien berücksichtigt werden. Die Konzentration von L-Prolin im Blutplasma des Menschen sowie auch der Ratte wurde mit 0,2mM angegeben. Die Konzentration im Gewebe kann sich allerdings von der im Blut unterscheiden. Außerdem ist bekannt, dass sich der Protein- bzw. Aminosäuremetabolismus und somit die aktuellen Aminosäurekonzentrationen im Verlauf einer Erkrankung verändern. Im Rahmen der chronischen Entzündung der Ratte bei *dextrane sulfate sodium* (DSS)- induzierter Kolitis wurde eine Anstieg der Plasmakonzentration von L-Prolin auf fast 0,3 mM gemessen⁹³.

Für eine Anwendung von CHP bei Patienten müsste daher zunächst eine Bestimmung der Prolin-Konzentration im entsprechenden Zielgewebe, z.B. im Pankreaskarzinom bzw. in der Pankreasfibrose, erfolgen. Die Einzeldosis sowie das Applikationsschema von CHP muss dann so gewählt werden, dass der effektive CHP-Spiegel im Verlauf mehrerer Tage höher als die Prolinkonzentration im Zielorgan liegt.

4.1.5 FAK-Proteolyse

Der von CHP initiierte Adhärenzverlust sowie die Resistenz gegenüber Anoikis der DSL6A-Zellen wiesen auf eine Beteiligung der *focal adhesion kinase* (FAK) hin.

Die *focal adhesion kinase* (FAK) ist eine 125 kD Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase. Als Aktivatoren können Wachstumsfaktoren und die Bindung der Zelle an die extrazelluläre Matrix (EZM) dienen. Entsprechend liegt die FAK in adhärenten Zellen als aktivierte, d.h. Tyrosin-phosphoryliertes Protein vor. Dabei ist die FAK in Bereichen der Interaktion von Integrinen und Zytoskelett mit der EZM, sogenannten *focal adhesion* oder auch *focal contacts*, lokalisiert⁴³⁻⁴⁵. Die phosphorylierte FAK bildet Komplexe mit Kinasen der Src-Familie und anderen Kinasen. Es folgt die Aktivierung von verschiedenen, komplexen Signalwegen. Diese sind an Zellproliferation und – überleben beteiligt⁴⁶. Weiterhin liegt die Rolle der FAK durch ihre Aktivität als Kinase und auch als Adaptorprotein in der Regulation des *Turnovers* von *focal adhesions* und damit der Migration der Zelle.

Der unter CHP-Inkubation charakteristische Adhärenzverlust der Zellen sowie ihre gewisse Resistenz gegenüber Anoikis führten zur Frage der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Da die *focal adhesion kinase* (FAK) in Zusammenhang mit beiden Effekten von Bedeutung ist, erfolgte die nähere Untersuchung dieser Kinase.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ablösen der DSL6A-Zellen unter dem Einfluss von CHP von einer Degradation und damit Inaktivierung der FAK begleitet wurde. Mehrere Autoren haben bereits einen Zusammenhang zwischen Zelladhärenz und FAK-Aktivität beschrieben^{74,94,95}. Die durch CHP verursachte Störung der Zellfunktion war mit einer proteolytischen Fragmentation und Inaktivierung der FAK in den DSL6A-Zellen verbunden.

Verschiedene Arbeiten lassen vermuten, dass die FAK essentiell für die Integrin-vermittelte Transduktion extrazellulärer Signale ist und zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege führt^{43,44,46,95,96}. Eine Aktivierung der FAK durch Phosphorylierung ist für verschiedene Zellpopulationen als Reaktion auf die Integrinbindung mit extrazellulären Liganden beschrieben worden^{45,46,90}. Zusätzlich berichten verschiedene Veröffentlichungen über die Regulation der FAK-Aktivität durch limitierte Proteolyse^{55,57}.

Die Rolle der FAK im Rahmen der Apoptose der DSL6A-Zellen, d.h. der Anoikis und die hierbei beobachteten Resistenz der DSL6A-Zellen, ist schwieriger zu beurteilen. So führte der Adhärenzverlust in Epithelzellen zur Anoikis. Vachon et al. zeigten hierbei eine Abnahme des FAK-Proteins 13 Stunden nach Induktion von Anoikis durch Kultivierung der Zellen in Suspension⁹⁷. Ob die Abnahme des FAK-Proteins durch Proteolyse oder verminderte Expression verursacht war, wurde von den Autoren nicht untersucht.

Im Gegensatz dazu beschrieb Hungerford et al., dass Inkubation von Fibroblasten mit einem inhibitierenden FAK-Antikörper schon nach 4 Stunden zur Apoptose führte⁹⁸. Die von CHP induzierte proteolytische Fragmentierung in den DSL6A-Zellen war dagegen nicht unmittelbar mit dem Zelltod assoziiert. Auch das Ablösen der Zellen wurde erst nach langerer Inkubation mit CHP beobachtet, so dass der Zeitverlauf für eine FAK-Proteolyse mit nachfolgendem Adhärenzverlust spricht. Darüber hinaus zeigten die in Suspension gehaltenen DSL6A-Zellen keine Degradation der FAK.

Den genannten Aspekten zu Folge ist die unter CHP-Inkubation auftretende FAK-Proteolyse für den Adhärenzverlust der Zellen (mit)verantwortlich. Die Möglichkeit einer FAK-Degradation als Folge von Adhärenzverlust kann somit ausgeschlossen werden.

Aus dem Zeitverlauf bezüglich FAK-Proteolyse, Adhärenzverlust und Zelltod lassen sich noch weitere Aspekte ableiten.

Diskussion

Da ein Intervall von mehreren Stunden zwischen der FAK-Proteolyse und dem Eintritt der Apoptose lag, ist ausgeschlossen, dass die FAK-Proteolyse die Folge von Apoptose ist. Es scheint eher, dass die Inaktivierung der FAK zum Eintritt der Zelle in die Apoptose führt oder zumindest daran beteiligt ist.

Hinsichtlich des durch CHP induzierten Adhärenzverlustes könnten auch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Von Kabir et al. wurde bei der Inkubation von Endothelzellen mit Stautoporine gezeigt, dass der Proteolyse eine Dephosphorylierung der FAK vorausgeht. Die Autoren beschrieben jedoch auch bei den gleichen Zellen, dass bei Behandlung mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid die Proteolyse der FAK im Vordergrund ihrer Inaktivierung steht⁹⁹. Dabei ist interessant, dass Cycloheximid in Bezug auf die FAK-Proteolyse einen ähnlichen Zeitverlauf zeigte, wie die unter CHP-Inkubation auftretende Proteolyse der FAK. Bei beiden Substanzen findet sich eine relevante Degradation dieser Kinase nach 24-stündiger Inkubation.

In der Zusammenfassung der Befunde lässt sich schlussfolgern, dass die von CHP initiierte ER-Stress-Kaskade zu einer Aktivierung oder/und Induktion von intrazellulären Protease(n) führt, deren Substrat u.a. das FAK-Protein darstellt. Diese Hypothese konnte durch den Einsatz von Protease-Inhibitoren bestätigt werden.

Erstaunlicherweise ließ sich durch L-Prolin-Gabe das ursprüngliche Niveau des FAK-Proteins wieder herstellen. Dieses Resultat unterstützt die Annahme, dass die proteolytische FAK-Degradation eine Folge der ER-Stress Kaskade ist.

Frisch et al. haben gezeigt, dass die konstitutive FAK-Aktivierung in Epithelzellen ein Schutzmechanismus zur Verhinderung von Anoikis, d.h. der durch Adhärenzverlust induzierten Apoptose darstellt⁷⁴. Anderseits konnte durch Hemmung der FAK-Aktivität in Mammakarzinomzellen Apoptose induziert werden¹⁰⁰.

Die erhöhte Resistenz der DSL6A-Zellen gegenüber Anoikis, die auch ein Kultivieren der Zellen in Suspension ermöglichte, wird vermutlich nur zum Teil durch Veränderung der FAK und ihrer Regulation verursacht. So scheint auch die fehlende Degradation der FAK bei den in Suspension kultivierten Zellen komplexere molekulare Ursachen zu haben. Deren Abklärung müsste Ziel weiterführender Arbeiten sein.

Insgesamt weisen diese Befunde auf eine Schlüsselrolle der FAK bei der Transduktion von anti-apoptotischen Signalen in Karzinomzellen hin. Damit stellt das Enzym ein interessantes Targetmolekül für die Entwicklung von Tumortherapiestrategien dar.

Ein weiterer Aspekt der FAK-Proteolyse ist die Frage nach der dafür verantwortlichen Protease(n). Die Degradation der FAK wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. Cooray et al. konnten bei der Untersuchung von humanen Thrombozyten Calpain als die verantwortliche Protease identifizieren⁵⁴. Unter Benutzung eines Models der onkogenen Transformation infolge eines retrovirusalen Gentransfers von v-src, wurde von Carragher et al. gezeigt, dass das Ablösen der Zellen mit einer durch Calpain verursachten FAK-Degradation verbunden ist. Weiterhin waren Adhäsionsverlust und Apoptose nach Ausschalten der v-src-Aktivität das Resultat einer Caspase-vermittelten FAK-Proteolyse. Hierbei wurde die verantwortliche Caspase von den Autoren nicht identifiziert¹⁰¹.

Diese Daten anderer Autoren und die eigenen Ergebnisse vor allem hinsichtlich der Beeinflussbarkeit durch den Proteaseinhibitor lassen vermuten, dass die Regulation der FAK-Aktivität durch Proteolyse ein ubiquitäres Prinzip darstellt.

Die dafür verantwortliche(n) Protease oder Proteasen scheinen unter verschiedenen biologischen Bedingungen, zwischen unterschiedlichen Zelltypen und Spezies zu variieren.

Diskussion

Diese Schlussfolgerung konnte von Gervais et al. experimentell gestützt werden. Die Autoren beschrieben Unterschiede zwischen Mensch und Ratte/Maus in Bezug auf die durch Caspase3 verursachte FAK-Proteolyse und der Größe der entstehenden Fragmente⁵⁷.

Für die Proteolyse der FAK kommen neben dem erwähnten Calpain und mehreren möglichen Caspasen auch Mitglieder der Gruppe der Serinproteasen, z.B Omi/HtrA2^{102,103} oder auch Cathepsine in Frage.

In unserem experimentellen System konnte eine wesentliche Beteiligung der Caspase3 und 7 aus der FAK-Degradation weitgehend ausgeschlossen werden, da unter Verwendung eines spezifischen Inhibitors die proteolytische Fragmentierung des Enzyms nicht beeinflussbar war. Nur durch Verwendung eines Breitspektrum-Proteaseinhibitors konnte eine FAK-Degradation verhindert werden. Diese Tatsache lässt vermuten, dass wahrscheinlich mehrere Proteasen an der FAK-Degradation beteiligt sind.

Da die Inaktivierung der FAK sowohl durch Proteolyse als auch durch Dephosphorylierung im Rahmen des *focal adhesion*- Turnover bei der Zell-Migration eine wichtige Rolle spielt^{43,45,90,95}, könnte eine CHP induzierte FAK-Proteolyse auch zu erhöhter Migration und damit Invasivität der Karzinomzellen beitragen. In diesen Zusammenhang passt die Beobachtung, dass CHP -Dosen im Bereich von 10^{-5} M die Migration von Endothel-Zellen induzieren, während höhere Dosen hemmend wirkten¹⁰⁴.

Aufgrund der sehr komplexen Regulation der FAK und auch von zu erwartenden Zelltyp-Unterschieden kann eine migrations- und damit invasivitätsfördernde Wirkung von CHP nicht endgültig ausgeschlossen werden, auch wenn dies eher unwahrscheinlich ist. Hier müssten weiterführende Arbeiten, vor allem zur Migration, folgen.

Den eigenen Ergebnissen zufolge war die CHP induzierte FAK-Proteolyse eher apoptotisch als migrationfördernd. Außerdem lagen die verwendeten Dosen deutlich über 10^{-5} M, so dass auch hier keine Induktion der Zellmigration zu erwarten war. Daneben berichteten viele Autoren über die Wachstumshemmung von Tumoren durch FAK-Inaktivierung^{52,100,105,106} oder beschrieben die Bedeutung der FAK-Überexpression bei der Tumorprogression^{49-51,107-111}. Eine Hemmung der FAK wurde somit eher als vorteilhaft für die Inhibition des Tumorwachstums angesehen. Neuere Arbeiten zeigen weiterhin Unterschiede bei der FAK-Regulation bei der Migration von Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen^{7,47,90}.

Weiterhin soll die *epidermal growth factor* (EGF) induzierte Tumor-Zell Invasivität und Metastasierung durch FAK-Inaktivierung mittels Dephosphorylierung vermittelt sein¹¹². Die EGF-Rezeptorfamilie und deren Liganden sind beim Pankreaskarzinom sehr oft überexprimiert und auch ihre autokrine Regulation spielt bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle^{7,104,113}. In diesen Kontext einer möglichen Interaktion von FAK- und EGF-Signalwegen würden auch die schon in Abschnitt 4.1.1 aufgeführten Schlussfolgerungen bezüglich dem Entzug von Serum und der damit verbundenen fehlenden Möglichkeit einer Kultivierung in Suspension passen.

Der Zusammenhang zwischen EGF und FAK-Signalweg hinsichtlich einer möglichen Rolle von CHP bei der Chemotherapie könnte so einen wichtigen Aspekt und den neuen Ansatz für weitere Versuche darstellen, insbesondere da mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib oder dem EGFR-Antikörper Cetuximab schon Inhibitoren des EGF-Signalweges als Chemotherapeutika zugelassen sind^{5,114,115}.

4.1.6 ER-Stress: Zelltod-Induktion

ER-Stress ist von verschiedenen Autoren in Zusammenhang mit der Apoptose untersucht worden^{35,40,116}. Davon unabhängig haben andere Autoren auch eine Verbindung zwischen der Inaktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK) und der Apoptose beschrieben. So soll die FAK-Inaktivierung zum einen als Auslöser von Apoptose eine Rolle spielen, zum anderen aber auch nur in ihrem Rahmen auftreten^{46,117-119}.

Da CHP sowohl ER-Stress als auch eine FAK-Proteolyse verursachte, stellte sich die Frage nach der möglichen Induktion von Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass CHP eine Aktivierung von Caspase3, Bcl2 und einer PARP-Proteolyse verursacht. Außerdem konnte auch nachgewiesen werden, dass es durch CHP zur Degradation der genomischen DNA in ca. 200bp Fragmente, der so genannten DNA-Leiter kommt. Diese Ergebnisse sind als Merkmale der Apoptose zu sehen⁷².

Der CHP-induzierte ER-Stress führte auch zur Degradation von Bcl2 und damit zur Inaktivierung dieses anti-apoptotischen Proteins. Die Rolle dieses Faktors wurde auch in anderen Arbeiten in Zusammenhang mit ER-Stress und Apoptose beschrieben. McCullough et al. diskutierten, dass die pro-apoptotische Wirkung des Faktors GADD153 zum Teil auf einer Verminderung der Bcl2-Expression beruht¹²⁰. Eine mögliche Degradation des Bcl2-Proteins wurde von diesen Autoren jedoch nicht untersucht.

Wurde vor einigen Jahren der Zelltod streng in Apoptose und Nekrose unterteilt, gibt es inzwischen die Ansicht, dass beide Prozesse Gemeinsamkeiten aufweisen. Der Begriff Apoptose-ähnlicher, programmierte Zelltod beschreibt Caspase-unabhängige Apoptose, ohne jedoch die Beteiligung von Caspasen ganz auszuschließen¹²¹⁻¹²⁵. Auch wird die Rolle von Caspasen nicht nur auf die Apoptose beschränkt gesehen. Sie scheinen auch weitere Aufgaben zu haben, z.B. Caspase1 bei der Synthese von Zytokinen¹²⁶.

In Bezug auf die FAK-Proteolyse durch CHP wurde schon die Rolle von Caspasen und anderen, möglicherweise beteiligten Proteasen diskutiert.

Die Aktivierung von Caspase3 verläuft in zwei Schritten. Durch Proteolyse von Procaspsase3 (p32) entstehen eine 12kD (p12) und eine 20kD (p20) große Untereinheit, die in einem zweiten Schritt zu einer 17kD (p17) großen Untereinheit, der aktiven Caspase3, proteolytisch gespalten wird. Während der erste Schritt von vielen Proteasen und auch Nicht-Caspasen induziert werden kann, ist der zweite vor allem autokatalytisch durch Caspase3 vermittelt^{75,76}. Der Caspase3-Inhibitor zDEVD-fmk verhindert die Caspase-Aktivierung, da er die Autoprozessierung zur p17-Untereinheit inhibiert. Entsprechend nimmt die p20-Untereinheit zu. Dies beweist die Wirksamkeit des verwendeten Caspase-Inhibitors zDEVD-fmk.

Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, dass die initiale Proteolyse der Procaspsase auch unter diesen Bedingungen stattfindet. Über die hierfür verantwortliche Protease kann ebenfalls nur spekuliert werden. Insgesamt scheint es so auch im Falle des durch CHP verursachten Zelltods fraglich, ob dieser allein Folge einer Aktivierung der Caspase-Kaskade ist. So konnte der Caspase-Inhibitor weder das Ablösen der Zellen noch die FAK-Proteolyse oder den Zelltod der DSL6A-Zellen unter CHP aufhalten. Trotz einer nachgewiesenen Aktivierung von Caspase3, sind somit Caspasen im Fall des CHP verursachten Zelltod zwar beteiligt, spielen aber nicht die Hauptrolle.

Aufgrund der genannten Aspekte sollte man auch bei dem CHP-induzierten Zelltod von Apoptose-ähnlichem, programmiertem Zelltod sprechen. Auch der Zelltod nach Tunicamycin induziertem ER-Stress wird von eigenen Autoren zur dieser Art des Zelltod gerechnet, mit Betonung der Bedeutung anderer Proteasen¹²¹. Von Cummings et al. wird beschrieben, dass

bei verschiedenen Karzinomzellen nach Inkubation mit einem Ca^{2+} -Kanalinhibitor (A23187) zwar die Caspase3-Aktivierung durch die Inhibitoren zVAD-fmk oder zDEVD-fmk verhindert werden kann, nicht jedoch der Zelltod¹²⁷.

Unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse liegt es insgesamt nahe, den CHP verursachten Zelltod als Apoptose-ähnlichen, programmierten Zelltod zu bezeichnen.

4.1.7 ER-Stress: Aktivierung von Proteasen

Wie im Abschnitt 4.1.5 ausführlich dargestellt, verursacht CHP eine Proteolyse der *focal adhesion kinase* (FAK). Hierbei wurden auch schon die Aspekte erläutert, die zur Annahme führen, dass die reversible Aktivierung von Proteasen Konsequenz der CHP induzierten ER-Stress-Maschinerie ist.

In mehreren Arbeiten anderer Autoren konnte die ER-Stress vermittelte Aktivierung verschiedener Proteasen gezeigt werden^{34,40,41,128,129}. Rao et al. beschrieben Zusammenhänge zwischen ER-Stress-Induktion und Aktivierung mehrerer Caspase mit anschließender Apoptose^{40,41}. Auch die Aktivierung von Calpain oder auch die Interaktion zwischen Caspase und Calpain wurde als Folge von ER-Stress beschrieben⁴².

Weiterhin wurde von Egger et al. gezeigt, dass bei ER-Stress die Aktivierung von Serinproteasen wichtig zu sein scheint, während Caspase-Aktivierung bzw. Calpain und Cathepsin-Aktivierung nur eine geringe bzw. gar keine Rolle spielen¹²¹. So sprechen diese Autoren dann auch von Apoptose-ähnlichen Zelltod als Folge des ER-Stresses.

Wie bei den eigenen Ergebnissen mit dem Caspase-Inhibitor zDEVD-fmk konnten auch Egger et al. beobachten, dass während des ER-Stresses die Prozessierung von Procaspsase3 durch einen Caspase-Inhibitor (in diesem Fall den Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk) nicht zu verhindern war¹²¹. Diese Ergebnisse anderer Autoren unterstreichen die eigenen Beobachtungen mit dem Caspase-Inhibitor zDEVD-fmk.

Wie in Abschnitt 4.1.6 erwähnt, wird die Rolle von Serinproteasen in Zusammenhang mit Apoptose-ähnlichem Zelltod diskutiert^{103,121}. Ein Beispiel für eine möglicherweise verantwortliche Serinprotease wäre Omi/HtrA2. Die Rolle von Omi/HtrA2, ein mitochondriales Protein mit Serin-Proteaseaktivität, wird auch in Zusammenhang von Caspase-unabhängigem Zelltod bei humanen Pankreas-Karzinomzellen diskutiert¹⁰².

Diese Resultate und die Tatsache, dass die meisten CHP-Effekte durch einen Protease-Inhibitor verhindert werden konnten, zeigen, dass Proteasen eine Hauptrolle bei der Vermittlung der durch CHP verursachten Zellschädigung spielen. Wie oben beschrieben, ist die Aktivierung von Proteasen als Folge von ER-Stress von verschiedenen Autoren beschrieben worden. Da ein Protease-Inhibitor die Wirkung von CHP verhindern kann, könnte er auch zu Beginn des ER-Stress-Signalweges als Inhibitor wirken.

Ein möglicher Angriffspunkt könnte dabei die Proteolyse des *activating transcription factor* (ATF)6 sein, einem an GRP78 gebundenen Protein. Bindet GRP78 an falschgefaltete Proteine, setzt es ATF6 frei. Dieses wird jedoch erst durch limitierte Proteolyse im Golgi-Apparat ins Zytosol freigesetzt, um schließlich im Kern als Transkriptionsfaktor für ER-Stressproteine wie GADD153 zu wirken^{39,130}. So könnte der Protease-Inhibitor durch Verhinderung der ATF6-Wirkung möglicherweise die Effekte von CHP verhindern.

Auch hinsichtlich des in Zusammenhang mit der Wachstumshemmung untersuchten CyclinD1-Proteins und dessen Abnahme unter CHP-Inkubation wäre eine ER-Stress vermittelte Proteolyse zu diskutieren. Von Zhao et al. wurde eine Erhöhung der CyclinD1-Expression durch FAK beschrieben⁴⁶. Die durch CHP verursachte Initiierung von ER-Stress

und eine nachfolgende Protease-Aktivierung könnte so über die Degradation der FAK auch eine Abnahme von CyclinD1 bewirken. Dies wäre auch eine Erklärung für die Wirkung des Breitspektrum-Proteaseinhibitors.

Eine weitere Möglichkeit könnte in einer direkten ER-Stress vermittelten Hemmung der Translation von CyclinD1 liegen. Bei Maus-Fibroblasten konnte ein solcher Effekt von Brewer et al. im Rahmen einer Behandlung der Zellen mit dem ER-Stressor Tunicamycin beobachtet werden¹³¹.

Es bleibt unklar, welche Proteasen im Einzelnen für die Vermittlung der durch CHP ausgelösten zellbiologischen Wirkungen verantwortlich sind. Künftige Untersuchungen sollten sich diesem Problem widmen.

4.1.8 Modell der CHP-induzierten Signalkaskade bei DSL6A-Zellen

Basierend auf den eigenen Daten lässt sich zusammenfassend das in Abbildung 4.1 gezeigte Modell der durch CHP induzierten Signalkaskade für DSL6A-Zellen aufstellen. Die Inkubation der Zellen mit CHP führt zum Einbau dieses Prolinanalogons in die von der Zelle synthetisierte Proteine, d.h. nicht nur in Kollagen, sondern in viele andere Proteine. Dadurch kommt es zur Störung der Proteinfaltung mit Anhäufung dieser Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER). Dies löst ER-Stress aus, der an der nachgewiesenen Induktion von GRP78 und GADD153, erkennbar wird, beides Bestandteile eines ER-Stress Signalweges, des *unfolded protein response* (UPR).

Weiterhin ist der ER-Stress verantwortlich für die Aktivierung von Proteasen, die schließlich über die Proteolyse der FAK zum Ablösen der Zellen führen. Darüberhinaus ist die Protease-Aktivierung auch für die Einleitung des Zelltodes verantwortlich, erkennbar an der Caspase3 sowie der PARP-Spaltung. Zudem wirken noch die FAK-Proteolyse und auch die Induktion von GADD153 proapoptotisch.

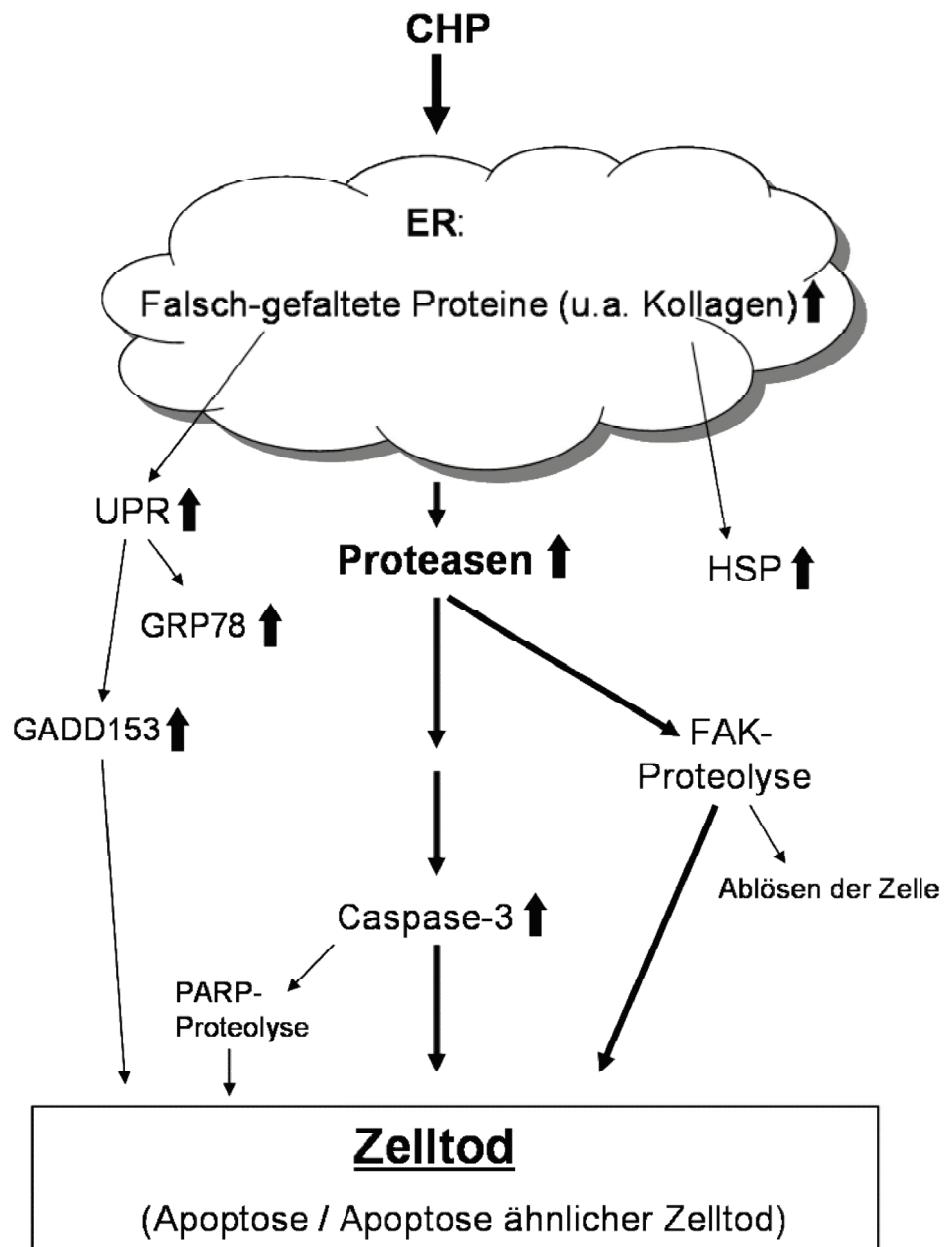


Abbildung 4.1 Zusammenfassung der vermuteten CHP-Effekte und der durch CHP induzierten Signalkaskade bei DSL6A-Zellen.

4.2 Humane Karzinomzellen

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf Untersuchungen der Pankreaskarzinom-Zelllinie der Ratte DSL6A. Humane Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden als Vergleich herangezogen. Hier war vor allem die Frage nach möglichen Unterschieden der molekularen Wirkung von CHP interessant.

Auch bei den humanen Zellen verursachte CHP eine Wachstumshemmung. Jedoch zeigten sich bei den untersuchten humanen Karzinom-Zelllinien große Unterschiede, nicht nur im Vergleich zu den DSL6A-Zellen, sondern auch zwischen den einzelnen humanen Karzinomzelllinien. Unter dem Einfluss von CHP kam es bei den Capan2-Zellen ebenfalls zum Adhärenzverlust, im Gegensatz zu den DSL6A-Zellen aber mit einer Zeitdauer von vier Tagen. Auch die Proliferationshemmung war schwächer ausgeprägt.

Dagegen zeigten die MiaPaCa-Zellen einen den DSL6A-Zellen sehr ähnlichen Verlauf, der Verlust der Adhärenz trat hier auch nach 24-stündiger CHP-Inkubation auf. Der Zeitverlauf bei den Panc1-Zellen entsprach etwa dem der Capan2-Zellen.

Um zu testen, ob sich die Unterschiede der biologischen Effekte auch auf molekularer Ebene widerspiegeln, wurden diese drei humanen Karzinom-Zelllinien in Bezug auf GRP78 und FAK untersucht. Die Panc1 und Capan2-Zellen exprimierten auch unbehandelt hohe GRP78-Level. Dies wies auf eine konstitutive Expression hin. Nur bei den Panc1-Zellen ließ sich durch CHP eine weitere Steigerung der GRP78-Expression erreichen, die Capan2-Zellen wurden hinsichtlich ihres GRP78-Levels nicht beeinflusst.

Diese nicht-beeinflussbare, hohe basale Expression von GRP78 in den Capan2-Zellen ist vermutlich ein Grund für das schlechte Ansprechen dieser Zellen auf CHP. So könnte die relativ schwache Wachstumshemmung durch CHP und das verzögerte Ansprechen dieser Zellen in Bezug auf den Adhärenzverlust zumindest teilweise durch die hohe basale Expression von GRP78 bedingt sein.

Auch von anderen Autoren wird eine hohe basale Expression von GRP78 in Tumorzellen beschrieben, vor allem ein Zusammenhang mit einer Resistenz dieser Zellen gegenüber bestimmten Chemotherapeutika^{31,132,133}. Da CHP trotz dieses Aspekts der hohen basalen GRP78-Expression in der Lage ist eine, wenn auch schwache, Wachstumshemmung zu verursachen, kann die Beteiligung anderer molekularer Mechanismen vermutet werden.

Brewer et al konnten zeigen, dass eine basale GRP78-Expression andere Effekte vermittelt als sie in Folge der ER-Stress induzierten GRP78-Expression auftreten¹³⁴. So beschrieben diese Autoren die Rolle einer basalen GRP78-Expression bei der Proteinsynthese unter Nicht-ER-Stress Bedingungen, reguliert durch verschiedene Mitogene.

Dies könnte bei den humanen Karzinomzellen vielleicht auch die Unterschiede in Bezug auf die GRP78-Induktion einerseits und das Ansprechen auf CHP sowie die Wachstumshemmung anderseits erklären. Somit besteht die Möglichkeit, dass die hohe basale GRP78-Expression der Karzinomzellen durch (autokrine) Wachstumsfaktoren bedingt ist.

Wie bei der GRP78-Expression fanden sich auch hinsichtlich der FAK deutliche Unterschiede. So konnte nur bei den MiaPaCa-Zellen eine den DSL6A-Zellen ähnliche Degradation der FAK unter CHP beobachtet werden. Dies würde auch ihre DSL6A-Zellen ähnlichen Zeitverlauf in Bezug auf den Adhärenzverlust erklären.

Weiterhin bestätigt dieses Resultat, dass die durch CHP verursachte FAK-Proteolyse für den Adhärenzverlust der Zellen maßgeblich verantwortlich ist.

Die Capan2-Zellen zeigten kaum das von den DSL6A gewohnte Abrundungs- und Ablösungsverhalten. Erklärbar ist dies durch die fehlende FAK-Proteolyse unter CHP-Inkubation. Das sehr starke FAK-Signal dieser Zelllinie im Western Blot könnte auf eine Überexpression der FAK hindeuten. Diese Ergebnisse der humangen Karzinomzelllinien hinsichtlich der FAK-Degradation durch CHP zeigen die Bedeutung dieser Kinase bei Tumoren.

Eine Überexpression der FAK in Karzinomzellen und deren Auswirkung auf die Aggressivität bzw. Resistenz dieser Zellen wurde auch von anderen Autoren beobachtet^{45,52,90,105,106,135}. Insgesamt legen die aus den humanen Karzinom-Zelllinien gewonnenen Ergebnisse nahe, dass die Wirksamkeit von CHP stark von der GRP78- und FAK-Regulation abhängig ist.

4.3 Pankreatische Stellate-Zellen

Zur Untersuchung der biologischen Wirkung vom CHP auf andere Zellpopulationen wurden pankreatische Stellate-Zellen in die Experimente einbezogen. CHP war sowohl bei den primären (PSZ) als auch bei den immortalisierten Stellate-Zellen in der Lage, das Wachstum zu hemmen. Hierbei zeigte sich eine den DSL6A-Zellen ähnliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit. Dagegen fehlte bei diesen Zellen der Adhäsionsverlust, der bei den DSL6A-Zellen unter CHP-Inkubation zu beobachten war. Darüber hinaus war CHP bei diesen Zellen auch in der Lage, die Wirkung von PDGF, einem der stärksten Mitogene von Stellate-Zellen^{66,67,136}, aufzuheben.

Die CHP-vermittelte Wachstumsinhibition von pankreatischen Stellate-Zellen ist sowohl im Rahmen der Behandlung des Pankreaskarzinoms als auch der chronischen Pankreatitis von Interesse.

Stellate-Zellen spielen bei der Entstehung der beim Pankreaskarzinom beobachteten Desmoplasie eine wichtige Rolle. Diese wird von verschiedenen Autoren als ein wichtiger Faktor in Zusammenhang mit dem Tumorwachstum angesehen^{137,138}. Neben einer durch CHP verursachten Wachstumshemmung der Tumorzellen selbst, könnte so die Hemmung der Stellate-Zellen und damit der Desmoplasie ein zusätzlicher Angriffspunkt sein.

Dies bezieht sich zum einen auf die Rolle der Desmoplasie als Wachstumsfaktor-Reservoir als auch auf ihre Barrierefunktion. Würde durch CHP der Aufbau dieser Barriere behindert, könnte der Tumor für andere Chemotherapeutika bzw. Immunmodulatoren zugänglicher und sensibler gemacht werden. Eine solche Eigenschaft von CHP würde sich im Rahmen von Kombinationstherapien nutzen lassen.

Darüber hinaus werden Stellate-Zellen als die wesentlichen Effektorzellen für pro-fibrotische Mediatoren bei der massiven Ablagerung von extrazellulären Matrix im Rahmen einer chronischen Pankreatitis angesehen^{6,136,139}. Die Rolle dieser Zellen bei chronischer Pankreatitis ist dabei vergleichbar mit der hepatischen Stellatezellen bei der Entstehung einer Leberzirrhose. Somit könnte CHP als Inhibitor der Proliferation von Stellate-Zellen sowie deren Kollagensynthese einen Ansatzpunkt für die Entwicklung effektiver anti-fibrotischer Therapiestrategien darstellen.

Die Wirkung von CHP auf pankreatische Stellate-Zellen sollte auch auf einer ER-Stress induzierten Signalkaskade beruhen wie bei den DSL6A-Zellen. Da sich diese Arbeit aber auf die Darstellung der biologischen Effekte von CHP auf Stellate-Zellen beschränkte, bleibt die Untersuchung der molekularen Ebene der CHP-Wirkung bei diesen Zellen weiterführenden Arbeiten vorbehalten. Interessant sollte hier die Untersuchung der molekularen Unterschiede bezüglich der *focal adhesion kinase* (FAK) sein, da Stellate-Zellen nicht das von den DSL6A-Zellen gewohnte Abrundungs- bzw. Ablösungsverhalten unter CHP-Inkubation zeigen.

4.4 Künftige Fragestellungen

CHP könnte sich aufgrund seiner wachstumshemmenden Eigenschaften bei Karzinom- und Stellate-Zellen sowohl zur Therapie des Pankreaskarzinoms als auch der Pankreasfibrose eignen. Um dieses Potential von CHP weiter zu analysieren, müssten Versuche an geeigneten Tiermodellen folgen.

Unter Berücksichtigung der hier beschriebenen Überexpression von GRP78 und FAK bei den Capan2-Zellen sollte die Frage der Bedeutung dieser beiden Proteine in Bezug auf die relative Resistenz der Zellen gegenüber einer CHP-Behandlung weiter untersucht werden. Hierbei konnte zum Beispiel durch Versuche mit antisense-RNA geklärt werden, ob durch eine zusätzliche Hemmung von GRP78 und/oder FAK ein stärkeres Ansprechen bzw. eine stärkere Wachstumshemmung zu erreichen ist.

Die Frage nach der für die FAK-Proteolyse verantwortlichen Proteasen sollte ebenso von großem Interesse sein. Neben einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen könnte hier auch einer weiteren Grund liegen, warum es bei Zellen wie den Capan2 nicht zur Proteolyse der FAK kommt. Vermutlich spielt neben einer möglichen FAK-Überexpression auch das Fehlen oder die Inaktivierung der verantwortlichen Protease eine Rolle.

Weiterhin könnte sich CHP auch aufgrund unterschiedlicher Wirkmechanismen zur Kombinationstherapie mit Gemzitabin, dem Chemotherapeutikum der ersten Wahl bei Pankreaskarzinom, eignen. Hier liegen Ansätze für weitere Untersuchungen zum therapeutischen Potential von CHP.

Zusammenfassend stellt CHP durchaus ein potenzielles Therapieprinzip für die Karzinom- und die Fibrosebehandlung dar. Weiterführende Arbeiten erscheinen vor diesem Hintergrund sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Das Prolinanalogon *cis*-Hydroxy-L-Prolin (CHP) ist als Inhibitor der Kollagensynthese bekannt^{21,22}. Eine Wachstumshemmung von Fibroblasten und Karzinomzellen durch CHP konnte von verschiedenen Autoren gezeigt werden. Diese beschränkten sich jedoch auf die Untersuchung der biologischen Effekte von CHP. Als Erklärung der Wachstumshemmung von Zellen wurde damals ausschließlich die Hemmung der Kollagensynthese angesehen. Das somit fehlende Substrat für Zelladhäsion sollte für die Wachstumshemmung verantwortlich sein. Weitere Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der CHP-Effekte konnten damals nicht durchgeführt werden²³⁻²⁵.

Vor dem Hintergrund neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung des Pankreaskarzinoms zu finden, erfolgte in dieser Arbeit neben Untersuchung der biologischen Effekte die Charakterisierung der molekularen Wirkmechanismen von CHP. Im Vordergrund stand dabei die Pankreaskarzinom-Zelllinie der Ratte DSL6A, darüber hinaus wurden humane Karzinom-Zelllinien sowie pankreatische Stellate-Zellen der Ratte untersucht.

CHP verursachte einer Wachstumshemmung aller untersuchten Zelllinien. Hier zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation, der Adhärenz sowie des Zellüberlebens. Die verschiedenen Zelllinien reagierten auf CHP-Behandlung unterschiedlich, wobei sich die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan2 in Bezug auf Proliferationshemmung und Adhärenzverlust als sehr resistent erwies.

Bei den Untersuchungen zu molekularen Mechanismen konnte bei den DSL6A-Zellen eine CHP-vermittelte Induktion der ER-Stress-Markerproteine *glucose-related protein* (GRP) 78 und *growth arrest and DNA damage inducible* (GADD) 153 beobachtet werden. Die Induktion der beiden Markerproteine zeigt, dass CHP ein Auslöser von ER-Stress ist. Diese Annahme konnte durch einen CHP verursachten Anstieg des Kollagen-spezifischen Chaperons HSP47 noch bestärkt werden. So steht ein Anstieg der HSP47-Expression in Zusammenhang mit ER-Stress und der Anhäufung falschgefalteter Kollagenketten.

Als eine mögliche Ursache des unter CHP auftretenden Zelladhärenzverlustes konnte eine Beteiligung der *focal adhesion kinase* (FAK) nachgewiesen werden. CHP verursacht so eine zeitabhängige Proteolyse der FAK mit gleichzeitigem Auftreten entsprechender Fragmente. Auf der Suche nach verantwortlichen Proteasen konnte durch Einsatz von spezifischen Inhibitoren eine Beteiligung von Caspasen weitgehend ausgeschlossen werden. Nur ein Breitspektrum-Proteaseinhibitor war in der Lage, die CHP vermittelte FAK-Proteolyse sowie den Adhärenzverlust abzuschwächen oder ganz zu verhindern.

Hinsichtlich der Induktion von ER-Stress sowie der FAK-Proteolyse wurden wiederum Unterschiede bei den humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien deutlich, wobei sich das Verhalten der Proliferationshemmung zum Teil widerspiegeln. Die Capan2-Zellen exprimierten so hohe basale GRP78- und FAK-Level, die beide durch CHP wenig beeinflussbar waren. Dies deutet in Bezug auf diese beiden Proteine auf einen möglichen Resistenzmechanismus hin.

In Zusammenhang mit den biologischen Effekten sowie der beteiligten molekularen Mechanismen konnte die Möglichkeit der Reversibilität nachgewiesen werden. So konnte bis zu 24 Stunden nach Beginn der CHP-Inkubation durch L-Prolin-Zugabe im Verlauf der weiteren Zell-Kultivierung sowohl die Proliferation als auch die ursprünglichen Level der FAK und ER-Stress-Markerproteine GRP78 und GADD153 wiederhergestellt werden.

Nach diesem Zeitpunkt der noch möglichen Reversibilität führte die Inkubation mit CHP schließlich zur Apoptose. Dies konnte unter anderem durch Caspase3-Aktivierung sowie PARP-Proteolyse nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Bei dieser Frage nach möglichen Resistenz-Mechanismen sowie der Frage nach der für die FAK-Proteolyse verantwortlichen Proteasen liegen Ansätze für weitere Forschung.

Insgesamt legen die Resultate dieser Arbeit nahe, dass die CHP-Wirkung durch Induktion von ER-Stress vermittelt ist. Als Folge des ER-Stress scheint es zu einer Aktivierung intrazellulärer Proteasen zu kommen, verantwortlich für die beobachtete FAK-Proteolyse und den im Verlauf der CHP-Behandlung auftretenden Zelltod.

Zum Schluss lässt sich so sagen, dass CHP als ER-Stressor durchaus ein potentielles Therapeutikum für Karzinom- und auch Fibrosebehandlung darstellen könnte. Diese Eignung von CHP als Therapeutikum sollte in weiteren Versuch, vor allem im Tiermodell, getestet werden.

6 Thesen

1. Das Prolinanalogon *cis*-Hydroxy-L-Prolin (CHP) ist als Inhibitor der Kollagensynthese bekannt. Eine Wachstumshemmung von Fibroblasten und Karzinomzellen durch CHP konnte von verschiedenen Autoren gezeigt werden. Die molekularen Mechanismen der CHP-Effekte waren bislang unbekannt.
2. Das Pankreaskarzinom gehört neben den kolorektalen Karzinomen zu den häufigsten Neoplasien des Gastrointestinaltraktes. Da Frühsymptome oft fehlen, werden die meisten Karzinome für eine kurative Resektion zu spät diagnostiziert. Trotz Verbesserung palliativer Maßnahmen hinsichtlich der Chemotherapie und chirurgischer Intervention zu Erhöhung der Lebensqualität bleibt die Situation unbefriedigend.
3. Vor dem Hintergrund neue Therapiemöglichkeiten für das Pankreaskarzinoms zu finden, erfolgte in dieser Arbeit neben Untersuchung der biologischen Effekte die Charakterisierung der molekularen Wirkmechanismen von CHP. Im Vordergrund stand dabei die Pankreaskarzinom-Zelllinie der Ratte DSL6A, darüber hinaus wurden humane Karzinom-Zelllinien sowie pankreatische Stellate-Zellen der Ratte untersucht.
4. CHP verursachte einer Wachstumshemmung aller untersuchten Zelllinien. Hier zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation, der Adhärenz sowie des Zellüberlebens.
5. Die verschiedenen Zelllinien reagierten auf CHP-Behandlung unterschiedlich, wobei sich die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan2 in Bezug auf Proliferationshemmung und Adhärenzverlust als sehr resistent erwies.
6. Das endoplasmatische Retikulum (ER) dient als Ort der Synthese, Faltung und Modifikation von Proteinen. Weiterhin ist es wichtiger intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher mit Einfluss auf Ca^{2+} -abhängige Signalwege.
7. Störungen der ER-Homeostase und damit der ER-Funktionen werden gemeinsam unter dem Begriff ER-Stress zusammengefasst. ER-Stress kann dabei durch vielfältige Faktoren ausgelöst werden, zum Beispiel Störungen im Ca^{2+} - oder Glukose-Haushalt sowie Veränderungen der Proteinsynthese. Dies führt zu Anhäufung von falschgefalteten Proteinen und so zur Auslösung von ER-Stress.

8. Die Zelle reagiert unter dieser Stress-Situation mit der so genannten *ER-stress response*. Durch ER-Stress aktivierte Signalwege sind z.B. der *unfolded protein response* (UPR) und der *ER overload response* (EOR). Im Rahmen des UPR kommt es sowohl zur Induktion des Chaperon *glucose regulated protein* (GRP)78 als auch des pro-apoptotischen *growth arrest and DNA damage inducible* (GADD)153 Faktors.
9. Bei den Untersuchungen zu molekularen Mechanismen konnte bei den DSL6A-Zellen eine CHP-vermittelte Induktion der ER-Stress-Markerproteine *glucose-related protein* (GRP) 78 und *growth arrest and DNA damage inducible* (GADD) 153 beobachtet werden.
10. Die Induktion der beiden Markerproteine zeigt, dass CHP ein Auslöser von ER-Stress ist. Diese Annahme konnte durch einen CHP verursachten Anstieg des Kollagen-spezifischen Chaperons HSP47 noch bestärkt werden. So steht ein Anstieg der HSP47-Expression in Zusammenhang mit ER-Stress und der Anhäufung falschgefalteter Kollagenketten.
11. Die *focal adhesion kinase* (FAK) ist eine 125 kD Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase. Als Aktivatoren können Wachstumsfaktoren und die Bindung der Zelle an die extrazelluläre Matrix (EZM) dienen. Dabei ist die FAK in Bereichen der Interaktion von Integrinen und Zytoskelett mit der (EZM), sogenannten *focal adhesion* oder auch *focal contacts*, lokalisiert. Phosphorylierte FAK bildet Komplexe mit Kinasen der Src-Familie und anderen Kinasen. Es folgt die Aktivierung von verschiedenen, komplexen Signalwegen. Diese sind an Zellproliferation und – überleben beteiligt.
12. Als eine mögliche Ursache des unter CHP auftretenden Zelladhärenzverlustes konnte eine Beteiligung der *focal adhesion kinase* (FAK) nachgewiesen werden. CHP verursacht so eine zeitabhängige Proteolyse der FAK mit gleichzeitigem Auftreten entsprechender Fragmente.
13. Auf der Suche nach verantwortlichen Proteasen konnte durch Einsatz von spezifischen Inhibitoren eine Beteiligung von Caspasen weitgehend ausgeschlossen werden. Nur ein Breitspektrum-Proteaseinhibitor war in der Lage, die CHP vermittelte FAK-Proteolyse sowie den Adhärenzverlust abzuschwächen oder ganz zu verhindern.

14. In Zusammenhang mit den biologischen Effekten sowie der beteiligten molekularen Mechanismen konnte die Möglichkeit der Reversibilität nachgewiesen werden. So konnte bis zu 24 Stunden nach Beginn der CHP-Inkubation durch L-Prolin-Zugabe im Verlauf der weiteren Zell-Kultivierung sowohl die Proliferation als auch die ursprünglichen Level der FAK und ER-Stress-Markerproteine GRP78 und GADD153 wiederhergestellt werden.
15. Nach diesem Zeitpunkt der noch möglichen Reversibilität führte die Inkubation mit CHP schließlich zur Apoptose. Dies konnte unter anderem durch Caspase3-Aktivierung sowie PARP-Proteolyse nachgewiesen werden.
16. Die Capan2-Zellen exprimierten so hohe basale GRP78- und FAK-Level, die beide durch CHP wenig beeinflussbar waren. Dies deutet in Bezug auf diese beiden Proteine auf einen möglichen Resistenzmechanismus hin.
17. Bei der Frage nach möglichen Resistenz-Mechanismen sowie der Frage nach der für die FAK-Proteolyse verantwortlichen Proteasen liegen Ansätze für weitere Forschung.
18. Insgesamt legen die Resultate dieser Arbeit nahe, dass die CHP-Wirkung durch Induktion von ER-Stress vermittelt ist. Als Folge des ER-Stress scheint es zu einer Aktivierung intrazellulärer Proteasen zu kommen, verantwortlich für die beobachtete FAK-Proteolyse und den im Verlauf der CHP-Behandlung auftretenden Zelltod.
19. Zum Schluss lässt sich so sagen, dass CHP als ER-Stressor durchaus ein potentielles Therapeutikum für Karzinom- und auch Fibrosebehandlung darstellen könnte. Diese Eignung von CHP als Therapeutikum sollte in weiteren Versuch, vor allem im Tiermodell, weiter getestet werden.

7 Literatur

1. Sahm S and Caspary W. Gastroenterologische Onkologie - Klinischer Leitfaden für Diagnostik und Therapie, 2 ed. Schattauer, 2003.
2. Herrmann, R., Bodoky, G., Ruhstaller, T., Glimelius, B., Bajetta, E., Schuller, J., Saletti, P., Bauer, J., Figer, A., Pestalozzi, B., Kohne, C. H., Mingrone, W., Stemmer, S. M., Tamas, K., Kornek, G. V., Koeberle, D., Cina, S., Bernhard, J., Dietrich, D., and Scheithauer, W. Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. *J.Clin.Oncol.*, 25: 2212-2217, 2007.
3. Kindler, H. L. Pancreatic cancer: an update. *Curr.Oncol.Rep.*, 9: 170-176, 2007.
4. Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., and Parulekar, W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J.Clin.Oncol.*, 25: 1960-1966, 2007.
5. Starling, N., Neoptolemos, J., and Cunningham, D. Role of erlotinib in the management of pancreatic cancer. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2: 435-445, 2006.
6. Böcker W, Denk H, and Heitz P. Pathologie, vol. 2. Urban & Fischer, 2001.
7. Bardeesy, N. and DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat.Rev.Cancer*, 2: 897-909, 2002.
8. Hebrok, M., Kim, S. K., St Jacques, B., McMahon, A. P., and Melton, D. A. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development*, 127: 4905-4913, 2000.

Literatur

9. Kim, S. K. and Hebrok, M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.*, *15*: 111-127, 2001.
10. Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., Qi, Y. P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A. L., and Hebrok, M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, *425*: 851-856, 2003.
11. Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I. M., Wolfe, M. S., Hruban, R. H., Ball, D. W., Schmid, R. M., and Leach, S. D. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*, *3*: 565-576, 2003.
12. Rooman, I., Heremans, Y., Heimberg, H., and Bouwens, L. Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia*, *43*: 907-914, 2000.
13. Pour, P. M., Pandey, K. K., and Batra, S. K. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma? *Mol.Cancer*, *2*: 13, 2003.
14. Zhang, Y. Q., Kritzik, M., and Sarvetnick, N. Identification and expansion of pancreatic stem/progenitor cells. *J.Cell Mol.Med.*, *9*: 331-344, 2005.
15. Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Muller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K., and Habener, J. F. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*, *50*: 521-533, 2001.
16. Mani, U. V. and Radhakrishnan, A. N. Isolation and characterization of a hydroxyproline-containing protein from soluble extracts of the leaves of sandal (*Santalum album L.*). *Biochem.J.*, *141*: 147-153, 1974.
17. Kuttan, R. and Radhakrishnan, A. N. The biosynthesis of cis-4-hydroxy-L-proline in sandal (*Santalum album L.*). *Biochem.J.*, *117*: 1015-1017, 1970.

Literatur

18. Anderson, M. O., Shelat, A. A., and Guy, R. K. A solid-phase approach to the phallotoxins: total synthesis of [Ala7]-phalloidin. *J.Org.Chem.*, *70*: 4578-4584, 2005.
19. Erbe T Microwave treatment of dietary gelatin does not generate cis-4-hydroxyproline, an inhibitor of collagen biosynthesis. *Z Lebensm Unters Forsch A*, *208*: 424-428, 1999.
20. Uitto, J. and Prockop, D. J. Incorporation of proline analogs into procollagen. Assay for replacement of imino acids by cis-4-hydroxy-L-proline and cis-4-fluoro-L-proline. *Arch.Biochem.Biophys.*, *181*: 293-299, 1977.
21. Rosenbloom, J. and Prockop, D. J. Incorporation of cis-hydroxyproline into procollagen and collagen. Collagen containing cis-hydroxyproline in place of proline and trans-hydroxyproline is not extruded at a normal rate. *J.Biol.Chem.*, *246*: 1549-1555, 1971.
22. Uitto, J., Hoffman, H., and Prockop, D. J. Retention of nonhelical procollagen containing cis-hydroxyproline in rough endoplasmic reticulum. *Science*, *190*: 1202-1204, 1975.
23. Lewko, W. M., Liotta, L. A., Wicha, M. S., Vonderhaar, B. K., and Kidwell, W. R. Sensitivity of N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors to cis-hydroxyproline, an inhibitor of collagen production. *Cancer Res.*, *41*: 2855-2862, 1981.
24. Tan, E. M., Ryhanen, L., and Uitto, J. Proline analogues inhibit human skin fibroblast growth and collagen production in culture. *J.Invest Dermatol.*, *80*: 261-267, 1983.
25. Yoo, J. S., Sakamoto, T., Spee, C., Kimura, H., Harris, M. S., Hinton, D. R., Kay, E. P., and Ryan, S. J. cis-Hydroxyproline inhibits proliferation, collagen synthesis, attachment, and migration of cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, *38*: 520-528, 1997.
26. Buck, T. B., Hall, A. L., Sinha, C. C., Bunce, O. R., and Thorgeirsson, U. P. cis-hydroxyproline stimulates the growth of rat mammary carcinoma cells. *In Vivo*, *14*: 7-11, 2000.
27. Kaufman, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.*, *13*: 1211-1233, 1999.
28. Löffler G and Petrides P. Biochemie und Patobiochemie, vol. 6. Springer, 1998.

Literatur

29. Verkhratsky, A. and Toescu, E. C. Endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis and neuronal death. *J.Cell Mol.Med.*, 7: 351-361, 2003.
30. Welihinda, A. A., Tirasophon, W., and Kaufman, R. J. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.*, 7: 293-300, 1999.
31. Kaufman, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J.Clin.Invest.*, 110: 1389-1398, 2002.
32. Shen, X., Zhang, K., and Kaufman, R. J. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J.Chem.Neuroanat.*, 28: 79-92, 2004.
33. Zhang, K. and Kaufman, R. J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.*, 279: 25935-25938, 2004.
34. Liu, H., Bowes, R. C., III, van de, W. B., Sillence, C., Nagelkerke, J. F., and Stevens, J. L. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca2+ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J.Biol.Chem.*, 272: 21751-21759, 1997.
35. Rao, R. V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P. C., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., and Bredesen, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.*, 514: 122-128, 2002.
36. Caspersen, C., Pedersen, P. S., and Treiman, M. The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2b is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein. *J.Biol.Chem.*, 275: 22363-22372, 2000.
37. Kaneko, M., Niinuma, Y., and Nomura, Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol.Pharm.Bull.*, 26: 931-935, 2003.
38. Kretz-Remy, C., Bates, E. E., and Arrigo, A. P. Amino acid analogs activate NF-kappaB through redox-dependent IkappaB-alpha degradation by the proteasome without apparent IkappaB-alpha phosphorylation. Consequence on HIV-1 long terminal repeat activation. *J.Biol.Chem.*, 273: 3180-3191, 1998.

Literatur

39. Oyadomari, S. and Mori, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death.Differ.*, *11*: 381-389, 2004.
40. Rao, R. V., Ellerby, H. M., and Bredesen, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death.Differ.*, *11*: 372-380, 2004.
41. Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., and Bredesen, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J.Biol.Chem.*, *276*: 33869-33874, 2001.
42. Siman, R., Flood, D. G., Thinakaran, G., and Neumar, R. W. Endoplasmic reticulum stress-induced cysteine protease activation in cortical neurons: effect of an Alzheimer's disease-linked presenilin-1 knock-in mutation. *J.Biol.Chem.*, *276*: 44736-44743, 2001.
43. Abbi, S. and Guan, J. L. Focal adhesion kinase: protein interactions and cellular functions. *Histol.Histopathol.*, *17*: 1163-1171, 2002.
44. Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., and Julian, R. L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol.Rev.*, *50*: 197-263, 1998.
45. Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, *6*: 56-68, 2005.
46. Zhao, J. H., Reiske, H., and Guan, J. L. Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J.Cell Biol.*, *143*: 1997-2008, 1998.
47. Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Streblow, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J., Spencer, K. S., Cheresh, D. A., and Schlaepfer, D. D. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J.Cell Biol.*, *160*: 753-767, 2003.
48. Gabarra-Niecko, V., Schaller, M. D., and Dunty, J. M. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, *22*: 359-374, 2003.

Literatur

49. Agochiya, M., Brunton, V. G., Owens, D. W., Parkinson, E. K., Paraskeva, C., Keith, W. N., and Frame, M. C. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene*, *18*: 5646-5653, 1999.
50. Cance, W. G., Harris, J. E., Iacocca, M. V., Roche, E., Yang, X., Chang, J., Simkins, S., and Xu, L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin.Cancer Res.*, *6*: 2417-2423, 2000.
51. Hauck, C. R., Sieg, D. J., Hsia, D. A., Loftus, J. C., Gaarde, W. A., Monia, B. P., and Schlaepfer, D. D. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res.*, *61*: 7079-7090, 2001.
52. McLean, G. W., Komiyama, N. H., Serrels, B., Asano, H., Reynolds, L., Conti, F., Hodivala-Dilke, K., Metzger, D., Chambon, P., Grant, S. G., and Frame, M. C. Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes Dev.*, *18*: 2998-3003, 2004.
53. von Sengbusch, A., Gassmann, P., Fisch, K. M., Enns, A., Nicolson, G. L., and Haier, J. Focal adhesion kinase regulates metastatic adhesion of carcinoma cells within liver sinusoids. *Am.J.Pathol.*, *166*: 585-596, 2005.
54. Cooray, P., Yuan, Y., Schoenwaelder, S. M., Mitchell, C. A., Salem, H. H., and Jackson, S. P. Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain. *Biochem.J.*, *318 (Pt 1)*: 41-47, 1996.
55. Levkau, B., Herren, B., Koyama, H., Ross, R., and Raines, E. W. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J.Exp.Med.*, *187*: 579-586, 1998.
56. Wen, L. P., Fahrni, J. A., Troie, S., Guan, J. L., Orth, K., and Rosen, G. D. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J.Biol.Chem.*, *272*: 26056-26061, 1997.
57. Gervais, F. G., Thornberry, N. A., Ruffolo, S. C., Nicholson, D. W., and Roy, S. Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. *J.Biol.Chem.*, *273*: 17102-17108, 1998.

Literatur

58. Shao, Z. M., Nguyen, M., and Barsky, S. H. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene*, 19: 4337-4345, 2000.
59. Tuxhorn, J. A., Ayala, G. E., Smith, M. J., Smith, V. C., Dang, T. D., and Rowley, D. R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin.Cancer Res.*, 8: 2912-2923, 2002.
60. Muerkoster, S., Wegehenkel, K., Arlt, A., Witt, M., Sipos, B., Kruse, M. L., Sebens, T., Kloppel, G., Kalthoff, H., Folsch, U. R., and Schafer, H. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res.*, 64: 1331-1337, 2004.
61. Muerkoster, S., Wegehenkel, K., Arlt, A., Witt, M., Sipos, B., Kruse, M. L., Sebens, T., Kloppel, G., Kalthoff, H., Folsch, U. R., and Schafer, H. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res.*, 64: 1331-1337, 2004.
62. Tuxhorn, J. A., McAlhany, S. J., Dang, T. D., Ayala, G. E., and Rowley, D. R. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res.*, 62: 3298-3307, 2002.
63. Kaiser, A., Wolf-Breitinger, M., Albers, A., Dorbic, T., Wittig, B., Riecken, E. O., and Rosewicz, S. Retinoic acid receptor gamma1 expression determines retinoid sensitivity in pancreatic carcinoma cells. *Gastroenterology*, 115: 967-977, 1998.
64. Pettengill, O. S., Faris, R. A., Bell, R. H., Jr., Kuhlmann, E. T., and Longnecker, D. S. Derivation of ductlike cell lines from a transplantable acinar cell carcinoma of the rat pancreas. *Am.J.Pathol.*, 143: 292-303, 1993.
65. Apte, M. V., Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Pirola, R. C., and Wilson, J. S. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 43: 128-133, 1998.

66. Bachem, M. G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., Siech, M., Beger, H., Grunert, A., and Adler, G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*, 115: 421-432, 1998.
67. Sparmann, G., Hohenadl, C., Tornoe, J., Jaster, R., Fitzner, B., Koczan, D., Thiesen, H. J., Glass, A., Winder, D., Liebe, S., and Emmrich, J. Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 287: G211-G219, 2004.
68. Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F. X., Lemoine, N. R., Gress, T., Bassi, C., Kloppel, G., Kalthoff, H., Ungefroren, H., Lohr, M., and Scarpa, A. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.*, 439: 798-802, 2001.
69. Sipos, B., Moser, S., Kalthoff, H., Torok, V., Lohr, M., and Kloppel, G. A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch.*, 442: 444-452, 2003.
70. Lehnert, L., Lerch, M. M., Hirai, Y., Kruse, M. L., Schmiegel, W., and Kalthoff, H. Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *J.Cell Biol.*, 152: 911-922, 2001.
71. Collins, J. A., Schandi, C. A., Young, K. K., Vesely, J., and Willingham, M. C. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J.Histochem.Cytochem.*, 45: 923-934, 1997.
72. Willingham, M. C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J.Histochem.Cytochem.*, 47: 1101-1110, 1999.
73. Weiß C. Basiswissen Medizinische Statistik, 3. ed. Springer, 2005.
74. Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E., and Chan-Hui, P. Y. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J.Cell Biol.*, 134: 793-799, 1996.
75. Han, Z., Hendrickson, E. A., Bremner, T. A., and Wyche, J. H. A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J.Biol.Chem.*, 272: 13432-13436, 1997.

Literatur

76. Stennicke, H. R., Jurgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Green, D. R., Reed, J. C., Froelich, C. J., and Salvesen, G. S. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J.Biol.Chem.*, 273: 27084-27090, 1998.
77. Apte, M. V., Haber, P. S., Darby, S. J., Rodgers, S. C., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Pirola, R. C., and Wilson, J. S. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*, 44: 534-541, 1999.
78. Schneider, E., Schmid-Kotsas, A., Zhao, J., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., Adler, G., Waltenberger, J., Grunert, A., and Bachem, M. G. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 281: C532-C543, 2001.
79. Grossmann, J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis.*, 7: 247-260, 2002.
80. Hecker, T. P. and Gladson, C. L. Focal adhesion kinase in cancer. *Front Biosci.*, 8: s705-s714, 2003.
81. Biankin, A. V., Kench, J. G., Morey, A. L., Lee, C. S., Biankin, S. A., Head, D. R., Hugh, T. B., Henshall, S. M., and Sutherland, R. L. Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.*, 61: 8830-8837, 2001.
82. Brown, K. E., Broadhurst, K. A., Mathahs, M. M., Brunt, E. M., and Schmidt, W. N. Expression of HSP47, a collagen-specific chaperone, in normal and diseased human liver. *Lab Invest*, 85: 789-797, 2005.
83. Masuda, H., Fukumoto, M., Hirayoshi, K., and Nagata, K. Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha 1(I) and alpha 1(III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J.Clin.Invest*, 94: 2481-2488, 1994.
84. Masuda, H., Hosokawa, N., and Nagata, K. Expression and localization of collagen-binding stress protein Hsp47 in mouse embryo development: comparison with types I and II collagen. *Cell Stress Chaperones.*, 3: 256-264, 1998.

Literatur

85. Matsuoka, Y., Kubota, H., Adachi, E., Nagai, N., Marutani, T., Hosokawa, N., and Nagata, K. Insufficient folding of type IV collagen and formation of abnormal basement membrane-like structure in embryoid bodies derived from Hsp47-null embryonic stem cells. *Mol.Biol.Cell*, *15*: 4467-4475, 2004.
86. Dafforn, T. R., Della, M., and Miller, A. D. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *J.Biol.Chem.*, *276*: 49310-49319, 2001.
87. Koide, T., Asada, S., and Nagata, K. Substrate recognition of collagen-specific molecular chaperone HSP47. Structural requirements and binding regulation. *J.Biol.Chem.*, *274*: 34523-34526, 1999.
88. Baum, B. J., Johnson, L. S., Franzblau, C., and Troxler, R. F. Incorporation of L-azetidine-2-carboxylic acid into hemoglobin in rabbit reticulocytes in vitro. *J.Biol.Chem.*, *250*: 1464-1471, 1975.
89. Schein, J., Frankel, L., and Rosenbloom, J. Inhibition of tropoelastin secretion by incorporation of DL-3,4-dehydroproline. *Arch.Biochem.Biophys.*, *183*: 416-420, 1977.
90. Schlaepfer, D. D. and Mitra, S. K. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, *14*: 92-101, 2004.
91. Sclabas, G. M., Fujioka, S., Schmidt, C., Evans, D. B., and Chiao, P. J. NF-kappaB in pancreatic cancer. *Int.J.Gastrointest.Cancer*, *33*: 15-26, 2003.
92. Wang, W., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Larry, L., Cleary, K. R., and Chiao, P. J. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin.Cancer Res.*, *5*: 119-127, 1999.
93. Mercier, S., Breuille, D., Mosoni, L., Obled, C., and Patureau, M. P. Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. *J.Nutr.*, *132*: 1921-1928, 2002.
94. Frisch, S. M. and Ruoslahti, E. Integrins and anoikis. *Curr.Opin.Cell Biol.*, *9*: 701-706, 1997.
95. Ilic, D., Damsky, C. H., and Yamamoto, T. Focal adhesion kinase: at the crossroads of signal transduction. *J.Cell Sci.*, *110 (Pt 4)*: 401-407, 1997.

Literatur

96. Clark, E. A. and Brugge, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, **268**: 233-239, 1995.
97. Vachon, P. H., Harnois, C., Grenier, A., Dufour, G., Bouchard, V., Han, J., Landry, J., Beaulieu, J. F., Vezina, A., Dydensborg, A. B., Gauthier, R., Cote, A., Drolet, J. F., and Lareau, F. Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology*, **123**: 1980-1991, 2002.
98. Hungerford, J. E., Compton, M. T., Matter, M. L., Hoffstrom, B. G., and Otey, C. A. Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J. Cell Biol.*, **135**: 1383-1390, 1996.
99. Kabir, J., Lobo, M., and Zachary, I. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem.J.*, **367**: 145-155, 2002.
100. Beviglia, L., Golubovskaya, V., Xu, L., Yang, X., Craven, R. J., and Cance, W. G. Focal adhesion kinase N-terminus in breast carcinoma cells induces rounding, detachment and apoptosis. *Biochem.J.*, **373**: 201-210, 2003.
101. Carragher, N. O., Fincham, V. J., Riley, D., and Frame, M. C. Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during SRC-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J. Biol. Chem.*, **276**: 4270-4275, 2001.
102. Garcia-Morales, P., Gomez-Martinez, A., Carrato, A., Martinez-Lacaci, I., Barbera, V. M., Soto, J. L., Carrasco-Garcia, E., Menendez-Gutierrez, M. P., Castro-Galache, M. D., Ferragut, J. A., and Saceda, M. Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.*, **4**: 1222-1230, 2005.
103. de Bruin, E. C., Meersma, D., de Wilde, J., den, O., I., Schipper, E. M., Medema, J. P., and Peltenburg, L. T. A serine protease is involved in the initiation of DNA damage-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, **10**: 1204-1212, 2003.
104. McAuslan, B. R., Reilly, W., Hannan, G. N., Schindhelm, K., Milthorpe, B., and Saur, B. A. Induction of endothelial cell migration by proline analogs and its relevance to angiogenesis. *Exp. Cell Res.*, **176**: 248-257, 1988.

Literatur

105. McLean, G. W., Avizienyte, E., and Frame, M. C. Focal adhesion kinase as a potential target in oncology. *Expert.Opin.Pharmacother.*, *4*: 227-234, 2003.
106. McLean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G., and Frame, M. C. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat.Rev.Cancer*, *5*: 505-515, 2005.
107. Hecker, T. P., Ding, Q., Rege, T. A., Hanks, S. K., and Gladson, C. L. Overexpression of FAK promotes Ras activity through the formation of a FAK/p120RasGAP complex in malignant astrocytoma cells. *Oncogene*, *23*: 3962-3971, 2004.
108. Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Liu, E. T., and Cance, W. G. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.*, *55*: 2752-2755, 1995.
109. Golubovskaya, V., Beviglia, L., Xu, L. H., Earp, H. S., III, Craven, R., and Cance, W. Dual inhibition of focal adhesion kinase and epidermal growth factor receptor pathways cooperatively induces death receptor-mediated apoptosis in human breast cancer cells. *J.Biol.Chem.*, *277*: 38978-38987, 2002.
110. Hauck, C. R., Hsia, D. A., Puente, X. S., Cheresh, D. A., and Schlaepfer, D. D. FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *EMBO J.*, *21*: 6289-6302, 2002.
111. Owens, L. V., Xu, L., Dent, G. A., Yang, X., Sturge, G. C., Craven, R. J., and Cance, W. G. Focal adhesion kinase as a marker of invasive potential in differentiated human thyroid cancer. *Ann.Surg.Oncol.*, *3*: 100-105, 1996.
112. Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P., and Hunter, T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol.Cell Biol.*, *21*: 4016-4031, 2001.
113. Schneider, G., Lersch, C., and Schmid, R. M. [Pancreatic carcinogenesis. Clinical implications]. *Chirurg*, *74*: 165-170, 2003.
114. Kindler, H. L. Pancreatic cancer: an update. *Curr.Oncol.Rep.*, *9*: 170-176, 2007.

Literatur

115. Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Vosoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., and Parulekar, W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J.Clin.Oncol.*, *25*: 1960-1966, 2007.
116. Groenendyk, J. and Michalak, M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim.Pol.*, *52*: 381-395, 2005.
117. Liu, X. J., Yang, L., Wu, H. B., Qiang, O., Huang, M. H., and Wang, Y. P. Apoptosis of rat hepatic stellate cells induced by anti-focal adhesion kinase antibody. *World J.Gastroenterol.*, *8*: 734-738, 2002.
118. Parsons, J. T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J.Cell Sci.*, *116*: 1409-1416, 2003.
119. Xu, L. H., Owens, L. V., Sturge, G. C., Yang, X., Liu, E. T., Craven, R. J., and Cance, W. G. Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ.*, *7*: 413-418, 1996.
120. McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., and Holbrook, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol.Cell Biol.*, *21*: 1249-1259, 2001.
121. Egger, L., Schneider, J., Rheme, C., Tapernoux, M., Hacki, J., and Borner, C. Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death.Differ.*, *10*: 1188-1203, 2003.
122. Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., and Jaattela, M. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J.Cell Biol.*, *153*: 999-1010, 2001.
123. Leist, M. and Jaattela, M. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death.Differ.*, *8*: 324-326, 2001.
124. Leist, M. and Jaattela, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, *2*: 589-598, 2001.

Literatur

125. Yamashima, T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog.Neurobiol.*, *62*: 273-295, 2000.
126. Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death.Differ.*, *6*: 1067-1074, 1999.
127. Cummings, B. S., Kinsey, G. R., Bolchoz, L. J., and Schnellmann, R. G. Identification of caspase-independent apoptosis in epithelial and cancer cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, *310*: 126-134, 2004.
128. Momoi, T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J.Chem.Neuroanat.*, *28*: 101-105, 2004.
129. Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J.Biol.Chem.*, *277*: 34287-34294, 2002.
130. Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J.Clin.Invest.*, *115*: 2656-2664, 2005.
131. Brewer, J. W., Hendershot, L. M., Sherr, C. J., and Diehl, J. A. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *96*: 8505-8510, 1999.
132. Jamora, C., Dennert, G., and Lee, A. S. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *93*: 7690-7694, 1996.
133. Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J., and Lee, A. S. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J.Biol.Chem.*, *278*: 20915-20924, 2003.
134. Brewer, J. W., Cleveland, J. L., and Hendershot, L. M. A pathway distinct from the mammalian unfolded protein response regulates expression of endoplasmic reticulum chaperones in non-stressed cells. *EMBO J.*, *16*: 7207-7216, 1997.
135. Schlaepfer, D. D., Mitra, S. K., and Ilic, D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim.Biophys.Acta*, *1692*: 77-102, 2004.

Literatur

136. Madro, A., Celinski, K., and Slomka, M. The role of pancreatic stellate cells and cytokines in the development of chronic pancreatitis. *Med.Sci.Monit.*, *10*: RA166-RA170, 2004.
137. Desmouliere, A., Guyot, C., and Gabbiani, G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int.J.Dev.Biol.*, *48*: 509-517, 2004.
138. Lohr, M., Schmidt, C., Ringel, J., Kluth, M., Muller, P., Nizze, H., and Jesnowski, R. Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.*, *61*: 550-555, 2001.
139. Emmrich, J., Weber, I., Nausch, M., Sparmann, G., Koch, K., Seyfarth, M., Lohr, M., and Liebe, S. Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion*, *59*: 192-198, 1998.

8 Anhang

8.1 Herkunft der Materialen

8.1.1 Basismaterialien

Soweit im Folgenden nicht anders erwähnt, stammen alle Basismaterialien von Sigma.

Aminosäuren, nicht-essentielle 100fach Stammlösung	Invitrogen, Karlsruhe
APS, 10%	Serva, Heidelberg
γ - ³² P-ATP	Amersham, Freiburg
Caspase-Inhibitor (zDEVD-fmk)	Calbiochem, Schwalbach
CHP	Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems, Greifswald
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM-Zellkulturmedium	Biochrom, Berlin
DMSO	Merck, Darmstadt
Doppelstrang-Oligo (Stammlösung)	BioTez, Berlin
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
FKS, 10%	Biochrom, Berlin
Glycerol	Merck, Darmstadt
IMDM-Zellkulurmedium	PAA Laboratories, Cölbe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Prolin	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Oligo(dT)	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Zentralapotheke Uni Rostock

Pefabloc	Roche, Mannheim
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-dI-dC Stammlösung	Roche, Mannheim
Polynukleotidkinase (T4-Kinase)	Roche, Mannheim
Protease Arrest Reagent	Calbiochem, Schwalbach
Protein Molecular Weight Marker, Premixed, Prestained	New England Biolabs, Schwalbach
RNasin	Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Superscript RT	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Quiagen,
TEMED	AppliChem
TBE-Puffer, 10fach	GIBCO
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypsin / EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

8.1.2 Antikörper

β-Actin	Sigma, München
Alexa Flour anti-Maus IgG	MoBiTec, Göttingen
cleaved Caspase-3	Cell Signalling
Cyclin D1	Santa Cruz
FAK	Transduktion
GRP78	BD Biosciences
PARP	Santa Cruz
Peroxidase-gekoppelte, sekundäre Antikörper	Amersham, Freiburg
Supershift-Antikörper	Santa Cruz

8.1.3 Kits

BrdU-labelling Cell Proliferation ELISA Kit	Roche, Mannheim
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
ECL Plus Kit	Amersham, Freiburg
Suicide-Track DNA Ladder Isolation Kit	Calbiochem, Mannheim

8.2 Lösungen, Puffer und Herstellung der Reaktionsgemische

8.2.1 RT-PCR

Verwendete Lösungen: Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5µg/µl)
Superscript RT (200U/µl)
dNTP (2,5mM)
DTT(0,1M)
Puffer(5x)
RNasin

Für die RT wurden 3µg RNA eingesetzt. Um das gewünschte Reaktionsvolumen von 40µl zu erreichen, wurde je die fehlende Menge mit RNase freiem Wasser (im Folgenden nur als Wasser bezeichnet) aufgefüllt, d.h.:

Gesamtes Volumen je Probe : 17,5µl Mix + 0,5µl Oligo(dT) + RNA + Wasser = 40µl
PCR-Reaktionsgemisch

Materialen: PCR-Wasser
PCR-Puffer (10 fach)
25mM MgCl₂
dNTP (2,5 mM)
Primer (25 pg /µl)
Taq (5U /µl)

16,9µl Wasser (mit Kontroll-Fragment (KF): 15,9µl Wasser)
2,5µl PCR-Puffer
0,5µl MgCl₂
1µl Primer sense
1µl Primer anti-sense
1µl Kontroll-Fragment
0,1µl Taq-Polymerase
1µl cDNA je Probe

Gesamt: je Probe 25µl (8,1µl (9,1µl mit KF) Reaktionsgemisch + 16,9µl (15,9 µl mit KF) Wasser)

PCR-Primer und PCR-Zyklerprogramme

Tabelle 1: verwendete Oligonukleotid-Primer

Name	Forward primer	Reverse Primer
GRP78	GACATTTGCCCCAGAAGAAA	ATGACCCGCTATCAAAGTC
GADD153	AGCTGAGTCTCTGCCTTCG	TGTGGTCTCTACCTCCCTGG
HSP47	CAGTGGTGGAGCGCTGAGAAG	GCCACGGTTGTCTACCATCT
Kollagen-4	GCCACACTGCCTGTCACTT	GCCCTGTTTACCTGTCTGTGG
Kollagen-1	CAAGAATGGCGACCGTGGTGA	GTCCACCTCAAGGTCACGGTC
β-Actin	CTATCGGCAATGAGCGGTTC	CTTAGGAGTTGGGGGTGGCT

Tabelle 2: verwendete PCR-Programme/ Schritte

Name	Größe PCR- Produkt (bp)	1.	2.	3.	4. *	5. Anzahl Wiederholung Schritte 2.-5.	6.	7.
GRP78	375	95° C 4mi n	95° C 30s	60° C 40s	72° C 40s	22	72° C 7mi n	10° C
GADD153	456	94° C 4mi n	94° C 30s	64° C 40s	72° C 50s	21	72° C 7mi n	4°C
HSP47	386	95° C 5mi n	95° C 30s	62° C 45s	72° C 40s	31	72° C 7mi n	10° C
Kollagen-4	430	94° C 4mi n	94° C 30s	64° C 40s	72° C 50s	35	72° C 7mi n	4°C
Kollagen-1	513	95° C 5mi n	95° C 30s	60° C 45s	72° C 40s	30	72° C 7mi n	10° C
β-Actin (KF)	762 (601)	94° C 4mi n	94° C 30s	64° C 40s	72° C 50s	18	72° C 7mi n	4°C

* jeweils +1s/ Zyklus

8.2.2 Western-Blot

Gewinnung der Proteine

Ansatz Probenpuffer (4fach): 3,8g SDS
2ml ETDA (0,5M pH 8,0)
25ml Sammelgelpuffer (s.u.)
22 ml Glycerol
1 Spatelspitze Bromophenolblau
Aqua dest. (Auffüllen auf 50ml)

Vor Verwendung des Probenpuffers wurde dieser 1:4 mit Aqua dest. verdünnt, dann erfolgte die Zugabe von 5% Mercaptoethanol und anschließend die Erhitzung auf 100°C.

Gel-Herstellung und Elektrophorese:

Trenngel-Puffer, pH 8,8 36,33g 1,5M Tris [Roth]
0,8g SDS [Serva]
Aqua dest. (Auffüllen auf 200ml)

Sammelgel-Puffer, pH 6,8 6,06g 0,5M Tris
0,4g SDS
Aqua dest. (Auffüllen auf 100ml)

Trenngel 8%

10% APS	200µl
TEMED	20µl
Trenngel-Puffer	8,25ml
Acrylamid-Stocklösung	6,7ml
Aqua dest.	17,8ml

Sammelgel

Aqua dest.	5,08ml
Acrylamid-Stocklösung	1,00ml
Sammelgel-Puffer	2,08ml
TEMED	10µl
10% APS	30µl

Ansetzen der Gele / Elektrophorese:

Elektrodenpuffer(3fach), pH 8,8: TRIS 25mM 18,18g
Glycin 84,6g
SDS 0,1% 6,0g
auf 2l Aqua dest.

Einstellungen Strom: für 1Gel 25mA für Sammelgel
2mA für Trenngel bei Elektrophorese über Nacht
(35mA falls über Tag)

bei 2 Gelen wurde die doppelte Ampere-Zahl benutzt

Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Protein	Größe des Proteins	Erkannte AS-Sequenz	Art	Firma
FAK	125	N354-534	Maus, monoclonal	Transduktion
GRP78	78	N525-628	Maus, monoclonal	BD Biosciences
cleaved Caspase3	17/20	cleaved Caspase3(Asp175)	Kaninchen	Cell Signalling
PARP	115	N764-1014	Kaninchen, polyclonal	Santa Cruz
CyclinD1		N1-295	Kaninchen, polyclonal	Santa Cruz
β-Actin	42	N-terminal	Maus, monoclonal	Sigma,

Inkubation mit Antikörper:

PBS-TWEEN 0,1%: 2ml TWEEN auf 2l PBS
BSA 0,1%: 500mg BSA auf 500ml PBS-TWEEN

Re-Probing

Stripping-Lösung: 349,6µl Mercaptoethanol
1ml 10% SDS
3,125 ml Tris 1M 6,7pH
43,052 ml dest.Wasser
ergibt 50ml Lös.

8.2.3 Electro Mobility Shift Asssay (EMSA)

Herstellung von Kernextrakten

Hierunter versteht man das Extrahieren der Kernproteine aus den zu untersuchenden Zellen
Zur Herstellung der Kernextrakte benutzt man die hypotone Lyse der Zellen, gefolgt von der hypertonen Lyse der Zellkerne.

Einzelne Schritte:

1. Medium abnehmen und in Reaktionsgefäß geben, dann 1,3ml eiskalten Puffer A pro well zugeben
2. Platten 10 min auf Eis inkubieren (hypotone Lyse der Zellen)
3. Reaktionsgefäßss bei Umax kurz (~ 20sec) zentrifugieren und Überstand aspirieren
4. 200µl eiskalten Puffer A in Reaktionsgefäßss, ebenfalls 10 min auf Eis inkubieren
5. Nach Ablauf der Zeit auf Platten verbliebene Zellen mit Schaber ablösen, well-Inhalt In entsprechendes Reaktionsgefäß überführen
6. Weitere 5 min Inkubation auf Eis, Zentrifugation 20 sec bei Umax, Überstand aspirieren, dann nochmals kurz bei Umax zentrifugieren und restlichen Überstand aspirieren
7. Je nach Pellet-Größe Zugabe von 20-40µl Puffer B
8. 20 min auf Eis inkubieren(hypertone Lyse der Zellkerne)
9. 3 min bei Umax zentrifugieren, Überstand in Reaktionsgefäß überführen und bei – 80°C wegfreren (evtl. portionieren)

Stammlösungen:

- HEPES 50mM pH 7,9
- KCL 100mM
- MgCl₂ 15mM
- DTT 100mM
- EDTA 100mM pH 8.0
- Pepstatin: 1mg/ ml
- Pefabloc (Proteaseinhibitor-Cocktail) (1 Tbl. in 2,4ml Bidest)
- Vanadat 100mM

Tabelle 4: Ansatz der Puffer zur Herstellung der Kernextrakte

	Puffer A (25ml)	Endkonzentration	Puffer B (10ml)	Endkonzentration
HEPES	5ml	10mM	4ml	20mM
KCl	2,5ml	10mM	-	-
MgCl ₂	2,5ml	1,5mM	500µl	1,5mM
DTT	125µl	0,5mM	50 µl	0,5mM
Glycerol	-	-	2,5ml	25%
NaCl	-	-	246mg	420mM
EDTA	-	-	20µl	0,2mM
Leupeptin (oder Pepstatin)	18µl		7µl	
Pefabloc	1ml		400µl	
Vanadat	250µl	1mM	100µl	1mM
Aqua dest.	13,608ml		4,846ml	

Markierung mit ^{32}P und Bindungsreaktion

Reaktionsgemisch:

- 1 μl Doppelstrang-Oligo (BioTez)
- 2 μl 10 X Puffer für Polynukleotidkinase [T4-Kinase] (Roche)
- 13 μl Aqua dest.
- 3 μl γ -32P-ATP (Amersham Boisciences)
- 1 μl Polynukleotidkinase (Roche)

Ansatz 1X TE-Puffer: 1mM EDTA = 0,372 g / 1 (Stammlösung 100mM, pH 8.0)
10mM Tris-HCL =1,211g/ 1 (Stammlösung 1M , pH 8.0)

Shift-Puffer:

10mM Tris pH 7.5, 50mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 5% Glycerol, 0,1% NP 40 , 1mM Pefabloc

10X Puffer-Stammlösung:

Tris 100mM pH 7.5, NaCl 500mM, EDTA 1mM (100mM Stammlösung pH 8.0)
(Aliquots bei -20°C)

Ansatz für 1ml (auf Eis):

- 100 μl Puffer-Stammlösung
- 10 μl DTT 0,1M
- 50 μl Glycerin
- 10 μl NP 40 (10% Stammlösung)
- 10 μl Pefabloc (100 mg/ ml Stammlösung; Aliquots bei -20°C)
- 820 μl Aqua dest.

Ansätze für Bindungsreaktion

- 4 μl Shift-Puffer
- 2 μl BSA (10mg / ml, Aliquots bei -20°C)
- 2 μl Poly-dI-dC (Stammlösung 1 $\mu\text{g} / 1\mu\text{l}$)
- je 3-6 μl Kernextrakt und Sonde
- 20 μl Aqua dest.

Elektrophorese:

Gießen eines nativen 6%-Polyacrylamidgels nach folgendem Ansatz:

- 6ml Acrylamid / Bis (40%, 29:1)
- 1ml 10 X TBE-Puffer (GIBCO)
- 33ml Aqua dest.
- 240 μl APS 10%
- 80 μl TEMED

9 Veröffentlichungen:

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Publikation bzw. Postern veröffentlicht:

Publikation:

Mueller C, Emmrich J, Jaster R, Braun D, Liebe S, Sparmann G.

Cis-hydroxyproline-induced inhibition of pancreatic cancer cell growth is mediated by endoplasmic reticulum stress. World J Gastroenterol 2006; 12 (10): 1569-1576

<http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/1569.asp>

Poster:

Mueller C, Emmrich S, Sparmann G, Jaster R, Liebe S, Emmrich J. Cis-hydroxyproline inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic carcinoma cells. Pancreas 27 (2003) 4:397

Mueller C, Emmrich S, Sparmann G, Avram D, Jaster R, Liebe S, Emmrich J.

Cis-hydroxyproline inhibits proliferation of pancreatic carcinoma cells and pancreatic stellate cells. Gastroenterology 126 (2004) Suppl 2: A-548

Mueller C, Sparmann G, Jaster R, Liebe S, Emmrich J Cis-Hydroxyprolin hemmt das Wachstum der Pankreaskarzinomzelllinie DSL6A durch Induktion von Endoplasmatischen Retikulum (ER)- Stress. Z Gastroenterol 2005; 43 822 P174

Mueller C, Emmrich J, Jaster R, Liebe S, Sparmann G. Cis-hydroxyproline-mediated endoplasmic reticulum stress in pancreatic carcinoma cells. Gut 54 (2005) Suppl 7: A244

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. J. Emmrich für die freundliche Aufnahme in seine Forschungsgruppe und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit dort anfertigen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. G. Sparmann, die mich in die notwendigen Arbeitstechniken eingewiesen und mich während der gesamten Zeit in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen hervorragend unterstützt hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. R. Jaster, insbesondere für seine Hilfe bei der Durchführung der Elektro Mobility Shift Assays.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, darunter besonders Fr. E. Prestin für die freundliche Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Dr. P. Lorenz, Institut für Immunologie, für seine Hilfe bei der Laser Scanning Mikroskopie.

Zuletzt danke ich auch meinen Eltern, ohne deren vor allem finanzielle Unterstützung weder Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wären.

11 Curriculum vitae

Hochschulstudium:

1999	Beginn des Medizinstudiums an der Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn
2001	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
2001	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Rostock
2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
2002	Urlaubssemester; Beginn der experimentellen Dissertation (WS 02/03)
2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
2005-2006	Praktisches Jahr (PJ) 1. Tertiäl: 2 Monate Allgemein- und Gefäßchirurgie und 2 Monate Neurochirurgie 2. Tertiäl: 4 Monate Anästhesiologie und Intensivmedizin 3. Tertiäl: 4 Monate Innere Medizin
2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)
2006	Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Tübingen

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe.

Andere Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen sind von mir nicht benutzt wurden. Alle Stellen im Text, die anderen Werken im Wortlaut oder sinngemäß entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht. Gleiches gilt für alle beigegebenen Abbildungen.

Rostock, den 14.10.2008

Christoph Müller