Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock,

Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Georg Lamprecht

Forschungslabor für Gastroenterologie

Leiter: Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster

# Regulatorische Funktionen des Hippo-Signalwegs in der Aktivierung pankreatischer Sternzellen der Ratte

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Lennard Spanehl | geb. am 06.01.1998 in Leipzig

Rostock | Juni 2022

Doktorarbeit

Universitätsmedizin Rostock

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004248

**Dekan:** Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. **Gutachter:**

   Prof. Dr. med. Robert Jaster
   Klinik für Innere Medizin II
   Universitätsmedizin Rostock

2. **Gutachter:**

   Prof. Dr. rer. nat. Angela Kuhla
   Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
   Universitätsmedizin Rostock

3. **Gutachter:**

   Prof. Dr. med. Ulrich F. Wellner
   Klinik für Chirurgie
   Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

**Datum der Verteidigung:** 15. März 2023

**INHALTSVERZEICHNIS**


**1. Grundlagen ... 1**

**1.1 Stand der Forschung ... 1**

1.1.1 Erkrankungen des exokrinen Pankreas ... 1

1.1.1.1 Chronische Pankreatitis ... 1

1.1.1.2 Pankreaskarzinom ... 4

1.1.1.3 Fibrose ... 7

1.1.2 Pankreatische Sternzellen ... 8

1.1.2.1 Allgemeine Beschreibung und Entdeckung ... 8

1.1.2.2 Rolle bei Erkrankungen des exokrinen Pankreas ... 10

1.1.2.3 Mechanismen der Aktivierung und Inhibition ... 12

1.1.3 Hippo-Signalweg ... 13

1.1.3.1 Beschreibung ... 13

1.1.3.2 Rolle bei Erkrankungen des exokrinen Pankreas ... 14

1.1.3.3 Therapeutische Beeinflussung ... 15

**1.2 Zielstellung der Arbeit ... 17**

**2. Material und Methoden ... 18**

**2.1 Material ... 18**

2.1.1 Geräte ... 18

2.1.2 Allgemeine Labormaterialien ... 19

2.1.3 Lösungen und Reagenzien für die Immunhistochemie ... 19

2.1.4 Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur ... 20

2.1.5 Lösungen und Reagenzien für den Luciferase-Reportergenassay ... 21

2.1.6 Lösungen und Reagenzien für die Zellproliferationsmessung ... 21

2.1.7 Materialien für die Zellzählung ... 21

2.1.8 Lösungen und Reagenzien für den Caspase-Assay ... 22

2.1.9 Lösungen und Reagenzien für die Nukleinsäureanalytik ... 22

2.1.10 Lösungen und Reagenzien für die IL-6-Bestimmung ... 23

2.1.11 Lösungen und Reagenzien für die Proteinanalytik ... 23

2.1.12 Lösungen und Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung ... 24

2.1.13 Lösungen und Reagenzien für die Ölrot-Färbung ... 25

**2.2 Methoden ... 26**
2.2.1 Immunhistochemie ... 26
2.2.2 Verwendete Zellen ... 28
2.2.3 Kultivierung der Zellen ... 29
2.2.4 Luciferase-Reportergenassay ... 29
2.2.5 Analyse der Zellproliferation ... 32
2.2.6 Analyse der Zellviabilität ... 33
2.2.6.1 Zellzählung ... 33
2.2.6.2 Caspase-Assay ... 34
2.2.7 Nukleinsäureanalytik ... 35
2.2.8 Analyse der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand ... 41
2.2.9 Proteinanalytik ... 42
2.2.10 Analyse der Zellmorphologie ... 46
2.2.10.1 Immunfluoreszenzfärbung von α-SMA und YAP ... 46
2.2.10.2 Färbung der intrazellulären Triglyceride mit Ölrot O ... 47
2.2.11 Scratch assay zur Analyse der Zellmigration ... 51
2.2.12 Statistische Analyse ... 53
**3. Ergebnisse ... 54**
**3.1 Immunhistochemische Färbung von YAP und TAZ in Gewebeschnitten des Pankreas ... 54**
3.1.1 Akute ödematöse Pankreatitis durch Caerulein ... 54
3.1.2 Chronische Pankreatitis durch DBTC ... 54
3.1.3 autoimmune Pankreatitis ... 54
**3.2 Ergebnisse des Luciferase-Reportergenassays ... 58**
**3.3 Einfluss von YAP-Inhibitoren auf die Zellproliferation und -viabilität ... 60**
3.3.1 Auswirkungen auf die DNA-Syntheserate ... 60
3.3.2 Auswirkungen auf die Zellviabilität ... 62
**3.4 Einfluss von YAP-Inhibitoren auf die Genexpression ... 64**
**3.5 Einfluss von YAP-Inhibitoren auf die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand ... 71**
**3.6 Einfluss von YAP-Inhibitoren auf die Proteinexpression ... 72**

**3.7 Einfluss von YAP-Inhibitoren auf die Zellmorphologie ..... 79**
3.7.1 Immunfluoreszenzfärbung von α-SMA ..... 79
3.7.2 Färbung intrazellulärer Triglyceride mit Ölrot O ..... 79
**3.8 Einfluss von YAP-Inhibitoren auf die Zellmigration ..... 82**
**4. Diskussion ..... 83**
**4.1 Expression von YAP und TAZ in Gewebeschnitten des Pankreas ..... 83**
**4.2 Funktionen von YAP in pankreatischen Sternzellen ..... 85**
4.2.1 verwendete Zellen und deren Limitationen ..... 85
4.2.2 Beeinflussen bekannte Regulatoren pankreatischer Sternzellen die Aktivität des Hippo-Signalwegs? ..... 85
4.2.3 Auswirkungen von YAP-Inhibitoren auf die Funktionen von PSZ ..... 86
4.2.3.1 Wirksamkeitsnachweis der eingesetzten siRNA-Varianten ..... 87
4.2.3.2 Zellproliferation und -viabilität ..... 87
4.2.3.3 Genexpression ..... 88
4.2.3.4 Bestätigung ausgewählter Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf Proteinebene ..... 90
4.2.3.5 Beurteilung der Aktivierung von PSZ auf morphologischer Ebene ..... 91
4.2.3.6 Zellmigration ..... 92
**4.3 Integrative Betrachtungen und Ausblick ..... 93**
**5. Zusammenfassung ..... 97**
**6. Thesen ..... I**
**7. Literatur ..... III**
**8. Abkürzungsverzeichnis ..... XX**
**9. Herstellerverzeichnis ..... XXIII**
**10. Lebenslauf ..... XXV**
**11. Veröffentlichungen ..... XXVI**
**12. Danksagung ..... XXVII**
**13. Eidesstattliche Versicherung ..... XXVIII**

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: **Aktivierung von PSZ** ..... 9
Abbildung 1.2: **Hippo-Signalweg und Wirkprinzip von YAP-Inhibitoren** ..... 16
Abbildung 2.1: **Schema des Luciferase-Reportergenassays** ..... 31
Abbildung 2.2: **RNA-Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel** ..... 38
Abbildung 2.3: **Exemplarische Zuordnung der Scores des Bewertungsschemas zu α-SMA-Immunfluoreszenzaufnahmen** ..... 49
Abbildung 2.4: **Exemplarische Zuordnung der Scores des Bewertungsschemas zur Ölrot-Färbung** ..... 50
Abbildung 2.5: **Messung der Defektbreite im Rahmen des Migrationsassays** ..... 52
Abbildung 3.1: **Immunhistochemische Färbung von YAP und TAZ in pankreatischen Gewebeschnitten gesunder und an akuter Pankreatitis erkrankter Mäuse** ..... 55
Abbildung 3.2: **Immunhistochemische Färbung von YAP und TAZ in pankreatischen Gewebeschnitten gesunder und an chronischer Pankreatitis erkrankter Ratten** ..... 56
Abbildung 3.3: **Immunhistochemische Färbung von YAP und TAZ in pankreatischen Gewebeschnitten gesunder und an autoimmuner Pankreatitis erkrankter Mäuse** ..... 57
Abbildung 3.4: **Aktivität der *Firefly*-Luciferase immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Zytokinen bzw. Kinaseinhibitoren** ..... 59
Abbildung 3.5: **DNA-Syntheseleistung immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Verteporfin bzw. siRNA gegen YAP** ..... 61
Abbildung 3.6: **DNA-Syntheseleistung primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin** ..... 61
Abbildung 3.7: **Zelltodrate und Caspaseaktivität immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Verteporfin bzw. siRNA gegen YAP** ..... 63
Abbildung 3.8: **Zelltodrate primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin bzw. siRNA gegen YAP** ..... 64
Abbildung 3.9: **Genexpression immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Verteporfin** ..... 65
Abbildung 3.10: **Genexpression immortalisierter PSZ nach Behandlung mit siRNA gegen YAP** 67
Abbildung 3.11: **Genexpression primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin** ..... 68
Abbildung 3.12: **Genexpression primärer PSZ nach Behandlung mit siRNA gegen YAP** ..... 70
Abbildung 3.13: **IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand von PSZ nach Behandlung mit siRNA gegen YAP bzw. Verteporfin** ..... 72
Abbildung 3.14: ***YAP1*-Expression immortalisierter PSZ nach unterschiedlich langer Behandlung mit siRNA gegen YAP** ..... 73
Abbildung 3.15: **Proteinexpression immortalisierter PSZ nach Behandlung mit siRNA gegen YAP** ..... 74
Abbildung 3.16: **Proteinexpression primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin** ..... 75
Abbildung 3.17: **Proteinexpression primärer PSZ nach unterschiedlich langer Behandlung mit siRNA gegen YAP** ..... 78

Abbildung 3.18: **Immunfluoreszenzfärbung von α-SMA in primären PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**..... 80
Abbildung 3.19: **Färbung der intrazellulären Triglyceride primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**..... 81
Abbildung 3.20: **Migrationsrate immortalisierter bzw. primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**..... 82
Abbildung 4.1: **Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse**..... 96

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: **Geräte** ..... 18
Tabelle 2: **Allgemeine Labormaterialien** ..... 19
Tabelle 3: **Lösungen und Reagenzien für die Immunhistochemie** ..... 19
Tabelle 4: **Primärantikörper Immunhistochemie** ..... 20
Tabelle 5: **Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur** ..... 20
Tabelle 6: **Lösungen und Reagenzien für den Luciferase-Reportergenassay** ..... 21
Tabelle 7: **Lösungen und Reagenzien für die Zellproliferationsmessung** ..... 21
Tabelle 8: **Materialien für die Zellzählung** ..... 21
Tabelle 9: **Lösungen und Reagenzien für den Caspase-Assay** ..... 22
Tabelle 10: **Lösungen und Reagenzien für die Nukleinsäureanalytik** ..... 22
Tabelle 11: ***Assay on Demand kits* für die Nukleinsäureanalytik** ..... 22
Tabelle 12: **Lösungen und Reagenzien für die IL-6-Bestimmung** ..... 23
Tabelle 13: **Primärantikörper für die Proteinanalytik** ..... 23
Tabelle 14: **Sekundärantikörper für die Proteinanalytik** ..... 23
Tabelle 15: **Lösungen und Reagenzien für die Proteinanalytik** ..... 23
Tabelle 16: **Lösungen und Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung** ..... 24
Tabelle 17: **Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung** ..... 24
Tabelle 18: **Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung** ..... 25
Tabelle 19: **Lösungen und Reagenzien für die Ölrot-Färbung** ..... 25
Tabelle 20: **Verdünnung der Primärantikörper für die IHC-Färbung** ..... 28
Tabelle 21: **Mengen der Reagenzien für die RNA-Isolation** ..... 36
Tabelle 22: **Zusammensetzung des Mastermixes für die reverse Transkription einer RNA-Probe** ..... 38
Tabelle 23: **Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für eine Probe** ..... 39
Tabelle 24: **Häufigkeit und Temperaturprofil der PCR-Zyklen** ..... 40
Tabelle 25: **Zusammensetzung der Minigele für die SDS-PAGE** ..... 43
Tabelle 26: **Aufbau des *Blotting-Sandwiches* für den *Tank-Blot*** ..... 44
Tabelle 27: **Verdünnung der Primärantikörper für die Immundetektion** ..... 45
Tabelle 28: **Bewertungsschema für die Auswertung der $\alpha$-SMA-Immunfluoreszenzfärbung** ..... 47
Tabelle 29: **Bewertungsschema für die Auswertung der Ölrot-Färbung** ..... 48
Tabelle 30: **Herstellerverzeichnis** ..... XXIII

# 1. GRUNDLAGEN

## 1.1 STAND DER FORSCHUNG

### 1.1.1 ERKRANKUNGEN DES EXOKRINEN PANKREAS

#### 1.1.1.1 CHRONISCHE PANKREATITIS

Bei der chronischen Pankreatitis (CP) handelt es sich um eine durch rezidivierende Entzündungsschübe charakterisierte Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, welche zum bindegewebigen Umbau des Organparenchyms führt [1].

**EPIDEMIOLOGIE**

Die Inzidenz liegt weltweit bei ca. 10 Fällen pro 100 000 Personenjahren [2] und zeigt eine zunehmende Tendenz [3]. Männer erkranken doppelt so häufig wie Frauen [2]. Auch global gibt es teilweise erhebliche Unterschiede. So sind nach eigenen Angaben 0,7 % der Erwachsenen in Vorpommern an einer CP erkrankt [4]. Die Prävalenz der Krankheit in den USA liegt hingegen bei ca. 0,07 % [5].

**ÄTIOLOGIE**

Als Risikofaktoren der CP konnten neben dem männlichen Geschlecht das Rauchen von mindestens 5,5 Zigaretten pro Tag sowie der Konsum von mindestens 13,5 g Alkohol pro Tag identifiziert werden [6]. Die Zufuhr von Alkohol ist damit also potenziell auch gefährlich, wenn sie unter der von der WHO definierten riskanten Trinkmenge von 24 g pro Tag (für Männer) liegt [7].

Weitere Ursachen der CP sind eher selten, werden jedoch in der 2001 von Etemad und Whitcomb eingeführten TIGAR-O Klassifikation ebenfalls berücksichtigt. TIGAR-O ist dabei ein Akronym, welches für die verschiedenen Hauptkategorien steht: **t**oxisch-metabolisch, **i**diopathisch, **g**enetisch, **a**utoimmun, **r**ezidivierende schwere akute Pankreatitis, **o**bstruktiv [8]. In den USA wurde in einer epidemiologischen Studie folgende Häufigkeitsverteilung der Hauptrisikofaktoren ermittelt: Rauchen (59 %), Alkohol (53 %), Idiopathisch (30 %), Obstruktiv (19 %) und Hyperlipidämie (13 %) [9]. Blickt man hingegen auf die durch Ärzte attribuierte Ätiologie der Pankreatitis, so scheint die äthyltoxische Genese mit 50 – 84 % am stärksten für die CP verantwortlich zu sein [1]. Typischerweise manifestiert sich eine durch übermäßigen Alkoholkonsum ausgelöste CP früher als andere Formen [10]. Auch der Zeitpunkt des erhöhten Alkoholkonsums ist von Bedeutung. Ist der Konsum bereits in jungem Lebensalter

erhöht, so ist dies mit einem vorzeitigen Erkrankungsbeginn assoziiert [10]. Obwohl bekannt ist, dass Ethanol die Zymogenaktivierung beeinflusst [11], sind die pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung nicht vollständig geklärt. Des Weiteren scheint Alkohol als alleiniger Faktor für das Entstehen einer CP nicht hinreichend zu sein. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass nur eine Minderheit der Alkoholiker eine Pankreatitis entwickelt [12]. Insbesondere die Ernährung scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen [13]. Begleitender Tabakkonsum führt zu einer früheren Manifestation der CP [10] und zum Voranschreiten der Erkrankung [14]. Obwohl sie oft gemeinsam auftreten, sind Alkohol- und Tabakkonsum unabhängige Risikofaktoren der CP [15].

Die Kategorie der idiopathischen Pankreatitiden verliert zunehmend an Bedeutung, da aufgrund eines besseren Verständnisses von hereditären und autoimmunen Prozessen immer mehr Erkrankungsfälle einer spezifischen Ätiologie zugeordnet werden können [16, 17].

Die hereditäre Pankreatitis (HP) ist zwar eher selten, sollte jedoch insbesondere bei jüngeren Patienten in Betracht gezogen werden [18]. Trotz uneinheitlicher Definition wird im engeren Sinn in der Regel bei familiärer Häufung der Erkrankung (bestimmten anamnestischen Kriterien entsprechend) oder beim Nachweis einer Mutation im *PRSS1* Gen von einer HP gesprochen [19]. Das genannte Gen codiert für kationisches Trypsinogen. Eine entsprechende Mutation wurde bereits 1996 als Ursache einer HP identifiziert [20]. Häufig sind hierbei die Mutationen N29I und R122H. Bei diesen handelt es sich um sogenannte *gain-of-function* Mutationen, welche zur Zunahme der Aktivierung bzw. erhöhten Stabilität von Trypsinogen bzw. Trypsin führen [12]. Betroffene Personen sind jedoch oft symptomlos oder symptomarm [21].

Abseits der HP konnten Mutationen in folgenden Genen ebenfalls als Risikofaktoren einer Pankreatitis identifiziert werden: *CFTR* [22], *SPINK1* [23], *CTRC* [24], *CPA1* [25], *CEL* [26] und *PNLIP* [27]. *SPINK1* und *CTRC* codieren für Enzyme, welche Trypsin hemmen bzw. für dessen Abbau verantwortlich sind. Dementsprechend sind in beiden Fällen *loss-of-function* Mutationen von Bedeutung [12, 24]. Mit *CEL* konnte 2015 erstmals ein Gen außerhalb des Protease-Antiprotease Systems der Azinuszellen als Risikofaktor einer CP identifiziert werden [26].

Die autoimmune Pankreatitis ist v. a. in Asien mit einem Anteil von bis zu 10 % eine relativ häufige Ursache der CP [28]. Zu den selteneren Ursachen zählen u. a. die Hypertriglyceridämie (> 1000 mg/dl) und ein primärer Hyperparathyreodismus [1, 29]. Anatomische Anomalien sollten bei Kindern mit wiederkehrenden Pankreatitiden in Betracht gezogen werden [30]. Die biliäre Genese einer CP ist bislang nicht belegt [31]. Abschließend sei darauf hingewiesen, dass auch Pankreaskarzinome eine CP bedingen können. Dies ist insbesondere bei kurzer Latenz zwischen der Detektion der Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms (PK)

wahrscheinlich. Bei Erstdiagnose einer CP sollte deshalb auch an ein PK gedacht werden [32].

#### PATHOPHYSIOLOGIE

Die Pathophysiologie der CP ist komplex und bisher nicht ausreichend verstanden [1]. Unter anderem sind eine Schädigung der Azinuszellen, Dysfunktionen der Pankreasgänge, eine persistierende Entzündungsreaktion und immunologische Faktoren beteiligt [33]. Die akute und die chronische Pankreatitis werden mittlerweile vermehrt als Kontinuum wahrgenommen [1]. Dafür spricht, dass 1/4 bis 1/3 der Patienten mit akuter Pankreatitis eine chronische Verlaufsform entwickelt [34]. Bereits 1992 wurde die These aufgestellt, dass eine CP auf dem Boden rezidivierender schwerer akuter Pankreatitiden entsteht [35]. Auf diese als Nekrose-Fibrose-Sequenz bekannt gewordene Theorie wird in Kapitel 1.1.1.3 näher eingegangen.

#### DIAGNOSTIK

Die Diagnostik der CP basiert vor allem auf bildgebenden Verfahren [34]. In der aktuellen S3-Leitlinie Pankreatitis wird zur Basisdiagnostik die transabdominelle Sonographie empfohlen. Im nächsten Schritt sollte die Endosonographie erfolgen. Ist die Diagnose weiterhin unklar, kommen die Computer- oder Magnetresonanztomographie zum Einsatz. Des Weiteren wird auf die Bedeutung funktioneller Untersuchungen hingewiesen [1]. Diese Labortests spielen bei der Objektivierung von Spätfolgen eine Rolle. So wird zur Beurteilung der exokrinen Organfunktion die Elastase-1-Konzentration im Stuhl bestimmt, während die endokrine Funktion durch den Blutglucose- und $HbA_{1c}$-Wert beurteilt wird [34]. Unter bestimmten Bedingungen kann eine genetische Testung (v. a. des *PRSS1* Gens) indiziert sein [36].

#### KLINIK UND THERAPIE

Das Kardinalsymptom der CP ist ein dumpfer epigastrischer Schmerz, welcher in den Rücken ausstrahlt [37]. Weitere Symptome (Steatorrhoe, Gewichtsverlust, Mangel fettlöslicher Vitamine) können im Zuge einer exokrinen Insuffizienz entstehen [37]. Eine Steatorrhoe tritt in der Regel erst auf, wenn die Lipase-Ausscheidung auf unter 10 % des Normwertes gefallen ist [38]. Bei Beeinträchtigung der endokrinen Organfunktion kann ein Diabetes mellitus Typ 3c resultieren [39].

Eine kausale bzw. kurative Therapie der CP ist bisher nicht möglich [34, 40]. Die vorzugsweise interdisziplinäre Behandlung fußt im Wesentlichen auf medikamentösen, endoskopischen und chirurgischen Verfahren [41]. Der Verzicht auf Alkohol und Tabak führt zur Schmerzreduktion [42, 43] und senkt das Risiko eines PK [44]. In der S3-Leitlinie Pankreatitis von 2021 wird zudem eine Schmerztherapie nach WHO-Stufenschema empfohlen [1]. Insgesamt entwickeln 30 % bis 60 % der Patienten Komplikationen (Pseudozysten, Gallen-

gangstenosen, refraktäre Schmerzen) [41]. Bei diesen können chirurgische oder endoskopische Verfahren indiziert sein, wobei eine frühzeitige Operation der Endoskopie überlegen scheint [45, 46]. Chirurgische Verfahren sind zudem bei lokalen Komplikationen und dem V. a. bösartige Läsionen indiziert [47, 48]. Endoskopische Verfahren werden hingegen besonders bei der Therapie von Pseudozysten eingesetzt [48].
Patienten mit exokrinen Funktionsstörungen sollten eine Enzymsubstitutionstherapie erhalten [1]. Dadurch kann die Lebensqualität verbessert werden [49]. Beim Vorliegen entsprechender Mangelzustände sollten zudem Vitamine und Spurenelemente supplementiert werden [1].

#### PROGNOSE

Patienten mit CP weisen eine höhere Mortalität auf als Personen einer Kontrollgruppe [50]. Ein früher Erkrankungsbeginn, wie er typischerweise bei hereditären Formen auftritt, ist hierbei mit einem stark erhöhten Risiko für ein PK vergesellschaftet [51, 52]. Deshalb kann bei Patienten mit HP unter Umständen eine prophylaktische Resektion des Pankreas erwägt werden [47]. Von der Gesamtheit der an einer CP Erkrankten entwickeln hingegen maximal 5 % innerhalb von 20 Jahren ein PK [52]. Deshalb wird in diesem Kollektiv kein aktives PK-Screening empfohlen [47].

### 1.1.1.2 PANKREASKARZINOM

#### EPIDEMIOLOGIE

Mit ca. 18 400 Fällen (2016) ist das PK zwar eine eher seltene Erkrankung in Deutschland, bei fast ebenso hoher Sterberate allerdings eine besonders schwere [53]. So stellt das PK die vierthäufigste Krebstodesursache dar. Mecklenburg-Vorpommern weist dabei im Bundesdurchschnitt die höchste altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität auf. Beide Parameter sind in Deutschland in den letzten Jahrzehnten leicht gestiegen. Da v. a. ältere Menschen an einem PK erkranken, scheint dieses vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung in Deutschland in Zukunft von steigender Relevanz zu sein [53].

#### ÄTIOLOGIE

Man unterscheidet anhand der Ätiologie im Wesentlichen drei Formen des PK: das sporadische, das familiäre und das im Rahmen anderer hereditärer Syndrome auftretende PK. Für das Entstehen des sporadischen PK konnten verschiedene Risikofaktoren ermittelt werden [54]. Als Hauptrisikofaktor gilt insbesondere ein hohes Lebensalter [54]. Weitere Risikofaktoren sind Rauchen, starker Alkoholkonsum und Adipositas. Das Rauchen erhöht die Wahrscheinlichkeit für ein PK, auch ohne vorher eine CP auszulösen [15, 44, 55]. Des Weiteren

manifestiert sich die Erkrankung bei Rauchern im Schnitt etwa zwei Dekaden früher als bei anderen Patienten [44]. Insgesamt scheint Rauchen für etwa 20 - 25 % der Tumoren des Pankreas verantwortlich zu sein [55]. Bezüglich des Alkohols ist ein moderater Konsum nicht mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert, ein starker hingegen schon [56]. Auch ein Diabetes mellitus Typ 2 sowie ein Body-Mass-Index von über 30 kg/m$^2$ korrelieren mit einem erhöhtem PK-Risiko [57, 58]. Als molekulare Grundlage dahinter wird die Expression von Cholezystokinin (CCK) durch bestimmte β-Zellen des Pankreas diskutiert [59]. Auch die CP erhöht das Risiko, an einem PK zu erkranken [60].

Die Bedeutung hereditärer Faktoren zeigt sich u. a. an dem 18-fach gesteigerten Erkrankungsrisiko für erstgradig Verwandte eines Patienten mit familiärem PK (*familial pancreatic cancer,* FPC) [61]. Dabei sind die genetischen Ursachen des FPC sehr heterogen [62]. Auch im Rahmen verschiedener erblicher Tumorsyndrome ist das PK-Risiko erhöht [63].

#### PATHOPHYSIOLOGIE

Die überwiegende Mehrheit (> 95 %) der Tumoren des exokrinen Pankreas bilden duktale Adenokarzinome (PDAC) [34]. Diese entwickeln sich laut dem genetischen Progressionsmodell aus Vorläuferläsionen wie den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), den intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) bzw. den muzinös-zystischen Neoplasien (MCN). PanIN werden anhand des Risikos für die Entwicklung eines PDAC in *low-grade* und *high-grade* Formen eingeteilt und zeigen Eigenschaften duktaler Zellen. Es wird jedoch diskutiert, ob sich auch Azinuszellen im Rahmen einer sogenannten azino-duktalen Metaplasie zu PanIN entwickeln können [64].

Während der Tumorigenese kommt es häufig zur Mutation des Protoonkogens *KRAS* und der Tumorsuppressorgene *TP53*, *SMAD4* und *CDKN2A* [64]. Die Häufigkeit der *KRAS*-Mutationen nimmt dabei mit dem Dysplasiegrad der PanIN zu [65].

#### KLINIK UND DIAGNOSTIK

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik (Oberbauchschmerzen, Rückenschmerzen, Völlegefühl) wird die Diagnose oft erst in fortgeschrittenen Stadien gestellt. Ein Pankreaskopfkarzinom kann durch einen schmerzlosen Ikterus klinisch apparent werden [54]. Derzeit gibt es kein etabliertes Screeningverfahren für die Normalbevölkerung [34, 66, 67]. Laut der aktuellen S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom sollte bei über 50-jährigen Patienten mit neu aufgetretenen Oberbauch- und Rückenschmerzen sowie bei schmerzlosem Ikterus eine weitere Diagnostik veranlasst werden. Die transabdominelle Sonographie stellt typischerweise das primäre diagnostische Verfahren dar. Anschließend kann ggf. eine Endosonographie, Computertomographie mit Kontrastmittel (KM-CT) oder eine Magnetresonanzto-

mographie mit Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie erfolgen. Bei Nachweis einer Raumforderung des Pankreas wird anschließend die Bestimmung des Tumormarkers CA 19-9 empfohlen. Ein erhöhter CA 19-9-Wert ist zwar kein Diagnosekriterium, allerdings sind besonders starke Erhöhungen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und schlechterer Resektabilität assoziiert [68]. Die präoperative Ausbreitungsdiagnostik erfolgt in der Regel durch ein KM-CT der Lunge, des Abdomens und Beckens. In Ausnahmefällen (hoher CA 19-9-Wert oder Aszites) kann eine *Staging*-Laparoskopie indiziert sein. Bei nicht resektablen Befunden sollte vor Einleitung einer spezifischen palliativen Therapie eine endosonographische Feinnadelpunktion erfolgen [69].

#### THERAPIE

Das therapeutische Vorgehen hängt vom Stadium der Erkrankung ab. Potenziell kurativ ist lediglich die R0-Resektion des PDAC. Deshalb sollten primär resektable Tumoren chirurgisch entfernt werden. Anschließend folgt je nach Resektionsausmaß eine adjuvante (R0) bzw. additive (R1) Chemotherapie für 6 Monate. Aktueller Therapiestandard ist ein modifiziertes FOLFIRINOX-Schema (Oxaliplatin, Irinotecan und 5-FU/Folinsäure). Dadurch konnte das mediane Überleben von 35 Monaten (unter Gemcitabin-Monotherapie) auf 54,4 Monate gesteigert werden. Die Toxizität dieser Kombinations-Chemotherapie ist jedoch höher als die einer Gemcitabin-Monotherapie [70], sodass letztere v. a. bei einem ECOG Status > 1 - 2 eine Alternative bleibt. In den letzten Jahren konnten durch effektivere Chemotherapien auch vermehrt sekundäre Resektionen lokal fortgeschrittener Tumore durchgeführt werden [54].
Das metastasierte PK wird palliativ mittels Chemotherapie nach dem FOLFIRINOX oder nPG-Schema (nab-Paclitaxel plus Gemcitabin) behandelt. Beide Therapieregime zeigten sich hinsichtlich des Gesamtüberlebens einer Gemcitabin-Monotherapie überlegen, wiesen allerdings eine höhere Toxizität auf [71, 72].
Obwohl zuletzt Fortschritte in der individualisierten Therapie des PK bei Patienten mit *BRCA* Mutation gemacht wurden [73], gibt es bislang weiterhin keine spezifischen Therapien für die häufigsten Mutationen des PDAC [54].

#### PROGNOSE

Die meisten Menschen sterben innerhalb der ersten 6 Monate nach Diagnosestellung [74], sodass die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit etwa 9 % sehr ungünstig ist [53]. Dazu tragen neben der späten Diagnosestellung auch die frühe und aggressive Metastasierung des Tumors und eine damit einhergehende geringe kurative Resektionsrate bei [69]. Selbst operierte Patienten erleiden jedoch zu ca. 80 % ein Rezidiv und versterben daran [75].

#### 1.1.1.3 FIBROSE

Sowohl im Rahmen der CP als auch beim PK kommt es zu einer voranschreitenden Pankreasfibrose [76]. Nachdem diese lange als Begleitphänomen der chronischen Organschädigung angesehen wurde, wird sie heutzutage als aktiver Prozess wahrgenommen, welcher den Verlauf der zugrundeliegenden Erkrankung beeinflusst [77]. Dem Konzept der Nekrose-Fibrose-Sequenz nach ist die Pankreasfibrose sogar kausal an der Entstehung der CP beteiligt. Nach einer akuten Pankreatitis kommt es im Zuge der Regeneration zur gesteigerten Expression von Kollagen Typ I und III [78]. Wiederkehrende Entzündungsschübe führen letztendlich zur irreversiblen Pankreasschädigung [79].

Die Desmoplasie (tumorassoziierte Fibrose) ist ein typisches Charakteristikum des PDAC und macht mehr als 80 % der Tumormasse aus [80]. Sie verstärkt das Tumorwachstum, fördert die Metastasierung und kann die körpereigenen Immunitätsmechanismen behindern [64]. Deshalb ist die Fibrose mittlerweile ein wichtiges Forschungsgebiet, um die Prognose der Erkrankung zu verbessern [81, 82]. So konnte gezeigt werden, dass Kollagen Typ I *in vitro* die Proliferation der Tumorzellen fördert [83]. Die Invasivität der Tumorzellen wird aufgrund des Abbaus der extrazellulären Matrix (EZM) durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) begünstigt [84, 85]. Diese werden u. a. von pankreatischen Sternzellen (PSZ) sezerniert [86]. Im Übrigen ist die Desmoplasie an der Chemoresistenz des PK beteiligt [87]. In der Theorie sollte die Kombination von antifibrotischen Therapien mit Chemotherapeutika zu einer Verbesserung der Mikrovaskularisation des Tumors und damit zur Reduktion der Chemoresistenz führen [88]. Tatsächlich führte in einem Mausmodell die Kombination von Gemcitabin mit der Hyaluronidase PEGPH20 zu einer verbesserten Durchblutung des Tumors und damit zur vermehrten Aufnahme des Chemotherapeutikums. Hieraus resultierte eine Hemmung des Tumorwachstums und letztendlich ein verlängertes Überleben im Vergleich zur Gemcitabin Monotherapie [89]. In klinischen Studien an Patienten mit metastasiertem PK zeigten Kombinationstherapien mit der gleichen Hyaluronidase jedoch verringerte Überlebensraten [90, 91]. In der Vergangenheit sind bereits einige in der präklinischen Forschung vielversprechende Therapieansätze im klinischen Einsatz gescheitert. Ein Grund dafür könnte die inadäquate Repräsentation der Mikroumgebung des Tumors in experimentellen Ansätzen sein [80].

Ein weiterer Grund dafür, die desmoplastische Reaktion als Therapieziel mit Vorsicht zu betrachten, liegt in den beschriebenen inhibitorischen Eigenschaften des Stromas auf die Tumorprogression. So führte im Mausmodell die Hemmung des *Sonic Hedgehog*-Signalwegs zu einer verminderten Desmoplasie, welche mit beschleunigtem Tumorwachstum, gesteigerter Metastasierung und einer höheren Mortalität assoziiert war [92]. In einem anderen Modell

wurde die Menge an Alpha-2-Aktin (α-SMA, engl. *alpha smooth muscle actin*) positiven Myofibroblasten in Mäusen, welche spontan ein PDAC entwickeln, experimentell reduziert. Dies führte zur Entstehung invasiver, undifferenzierter Tumore und einem verringerten Überleben [93]. Auch beim Menschen geht ein geringerer Gehalt an α-SMA positiven Myofibroblasten im histologischen Präparat eines PDAC mit schlechteren Überlebensraten einher [93]. Gegenwärtig wird diskutiert, dass das Bindegewebe vor allem initial eine Barriere für Tumorzellen darstellen und diese zurückhalten könnte [85]. Mittlerweile werden die Karzinom-assoziierten Fibroblasten, zu denen auch die PSZ gehören, als heterogene Zellpopulation wahrgenommen. Da bereits Subgruppen mit unterschiedlichen Funktionen identifiziert werden konnten [94], scheint die Entwicklung zielgerichteterer Therapieansätze in Zukunft möglich.

### 1.1.2 PANKREATISCHE STERNZELLEN

#### 1.1.2.1 ALLGEMEINE BESCHREIBUNG UND ENTDECKUNG

PSZ machen etwa 4 - 7 % der Zellen des Pankreas aus und sind physiologischerweise interlobulär und periazinär lokalisiert [95–97]. Bei ihrer Entdeckung im Jahr 1982 wurden sie als Zellen im Pankreas beschrieben, welche Vitamin A in Lipidtröpfchen speichern und Ähnlichkeiten zu hepatischen Sternzellen aufweisen [98]. Es dauerte 16 weitere Jahre, bis PSZ isoliert und kultiviert werden konnten [96, 99]. Bachem *et al.* isolierten aktivierte PSZ mittels *outgrowth*-Methode aus fibrotischem bzw. entzündetem Pankreasgewebe von Menschen und Ratten [96]. Die Isolation ruhender PSZ aus dem Gewebe gesunder Ratten gelang Bachem *et al.* und Apte *et al.* unabhängig voneinander durch Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kapitel 2.2.2) [96, 99]. Dies ermöglicht die Erforschung des Aktivierungsprozesses *in vitro* [100]. Als Aktivierung versteht man in diesem Zusammenhang morphologische und funktionelle Änderungen, welche letztlich zur Ausprägung eines myofibroblastären Zelltyps führen [101]. Dabei kommt es zum Verlust der Lipidtröpfchen, zur gesteigerten Expression von α-SMA, Zytokinen und Bestandteilen der EZM sowie zur Proliferation und Migration der PSZ [101]. Die hauptsächlich produzierten EZM-Bestandteile sind Kollagen, Fibronektin und Laminin [96]. *In vivo* ist die Aktivierung oft eine physiologische Reaktion auf Schädigungen des Pankreas [97, 101]. So sind PSZ an regenerativen Prozessen beteiligt, ermöglichen aber auch das Entfernen überschüssiger EZM [100, 102]. Als weiteres Charakteristikum der PSZ wurde die Expression von Desmin und saurem Gliafaserprotein beschrieben [99]. Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass nicht alle PSZ Desmin exprimieren [97]. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die Gesamtheit der PSZ heutzutage als Konglomerat unterschiedlicher Subpopulationen wahrgenommen wird [103].

Die Herkunft von PSZ ist bislang nicht vollständig geklärt [97]. Bereits 2005 fanden Buchholz *et al.* durch Transkriptomanalysen heraus, dass die Zellen trotz ihrer Ähnlichkeiten zu Fibroblasten von diesen differenziert werden müssen [104]. Interessanterweise scheint ein Teil der PSZ dem hämatopoetischen System zu entstammen [105, 106]. Die Nomenklatur ist jedoch uneinheitlich. Einige Autoren bevorzugen den Begriff pankreatische Myofibroblasten für alle Zellen, welche PSZ-Marker exprimieren. Der Begriff PSZ ist dann nur Zellen pankreatischen Ursprungs vorbehalten [107].

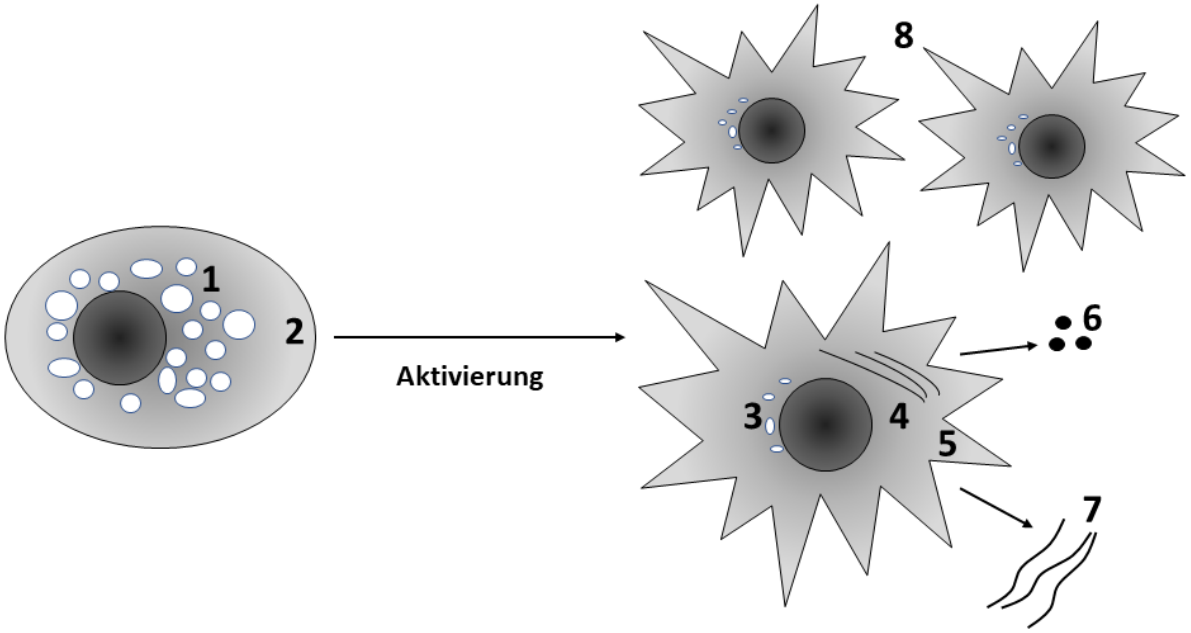



Abbildung 1.1: **Aktivierung von PSZ**
Links: ruhende PSZ sind durch zahlreiche intrazelluläre Lipidtröpfchen (1) und das Fehlen von Zellfortsätzen (2) charakterisiert.
Rechts: Im Rahmen der Aktivierung kommt es zum Verlust intrazellulärer Lipidtröpfchen (3), zur Expression von α-SMA *stress-fibers* (4) sowie zur Ausbildung von Zellfortsätzen (5). Des Weiteren werden vermehrt verschiedene Zytokine und Modulatoren der EZM (6) sowie Kollagen (7) sezerniert. Auch die proliferative Aktivität der PSZ ist gesteigert (8).

#### FUNKTIONEN

PSZ sezernieren MMPs (u. a. MMP2 und MMP9) und deren Inhibitoren (TIMPs, engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*). Damit nehmen sie eine Rolle bei der Wahrung des Gleichgewichts zwischen EZM-Degradation und -Synthese ein [108]. Auch Funktionen im angeborenen Immunsystem werden PSZ nachgesagt [101]. Dafür spricht die Expression von *Toll-like* Rezeptoren, welche für das Erkennen pathogenassoziierter molekularer Muster (PAMPs, engl. *pathogen associated molecular patterns*) und die anschließende chemotaktische Rekrutierung von Immunzellen wichtig sind [109, 110]. Des Weiteren sind PSZ zur Phagozytose fähig und nehmen damit Aufgaben bei der Begrenzung von Entzündungsreaktionen wahr

[111]. Sogar Bakterien können durch PSZ phagozytiert werden [109]. Die fehlende Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen deutet allerdings darauf hin, dass PSZ keine Funktionen im erworbenen Immunsystem wahrnehmen [112]. Inwieweit PSZ ebenfalls als Stamm- und Progenitorzellen aktiv sind, ist bisher relativ wenig verstanden [97, 103]. Neben der Expression verschiedener Stammzellmarker scheint v. a. die Beobachtung von Mato *et al.* interessant. Die Arbeitsgruppe identifizierte eine Population von PSZ, welche in Insulin-produzierende Zellen umgewandelt werden konnte [113]. Mittlerweile finden PSZ auch bei der Betrachtung endokriner Funktionsstörungen Beachtung. So führen sie im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 2 zu einer verminderten Insulinsekretion und dem Verlust von β-Zellen [114].
Der Einfluss von PSZ auf exokrine Funktionen des Pankreas wird kontrovers diskutiert. Phillips *et al.* postulierten, dass PSZ nach Stimulation mit Cholezystokinin in der Lage sind, Acetylcholin zu sezernieren und so die Amylasesekretion der Azinuszellen zu stimulieren [115]. Diese Funktion wird heutzutage allerdings in Frage gestellt [116].

#### 1.1.2.2 ROLLE BEI ERKRANKUNGEN DES EXOKRINEN PANKREAS

Nachdem bereits auf die versatilen Funktionen des Stromas im Rahmen der CP und des PK eingegangen wurde, soll an dieser Stelle die Bedeutung der PSZ im selben Kontext hervorgehoben werden. Bereits 1998 vermuteten Bachem *et al.* eine kausale Beteiligung der PSZ an der Fibrogenese des Pankreas [96]. Mittlerweile werden sie als hauptverantwortlich für die Entstehung der Pankreasfibrose angesehen [100]. Besonders die dauerhafte Aktivierung der Zellen im Rahmen repetitiver oder persistierender Organschädigungen führt zum Entstehen einer Fibrose [102, 117]. So beeinflussen viele Zytokine, die im Rahmen einer Pankreatitis hochreguliert werden, die Funktionen von PSZ [118]. Andererseits sind PSZ auch an der Fibrolyse beteiligt [97].

##### PANKREASKARZINOM

Bereits vor über 15 Jahren wurden PSZ als Produzenten der EZM im Zuge der desmoplastischen Reaktion des PK identifiziert [119, 120]. Sie werden schon früh während der Entstehung des PDAC aktiviert [121], u. a. getriggert durch die Karzinomzellen selbst [119]. Die Tumorzellen sezernieren verschiedene Wachstumsfaktoren (u. a. TGF-β1, PDGF, VEGF) und fördern *in vitro* die Proliferation sowie EZM-Synthese von PSZ [120, 122]. PSZ wiederum regen die Proliferation und Migration der Tumorzellen an und vermindern deren Apoptoserate [123]. Umgekehrt stimulieren auch Tumorzellen *in vitro* die Migration von PSZ und scheinen diese regelrecht zu rekrutieren [122, 123]. Dieser Synergismus zwischen PSZ und Karzinomzellen konnte ebenfalls *in vivo* beobachtet werden. Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten dies in Mausmodellen, in denen Karzinomzellen entweder allein oder

zusammen mit PSZ subkutan bzw. in das Pankreas injiziert wurden. Bei Koinjektion der Zellen zeigte sich eine verstärkte Tumorprogression mit vermehrter Metastasierung und verstärkter Desmoplasie [86, 120, 123]. Das gesteigerte Tumorwachstum könnte dabei durch eine erhöhte Mitose- und eine verminderte Apoptoserate der Karzinomzellen bedingt sein [122]. Die vermehrte Metastasierung wurde am ehesten auf eine gesteigerte Invasivität des Tumors zurückgeführt [122]. Hintergrund ist, dass PSZ von Karzinomzellen zur Sekretion von MMPs angeregt werden, welche wiederum die Invasivität der Karzinomzellen fördern [84, 86]. Außerdem scheinen zumindest immortalisierte PSZ *in vitro* auch über die Abgabe von Exosomen die Migration der Karzinomzellen zu fördern [124]. Ein wichtiger Mechanismus im Zuge der Metastasierung ist die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von Tumorzellen. In einer Kokultur von PSZ mit Karzinomzellen zeigten letztere eine vermehrte EMT [125]. Neben der Invasivität scheinen PSZ aber auch die Viabilität von Tumorzellen zu erhöhen und die Wirkung von Gemcitabin zu vermindern [126]. Ein parakriner Mediator, welcher die Chemoresistenz der Tumorzellen verstärkt, ist der Leukämiehemmende Faktor (LIF, engl. *leukemia inhibitory factor*) [121]. Eine weitere interessante Beobachtung ist die Stimulation der Autophagie in PSZ durch Zellen eines PDAC. Dadurch werden nichtessenzielle Aminosäuren freigesetzt, welche dem Tumor als Nährstoff dienen [127]. Bemerkenswerterweise scheint die Autophagie selbst auch an der Aktivierung von PSZ beteiligt zu sein [128]. Auf die Bedeutung von Hyaluronan als therapeutisches Ziel beim PK wurde in Kapitel 1.1.1.3 eingegangen. Junliang *et al.* zeigten, dass aktivierte PSZ Hyaluronan produzieren [129]. Die ebenfalls in Kapitel 1.1.1.3 erwähnte Arbeit von Özdemir *et al.* legt allerdings auch inhibitorische Effekte von PSZ (bzw. $\alpha$-SMA positiven Myofibroblasten) auf die Entwicklung eines PDAC nahe [93].

Ikenaga *et al.* zeigten im Jahr 2010, dass unterschiedliche Subpopulationen von PSZ eine unterschiedliche Relevanz für Erkrankungen haben. Sie fanden heraus, dass bei Menschen mit PK insbesondere $CD10^+$ PSZ mit Lymphknotenmetastasen und einem verringerten Überleben assoziiert waren. *In vitro* und in Tierversuchen förderten diese Zellen die Invasivität und das Tumorwachstum stärker als $CD10^-$ Zellen [130]. Eine andere Arbeit beschäftigte sich mit der funktionellen Heterogenität von PSZ und ihren Auswirkungen auf das PDAC. So konnte gezeigt werden, dass sich die Fähigkeit zur Produktion des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF, engl. *hepatocyte growth factor*) in PSZ aus verschiedenen Personen erheblich unterscheidet. Ein hoher Gehalt an HGF führte dabei *in vitro* zur vermehrten DNA-Synthese und Migration von Karzinomzellen [131].

#### 1.1.2.3 MECHANISMEN DER AKTIVIERUNG UND INHIBITION

Die Regulation der Aktivierung von PSZ erfolgt durch eine Vielzahl von Faktoren. Beteiligt sind u. a. Zytokine (IL-1, IL-6, TNF-$\alpha$), Wachstumsfaktoren (CTGF, PDGF, TGF-$\beta$1, Aktivin A), Ethanol und seine Metabolite, oxidativer Stress, physikalischer Druck und Veränderungen der EZM [101, 132]. Ethanol und seine Metabolite aktivieren PSZ durch die Stimulation aller Untergruppen des MAPK-Signalwegs (ERK, JNK und p38 MAP-Kinase) [133]. *Transforming Growth Factor $\beta 1$* (TGF-$\beta$1) wird bei chronischer Inflammation u. a. durch Makrophagen sezerniert [85]. Im Rahmen der Regeneration nach einer akuten Pankreatitis exprimieren auch Azinuszellen TGF-$\beta$1 [78]. Das Zytokin aktiviert PSZ vermittelt durch SMAD-Proteine [134] und stimuliert seine eigene Expression [135]. Neben der Sekretion von TGF-$\beta$1 sind PSZ auch zur Sekretion von weiteren Zytokinen (Aktivin A, IL-1, CTGF) fähig, was im Sinne einer autokrinen Beeinflussung von Relevanz ist [101, 136]. Charrier *et al.* wiesen nach, dass aktivierte PSZ neben CTGF auch miRNA21 exprimieren und diese wiederum durch eine autokrine Feedbackschleife die CTGF Expression fördert. Der Nachweis von miRNA21 und CTGF in Exosomen lässt einen parakrinen Effekt auf benachbarte PSZ vermuten [132].

Wirkungsgrundlage der genannten aktivierenden Faktoren sind mehrere Signalwege, die sich zum Teil gegenseitig beeinflussen [102]. So entfaltet beispielsweise PDGF seine Effekte auf PSZ über den ERK- und PI3K/Akt-Signalweg [137, 138]. Auch die Beteiligung des *Sonic Hedgehog* und Jak-STAT-Signalwegs an der Aktivierung der PSZ ist mittlerweile etabliert [139, 140]. Glucose scheint PSZ via Proteinkinase C und p38 MAP-Kinase zu aktivieren [141].

Die Bedeutung des Kalziumhaushaltes für die Funktion von PSZ wird bei Betrachtung der desmoplastischen Reaktion des PDAC deutlich. Hier sorgt ein hoher Gewebedruck durch den Influx von Kalzium über TRPC1-Kanäle für eine Aktivierung der Sternzellen [142]. Durch die Ausbildung des aktivierten Phänotyps steigert sich aufgrund von verstärkten Zugkräften die Rigidität der EZM weiter [143]. Das Vitamin A Derivat all-trans-Retinsäure (ATRA, engl. *all-trans-retinoic acid*) kann diesen Vorgang unterbrechen, was letztendlich zu einer weniger stark ausgeprägten Desmoplasie führt [143]. Dass ATRA die Proliferation und Kollagensynthese von PSZ hemmt, ist schon lange bekannt [144]. Vitamin A und seine Derivate wirken dabei über den Wnt- und den MAPK-Signalweg [145, 146]. Einer Theorie zufolge, könnte die Vitamin A-Speicherung selbst zur Aufrechterhaltung eines ruhenden PSZ-Phänotyps beitragen [101].

Inzwischen haben sich viele Studien mit den Möglichkeiten der Inhibition von PSZ beschäftigt. Dies könnte neben den bereits genannten Auswirkungen auf das PK potenziell auch die exo- und endokrine Insuffizienz im Zuge der CP verhindern. Die Beendigung der Aktivierung ist prinzipiell durch Apoptose, Seneszenz und Rückführung in den ruhenden Phänotyp denkbar [100]. Letzteres beschrieben Sherman *et al.* nach Behandlung mit Calcipotriol *in vitro*. Aber auch *in vivo* war Calcipotriol dazu imstande, die Entzündungsreaktion und Fibrose des Pankreas in mit Caerulein behandelten Mäusen abzuschwächen [147]. Eine frühere Arbeit unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigte allerdings, dass Vitamin-D-Rezeptor-Liganden zwar die Aktivierung von PSZ *in vitro* inhibieren, jedoch keine vollständig aktivierten Zellen in den ruhenden Phänotyp zurückführen können [148].
Der oben erwähnte Mechanismus der Seneszenz geht mit einem Proliferationsstopp einher und wirkt der Tumorigenese prinzipiell entgegen. Jedoch kann insbesondere die Anhäufung von seneszenten Zellen, welche wiederum eine Vielzahl von Faktoren sezernieren, die Entwicklung von Malignomen fördern [149].

### 1.1.3 HIPPO-SIGNALWEG

#### 1.1.3.1 BESCHREIBUNG

Der Hippo-Signalweg ist eine evolutionär konservierte Signalkaskade, welche zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und später in Säugetieren identifiziert wurde [150]. Der Signalweg hat eine enorme Bedeutung bei der Regulation des Wachstums und der Größe von Organen. Dies geschieht über die Kontrolle der Zellzahl durch pro-apoptotische und antiproliferative Effekte [151]. Die Aktivität des Hippo-Signalwegs wird durch eine Reihe biochemischer, physikalischer und mechanischer Faktoren beeinflusst [152, 153]. Erwähnenswert ist die starke Regulation durch extrazelluläre Signale, welche u. a. eine Funktion im Rahmen der Zellkontakthemmung ermöglicht [85, 153–155]. Der Hippo-Signalweg besteht aus einer Vielzahl von Proteinen und interagiert mit anderen Signalwegen [150, 154]. Die zentralen Elemente werden jedoch von einer überschaubaren Kinasekaskade verkörpert (siehe Abbildung 1.2). Diese besteht aus MST1/2 (engl. *mammalian sterile 20-like kinase 1/2*) und LATS1/2 (*engl. large tumor suppressor kinase 1/2*) sowie den zugehörigen Gerüstproteinen SAV1 (*salvador homolog 1*) und MOBKL1 (*engl. mps one binder kinase activator-like 1*) [150, 156]. SAV1 bildet dabei ein Heterodimer mit MST1/2 [157], welches im phosphorylierten Zustand für die Aktivierung von LATS1/2 (ebenfalls durch Phosphorylierung) sorgt. LATS1/2 komplexiert daraufhin mit MOBKL1, um YAP (engl. *yes-associated protein*) und TAZ (engl. *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) zu phosphorylieren [158]. Die beiden letztgenannten Proteine sind zueinander paralog [154] und

bilden die hauptsächlichen Effektoren des Hippo-Signalwegs [155]. Als Transkriptions-Koaktivatoren translozieren sie im dephosphorylierten Zustand in den Zellkern und interagieren mit Transkriptionsfaktoren, wobei hier hauptsächlich TEAD (engl. *transcriptional enhanced associate domain*) von Bedeutung ist [159, 160]. Im Allgemeinen induziert YAP so die Expression wachstumsfördernder und antiapoptotischer Gene [155, 161]. Bei aktiver Kinasekaskade sind YAP und TAZ hingegen phosphoryliert und binden an 14-3-3 Proteine (Vertreter der Chaperone), wodurch sie im Zytoplasma sequestriert und vermehrt Ubiquitin-vermittelt abgebaut werden [150, 160]. Zum Teil wird die subzelluläre Lokalisation von YAP und TAZ auch unter Umgehung des Hippo-Signalwegs reguliert, beispielsweise durch direkte Fixierung von YAP und TAZ an der zytoplasmatischen Seite von Zellkontakten [150]. Wann der Hippo-Signalweg als aktiv gilt, wird unterschiedlich gehandhabt. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bezeichnung „aktiver Hippo-Signalweg“ verwendet, wenn die Kinasekaskade aktiv und somit die Transkription der durch YAP regulierten Gene vermindert ist. Dies deckt sich mit der Definition der meisten Autoren [152, 153, 155, 162]. Die genannten Kinasen des Hippo-Signalwegs gelten als Tumorsuppressoren. Bei ihrem Verlust kommt es zur exzessiven Proliferation und gestörten Differenzierung von Zellen [163]. Dementsprechend überrascht es nicht, dass der Hippo-Signalweg in verschiedenen Malignomen dysreguliert ist [150, 159, 161]. Oft wird eine Überexpression von YAP beobachtet [164].

#### 1.1.3.2 ROLLE BEI ERKRANKUNGEN DES EXOKRINEN PANKREAS

Eine Dysregulation des Hippo-Signalwegs wird sowohl mit der Entstehung einer CP als auch mit der Entwicklung eines PK in Verbindung gebracht [102, 165]. Untersuchungen an humanen Gewebeproben haben gezeigt, dass die *YAP* Expression im PK erhöht ist und mit dem TNM Stadium korreliert [162, 166]. YAP konnte in diesem Zusammenhang als unabhängiger Marker einer verschlechterten Prognose identifiziert werden [154, 166]. Bei der Progression von *KRAS*-mutierten PKs spielt LIF eine wichtige Rolle. Das ist an dieser Stelle insofern relevant, als dass die Wirkung von LIF auf einer Hemmung des Hippo-Signalwegs zu basieren scheint [167]. Mittlerweile wird YAP aber auch eine das PK fördernde Funktion unabhängig von *KRAS* zugesprochen [154]. *In vitro* Studien legen nahe, dass YAP durch die Förderung der EMT die Invasivität der Tumorzellen steigern kann [166]. Erwähnenswert ist ebenfalls, dass YAP im Rahmen eines PDAC oder einer CP vermehrt in PSZ exprimiert wird [166, 168]. Es ist u. a. an der CTGF vermittelten Aktivierung von PSZ durch Tumorzellen beteiligt [166]. Allerdings übt YAP über die Förderung der Expression von SPARC (*engl. secreted protein acidic and cysteine rich*) in PSZ auch inhibitorische Effekte auf die Proliferation von PK-Zellen aus [169].

#### 1.1.3.3 THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSUNG

YAP erfährt mittlerweile ein breites Interesse in der Krebsforschung [170]. Als einer der wichtigsten Effektoren des Hippo-Signalwegs bietet es sich als therapeutisches Ziel an [150]. Die Bedeutung einer YAP-Inhibition resultiert auch aus der Tatsache, dass die meisten Kinasen des Hippo-Signalwegs Tumorsuppressoren sind und deren Hemmung somit nicht zielführend wäre [150].

##### VERTEPORFIN

2012 identifizierten Liu-Chittenden *et al.* eine Gruppe von Porphyrinen, welche als niedermolekulare Inhibitoren die Interaktion zwischen YAP und TEAD behindern konnten. Den stärksten Effekt hatte dabei die Substanz Verteporfin [171], welche schon seit Jahren in der photodynamischen Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration Verwendung findet [172]. Verteporfin hemmt die YAP-TEAD-Interaktion auf drei Arten (siehe Abbildung 1.2). Erstens vermindert Verteporfin die Transkription von YAP [173]. Zweitens kann Verteporfin durch Bindung an YAP die Interaktion mit TEAD verhindern [171]. Drittens erhöht Verteporfin den Spiegel an 14-3-3 Proteinen [164]. In Mausmodellen war Verteporfin dementsprechend in der Lage, die Effekte einer YAP-Überexpression abzuschwächen [171]. Für die Anwendung am Menschen sprechen das gute Sicherheitsprofil und die gering ausgeprägten Nebenwirkungen [174]. Allerdings weisen einige Autoren zurecht darauf hin, dass Verteporfin mit vielen Proteinen interagiert und deshalb mangels Spezifität kein idealer YAP-Inhibitor ist [170].

##### SIRNA

Um YAP gezielt zu inhibieren, bietet sich *in vitro* die Verwendung von siRNA an. Dabei handelt es sich um kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle, welche im Rahmen der sogenannten RNA-Interferenz von Bedeutung sind [175]. Die siRNA formt hierbei mit Proteinen den *RNA-induced silencing complex* (RISC), welcher spezifisch zur siRNA komplementäre mRNA spaltet [176]. So können bestimmte Gene gezielt post-transkriptionell stumm geschaltet werden. In dieser Arbeit wurden siRNAs verwendet, welche gegen YAP gerichtet waren.

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer YAP-Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen identifiziert werden konnte (u. a. Dobutamin, Statine, Metformin, Neratinib) [153, 154].

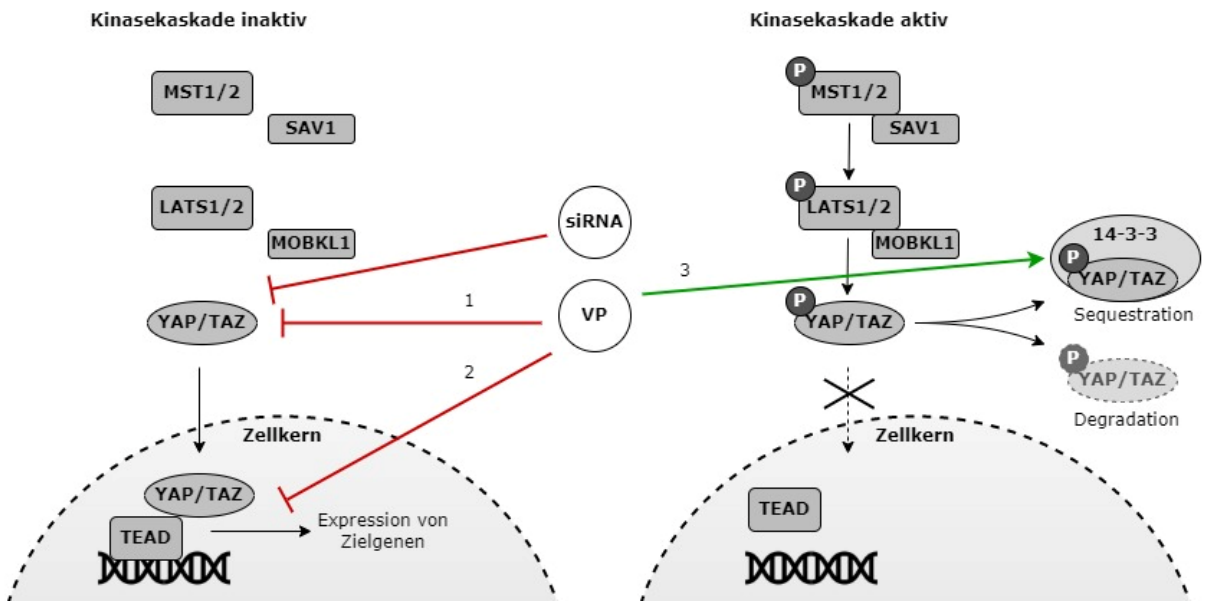



Abbildung 1.2: **Hippo-Signalweg und Wirkprinzip von YAP-Inhibitoren**

Links: Bei inaktiver Kinasekaskade sind YAP und TAZ dephosphoryliert und können in den Zellkern translozieren, um zusammen mit TEAD-Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Gene zu fördern.

Rechts: Bei aktiver Kinasekaskade werden YAP und TAZ phosphoryliert. Das fördert die zytoplasmatische Sequestration in Komplexen mit 14-3-3 Proteinen sowie den proteasomalen Abbau von YAP und TAZ.

Mitte: Gegen YAP gerichtete siRNA führt zur posttranskriptionellen Degradation von YAP-mRNA. Verteporfin vermindert die Expression von *YAP* (1), hemmt die Interaktion von YAP mit TEAD (2) und erhöht den Spiegel an 14-3-3 Proteinen im Zytoplasma (3).

## 1.2 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Das Ziel der Arbeit war es, zu einem besseren Verständnis der Funktionen des Hippo-Signalwegs in PSZ beizutragen und dessen Rolle im Kontext der CP zu untersuchen. Dabei sollten folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

- YAP und TAZ werden im Rahmen einer CP vermehrt in fibrotischen Arealen des Pankreas exprimiert.
- TGF-ß1 und IFN-$\gamma$ entfalten ihre Effekte auf PSZ, indem sie die Aktivität des Hippo-Signalwegs regulieren.
- YAP-Inhibitoren hemmen die Aktivierung von PSZ.
- YAP-Inhibitoren hemmen die Zellproliferation und fördern die Apoptose von PSZ.
- YAP-Inhibitoren senken die Expression profibrotischer Gene in PSZ.

Zur Adressierung dieser Fragestellungen wurden immunhistochemische Färbungen von YAP und TAZ an Pankreasschnitten gesunder und an CP erkrankter Ratten und Mäuse angefertigt. Mittels Reportergenassay wurde der Einfluss verschiedener potenzieller *upstream*-Regulatoren auf die YAP-Aktivität untersucht. Zur Beurteilung der Auswirkungen von YAP-Inhibitoren auf die zellulären Funktionen von PSZ kamen Proliferationsassays, Zellzählungen, Apoptoseassays, Genexpressionsanalysen, *Western Blots,* Immunfluoreszenzfärbungen von $\alpha$-SMA sowie Ölrot-Färbungen und Migrationsassays zur Anwendung.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 MATERIAL

### 2.1.1 GERÄTE

Tabelle 1: **Geräte**

| Gerät | Hersteller | Seriennummer |
|---|---|---|
| -150°C Gefrierschrank | Sanyo Denki GmbH | 60915116 |
| -80°C Gefrierschrank | Thermo Fisher Scientific Inc. | 50054302 |
| -20°C Gefrierschrank | Liebherr | - |
| 4°C Kühlschrank | Robert Bosch GmbH | - |
| 6°C Kühlschrank | Liebherr | - |
| Brutschrank HERA cell 150 | Thermo Fisher Scientific Inc. | 40862222 |
| Elektrophoresekammer Mini-Protean Tetra System | Bio-Rad Laboratories Inc. | 552BR047080 |
| Feinanalysewaage Chyobalance JL 200 | Dynatech | 90610 |
| Flockeneisautomat AF 103 | Scotsman Ice Systems | 3006ES1L |
| Fluoreszenzmikroskop DM4000B | Leica Camera AG | - |
| GloMax-Multi Detection System | Promega | - |
| Kryostat | Leica Biosystems | CM1850 |
| Magnetrührer MR 2002 | Heidolph Instruments | 10667 |
| Mikroskop Axio Observer | Carl Zeiss AG | 1027184678 |
| Mikroskop Axiovert 25 | Carl Zeiss AG | 667234 |
| NanoPhotometer P-Class | Implen Inc. | 6303 |
| NucleoCounter NC-200 | ChemoMetec | - |
| Odyssey CLx Infrared Imager | LI-COR Biosciences | ODY-1790 |
| pH-Messgerät Five Easy FE20 | Mettler-Toledo Inc. | 1229215156 |
| Photometer Anthos reader 2001 | Anthos Labtec Instruments GmbH | 1098 |
| Plattenschüttler MTS 4 | IKA-Werke GmbH & Co.KG | 94-173-05 |
| Pipetboy | Integra Biosciences AG | - |
| Schüttler Rocky 3D | Labortechnik Fröbel GmbH | 4024 |
| Sterilwerkbank | Thermo Fisher Scientific Inc. | 41093135 |
| Stromversorgungsgerät Power Pac 1000 | Bio-Rad Laboratories Inc. | 287BR03458 |
| Thermomixer comfort | Eppendorf AG | 5355ZK947672 |
| UV-Messsystem | Intas Pharmaceuticals Ltd. | - |
| ViiA 7 Real-Time PCR System | Thermo Fisher Scientific Inc. | 27882087 |
| Vortexer VM 2 | Karl Hecht GmbH & Co. KG | 740482 |

| | | |
|---|---|---|
| Wasserbad 1083 | Gesellschaft für Labortechnik mbH | 11464501K |
| Western Blot Kammer Eco-Mini | Biometra GmbH | 1109-0078 |
| Zentrifuge 5415 D | Eppendorf AG | 542511840 |
| Zentrifuge Mikro 200 R (2405) | Andreas Hettich GmbH | 0000778-02-00 |
| Zentrifuge Rotina 46 R (4610) | Andreas Hettich GmbH | 0003058-01-00 |

### 2.1.2 ALLGEMEINE LABORMATERIALIEN

Tabelle 2: **Allgemeine Labormaterialien**

| Material | Hersteller |
|---|---|
| 96-*well* half area Mikrotiterplatte | Greiner Bio One International GmbH |
| Aluminiumfolie | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Bechergläser (50 ml,100 ml,250 ml) | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Bechergläser (600 ml,1000 ml) | Armin Baack |
| Deckgläser | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| *Dual Filter Tips* (0,1 - 1000 µl) | Eppendorf AG |
| Eisbehälter | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Faltenfilter | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Kulturplatten (6-, 12-, 24-w*ell*) | Greiner Bio One International GmbH |
| Löffelspatel | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Messzylinder | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Neubauer Zählkammer improved | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Objektträger | Paul Marienfeld GmbH & Co. KG |
| Parafilm M | American Can Company |
| Pinzette | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Pipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml) | Greiner Bio One International GmbH |
| Pipettenspitzen (0,1-1000 µl) | Eppendorf AG |
| PVDF-Transfermembran | Merck KgaA |
| Reaktionsgefäße (0,6 ml; 1,5 ml; 2 ml; 5 ml) | Eppendorf AG |
| Röhrchen (15 ml, 50 ml) | Greiner Bio One International GmbH |

### 2.1.3 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE

Tabelle 3: **Lösungen und Reagenzien für die Immunhistochemie**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Aceton | | RCI Labscan |
| Ethanol absolut | | Walter-CMP GmbH |
| Hämalaun | 1:5 mit *Aqua dest.* verdünnt | Merck KGaA |
| *ImmPACT Vector Red Substrate* | enthält *ImmPACT Vector Red* Lösungsmittel sowie ImmPACT | Vector Laboratories |

| | | |
|---|---|---|
| | *Vector Red* Reagenz 1 und 2 | |
| *ImmPRESS-AP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit* | enthält *ImmPRESS-AP Reagent*, *ready-to-use (2,5 %) normal horse serum* | Vector Laboratories |
| Levamisol | | Dako GmbH |
| Pertex | | Medite GmbH |
| *Tissue-Tek* O.C.T. Compound | | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| *Tris-buffered saline* (TBS) | 60,5 g TRIS und 87,5 g NaCl auf 10 l *Aqua dest.*; pH 7,4 - 7,6 mit HCl eingestellt | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Xylol | | J. T. Baker |

Tabelle 4: **Primärantikörper Immunhistochemie**

| Antikörper | Herkunft | Hersteller | Katalognummer |
|---|---|---|---|
| TAZ | Kaninchen, polyklonal | Thermo Fisher Scientific Inc. | PA1-46190 |
| YAP | Kaninchen, monoklonal | Cell Signaling Technology | #14074 |

### 2.1.4 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Tabelle 5: **Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | | Sigma-Aldrich |
| fetales Kälberserum (FKS) | hitzeinaktiviert | Bio & Sell GmbH |
| iBONi siRNA gegen YAP1; im Folgenden Nummer 1 | 5'-UUAUGUAGUA AACUUCUCCCCC-3' | Riboxx GmbH |
| iBONi siRNA gegen YAP1; im Folgenden Nummer 2 | 5'-UCAUUGUCCUCA AUUCCUGCCCCC-3' | Riboxx GmbH |
| iBONi siRNA gegen YAP1; im Folgenden Nummer 3 | 5'-AUAUUCCGUAU UGCCUGCCCCC-3' | Riboxx GmbH |
| *Iscove's modified Dulbecco's medium* | | Biochrom GmbH |
| nicht-essenzielle Aminosäuren (100x) | | Biochrom GmbH |
| Penicillin/Streptomycin (100x) | 10 000 U/ml Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| *Phosphate buffered saline* (PBS, 10x) | pH 7,4; mit *Aqua dest.* verdünnt | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| riboxxFECT Transfektionsreagenz | | Riboxx GmbH |
| Trypanblau | | Sigma-Aldrich |
| Trypsin-EDTA | 0,05 % mit PBS verdünnt | Thermo Fisher Scientific Inc. |

| | | |
|---|---|---|
| unspezifische siRNA | 5'-UUGUACUACAC AAAAGUACCCCC-3' | Riboxx GmbH |
| Verteporfin | in DMSO gelöst, Stammlösung 10 µmol/l | Selleck Chemicals LLC |

### 2.1.5 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DEN LUCIFERASE-REPORTERGENASSAY

Tabelle 6: **Lösungen und Reagenzien für den Luciferase-Reportergenassay**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| *Dual-Luciferase Reporter Assay* | enthält Luciferase-Assayreagenz II, *Stop & Glo* Reagenz, *Passive Lysis Buffer* | Promega |
| FuGENE HD Transfektionsreagenz | | Promega |
| IFN-γ | Spezies: Ratte | ImmunoTools GmbH |
| Kontrollplasmid pGL 4.70 | | Promega |
| PD 98059 | in DMSO gelöst | Calbiochem |
| SB 202190 | in DMSO gelöst | Calbiochem |
| SB 202474 | in DMSO gelöst | Calbiochem |
| SB 203580 | in DMSO gelöst | Calbiochem |
| *Stimulight Hippo Pathway trans-reporting system* | enthält das Aktivatorplasmid pGAL4-TEAD4 und das Reporterplasmid pHTS-GAL4 | Lifeome |
| TGF-β1 | Spezies: Mensch | Bio-Techne GmbH |
| Verteporfin | in DMSO gelöst | Selleck Chemicals LLC |

### 2.1.6 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLPROLIFERATIONSMESSUNG

Tabelle 7: **Lösungen und Reagenzien für die Zellproliferationsmessung**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| *Cell Proliferation ELISA* | enthält BrdU-Reagenz, Fix Denat, Antikörper Dilutionslösung, Anti-BrdU-POD, Waschpufferansatz, Substratlösung | F. Hoffmann-La Roche AG |
| Schwefelsäure | 1 mol/l, Stopplösung | Merck KGaA |

### 2.1.7 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLZÄHLUNG

Tabelle 8: **Materialien für die Zellzählung**

| Material | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Via1-Cassetten | enthält Acridinorange (AO) und 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | ChemoMetec |

### 2.1.8 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DEN CASPASE-ASSAY

Tabelle 9: **Lösungen und Reagenzien für den Caspase-Assay**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Caspase-Glo 3/7 Assay | enthält Caspase-Glo 3/7 Reagenz | Promega |

### 2.1.9 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE NUKLEINSÄUREANALYTIK

Tabelle 10: **Lösungen und Reagenzien für die Nukleinsäureanalytik**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Agarose | | Serva Electrophoresis GmbH |
| Chloroform | | Sigma-Aldrich |
| DEPC-$H_2O$ | mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat versetztes *Aqua dest.*, vor Gebrauch 20 min autoklaviert | Sigma-Aldrich |
| *DNA-free DNase Treatment & Removal DNase Inactivation Reagent* | enthält DNase I Puffer, rDNase I (2 U/µl), nukleasefreies Wasser | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| Ethanol 75 % | verdünnt mit DEPC-$H_2O$ | Sigma-Aldrich |
| Ethidiumbromid | | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* | | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| *High capacity cDNA Reverse Transcription Kit* | enthält *Random Primer*, Reverse Transkriptase, dNTP-Gemisch, RT Puffer, nukleasefreies Wasser | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| Isopropanol | | J. T. Baker |
| Takyon Low ROX Probe 2x MasterMix dTTP blue | | Eurogentec |
| TBE-Puffer | pH 8,0<br>10,78 g Tris<br>5,50 g Borsäure<br>0,58 g EDTA auf<br>1000 ml Aqua *dest.* aufgefüllt | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| TriFast | | PEQLAB Biotechnologie |

Tabelle 11: ***Assay on Demand kits* für die Nukleinsäureanalytik**

| Gen | Hersteller | Katalognummer |
|---|---|---|
| *ACTA2* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn01759928_g1 |
| *CCN1* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn00580055_m1 |
| *COL1A1* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn01463848_m1 |
| *CTGF* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn00573960_g1 |
| *HPRT* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn01527840_m1 |

| | | |
|---|---|---|
| *IL6* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn00561420_m1 |
| *MMP2* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn01538167_m1 |
| *MMP9* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn00579162_m1 |
| *TGFB1* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn00572010_m1 |
| *YAP1* | Thermo Fisher Scientific Inc. | Rn01448051_m1 |

### 2.1.10 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE IL-6-BESTIMMUNG

Tabelle 12: **Lösungen und Reagenzien für die IL-6-Bestimmung**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Legend Max ELISA Kit mit vorbeschichteten Platten für Ratten IL-6 | enthält *Assay Buffer A*, Avidin HRP A, IL-6-Detektionsantikörper, Substratlösung, Stopplösung | BioLegend |

### 2.1.11 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE PROTEINANALYTIK

Tabelle 13: **Primärantikörper für die Proteinanalytik**

| Primärantikörper | Herkunft | Hersteller | Katalognummer |
|---|---|---|---|
| α-SMA | Maus, monoklonal | Sigma-Aldrich | A2547 |
| β-Aktin | Kaninchen, monoklonal | Cell Signaling Technology | #4970 |
| Col1a1 | Kaninchen, polyklonal | Bio-Techne GmbH | NB600-408 |
| Col1a2 | Kaninchen, polyklonal | Biorbyt | orb213757 |
| GAPDH | Kaninchen, monoklonal | Cell Signaling Technology | #2118 |
| YAP | Kaninchen, polyklonal | Cell Signaling Technology | #14074 |

Tabelle 14: **Sekundärantikörper für die Proteinanalytik**

| Sekundärantikörper | Herkunft | Hersteller | Katalognummer |
|---|---|---|---|
| IRDye 680CW Anti-Maus IgG | Ziege, polyklonal | LI-COR Biosciences | 926-32220 |
| IRDye 800CW Anti-Kaninchen IgG | Ziege, polyklonal | LI-COR Biosciences | 926-32211 |

Tabelle 15: **Lösungen und Reagenzien für die Proteinanalytik**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Acrylamid (40 %) | | Bio-Rad Laboratories Inc. |
| Ammoniumpersulfat (10 %) | 100 mg in 1 ml *Aqua dest.* gelöst | Sigma-Aldrich |
| Blockpuffer | 10 ml Blockpuffer auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und mit | Rockland Immunochemicals Inc. Thermo Fisher Scientific Inc. |

| | | |
|---|---|---|
| | 0,0125 - 0,025 g Natriumazid versetzt | Honeywell Riedel-de-Haën |
| *Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder* | 8 - 260 kDa | LI-COR Biosciences |
| Elektrophoresepuffer (3x) | 81,81 g Tris und 27 g SDS auf 9 l mit *Aqua dest.* aufgefüllt | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Probenpuffer | 2% SDS<br>10% Glycerin<br>62,5 g Tris-HCL, ph 6,8<br>5 mM EDTA-HCL, pH 8<br>0,001% Bromphenolblau<br>5% β-Mercaptoethanol | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Carl Roth GmbH & Co. KG<br>AppliChem GmbH<br>AppliChem GmbH<br>Sigma-Aldrich<br>Sigma-Aldrich |
| Sammelgelpuffer | pH 6,8; 6,06 g Tris und 0,4 g SDS auf 100 ml mit *Aqua dest.* aufgefüllt | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Strip-Puffer | pH 2,0; 1,8 g Glycin und 20 g SDS auf 1 l mit *Aqua dest.* aufgefüllt | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Tetramethylethylendiamin | | Sigma-Aldrich |
| Transferpuffer | 6 g Tris<br>29 g Glycin<br>10% Methanol<br>auf 2 l mit *Aqua dest.* aufgefüllt | Carl Roth GmbH & Co. KG<br>Carl Roth GmbH & Co. KG<br>J. T. Baker |
| Trenngelpuffer | pH 8,8; 36,33 g Tris und 0,8 g SDS auf 200 ml mit *Aqua dest.* aufgefüllt | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Tween-20 | | Carl Roth GmbH & Co. KG |

### 2.1.12 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG

Tabelle 16: **Lösungen und Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Bovines Serumalbumin (BSA) | 1:100 in PBS gelöst | PAA Laboratories Inc. |
| DAPI | 2 µl DAPI in 40 ml Methanol | Sigma-Aldrich |
| Fluoreszenz-Einbettmedium | | Agilent Technologies |

Tabelle 17: **Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung**

| Primärantikörper | Herkunft | Hersteller | Katalognummer |
|---|---|---|---|
| α-SMA | Maus, monoklonal | Sigma-Aldrich | A2547 |
| YAP | Kaninchen, polyklonal | Cell Signaling Technology | #14074 |

Tabelle 18: **Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung**

| Sekundärantikörper | Herkunft | Hersteller | Katalognummer |
|---|---|---|---|
| IRDye 800CW Anti-Maus IgG | Ziege, polyklonal | LI-COR Biosciences | 926-32210 |
| IRDye 800CW Anti-Kaninchen IgG | Ziege, polyklonal | LI-COR Biosciences | 926-32211 |

### 2.1.13 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ÖLROT-FÄRBUNG

Tabelle 19: **Lösungen und Reagenzien für die Ölrot-Färbung**

| Lösung/Reagenz | Anmerkung | Hersteller |
|---|---|---|
| Aquatex | Eindeckmedium | VWR International |
| Hämalaun | 1:5 mit *Aqua dest.* verdünnt | Merck KGaA |
| Ölrot O Stammlösung | 1 % m/v gelöst in Isopropanol | - |
| Paraformaldehyd | 2,5 % m/v gelöst in PBS, pH 7,4 | Morphisto |

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 IMMUNHISTOCHEMIE

Mithilfe der Immunhistochemie (IHC) ist es möglich, Aussagen über die Lokalisation und Menge bestimmter Antigene in Gewebeschnitten zu treffen. Dafür werden Gewebeschnitte auf der Basis von Antigen-Antikörper-Reaktionen gefärbt. Dies erfolgt bei der hier verwendeten, indirekten Methode über einen Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper, welcher gegen das $F_C$-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist.

#### HERKUNFT DER PANKREATA

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pankreata stammen aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. R. Jaster zur Verfügung gestellt. Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte der Vorversuche erläutert. Die Organe stammen aus unterschiedlichen Tiermodellen, in denen verschiedene Formen der Pankreatitis untersucht wurden. Die Versuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt und die Tiere entsprechend der Richtlinie der EU-Kommission „2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“ gehalten. Hierbei wurde unter Einhaltung eines 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus uneingeschränkter Zugang zu Futter und Wasser ermöglicht.

Die akute Pankreatitis wurde an weiblichen und männlichen C57BL/6 Mäusen untersucht. Dafür fand das Cholezystokinin-Analogon Caerulein Anwendung, welches bei entsprechender Dosierung zur Ausbildung einer akuten ödematösen Pankreatitis führt [177]. Die Tiere wurden nach nächtlichem Fasten mit 7 intraperitonealen Injektionen von Caerulein (50 µg/kg Körpergewicht [KG]) im Abstand von je 1 h behandelt. Ein Teil der Mäuse wurde vor Beginn dieser Behandlung euthanasiert (Kontrollgruppe), ein weiterer Teil nach 24 h [178]. Untersucht wurden die Pankreata von 4 Kontrolltieren (0 h) und 4 erkrankten Tieren (24 h).

Für die Untersuchung der chronischen Pankreatitis wurden männliche adoleszente Lewis-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von ca. 200 g und einem Alter von 10 - 12 Wochen einer Behandlung mit Dibutylzinndichlorid (DBTC) unterzogen. Dies führt dosisabhängig zu einer akuten, ödematösen Pankreatitis mit Neigung zur Chronifizierung und Organfibrose [179]. Den Tieren wurde 8 mg DBTC/kg KG intravenös injiziert [180]. Nach 7 bzw. 28 Tagen Inkubationszeit wurden die Ratten euthanasiert und die

Pankreata entnommen [181]. Untersucht wurden die Organe von 8 Ratten nach 7-tägiger Inkubation und von 6 Ratten nach 28-tägiger Inkubation. Die Pankreata 6 unbehandelter Kontrolltiere wurden ebenfalls untersucht.

Die Erforschung der autoimmunen Pankreatitis (AIP) fand an MRL/MpJ-Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) statt. Da vor allem weibliche Mäuse mit fortschreitendem Alter spontan Anzeichen einer AIP entwickeln [182], wurden diese für die Versuche verwendet. Immunhistochemische Färbungen wurden an Pankreata von 6 erkrankten und 6 gesunden Tieren durchgeführt. Die Klassifikation der Tiere als krank oder gesund erfolgte hierbei anhand des AIP-Scores. Dieser stellt ein Schema zur Beurteilung des Schweregrades einer murinen AIP dar und setzt sich aus Bewertungen von Gewebeschnitten des Pankreas in Hämatoxylin-Eosin-Färbung und immunhistochemischer CD3-Färbung zusammen [183]. Die gesunden Kontrolltiere wurden in einem Alter von 8 - 9 Wochen euthanasiert [183] und hatten einen AIP-Score ≤ 1. Erkrankte Mäuse waren zum Zeitpunkt der Organentnahme mindestens 37 Wochen alt und wiesen einen AIP-Score ≥ 3 auf.

#### GEWINNUNG UND VERARBEITUNG DER PANKREATA

Die Euthanasie der Versuchstiere und die anschließende Organentnahme erfolgten wie von Müller *et al.* 2014, Walther 2014 und Ehlers 2018 beschrieben [178, 181, 183]. Corpus und Cauda des Pankreas wurden in *Tissue-Tek* Gewebeschutzlösung eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Nach 24-stündiger Lagerung bei -20 °C wurden 6 µm dicke Gewebeschnitte der Organpräparate am Gefriermikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträgern fixiert, bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

#### VERSUCHSABLAUF

Die immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte erfolgte unter Einsatz des *Imm-PRESS-AP Detection Systems* von Vector Laboratories. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 10 min luftgetrocknet. An das fünfminütige Fixieren in 4 °C warmem Aceton schlossen sich drei Waschschritte mit *Tris-buffered saline* (TBS, pH 7,4 - 7,6) an. Nachdem die Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift umkreist wurden, folgte eine zwanzigminütige Inkubation mit *ready-to-use (2,5 %) normal horse serum,* um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu Blocken. Dieser und folgende Schritte fanden in einer feuchten Kammer statt. Anschließend wurde das Serum verworfen und die Präparate für 30 min mit 50 - 100 µl der jeweiligen Primärantikörper-Suspension inkubiert (Verdünnung siehe Tabelle 20). Für jedes Präparat wurde eine entsprechende Negativkontrolle mitgeführt,

bei der auf die Inkubation mit dem Primärantikörper verzichtet wurde. Nach einem fünfminütigen Waschschritt mit TBS folgte die dreißigminütige Inkubation mit *ImmPRESS-AP Reagent.* Dieses enthält einen gegen Kaninchen-IgG gerichteten sekundären Antikörper, welcher mit polymerisierten alkalischen Phosphatasen (AP) gekoppelt wurde. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit TBS sowie die Inkubation mit *ImmPACT Vector Red*. Dieses AP-Substrat wurde nach Herstellerangaben angesetzt, mit Levamisol (2 Tropfen pro ml Substrat) zum Blocken der endogenen AP-Aktivität vermengt und schließlich bis zum Erscheinen einer makroskopisch sichtbaren Rotfärbung inkubiert (typischerweise 7 bzw. 30 min für TAZ bzw. YAP). Die Schnitte wurden 5 min in lauwarmem Leitungswasser gewaschen und für 4 min mit filtrierter Hämalaun-Lösung (1:5 in *Aqua dest.* verdünnt) gegengefärbt. Nach dem zehnminütigen Bläuen in lauwarmem Leitungswasser wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (bestehend aus 2-mal absolutem Ethanol und 2-mal Xylol) entwässert und schließlich unter einem Deckglas in Pertex eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden am Lichtmikroskop betrachtet und durch zwei Beobachter hinsichtlich des Ausmaßes und der Lokalisation der Färbung in Bezug zur Organschädigung beurteilt.

Tabelle 20: **Verdünnung der Primärantikörper für die IHC-Färbung**

| Antikörper | Isotyp | Verdünnung in *ready-to-use (2,5 %) normal horse serum* |
|---|---|---|
| YAP | Kaninchen IgG | 1:50 |
| TAZ | Kaninchen IgG | 1:1000 |

### 2.2.2 VERWENDETE ZELLEN

Für die Versuche wurden sowohl primäre PSZ bis zur ersten Passage als auch immortalisierte PSZ der Ratte bis zur zehnten Passage verwendet. Die immortalisierten Zellen wurden durch retroviralen Transfer des „*SV40 large T antigen*s“ in primäre PSZ an Tag 7 nach Isolation generiert (LTC-7 Zellen) [184].

Primäre PSZ wurden aus etwa 3 Monate alten Lewis-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) gewonnen. Dafür wurden die Pankreata der euthanasierten Tiere mit einer Schere zerkleinert und mit einem in *Hank‘s buffered salt solution* gelösten Enzymgemisch aus Kollagenase P (0,05 %), Protease IX (0,02 %) und Desoxyribonuklease (0,1 %) behandelt. Die auf diese Weise entstandene Zellsuspension wurde mittels Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation [99] aufgetrennt (bei 1400 g für 20 min). PSZ setzen sich aufgrund des hohen Lipidgehalts und der damit einhergehenden geringen Dichte als Fraktion oberhalb der restlichen Zellen ab. Nach Gewinnung der PSZ wurden diese in Einfriermedium (bestehend aus 90 % fetalem Kälberserum [FKS] und 10 % Dimethylsulfoxid [DMSO]) resuspendiert und bis zur Verwendung bei -150 °C gelagert.

### 2.2.3 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom statt. Die tiefgefrorenen Zellen wurden für ca. 2 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Einfriermedium entfernt und die Zellen in *Iscove's modified Dulbecco's medium* resuspendiert, welches mit FKS, nicht-essenziellen Aminosäuren (1 % v/v), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt wurde. Der FKS Gehalt betrug dabei 10 % im Medium für immortalisierte und 17 % im Medium für primäre PSZ. Das entsprechend modifizierte Kulturmedium wird im Folgenden als Standardmedium bezeichnet. Die Zellen wurden auf Kulturplatten in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % $CO_2$-Gehalt der mit Wasser gesättigten Luft inkubiert. Nach 2 Tagen fand ein Mediumwechsel statt, durch welchen ein Großteil der kontaminierenden Zellen (z. B. nicht adhärente Azinuszellen) entfernt wurde und lichtmikroskopisch nahezu reine PSZ-Kulturen anwuchsen.

Bei den Versuchen mit Primärzellen wurden zwei Versuchsansätze unterschieden:

Da der Aktivierungsprozess primärer PSZ *in vitro* bereits 48 h nach deren Isolation beginnt [99], wurde ein Teil der Zellen direkt nach dem Auftauen für die Versuche eingesät. Diese Zellen werden im Folgenden als „frühe aktivierte PSZ" bezeichnet.

Um die Funktionen vollständig aktivierter PSZ [99] zu untersuchen, wuchs ein Teil der Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz auf einer 6-*well*-Platte an (etwa 7 Tage) und wurde anschließend für die Versuche eingesät. Dafür wurde das Zellkulturmedium entfernt und nach Spülung mit PBS für eine Minute Trypsin (0,05 % v/v) auf die *wells* gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 5 min in den Brutschrank gestellt und nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Adhäsiolyse in neuem Kulturmedium abgeerntet. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 400 g wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert. Nach Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen für die Versuche eingesät.

### 2.2.4 LUCIFERASE-REPORTERGENASSAY

#### HIPPO PATHWAY TRANS-REPORTING SYSTEM

Um die Aktivierung von TEAD4 einer objektiven Quantifizierung zugänglich zu machen, wurde das *Stimulight Hippo Pathway trans-reporting system* von Lifeome eingesetzt und verschiedene Vektoren kotransfiziert (siehe Abbildung 2.1). Das Aktivatorplasmid pGAL4-TEAD4 sorgt unter Verwendung des *CMV early* Promotors für eine konstitutive Expression des Fusionsproteins Gal4-TEAD4, welches als trans-Aktivator und Detektor der Aktivität des Hippo-Signalwegs fungiert. Es besteht aus der DNA-bindenden Domäne (DBD)

von GAL4 (einem hefespezifischen Transkriptionsfaktor) und der Transaktivierungsdomäne von TEAD4. Das Reporterplasmid pHTS-GAL4 kodiert für die *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle des GAL4-bindenden Elementes (GBE). Kommt es zur Interaktion von YAP mit der TEAD4 Transaktivierungsdomäne des Fusionsproteins, bindet dieses mithilfe der DBD an die GBE-Region des Reporterplasmids und die *Firefly*-Luciferase wird vermehrt exprimiert. Liegt YAP jedoch bei aktivierter Hippo-Kinasekaskade phosphoryliert im Zytoplasma vor, resultiert eine verminderte Luciferase-Expression [185].

#### LIPOFEKTION

Hierbei handelt es sich um eine Methode der chemischen Transfektion. Spezielle kationische Lipide lagern sich in Lösungen mit negativ geladenen Nukleinsäuren zu Nukleinsäure-Lipid-Komplexen (Lipoplexen) zusammen. Diese werden von den Zellen via Endozytose aufgenommen und über die Endosomen ins Zytosol freigesetzt. Da die Kernmembran eine Schranke für DNA (*nuclear barrier*) darstellt, gelangen die Plasmide vor allem während der Mitose, wenn die Membran zerfällt, in den Nukleus. Folglich ist die Zellteilungsrate von Bedeutung für die Transfektionseffizienz [186].

#### LUMINOMETRISCHE AUSWERTUNG

Durch die von der *Firefly*-Luciferase katalysierte, $Mg^{2+}$-abhängige Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin kommt es zur Emission von Licht, welche luminometrisch gemessen werden kann. Durch die Verwendung des *Dual-Luciferase Reporter Assays* von Promega konnte der Einfluss von Störfaktoren wie einer unterschiedlichen Zellzahl, Zellviabilität und Transfektionseffizienz minimiert werden. Dafür wurden die Zellen zusätzlich zum Aktivator- und Reporterplasmid mit dem Kontrollplasmid pGL 4.70 transfiziert, welches für eine konstitutive Expression der *Renilla*-Luciferase sorgt. Diese setzt unter Emission von Licht Coelenterazin zu Coelenteramid um. Die Signale der *Firefly*-Luciferase können dann mit den Signalen der *Renilla*-Luciferase normalisiert werden.

#### VERSUCHSBEDINGUNGEN

5 x $10^3$ immortalisierte PSZ bzw. vollständig aktivierte Primärzellen pro *well* wurden für 48 h im entsprechenden Standardmedium auf 96-*well*-Mikrotiterplatten anwachsen gelassen. Darauf folgte die Transfektion der drei Plasmide und die gleichzeitige 24-stündige Behandlung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen. Verwendet wurden TGF-$\beta$1 und Interferon-$\gamma$ (IFN-$\gamma$) als mögliche extrazelluläre Upstream-Regulatoren des Hippo-Signalwegs. Als mögliche intrazelluläre Upstream-Regulatoren wurden die p38-MAP-Kinase Inhibitoren SB 203580 und SB 202190 sowie die zugehörige Negativkontrolle SB 202474 getestet. Des

Weiteren wurden die Effekte des MAP-Kinase-Kinase Inhibitors PD 98059 und des Verteporfins untersucht.

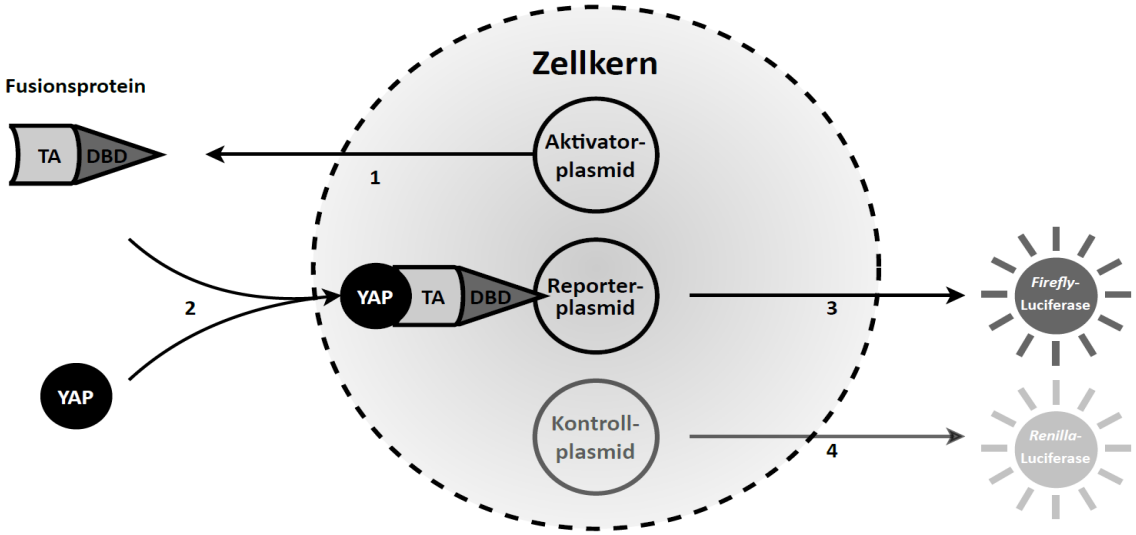



Abbildung 2.1: **Schema des Luciferase-Reportergenassays**
Das Aktivatorplasmid sorgt für die konstitutive Expression des Fusionsproteins Gal4-TEAD4 (1), welches aus der Transaktivierungsdomäne von TEAD4 (TA) und der DNA-bindenden Domäne von GAL4 (DBD) besteht. Das Reporterplasmid kodiert für eine *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle des GAL4-bindenden Elementes (GBE). Das Fusionsprotein wird durch die Interaktion von unphosphoryliertem, intranukleären YAP mit der Transaktivierungsdomäne aktiviert (2). Wenn die DNA-bindende Domäne des aktivierten Fusionsproteins an das GAL4-bindende Element des Reporterplasmids bindet, wird die *Firefly*-Luciferase exprimiert (3). Das Kontrollplasmid kodiert für die *Renilla*-Luciferase (4). Zusammenfassend ist die Aktivität der Firefly-Luciferase ein Marker für intranukleäres YAP und somit den Aktivierungszustand des Hippo-Signalwegs.

### VERSUCHSABLAUF

An Tag 3 nach Einsaat wurden die Zellen gemäß den Herstellerangaben transient mit dem Aktivatorplasmid (100 ng/*well*), dem Reporterplasmid (6 ng/*well*) und dem Kontrollplasmid (10 ng/*well*) transfiziert. Dafür wurden die Plasmide in einem Ansatz mit serumfreien Standardmedium und FuGENE Transfektionsreagenz kurz gevortext und nachfolgend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die im vorherigen Abschnitt genannten Substanzen mittels Mediumwechsel in die *wells* pipettiert und der Transfektionsansatz dazugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der Überstand entfernt und zur Lyse der Zellen je 25 µl *Passive Lysis Buffer* in die *wells* gegeben. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei 1000 rpm auf dem Schüttler wurden je 20 µl der Zellsuspension eines *wells* auf eine weiße 96-*well*-Mikrotiterplatte überführt. Die anschließende Messung der Lumineszenz fand automatisiert am *GloMax-Multi Detection System* von Promega statt. Dabei wurde zuerst die Aktivität der *Firefly*-Luciferase durch Zugabe von je 50 µl Luciferase-Assayreagenz II bestimmt. Nach Hinzugabe des *Stop & Glo* Reagenz konnte das Signal der *Renilla*-Luciferase gemes-

sen werden. Schließlich wurde zur Normalisierung der Quotient aus den Messwerten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase gebildet.

### 2.2.5 ANALYSE DER ZELLPROLIFERATION

Die proliferative Aktivität der Zellen wurde indirekt mit Hilfe des *Cell Proliferation ELISAs* von Roche analysiert. Dieser Immunassay basiert auf dem Einbau von 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA sich replizierender Zellen. Bereits 1985 wurde eine entsprechende Methode zur Analyse der Zellproliferation beschrieben [187]. Nach Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA kann das eingebaute BrdU als Surrogatmarker der Proliferation mittels eines monoklonalen Anti-BrdU Antikörpers quantifiziert werden. Eine an den Antikörper gekoppelte Peroxidase (POD) setzt das anschließend hinzugegebene Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) um, sodass eine Blaufärbung entsteht, welche proportional zur Menge der DNA-Synthese und somit zur Anzahl der proliferierenden Zellen ist.

#### VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Effekte des Verteporfins auf die Zellproliferation wurden sowohl an immortalisierten PSZ als auch an aktivierten primären PSZ untersucht. Dafür wurden 1 x $10^3$ immortalisierte bzw. 2 x $10^3$ Primärzellen pro *well* in 96-*well half-area* Mikrotiterplatten eingesät und in 50 µl Standardmedium pro *well* anwachsen gelassen. Am 1. Tag nach Einsaat erfolgte die Zugabe von Verteporfin durch einen Mediumwechsel. Die anschließende Inkubationszeit betrug 48 h. Da Verteporfin in DMSO gelöst ist, dienten bei diesen und folgenden Versuchen mit demselben Inhibitor die ausschließlich mit dem Lösungsmittel behandelten Zellen als Kontrollgruppe. Die bei den Kontrollen eingesetzte DMSO-Konzentration entsprach dabei der maximalen Lösungsmittelkonzentration unter den mit Verteporfin behandelten Zellen.
Analog dazu wurden die Auswirkungen der siRNA auf immortalisierte Zellen untersucht. Dabei wurden 1,5 x $10^3$ Zellen pro *well* eingesät. Am 1. Tag nach Einsaat erfolgte die transiente Transfektion mit siRNA in einer Konzentration von 20 nmol/l und 48 h später die Inkubation mit BrdU.

#### VERSUCHSABLAUF

Nach Ende der Inkubationszeit wurden je 5 µl einer mit Standardmedium verdünnten BrdU-Lösung in die *wells* der Mikrotiterplatte pipettiert und die Platten kurz zentrifugiert. Die BrdU-Konzentration in den *wells* lag bei 10 µmol/l. Anschließend wurden die Platten für 8 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Konfluenzgrad der Zellen mikroskopisch begutachtet, um ihn mit den späteren Versuchsergebnissen abgleichen zu können. Der Überstand wurde entfernt und die Platte über Nacht bei 4 °C gelagert. Im

nächsten Schritt erfolgte durch Zugabe von 100 µl FixDenat-Lösung pro *well* die Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA, welche Voraussetzung für die Bindung des Antikörpers an BrdU ist. Nach dreißigminütiger Einwirkung bei Raumtemperatur wurde die Lösung verworfen. Der Anti-BrdU-POD Antikörper wurde für 10 min in 1,1 ml *Aqua bidest.* gelöst, 1:100 mit Verdünnungslösung verdünnt und anschließend für 90 min unter leichtem Schütteln inkubiert (50 µl pro *well*). Nach Entfernen der Antikörperlösung und 3-maligem Spülen mit Waschlösung wurde 50 µl TMB-haltige Substratlösung pro *well* hinzugegeben. Die Peroxidase-katalysierte Oxidation von TMB führte innerhalb einiger Minuten zu einem blauen Farbumschlag, welcher proportional zur Menge des gebundenen Anti-BrdU-POD war. Nach Abstoppen der Reaktion mit 25 µl Schwefelsäure (1 mol/l) pro *well* trat eine Gelbfärbung ein. Die Extinktion wurde mit einem ELISA-Reader bei 450 nm photometrisch gemessen und nach Abzug des Leerwertes auf die Extinktion einer Kontrolle normiert. Dadurch konnten Aussagen zur relativen DNA-Syntheseleistung der unterschiedlichen Proben getroffen werden.

### 2.2.6 ANALYSE DER ZELLVIABILITÄT

#### 2.2.6.1 ZELLZÄHLUNG

Der Einfluss von Verteporfin auf die Zellviabilität wurde an immortalisierten und aktivierten primären PSZ untersucht. Dafür wurden je nach Verfügbarkeit 1 x $10^4$ bis 3 x $10^4$ immortalisierte bzw. primäre PSZ pro *well* im jeweiligen Standardmedium auf 24-*well*-Platten eingesät und ein bis zwei Tage anwachsen gelassen. Es folgte die Zugabe von Verteporfin durch Mediumwechsel und eine 48-stündige Inkubation. Die Effekte der siRNA wurden auf gleiche Weise an immortalisierten PSZ untersucht. Auch hier betrug die Inkubationszeit 48 h.

**VERSUCHSABLAUF**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen jedes einzelnen *wells* in ein separates 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde zunächst der Überstand in das Reaktionsgefäß pipettiert und das leere *well* mit 100 µl PBS (pH 7,4) gespült, welches anschließend ebenfalls überführt wurde. Es folgte die Zugabe von 200 µl Trypsinlösung für 1 min bei Raumtemperatur. Nach Verwerfen des Trypsins wurde die Mikrotiterplatte für 5 bis 7 min in den Brutschrank gestellt und darauffolgend die Zellen durch Spülen der *wells* mit 800 µl Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß abgeerntet und in dieses überführt. Nach einem weiteren Spülvorgang mit 200 µl Standardmedium wurde die Vollständigkeit der Zellernte am Mikroskop kontrolliert. Im Anschluss an eine 20-sekündige Zentrifugation der Proben bei 18 626 g wurde der Überstand aus dem Reaktionsgefäß entfernt und das Zellpellet in 250 µl Medium resuspendiert.

#### ZELLZÄHLUNG MITTELS TRYPANBLAU-AUSSCHLUSSTEST

Bei den ersten Versuchen mit immortalisierten und primären PSZ wurde die Zellviabilität durch Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt. Der anionische, blaue Farbstoff dient der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, da er die intakte Zellmembran lebender Zellen nur sehr langsam penetrieren kann und sich stattdessen in Zellen mit Membranschädigung anreichert (Perforationsfarbstoff).

#### ZELLZÄHLUNG AM *NUCLEOCOUNTER*

Nach Validierung der Messergebnisse durch Abgleich mit den Werten der Trypanblau-Zellzählung wurden alle weiteren Zellzählungen automatisiert am *NucleoCounter* NC-200 von ChemoMetec durchgeführt. Die dabei verwendeten Via1-Cassetten enthalten die Fluorochrome Acridinorange (AO) und 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). AO interagiert mit Nukleinsäuren in lebenden und toten Zellen, wohingegen DAPI die Zellmembran lebender Zellen nur sehr langsam überwinden kann und so hauptsächlich die DNA toter Zellen ohne intakte Membran färbt. Das Gerät kann so nach Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe die Gesamtzellzahl und den Anteil toter Zellen bestimmen.

### 2.2.6.2 CASPASE-ASSAY

Die Apoptose beruht als Form des programmierten Zelltods auf proteolytischen Enzymkaskaden, deren zentraler Bestandteil Caspasen sind. Die Effektorcaspasen 3 und 7 werden im Rahmen der Apoptose durch limitierte Proteolyse aktiviert und können mit Hilfe des Caspase-Glo 3/7 Assays von Promega zur Quantifizierung der Apoptose herangezogen werden. Dabei wird ein Reagenz verwendet, welches an eine DEVD-Sequenz gebundenes Proluciferin als Substrat sowie eine rekombinante Luciferase enthält. Nach Lyse der Zellen spalten die Caspasen Aminoluciferin vom Substrat ab. Dieses wird unter Emission von Licht durch die Luciferase oxidiert. Anschließend kann die Lumineszenz gemessen werden, welche sich proportional zur Caspaseaktivität und damit zur Anzahl der apoptotischen Zellen verhält.

#### VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Auswirkungen von Verteporfin und der getesteten siRNA auf die Apoptoserate wurden jeweils an immortalisierten PSZ untersucht. Die Zellen wurden in einer Dichte von 3 x $10^3$ Zellen pro *well* auf weißen 96-*well*-Platten eingesät und für 24 h in 100 µl Standardmedium pro *well* anwachsen gelassen. Es folgten die Behandlung mit Verteporfin durch Mediumwechsel bzw. die transiente Transfektion der Zellen und eine Inkubation über 48 h.

#### VERSUCHSABLAUF

Nach abgeschlossener Inkubation wurden 100 µl des Caspase-Glo 3/7 Reagenzes in die *wells* pipettiert. Die Platte wurde für 30 sek bei 300 rpm geschüttelt und 1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte die Messung der Lumineszenz am *GloMax-Multi Detection System*. Die in einem zellfreien *well* gemessene Lumineszenz fungierte als Leerwert. Die abzüglich des Leerwertes ermittelten Lumineszenzwerte wurden auf die Werte unbehandelter Kontrollen bezogen, sodass die relative Caspaseaktivität der Proben als Maß der Apoptose bewertet werden konnte.

### 2.2.7 NUKLEINSÄUREANALYTIK

Um die Auswirkungen der untersuchten Pharmaka auf die Expression der in Tabelle 11 genannten Gene zu eruieren, wurden die entsprechenden Boten-RNA-Transkripte (mRNA-Transkripte) quantifiziert. Hierfür fand die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*Real-Time PCR*, qPCR) Anwendung, mit deren Hilfe sich Aussagen über den absoluten und relativen Gehalt bestimmter Nukleinsäuren in Lösungen treffen lassen. Im gegebenen Setting (Quantifizierung der Genexpression unterschiedlich behandelter Zellen) bot sich ein Ansatz mit relativer Betrachtung mittels vergleichender CT-Methode an, da hierfür kein Standard benötigt wird. Dabei wird die Expression eines definierten Gens zunächst mit der eines Haushaltsgens, dessen Expression stabil und weitgehend unabhängig von den Umgebungsbedingungen ist, ins Verhältnis gesetzt. Anschließend erfolgt der Bezug auf einen Kalibrator (z. B. eine unbehandelte Kontrolle), wodurch Unterschiede im Expressionsniveau relativ zu dieser Probe beurteilt werden können.

#### VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Genexpressionsanalysen wurden sowohl an immortalisierten als auch an aktivierten primären PSZ durchgeführt. Dazu wurden die Zellen je nach Verfügbarkeit auf 6- oder auf 12-*well*-Platten bis zum Erreichen einer ca. 70%igen Konfluenz (typischerweise am 2. Tag nach Einsaat) in Standardmedium anwachsen gelassen. Dann erfolgte die Stimulation der Zellen. Verteporfin wurde mittels Mediumwechsel hinzugegeben und der Versuch nach 24 h Inkubationszeit abgestoppt. Die Versuche mit siRNA wurden hingegen erst nach 48 h abgestoppt.

#### RNA-ISOLATION

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurde auf eine modifizierte *single-step*-Methode [188] zurückgegriffen. Dafür wurde zunächst das Kulturmedium aus den bewachsenen *wells* entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren unter dem Sicherheitsabzug mit TriFast Reagenz (Menge in Tabelle 21) lysiert und die Suspension in 1,5 ml

RNA-Reaktionsgefäße überführt. Nach kurzem Vortexen der Proben und fünfminütiger Lagerung bei Raumtemperatur wurde Chloroform zur Phasentrennung zugesetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 18 626 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert.

Dadurch grenzten sich drei Phasen voneinander ab. Eine untere chloroformreiche, organische Phase, die DNA-haltige Intermediärphase sowie die obere, wässrige Phase mit gelöster RNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol versetzt. Nach Durchmischung und zehnminütiger Inkubation erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 18 626 g und 4 °C für 10 min. Die nun in Form eines kleinen Pellets präzipitierte RNA wurde vom Überstand befreit und mit je 1 ml eiskaltem Ethanol (75 % v/v, verdünnt mit nukleasefreiem Wasser [nf-$H_2O$]) gewaschen. Nach einer weiteren fünfminütigen Zentrifugation wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt und das RNA-Pellet unter dem Abzug trocknen gelassen. Schließlich erfolgte die Resuspension der RNA in 30 µl nf-$H_2O$ bei 65 °C für 10 min. Anschließend wurde die RNA auf Eis gelagert, um einer Degradation vorzubeugen.

Tabelle 21: **Mengen der Reagenzien für die RNA-Isolation**

| | **6-*well*-Platte** | **12-*well*-Platte** |
|---|---|---|
| TriFast Reagenz | 300 µl | 250 µl |
| Chloroform | 60 µl | 50 µl |
| Isopropanaol | 150 µl | 125 µl |

#### DNASE-VERDAU

Um bei der folgenden qPCR nicht unbeabsichtigt Transkripte genomischer DNA zu detektieren, wurde diese enzymatisch verdaut. Hierfür wurde das *DNA-free Kit* von Life Technologies verwendet, welches auf der Wirkung von rekombinanter DNase I (rDNase I) basiert.

Zunächst wurden die RNA-Proben mit 3 µl 10X DNase I Puffer und 1 µl rDNase I gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 µl resuspendiertes DNase-Inaktivierungsreagenz hinzugegeben und für 2 min bei 25 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation bei 10 000 g und anschließendes Überführen des Überstands in neue Reaktionsgefäße, wurden die Reagenzien von der RNA-Suspension getrennt.

#### RNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Unmittelbar nach dem DNase-Verdau wurde die RNA-Konzentration spektralphotometrisch am Implen NanoPhotometer bestimmt. Hierfür wurde die optische Dichte (OD) der RNA-

Lösung bei Durchstrahlung mit monochromatischem Licht einer Wellenlänge von λ = 260 nm gemessen und die Konzentration mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Konzentration [µg/mL]} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40\ \mu g/ml$$

Im ultravioletten Frequenzbereich besitzt RNA ein Absorptionsmaximum bei λ = 260 nm, während das Absorptionsmaximum für Proteine bei λ = 280 nm liegt. Der Quotient der Extinktionen bei diesen Wellenlängen ($OD_{260}/OD_{280}$) kann als Maß für Verunreinigungen der RNA mit Proteinen verwendet werden. Bei Werten über 1,8 gilt die extrahierte RNA als relativ rein. Nach der RNA-Konzentrationsmessung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

**AGAROSE-GELELEKTROPHORESE**

Die Qualität der RNA-Proben hängt nicht nur von ihrer Reinheit, sondern auch von der Intaktheit der RNA ab. Um diese zu beurteilen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein einprozentiges (m/v) Agarosegel mit 0,001 % (v/v) Ethidiumbromid angesetzt. Zunächst wurde 1 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml mit 50%igem TBE-Puffer (v/v mit 0,1%igem DEPC-$H_2O$ verdünnt) versetzt. Die Agarose wurde durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und schließlich 1 µl Ethidiumbromid unter dem Sicherheitsabzug hinzugegeben. Nach kurzem Abkühlen wurde die Gelflüssigkeit in eine vorbereitete Kammer gegossen und ein Kamm für Probentaschen aufgesteckt. Nach dreißigminütiger Aushärtung wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in einer Elektrophoresekammer mit dem 50%igen TBE-Puffer bedeckt. In die Probentaschen wurde je 1 µg RNA pipettiert, welche mit 2 µl Ladepuffer und einer variablen Menge an nf-$H_2O$ in einem Gesamtvolumen von 12 µl gelöst war. Die erste Probentasche wurde dabei mit 10 µl einer 1 kB DNA-Leiter gefüllt. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V über eine Stunde trennen sich die unterschiedlichen RNA-Moleküle entsprechend ihrer Molekülmasse auf. Dies beruht darauf, dass die RNA aufgrund ihres Phosphat-Rückgrates eine direkt zur molaren Masse proportionale negative Ladung besitzt. Daraus folgt, dass kleinere RNA-Moleküle im Gel schneller zur Anode wandern als größere.

Ethidiumbromid ist nach Absorption von UV-Strahlung zur Emission von Licht (λ = 590 nm) fähig. Als Kation wandert es in dem Gel bei angelegter Spannung entgegengesetzt zur RNA und interkaliert dabei in die Nukleinsäurestränge. Dadurch nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50 bis 100 zu (proportional zur Konzentration und Länge der RNA). So konnten RNA-Banden an einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Die Banden der ribosomalen 18S und 28S RNA dienten als Indikator für die Qualität der Proben. Aufgrund des hohen Anteils der rRNA an der Gesamt-RNA in Verbindung mit den bekannten Molekülmassen, lassen sich bei nicht degradierten RNA-Proben zwei scharfe

Banden abgrenzen (siehe Abbildung 2.2). Degradiert die RNA jedoch in Fragmente unterschiedlicher Länge, lassen sich die Banden nur noch unscharf bzw. nicht mehr erkennen.

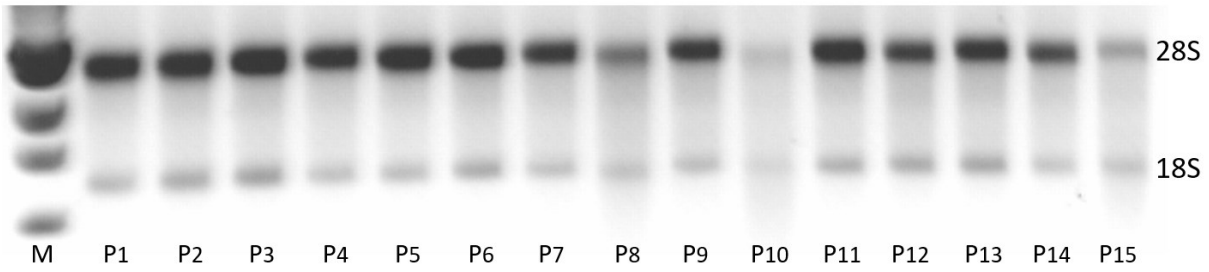



Abbildung 2.2: **RNA-Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel**
Pro Probentasche wurde 1 µg RNA aufgetragen, welche aus immortalisierten PSZ isoliert wurde. Links im Bild befindet sich ein DNA-Marker (M). Zu erkennen sind die Banden der ribosomalen 18S und 28S RNA. Die schwer zu erkennenden Banden im Bereich der Probentasche P10 sprechen für eine in diesem Fall leichte Degradation der RNA.

#### REVERSE TRANSKRIPTION

Da die isolierte RNA nicht direkt als Substrat für die qPCR verwendet werden kann und weniger stabil ist als DNA, erfolgte ein Umschreiben in komplementäre, einsträngige DNA (cDNA). Hierfür wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems verwendet. Die enthaltene Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche nach Synthese der cDNA die komplementären RNA-Stränge mit ihrer Aktivität als RNase H abbaut. 0,25 µg RNA wurden in 10 µl nf-$H_2O$ gelöst und mit 10 µl Mastermix (siehe Tabelle 22) in einem Reaktionsgefäß gemischt. Es folgten der Reihe nach drei Inkubationsschritte:

- 10 min bei 25 °C
- 120 min bei 37 °C
- 5 min bei 85 °C

Der letzte Inkubationsschritt dient der Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 22: **Zusammensetzung des Mastermixes für die reverse Transkription einer RNA-Probe**

| Bestandteil | Volumen |
|---|---|
| 10X Puffer | 2,0 µl |
| dNTPs | 0,8 µl |
| Random Primer | 2,0 µl |
| MultiScribe Reverse Transkriptase | 1,0 µl |
| nf-$H_2O$ | 4,2 µl |

### *REAL-TIME* PCR (TAQMAN)

Um die relativen Mengen der cDNA-Transkripte zu bestimmen, wurde die *Real-Time* PCR-Methode nach der TaqMan-Technologie angewendet. Hierbei handelt es sich um einen Assay, bei dem in Echtzeit die Menge an amplifizierter DNA gemessen wird. Dazu wird ein genspezifisches Gemisch aus Sonden und Primern (*Assay-on-Demand*) sowie ein DNA-Polymerase-haltiger Mastermix verwendet. Nacheinander werden die Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation durchlaufen. Während der Hybridisierungsphase binden nicht nur die zwei spezifischen Primer an ihre komplementären DNA-Sequenzen, sondern auch genspezifische TaqMan MGB-Sonden (engl. *minor groove binder*). Diese Sonden hybridisieren unterhalb (bezogen auf die Leserichtung) der Primerstellen. Es handelt es sich um modifizierte Oligonukleotide, welche am 5´-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3´-Ende einen *Quencher*-Farbstoff enthalten. Ist die Sonde intakt, gibt der Fluoreszenzfarbstoff durch seine Nähe zum *Quencher* den Großteil seiner Strahlungsenergie mittels Förster-Resonanzenergietransfer an diesen ab, weswegen kein nennenswertes Fluoreszenzsignal detektiert werden kann.

Kommt es nun jedoch durch die Aktivität der modifizierten, thermostabilen Taq-Polymerase (ursprünglich isoliert aus *Thermus aquaticus*) zur Elongation der Primer, werden die Sonden durch die 5´-3´-Exonukleaseaktivität des Enzyms abgebaut. Dies hat eine räumliche Separation der Farbstoffe zur Folge, die in einem Anstieg der Fluoreszenzintensität mündet, welcher proportional zur Menge der synthetisierten DNA ist. Die Menge an synthetisierter DNA hängt wiederum direkt von der Ausgangsmenge an cDNA ab.

Für die Versuche wurden unter Verwendung von *Low Retention* Filterspitzen je 2,5 µl cDNA pro Vertiefung in 96-*well*-Multititerplatten pipettiert. Anschließend wurden 10 µl des PCR-Ansatzes (siehe Tabelle 23) dazugegeben. Dabei wurde unter Eiskühlung gearbeitet.

Tabelle 23: **Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für eine Probe**

| Bestandteil | Volumen |
|---|---|
| Primer/Sonden-Kombination | 0,625 µl |
| nf-$H_2O$ | 3,125 µl |
| Mastermix | 6,250 µl |

Die Platte wurde zum Schutz gegen Verdunstung mit einer durchsichtigen Plastikfolie abgeklebt und kurz zentrifugiert. Danach wurde sie in den Echtzeit-PCR-Cycler eingesetzt und ein repetitives Protokoll zur Amplifikation (siehe Tabelle 24) durchlaufen.

Tabelle 24: **Häufigkeit und Temperaturprofil der PCR-Zyklen**

| Wiederholungen | Temperatur | Zeit |
|---|---|---|
| 1 | 95 °C | 5:00 min |
| 45 | 95 °C | 0:15 min |
| | 60 °C | 1:00 min |

Die PCR ist ein Verfahren, bei dem unter optimalen Reaktionsbedingungen eine exponentielle Vervielfältigung des Ausgangsmaterials stattfindet. Dementsprechend steigt die Intensität des Fluoreszenzsignals ab einer gewissen Anzahl an durchlaufenen Zyklen exponentiell an. Die minimale Zyklusnummer, bei der die Fluoreszenzintensität einen festgelegten Schwellenwert überschreitet, markiert den Übergang in die exponentielle Phase und wird als Schwellenwertzyklus (engl. *Threshold Cycle,* Ct-Wert) bezeichnet. Anhand des Vergleiches der Ct-Werte für ein bestimmtes Gen in unterschiedlichen Proben sind Aussagen über die relative Genexpression möglich.

Die Auswertung der PCR-Daten erfolgte mittels der Software „Quant Studio Real Time PCR Version 1.2“. Zunächst wurde der ermittelte Ct-Wert eines Gens mit dem Ct-Wert des Haushaltsgens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*HPRT*) in derselben Probe normalisiert:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{HPRT}}$$

Dadurch verringert sich der Einfluss von Störgrößen wie einer unterschiedlichen Effizienz der reversen Transkription oder Varianzen in der Gesamtmenge an RNA zwischen den Proben. Um eine Aussage über die Expression eines Gens in Relation zu einem Kalibrator (beispielsweise einer unbehandelten Kontrolle) treffen zu können, wurde der entsprechend normalisierte $\Delta Ct$-Wert der Kontrolle ins Verhältnis zum $\Delta Ct$-Wert der Probe gesetzt:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

Der ermittelte Wert gibt einen (mittlerweile normierten) Unterschied an Zyklen zum Erreichen der exponentiellen Phase an. Da die Funktion zur Beschreibung der amplifizierten Nukleinsäuremenge eine Exponentialfunktion mit der Basis 2 ist (Verdoppelung der Menge in jedem Zyklus), findet zur Umrechnung in relative Mengenangaben folgende Formel Verwendung:

$$relative\ Expression = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{1}{2^{\Delta\Delta Ct}}$$

### 2.2.8 ANALYSE DER IL-6-KONZENTRATION IM ZELLKULTURÜBERSTAND

Um die Sekretion von Interleukin-6 (IL-6) beurteilen zu können, wurde die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand unter Verwendung eines kommerziellen IL-6 ELISA Kits (*engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) bestimmt.

#### VERSUCHSBEDINGUNGEN

Primärzellen sowie immortalisierte PSZ wurden für 24 h bis 48 h mit Standardmedium in 12- bzw. 24-*well*-Mikrotiterplatten anwachsen gelassen. Anschließend erfolgte bei beiden Zelltypen die Zugabe von Verteporfin mittels Mediumwechsel bzw. bei den immortalisierten PSZ in zusätzlichen Versuchen die transiente Transfektion mit siRNA gegen YAP.
Nach 48 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 18 626 g zentrifugiert. Der neue Überstand wurde in separate 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### VERSUCHSABLAUF

Unmittelbar vor Verwendung wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur äquilibriert. Die *wells* der Mikrotiterplatte des ELISA Kits wurden mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit je 50 µl *Assay Buffer A* befüllt. Dazu wurden jeweils weitere 50 µl einer seriell verdünnten IL-6 Standardlösung bzw. der Probe pipettiert. Während der 2-stündigen Inkubation bei 200 rpm auf dem Schüttler wurde das in den Proben vorhandene IL-6 von dem auf der Mikrotiterplatte fixierten, polyklonalen *capture*-Antikörper gebunden. Nach weiteren Waschschritten wurden 100 µl des gelösten Nachweisantikörpers in jedes *well* gegeben und die Platte für 1 h schüttelnd inkubiert. Bei dem Nachweisantikörper handelt es sich um einen biotinylierten, polyklonalen anti-Ratten-IL-6-Antikörper. Da das IL-6 so zwischen zwei Antikörpern gebunden wird, spricht man bei dieser Methode auch von einem *Sandwich*-ELISA. Es folgten Waschschritte und schließlich die Zugabe von 100 µl Avidin-HRP A Lösung pro *well* für 30 min. Die Meerrettichperoxidase (*engl. horseradish peroxidase,* HRP) bindet über das Avidin an den Biotinrest des Nachweisantikörpers. Nach gründlichem Waschen wurde 100 µl Substratlösung zugesetzt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Hierbei wurde das Substrat durch die katalytische Aktivität der Peroxidase in einen farbigen Metaboliten umgewandelt. Dadurch resultierte ein zur ursprünglichen IL-6 Konzentration proportionaler blauer Farbumschlag. Durch Zugabe von 100 µl Stopplösung pro *well* kam es zur Gelbfärbung und die Extinktion konnte bei 450 nm photometrisch bestimmt werden. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der online Software *elisaanalysis.com*.

### 2.2.9 PROTEINANALYTIK

#### VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Effekte des Verteporfins wurden an aktivierten primären PSZ untersucht. Dafür wurden die Zellen bis zum Erreichen einer ca. 30 - 40%igen Konfluenz (typischerweise am 1. Tag nach Einsaat) auf 24-*well*-Platten in Standardmedium anwachsen gelassen. Die Behandlung mit Verteporfin erfolgte durch einen Mediumwechsel mit anschließender Inkubation über 48 h.

Versuche mit siRNA wurden sowohl an immortalisierten PSZ als auch an aktivierten primären PSZ durchgeführt. Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt. Der erste ähnelte dem zuvor mit Verteporfin beschriebenen Ansatz. Hier wurden die Zellen bis zum Erreichen einer ca. 30 - 40%igen Konfluenz in Standardmedium auf 24-*well*-Platten anwachsen gelassen, die Zellen transient mit siRNA transfiziert und der Versuch nach 48 h Inkubationszeit abgestoppt. Im zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen auf je 4 unterschiedlichen 24-*well*-Platten anwachsen gelassen. Die Zellen der verschiedenen Platten wurden gleichzeitig stimuliert, die Versuche jedoch nach unterschiedlichen Inkubationszeiten beendet, sodass eine Zeitreihe entstand. Dabei wurde der Versuch auf der ersten Platte schon nach 24 h gestoppt. Die weiteren Platten wurden nach 48 h, 72 h und 96 h abgestoppt.

#### PROBENGEWINNUNG

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand vollständig entfernt und 75 µl des auf 95 °C erhitzten Probenpuffers (Zusammensetzung in Tabelle 15) in jedes *well* gegeben. Bei dem darin enthaltenen SDS handelt es sich um ein anionisches Tensid, welches über hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine bindet und diese durch Zerstörung von nichtkovalenten Bindungen denaturiert. Das ebenfalls enthaltene β-Mercaptoethanol trägt durch Reduktion von Disulfidbrücken zum Denaturierungsprozess bei. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Puffers entstand eine visköse Suspension von lysierten Zellen, welche in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurde. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Zelllyse zu vervollständigen, Proteasen zu inaktivieren, Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und so die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zu zerstören. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert und schließlich bei - 20 °C gelagert.

**SDS-PAGE**

Zur semiquantitativen Analyse der verschiedenen Proteine erfolgte zunächst deren räumliche Separation. Hierfür fand die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,* SDS-PAGE) [189] Anwendung. Das Verfahren beruht auf den Eigenschaften des Anions SDS, Proteine zu linearisieren und deren Eigenladung zu überdecken, sodass diese eine relativ konstante negative Ladungsverteilung besitzen. Dies führt dazu, dass die Proteine im Polyacrylamidgel zur Anode wandern und unabhängig von ihrer nun vernachlässigbaren Eigenladung entsprechend ihrer molaren Masse aufgetrennt werden.

Ein Vorteil der diskontinuierlichen gegenüber der kontinuierlichen Gelelektrophorese ist die Fokussierung der Proben, welche durch die Verwendung eines Sammel- und eines Trenngels erreicht wird. Zunächst erfolgte das Ansetzen des feinporigen 8%igen Trenngels (Zusammensetzung siehe Tabelle 25) in einem 15 ml Reaktionsgefäß. Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator wurden dabei als letztes hinzugegeben. Das flüssige Trenngel wurde in eine Minigel-Kammer gegossen. Zur Entfernung von Blasen an der oberen Gelkante und zum Schutz vor Luftsauerstoff als Radikalfänger wurde das Gel während der Aushärtung mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach ca. dreißigminütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt und das frisch angesetzte Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 25) ebenfalls in die Gelkammer gegossen. Ein Probenkamm, welcher die späteren Probentaschen im Sammelgel formt, wurde in das noch flüssige Gel gesteckt und dichtete dieses während der ca. fünfzehnminütigen Polymerisation luftdicht ab. Nach vorsichtigem Entfernen des Kammes wurden die Minigele samt umhüllender Glasplatten in eine Elektrophoresekammer gespannt und mit Elektrophoresepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 15) bedeckt. Anschließend wurden je 10 µl Probenvolumen in die jeweilige Tasche pipettiert. Auf jedem Gel wurde außerdem eine der Taschen mit 2,5 µl *Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder* als Komigrationsstandard befüllt. Die folgende Elektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 200 V statt.

Tabelle 25: **Zusammensetzung der Minigele für die SDS-PAGE**

| | **Trenngel (8 %)** | **Sammelgel** |
|---|---|---|
| $H_2O$ | 3,35 ml | 950 µl |
| Trenn- bzw. Sammelgelpuffer | 1,55 ml | 400 µl |
| Acrylamidstocklösung 40 % (v/v) | 1,25 ml | 187,5 µl |
| APS 10 % | 33 µl | 10 µl |
| TEMED | 10 µl | 3 µl |

Zu Beginn der Elektrophorese kommt es an der Grenze des grobporigen Sammelgels zum feinporigeren Trenngel zum Stapelungseffekt der Proben. Dies beruht u. a. auf den unterschiedlichen pH-Werten von Trenn- und Sammelgel. Dadurch überholen die im Sammelgel hinter den Proteinen laufenden Glycinationen diese an der Grenze zum basischeren Trenngel (aufgrund ihrer nun negativeren Ladung) und führen zur Konzentration der Proteine.

#### PROTEINTRANSFER (TANK-BLOT)

Um die Proteinbanden untersuchen zu können, wurden diese per *Western Blot* aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Zunächst wurde die Membran zur Minderung der Hydrophobie für 2 sec in Methanol äquilibriert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und in Transferpuffer eingeweicht. Der Blot wurde schließlich als *Sandwich* (siehe Tabelle 26) aufgebaut und in das *Blotting*-Modul des mit Transferpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 15) gefüllten *Blotting*-Tankes gesteckt. Dabei befand sich die PVDF-Membran in Relation zum Gel anodenseitig, sodass die Proteine nach Anlegen eines konstanten, senkrecht zur vorherigen Elektrophorese-Laufrichtung gerichteten Stromflusses mit einer Stärke von 100 mA über Nacht durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen an der Membran fixiert wurden. Beim verwendeten *Tank-Blot*-System erfolgte dies in einer feuchten Umgebung bei 4 °C unter kontinuierlicher Durchmischung auf einer Magnetrührplatte.

Tabelle 26: **Aufbau des *Blotting-Sandwiches* für den *Tank-Blot***

| Reihenfolge | Bestandteil | Anmerkung |
|---|---|---|
| 1 | Kathodenseite der *Blotting*-Kassette | |
| 2 | Schwamm | in gekühltem Transferpuffer eingeweicht |
| 3 | Pappe | in gekühltem Transferpuffer eingeweicht |
| 4 | Polyacrylamidgel | gegenüber der Membran um 180 ° gedreht |
| 5 | PVDF-Membran | |
| 6 | Pappe | in gekühltem Transferpuffer eingeweicht |
| 7 | Schwamm | in gekühltem Transferpuffer eingeweicht |
| 8 | Anodenseite der *Blotting*-Kassette | |

**IMMUNDETEKTION**

Die Proteinbanden wurden im letzten Schritt durch die Immunmarkierung quantifizierbar gemacht. Dafür wurden die PVDF-Membranen aus dem *Blotting*-System entfernt und in eine lichtundurchlässige Plastikschachtel überführt. Als erstes erfolgte ein kurzer Waschschritt mit PBS (pH 7,4), bevor die Membran für 1 h mit *Odyssey Blocking Buffer* (1:5 mit PBS verdünnt) inkubiert wurde. Diese und folgende Inkubationsschritte fanden auf einem Horizontalschüttler statt. Danach wurde die Membran mit 5 ml eines in Blockpuffer (1:5 mit PBS verdünnt, mit 0,1 % Tween-20 versetzt) verdünnten Primärantikörpers (Verdünnung siehe Tabelle 27) bedeckt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgten vier fünfminütige Waschschritte mit PBS (pH 7,4) und 0,1 % Tween-20 bei Raumtemperatur, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 30 min mit einem Sekundärantikörper inkubiert (indirekte Methode der Immundetektion), welcher 1:5000 in Blockpuffer (1:5 mit PBS verdünnt) und 0,1 % Tween-20 verdünnt wurde. Bei den Sekundärantikörpern handelt es sich um Fluorochrom-markierte Antikörper, die gegen die Fc-Region der jeweiligen Primärantikörper aus Kaninchen oder Maus gerichtet sind. Nach weiteren vier Waschvorgängen wurde die Membran in PBS (pH 7,4) gelagert und mit dem *Odyssey Infrared Imaging System* entwickelt. Hierbei wurden die Farbstoffe der Sekundärantikörper mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt und deren Fluoreszenz gemessen. Die Anregung erfolgte für IRDye 680CW (rot) bei 700 nm und für IRDye 800CW (grün) bei 800 nm. Diese Vorgänge wurden für jeden neuen Primärantikörper ohne zwischenzeitiges *Strippen* wiederholt.

Tabelle 27: **Verdünnung der Primärantikörper für die Immundetektion**

| Antikörper | Verdünnung in Blockpuffer (1:5 mit PBS verdünnt) und Tween-20 |
|---|---|
| COL1A1 | 1:1000 |
| COL1A2 | 1:1000 |
| $\alpha$-SMA | 1:3000 |
| YAP1 | 1:1000 |
| GAPDH | 1:5000 |

Bei der anschließenden Auswertung mithilfe des zugehörigen Programmes *Image Studio Lite Version 5.2.5* und Microsoft Excel, wurden die Signale der Proteine von Interesse mit dem Signal des Haushaltsproteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in derselben Probe abgeglichen. Dadurch konnten Unterschiede in der Beladungsmenge der Probentaschen ausgeglichen werden. Durch Bezug der Werte auf die zugehörige Kontrollprobe waren semiquantitative Aussagen über den Proteingehalt der Proben möglich.

## 2.2.10 ANALYSE DER ZELLMORPHOLOGIE

### 2.2.10.1 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG VON α-SMA UND YAP

Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet zunächst ein spezifischer Primärantikörper an das zu untersuchende Protein. Nach Zugabe eines gegen den Primärantikörper gerichteten, fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers kann die Zielstruktur durch Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

#### VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Versuche mit Verteporfin wurden an vollständig aktivierten und frühen aktivierten Primärzellen durchgeführt. Dafür wurde 1/3 eines Aliquots der aus jeweils einer Lewis-Ratte isolierten und anschließend weggefrorenen Primärzellen (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetaut und ein Teil der Zellen in einer 24-*well*-Platte mit eingelegten Deckgläsern eingesät. Diese primär kultivierten und nicht passagierten frühen aktivierten Primärzellen wurden am nächsten Tag durch einen Mediumwechsel mit Verteporfin versetzt und anschließend für 3 bzw. 6 Tage inkubiert. Der andere Teil der aufgetauten Zellen wurde auf 4 *wells* einer 6-*well*-Platte verteilt und 6 bis 7 Tage anwachsen gelassen (mit Mediumwechsel nach 2 Tagen). Danach erfolgte die Einsaat dieser nun vollständig aktivierten Primärzellen in eine 24-*well*-Platte mit eingelegten Deckgläsern und am folgenden Tag die 48-stündige Behandlung mit Verteporfin mittels Mediumwechsel. Die α-SMA-Immunfluoreszenzfärbung wurde ebenfalls nach dem o. g. Schema an frühen aktivierten Primärzellen durchgeführt, die transient mit siRNA gegen YAP transfiziert wurden.

#### VERSUCHSABLAUF

Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Zellen einmal kurz mit 400 µl PBS (pH 7,4) gespült und anschließend für 10 min in eiskaltem Methanol mit DAPI (0,25 µg/ml) fixiert und gefärbt. Es folgten zwei zehnminütige Waschschritte mit je 400 µl PBS (pH 7,4) und daraufhin das Blocken mit 400 µl bovinem Serumalbumin (BSA, 1% m/v gelöst in PBS, pH 7,4) für 30 min. Der Primärantikörper gegen α-SMA bzw. YAP (siehe Tabelle 17) wurde 1:100 in 1 % BSA verdünnt und auf Paraffinfolie für 30 min mit den fixierten Zellen inkubiert. Ein bewachsenes Deckglas pro Färbung wurde dabei nicht mit dem Primärantikörper inkubiert, um später als Negativkontrolle zu dienen. Nach zwei weiteren zehnminütigen Waschschritten mit PBS (pH 7,4) wurde der mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 488 markierte Sekundärantikörper 1:300 in 1 % BSA verdünnt und auf Paraffinfolie für 30 min mit den bewachsenen Deckgläsern inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern folgten nochmals zwei zehnminütige Waschschritte mit PBS (pH 7,4). Die Deckgläser wurden mit

einem Fluoreszenz-Einbettmedium auf Objektträgern fixiert und anschließend lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Am Fluoreszenzmikroskop wurden Aufnahmen der Präparate erstellt und anschließend verblindet. Die Bewertung der Bilder erfolgte anhand eines standardisierten Schemas durch zwei voneinander unabhängige Begutachter (siehe Tabelle 28 und Abbildung 2.3).

Tabelle 28: **Bewertungsschema für die Auswertung der α-SMA-Immunfluoreszenzfärbung**

| Score | Grad der α-SMA-Expression |
|---|---|
| 0 | keine |
| 1 | gering, blass und diffus |
| 2 | mäßig |
| 3 | stark und homogen |

### 2.2.10.2 FÄRBUNG DER INTRAZELLULÄREN TRIGLYCERIDE MIT ÖLROT O

Die triglyceridhaltigen intrazellulären Lipidtröpfchen lassen sich durch den fettlöslichen Bisazofarbstoff Ölrot O anfärben. Aufgrund seiner Absorptionsmaxima bei 518 nm und 359 nm kann die Auswertung der Färbung per Phasenkontrastmikroskopie erfolgen. Die Ölrot-Färbung an mit Verteporfin behandelten frühen aktivierten und vollständig aktivierten Primärzellen wurde unter den in Kapitel 2.2.10.1 beschriebenen Versuchsbedingungen durchgeführt.

#### VERSUCHSABLAUF

Nach abgeschlossener Inkubation der Zellen mit Verteporfin wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (pH 7,4) gespült. Die anschließende Fixierung erfolgte mit Paraformaldehyd (2,5 % m/v gelöst in PBS, pH 7,4) für 30 min unter leichtem Schütteln. Nach 5 Waschschritten mit PBS (pH 7,4) für 5 min wurden die Zellen 15 min lang mit zuvor 3:2 in *Aqua dest.* verdünnter und filtrierter Ölrot O-Stammlösung (1 % m/v gelöst in Isopropanol) gefärbt. Es folgten 5 weitere fünfminütige Waschschritte mit *Aqua dest.*, an die sich die Gegenfärbung mit Hämalaun anschloss. Die Hämalaun-Lösung wurde dabei für 5 sec einwirken gelassen und anschließend für 10 min durch lauwarmes Leitungswasser ersetzt. Die Menge der eingesetzten Reagenzien für ein *well* betrug 400 µl pro Arbeitsschritt. Zum Abschluss wurden die Deckgläser mit Einbettmedium auf einem Objektträger fixiert und über Nacht bei 4 °C trocknen gelassen. Die Bewertung der am Mikroskop erstellten und anschließend verblindeten Bilder erfolgte durch zwei voneinander unabhängige Begutachter nach einem festgelegten Schema (siehe Tabelle 29 und Abbildung 2.4).

Tabelle 29: **Bewertungsschema für die Auswertung der Ölrot-Färbung**

| Score | Ausprägung der gefärbten Lipidtröpfchen |
|---|---|
| 0 | keine Lipidtröpfchen |
| 1 | viele kleine Lipidtröpfchen in den meisten Zellen |
| 2 | Ansammlungen größerer Lipidtröpfchen in einigen Zellen, zusätzlich mehr kleine Lipidtröpfchen als bei Wert 1,0 |
| 3 | Ansammlungen größerer Lipidtröpfchen in den meisten Zellen |

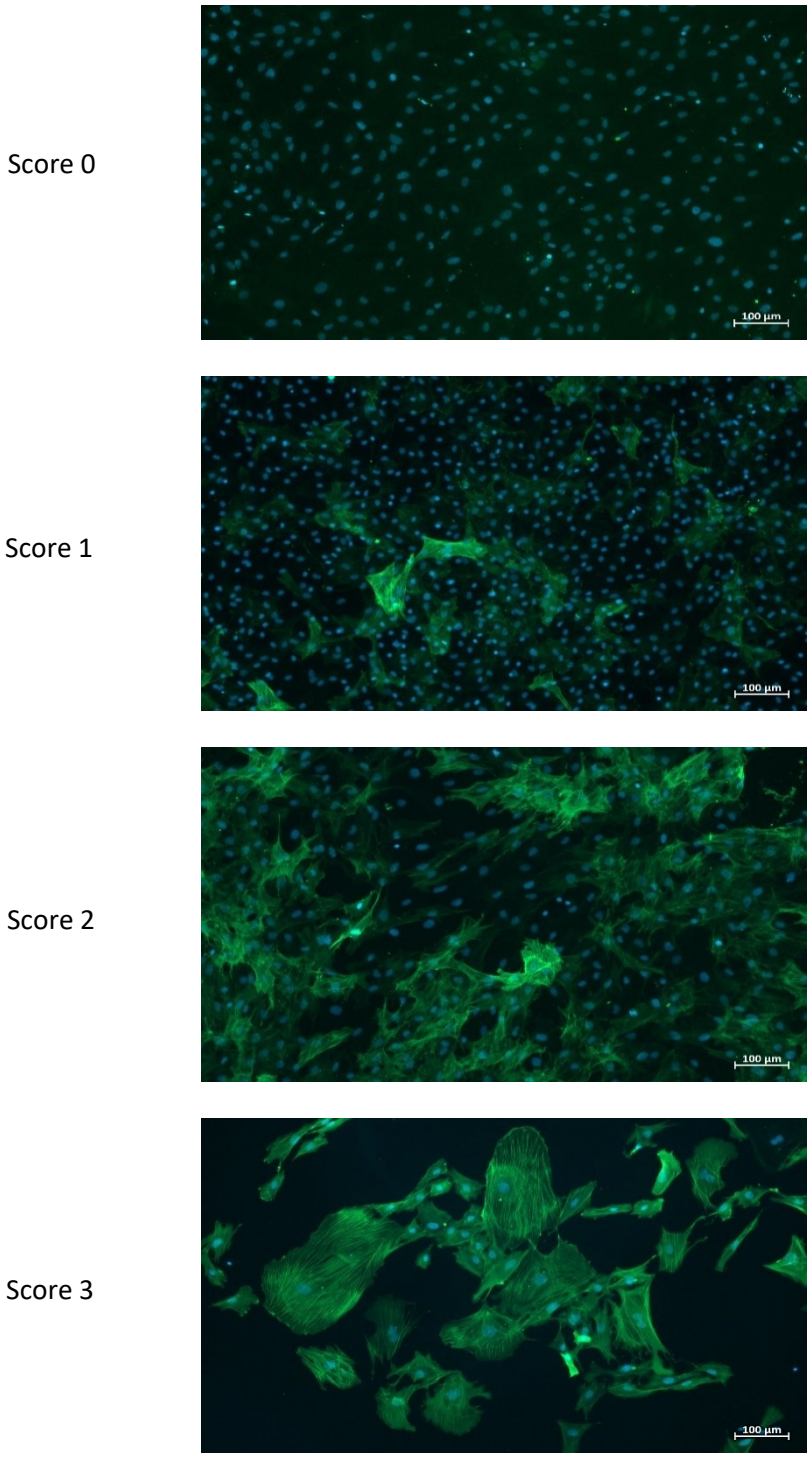



Abbildung 2.3: **Exemplarische Zuordnung der Scores des Bewertungsschemas zu α-SMA-Immunfluoreszenzaufnahmen**

Zytoskelettales α-SMA primärer PSZ wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung visualisiert und die verblindeten Fluoreszenzaufnahmen durch zwei unabhängige Untersucher anhand eines standardisierten Bewertungsschemas (siehe Tabelle 28) evaluiert. Dabei wurden Werte von 0 (keine α-SMA-Expression) bis 3 (starke und homogene α-SMA-Expression) vergeben. Bei einer zwischen zwei Scores liegenden Ausprägung der α-SMA-Färbung wurde der Mittelwert beider Scores vergeben. Dargestellt sind exemplarische Bilder, welche von beiden Untersuchern mit dem jeweils angegebenen Score bewertet wurden.

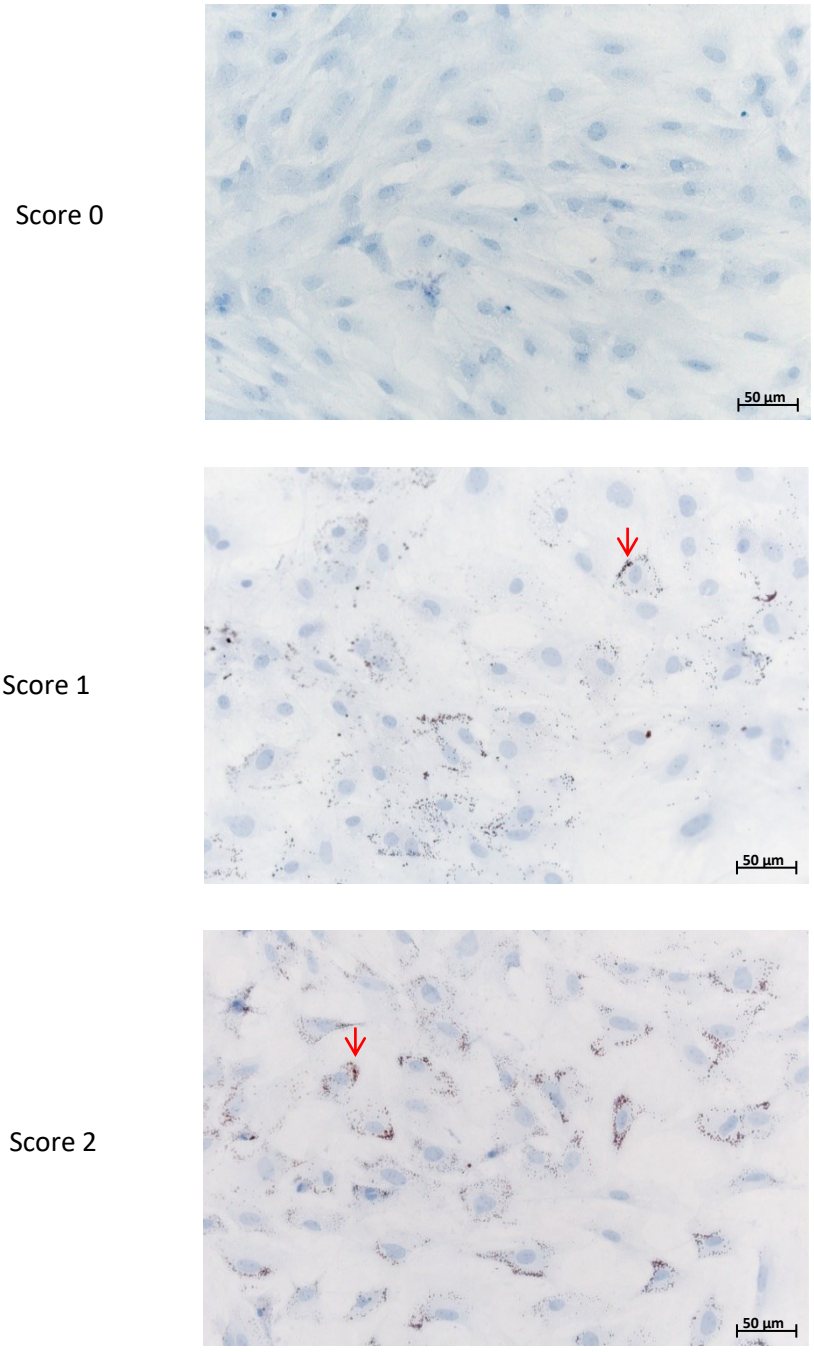



Abbildung 2.4: **Exemplarische Zuordnung der Scores des Bewertungsschemas zur Ölrot-Färbung**

Intrazelluläre Lipidtröpfchen primärer PSZ wurden mit dem Farbstoff Ölrot O gefärbt und anschließend Bilder am Phasenkontrastmikroskop erstellt. Die Evaluation der verblindeten Aufnahmen erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher anhand eines standardisierten Bewertungsschemas (siehe Tabelle 29). Dabei konnten Werte von 0 (keine Lipidtröpfchen) bis 3 (Ansammlungen größerer Lipidtröpfchen in den meisten Zellen) vergeben werden, wobei der höchste tatsächlich vergebene Wert bei 2 lag. Bei einer zwischen zwei Scores liegenden Ausprägung der intrazellulären Lipidtröpfchen wurde der Mittelwert beider Scores vergeben. Dargestellt sind exemplarische Bilder, welche von beiden Untersuchern mit dem jeweils angegebenen Score bewertet wurden. Die roten Pfeile markieren beispielhaft gefärbte intrazelluläre Lipidtröpfchen.

### 2.2.11 SCRATCH ASSAY ZUR ANALYSE DER ZELLMIGRATION

Einen einfachen Ansatz zum Messen der Migration von Zellfronten adhärenter Zellen *in vitro* stellt der zweidimensionale Migrationsassay (auch *scratch* oder *wound healing assay* genannt) dar [190]. Hierbei wird zunächst ein Defekt in einen konfluenten Zell-*Monolayer* gesetzt und anschließend dessen Zuwachsen im zeitlichen Verlauf ausgewertet.

#### VERSUCHSBEDINGUNGEN

Immortalisierte PSZ bzw. vollständig aktivierte Primärzellen wurden in einer Dichte von 4 x $10^4$ Zellen pro *well* in 24-*well*-Mikrotiterplatten eingesät. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen geachtet, um einen möglichst homogenen Zellrasen zu bilden. Nach 48-stündigem Anwachsen im jeweiligen Standardmedium lag das Konfluenzniveau bei 80 - 90 %.

#### VERSUCHSABLAUF

Das Setzen eines mechanischen Defektes erfolgte, indem eine 1000 µl Pipettenspitze mit konstantem Druck mittig am Boden des *wells* entlanggeführt wurde. Um einen möglichst vergleichbaren und konstanten Durchmesser des Defektes sicherzustellen, wurde auf eine orthogonale Ausrichtung der Pipettenspitze geachtet. Das Entfernen abgelöster Zellen und Zelltrümmer erfolgte durch zweimaliges Spülen mit Standardmedium. Daraufhin wurden die Zellen durch einen weiteren Mediumwechsel mit Verteporfin (100 nmol/l) bzw. DMSO (0,001% v/v) versetzt. Die Zellkulturplatten wurden am Axio Observer Mikroskop der Carl Zeiss AG bei auf 37 °C vorgewärmtem Heiztisch und Begasung mit feuchtigkeitsgesättigtem Carbogen inkubiert. Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Setzen des Defektes ($t1$ = 0 h, $t2$ = 12 h, $t3$ = 24 h) Aufnahmen von definierten Bereichen der *wells* angefertigt.

#### AUSWERTUNG

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte unter Verwendung der Zen 2 *(blue edition)* Software der Carl Zeiss AG. Für die Analyse der Defektbreite wurde diese zum Zeitpunkt $t1$ = 0 h und zu einem weiteren Zeitpunkt ($t2$ = 12 h oder $t3$ = 24 h), welcher in Abhängigkeit von der Morphologie des Defektes gewählt wurde, bestimmt. Zunächst wurde der Verlauf der Zellfront einer Seite vom Untersucher durch Anlegen einer Gerade optisch gemittelt. Anschließend wurde eine dazu parallel verlaufende Gerade durch die Zellfront der Gegenseite gelegt, sodass der Abstand zwischen den zwei Geraden als Defektbreite ermittelt werden konnte (siehe Abbildung 2.5).

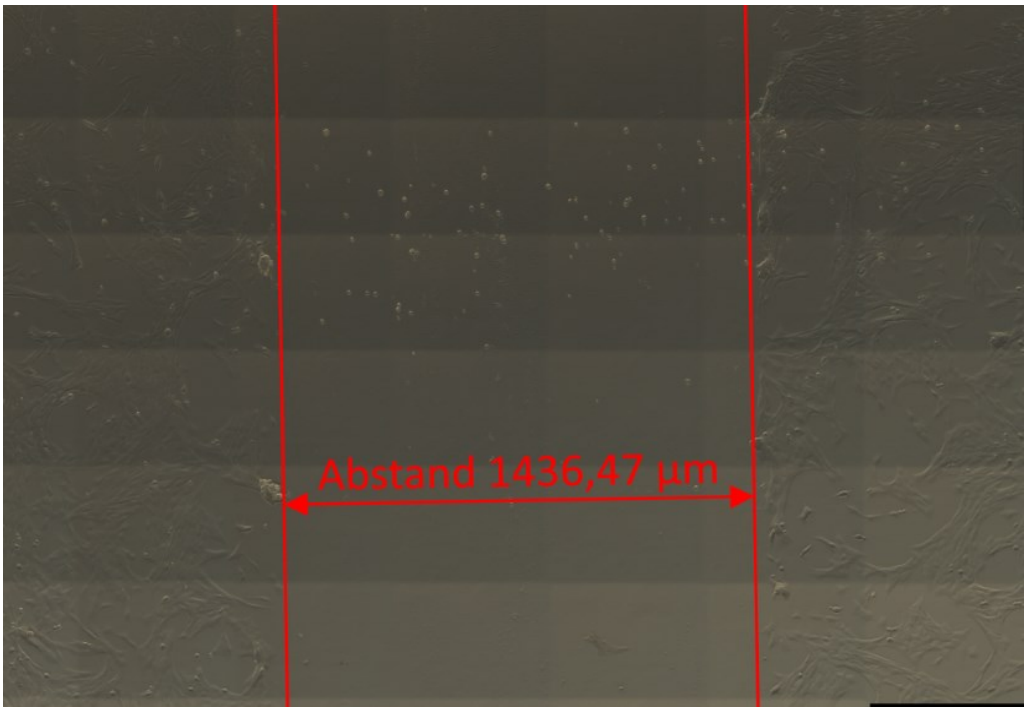



Abbildung 2.5: **Messung der Defektbreite im Rahmen des Migrationsassays**
In einem gleichmäßig angewachsenen Rasen aus immortalisierten PSZ wurde mit einer 1000 µl Pipettenspitze ein mechanischer Defekt gesetzt. Die Defektbreite wurde mithilfe der Software Zen 2 *(blue edition)* der Carl Zeiss AG ermittelt, indem vom Untersucher zwei parallele Geraden entlang der Zellfronten angelegt und der Abstand dazwischen gemessen wurde.

Die Migrationsrate $R_M$ ließ sich nach folgender Formel berechnen [191]:

$$R_M = \frac{A_{t1} - A_{t2/3}}{\Delta t}$$

Dabei gilt:

$A_{t1}$ = Abstand der Zellfronten zum Zeitpunkt $t1$

$A_{t2/3}$ = Abstand der Zellfronten zum Zeitpunkt $t2$ bzw. $t3$

$\Delta t$ = Zeitspanne zwischen $t1$ und $t2$ bzw. $t3$ ($t2 - t1\ bzw. t3 - t1$)

Der errechnete Wert entspricht der Verschlussrate des Defektes in µm/h. Die Migrationsrate einer Zellfront entspricht der Hälfte der Verschlussrate, da in diese die Bewegung der Zellfronten von beiden Seiten einfließt. Der errechnete Wert ist jedoch kein Maß für die Zellmigration allein, da auch das Überwachsen der Lücke durch Zellproliferation eine Rolle spielt.

### 2.2.12 STATISTISCHE ANALYSE

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der Software *IBM SPSS Statistics Version 27.0*. Zunächst wurden die Daten mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests auf potenzielle Gruppenunterschiede überprüft. Bei $p < 0,05$ wurde im Anschluss der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Im letzten Schritt wurden die errechneten p-Werte nach Bonferroni für multiples Testen korrigiert. Als statistisch signifikant wurden Gruppenunterschiede ab einem korrigierten p-Wert $\leq 0,05$ gewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*, SEM) angegeben. Aufgrund eines Ausreißer-Messwertes wurde im Rahmen der statistischen Auswertung des IL-6-ELISAs bei immortalisierten PSZ auf die Betrachtung des Medians als Lagemaß zurückgegriffen. Das verwendete Streuungsmaß war dementsprechend der Standardfehlers des Medians (SFM).

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON YAP UND TAZ IN GEWEBESCHNITTEN DES PANKREAS

Um die Menge und Lokalisation von YAP und TAZ im Pankreas beurteilen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen unter Verwendung des *ImmPRESS-AP Detection Systems* von Vector Laboratories durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1). Hierfür wurden die Pankreata von gesunden und an Pankreatitis erkrankten Ratten bzw. Mäusen gefärbt und durch zwei Untersucher lichtmikroskopisch bewertet.

### 3.1.1 AKUTE ÖDEMATÖSE PANKREATITIS DURCH CAERULEIN

Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung. Dabei konnte keine spezifische Anfärbung von YAP im Pankreas nachgewiesen werden. Jedoch stellten sich einzelne Zellen im lymphatischen Gewebe YAP-positiv dar. Zwischen den Organen kranker und gesunder Tiere wurde kein Unterschied beobachtet. Bei Verwendung des anti-TAZ-Antikörpers konnte hingegen eine diffuse Färbung der Azini nachgewiesen werden. Zudem kam es zu einer starken Anfärbung im Bereich der Langerhans-Inseln. Auch hier konnte insgesamt kein Unterschied zwischen den Organen gesunder und kranker Mäuse festgestellt werden. Daher wurde die Färbung auf 4 Tiere pro Gruppe beschränkt.

### 3.1.2 CHRONISCHE PANKREATITIS DURCH DBTC

In den Pankreata gesunder Tiere konnte kein YAP nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.2). Die an Tag 7 nach DBTC-Injektion gewonnenen Organe zeigten eine YAP-Färbung im periduktalen Gewebe und im Bereich von azino-duktalen Metaplasien. An Tag 28 imponierte die Färbung im periduktalen Gewebe in stärkerer Intensität. TAZ konnte bereits diffus in den Azini gesunder Ratten nachgewiesen werden. In den Präparaten der erkrankten Tiere an Tag 7 zeigten sich zusätzlich zu den Azini auch azino-duktale Metaplasien und in schwächerem Ausmaß interstitiell fibrotisches Bindegewebe gefärbt. An Tag 28 nach Behandlung mit DBTC kam es zusätzlich zur diffusen Färbung der Azini und azino-duktalen Metaplasien zu einer periduktal lokalisierten Anfärbung.

### 3.1.3 AUTOIMMUNE PANKREATITIS

Wie in Abbildung 3.3 zu sehen, konnte YAP vor allem im periduktalen Bereich angefärbt werden. Gesunde und geschädigte Organe unterschieden sich dabei nicht. Die TAZ-Färbung

zeigte ein diffuses azinäres Muster. Auch hier konnten keine Differenzen zwischen den Gruppen festgestellt werden.

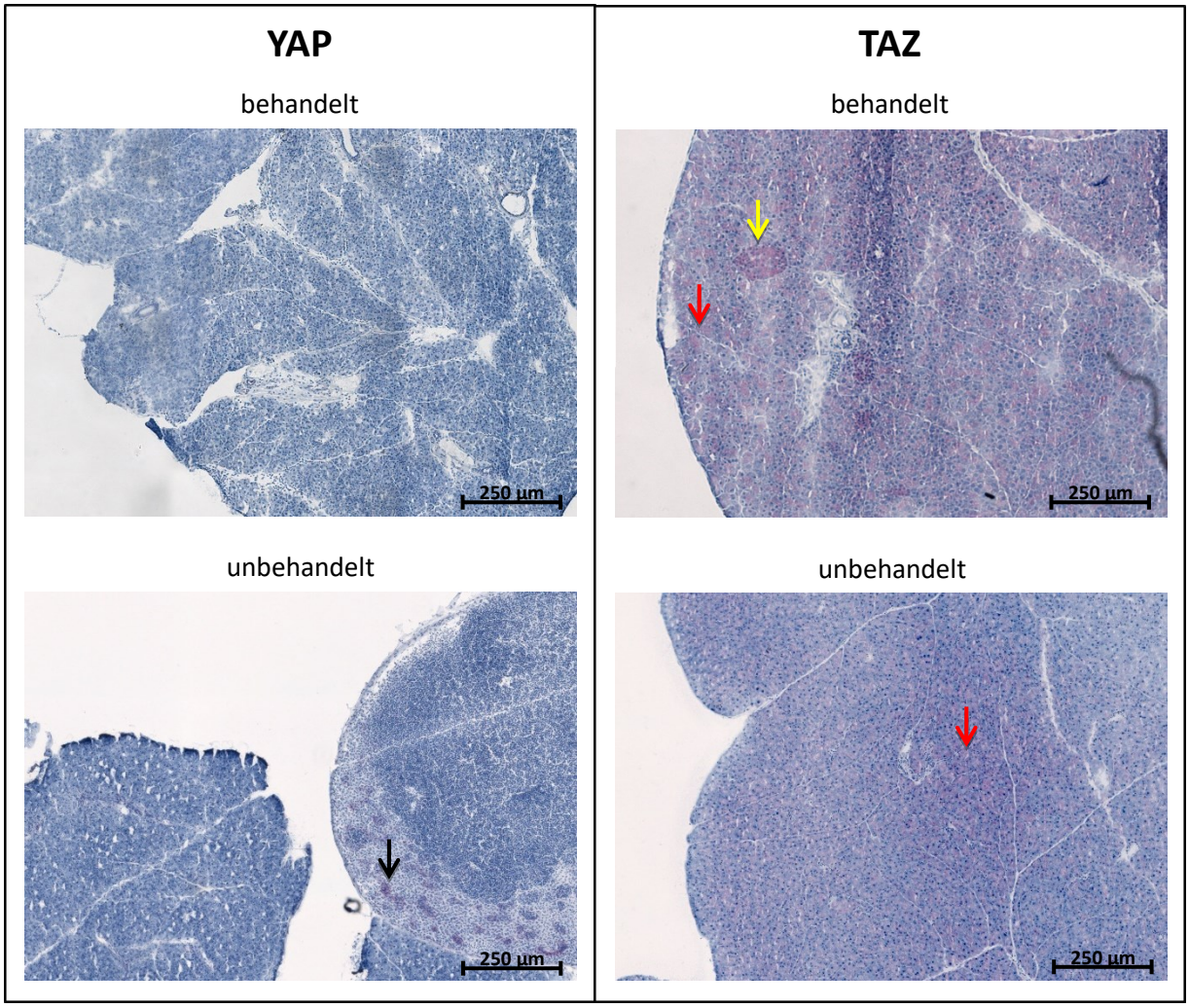



Abbildung 3.1: **Immunhistochemische Färbung von YAP und TAZ in pankreatischen Gewebeschnitten gesunder und an akuter Pankreatitis erkrankter Mäuse**

Zur Induktion einer akuten Pankreatitis wurden C57BL/6 Mäuse mit sieben intraperitonealen Caerulein-Injektionen (50 µg/kg KG) im Abstand von je 1 h behandelt und 24 h später euthanasiert. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die entnommenen Organe wurden in *Tissue-Tek* eingebettet und schockgefroren, bevor Gewebeschnitte am Gefriermikrotom angefertigt wurden. Daraufhin wurden YAP und TAZ unter Verwendung des *ImmPRESS-AP Detection Systems* von Vector Laboratories immunhistochemisch gefärbt. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung der Präparate durch zwei Untersucher. Die ausgewählten Bilder stehen exemplarisch für das Färbeverhalten der Präparate von 4 Tieren pro Gruppe. Pfeile markieren beispielhaft immunhistochemische Anfärbungen im Bereich der Azini (rot), der Langerhans-Inseln (gelb) und in lymphatischem Gewebe (schwarz).

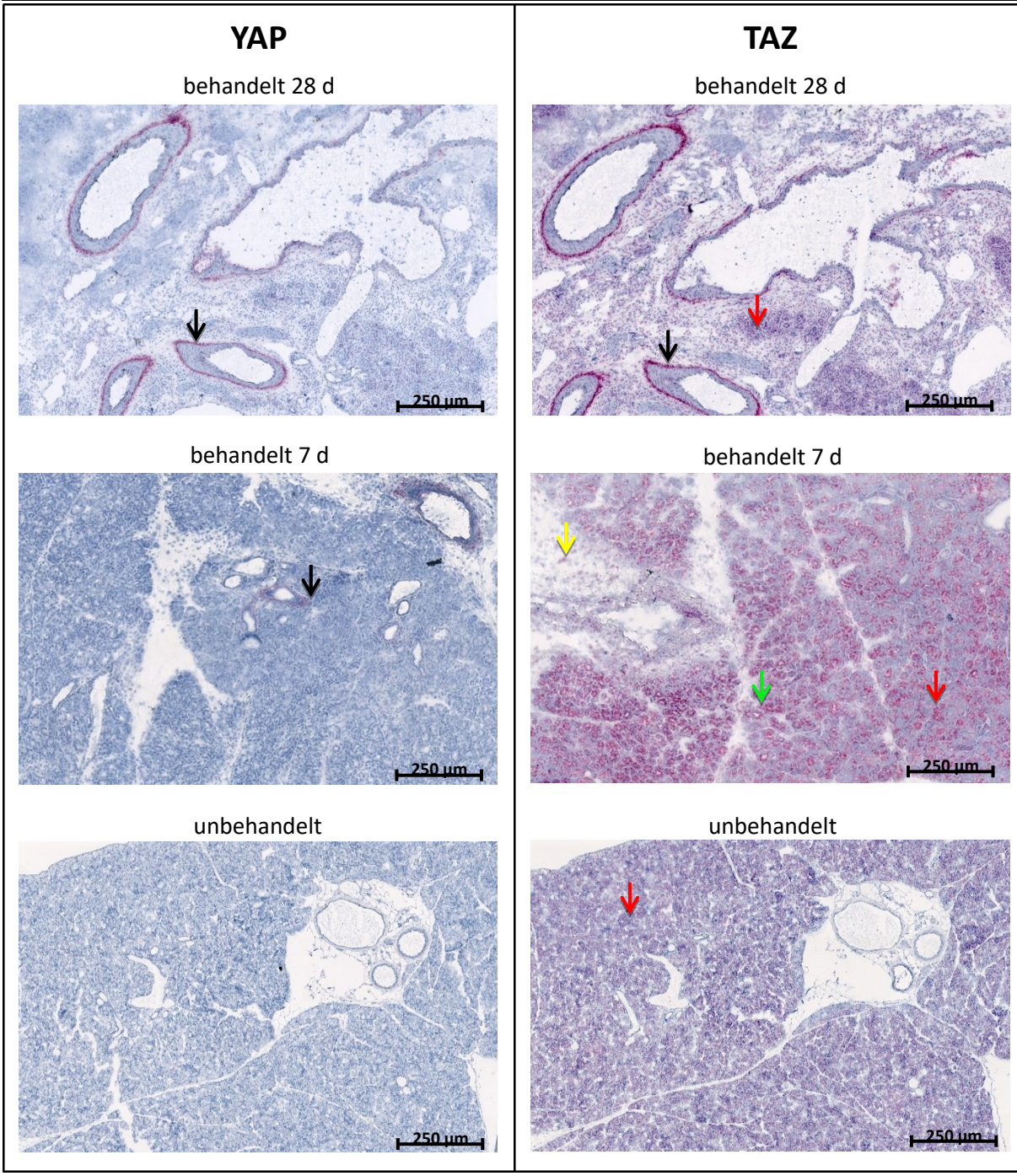



Abbildung 3.2: **Immunhistochemische Färbung von YAP und TAZ in pankreatischen Gewebeschnitten gesunder und an chronischer Pankreatitis erkrankter Ratten**

Zur Induktion einer chronischen Pankreatitis wurden Lewis-Ratten mit intravenösen DBTC-Injektionen (8 mg/kg KG) behandelt und 7 d bzw. 28 d später euthanasiert. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die entnommenen Organe wurden in *Tissue-Tek* eingebettet und schockgefroren, bevor Gewebeschnitte am Gefriermikrotom angefertigt wurden. Daraufhin wurden YAP und TAZ unter Verwendung des *ImmPRESS-AP Detection Systems* von Vector Laboratories immunhistochemisch gefärbt. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung der Präparate durch zwei Untersucher. Die ausgewählten Bilder stehen exemplarisch für das Färbeverhalten der Präparate von mindestens 6 Tieren pro Gruppe. Pfeile markieren beispielhaft immunhistochemische Anfärbungen im Bereich der Azini (rot), azino-duktalen Metaplasien (grün), des interstitiellen Bindegewebes (gelb) und periduktal (schwarz).

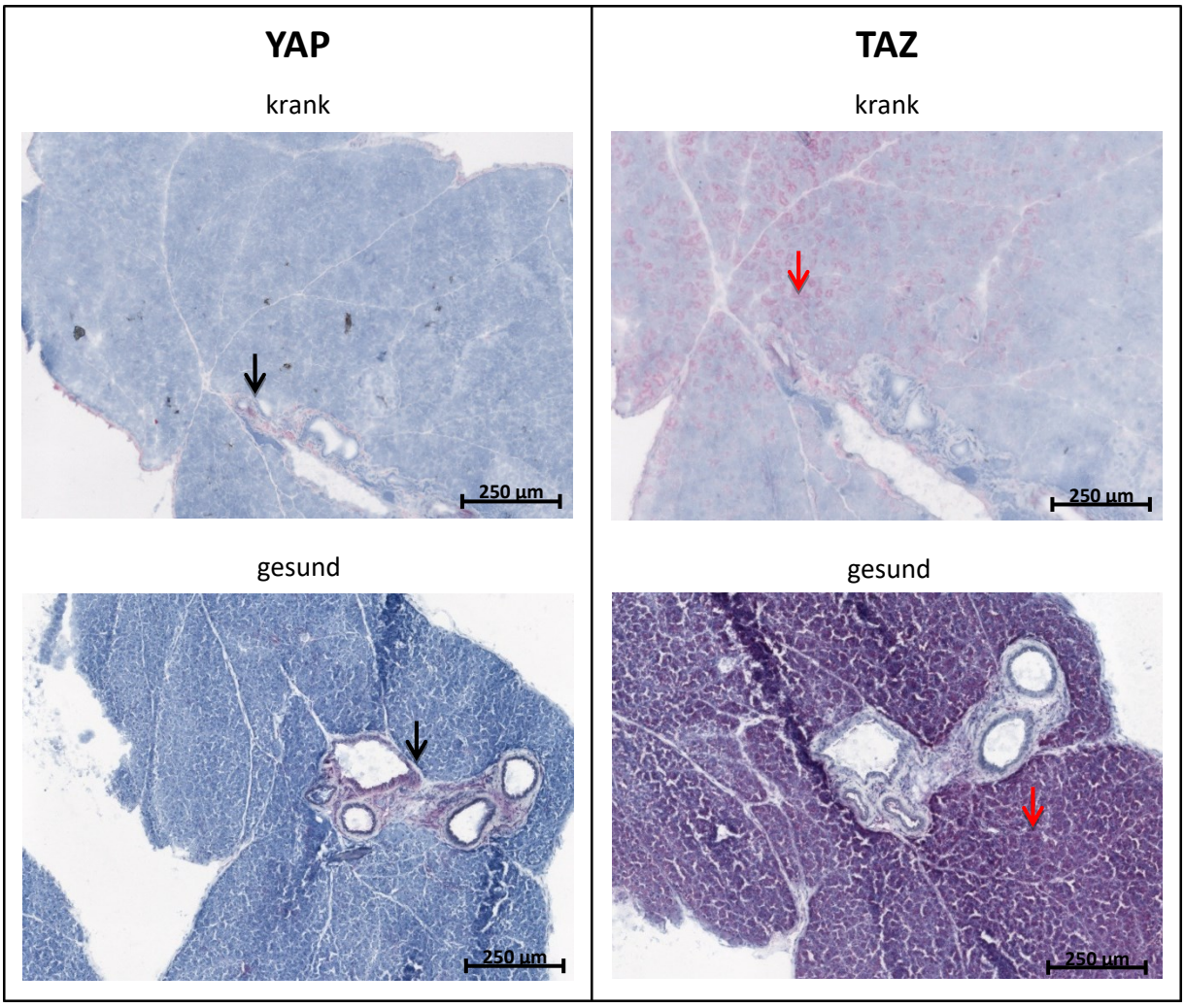



Abbildung 3.3: **Immunhistochemische Färbung von YAP und TAZ in pankreatischen Gewebeschnitten gesunder und an autoimmuner Pankreatitis erkrankter Mäuse**

Für die Untersuchung der autoimmunen Pankreatitis wurden weibliche MRL/MpJ-Mäuse mit einem Alter von mindestens 37 Wochen euthanasiert. Diese Tiere hatten einen AIP-Score ≥ 3 und galten damit als erkrankt. Als gesund galten 8 - 9 Wochen alte Tiere mit einem AIP-Score ≤ 1. Die entnommenen Organe wurden in *Tissue-Tek* eingebettet und schockgefroren, bevor Gewebeschnitte am Gefriermikrotom angefertigt wurden. Daraufhin wurden YAP und TAZ unter Verwendung des *ImmPRESS-AP Detection Systems* von Vector Laboratories immunhistochemisch gefärbt. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung der Präparate durch zwei Untersucher. Die ausgewählten Bilder stehen exemplarisch für das Färbeverhalten der Präparate von 6 Tieren pro Gruppe. Pfeile markieren beispielhaft immunhistochemische Anfärbungen im Bereich der Azini (rot) bzw. periduktal (schwarz).

## 3.2 ERGEBNISSE DES LUCIFERASE-REPORTERGENASSAYS

Um auf den Aktivierungszustand des Hippo-Signalwegs in PSZ schließen zu können, wurde die Aktivierung von TEAD4 durch intranukleäres YAP gemessen. Die Quantifizierung dieses Vorgangs erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben unter Einsatz des *Stimulight Hippo Pathway trans reporting systems* von Lifeome.

Die Versuche wurden zunächst an immortalisierten und in der Folge auch an einmal passagierten primären PSZ durchgeführt. Da die Messwerte bei Letzteren im Bereich von Leerwerten lagen, wurde hier auf eine Darstellung der entsprechenden Ergebnisse mit Primärzellen verzichtet. Untersucht wurden die Effekte möglicher Upstream-Regulatoren des Hippo-Signalwegs. Als extrazellulär wirkende Substanzen kamen die Zytokine TGF-β1 und IFN-γ zum Einsatz. Die Kontrollen waren dabei unbehandelte Zellen. Als mögliche intrazelluläre Regulatoren wurden die p38-MAP-Kinase Inhibitoren SB 203580 und SB 202190 sowie der MAP-Kinase-Kinase (MEK-1) Inhibitor PD 98059 untersucht. Als Kontrolle dienten hier mit 0,1 % (v/v) DMSO behandelte Zellen. SB 202474 diente als Negativkontrolle für die p38-MAP-Kinase Inhibitoren.

#### ERGEBNISSE MIT IMMORTALISIERTEN PSZ

Wie in Abbildung 3.4 A zu sehen, sorgte TGF-β1 für einen Anstieg der Aktivität der *Firefly*-Luciferase. Diese Wirkung nahm mit steigender Dosis zu und wurde ab 1 ng/ml statistisch signifikant. Die Luciferaseaktivität wurde durch 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml TGF-β1 auf mehr als das 1,5-fache der Kontrolle gesteigert. IFN-γ führte in Dosierungen von 1 - 100 ng/ml zu einer über 50%igen Reduktion der Luciferaseaktivität. Der Effekt war nicht konzentrationsabhängig und in allen getesteten Dosierungen signifikant.

Abbildung 3.4 B zeigt die Auswirkungen verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Luciferaseaktivität. Während der MEK-1 Inhibitor PD 98059 in einer Konzentration von 20 µmol/l für einen leichten Aktivitätsanstieg sorgte, führte eine Dosis von 100 µmol/l zu einer signifikanten Verminderung der Luciferaseaktivität. Bezogen auf die Kontrolle war die Aktivität um über 50 % reduziert. Die p38-MAP-Kinase Inhibitoren SB 203580 und SB 202190 waren in Konzentrationen von 5 µmol/l bzw. 20 µmol/l ebenfalls imstande, die Luciferaseaktivität signifikant zu verringern. SB 203580 in einer geringeren Konzentration sowie die Negativkontrolle SB 202474 zeigten dabei keine Effekte

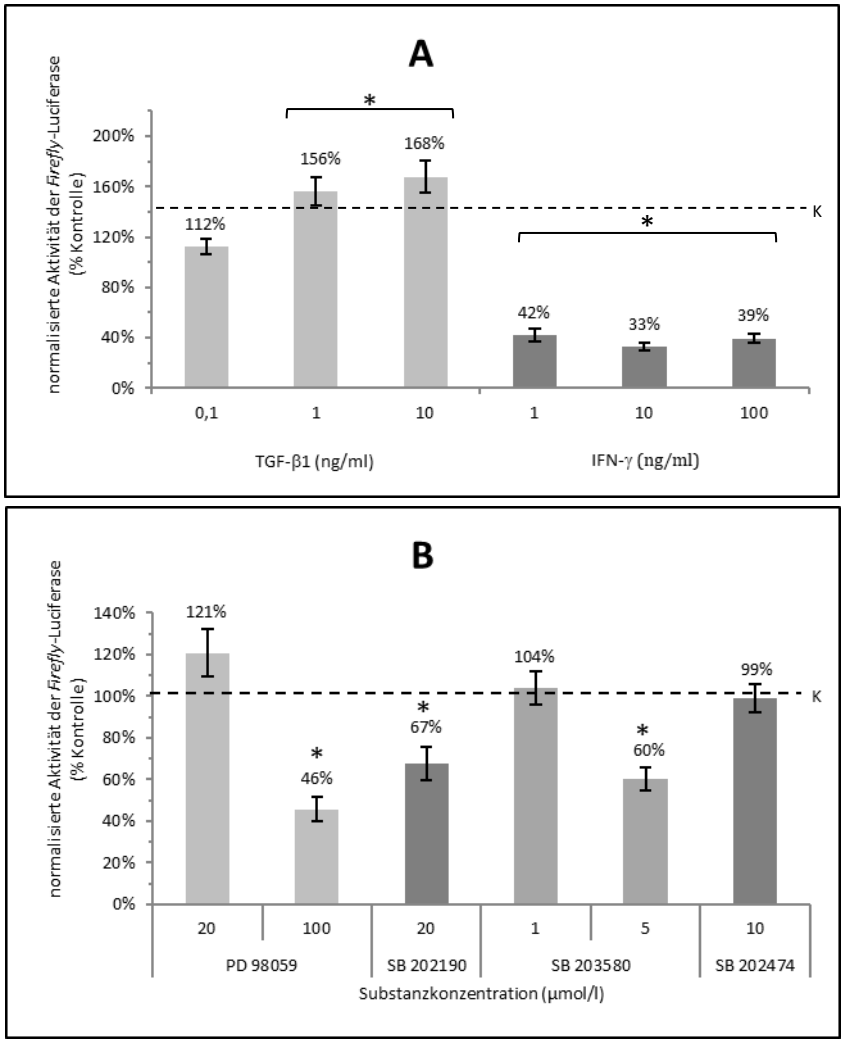



Abbildung 3.4: **Aktivität der *Firefly*-Luciferase immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Zytokinen bzw. Kinaseinhibitoren**

Immortalisierte PSZ wurden transient mit den Plasmiden pHTS-GAL4, pGAL4-TEAD4 und pGL 4.70 transfiziert und für 24 h mit Zytokinen (A) bzw. Kinaseinhibitoren (B) behandelt. Anschließend wurden die Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase unter Verwendung des *Dual-Luciferase Reporter Assays* von Promega luminometrisch bestimmt. Nach Bildung des Quotienten aus *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase erfolgte der Bezug auf die unbehandelte (A) bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte (B) Kontrolle (K = 100 %). Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von mindestens 11 Proben. *P < 0,01 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

## 3.3 EINFLUSS VON YAP-INHIBITOREN AUF DIE ZELLPROLIFERATION UND -VIABILITÄT

### 3.3.1 AUSWIRKUNGEN AUF DIE DNA-SYNTHESERATE

Um die Effekte einer YAP-Inhibition auf die proliferative Aktivität der Zellen zu untersuchen, wurden immortalisierte bzw. primäre PSZ für 48 h mit Verteporfin in unterschiedlichen Konzentrationen oder siRNA in einer Konzentration von 20 nmol/l inkubiert. Aufgrund des besseren Ansprechens der immortalisierten PSZ auf die transiente Transfektion kam die siRNA nur bei diesen zum Einsatz.

#### ERGEBNISSE MIT IMMORTALISIERTEN PSZ

Abbildung 3.5 A zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung des BrdU-Einbaus immortalisierter PSZ unter Einwirkung von Verteporfin. Bereits in einer Dosierung von 100 nmol/l führte Verteporfin zu einer etwa 20%igen Reduktion der BrdU-Inkorporation. Ab einer Konzentration von 250 nmol/l wurde dieser Effekt statistisch signifikant. Hierunter verringerte sich die DNA-Syntheserate um 50 %. Bei Vervierfachung der Dosis zeigte sich ein rund 4-mal so starker Hemmeffekt.

Abbildung 3.5 B ist zu entnehmen, dass alle eingesetzten siRNA-Varianten zu einer statistisch signifikanten Reduktion der BrdU-Inkorporation führten. Auch die unspezifische siRNA senkte den BrdU-Einbau auf 40 % gegenüber der Kontrolle. Die siRNA 1 führte zu einer über 90%igen Verringerung der DNA-Synthese und hat damit einen signifikant stärkeren Effekt als die unspezifische siRNA. Die zweite der gegen YAP eingesetzten siRNAs unterschied sich in ihrer Wirkstärke hingegen nicht von derjenigen der unspezifischen siRNA.

#### ERGEBNISSE MIT PRIMÄREN PSZ

Auch der BrdU-Einbau einmal passagierter primärer PSZ wurde durch Verteporfin konzentrationsabhängig gehemmt (siehe Abbildung 3.6). Dieser Effekt begann bei einer Dosierung von 50 nmol/l und wurde bei doppelter Konzentration statistisch signifikant. In Analogie zu den Versuchen mit immortalisierten Zellen führte Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l zu einem Abfall der BrdU-Inkorporation um ca. 20 %, während 250 nmol/l bereits in einer etwa 50%igen Inhibition resultierten. Bei Steigerung der Dosis auf 1 µmol/l sank die DNA-Syntheseleistung auf unter 10 % der Kontrolle. Tendenziell war der inhibitorische Effekt des Verteporfins auf den BrdU-Einbau bei den Primärzellen etwas stärker ausgeprägt als bei den immortalisierten PSZ.

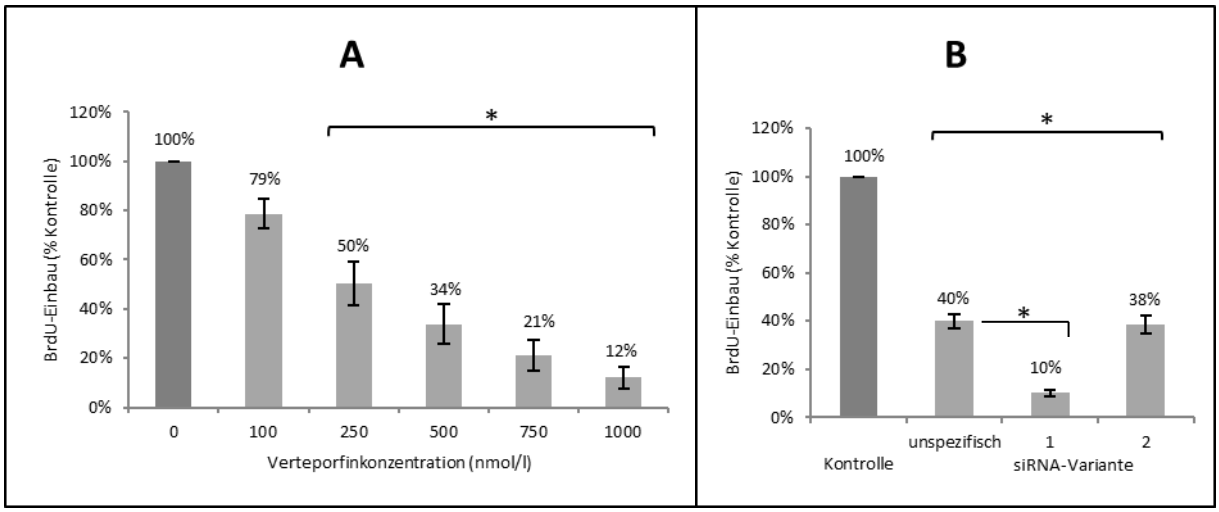



Abbildung 3.5: **DNA-Syntheseleistung immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Verteporfin bzw. siRNA gegen YAP**

Immortalisierte PSZ wurden für 48 h mit Verteporfin behandelt (A) bzw. transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert (B). Anschließend erfolgte eine 8-stündige Inkubation mit BrdU in einer Endkonzentration von 10 µmol/l. Der BrdU-Einbau wurde mittels ELISA quantifiziert und auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Kontrollen entsprechen unbehandelten (B) bzw. ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen (A). Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 18 (A) bzw. 12 (B) Proben. *P < 0,001 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

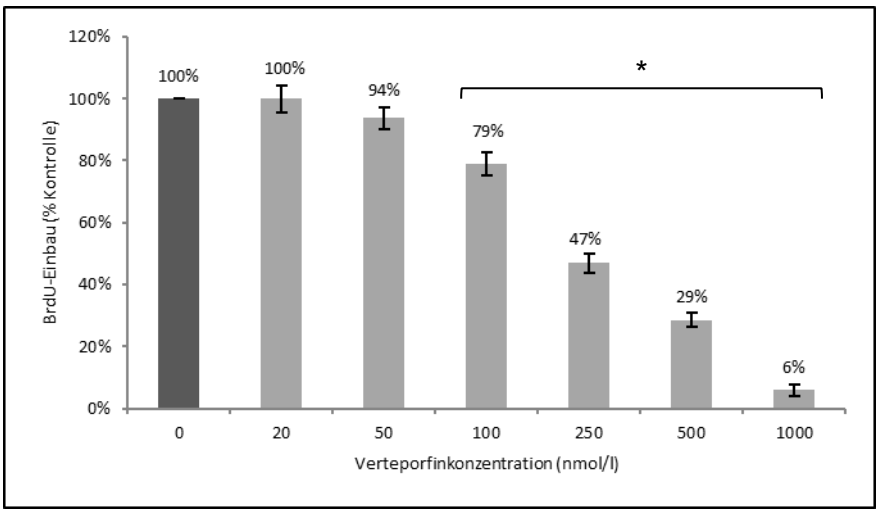



Abbildung 3.6: **DNA-Syntheseleistung primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**

Einmal passagierte primäre PSZ wurden für 48 h mit Verteporfin in den angegebenen Dosierungen behandelt. Anschließend erfolgte eine 8-stündige Inkubation mit BrdU in einer Endkonzentration von 10 µmol/l. Die DNA-Syntheseleistung der Zellen wurde mittels ELISA quantifiziert und auf die ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Kontrolle bezogen. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 12 Proben. *P < 0,001 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

### 3.3.2 AUSWIRKUNGEN AUF DIE ZELLVIABILITÄT

Ein verminderter BrdU-Einbau kann auf eine reduzierte Zellviabilität oder eine verringerte proliferative Aktivität bei unbeeinflusster Viabilität hinweisen. Zur Differenzierung des zugrundeliegenden Mechanismus wurde deshalb die Zellviabilität sowohl von immortalisierten als auch primären PSZ unter 48-stündigem Einfluss von Verteporfin bzw. siRNA bestimmt. Durch die Messung des Anteils toter Zellen einer Zellpopulation sind Aussagen über mögliche zytotoxische Effekte der getesteten Inhibitoren möglich. Um die Ursache für eine Verminderung der Zellviabilität zu spezifizieren, kam der C*aspase-Glo 3/7 Assay* zur Anwendung. Vor der Durchführung des Caspase-Assays wurden immortalisierte PSZ für 48 h mit Verteporfin inkubiert bzw. transient mit siRNA in einer Konzentration von 20 nmol/l transfiziert. Da sich bei den Versuchen mit Verteporfin an immortalisierten Zellen keine signifikanten Effekte zeigten und Primärzellen generell schlechter auf die transiente Transfektion mit siRNA ansprechen, erfolgten keine Versuche zur Quantifizierung der Apoptose an primären PSZ.

#### ERGEBNISSE MIT IMMORTALISIERTEN PSZ

Abbildung 3.7 A stellt die Zunahme des Zelltods immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Verteporfin dar. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. Bereits eine Dosierung von 250 nmol/l sorgte für eine Steigerung der Zelltodrate auf 50 %, allerdings ohne statistische Signifikanz. Ab einer Konzentration von 500 nmol/l kam es zu einem signifikanten Anstieg des Anteils toter Zellen mit Steigerung auf 84 % bei Behandlung mit 1 µmol/l Verteporfin. Im Gegensatz dazu erhöhten alle getesteten siRNA-Varianten die Zelltodrate nur leicht und nicht signifikant (siehe Abbildung 3.7 B). Die stärkste Wirkung zeigte siRNA 1. Der Anteil toter Zellen betrug unter Behandlung mit der ersten siRNA 7 % im Vergleich zu 4 % bei der Kontrolle.

Die Ergebnisse des Caspase-Assays sind im unteren Teil der Abbildung 3.7 dargestellt. Verteporfin führte in Konzentrationen von 20 - 1000 nmol/l zu einem Abfall der gemessenen Caspaseaktivität auf Werte in einem Bereich zwischen 76 % und 94 %. Dieser Effekt war weder dosisabhängig noch signifikant. Alle verwendeten siRNA-Varianten führten hingegen zu einer signifikanten Zunahme der Caspaseaktivität. Die siRNA 1 zeigte dabei mit einer 215%igen Steigerung der Caspaseaktivität den größten Effekt. Dieser war jedoch in Relation zur unspezifischen siRNA nicht signifikant. Diese sorgte für einen ca. 50%igen Anstieg der gemessenen Signalintensität. Auch die zweite gegen YAP gerichtete siRNA führte, bezogen auf die unspezifische siRNA, nicht zu einer signifikanten Aktivitätszunahme.

### ERGEBNISSE MIT PRIMÄREN PSZ

Auch bei Primärzellen führte Verteporfin zu einem Anstieg der Zelltodrate (siehe Abbildung 3.8 A). Bis zu einer Verteporfinkonzentration von 100 nmol/l war diese Wirkung mit einem maximalen Anteil toter Zellen von 20 % eher gering ausgeprägt und statistisch nicht signifikant. Bei einer Konzentration von 500 nmol/l war der Anteil toter Zellen mit 54 % gegenüber der Kontrolle jedoch signifikant vergrößert. Keine der eingesetzten siRNAs zeigte einen Effekt auf das Überleben der primären PSZ (siehe Abbildung 3.8 B).

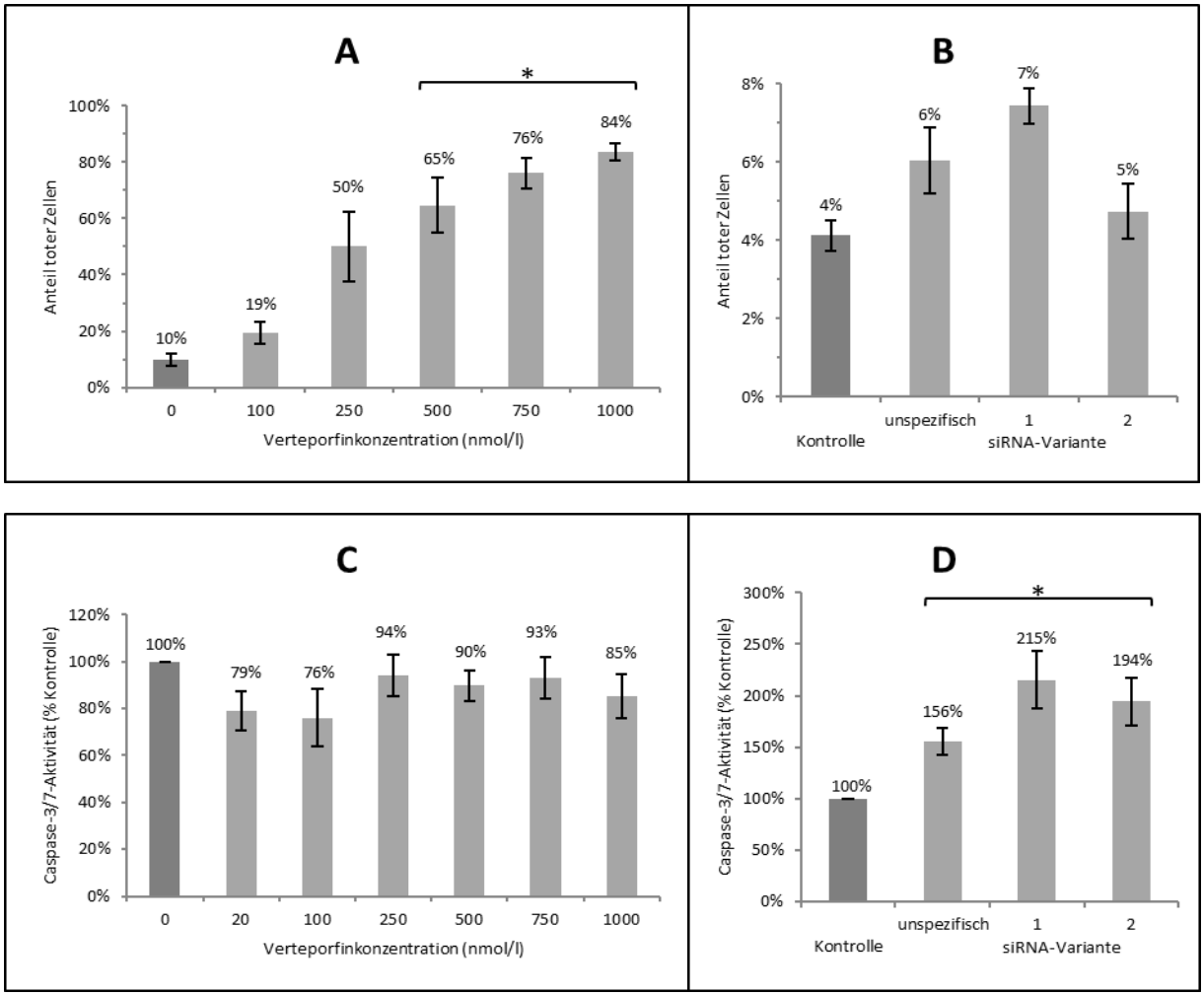



Abbildung 3.7: **Zelltodrate und Caspaseaktivität immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Verteporfin bzw. siRNA gegen YAP**

Immortalisierte PSZ wurden für 48 h mit Verteporfin behandelt bzw. transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert. Die Kontrollen entsprechen unbehandelten (B, D) oder ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen (A, C).

A, B: Automatisierte Zellzählung am *NucleoCounter NC-200* von ChemoMetec zur Ermittlung des Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 6 (A) bzw. 3 (B) Proben. *P < 0,05 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

C, D: Bestimmung der Aktivität von pro-apoptotischen Effektorcaspasen mithilfe des *Caspase-Glo 3/7 Assays* von Promega und Abgleich mit der jeweiligen Kontrolle. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 12 Proben. *P < 0,01 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

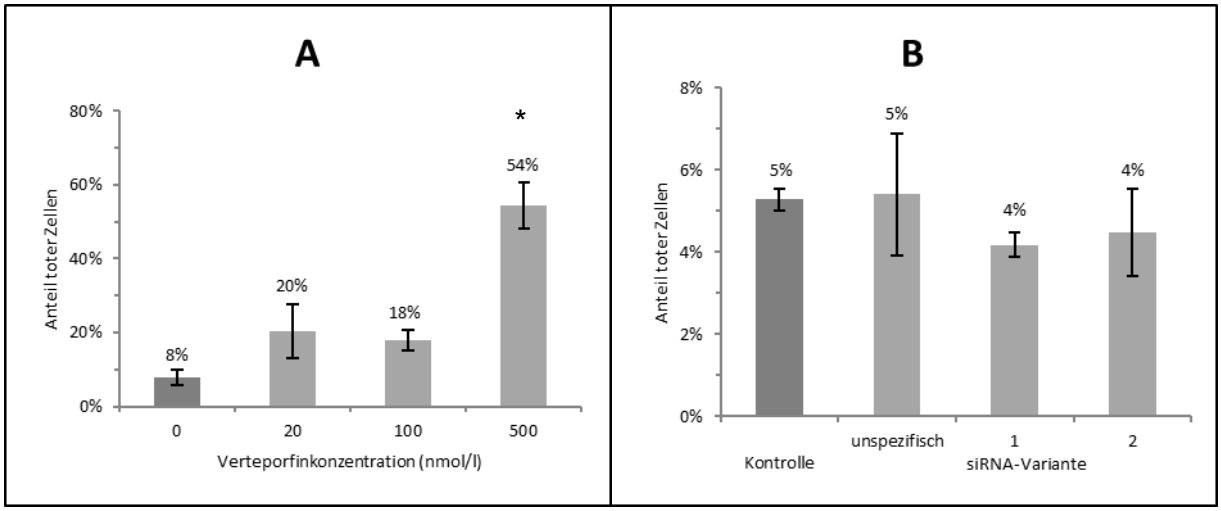



Abbildung 3.8: **Zelltodrate primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin bzw. siRNA gegen YAP**

Einmal passagierte primäre PSZ wurden für 48 h mit Verteporfin behandelt (A) bzw. transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert (B). Anschließend wurden die Zellen automatisiert am *NucleoCounter NC-200* von ChemoMetec ausgezählt und der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt. Die Kontrollen entsprechen unbehandelten (B) bzw. ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen (A). Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 9 (A) bzw. 3 (B) Proben. *P < 0,001 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

## 3.4 EINFLUSS VON YAP-INHIBITOREN AUF DIE GENEXPRESSION

Um Veränderungen der Genexpression in Abhängigkeit einer Behandlung mit Verteporfin respektive siRNA zu detektieren, wurden die entsprechenden mRNA-Transkripte aus PSZ wie im Methodenteil beschrieben (siehe Kapitel 2.2.7) quantifiziert. Die untersuchten Gene codieren für Zytokine, Proteine des Zytoskeletts oder von PSZ sezernierte Proteine, auf deren Funktion in Kapitel 4.2.3.3 näher eingegangen wird. In den Versuchen mit siRNA wurde außerdem die Menge an *YAP1*-mRNA als Angriffspunkt der spezifischen siRNAs bestimmt.

### ERGEBNISSE MIT IMMORTALISIERTEN PSZ

Wie in Abbildung 3.9 zu sehen, zeigte Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l keinen Effekt auf die Expression der Gene *TGFβ1*, *ACTA2*, *COL1A1*, *CTGF*, *MMP2* und *MMP9*. Die Expression der *IL-6*-mRNA war jedoch unter Behandlung mit Verteporfin auf das 1,5-fache der Kontrolle gesteigert. Diese Wirkung war bei einer relativ kleinen Probenanzahl (n = 3) statistisch nicht signifikant. Die Genexpression von *CYR61* wurde durch Verteporfin hingegen signifikant verringert. Der Effekt war mit einer 13%igen Reduktion im Vergleich zur Kontrolle jedoch eher gering ausgeprägt.

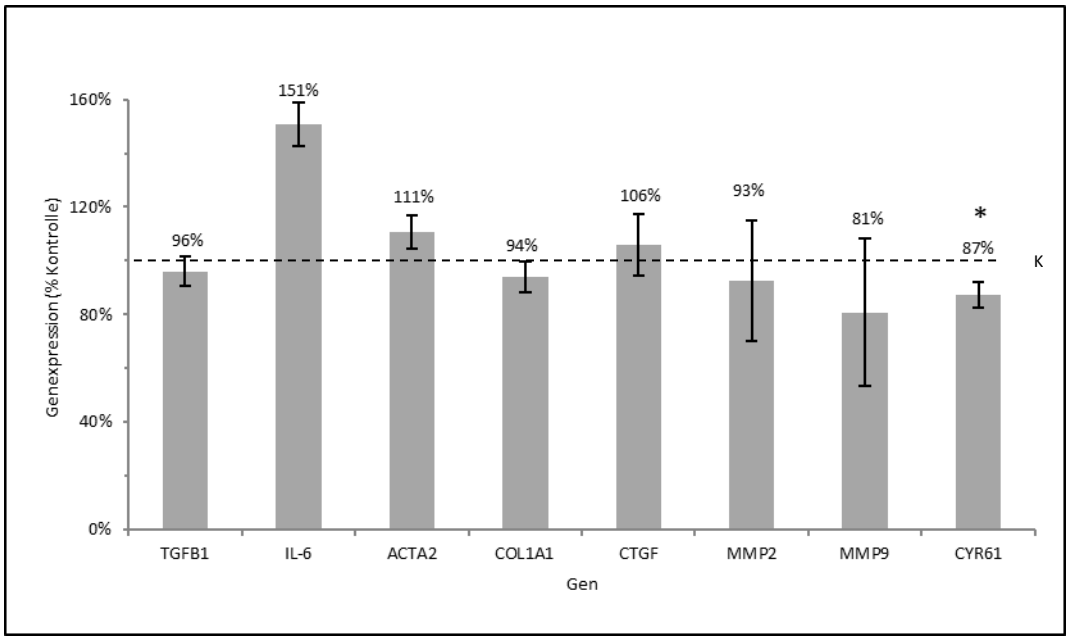



Abbildung 3.9: **Genexpression immortalisierter PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**
Immortalisierte PSZ wurden für 24 h mit Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels modifizierter *single-step*-Methode isoliert und Reste genomischer DNA enzymatisch beseitigt. Es folgte die reverse Transkription der RNA in cDNA. Zur Quantifizierung der Genexpression kam die *Real-Time* PCR-Methode nach der TaqMan-Technologie zur Anwendung. *HPRT* diente hierbei als Haushaltsgen. Die Genexpression der mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrolle (K) entspricht 100 %. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 3 - 9 Proben. *P < 0,01 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

Aus Abbildung 3.10 wird ersichtlich, dass beide gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten dazu imstande waren, die *YAP1*-mRNA-Spiegel signifikant zu senken. Dabei zeigte die zweite eingesetzte siRNA mit einer in Relation zur Kontrolle um 74 % reduzierten Genexpression einen etwas stärkeren Effekt als die erste siRNA mit einer 64%igen Reduktion. Die unspezifische siRNA zeigte keinen Effekt auf die *YAP1*-Expression auf mRNA-Ebene. Die Expression von *TGF$\beta$1* wurde durch die beiden spezifischen siRNAs auf mehr als das Doppelte der Kontrolle gesteigert. Zwar sorgte auch die unspezifische siRNA für einen 50%igen Anstieg der *TGF$\beta$1*-mRNA-Spiegel, jedoch hatten die spezifisch gegen YAP gerichteten siRNAs im Vergleich dazu eine signifikant stärkere Wirkung. Auch die Expression von *IL-6* wurde auf Ebene der mRNA durch alle eingesetzten siRNA-Varianten signifikant erhöht. Die unspezifische siRNA und siRNA 1 sorgten für eine Zunahme der Genexpression auf etwa das 4- bis 6-fache der Kontrolle und unterschieden sich in ihrer Wirkung nicht signifikant. Die zweite spezifische siRNA erhöhte die *IL-6*-mRNA-Menge auf 2150 % der Kontrolle und hatte auch in Relation zur unspezifischen siRNA einen signifikanten Effekt. Die Expression von *ACTA2* nahm unter Einwirkung der unspezifischen siRNA geringfügig aber signifikant zu. Die spezifischen siRNAs sorgten hingegen für eine leichte Verminderung der Expression des *ACTA2*-

Gens, welche in Bezug zur unspezifischen siRNA signifikant war. Im Vergleich zur Kontrolle sorgte nur siRNA 1 für eine signifikante Reduktion der Genexpression. Auf die Expression von *COL1A1* zeigten die unspezifische siRNA und siRNA 2 einen hemmenden Einfluss. Die zweite spezifische siRNA senkte die Genexpression auf 45 % der Kontrolle und war damit signifikant wirksamer als die unspezifische siRNA mit einer Verringerung auf 66 % der Kontrolle. Die *CTGF*-mRNA-Menge fiel unter der Behandlung mit den spezifischen siRNAs auf etwas mehr als die Hälfte des Kontrollwertes ab. Dieser Effekt war in Bezug zur Kontrolle signifikant, in Bezug zur unspezifischen siRNA jedoch nicht. Die unspezifische siRNA sorgte für einen leichten, nicht signifikanten Abfall der Expression des *CTGF*-Gens. Die Menge an *MMP2*- bzw. *MMP9*-mRNA wurde durch alle eingesetzten siRNA-Varianten gesteigert. Während die unspezifische siRNA und siRNA 1 signifikante Effekte auf die *MMP2*-Expression zeigten, hatten beide spezifische siRNAs einen signifikanten Einfluss auf die Expression von *MMP9*. Den stärksten Effekt hatte jeweils die erste spezifische siRNA mit einer Erhöhung der Genexpression auf mehr als das 8- bzw. 7-fache der Kontrolle. Auch die unspezifischen siRNAs führten zu einer Zunahme der Expression auf etwa das 3-fache der Kontrolle. In Relation zur unspezifischen siRNA war nur die Wirkung der siRNA 1 auf die *MMP2*-Expression signifikant. Bei *CYR61* zeigten die unspezifische siRNA und siRNA 1 keine Wirkung. Die zweite siRNA führte hingegen zu einer auf 65 % der Kontrolle reduzierten Genexpression. Dies war sowohl in Bezug zur Kontrolle aus auch in Bezug zur unspezifischen siRNA signifikant.

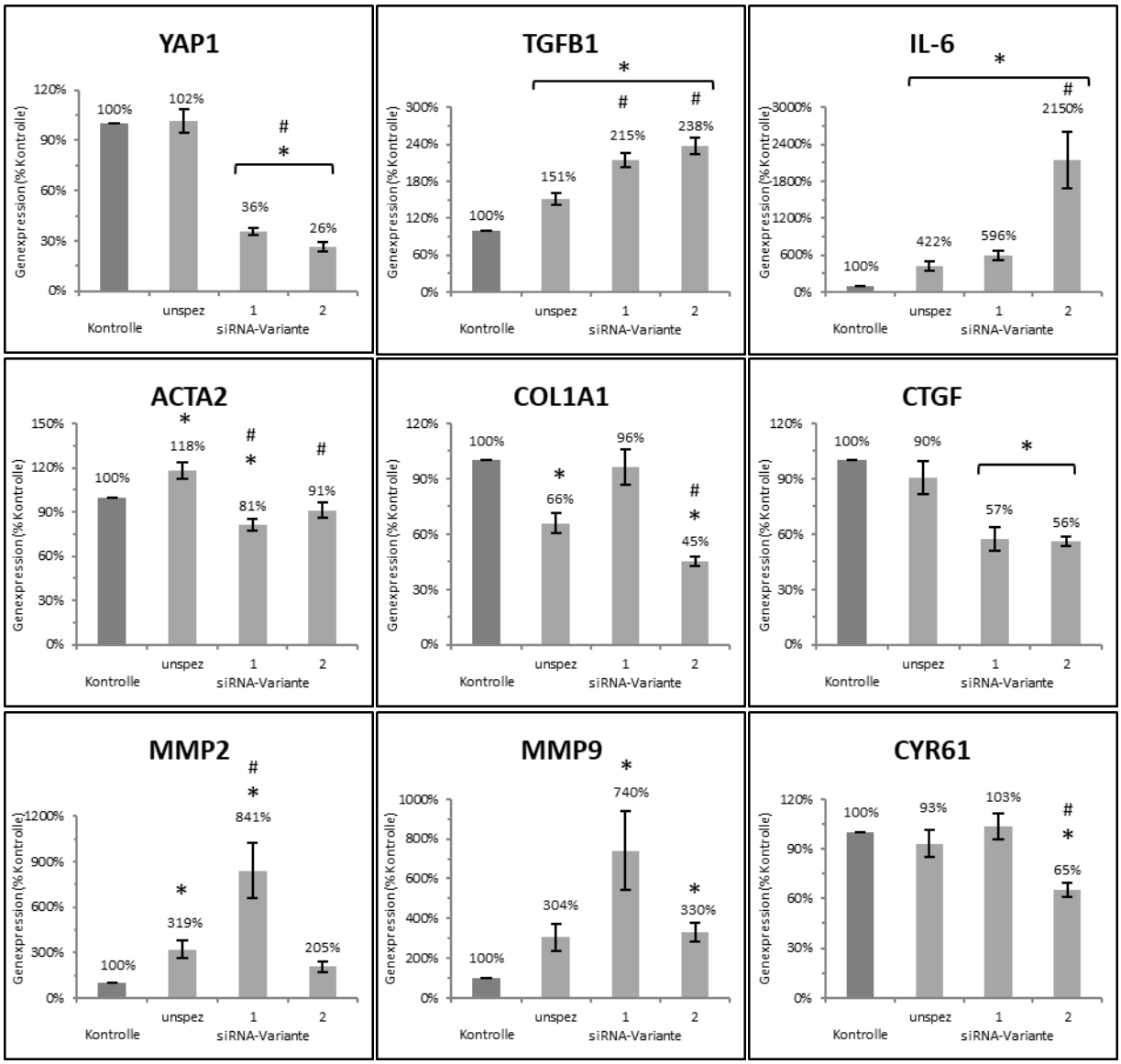



Abbildung 3.10: **Genexpression immortalisierter PSZ nach Behandlung mit siRNA gegen YAP**
Immortalisierte PSZ wurden für 48 h transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert (unspez = unspezifisch). Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels modifizierter *single-step*-Methode isoliert und Reste genomischer DNA enzymatisch beseitigt. Es folgte die reverse Transkription der RNA in cDNA. Zur Quantifizierung der Genexpression kam die *Real-Time* PCR-Methode nach der TaqMan-Technologie zur Anwendung. *HPRT* diente hierbei als Haushaltsgen. Die Genexpression der jeweiligen unbehandelten Kontrolle entspricht 100 %. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von mindestens 9 Proben. *P < 0,01 (Vergleich mit Kontrolle); $^{\#}$P < 0,05 (Vergleich mit unspezifischer siRNA) (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

### ERGEBNISSE MIT PRIMÄREN PSZ

Abbildung 3.11 ist zu entnehmen, dass Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l lediglich die Expression von *TGFβ1* und *CYR61* auf mRNA-Ebene signifikant vermindern konnte. Diese Effekte waren mit einer Reduktion von etwa 10 % im Vergleich zur Kontrolle gering ausgeprägt. Auf die Expression von *IL-6, ACTA2, COL1A1 und CTGF* hatte Verteporfin keinen signifikanten Einfluss.

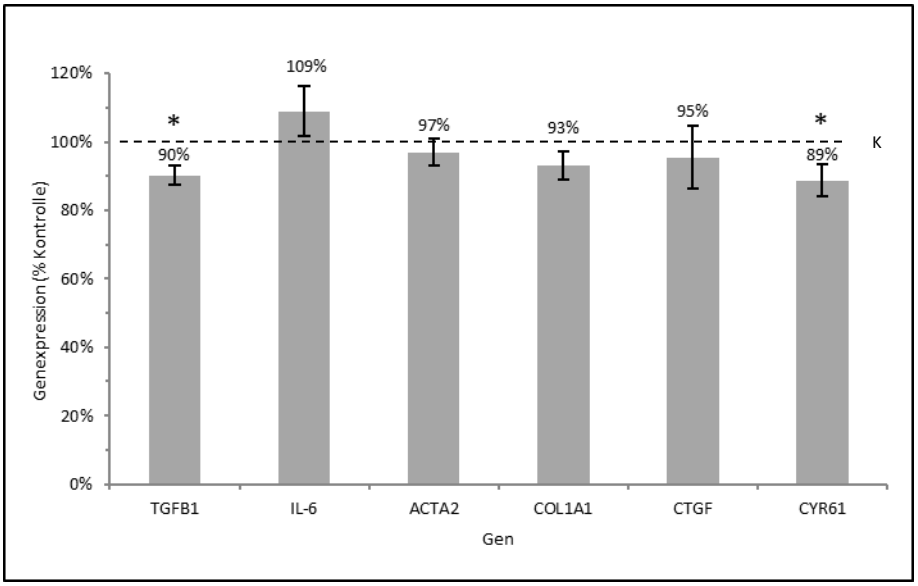



Abbildung 3.11: **Genexpression primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**
Einmal passagierte primäre PSZ wurden für 24 h mit Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels modifizierter *single-step*-Methode isoliert und Reste genomischer DNA enzymatisch beseitigt. Es folgte die reverse Transkription der RNA in cDNA. Zur Quantifizierung der Genexpression kam die *Real-Time* PCR-Methode nach der TaqMan-Technologie zur Anwendung. *HPRT* diente hierbei als Haushaltsgen. Die Genexpression der mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrolle (K) entspricht 100 %. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von mindestens 9 Proben. *P < 0,01 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

Abbildung 3.12 stellt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse an mit siRNA transfizierten Primärzellen dar. Die Menge an *YAP1*-mRNA konnte durch die spezifisch dagegen gerichteten siRNAs um jeweils 22 % gesenkt werden. Die unspezifische siRNA hatte hingegen keinen Einfluss auf die Expression von *YAP1*. Auch auf die Expression von *ACTA2* auf mRNA-Ebene hatten beide spezifische siRNAs einen hemmenden Einfluss. Dieser war mit einer etwa 10%igen Verminderung der *ACTA2*-Expression jedoch geringer ausgeprägt als bei *YAP1*. Auf die Genexpression von *IL-6* zeigten alle eingesetzten siRNA-Varianten fördernde Effekte. Während die unspezifische siRNA die Genexpression mit einem Anstieg um 15 % gegenüber der Kontrolle nur unwesentlich beeinflusste, sorgten siRNA 1 und siRNA 2 für deutliche Zunahmen der Genexpression. Den größten Effekt erzielte siRNA 2 mit einer Stei-

gerung des *IL-6*-mRNA-Gehaltes auf etwa das Doppelte der Kontrolle. Der *CTGF*-mRNA-Spiegel wurde durch jede der eingesetzten siRNAs gesenkt. Dabei hatte die unspezifische siRNA mit einer Reduktion um 34 % gegenüber der Kontrolle den stärksten Effekt, während die spezifischen siRNAs die Genexpression um 14 – 17 % reduzierten. Die Expression von *MMP2* wurde durch die unspezifische siRNA auf 86 % der Kontrolle reduziert und durch siRNA 1 geringfügig gesteigert. Das Gen *CYR61* wurde unter Einwirkung der siRNAs leicht vermindert exprimiert. Die Genexpressionswerte in Bezug zur Kontrolle lagen hierbei zwischen 94 % bei siRNA 1 und 83 % bei der unspezifischen siRNA. Keiner der beobachteten Effekte war statistisch signifikant, was sich zum Teil auf die geringe Anzahl an Proben (n = 3) zurückführen lässt. Auf die mRNA-Menge von *TGFβ1, COL1A1* und *MMP9* hatte die siRNA keinen Einfluss.

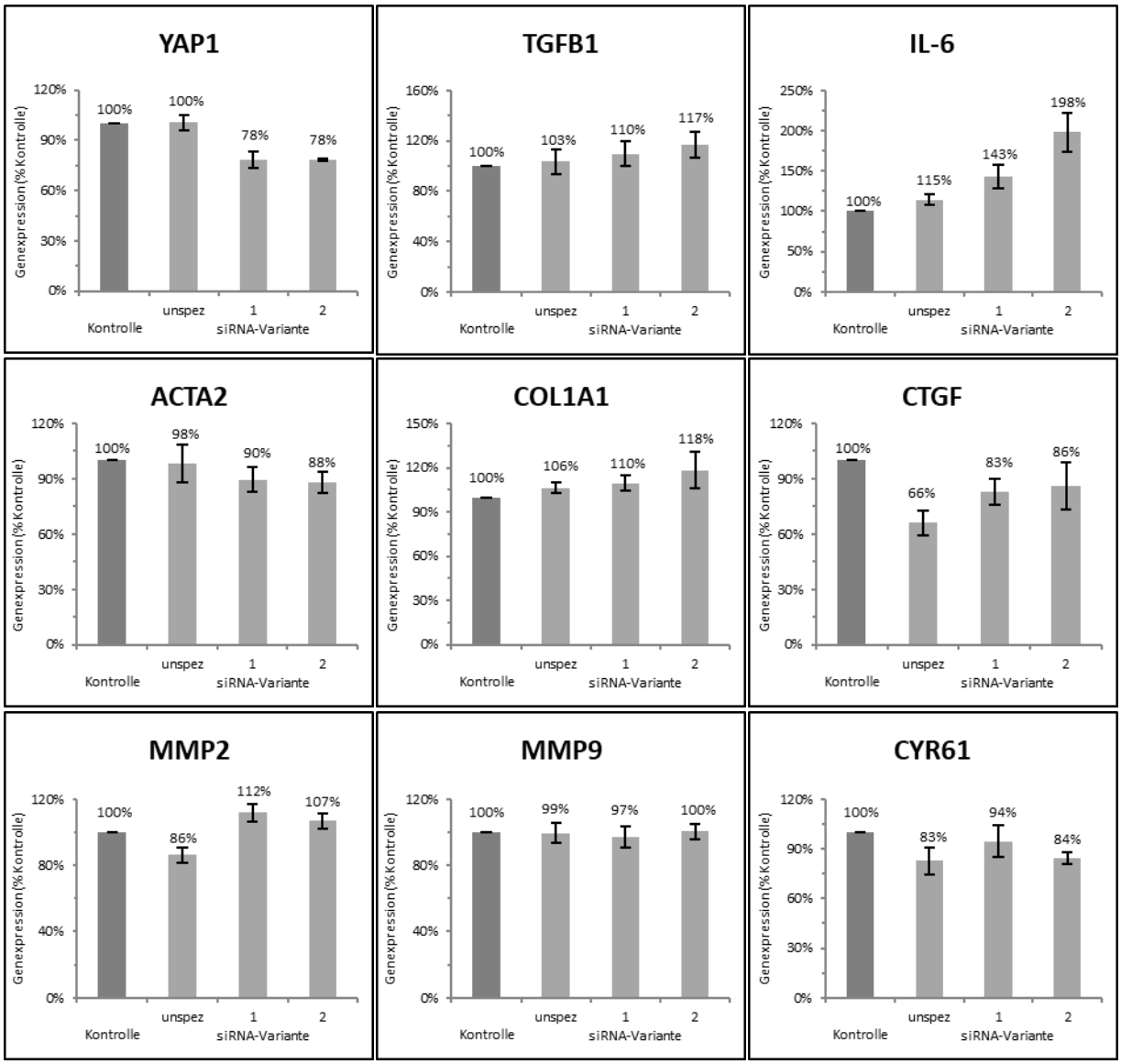



Abbildung 3.12: **Genexpression primärer PSZ nach Behandlung mit siRNA gegen YAP**

Einmal passagierte primäre PSZ wurden für 48 h transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert (unspez = unspezifisch). Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels modifizierter *single-step*-Methode isoliert und Reste genomischer DNA enzymatisch beseitigt. Es folgte die reverse Transkription der RNA in cDNA. Zur Quantifizierung der Genexpression kam die *Real-Time* PCR-Methode nach der TaqMan-Technologie zur Anwendung. *HPRT* diente hierbei als Haushaltsgen. Die Genexpression der jeweiligen unbehandelten Kontrolle entspricht 100 %. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 3 Proben. Das Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$ (U-Test) wurde nicht erreicht.

## 3.5 EINFLUSS VON YAP-INHIBITOREN AUF DIE IL-6-KONZENTRATION IM ZELLKULTURÜBERSTAND

#### ERGEBNISSE MIT IMMORTALISIERTEN PSZ

Die Ergebnisse der Versuche mit Verteporfin an immortalisierten PSZ waren aufgrund einer zu geringen IL-6-Konzentration im Überstand nicht verwertbar. Auch bei den Versuchen mit siRNA waren die gemessenen IL-6-Konzentrationen insgesamt sehr gering (siehe Abbildung 3.13 A). Viele gemessene Extinktionswerte befanden sich im Bereich des Leerwertes, sodass keine Konzentration berechnet werden konnte. In Zusammenschau aller Ergebnisse können die Daten jedoch trotzdem verwendet werden (siehe Kapitel 4.2.3.4). Lediglich siRNA 2 war dazu imstande, die IL-6-Sekretion der PSZ so weit zu erhöhen, dass die IL-6-Konzentration im Überstand konstant oberhalb der Nachweisgrenze lag.

#### ERGEBNISSE MIT PRIMÄREN PSZ

Abbildung 3.13 B zeigt die IL-6-Konzentrationen im Überstand von mit Verteporfin behandelten primären PSZ. Da sich die absoluten Konzentrationen zwischen den Einzelversuchen teils deutlich voneinander unterschieden, erfolgte die Relativierung der Messwerte durch die jeweilige Kontrolle. Erst ab einer zytotoxischen Konzentration von 500 nmol/l führte Verteporfin zu einem leichten Anstieg des IL-6-Gehaltes auf 134 % der Kontrolle. Bei geringerer Dosierung konnte kein Effekt nachgewiesen werden.

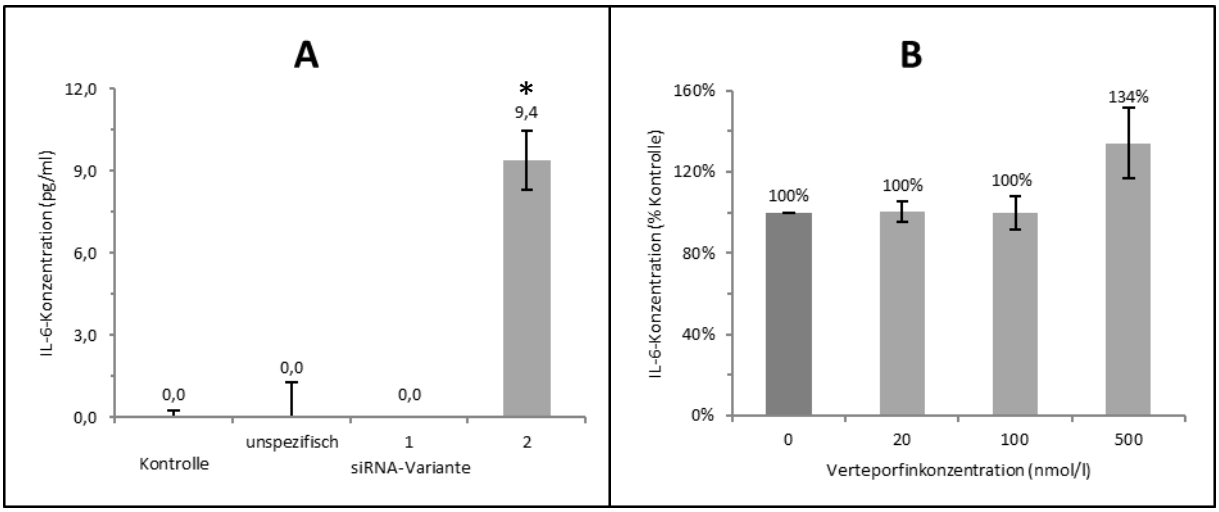



Abbildung 3.13: **IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand von PSZ nach Behandlung mit siRNA gegen YAP bzw. Verteporfin**

A: Immortalisierte PSZ wurden transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand mithilfe eines IL-6 ELISA Kits analysiert. Im Anschluss an die photometrische Extinktionsmessung bei 450 nm wurde die IL-6-Konzentration unter Verwendung der online Software *elisaanalysis.com* berechnet. Die Kontrolle entspricht unbehandelten Zellen. Abgebildet sind die Mediane ± SFM (Standardfehler des Medians) von 9 Proben. *P < 0,01 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

B: Einmal passagierte primäre PSZ wurden für 48 h mit Verteporfin in den angegebenen Dosierungen inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mithilfe eines IL-6 ELISA Kits analysiert. Nach photometrischer Extinktionsmessung bei 450 nm wurde die IL-6-Konzentration unter Verwendung der online Software *elisaanalysis.com* berechnet und auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Kontrolle entspricht ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Proben. Das Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$ (U-Test) wurde nicht erreicht.

## 3.6 EINFLUSS VON YAP-INHIBITOREN AUF DIE PROTEINEXPRESSION

Für die semiquantitative Analyse der Expression verschiedener Proteine unter Behandlung mit YAP-Inhibitoren, wurden PSZ entweder 48 h lang mit Verteporfin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt oder über unterschiedlich lange Zeiträume mit siRNA gegen YAP inkubiert. Die Probengewinnung und Quantifizierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben. GAPDH bzw. β-Aktin dienten als Haushaltsproteine. Untersucht wurden neben YAP1 die Proteine α-SMA und Alpha-1- bzw. Alpha-2-Typ-I-Kollagen. Im Rahmen der Versuche kamen sowohl Antikörper gegen die α1-Kette als auch gegen die α2-Kette des Kollagen Typ I zur Anwendung, da der zunächst eingesetzte anti-α-1-Typ-I-Kollagen-Antikörper nicht zuverlässig zur Färbung der entsprechenden Proteinbanden führte.

### ERGEBNISSE MIT IMMORTALISIERTEN PSZ

Um den zeitlichen Verlauf der Wirkung der siRNAs auf den YAP1-Gehalt zu untersuchen, wurden immortalisierte PSZ für 24 h, 48 h bzw. 72 h mit den verschiedenen siRNA-Varianten inkubiert. Während die siRNA-Varianten 1 und 2 mit zunehmender Dauer der Inkubation zu einer verstärkten Hemmung der *YAP1*-Expression führten, zeigte die unspezifische siRNA keinen Effekt (siehe Abbildung 3.14). Die erste spezifische siRNA-Variante war dabei mit einer Reduktion des YAP1-Spiegels auf Werte zwischen 30 % der Kontrolle nach 24 h Inkubation und 13 % nach 72 h Inkubation etwas wirksamer als siRNA 2. Diese verminderte den YAP1-Gehalt auf Werte zwischen 47 % und 27 % in Relation zur Kontrolle. Auch siRNA 3 zeigte nach 24 h und nach 48 h einen hemmenden Einfluss auf die YAP1-Menge. Dieser war allerdings schwächer ausgeprägt als bei der ersten und zweiten siRNA und nach 72 h nicht mehr nachweisbar. Im Folgenden kamen lediglich die ersten beiden spezifischen siRNAs zum Einsatz. Bei einer Probenzahl von n = 2 wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

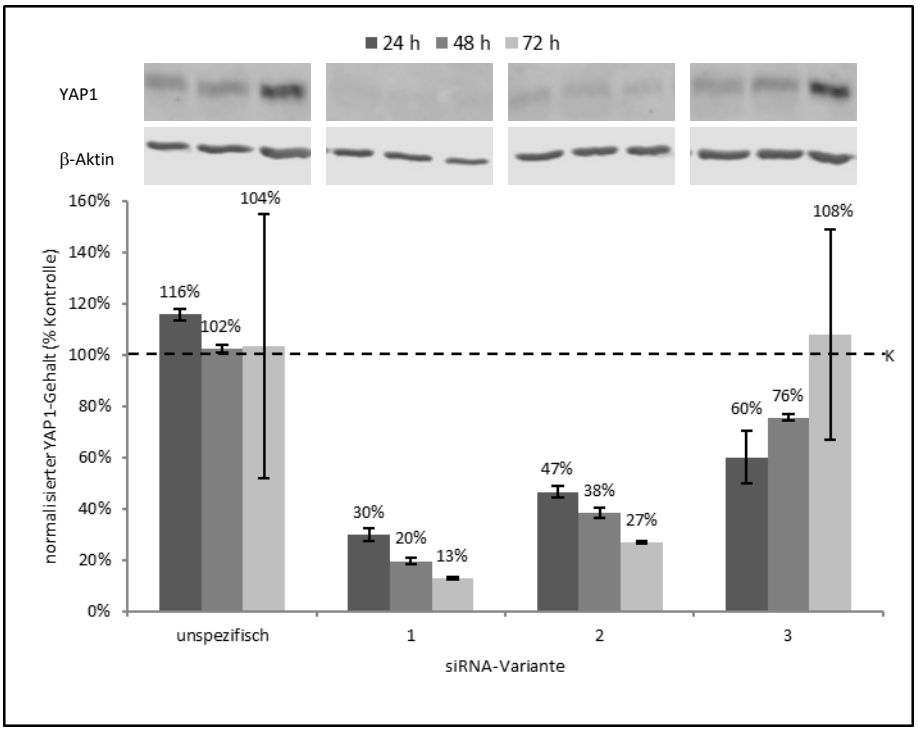



Abbildung 3.14: ***YAP1*-Expression immortalisierter PSZ nach unterschiedlich langer Behandlung mit siRNA gegen YAP**

Immortalisierte PSZ wurden für 24 h, 48 h und 72 h transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert. Anschließend wurden die Proteine isoliert und mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE separiert. Nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran folgte die indirekte Immundetektion von YAP1 und β-Aktin sowie die fluorimetrische Quantifizierung der Proteinmenge. β-Aktin diente hierbei als Haushaltsprotein. Im oberen Teil der Abbildung sind beispielhaft die Bilder der fluoreszenzmarkierten YAP1- bzw. β-Aktin-Proteinbanden eines Versuches zu sehen. Im unteren Teil ist der durch das Haushaltsprotein normalisierte YAP1-Gehalt bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K) dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 2 Proben. Eine statistische Analyse wurde aufgrund der geringen Probenzahl nicht durchgeführt.

Aufgrund der im oben beschriebenen Versuch beobachteten suffizienten Reduktion des YAP1-Levels nach 48 h Inkubationszeit, wurden in weiteren Versuchen die Effekte der siRNAs auf die Expression unterschiedlicher Proteine nach 48-stündiger Einwirkung untersucht (siehe Abbildung 3.15). Es fällt auf, dass die YAP1-Spiegel durch die siRNA-Varianten 1 und 2 sogar noch stärker gesenkt wurden als im Zeitreihenversuch. Die erste siRNA reduzierte dabei die YAP1-Menge auf 10 % der Kontrolle, die zweite siRNA auf 16 %. Allerdings hatte auch die unspezifische siRNA einen hemmenden Einfluss auf die *YAP1*-Expression, welcher mit einer Verminderung der YAP1-Menge auf 68 % jedoch deutlich geringer ausgeprägt war als bei den spezifischen siRNAs. Auf den Gehalt an Alpha-2-Typ-I-Kollagen zeigte lediglich die siRNA-Variante 2 eine Wirkung. Im Vergleich zur Kontrolle kam es zu einer Verdopplung des Proteingehaltes. Die Menge an $\alpha$-SMA wurde wiederum lediglich durch siRNA 1 beeinflusst. Diese sorgte für eine Reduktion der $\alpha$-SMA-Menge auf etwa die Hälfte der Kontrolle. Bei einer Probenzahl von n = 3 wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

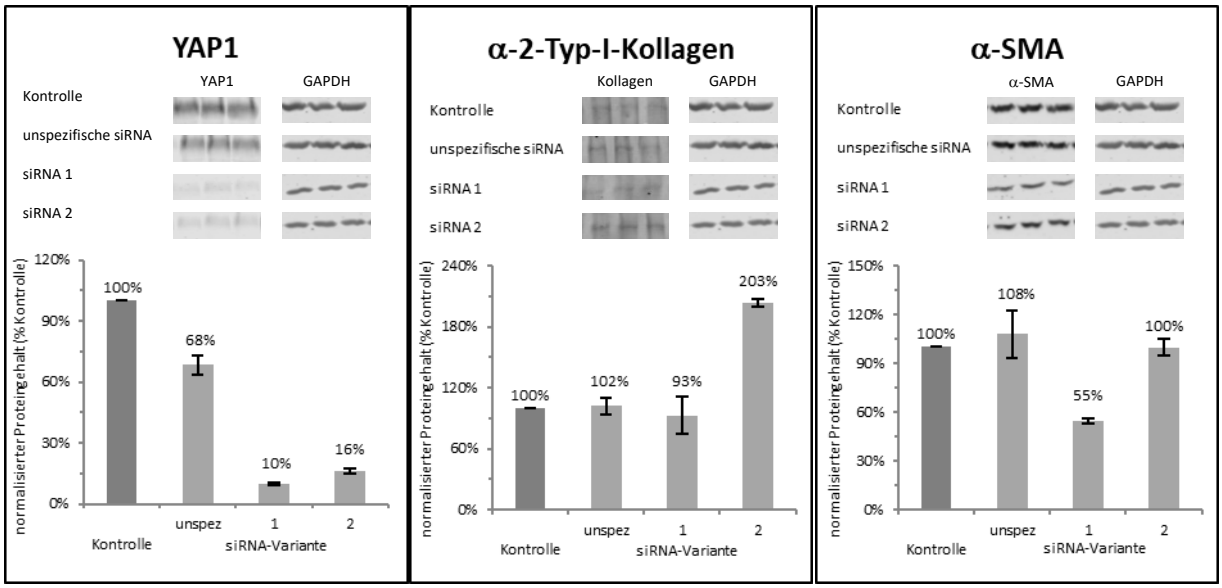



Abbildung 3.15: **Proteinexpression immortalisierter PSZ nach Behandlung mit siRNA gegen YAP**

Immortalisierte PSZ wurden für 48 h transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert (unspez = unspezifisch). Anschließend wurden die Proteine isoliert und mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE separiert. Nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran folgte die indirekte Immundetektion und schließlich die fluorimetrische Quantifizierung der Proteinmenge. GAPDH diente hierbei als Haushaltsprotein. Im oberen Teil der Abbildung sind die Bilder der fluoreszenzmarkierten Proteinbanden zu sehen. Im unteren Teil ist der durch das Haushaltsprotein normalisierte Proteingehalt bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle dargestellt. Abgebildet sind die Fluoreszenzaufnahmen bzw. die Mittelwerte ± SEM von 3 Proben. Eine statistische Analyse wurde aufgrund der geringen Probenzahl nicht durchgeführt.

### ERGEBNISSE MIT PRIMÄREN PSZ

Abbildung 3.16 zeigt den Einfluss des Verteporfins auf die Proteinexpression einmal passagierter primärer PSZ. Hierbei kamen unterschiedliche Dosierungen zum Einsatz. Bei der Betrachtung von YAP1 fiel eine dosisabhängige Zunahme der Proteinmenge um bis zu 75 % bei einer Verteporfinkonzentration von 500 nmol/l auf. Dieser Effekt war aufgrund von großen Streuungen der Einzelwerte statistisch nicht signifikant. Die Expression der $\alpha$1-Kette des Kollagen Typ I wurde dosisabhängig gesenkt. Mit einer 36%igen Reduktion der Alpha-1-Typ-I-Kollagen-Menge hatte Verteporfin in der Maximaldosis von 500 nmol/l eine statistisch signifikante Wirkung. Auf $\alpha$-SMA zeigte Verteporfin keinen Effekt.

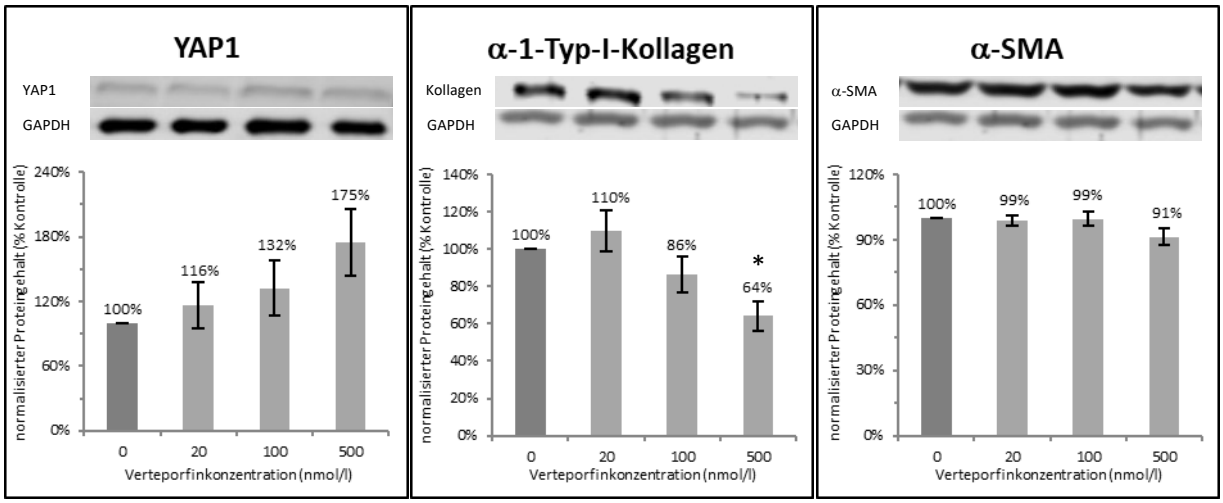



Abbildung 3.16: **Proteinexpression primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**

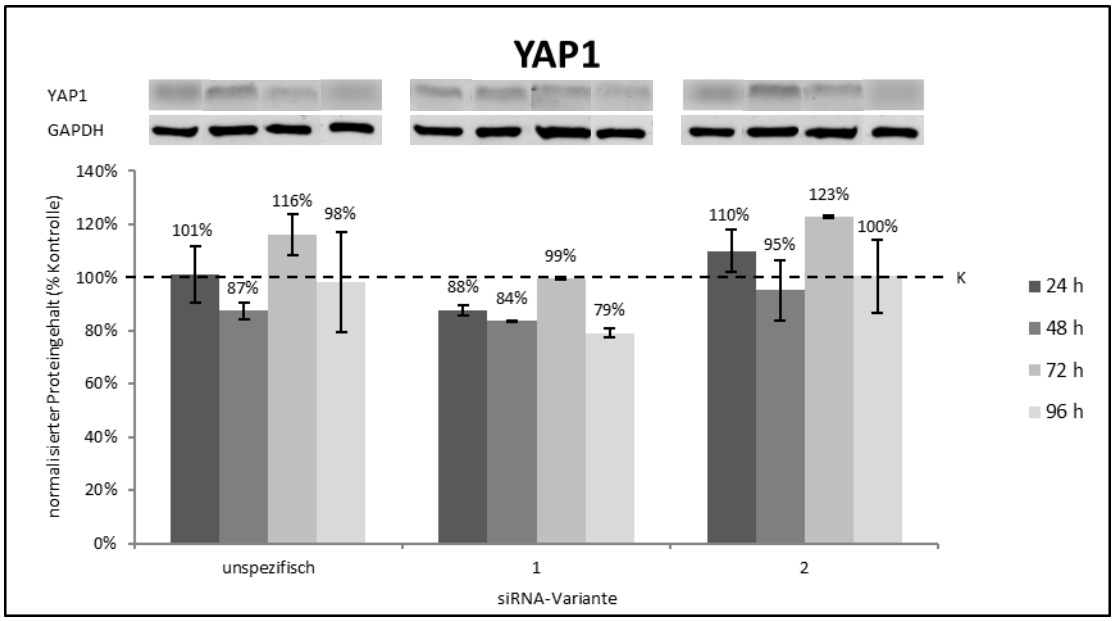
Einmal passagierte primäre PSZ wurden für 48 h mit Verteporfin in den angegebenen Dosierungen inkubiert. Anschließend wurden die Proteine isoliert und mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE separiert. Nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran folgte die indirekte Immundetektion und schließlich die fluorimetrische Quantifizierung der Proteinmenge. GAPDH diente hierbei als Haushaltsprotein. Im oberen Teil der Abbildung sind beispielhaft die Bilder der fluoreszenzmarkierten Proteinbanden eines Versuches zu sehen. Im unteren Teil ist der durch das Haushaltsprotein normalisierte Proteingehalt bezogen auf die jeweilige Kontrolle dargestellt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von mindestens 6 Proben. *P < 0,01 (U-Test, Bonferroni-korrigiert).

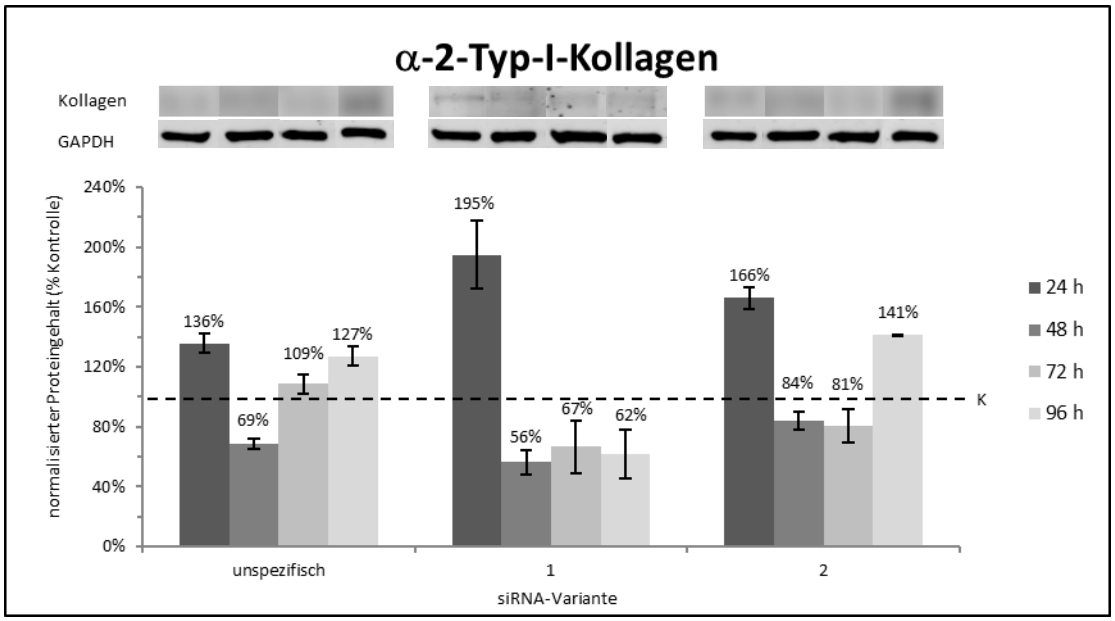
In Analogie zu den Versuchen mit immortalisierten PSZ wurde auch an primären PSZ ein Zeitreihenversuch durchgeführt (siehe Abbildung 3.17). Da in den Vorversuchen die Wirkung der spezifischen siRNAs 1 und 2 mit steigender Inkubationszeit zugenommen hat, wurde diesmal zusätzlich ein Teil der Zellen nach der Transfektion für 96 h mit den siRNAs inkubiert. Während die unspezifische siRNA nach 48-stündiger Inkubation zu einer 13%igen Reduktion der YAP1-Menge führte, ließen sich zu den anderen Zeitpunkten keine Effekte

nachweisen. Die erste spezifische siRNA sorgte nach 24 h, 48 h sowie nach 96 h für eine leichte Verminderung des YAP1-Gehaltes auf Werte zwischen 88 % und 79 % bezogen auf die Kontrolle. Die siRNA-Variante 2 führte bei 72-stündiger Inkubation zu einem Anstieg des YAP1-Gehaltes um 23 % und hatte sonst keine Effekte.

Die Expression von Alpha-2-Typ-I-Kollagen wurde nach 24 h Inkubation durch alle siRNA-Varianten erhöht. Dabei hatte siRNA 1 mit einer 95%igen Steigerung im Vergleich zur Kontrolle den größten Effekt. Nach 48-stündiger Inkubation zeigten sich die Alpha-2-Typ-I-Kollagen-Spiegel jedoch unter Einfluss der siRNA-Varianten vermindert. Auch hier hatte siRNA 1 mit einer 44%igen Senkung des Kollagengehaltes den größten Effekt. Nach 72 h Einwirkzeit sorgten nur noch die beiden spezifischen siRNAs für eine jeweils leichte Reduktion der Menge an Kollagen. Nach 96-stündiger Inkubation zeigte sich der Kollagengehalt unter Einwirkung der siRNA-Variante 1 auf 62 % der Kontrolle vermindert und unter Einwirkung der siRNA-Variante 2 um etwa 40 % erhöht. Auch die unspezifische siRNA sorgte für einen leichten Anstieg der Menge an Alpha-2-Typ-I-Kollagen, welcher jedoch geringer ausgeprägt war als bei der siRNA 2.

Auf $\alpha$-SMA hatte die unspezifische siRNA keine Auswirkungen, während die erste spezifische siRNA nach 72 h und 96 h Inkubationszeit zu einer Hemmung der $\alpha$-SMA-Expression führte. Die siRNA-Variante 2 sorgte initial für einen leichten Anstieg des Proteingehaltes, welcher jedoch bei längeren Inkubationszeiten nicht bestehen blieb. Zusammenfassend, konnte ein über alle Inkubationszeiträume hinweg gleichsinniger Effekt nur unter Einwirkung der siRNA 1 auf die *YAP1*-Expression beobachtet werden. Auf die anderen Proteine hatte keine der siRNA-Varianten einen gleichsinnigen Effekt über alle Inkubationszeiten. Bei einer Probenzahl von n = 2 wurde auf eine statistische Analyse verzichtet. Aufgrund einer generell eher schlechteren Wirksamkeit der siRNA bei Versuchen mit Primärzellen wurde die Versuchszahl nicht erhöht.


YAP1
YAP1
GAPDH
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
normalisierter Proteingehalt (% Kontrolle)
101%
87%
116%
98%
88%
84%
99%
79%
110%
95%
123%
100%
K
unspezifisch
1
2
siRNA-Variante
24 h
48 h
72 h
96 h


α-2-Typ-I-Kollagen
Kollagen
GAPDH
240%
200%
160%
120%
80%
40%
0%
normalisierter Proteingehalt (% Kontrolle)
136%
69%
109%
127%
195%
56%
67%
62%
166%
84%
81%
141%
K
unspezifisch
1
2
siRNA-Variante
24 h
48 h
72 h
96 h

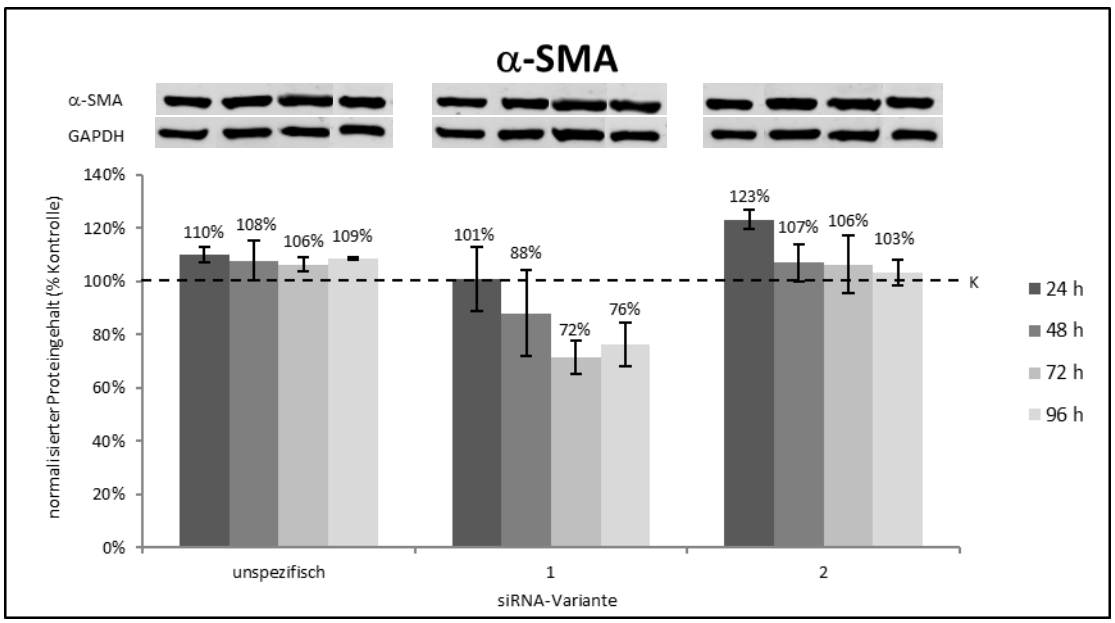

α-SMA
α-SMA
GAPDH
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
normalisierter Proteingehalt (% Kontrolle)
110%
108%
106%
109%
101%
88%
72%
76%
123%
107%
106%
103%
K
unspezifisch
1
2
siRNA-Variante
24 h
48 h
72 h
96 h

Abbildung 3.17: **Proteinexpression primärer PSZ nach unterschiedlich langer Behandlung mit siRNA gegen YAP**

Einmal passagierte primäre PSZ wurden für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h transient mit verschiedenen gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert. Anschließend wurden die Proteine isoliert und mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE separiert. Nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran folgte die indirekte Immundetektion und schließlich die fluorimetrische Quantifizierung der Proteinmenge. GAPDH diente hierbei als Haushaltsprotein. Im oberen Teil der Abbildung sind beispielhaft die Bilder der fluoreszenzmarkierten Proteinbanden eines Versuches zu sehen. Im unteren Teil ist der durch das Haushaltsprotein normalisierte Proteingehalt bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K) dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 2 Proben. Eine statistische Analyse wurde aufgrund der geringen Probenzahl nicht durchgeführt.

## 3.7 EINFLUSS VON YAP-INHIBITOREN AUF DIE ZELLMORPHOLOGIE

### 3.7.1 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG VON α-SMA

Abbildung 3.18 A zeigt die Ergebnisse mit primär kultivierten und nicht passagierten Primärzellen, welche für 3 bzw. 6 Tage mit Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l behandelt wurden. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen. Während an Tag 3 kein Unterschied zwischen behandelten Zellen und der Kontrolle bestand, erhielten mit Verteporfin behandelte Zellen an Tag 6 im Schnitt etwas niedrigere Bewertungen als die lediglich mit DMSO behandelten Zellen. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Auffällig war der Anstieg des α-SMA-Gehaltes mit zunehmender Kultivierungszeit der Zellen. Dieser war für die Kontrolle an Tag 6 in Bezug zur Kontrolle an Tag 3 statistisch signifikant. Abbildung 3.18 B zeigt die Ergebnisse mit einmal passagierten Primärzellen, welche für 48 h mit Verteporfin in den gezeigten Konzentrationen inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten auch hier ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen. Verteporfin zeigte in keiner der eingesetzten Dosierungen einen Effekt auf die Ausprägung der α-SMA-Färbung. Die Resultate mit Primärzellen, welche mit gegen YAP gerichteten siRNA-Varianten transfiziert wurden, sind aufgrund der retrospektiv als schlecht einzuschätzenden Wirksamkeit der siRNA an Primärzellen nicht gezeigt.

### 3.7.2 FÄRBUNG INTRAZELLULÄRER TRIGLYCERIDE MIT ÖLROT O

Abbildung 3.19 A zeigt die Ergebnisse mit primär kultivierten, nicht passagierten Primärzellen, welche für 3 bzw. 6 Tage mit Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l behandelt wurden. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen. An Tag 3 war kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sichtbar. An Tag 6 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden. Allerdings fiel eine im Vergleich zu Tag 3 signifikante Abnahme des Gehaltes an Lipidtröpfchen auf. Die Ergebnisse mit einmal passagierten Primärzellen, welche für 48 h mit Verteporfin in den gezeigten Konzentrationen inkubiert wurden, sind in Abbildung 3.19 B dargestellt. Hier zeigten mit Verteporfin behandelte Zellen im Schnitt einen etwas höheren Gehalt an Lipidtröpfchen als die Kontrolle. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

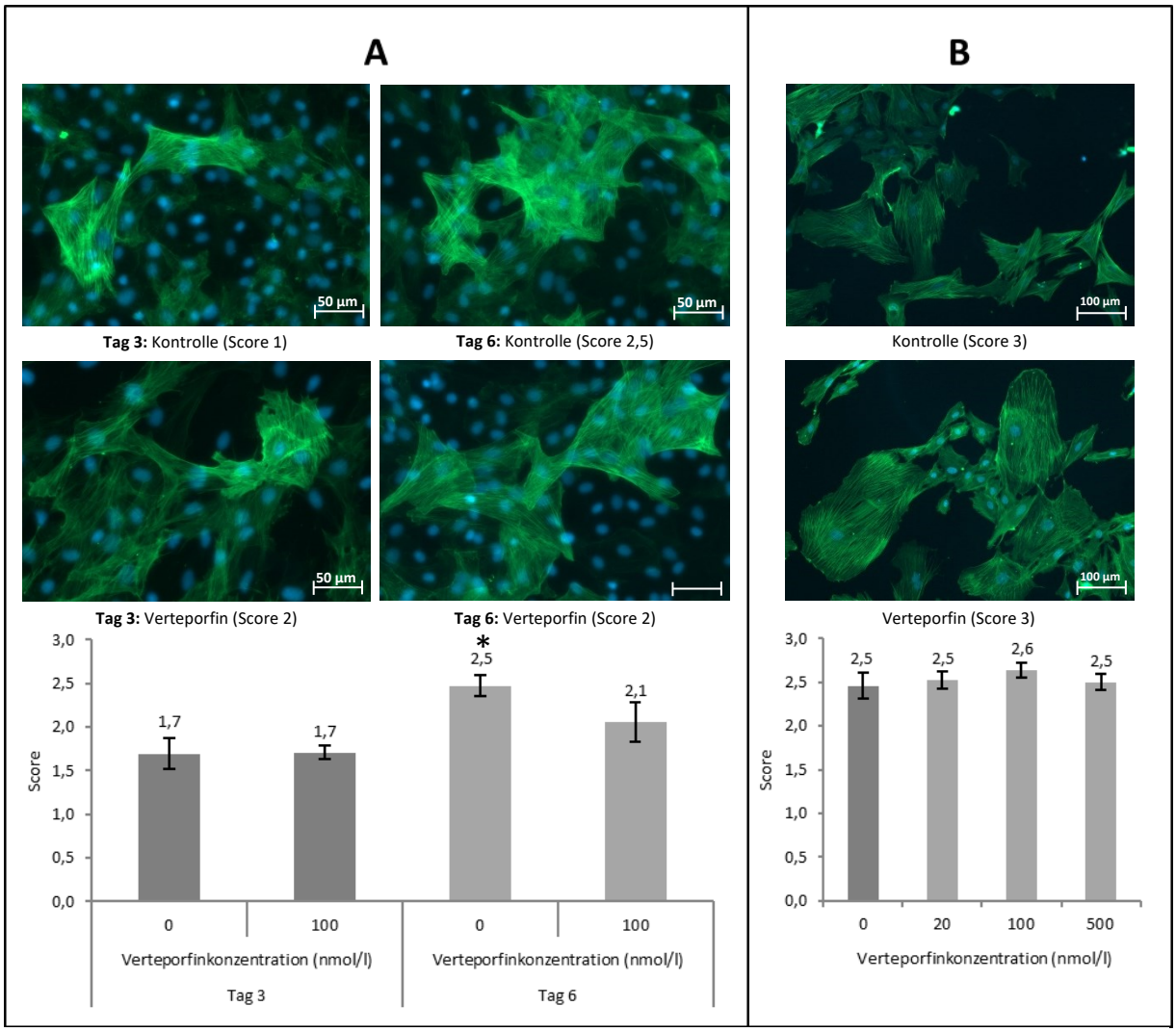



Abbildung 3.18: **Immunfluoreszenzfärbung von α-SMA in primären PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**

PSZ wurden in unterschiedlichen Versuchsansätzen mit Verteporfin behandelt. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO inkubierte Zellen. Anschließend wurde α-SMA mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung visualisiert und die verblindeten Fluoreszenzaufnahmen durch zwei unabhängige Untersucher anhand eines standardisierten Bewertungsschemas evaluiert. Dabei wurden Werte von 0 (keine α-SMA-Expression) bis 3 (starke und homogene α-SMA-Expression) vergeben. Im oberen Teil der Abbildung sind beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen mit den entsprechenden Bewertungen beider Untersucher dargestellt. Unten sind die Mittelwerte der vergebenen Scores abgebildet.

A: Primär kultivierte, nicht passagierte Primärzellen wurden für 3 bzw. 6 Tage mit Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l behandelt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Proben. *P < 0,05 (Vergleich mit Kontrolle an Tag 3, U-Test, Bonferroni-korrigiert).

B: Einmal passagierte Primärzellen wurden für 48 h mit Verteporfin in den gezeigten Dosierungen behandelt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von mindestens 6 Proben. Das Signifikanzniveau α = 0,05 (U-Test) wurde nicht erreicht.

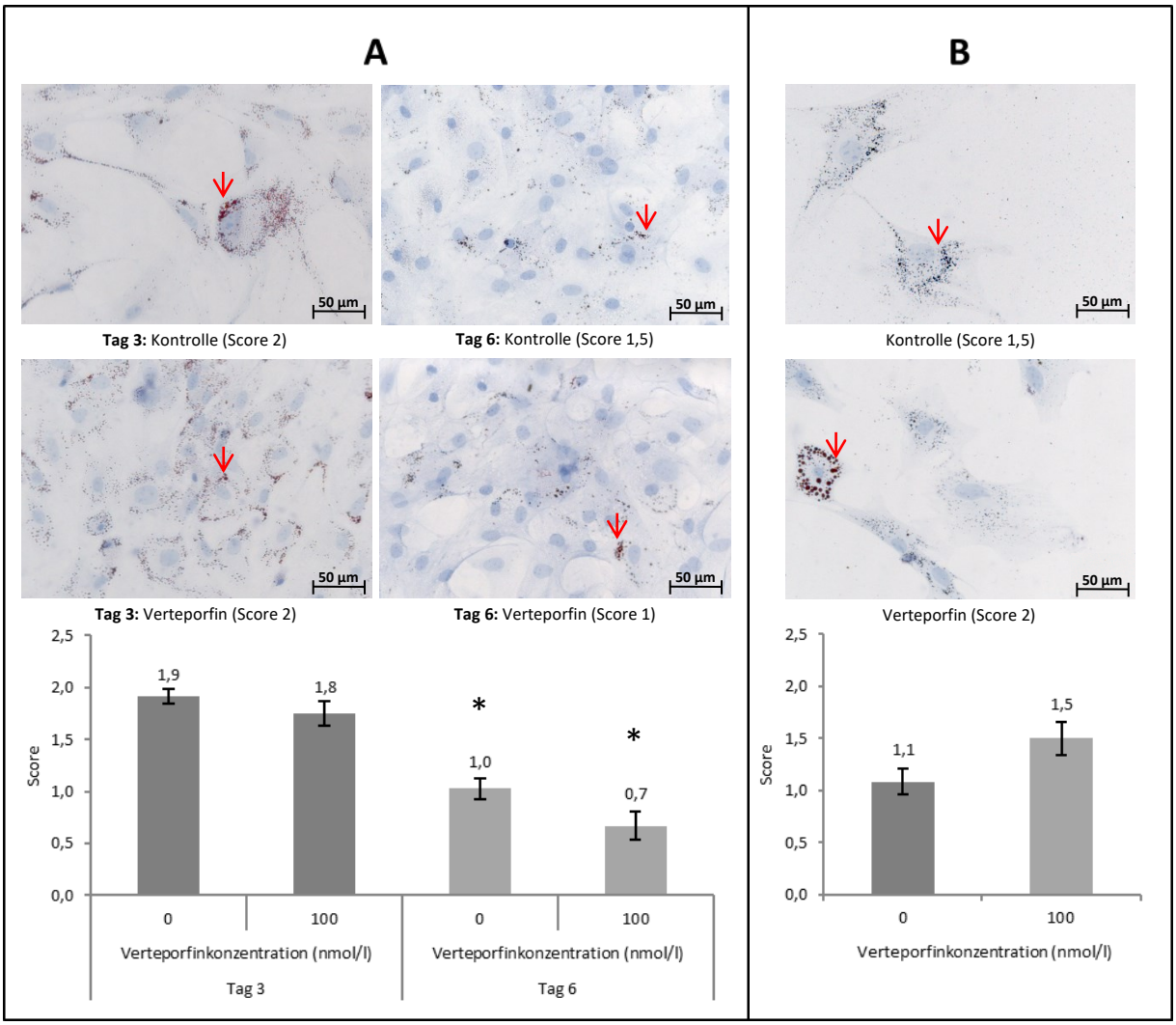



Abbildung 3.19: **Färbung der intrazellulären Triglyceride primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**

Primäre PSZ wurden in unterschiedlichen Versuchsansätzen mit Verteporfin behandelt. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO inkubierte Zellen. Anschließend wurden die intrazellulären Lipidtröpfchen mit dem Farbstoff Ölrot O gefärbt und Bilder am Phasenkontrastmikroskop erstellt. Die Evaluation der verblindeten Aufnahmen erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher anhand eines standardisierten Bewertungsschemas. Dabei konnten Werte von 0 (keine Lipidtröpfchen) bis 3 (Ansammlungen größerer Lipidtröpfchen in den meisten Zellen) vergeben werden. Im oberen Teil der Abbildung sind Aufnahmen der Ölrot-Färbung mit den entsprechenden Bewertungen beider Untersucher dargestellt. Die roten Pfeile markieren beispielhaft gefärbte intrazelluläre Lipidtröpfchen. Unten sind die Mittelwerte der vergebenen Scores abgebildet.

A: Primär kultivierte, nicht passagierte Primärzellen wurden für 3 bzw. 6 Tage mit Verteporfin in einer Konzentration von 100 nmol/l behandelt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von mindestens 6 Proben. *P < 0,05 (Vergleich mit jeweiligem Pendant an Tag 3, U-Test, Bonferroni-korrigiert).

B: Einmal passagierte Primärzellen wurden für 48 h mit Verteporfin in den gezeigten Dosierungen behandelt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Proben. Das Signifikanzniveau $\alpha$ = 0,05 (U-Test) wurde nicht erreicht.

## 3.8 EINFLUSS VON YAP-INHIBITOREN AUF DIE ZELLMIGRATION

Zur Bestimmung der Migrationsrate adhärenter Zellen *in vitro* wurde der in Kapitel 2.2.11 beschriebene zweidimensionale Migrationsassay verwendet.

Abbildung 3.20 A zeigt die Migrationsrate immortalisierter PSZ. Unter Behandlung mit Verteporfin war die Migrationsrate der Zellen mit 7,4 µm/h etwas geringer als bei der Kontrolle mit 9,8 µm/h. Dieser Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant. Bei einmal passagierten primären PSZ gab es keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen (siehe Abbildung 3.20 B).

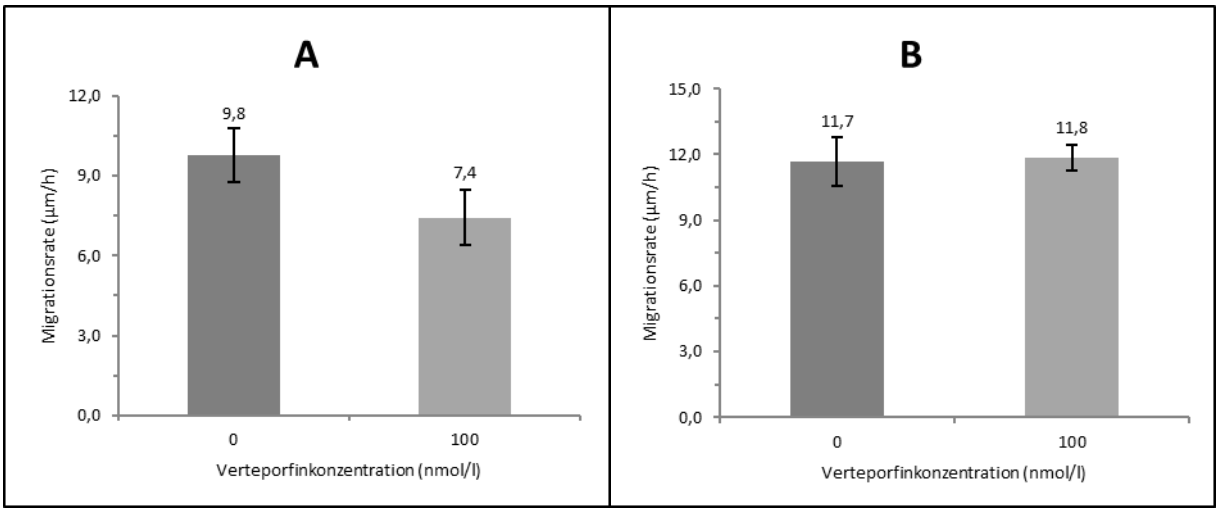



Abbildung 3.20: **Migrationsrate immortalisierter bzw. primärer PSZ nach Behandlung mit Verteporfin**

In einem gleichmäßig angewachsenen Rasen aus immortalisierten (A) bzw. einmal passagierten primären (B) PSZ wurde mit einer 1000 µl Pipettenspitze ein mechanischer Defekt gesetzt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit Verteporfin behandelt. Als Kontrollen dienten ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen. Unmittelbar nach Setzen des Defektes sowie 12 h und 24 h später wurden Aufnahmen per Phasenkontrastmikroskopie angefertigt. Die Defektbreite wurde unter Verwendung der Software *Zen 2 (blue edition)* der Carl Zeiss AG ermittelt, indem vom Untersucher zwei parallele Geraden entlang der Zellfronten angelegt und der Abstand dazwischen gemessen wurde. Anschließend erfolgte die rechnerische Bestimmung der Migrationsrate. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von 11 (A) bzw. 6 (B) Proben. Das Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$ (U-Test) wurde nicht erreicht.

# 4. DISKUSSION

## 4.1 EXPRESSION VON YAP UND TAZ IN GEWEBESCHNITTEN DES PANKREAS

Im gesunden Pankreas lässt sich YAP in Azinuszellen sowie in zentroazinären und duktalen Zellen anfärben [166, 168]. Im Zuge einer CP oder eines PDAC werden YAP und TAZ auch vermehrt in aktivierten PSZ und damit im Stroma exprimiert [168]. In dieser Arbeit wurde die Expression beider Proteine im Kontext verschiedener experimentell hervorgerufener Pankreatitiden untersucht.

#### AKUTE ÖDEMATÖSE PANKREATITIS DURCH CAERULEIN

Eine milde akute Pankreatitis wurde durch wiederholte intraperitoneale Injektionen von Caerulein in C57BL/6 Mäuse hervorgerufen. Dabei bewirkt das Cholezystokinin-Analogon ein Pankreasödem und nur in geringem Umfang Zelltod durch Apoptose bzw. Nekrose [177, 178]. TAZ-Antikörper führten zu einer diffusen Anfärbung der Azini und Langerhans-Inseln (siehe Abbildung 3.1). YAP konnte hingegen im Pankreas nicht spezifisch angefärbt werden. Dass die Färbung jedoch prinzipiell funktioniert hat, zeigte sich an Färbungen im Bereich von Lymphknoten. Weder die Ausprägung noch das Muster der YAP- und TAZ-Färbung unterschied sich zwischen den Präparaten gesunder und kranker Tiere. Deshalb wurde diese Versuchsreihe bereits nach der Färbung von 4 Gewebeschnitten pro Gruppe (erkrankte Tiere und Kontrolltiere) eingestellt. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Unterschied zwischen den Gruppen könnte der akute Charakter der Erkrankung liefern. YAP und TAZ wird eine wichtige regenerative Funktion nach Organschädigungen zugeschrieben [192]. So wäre es denkbar, dass die regenerativen Prozesse nach einem 24-stündigen Krankheitsverlauf noch nicht ausreichend fortgeschritten sind, um detektierbare Veränderungen der YAP-Proteinexpression hervorzurufen. Im Widerspruch dazu stehen jedoch Ergebnisse von Morvaridi *et al.*, welche ebenfalls immunhistochemisch die YAP-Expression bei Caerulein-induzierter Pankreatitis analysierten. Dabei wurde zur Untersuchung der akuten Pankreatitis das gleiche Mausmodell wie in dieser Versuchsreihe verwendet [168]. Allerdings wurden die Pankreata der Tiere nach 8 h bzw. 72 h gewonnen. Zudem verwendeten Morvaridi *et al.* nicht die gleichen YAP-Antikörper wie in dieser Arbeit. Die Arbeitsgruppe wies bereits 8 h nach Caerulein-Behandlung eine Steigerung der YAP-Expression in duktalen Zellen und Azinuszellen nach, welche auch nach 72 h erhöht blieb [168].

#### CHRONISCHE PANKREATITIS DURCH DBTC

Inwieweit eine chronische Pankreatitis zu Veränderungen der YAP- oder TAZ-Expression führt, wurde an männlichen Lewis-Ratten geprüft. Dazu wurden die Tiere 7 bzw. 28 Tage nach intravenöser Injektion von DBTC euthanasiert. Dieses Versuchsprotokoll führt dosisabhängig zu einer akuten, ödematösen Pankreatitis mit Neigung zur Chronifizierung und Organfibrose [179]. In den Pankreata gesunder Tiere konnte analog zu den Präparaten der C57BL/6 Mäuse kein YAP nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.2). An Tag 7 nach DBTC-Injektion zeigte sich jedoch eine YAP-Färbung im Bereich von mutmaßlichen azinoduktalen Metaplasien und im periduktalen Gewebe. Die Intensität der Färbung im periduktalen Gewebe war an Tag 28 gesteigert. Eine Steigerung der YAP-Expression im Rahmen einer CP wiesen auch Morvaridi *et al.* im Mausmodell mit Caerulein nach [168]. TAZ konnte, ebenfalls wie im Versuch mit C57BL/6 Mäusen, diffus in den Azini gesunder Ratten nachgewiesen werden. Auch hier imponierten bei Tieren an Tag 7 zusätzlich Färbungen im Bereich von mutmaßlichen azino-duktalen Metaplasien und in schwächerem Ausmaß in interstitiell fibrotischem Bindegewebe. An Tag 28 nach Behandlung mit DBTC kam es außerdem zu einer periduktalen Färbung. Dass YAP in unseren Versuchen weder im gesunden noch im akut geschädigten Pankreas exprimiert wurde, sehr wohl aber im chronisch geschädigten Organ, spricht für Funktionen des Hippo-Signalwegs bei der CP und Fibrogenese. Auch die Zunahme der TAZ-Färbung bei CP stützt diese Schlussfolgerung.

#### AUTOIMMUNE PANKREATITIS

Die Untersuchung des Expressionsmusters von YAP und TAZ im Rahmen einer AIP erfolgte an Präparaten von weiblichen MRL/MpJ-Mäusen, welche anhand ihres AIP-Scores (siehe Kapitel 2.2.1) als gesund oder krankhaft bewertet wurden [183]. YAP wurde vor allem in periduktalen Regionen angefärbt. Es zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen gesunden und geschädigten Organen (siehe Abbildung 3.3). Damit unterschied sich das YAP-Expressionsmuster bei gesunden Tieren im AIP-Modell von dem in anderen Pankreatitis-Modellen. Die Ursache dafür ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. TAZ war wie in den anderen Versuchen diffus azinär lokalisiert. Auch hier konnten keine Differenzen zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dies deutet auf eine untergeordnete Rolle des Hippo-Signalwegs bei der AIP der Maus hin.

## 4.2 FUNKTIONEN VON YAP IN PANKREATISCHEN STERNZELLEN

Die *in vivo* Versuche sprechen für eine Bedeutung von YAP im Rahmen der CP und der Fibrogenese. Wie bereits in Kapitel 1.1.2.2 erläutert, spielen auch PSZ eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie dieser Prozesse. Im Folgenden wird deshalb auf die Funktionen von YAP in PSZ eingegangen.

### 4.2.1 VERWENDETE ZELLEN UND DEREN LIMITATIONEN

Für die Versuche wurden sowohl primäre als auch immortalisierte PSZ der Ratte verwendet (siehe Kapitel 2.2.2). Aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden zwischen PSZ [97] sind die Ergebnisse dieser Arbeit nicht ohne Weiteres auf humane PSZ übertragbar. Auch die Immortalisierung von Zellen führt dazu, dass diese sich in ihren Eigenschaften teilweise von primären PSZ unterscheiden [97, 193]. So weisen immortalisierte PSZ eine erhöhte Proliferationsrate auf [193]. Zudem unterscheiden sich Zellen in hoher Passage aufgrund des Phänomens des „genetischen Drifts“ teilweise erheblich von der Ursprungszelle [194]. Einige Autoren diskutieren sogar, dass der Prozess der Immortalisierung zur Selektion maligner Subklone führt [97]. Mathison *et al.* konnten hingegen keine tumorigenen Eigenschaften immortalisierter PSZ der Ratte nachweisen [195]. Dennoch gilt im Allgemeinen der Expertenkonsens, dass Ergebnisse an immortalisierten PSZ mit Primärzellen validiert werden sollten [97].

### 4.2.2 BEEINFLUSSEN BEKANNTE REGULATOREN PANKREATISCHER STERNZELLEN DIE AKTIVITÄT DES HIPPO-SIGNALWEGS?

Die Effekte der Zytokine TGFβ1 und IFN-γ auf PSZ wurden bereits ausführlich studiert. TGFβ1 aktiviert PSZ und induziert die Transkription von EZM-Proteinen durch die Aktivierung von SMAD-Proteinen [134, 196]. IFN-γ hingegen hemmt STAT1 vermittelt die Aktivierung von PSZ und kann so als Gegenspieler zu TGFβ1 betrachtet werden [197].

Inwieweit diese Effekte auch auf einer Modulation des Hippo-Signalwegs beruhen, ist jedoch unklar. *In vitro* Studien an humanen PK-Zelllinien haben gezeigt, dass TGFβ1 die *YAP*-Expression steigert [166]. In murinen bzw. humanen PSZ beeinflusst TGFβ1 in einer Konzentration von 5 ng/ml allerdings weder die Menge noch die subzelluläre Lokalisation von YAP [198]. Trotzdem scheint YAP in PSZ ein wichtiger Mediator der TGFβ1-induzierten Expression von *CTGF* und *IL-6* zu sein [198]. Im Luciferase-Reportergenassay zeigte sich in den eigenen Untersuchungen ab einer TGFβ1-Konzentration von 1 ng/ml ein signifikanter Anstieg der *Firefly*-Luciferase Aktivität. IFN-γ führte in allen getesteten Dosierungen zu einem Abfall derselbigen. Dies deutet auf vermehrt intranukleär vorliegendes YAP und somit eine

inaktivierte Hippo-Kinasekaskade unter Einfluss von TGFβ1 hin. IFN-γ scheint dagegen über eine Aktivitätssteigerung der Hippo-Kinasekaskade zu wirken. Eine mögliche Erklärung für den scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen von Hu *et al*. ist neben der Verwendung von PSZ einer anderen Spezies der unterschiedliche Versuchsaufbau. Während der Luciferase-Reportergenassay einen indirekten Nachweis der YAP-Aktivität darstellt, haben Hu *et al*. die Lokalisation von YAP mittels Immunfluoreszenz untersucht. Letztendlich ist die gemessene Aktivität von YAP aber nicht uneingeschränkt mit dessen subzellulärer Lokalisation im Zellkern gleichzusetzen.

Der Hippo-Signalweg wird nicht nur durch extrazelluläre Zytokine beeinflusst, sondern steht auch mit vielen anderen intrazellulären Signalwegen in Verbindung (z. B. PI3K/AKT, *Hedgehog*, *Notch*, und mTOR-Signalweg) [154]. Auf die Bedeutung des MAPK-Signalwegs bei der Aktivierung der PSZ wurde bereits in Kapitel 1.1.2.3 hingewiesen. Als mögliche Regulatoren des Hippo-Signalwegs wurden deshalb die p38-MAP-Kinase Inhibitoren SB 203580 und SB 202190 sowie der MAP-Kinase-Kinase Inhibitor PD 98059 untersucht. Bekannt ist, dass SB 203580 und SB 202190 die Proliferation sowie die Expression von α-SMA und Kollagen in PSZ hemmen [199]. SB 203580 war zudem *in vitro* in der Lage, den ruhenden Phänotyp in immortalisierten murinen PSZ zu induzieren und deren *YAP*-Expression zu vermindern [198]. PD 98059 inhibiert die Zellproliferation von PSZ der Ratte [137]. Alle genannten Kinaseinhibitoren führten im Reportergenassay zumindest in höherer Dosierung zu einem signifikanten Abfall der *Firefly*-Luciferase Aktivität. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine Hemmung des MAPK-Signalwegs zu einer gesteigerten Aktivität der Hippo-Kinasekaskade und damit einer verminderten intranukleären YAP-Aktivität führt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind gut mit der bestehenden Studienlage und insbesondere den Resultaten von Hu *et al.* zu vereinbaren und erweitern diese im Hinblick auf eine mögliche Verknüpfung des MAPK- und Hippo-Signalwegs.

Einschränkend ist zu erwähnen, dass die beschriebenen Versuche nur an immortalisierten PSZ auswertbar waren. Bei den Versuchen mit Primärzellen war die Transfektionseffizienz zu gering.

### 4.2.3 AUSWIRKUNGEN VON YAP-INHIBITOREN AUF DIE FUNKTIONEN VON PSZ

Nachdem die Wirkung verschiedener *Upstream*-Regulatoren auf die YAP-Aktivität beschrieben wurde, soll im Folgenden auf die Auswirkungen einer YAP-Inhibition eingegangen werden.

#### 4.2.3.1 WIRKSAMKEITSNACHWEIS DER EINGESETZTEN SIRNA-VARIANTEN

Wie in Kapitel 1.1.3.3 beschrieben, wurde YAP einerseits mit Verteporfin und andererseits durch spezifisch dagegen gerichtete siRNAs gehemmt. Die siRNAs sorgen über eine Degradation der YAP-mRNA für dessen post-transkriptionelle Unterdrückung. Eine Voraussetzung für weitere Versuche ist daher der Wirksamkeitsnachweis der eingesetzten siRNA-Varianten durch *Western-Blot* und *Real-Time* PCR. Auf Proteinebene wurden zunächst drei verschiedene siRNA-Varianten hinsichtlich ihrer YAP-inhibitorischen Potenz in immortalisierten PSZ untersucht (siehe Abbildung 3.14). Zwei der eingesetzten siRNA-Varianten führten nach mindestens 48-stündiger Inkubation zu einer deutlichen Reduktion des YAP-Gehaltes auf unter 40 % und wurden im Folgenden verwendet. Der Effekt nahm mit steigender Inkubationsdauer zu. Aus Gründen der Zeitplanung und der Vergleichbarkeit mit den Verteporfin-Versuchen wurde für weitere Versuche eine Inkubationszeit von 48 h festgelegt. In den Folgeversuchen führten die siRNA-Varianten sogar zu einer mehr als 80%igen Reduktion von YAP in immortalisierten PSZ, wobei hier auch die unspezifische siRNA einen gleichgerichteten Effekt hatte (siehe Abbildung 3.15). Bei Primärzellen konnte jedoch auch nach bis zu 96-stündiger Inkubation keine adäquate Reduktion des YAP-Gehalts nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.17).

Auf mRNA-Ebene reduzierten beide siRNA-Varianten die *YAP*-Expression in immortalisierten PSZ signifikant auf unter 40 % (siehe Abbildung 3.10). Dieser Effekt war in Primärzellen mit einer Reduktion auf unter 80 % schwächer ausgeprägt und zudem nicht signifikant. Zusammenfassend wirken die siRNA-Varianten also vor allem in immortalisierten PSZ zufriedenstellend und kamen im Folgenden besonders bei diesen zum Einsatz.

#### 4.2.3.2 ZELLPROLIFERATION UND -VIABILITÄT

Ein wichtiges Charakteristikum aktivierter PSZ ist deren Proliferation. Hu *et al.* konnten 2019 nachweisen, dass ein YAP-Knockdown mittels siRNA die proliferationsfördernde Wirkung von PDGF auf immortalisierte murine PSZ abschwächt [198]. In humanen PSZ führt ein YAP-Knockdown ebenfalls zur verminderten Zellproliferation [169]. Zudem kommt es zu einer vermehrten Apoptose der PSZ [169]. Verteporfin führte in unseren Experimenten an immortalisierten und primären PSZ zu einer deutlichen dosisabhängigen Reduktion der BrdU-Inkorporation als Surrogatmarker der Zellproliferation (siehe Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6). Analog zu den Versuchen von Xiao *et al.* kam es auch bei einem Knockdown von YAP zu einer verminderten Zellproliferation. Allerdings überstieg nur der Effekt der siRNA-Variante 1 die ebenfalls nachweisbare antiproliferative Wirkung der unspezifischen siRNA signifikant.

Ein verminderter BrdU-Einbau kann auch durch eine reduzierte Zellviabilität bedingt sein. Diese wurde durch Zellzählungen untersucht. Hier stieg der Anteil toter PSZ unter Verteporfin dosisabhängig und war ab 500 nmol/l statistisch signifikant erhöht (siehe Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Da eine signifikante Reduktion der Zellproliferation bereits ab einer Konzentration von 250 nmol/l (immortalisierte PSZ) bzw. 100 nmol/l (Primärzellen) erreicht werden konnte, sind im Folgenden Effekte bei einer nicht zytotoxischen Verteporfinkonzentration von 100 nmol/l von besonderem Interesse. Keine der eingesetzten siRNA-Varianten führte zu einem signifikanten Anstieg des Anteils toter Zellen. Um die Ursache für eine Verminderung der Zellviabilität zu spezifizieren, kam der C*aspase-Glo 3/7 Assay* zur Anwendung. Dieser liefert Informationen zur Apoptoserate in einer Zellpopulation. Während Verteporfin die Apoptoserate der PSZ nicht erhöhte, führten alle eingesetzten siRNA-Varianten unspezifisch zur vermehrten Apoptose (siehe Abbildung 3.7). Zusammenfassend wirkt Verteporfin in Dosierungen ab 500 nmol/l zytotoxisch auf PSZ, wohingegen die siRNA zwar die Apoptoserate der PSZ erhöht, den Anteil toter Zellen damit aber nicht signifikant beeinflusst.

#### 4.2.3.3 GENEXPRESSION

Das Gen *COL1A1* codiert für die von PSZ sezernierte $\alpha$1-Kette des Typ-I-Kollagens, welches ein wichtiger Bestandteil der EZM im fibrösen Gewebe ist [196]. *ACTA2* codiert für das zytoskelettale Protein $\alpha$-SMA. Dieses gilt als Marker aktivierter PSZ [99]. In humanen PSZ konnte durch einen *Knockdown* von YAP mittels siRNA bzw. eine YAP-Inhibition durch Verteporfin die Expression von $\alpha$-SMA und Kollagen Typ I vermindert werden [169]. In PSZ der Ratte führt Verteporfin hingegen nicht zu einer signifikanten Hemmung der Expression von $\alpha$-SMA und Kollagen Typ I auf mRNA-Ebene (siehe Abbildung 3.9 und Abbildung 3.11). Ein YAP-*Knockdown* mit siRNA führte zwar je nach eingesetzter siRNA-Variante zu einer signifikanten Reduktion der *ACTA2*- bzw. *COL1A1*-mRNA auf 81 % bzw. 45 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Allerdings hatte keine der siRNA-Varianten einen signifikanten Effekt auf beide Gene und auch die unspezifische siRNA führte zu teils deutlichen Effekten (siehe Abbildung 3.10). Wie aufgrund der nicht suffizienten YAP-Inhibition (siehe Kapitel 4.2.3.1) zu erwarten, zeigte die siRNA keinen Effekt auf Primärzellen. Bei den im Folgenden beschriebenen Genen wird deswegen nicht näher auf die Ergebnisse der siRNA-Versuche mit Primärzellen eingegangen.

TGF$\beta$1 bzw. IL-6 sind profibrotische Zytokine, welche die Funktionen von PSZ beeinflussen. Aoki *et al.* entdeckten, dass TGF$\beta$1 und IL-6 im Sinne einer autokrinen Feedbackschleife gegenseitig ihre Expression in PSZ fördern [200]. Zudem erhöhen beide Zytokine die $\alpha$-SMA-Expression von PSZ und beeinflussen auch die Zellproliferation und Kollagensynthese [118, 196]. Verteporfin führte zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der

*IL-6*-mRNA-Menge in PSZ (siehe Abbildung 3.9 und Abbildung 3.11). Auch die eingesetzten siRNAs erhöhten die *IL-6*-Expression. Vor allem siRNA-Variante 2 zeigte mit einer 21-fachen Zunahme des *IL-6* einen deutlichen Effekt in immortalisierten PSZ (siehe Abbildung 3.10). Die *TGFβ1*-Expression in primären PSZ wurde durch Verteporfin moderat, aber signifikant reduziert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Jiang *et al.*, welche herausfanden, dass ein YAP-*Knockdown* die TGFβ1-Produktion von PSZ reduziert [166]. Demgegenüber stehen die Ergebnisse des YAP-*Knockdowns* mit siRNA an immortalisierten PSZ. Hier kam es zu einer signifikanten Zunahme der *TGFβ1*-Expression (siehe Abbildung 3.10). Die Ursache für diese Differenzen ist unklar.

CTGF (*engl. connective tissue growth factor*, auch CCN2) und CYR61 (*engl. cysteine rich angiogenic inducer 61*, auch CCN1) gehören beide zur CCN-Familie von EZM-Proteinen und haben strukturelle Ähnlichkeiten. CTGF ist wichtig für die Zelladhäsion und Migration, sowie die Proliferation und Angiogenese [201]. Es wird u. a. TGFβ1-abhängig von aktivierten PSZ produziert und kann wiederum PSZ aktivieren und deren Kollagensynthese stimulieren [136]. Auch die Expression von *CYR61* in PSZ wird durch TGFβ1 gefördert [202]. Von klinischer Relevanz ist CYR61 u. a., da Studien CYR61 ein Rolle in der Vermittlung der Gemcitabin-Resistenz des PDAC zusprechen [202]. Sowohl die Expression von *CTGF* als auch die von *CYR61* wird durch YAP reguliert [201]. Dennoch hatte Verteporfin keinen Einfluss auf die *CTGF*-Expression von PSZ der Ratte. *CYR61* wurde hingegen nach Behandlung mit Verteporfin sowohl in immortalisierten als auch in primären PSZ signifikant vermindert exprimiert. Dieser Effekt war mit einer etwas über 10%igen Reduktion der mRNA-Menge jedoch gering ausgeprägt. Eine YAP-Inhibition mit siRNA-Variante 2 führte zu einer deutlicheren Reduktion der *CYR61*-Expression auf 65 %. Auch die *CTGF*-Expression wurde durch einen YAP-*Knockdown* deutlich reduziert. Dies ist gut mit den Ergebnissen von Xiao *et al.* vereinbar, welche eine verminderte CTGF-Expression in humanen PSZ nach YAP-Inhibition beobachteten [169].

Über die Sekretion von MMP2 und MMP9 sowie deren Inhibitoren beeinflussen PSZ das Gleichgewicht aus EZM-Degradation und Synthese [108]. MMPs sind u. a. an der Pathogenese der CP sowie des PK beteiligt und insbesondere im PK-Gewebe in hoher Konzentration vorzufinden [203]. Wei *et al.* konnten nachweisen, dass Verteporfin die *MMP2*-Expression in PDAC Zellen hemmt [204]. In PSZ beeinflusste Verteporfin die Expression von *MMP2* und *MMP9* nicht signifikant. Ein YAP-*Knockdown* mit siRNA führte zwar teilweise zu einem Anstieg der Expression der MMPs, unspezifische Effekte der siRNA können dabei allerdings nicht ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.10).

#### 4.2.3.4 BESTÄTIGUNG AUSGEWÄHLTER ERGEBNISSE DER GENEXPRESSIONSANALYSE AUF PROTEINEBENE

Die Betrachtung der mRNA-Ebene zur Genexpressionsanalyse bietet sich u. a. an, weil Veränderungen der Genexpression auf dieser Stufe frühzeitig detektiert werden können. Entscheidend für die Funktion der untersuchten Gene sind allerdings die Proteine als Produkte der mRNA. Im Folgenden sollten deshalb ausgewählte Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf Proteinebene verifiziert werden.

##### NACHWEIS VON IL-6 MITTELS ELISA

Aufgrund der beobachteten Zunahme der *IL-6*-mRNA-Expression in mit YAP-Inhibitoren behandelten PSZ wurde im Folgenden die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand untersucht (siehe Abbildung 3.13). Diese ist ein Maß für die IL-6-Sekretion der PSZ. Verteporfin führte ab einer Konzentration von 500 nmol/l zu einem 34%igen Anstieg des IL-6-Gehaltes primärer PSZ. Die Tatsache, dass der IL-6-Gehalt erst ab einer zytotoxischen Konzentration von 500 nmol/l ansteigt, könnte man als Stressreaktion sterbender Zellen verstehen. An immortalisierten PSZ führten jedoch auch schon Verteporfin-Dosen von 100 nmol/l zu einem 50%igen Anstieg der *IL-6*-Expression auf mRNA-Ebene (siehe Abbildung 3.9). Dies konnte aufgrund einer zu geringen IL-6-Konzentration im Überstand nicht mittels ELISA verifiziert werden.
Auch bei den Versuchen mit siRNA an immortalisierten PSZ lagen viele der gemessenen Extinktionswerte im Bereich des Leerwertes, sodass keine Konzentration berechnet werden konnte. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Versuche zur *IL-6*-Expression auf mRNA-Ebene können die Daten dieser Versuche jedoch trotzdem verwertet werden. Bei den Genexpressionsanalysen an immortalisierten PSZ führte siRNA 2 zu einem starken Anstieg der *IL-6*-Expression gegenüber der Kontrolle und allen anderen eingesetzten siRNA-Varianten (siehe Abbildung 3.10). In den Versuchen zur IL-6-Sekretion konnten für alle Proben, welche mit siRNA 2 behandelt wurden, Extinktionswerte oberhalb des Leerwertes ermittelt werden. In Zusammenschau der Daten spricht das für die Hypothese, dass lediglich siRNA 2 dazu imstande war, die IL-6-Sekretion der PSZ so weit zu erhöhen, dass die IL-6-Konzentration im Überstand konstant oberhalb der Nachweisgrenze lag. Eine YAP-Inhibition in PSZ scheint also tendenziell zu einem Anstieg der IL-6-Sektretion zu führen.

##### NACHWEIS VON ALPHA-SMA, KOLLAGEN I UND YAP MITTELS WESTERN BLOT

Die Expression der zellulären Aktivierungsmarker Kollagen Typ I und $\alpha$-SMA sollte neben der mRNA-Ebene auch auf Proteinebene untersucht werden. Beim YAP-*Knockdown* in immortalisierten PSZ führte siRNA 1 zu einer Reduktion des $\alpha$-SMA-Gehaltes auf 55 % (siehe Abbildung 3.15) und war damit sogar wirksamer als es die Analyse der *ACTA2*-mRNA-

Spiegel (Reduktion auf 81 %) suggerierte. Die siRNA Variante 2 hatte keinen Effekt auf die Expression von α-SMA. Hingegen sorgte sie für eine Verdopplung der Kollagenexpression. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist aufgrund der auf mRNA-Ebene verminderten Kollagenexpression nach Behandlung mit siRNA 1 jedoch anzuzweifeln.

Verteporfin hatte weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene einen Einfluss auf die α-SMA-Expression primärer PSZ (siehe Abbildung 3.16). Die Expression von Kollagen wurde hingegen dosisabhängig vermindert. Eine signifikante Reduktion auf 64 % trat jedoch erst bei einer zytotoxischen Verteporfin-Dosis von 500 nmol/l auf. Betrachtet man die Ergebnisse der mRNA-Analyse, bewirkt Verteporfin in Dosierungen bis 100 nmol/l höchstens eine sehr schwache Hemmung der Kollagenexpression. Anders als es der Wirkmechanismus vermuten lässt, führte Verteporfin nicht zu einer Reduktion der YAP-Menge in PSZ.

#### 4.2.3.5 BEURTEILUNG DER AKTIVIERUNG VON PSZ AUF MORPHOLOGISCHER EBENE

Sowohl das Expressionsniveau der α-SMA-Filamente als auch der Gehalt an Lipidtröpfchen unterscheidet sich zwischen ruhenden und aktivierten PSZ (siehe Kapitel 1.1.2.1). Bereits nach 48 h in Kultur macht sich der Beginn des Aktivierungsprozesses durch einen Verlust Vitamin-A haltiger Lipidtröpfchen und die Expression von *α-SMA* bemerkbar [95]. Nach 6 Tagen in Kultur bilden PSZ deutliche α-SMA-Fasern aus [205]. Damit liefert die Betrachtung zytomorphologischer Parameter eine weitere Möglichkeit, den Grad der zellulären Aktivierung einzuschätzen.

##### FÄRBUNG VON ALPHA-SMA MITTELS IMMUNFLUORESZENZ UND LIPIDTRÖPFCHEN MIT ÖLROT

Um herauszufinden, ob eine YAP-Inhibition den Aktivierungsprozess aufhalten kann, wurden unpassagierte PSZ für 3 bzw. 6 Tage mit Verteporfin inkubiert (siehe Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19). Da immortalisierte PSZ phänotypisch bereits aktivierten PSZ entsprechen [206], wurden die Versuche nur an Primärzellen durchgeführt. An Tag 3 zeigte sich auf Ebene der *α-SMA*-Expression kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Nach 6 Tagen exprimierten die Zellen erwartungsgemäß mehr *α-SMA*. Verteporfin schien diesen Effekt jedoch leicht abzuschwächen, sodass nur die *α-SMA*-Expression der unbehandelten Zellen an Tag 6 im Vergleich zu Tag 3 signifikant erhöht war. Bei Betrachtung der Ausprägung der Lipidtröpfchen konnte nach 3 Tagen Inkubationszeit ebenfalls kein Unterschied zwischen behandelten Zellen und Kontrollzellen detektiert werden. Nach 6 Tagen kam es erwartungsgemäß zu einer Reduktion der intrazellulären Lipidtröpfchen. Verteporfin konnte diesen Prozess nicht abschwächen.

Die $\alpha$-*SMA*-Expression vollständig aktivierter PSZ wurde durch Verteporfin nicht beeinflusst (siehe Abbildung 3.18), was die Ergebnisse der Nukleinsäureanalytik mittels PCR und der Proteinanalytik mittels *Western-Blot* bestätigen. Auch auf den Gehalt an intrazellulären Lipidtröpfchen in vollständig aktivierten PSZ hatte Verteporfin keinen signifikanten Einfluss (siehe Abbildung 3.19).
Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz- und der Ölrot-Färbung, dass Verteporfin nicht dazu in der Lage ist, aktivierte PSZ in einen ruhenden Phänotyp zurückzuversetzen. Auch eine bei Betrachtung der Immunfluoreszenzversuche möglich scheinende Inhibition des Aktivierungsprozesses durch Verteporfin ist vor dem Hintergrund der Ölrot-Versuche kritisch zu sehen.

#### 4.2.3.6 ZELLMIGRATION

Neben den genannten morphologischen Charakteristika ist auch die verstärkte Zellmigration ein Zeichen aktivierter PSZ [206]. Durch den *scratch assay* (siehe Kapitel 2.2.11) kann die Bewegung von Zellfronten analysiert werden. Verteporfin führte in einer Dosierung von 100 nmol/l zu einer leichten Reduktion der Migrationsrate immortalisierter PSZ (siehe Abbildung 3.20 A). Dieser Effekt war statistisch jedoch nicht signifikant. Zudem muss an dieser Stelle kritisch angemerkt werden, dass die errechnete Migrationsrate kein Maß für die Zellmigration allein ist, da auch das Überwachsen des *scratches* durch Zellproliferation eine Rolle spielt. Da Verteporfin einerseits die Zellproliferation von PSZ hemmt (siehe Abbildung 3.5), könnte eine scheinbar verminderte Migration nur der Ausdruck einer verringerten Zellproliferation sein. Andererseits hatte Verteporfin keinen Einfluss auf die Migrationsrate primärer PSZ (siehe Abbildung 3.20 B). Da Verteporfin auch bei diesen Zellen eine suffiziente Reduktion der Zellproliferation bewirkt, scheint der Einfluss der Zellproliferation auf die errechnete Migrationsrate vernachlässigbar zu sein.
Insgesamt kann ein leichter inhibitorischer Effekt von Verteporfin auf die Zellproliferation immortalisierter PSZ also nicht ausgeschlossen, aber auch nicht ausreichend belegt werden. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

## 4.3 INTEGRATIVE BETRACHTUNGEN UND AUSBLICK

YAP konnte im Zuge der *in vivo* Versuche zur Pankreatitis weder im gesunden noch im akut geschädigten Pankreas angefärbt werden, sehr wohl aber im chronisch geschädigten Organ. Die Färbung trat im Bereich von azino-duktalen Metaplasien sowie periduktal auf und nahm mit Progress der Erkrankung zu. Dies spricht für Funktionen des Hippo-Signalwegs bei der CP und der Fibrogenese. Auch die Zunahme der TAZ-Färbung bei CP stützt diese Schlussfolgerung. Die eingangs formulierte These, dass YAP und TAZ im Rahmen einer CP vermehrt in fibrotischen Arealen des Pankreas exprimiert werden, kann also bejaht werden. Inwieweit der Hippo-Signalweg eine Rolle bei der Formation von azino-duktalen Metaplasien als möglichen Vorläufern eines PDAC spielt, bleibt offen und sollte in Zukunft untersucht werden.

PSZ werden entscheidende pathophysiologische Funktionen im Kontext der CP und des PK zugesprochen. Deshalb wurde im Folgenden die Funktion des Hippo-Signalwegs in diesen Zellen untersucht. Zunächst konnte die These verifiziert werden, dass TGF-$\beta$1 und IFN-$\gamma$ ihre Effekte auf PSZ entfalten, indem sie die Aktivität des Hippo-Signalwegs regulieren.

Im Folgenden sollte eine potenzielle Eignung von YAP als Therapieziel zur Abschwächung der fibrotischen Reaktion bei der CP und dem PK evaluiert werden. Dafür wurden die Effekte einer YAP-Inhibition auf PSZ untersucht. Die These, dass YAP-Inhibitoren die Proliferation von PSZ hemmen und deren Apoptose fördern, kann zum Teil bestätigt werden. Verteporfin führte im nanomolaren Bereich zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Zellproliferation, ohne jedoch die Apoptoserate zu beeinflussen. Die eingesetzten siRNA-Varianten führten zwar zu einer gesteigerten Apoptose, allerdings nicht zu einem signifikanten Anstieg der Zelltodrate. Auf die Zellproliferation hatte nur eine der eingesetzten siRNA-Varianten einen spezifischen inhibitorischen Effekt. Die Interpretation der Versuche mit siRNA wird dadurch erschwert, dass in vielen Versuchen nur eine der beiden spezifischen siRNA-Varianten einen Effekt hatte. Der Grund dafür ist unklar. Im Folgenden wird deshalb vermehrt auf die Effekte des Verteporfins eingegangen. Dieses findet bereits seit Jahren in der Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration klinische Anwendung am Menschen [172].

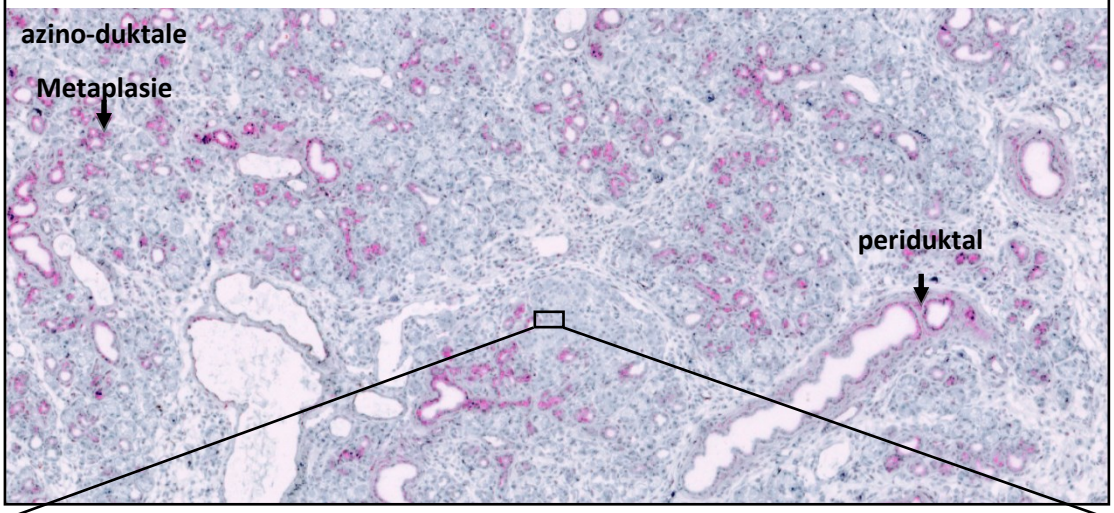
Bei Betrachtung der Genexpression fiel die signifikante Reduktion der *TGFB1*- und *CYR61*-Expression durch Verteporfin auf. Aufgrund der beschriebenen Funktionen der Proteine spricht das für eine antifibrotische Wirkung von Verteporfin und könnte darüber hinaus zu einer verminderten Chemoresistenz des PDAC beitragen [202]. Das profibrotisch wirkende IL-6 wird hingegen durch eine YAP-Inhibition tendenziell verstärkt exprimiert. Deshalb kann die These: „YAP-Inhibitoren senken die Expression profibrotischer Gene in PSZ“ nur teilweise bestätigt werden. Ob auf Ebene der Genexpression eine pro- oder antifibrotische Wirkung

von Verteporfin überwiegt, kann letztendlich nicht abschließend beantwortet werden. Als Limitation ist auch anzumerken, dass die Effekte des Verteporfins eher gering ausgeprägt waren. Ein interessanter Ansatz für Folgestudien könnte die simultane Inhibition mehrerer Signalwege in PSZ sein, um synergistische und damit deutlichere antifibrotische Effekte zu erzielen.

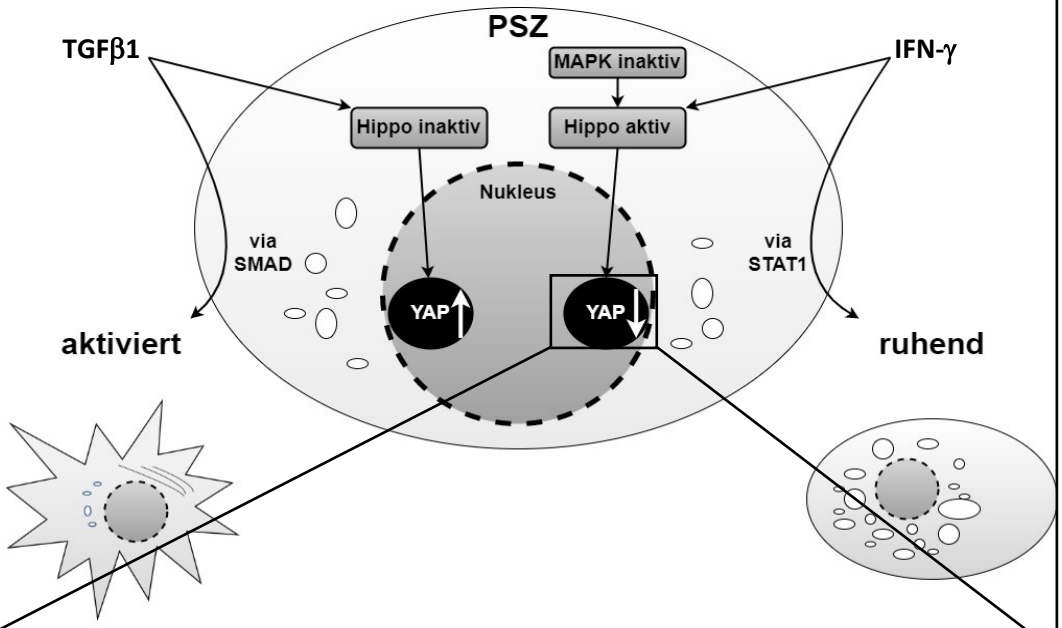
Viele Untersuchungen haben sich mit der Frage beschäftigt, ob man den Aktivierungsprozess von PSZ aufhalten oder die Aktivierung selbst rückgängig machen kann. Sherman *et al.* beschrieben, dass Calcipotriol aktivierte PSZ in den ruhenden Phänotyp zurückführen konnte [147]. Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe deuten jedoch darauf hin, dass die vollständige Aktivierung von PSZ nicht reversibel ist [148, 207]. Auch Verteporfin war nicht in der Lage, vollständig aktivierte PSZ in den ruhenden Phänotyp zurückzuversetzen. Eine mögliche Hemmung des Aktivierungsprozesses konnte ebenfalls nicht zweifelsfrei belegt werden, womit die These: „YAP-Inhibitoren hemmen die Aktivierung von PSZ“ nicht hinreichend bestätigt werden kann.

Dennoch ist Verteporfin weiterhin ein potenzieller Kandidat für die Therapie der CP bzw. des PK. Aktivierte PSZ nehmen wichtige Funktionen bei Wundheilungsprozessen wahr [100, 102]. Ein Vorteil des Verteporfins könnte daher das Verhindern einer überschießenden Zellproliferation ohne Beeinträchtigung der regenerativen Funktionen von PSZ sein. Ohnehin wird gegenwärtig nicht mehr die Depletion des Stromas, sondern eher dessen Modulation als therapeutischer Ansatz propagiert (siehe Kapitel 1.1.1.3). Da die Ergebnisse von PSZ der Ratte nicht ohne Weiteres auf humane PSZ übertragbar sind, sollten auch an diesen Zellen *in vitro* Studien durchgeführt werden. Zudem sollten die Effekte von Verteporfin *in vivo* überprüft werden. In Tiermodellen zur CP und zum PDAC könnten zunächst mittels histologischen Methoden Effekte des Verteporfins untersucht und sekundär die optimale Galenik ermittelt werden. Abbildung 4.1 fasst die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit graphisch zusammen.

**YAP-Färbung bei chronischer Pankreatitis**




**TGFβ1, IFN-γ und der MAPK-Signalweg beeinflussen die YAP-Aktivität**




**YAP-Inhibition durch Verteporfin**

| | Eigenschaft von PSZ | Effekt von Verteporfin (100 nmol/l) |
|---|---|---|
| **Zellproliferation und -viabilität** | Zellviabilität | – |
| | Apoptoserate | – |
| | Zellproliferation | ↓ |
| **Gen- und Proteinexpression** *statistisch nicht signifikant | *TGFβ1* | ↓ |
| | *CYR61* | ↓ |
| | *IL-6* | ↑* |
| **Aktivierung** | früher Aktivierungsprozess | ? |
| | vollständige Aktivierung | – |
| **Migration** | Zellmigration | – |

Abbildung 4.1: **Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse**

Oben: YAP-Färbung bei chronischer Pankreatitis. Zu erkennen ist die Färbung periduktal und im Bereich mutmaßlicher azino-duktaler Metaplasien. Zur Verdeutlichung des Färbemusters wurde die Farbsättigung in dieser Übersichtsdarstellung nachbearbeitet.

Mitte: Beeinflussung der YAP-Aktivität durch bekannte Regulatoren von PSZ. Während IFN-$\gamma$ und MAPK-Inhibitoren die YAP-Aktivität reduzieren, erhöht TGF-$\beta$1 die Aktivität von YAP, was für eine inaktive Hippo-Kinasekaskade spricht.

Unten: Tabellarische Übersicht der Auswirkungen einer YAP-Inhibition mittels Verteporfin auf PSZ.

# 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom sind schwerwiegende Erkrankungen, für die bisher keine kausalen Therapien existieren. Die abnorm gesteigerte Bindegewebsvermehrung (Fibrose) ist ein zentrales Element in der Entstehung beider Krankheiten. Die genauen Auswirkungen der Fibrose und sich daraus ergebende therapeutische Implikationen sind jedoch vielschichtig und bisher nur unzureichend verstanden. Pankreatische Sternzellen (PSZ) gelten als die hauptsächlichen Produzenten des fibrotischen Stromas. Obwohl Ihre Funktionen seit mittlerweile fast 25 Jahren intensiv erforscht werden, sind die Mechanismen der Aktivierung noch nicht vollständig aufgeklärt. In den letzten Jahren wurde in diesem Zusammenhang dem Hippo-Signalweg und insbesondere YAP als eine seiner Kernkomponenten eine steigende Aufmerksamkeit zuteil.

Das Ziel der Arbeit war es, zum besseren Verständnis der Funktionen des Hippo-Signalwegs in PSZ beizutragen und dessen Rolle im Kontext der chronischen Pankreatitis zu evaluieren. Letzteres wurde durch *in vivo* Studien an immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten von Mäusen und Ratten mit experimentell hervorgerufenen Pankreatitiden realisiert. Im Rahmen der chronischen Pankreatitis kam es im Bereich von azino-duktalen Metaplasien und periduktal zu einer YAP-Färbung, welche weder im gesunden Pankreas noch bei akuter Organschädigung zu beobachten war. Auch die bereits im gesunden Gewebe nachweisbare TAZ-Färbung nahm im chronisch geschädigten Organ zu. Insgesamt deutet dies auf eine Beteiligung des Hippo-Signalwegs bei der Entstehung der chronischen Pankreatitis und der Fibrose hin.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte durch *in vitro* Studien die Bedeutung des Signalwegs in PSZ der Ratte näher charakterisiert werden. Dabei kamen sowohl immortalisierte als auch primäre PSZ zur Anwendung. Zunächst wurde durch einen Reportergenassay überprüft, ob bekannte extrazelluläre Regulatoren von PSZ die Aktivität des Hippo-Signalwegs beeinflussen. Besonders interessant waren die Effekte der antagonistisch wirkenden Zytokine TGF-β1 und IFN-γ. Während TGF-β1 als Aktivator von PSZ die YAP-Aktivität erhöhte, verminderte IFN-γ als Inhibitor von PSZ die transkriptionelle Aktivität von YAP, was wiederum für eine Aktivierung der Hippo-Kinasekaskade spricht. Die Aktivität des Hippo-Signalwegs wird allerdings nicht nur durch extrazelluläre *Upstream*-Regulatoren beeinflusst, sondern auch durch intrazelluläre Signalwege. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Verknüpfung des MAPK-Signalwegs mit dem Hippo-Signalweg nahe, da eine Hemmung von MAP-Kinasen zu einer verminderten YAP-Aktivität führte.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass einige bekannte Regulatoren von PSZ die Aktivität von YAP und daher mutmaßlich des Hippo-Signalwegs beeinflussen. Im Folgenden sollten die Auswirkungen einer YAP-Inhibition auf die Funktionen von PSZ studiert wer-

den. Hierfür wurde YAP sowohl durch Verteporfin als auch durch spezifische siRNA-Varianten gehemmt. Der YAP-*Knockdown* mit siRNA hat jedoch nur an immortalisierten PSZ zufriedenstellend funktioniert. Verteporfin war bereits im nicht-zytotoxischen, nanomolaren Bereich in der Lage, die Proliferation von PSZ konzentrationsabhängig zu inhibieren. Auch die siRNA-Varianten führten tendenziell zu einer Abnahme der Proliferationsrate bei gleichzeitig leichter Steigerung der Apoptoserate. Verteporfin erhöhte den Anteil apoptotischer Zellen nicht. Auf mRNA-Ebene verminderte Verteporfin die Expression des profibrotischen *TGFB1* signifikant. Auch *CYR61*, welchem die Vermittlung einer erhöhten Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms zugeschrieben wird, wurde vermindert exprimiert. Die Expression des profibrotischen Zytokins IL-6 wurde hingegen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gesteigert, allerdings ohne statistische Signifikanz. Es lässt sich deshalb nicht abschließend beurteilen, ob auf Ebene der Gen- bzw. Proteinexpression die pro- oder antifibrotischen Effekte des Verteporfins überwiegen. Insgesamt waren die Effekte eher gering ausgeprägt. Die Wirkungen einer YAP-Inhibition mit siRNA auf die Gen- und Proteinexpression von PSZ waren aufgrund von unspezifischen Effekten und wechselnder Wirksamkeit der eingesetzten siRNA-Varianten nicht eindeutig.

Im nächsten Schritt sollte evaluiert werden, inwieweit Verteporfin vollständig aktivierte PSZ in den ruhenden Phänotyp überführen, bzw. den Aktivierungsprozess selbst abschwächen kann. Der Aktivierungszustand von PSZ wurde dabei anhand von morphologischen Kriterien eingeschätzt. Hierfür wurden $\alpha$-SMA-Fasern mittels Immunfluoreszenzfärbung und Lipidtröpfchen mittels Ölrot-Färbung dargestellt. Verteporfin konnte vollständig aktivierte PSZ nicht in den ruhenden Phänotyp zurückversetzen. Auch eine mögliche Hemmung des Aktivierungsprozesses selbst konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Auf die Zellmigration hatte Verteporfin keinen Effekt.

Insgesamt sollte der klinisch verfügbare Arzneistoff Verteporfin jedoch weiterhin als potenzieller Kandidat für die Therapie der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms betrachtet werden. Zwar konnte Verteporfin die Aktivierung von PSZ nicht aufhalten. Dies scheint jedoch vor dem Hintergrund der bekannten regenerativen Funktionen von PSZ und dem heutzutage propagierten Ansatz der Stroma-Modulation statt Stroma-Depletion kein Nachteil zu sein. So wäre es denkbar, dass Verteporfin eine überschießende Proliferation von PSZ verhindert, ohne deren regenerative Funktionen zu beeinträchtigen. In Zukunft sollten die *in vivo* Effekte von Verteporfin in Tiermodellen überprüft werden.

# 6. THESEN

1. Die Rolle des Stromas in der Pathophysiologie der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms wird trotz der intensiven Forschungsbemühungen der letzten Jahre weiterhin unzureichend verstanden.

2. Sowohl die chronische Pankreatitis als auch das Pankreaskarzinom bedürfen dringend neuer therapeutischer Ansätze, welche das Stroma als Therapieziel mit einbeziehen.

3. Der Fokus einer Therapie, welche das Stroma einschließt, sollte dabei eher auf einer Modulation statt auf einer Depletion des Stromas liegen.

4. Der Hippo-Signalweg ist ein vielversprechendes Therapieziel im Rahmen der Stroma-Modulation.

5. YAP eignet sich als einer der wichtigsten Effektoren des Hippo-Signalwegs am besten als therapeutischer Angriffspunkt.

6. TGF-ß1 und IFN-$\gamma$ entfalten ihre Effekte auf pankreatische Sternzellen zumindest teilweise, indem sie die Aktivität des Hippo-Signalwegs regulieren.

7. Eine Inhibition des MAPK-Signalwegs führt zu einer Verminderung der YAP-Aktivität in pankreatischen Sternzellen.

8. Verteporfin ist ein effektiver Inhibitor der Proliferation pankreatischer Sternzellen der Ratte *in vitro*.

9. Verteporfin beeinflusst die Apoptoserate von pankreatischen Sternzellen der Ratte *in vitro* nicht.

10. Verteporfin beeinflusst die Migration von pankreatischen Sternzellen der Ratte *in vitro* nicht.

11. Vollständig aktivierte pankreatische Sternzellen der Ratte lassen sich durch Verteporfin nicht in den ruhenden Phänotyp überführen.

12. Verteporfin hat das Potenzial, eine überschießende Proliferation pankreatischer Sternzellen zu verhindern, ohne deren regenerative Funktionen zu beeinträchtigen.

13. Um das volle therapeutische Potenzial von Verteporfin zu nutzen, sollten Kombinationstherapien mit weiteren Modulatoren pankreatischer Sternzellen untersucht werden.

14. In Zukunft sollten die Effekte von Verteporfin *in vivo* zunächst in Tiermodellen überprüft werden.

15. Um in Zukunft Durchbrüche in der Therapie der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms zu erzielen, sollten pankreatische Sternzellen noch intensiver als bisher erforscht werden.

# 7. LITERATUR


[1] Beyer G, Hoffmeister A, Michl P, et al. S3-Leitlinie Pankreatitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2021

[2] Xiao AY, Tan MLY, Wu LM, et al. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. The Lancet Gastroenterology & Hepatology 2016; 1: 45–55. doi:10.1016/S2468-1253(16)30004-8

[3] Yadav D, Timmons L, Benson JT, et al. Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: a population-based study. Am J Gastroenterol 2011; 106: 2192–2199. doi:10.1038/ajg.2011.328

[4] Völzke H, Lüdemann J, Mayerle J, et al. Prevalence and determinants of increased serum lipase levels in a general population. Pancreas 2008; 37: 411–417. doi:10.1097/MPA.0b013e31817f527d

[5] Machicado JD, Dudekula A, Tang G, et al. Period prevalence of chronic pancreatitis diagnosis from 2001-2013 in the commercially insured population of the United States. Pancreatology 2019; 19: 813–818. doi:10.1016/j.pan.2019.07.003

[6] Di Leo M, Leandro G, Singh SK, et al. Low Alcohol and Cigarette Use Is Associated to the Risk of Developing Chronic Pancreatitis. Pancreas 2017; 46: 225–229. doi:10.1097/MPA.0000000000000737

[7] World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018

[8] Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. Gastroenterology 2001; 120: 682–707. doi:10.1053/gast.2001.22586

[9] Conwell DL, Banks PA, Sandhu BS, et al. Validation of Demographics, Etiology, and Risk Factors for Chronic Pancreatitis in the USA: A Report of the North American Pancreas Study (NAPS) Group. Dig Dis Sci 2017; 62: 2133–2140. doi:10.1007/s10620-017-4621-z

[10] Jeon CY, Whitcomb DC, Slivka A, et al. Lifetime Drinking History of Persons With Chronic Pancreatitis. Alcohol Alcohol 2019; 54: 615–624. doi:10.1093/alcalc/agz072

[11] Lerch MM, Albrecht E, Ruthenbürger M, et al. Pathophysiology of alcohol-induced pancreatitis. Pancreas 2003; 27: 291–296. doi:10.1097/00006676-200311000-00003

[12] Witt H, Apte MV, Keim V, et al. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. Gastroenterology 2007; 132: 1557–1573. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.001

[13] Lévy P, Mathurin P, Roqueplo A, et al. A multidimensional case-control study of dietary, alcohol, and tobacco habits in alcoholic men with chronic pancreatitis. Pancreas 1995; 10: 231–238. doi:10.1097/00006676-199504000-00003

[14] Maisonneuve P, Lowenfels AB, Müllhaupt B, et al. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. Gut 2005; 54: 510–514. doi:10.1136/gut.2004.039263

[15] Talamini G, Bassi C, Falconi M, et al. Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Dig Dis Sci 1999; 44: 1303–1311. doi:10.1023/a:1026670911955

[16] Raphael KL, Willingham FF. Hereditary pancreatitis: current perspectives. Clin Exp Gastroenterol 2016; 9: 197–207. doi:10.2147/CEG.S84358

[17] Keller J, Layer P. Idiopathic chronic pancreatitis. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2008; 22: 105–113. doi:10.1016/j.bpg.2007.10.006

[18] Masamune A, Kikuta K, Hamada S, et al. Nationwide survey of hereditary pancreatitis in Japan. J Gastroenterol 2018; 53: 152–160. doi:10.1007/s00535-017-1388-0

[19] Rebours V, Boutron-Ruault M-C, Schnee M, et al. The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. Gut 2009; 58: 97–103. doi:10.1136/gut.2008.149179

[20] Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. Nat Genet 1996; 14: 141–145. doi:10.1038/ng1096-141

[21] Keim V, Bauer N, Teich N, et al. Clinical characterization of patients with hereditary pancreatitis and mutations in the cationic trypsinogen gene. The American Journal of Medicine 2001; 111: 622–626. doi:10.1016/S0002-9343(01)00958-5

[22] Sharer N, Schwarz M, Malone G, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. N Engl J Med 1998; 339: 645–652. doi:10.1056/NEJM199809033391001

[23] Witt H, Luck W, Hennies HC, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. Nat Genet 2000; 25: 213–216. doi:10.1038/76088

[24] Rosendahl J, Witt H, Szmola R, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. Nat Genet 2008; 40: 78–82. doi:10.1038/ng.2007.44

[25] Witt H, Beer S, Rosendahl J, et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. Nat Genet 2013; 45: 1216–1220. doi:10.1038/ng.2730

[26] Fjeld K, Weiss FU, Lasher D, et al. A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. Nat Genet 2015; 47: 518–522. doi:10.1038/ng.3249

[27] Lasher D, Szabó A, Masamune A, et al. Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis. Am J Gastroenterol 2019; 114: 974–983. doi:10.14309/ajg.0000000000000051

[28] Camara SN, Ramdany S, Zhao G, et al. Etiology, pathology, management and prognosis of chronic pancreatitis in Chinese population: A retrospective study. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2015; 35: 384–389. doi:10.1007/s11596-015-1442-1

[29] Jacob JJ, John M, Thomas N, et al. Does hyperparathyroidism cause pancreatitis? A South Indian experience and a review of published work. ANZ J Surg 2006; 76: 740–744. doi:10.1111/j.1445-2197.2006.03845.x

[30] Su W-J, Chen H-L, Lai H-S, et al. Pancreaticobiliary Anomalies is the Leading Cause of Childhood Recurrent Pancreatitis. Journal of the Formosan Medical Association 2007; 106: 119–125. doi:10.1016/S0929-6646(09)60227-8

[31] Yan M-X, Li Y-Q. Gall stones and chronic pancreatitis: the black box in between. Postgrad Med J 2006; 82: 254–258. doi:10.1136/pgmj.2005.037192

[32] Kirkegård J, Mortensen FV, Cronin-Fenton D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. Am J Gastroenterol 2017; 112: 1366–1372. doi:10.1038/ajg.2017.218

[33] Kleeff J, Whitcomb DC, Shimosegawa T, et al. Chronic pancreatitis. Nat Rev Dis Primers 2017; 3: 17060. doi:10.1038/nrdp.2017.60

[34] Lammert F, Lynen Jansen P, Lerch MM. Weissbuch Gastroenterologie 2020/2021. Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, der Leber und der Bauchspeicheldrüse – Gegenwart und Zukunft. Berlin/Boston: De Gruyter; 2019. doi:10.1515/9783110642513

[35] Klöppel G, Maillet B. The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1992; 420: 1–4. doi:10.1007/BF01605976

[36] Ellis I, Lerch MM, Whitcomb DC. Genetic testing for hereditary pancreatitis: guidelines for indications, counselling, consent and privacy issues. Vol. 1; 2001. doi:10.1159/000055840

[37] Singh VK, Yadav D, Garg PK. Diagnosis and Management of Chronic Pancreatitis: A Review. JAMA 2019; 322: 2422–2434. doi:10.1001/jama.2019.19411

[38] DiMagno EP, Go VL, Summerskill WH. Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. N Engl J Med 1973; 288: 813–815. doi:10.1056/NEJM197304192881603

[39] Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, et al. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. The Lancet Gastroenterology & Hepatology 2016; 1: 226–237. doi:10.1016/S2468-1253(16)30106-6

[40] Beyer G, Habtezion A, Werner J, et al. Chronic pancreatitis. The Lancet 2020; 396: 499–512. doi:10.1016/S0140-6736(20)31318-0

[41] Mayerle J, Hoffmeister A, Werner J, et al. Chronic pancreatitis--definition, etiology, investigation and treatment. Dtsch Arztebl Int 2013; 110: 387–393. doi:10.3238/arztebl.2013.0387

[42] Talamini G, Bassi C, Falconi M, Sartori N, Salvia R, Di Francesco V, Frulloni L, Vaona B, Bovo P, Vantini I, Pederzoli P, Cavallini G. Pain relapses in the first 10 years of chronic pancreatitis. Bd. 171; 1996. doi:10.1016/S0002-9610(97)89604-3

[43] Olesen SS, Kuhlmann L, Novovic S, et al. Association of multiple patient and disease characteristics with the presence and type of pain in chronic pancreatitis. J Gastroenterol Hepatol 2020; 35: 326–333. doi:10.1111/jgh.14783

[44] Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC, et al. Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. JAMA 2001; 286: 169–170. doi:10.1001/jama.286.2.169

[45] Issa Y, Kempeneers MA, Bruno MJ, et al. Effect of Early Surgery vs Endoscopy-First Approach on Pain in Patients With Chronic Pancreatitis: The ESCAPE Randomized Clinical Trial. JAMA 2020; 323: 237–247. doi:10.1001/jama.2019.20967

[46] Ahmed Ali U, Pahlplatz JM, Nealon WH, et al. Endoscopic or surgical intervention for painful obstructive chronic pancreatitis. Cochrane Database Syst Rev 2012; 1: CD007884. doi:10.1002/14651858.CD007884.pub2

[47] Kempeneers MA, Issa Y, Ali UA, et al. International consensus guidelines for surgery and the timing of intervention in chronic pancreatitis. Pancreatology 2020; 20: 149–157. doi:10.1016/j.pan.2019.12.005

[48] Lerch MM, Stier A, Wahnschaffe U, et al. Pancreatic pseudocysts: observation, endoscopic drainage, or resection? Dtsch Arztebl Int 2009; 106: 614–621. doi:10.3238/arztebl.2009.0614

[49] La Iglesia-García D de, Huang W, Szatmary P, et al. Efficacy of pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis: systematic review and meta-analysis. Gut 2017; 66: 1354–1355. doi:10.1136/gutjnl-2016-312529

[50] Bang UC, Benfield T, Hyldstrup L, Bendtsen F, Beck Jensen J-E. Mortality, cancer, and comorbidities associated with chronic pancreatitis: a Danish nationwide matched-cohort study. Vol. 146; 2014. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.033

[51] Lowenfels AB, Maisonneuve P, Dimagno EP, et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 442–446. doi:10.1093/jnci/89.6.442

[52] Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, et al. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2010; 24: 349–358. doi:10.1016/j.bpg.2010.02.007

[53] Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland | 2015/2016

[54] Wenzel P, Figura G von. Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms. Bd. 146. Dtsch Med Wochenschr. Basel, Freiburg Breisgau, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney: Thieme; 2021. doi:10.1055/a-1221-7306

[55] Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2009; 6: 699–708. doi:10.1038/nrgastro.2009.177

[56] Ye W, Lagergren J, Weiderpass E, et al. Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. Gut 2002; 51: 236–239. doi:10.1136/gut.51.2.236

[57] Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, et al. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. Br J Cancer 2005; 92: 2076–2083. doi:10.1038/sj.bjc.6602619

[58] Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. Br J Cancer 2003; 89: 519–523. doi:10.1038/sj.bjc.6601140

[59] Chung KM, Singh J, Lawres L, et al. Endocrine-Exocrine Signaling Drives Obesity-Associated Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cell 2020; 181: 832-847.e18. doi:10.1016/j.cell.2020.03.062

[60] Munigala S, Subramaniam DS, Subramaniam DP, et al. Incidence and Risk of Pancreatic Cancer in Patients with a New Diagnosis of Chronic Pancreatitis. Dig Dis Sci 2022; 67: 708–715. doi:10.1007/s10620-021-06886-7

[61] Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, et al. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2001; 7: 738–744

[62] Roberts NJ, Norris AL, Petersen GM, et al. Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. Cancer Discov 2016; 6: 166–175. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0402

[63] Benzel J, Fendrich V. Familial Pancreatic Cancer. Oncol Res Treat 2018; 41: 611–618. doi:10.1159/000493473

[64] Ying H, Dey P, Yao W, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes Dev 2016; 30: 355–385. doi:10.1101/gad.275776.115

[65] Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, et al. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. Neoplasia 2005; 7: 17–23. doi:10.1593/neo.04445

[66] Kim J-E, Lee KT, Lee JK, et al. Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. J Gastroenterol Hepatol 2004; 19: 182–186. doi:10.1111/j.1440-1746.2004.03219.x

[67] Homma T, Tsuchiya R. The study of the mass screening of persons without symptoms and of the screening of outpatients with gastrointestinal complaints or icterus for pancreatic cancer in Japan, using CA19-9 and elastase-1 or ultrasonography. Int J Pancreatol 1991; 9: 119–124. doi:10.1007/BF02925587

[68] Forsmark CE, Lambiase L, Vogel SB. Diagnosis of pancreatic cancer and prediction of unresectability using the tumor-associated antigen CA19-9. Pancreas 1994; 9: 731–734. doi:10.1097/00006676-199411000-00010

[69] Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 2.0, 2021, AWMF Registernummer: 032-010OL; 2021

[70] Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. N Engl J Med 2018; 379: 2395–2406. doi:10.1056/NEJMoa1809775

[71] Conroy Thierry, Desseigne Françoise, Ychou Marc, et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer 2011

[72] Hoff DD von, Ervin T, Arena FP, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. N Engl J Med 2013; 369: 1691–1703. doi:10.1056/NEJMoa1304369

[73] Golan T, Hammel P, Reni M, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. N Engl J Med 2019; 381: 317–327. doi:10.1056/NEJMoa1903387

[74] Hine RJ, Srivastava S, Milner JA, et al. Nutritional links to plausible mechanisms underlying pancreatic cancer: a conference report. Pancreas 2003; 27: 356–366. doi:10.1097/00006676-200311000-00014

[75] Kleeff J, Korc M, Apte M, et al. Pancreatic cancer. Nat Rev Dis Primers 2016; 2: 16022. doi:10.1038/nrdp.2016.22

[76] Jaster R, Emmrich J. Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2008; 22: 17–29. doi:10.1016/j.bpg.2007.10.004

[77] Apte MV, Wilson JS. Mechanisms of pancreatic fibrosis. Dig Dis 2004; 22: 273–279. doi:10.1159/000082799

[78] Gress T, Müller-Pillasch F, Elsässer HP, et al. Enhancement of transforming growth factor beta 1 expression in the rat pancreas during regeneration from caerulein-induced

pancreatitis. Eur J Clin Invest 1994; 24: 679–685. doi:10.1111/j.1365-2362.1994.tb01060.x

[79] Witt H. Pathogenese der chronischen Pankreatitis. Gastroenterologe 2014; 9: 6–13. doi:10.1007/s11377-013-0818-7

[80] Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, et al. The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. Curr Mol Med 2012; 12: 288–303. doi:10.2174/156652412799218921

[81] Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, et al. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. World J Gastroenterol 2014; 20: 11216–11229. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11216

[82] Jain T, Dudeja V. The war against pancreatic cancer in 2020 - advances on all fronts. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2021; 18: 99–100. doi:10.1038/s41575-020-00410-4

[83] Armstrong T, Packham G, Murphy LB, et al. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2004; 10: 7427–7437. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0825

[84] Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, et al. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. Int. J. Cancer 2000; 85: 14–20. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(20000101)85:1<14::AID-IJC3>3.0.CO;2-O

[85] Piersma B, Hayward MK, Weaver VM. Fibrosis and cancer: A strained relationship. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2020; 1873: 188356. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188356

[86] Schneiderhan W, Diaz F, Fundel M, et al. Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. J Cell Sci 2007; 120: 512–519. doi:10.1242/jcs.03347

[87] Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, et al. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012; 9: 454–467. doi:10.1038/nrgastro.2012.115

[88] Erkan M. Antifibrotic therapy in pancreatic diseases. Gut 2013; 62: 1244–1245. doi:10.1136/gutjnl-2012-303937

[89] Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. Gut 2013; 62: 112–120. doi:10.1136/gutjnl-2012-302529

[90] Ramanathan RK, McDonough SL, Philip PA, et al. Phase IB/II Randomized Study of FOLFIRINOX Plus Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase Versus FOLFIRINOX Alone in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: SWOG S1313. J Clin Oncol 2019; 37: 1062–1069. doi:10.1200/JCO.18.01295

[91] van Cutsem E, Tempero MA, Sigal D, et al. Randomized Phase III Trial of Pegvorhyaluronidase Alfa With Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Patients With Hyaluronan-High

Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. J Clin Oncol 2020; 38: 3185–3194. doi:10.1200/JCO.20.00590

[92] Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell 2014; 25: 735–747. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021

[93] Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. Cancer Cell 2014; 25: 719–734. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005

[94] Dominguez CX, Müller S, Keerthivasan S, et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals Stromal Evolution into LRRC15+ Myofibroblasts as a Determinant of Patient Response to Cancer Immunotherapy. Cancer Discov 2020; 10: 232–253. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0644

[95] Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. Front Physiol 2012; 3: 344. doi:10.3389/fphys.2012.00344

[96] Bachem MG, Schneider E, Groß H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. Gastroenterology 1998; 115: 421–432. doi:10.1016/S0016-5085(98)70209-4

[97] Erkan M, Adler G, Apte MV, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. Gut 2012; 61: 172–178. doi:10.1136/gutjnl-2011-301220

[98] Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. Okajimas Folia Anat Jpn 1982; 58: 837–858. doi:10.2535/ofaj1936.58.4-6_837

[99] Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 1998; 43: 128–133. doi:10.1136/gut.43.1.128

[100] Apte M, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer. Curr Opin Gastroenterol 2015; 31: 416–423. doi:10.1097/MOG.0000000000000196

[101] Masamune A, Shimosegawa T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. J Gastroenterol 2009; 44: 249–260. doi:10.1007/s00535-009-0013-2

[102] Kusiak AA, Szopa MD, Jakubowska MA, et al. Signaling in the Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Stellate Cells - a Brief Review of Recent Advances. Front Physiol 2020; 11: 78. doi:10.3389/fphys.2020.00078

[103] Xue R, Jia K, Wang J, et al. A Rising Star in Pancreatic Diseases: Pancreatic Stellate Cells. Front Physiol 2018; 9: 754. doi:10.3389/fphys.2018.00754

[104] Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K, et al. Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. J Mol Med (Berl) 2005; 83: 795–805. doi:10.1007/s00109-005-0680-2

[105] Sparmann G, Kruse M-L, Hofmeister-Mielke N, et al. Bone marrow-derived pancreatic stellate cells in rats. Cell Res 2010; 20: 288–298. doi:10.1038/cr.2010.10

[106] Ino K, Masuya M, Tawara I, et al. Monocytes infiltrate the pancreas via the MCP-1/CCR2 pathway and differentiate into stellate cells. PLoS One 2014; 9: e84889. doi:10.1371/journal.pone.0084889

[107] Cannon A, Thompson CM, Bhatia R, et al. Molecular mechanisms of pancreatic myofibroblast activation in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. J Gastroenterol 2021; 56: 689–703. doi:10.1007/s00535-021-01800-4

[108] Phillips PA, McCarroll JA, Park S, et al. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. Gut 2003; 52: 275–282. doi:10.1136/gut.52.2.275

[109] Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, et al. Pancreatic stellate cells express Toll-like receptors. J Gastroenterol 2008; 43: 352–362. doi:10.1007/s00535-008-2162-0

[110] Andoh A, Takaya H, Saotome T, Shimada M, Hata K, Araki Y, Nakamura F, Shintani Y, Fujiyama Y, Bamba T. Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts. Vol. 119; 2000. doi:10.1053/gast.2000.8538

[111] Shimizu K, Kobayashi M, Tahara J, et al. Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. Gastroenterology 2005; 128: 2105–2118. doi:10.1053/j.gastro.2005.03.025

[112] Shimizu K, Hashimoto K, Tahara J, et al. Pancreatic stellate cells do not exhibit features of antigen-presenting cells. Pancreas 2012; 41: 422–427. doi:10.1097/MPA.0b013e31822e673b

[113] Mato E, Lucas M, Petriz J, et al. Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. Biochemical Journal 2009; 421: 181–191. doi:10.1042/BJ20081466

[114] Zha M, Xu W, Zhai Q, et al. High glucose aggravates the detrimental effects of pancreatic stellate cells on Beta-cell function. Int J Endocrinol 2014; 2014: 165612. doi:10.1155/2014/165612

[115] Phillips PA, Yang L, Shulkes A, et al. Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 17397–17402. doi:10.1073/pnas.1000359107

[116] Ferdek PE, Jakubowska MA. Biology of pancreatic stellate cells-more than just pancreatic cancer. Pflugers Arch 2017; 469: 1039–1050. doi:10.1007/s00424-017-1968-0

[117] Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, et al. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. Clin Gastroenterol Hepatol 2009; 7: S48-54. doi:10.1016/j.cgh.2009.07.038

[118] Mews P, Phillips P, Fahmy R, et al. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. Gut 2002; 50: 535–541. doi:10.1136/gut.50.4.535

[119] Apte MV, Park S, Phillips PA, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. Pancreas 2004; 29: 179–187. doi:10.1097/00006676-200410000-00002

[120] Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. Gastroenterology 2005; 128: 907–921. doi:10.1053/j.gastro.2004.12.036

[121] Shi Y, Gao W, Lytle NK, et al. Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring. Nature 2019; 569: 131–135. doi:10.1038/s41586-019-1130-6

[122] Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, et al. Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance. Cancer Res 2008; 68: 7707–7710. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1132

[123] Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, et al. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. Cancer Res 2008; 68: 2085–2093. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2477

[124] Takikawa T, Masamune A, Yoshida N, et al. Exosomes Derived From Pancreatic Stellate Cells: MicroRNA Signature and Effects on Pancreatic Cancer Cells. Pancreas 2017; 46: 19–27. doi:10.1097/MPA.0000000000000722

[125] Karnevi E, Rosendahl AH, Hilmersson KS, et al. Impact by pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer cell invasion: Adding a third dimension in vitro. Exp Cell Res 2016; 346: 206–215. doi:10.1016/j.yexcr.2016.07.017

[126] Liu S-L, Cao S-G, Li Y, et al. Pancreatic stellate cells facilitate pancreatic cancer cell viability and invasion. Oncol Lett 2019; 17: 2057–2062. doi:10.3892/ol.2018.9816

[127] Sousa CM, Biancur DE, Wang X, et al. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. Nature 2016; 536: 479–483. doi:10.1038/nature19084

[128] Endo S, Nakata K, Ohuchida K, et al. Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth

of Pancreatic Tumors in Mice. Gastroenterology 2017; 152: 1492-1506.e24. doi:10.1053/j.gastro.2017.01.010

[129] Junliang L, Lili W, Xiaolong L, et al. High-molecular-weight hyaluronan produced by activated pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer cell migration via paracrine signaling. Biochem Biophys Res Commun 2019; 515: 493–498. doi:10.1016/j.bbrc.2019.05.167

[130] Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer. Gastroenterology 2010; 139: 1041-51, 1051.e1-8. doi:10.1053/j.gastro.2010.05.084

[131] Tjomsland V, Aasrum M, Christoffersen T, et al. Functional heterogeneity in tumor-derived human pancreatic stellate cells: Differential expression of HGF and implications for mitogenic signaling and migration in pancreatic cancer cells. Oncotarget 2017; 8: 71672–71684. doi:10.18632/oncotarget.17800

[132] Charrier A, Chen R, Chen L, et al. Connective tissue growth factor (CCN2) and microRNA-21 are components of a positive feedback loop in pancreatic stellate cells (PSC) during chronic pancreatitis and are exported in PSC-derived exosomes. J Cell Commun Signal 2014; 8: 147–156. doi:10.1007/s12079-014-0220-3

[133] McCarroll JA, Phillips PA, Park S, et al. Pancreatic stellate cell activation by ethanol and acetaldehyde: is it mediated by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway? Pancreas 2003; 27: 150–160. doi:10.1097/00006676-200308000-00008

[134] Ellenrieder V, Schneiderhan W, Bachem M, et al. Fibrogenesis in the pancreas. Rocz Akad Med Bialymst 2004; 49: 40–46

[135] Ohnishi H, Miyata T, Yasuda H, et al. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. J Biol Chem 2004; 279: 8873–8878. doi:10.1074/jbc.M309698200

[136] Gao R, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor. Gastroenterology 2005; 129: 1019–1030. doi:10.1053/j.gastro.2005.06.067

[137] Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, et al. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. Gut 2002; 51: 579–584. doi:10.1136/gut.51.4.579

[138] McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, et al. Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-kinase) pathway. Biochem Pharmacol 2004; 67: 1215–1225. doi:10.1016/j.bcp.2003.11.013

[139] Li X, Wang Z, Ma Q, et al. Sonic hedgehog paracrine signaling activates stromal cells to promote perineural invasion in pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2014; 20: 4326–4338. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3426

[140] Komar HM, Serpa G, Kerscher C, et al. Inhibition of Jak/STAT signaling reduces the activation of pancreatic stellate cells in vitro and limits caerulein-induced chronic pancreatitis in vivo. Sci Rep 2017; 7: 1787. doi:10.1038/s41598-017-01973-0

[141] Nomiyama Y, Tashiro M, Yamaguchi T, et al. High glucose activates rat pancreatic stellate cells through protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase pathway. Pancreas 2007; 34: 364–372. doi:10.1097/MPA.0b013e31802f0531

[142] Fels B, Nielsen N, Schwab A. Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of murine pancreatic stellate cells. Eur Biophys J 2016; 45: 657–670. doi:10.1007/s00249-016-1176-4

[143] Chronopoulos A, Robinson B, Sarper M, et al. ATRA mechanically reprograms pancreatic stellate cells to suppress matrix remodelling and inhibit cancer cell invasion. Nat Commun 2016; 7: 12630. doi:10.1038/ncomms12630

[144] Jaster R, Hilgendorf I, Fitzner B, et al. Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-trans retinoic acid. Biochem Pharmacol 2003; 66: 633–641. doi:10.1016/S0006-2952(03)00390-3

[145] McCarroll JA, Phillips PA, Santucci N, et al. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. Gut 2006; 55: 79–89. doi:10.1136/gut.2005.064543

[146] Xiao W, Jiang W, Shen J, et al. Retinoic Acid Ameliorates Pancreatic Fibrosis and Inhibits the Activation of Pancreatic Stellate Cells in Mice with Experimental Chronic Pancreatitis via Suppressing the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway. PLoS One 2015; 10: e0141462. doi:10.1371/journal.pone.0141462

[147] Sherman MH, Yu RT, Engle DD, et al. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. Cell 2014; 159: 80–93. doi:10.1016/j.cell.2014.08.007

[148] Wallbaum P, Rohde S, Ehlers L, et al. Antifibrogenic effects of vitamin D derivatives on mouse pancreatic stellate cells. World J Gastroenterol 2018; 24: 170–178. doi:10.3748/wjg.v24.i2.170

[149] Campisi J, Di d'Adda Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 729–740. doi:10.1038/nrm2233

[150] Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. Nat Rev Cancer 2013; 13: 246–257. doi:10.1038/nrc3458

[151] Casati G, Giunti L, Iorio AL, et al. Hippo Pathway in Regulating Drug Resistance of Glioblastoma. Int J Mol Sci 2021; 22. doi:10.3390/ijms222413431

[152] Ma S, Meng Z, Chen R, et al. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. Annu Rev Biochem 2019; 88: 577–604. doi:10.1146/annurev-biochem-013118-111829

[153] Bao Y, Nakagawa K, Yang Z, et al. A cell-based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. J Biochem 2011; 150: 199–208. doi:10.1093/jb/mvr063

[154] Mao W, Mai J, Peng H, et al. YAP in pancreatic cancer: oncogenic role and therapeutic strategy. Theranostics 2021; 11: 1753–1762. doi:10.7150/thno.53438

[155] Hong W, Guan K-L. The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. Semin Cell Dev Biol 2012; 23: 785–793. doi:10.1016/j.semcdb.2012.05.004

[156] Pocaterra A, Romani P, Dupont S. YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. J Cell Sci 2020; 133. doi:10.1242/jcs.230425

[157] Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. FEBS J 2006; 273: 4264–4276. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05427.x

[158] Ansari D, Ohlsson H, Althini C, et al. The Hippo Signaling Pathway in Pancreatic Cancer. Anticancer Res 2019; 39: 3317–3321. doi:10.21873/anticanres.13474

[159] Zhao B, Ye X, Yu J, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. Genes Dev 2008; 22: 1962–1971. doi:10.1101/gad.1664408

[160] Vassilev A, Kaneko KJ, Shu H, et al. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. Genes Dev 2001; 15: 1229–1241. doi:10.1101/gad.888601

[161] Tapon N, Harvey KF, Bell DW, et al. salvador Promotes Both Cell Cycle Exit and Apoptosis in Drosophila and Is Mutated in Human Cancer Cell Lines. Cell 2002; 110: 467–478. doi:10.1016/S0092-8674(02)00824-3

[162] Diep CH, Zucker KM, Hostetter G, et al. Down-regulation of Yes Associated Protein 1 expression reduces cell proliferation and clonogenicity of pancreatic cancer cells. PLoS One 2012; 7: e32783. doi:10.1371/journal.pone.0032783

[163] Justice RW, Zilian O, Woods DF, et al. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. Genes Dev 1995; 9: 534–546. doi:10.1101/gad.9.5.534

[164] Wang C, Zhu X, Feng W, et al. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3σ sequestering YAP in the cytoplasm. Am J Cancer Res 2016; 6: 27–37

[165] Tamura T, Kodama T, Sato K, et al. Dysregulation of PI3K and Hippo signaling pathways synergistically induces chronic pancreatitis via CTGF upregulation. J Clin Invest 2021; 131. doi:10.1172/JCI143414

[166] Jiang Z, Zhou C, Cheng L, et al. Inhibiting YAP expression suppresses pancreatic cancer progression by disrupting tumor-stromal interactions. J Exp Clin Cancer Res 2018; 37: 69. doi:10.1186/s13046-018-0740-4

[167] Wang M-T, Fer N, Galeas J, et al. Blockade of leukemia inhibitory factor as a therapeutic approach to KRAS driven pancreatic cancer. Nat Commun 2019; 10: 3055. doi:10.1038/s41467-019-11044-9

[168] Morvaridi S, Dhall D, Greene MI, et al. Role of YAP and TAZ in pancreatic ductal adenocarcinoma and in stellate cells associated with cancer and chronic pancreatitis. Sci Rep 2015; 5: 16759. doi:10.1038/srep16759

[169] Xiao Y, Zhang H, Ma Q, et al. YAP1-mediated pancreatic stellate cell activation inhibits pancreatic cancer cell proliferation. Cancer Lett 2019; 462: 51–60. doi:10.1016/j.canlet.2019.07.015

[170] Gibault F, Corvaisier M, Bailly F, et al. Non-Photoinduced Biological Properties of Verteporfin. Curr Med Chem 2016; 23: 1171–1184. doi:10.2174/0929867323666160316125048

[171] Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. Genes Dev 2012; 26: 1300–1305. doi:10.1101/gad.192856.112

[172] Fenton C, Perry CM. Verteporfin: a review of its use in the management of subfoveal choroidal neovascularisation. Drugs Aging 2006; 23: 421–445. doi:10.2165/00002512-200623050-00006

[173] Wei C, Li X. Verteporfin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in different subtypes of breast cancer cell lines without light activation. BMC Cancer 2020; 20: 1042. doi:10.1186/s12885-020-07555-0

[174] Mohede DCJ, Jong IJ de, Bank RA, et al. Verteporfin as a Medical Treatment in Peyronie's Disease. Sex Med 2018; 6: 302–308. doi:10.1016/j.esxm.2018.08.002

[175] Saw PE, Song E-W. siRNA therapeutics: a clinical reality. Sci China Life Sci 2020; 63: 485–500. doi:10.1007/s11427-018-9438-y

[176] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 2000; 404: 293–296. doi:10.1038/35005107

[177] Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Caerulein-Induced Acute Necrotizing Pancreatitis in Mice; Protective Effects of Proglumide Benzotript, and Secretin. Gastroenterology 1985; 88: 1192–1204. doi:10.1016/S0016-5085(85)80079-2

[178] Müller S, Kaiser H, Krüger B, et al. Age-dependent effects of UCP2 deficiency on experimental acute pancreatitis in mice. PLoS One 2014; 9: e94494. doi:10.1371/journal.pone.0094494

[179] Sparmann G, Merkord J, Jaschke A, et al. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. Gastroenterology 1997; 112: 1664–1672. doi:10.1016/s0016-5085(97)70049-0

[180] Rieckeheer KL. Ätiologie der chronischen Pankreatitis - Ein immunologischer Ansatz [Dissertation]. Rostock: Universität Rostock; 2012

[181] Walther MC. Untersuchungen zur Termination der Fibrogenese im Pankreas durch Seneszenz pankreatischer Sternzellen [Dissertation]. Rostock: Universität Rostock; 2015

[182] Kanno H, Nose M, Itoh J, et al. Spontaneous development of pancreatitis in the MRL/Mp strain of mice in autoimmune mechanism. Clin Exp Immunol 1992; 89: 68–73. doi:10.1111/j.1365-2249.1992.tb06879.x

[183] Ehlers L. Tierexperimentelle Studien zur Übertragung der murinen Autoimmunpankreatitis durch adoptiven Zelltransfer. Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizinwissenschaften (doctor rerum humanarum, Dr. rer. hum.) der Universitätsmedizin Rostock. Rostock: Universität Rostock; 2018

[184] Sparmann G, Hohenadl C, Tornøe J, et al. Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 287: G211-9. doi:10.1152/ajpgi.00347.2003

[185] Lifeome. Certificate of Analysis. Stimulight Hippo Pathway trans-reporting system 2021

[186] Wilke M, Fortunati E, van den Broek M, et al. Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. Gene Ther 1996; 3: 1133–1142

[187] Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. J Immunol Methods 1985; 82: 169–179. doi:10.1016/0022-1759(85)90236-4

[188] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Bd. 162; 1987. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2

[189] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680–685. doi:10.1038/227680a0

[190] Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. J Cell Biol 1999; 144: 1235–1244. doi:10.1083/jcb.144.6.1235

[191] Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, et al. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. J Invest Dermatol 2017; 137: e11-e16. doi:10.1016/j.jid.2016.11.020

[192] Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. Nat Rev Mol Cell Biol 2019; 20: 211–226. doi:10.1038/s41580-018-0086-y

[193] Lenggenhager D, Amrutkar M, Sántha P, et al. Commonly Used Pancreatic Stellate Cell Cultures Differ Phenotypically and in Their Interactions with Pancreatic Cancer Cells. Cells 2019; 8. doi:10.3390/cells8010023

[194] Marx V. Cell-line authentication demystified. Nat Methods 2014; 11: 483–488. doi:10.1038/nmeth.2932

[195] Mathison A, Liebl A, Bharucha J, et al. Pancreatic Stellate Cell Models for Transcriptional Studies of Desmoplasia-Associated Genes. Pancreatology 2010; 10: 505–516. doi:10.1159/000320540

[196] Apte MV, Haber PS, Darby SJ, et al. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. Gut 1999; 44: 534–541. doi:10.1136/gut.44.4.534

[197] Baumert J-T, Sparmann G, Emmrich J, et al. Inhibitory effects of interferons on pancreatic stellate cell activation. World J Gastroenterol 2006; 12: 896–901. doi:10.3748/wjg.v12.i6.896

[198] Hu C, Yang J, Su H-Y, et al. Yes-Associated Protein 1 Plays Major Roles in Pancreatic Stellate Cell Activation and Fibroinflammatory Responses. Front Physiol 2019; 10: 1467. doi:10.3389/fphys.2019.01467

[199] Masamune A, Satoh M, Kikuta K, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase blocks activation of rat pancreatic stellate cells. J Pharmacol Exp Ther 2003; 304: 8–14. doi:10.1124/jpet.102.040287

[200] Aoki H, Ohnishi H, Hama K, et al. Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. J Cell Biochem 2006; 99: 221–228. doi:10.1002/jcb.20906

[201] Brodowska K, Al-Moujahed A, Marmalidou A, et al. The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth in vitro without light activation. Exp Eye Res 2014; 124: 67–73. doi:10.1016/j.exer.2014.04.011

[202] Hesler RA, Huang JJ, Starr MD, et al. TGF-β-induced stromal CYR61 promotes resistance to gemcitabine in pancreatic ductal adenocarcinoma through downregulation of the nucleoside transporters hENT1 and hCNT3. Carcinogenesis 2016; 37: 1041–1051. doi:10.1093/carcin/bgw093

[203] Lekstan A, Lampe P, Lewin-Kowalik J, et al. Concentrations and activities of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors (TIMPS) in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. J Physiol Pharmacol 2012; 63: 589–599

[204] Wei H, Wang F, Wang Y, et al. Verteporfin suppresses cell survival, angiogenesis and vasculogenic mimicry of pancreatic ductal adenocarcinoma via disrupting the YAP-TEAD complex. Cancer Sci 2017; 108: 478–487. doi:10.1111/cas.13138

[205] Manapov F, Muller P, Rychly J. Translocation of p21(Cip1/WAF1) from the nucleus to the cytoplasm correlates with pancreatic myofibroblast to fibroblast cell conversion. Gut 2005; 54: 814–822. doi:10.1136/gut.2003.036491

[206] Omary MB, Lugea A, Lowe AW, et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. J Clin Invest 2007; 117: 50–59. doi:10.1172/JCI30082

[207] Elsner A, Lange F, Fitzner B, et al. Distinct antifibrogenic effects of erlotinib, sunitinib and sorafenib on rat pancreatic stellate cells. World J Gastroenterol 2014; 20: 7914–7925. doi:10.3748/wjg.v20.i24.7914

# 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|---|
| AIP | autoimmune Pankreatitis |
| AO | Acridinorange |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATRA | all-trans-Retinsäure, engl. *all-trans-retinoic acid* |
| BrdU | 5-Brom-2-desoxyuridin |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CCK | Cholezystokinin |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CP | chronische Pankreatitis |
| CTGF | engl. *connective tissue growth factor*, auch CCN2 |
| Ct-Wert | Schwellenwertzyklus |
| CYR61 | engl. *cysteine rich angiogenic inducer 61*, auch CCN1 |
| DAPI | 4′,6-Diamidin-2-phenylindol |
| DBD | DNA-bindende Domäne |
| DBTC | Dibutylzinndichlorid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ELISA | engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* |
| EMT | epithelial-mesenchymale Transition |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FPC | familiäres Pankreaskarzinom, engl. *familial pancreatic cancer* |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GBE | Gal4-bindendes Element |
| ggf. | gegebenenfalls |
| h | Stunde, Stunden |

| | |
|---|---|
| HGF | Hepatozyten-Wachstumsfaktor, engl. *hepatocyte growth factor* |
| HP | hereditäre Pankreatitis |
| HPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| HRP | Meerrettichperoxidase, engl. *horseradish peroxidase* |
| IFN-γ | Interferon-γ |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IPMN | intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie |
| KG | Körpergewicht |
| KM-CT | Computertomographie mit Kontrastmittel |
| LATS1/2 | engl. *large tumor suppressor kinase 1/2* |
| LIF | Leukämiehemmender Faktor, engl. *leukemia inhibitory factor* |
| MCN | muzinös-zystische Neoplasie |
| MGB | engl. *minor groove binder* |
| min | Minute, Minuten |
| MMPs | Matrix-Metalloproteasen |
| MOBKL1 | engl. *mps one binder kinase activator-like 1* |
| mRNA | Boten-RNA, engl. *messenger-RNA* |
| MST1/2 | engl. *mammalian sterile 20-like kinase 1/2* |
| nf-$H_2O$ | nukleasefreies Wasser |
| OD | optische Dichte |
| o. g. | oben genannt |
| PAMPs | engl. *pathogen associated molecular patterns* |
| PanIN | pankreatische intraepitheliale Neoplasie |
| PBS | engl. *phosphate buffered saline* |
| PDAC | duktales Adenokarzinom des Pankreas |
| PK | Pankreaskarzinom |
| POD | Peroxidase |

| | |
|---|---|
| PSZ | pankreatische Sternzellen |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| qPCR | quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, engl. *Real-Time* PCR |
| rDNase I | rekombinante DNase I |
| RISC | engl. *RNA-induced silencing complex* |
| Rpm | Umdrehungen pro Minute, engl. *rotations per minute* |
| SAV1 | salvador homolog 1 |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* |
| sek | Sekunden |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes, engl. *standard error of the mean* |
| SFM | Standardfehlers des Medians |
| SPARC | engl. *secreted protein acidic and cysteine rich* |
| TA | Transaktivierungsdomäne |
| TAZ | engl. *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* |
| TBS | engl. *Tris-buffered saline* |
| TEAD | engl. *transcriptional enhanced associate domain* |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF-β1 | engl. *Transforming Growth Factor β1* |
| TIMPs | engl. *tissue inhibtors of metalloproteinases* |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| u. a. | unter anderem |
| UV | ultravioletter Frequenzbereich |
| v. a. | vor allem |
| V. a. | Verdacht auf |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation, engl. *World Health Organization* |
| YAP | engl. *yes-associated protein* |
| α-SMA | Alpha-2-Aktin, engl. *alpha smooth muscle actin* |

# 9. HERSTELLERVERZEICHNIS

Tabelle 30: **Herstellerverzeichnis**

| Hersteller | Firmensitz |
|---|---|
| Agilent Technologies | Santa Clara, Kalifornien, USA |
| American Can Company | New York City, New York, USA |
| Andreas Hettich GmbH | Tuttlingen, Baden-Württemberg, Deutschland |
| Anthos Labtec Instruments GmbH | Salzburg, Salzburg, Österreich |
| AppliChem GmbH | Darmstadt, Hessen, Deutschland |
| Armin Baack | Schwerin, Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland |
| Biochrom GmbH | Berlin, Berlin, Deutschland |
| BioLegend | San Diego, Kalifornien, USA |
| Biometra GmbH | Jena, Thüringen, Deutschland |
| Bio-Rad Laboratories Inc. | Hercules, Kalifornien, USA |
| Biorbyt | Cambridge, Cambridgeshire, England |
| Bio & Sell GmbH | Feucht, Bayern, Deutschland |
| Bio-Techne GmbH | Wiesbaden, Hessen, Deutschland |
| Calbiochem | Bad Soden, Hessen, Deutschland |
| Carl Roth GmbH & Co. KG | Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland |
| Carl Zeiss AG | Oberkochen, Baden-Württemberg, Deutschland |
| Cell Signaling Technology | Danvers, Massachusetts, USA |
| Charles River Laboratories | Sulzfeld, Bayern, Deutschland |
| ChemoMetec | Kaiserslautern, Rheinland-Pfalz, Deutschland |
| Dako GmbH | Jena, Thüringen, Deutschland |
| Dynatech | Chemnitz, Sachsen, Deutschland |
| Eppendorf AG | Hamburg, Hamburg, Deutschland |
| Eurogentec | Seraing, Wallonien, Belgien |
| F. Hoffmann-La Roche AG | Basel, Basel-Stadt, Schweiz |
| Gesellschaft für Labortechnik mbH | Burgwedel, Niedersachsen, Deutschland |
| Greiner Bio One International GmbH | Kremsmünster, Oberösterreich, Österreich |
| Heidolph Instruments | Schwabach, Bayern, Deutschland |
| Honeywell Riedel-de-Haën | Seelze, Niedersachsen, Deutschland |
| IKA-Werke GmbH & Co.KG | Staufen im Breisgau, Baden-Württemberg, Deutschland |
| ImmunoTools GmbH | Frisoythe, Niedersachsen, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Implen Inc. | Westlake Village, Kalifornien, USA |
| Intas Pharmaceuticals Ltd. | Ahmedabad, Gujarat, Indien |
| Integra Biosciences AG | Zizers, Graubünden, Schweiz |
| J. T. Baker | Center Valley, Pennsylvania, USA |
| Karl Hecht GmbH & Co. KG | Sondheim vor der Rhön, Bayern, Deutschland |
| Labortechnik Fröbel GmbH | Lindau, Bayern, Deutschland |
| Leica Biosystems | Nußloch, Baden-Württemberg, Deutschland |
| Leica Camera AG | Wetzlar, Hessen, Deutschland |
| LI-COR Biosciences | Lincoln, Nebraska, USA |
| Liebherr | Bulle, Freiburg, Schweiz |
| Lifeome | Oceanside, Kalifornien, USA |
| Medite GmbH | Burgdorf, Niedersachsen, Deutschland |
| Merck KGaA | Darmstadt, Hessen, Deutschland |
| Mettler-Toledo Inc. | Columbus, Ohio, USA |
| Morphisto | Offenbach am Main, Hessen, Deutschland |
| PAA Laboratories Inc. | Pasching, Oberösterreich, Österreich |
| Paul Marienfeld GmbH & Co. KG | Lauda-Königshofen, Baden-Württemberg, Österreich |
| PEQLAB Biotechnologie | Erlangen, Bayern, Deutschland |
| Promega | Madison, Wisconsin, USA |
| RCI Labscan | Bangkok, Bangkok, Thailand |
| Riboxx GmbH | Radebeul, Sachsen, Deutschland |
| Robert Bosch GmbH | Stuttgart, Baden-Württemberg, Deutschland |
| Rockland Immunochemicals Inc. | Limerick, Pennsylvania, USA |
| Sanyo Denki GmbH | Eschborn, Hessen, Deutschland |
| Scotsman Ice Systems | Vernon Hills, Illinois, USA |
| Selleck Chemicals LLC | Houston, Texas, USA |
| Serva Electrophoresis GmbH | Heidelberg, Baden-Württemberg, Deutschland |
| Sigma-Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, Massachusetts, USA |
| Vector Laboratories | Burlingame, California, USA |
| VWR International | Radnor, Pennsylvania, USA |
| Walter-CMP GmbH | Kiel, Schleswig-Holstein, Deutschland |

# 10. LEBENSLAUF

**PERSÖNLICHE DATEN**

| | |
|---|---|
| Name: | Lennard Spanehl |
| Geburtsdatum: | 06.01.1998 |
| Geburtsort: | Leipzig |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch |

**SCHULE**

| | |
|---|---|
| 09/2004 – 07/2006 | Johann-Strauß-Grundschule (Berlin) |
| 09/2006 – 07/2008 | Mahlsdorfer Grundschule (Berlin) |
| 09/2008 – 07/2015 | Melanchthon-Gymnasium (Berlin) |

**UNIVERSITÄT**

10/2015 – 11/2021 **Studium der Humanmedizin**

Universitätsmedizin Rostock

| | |
|---|---|
| 09/2017 | 1. Staatsexamen |
| 10/2020 | 2. Staatsexamen |
| 11/2022 | 3. Staatsexamen |

04/2018 – dato **Promotionsvorhaben**

Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Innere Medizin II

Abt. Gastroenterologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Robert Jaster

<u>Extrakurrikulare Aktivitäten und Auszeichnungen</u>

| | |
|---|---|
| 01/2016 | Buchpreis Medizinische Biologie (Universität Rostock) |
| 10/2016 | Buchpreis Anatomie (Universität Rostock) |
| 09/2019 | Wahlfach: Summer School „Osteosynthese“ |
| 01/2019 – 07/2020 | Studentische Hilfskraft Forschungslabor Gastroenterologie |
| 09/2019 – 05/2020 | Fakultatives Wahlfach: Englisch C1.1 Fachkommunikation Medizin M1 |
| 10/2021 – 02/2022 | Fakultatives Wahlfach: Englisch C1.2 Fachkommunikation Medizin M3 |

**ÄRZTLICHE WEITERBILDUNG**

02/2022 – dato **Assistenzarzt**

Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

# 11. VERÖFFENTLICHUNGEN

Kongressbeiträge:

Posterbeitrag auf der 51. Jahrestagung des *European Pancreatic Club* in Bergen/Norwegen:

Spanehl, Lennard; Jaster, Robert (2019): The hippo pathway regulates pancreatic stellate cell proliferation and synthesis of extracellular matrix in a transforming growth factor-β1- and interferon-γ-dependent manner.

Posterbeitrag auf der 39. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub in Göttingen:

Spanehl, Lennard; Jaster, Robert (2019): Der Hippo-Signalweg reguliert die Proliferation und Matrixproteinsyntheseleistung pankreatischer Sternzellen.

Publikationen:

Spanehl, Lennard; Jaster, Robert (2019): The hippo pathway regulates pancreatic stellate cell proliferation and synthesis of extracellular matrix in a transforming growth factor-β1- and interferon-γ-dependent manner. In: Pancreatology, Volume 19, Supplement 1, S. 24. DOI: 10.1016/j.pan.2019.05.054.

Spanehl, Lennard; Revskij, Denis; Bannert, Karen; Ehlers, Luise; Jaster, Robert (2022): YAP activates pancreatic stellate cells and enhances pancreatic fibrosis. In: Hepatobiliary & pancreatic diseases international, HBPD INT, 21(6), 583–589. DOI: 10.1016/j.hbpd.2022.06.004.

# 12. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.
Ein herausragender Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Robert Jaster, der mich im Rahmen einer Vorlesung für eine experimentelle Arbeit begeistern konnte. Neben der offenen und stets freundlichen Atmosphäre im Labor möchte ich in besonderem Maße die exzellente Betreuung in den letzten Jahren hervorheben. Die regelmäßigen Besprechungen und Ratschläge sowie die stets unverzügliche Korrektur der eingereichten Abschnitte des Manuskripts waren eine enorme Hilfe. Auch für die Möglichkeit, an internationalen Kongressen teilzunehmen, möchte ich mich herzlich bedanken.
Natürlich gilt auch allen weiteren Mitarbeitern des Forschungslabors Gastroenterologie der Universitätsmedizin Rostock mein aufrichtiger Dank für ein jederzeit angenehmes Arbeitsklima und den respektvollen Umgang miteinander. Hervorzuheben sind insbesondere Frau Katja Bergmann, die mir geduldig die methodische Arbeit im Labor beigebracht hat, und Herr Denis Revskij, welcher mich bei Fragestellungen jederzeit unterstützt hat und mittlerweile zu einem guten Freund geworden ist.
Auch meinen Freunden Hanjo und Benjamin möchte ich für ihre Unterstützung danken. Ohne ihre humorvolle Art wäre die Studienzeit nicht mal halb so schön gewesen.
Abschließend gebührt ein großes Dankeschön meiner Familie und meinen Schwiegereltern für die liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung. Besonders mein Zwillingsbruder und meine Freundin waren stets eine Stütze und haben mich auch an schwierigen Tagen motiviert.

# 13. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock Juni 2022

Lennard Spanehl