

BACHELORARBEIT

Proliferationsverhalten exokriner Mauspankreaszellen nach Isolation aus dem Gewebsverband

Bachelorstudiengang Biotechnologie

Durchgeführt: an der Fraunhofer Einrichtung für
Marine Biotechnologie in Lübeck

Vorgelegt von: Janina Hinrichs
Matrikelnummer: 2000069

Hamburg-Bergedorf

20.6.2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker
(HAW Hamburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Hans Rapoport
(Fraunhofer EMB Lübeck)

Betreuung: Stephanie Frahm
(Fraunhofer EMB Lübeck)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	4
2 Materialien	14
3 Methoden	18
3.1 Zellkulturmethoden.....	18
3.2 Zellzahlbestimmung mit dem NucleoCounter	21
3.3 Zellfixierung mit Methanol/Aceton	21
3.4 Click-iT Proliferationsassay.....	22
3.5 Cytospin	23
3.6 Zellzyklusmessung mit dem Durchflusszytometer	23
3.7 Time-Lapse Aufnahmen	25
3.8 Microarray Analyse	25
4 Ergebnisse.....	27
4.1 Untersuchung des Proliferationsverhaltens mit dem Click-it-Assay	27
4.2 Verifizierung der Ergebnisse des Click-it-Assays durch die Durchflusszytometrie..	30
4.3 Time-Lapse Aufnahme	32
4.4 Auswertung der Genexpressionsanalyse.....	34
5 Diskussion.....	42
6 Zusammenfassung.....	50
Literaturverzeichnis	51
Anhang.....	55
Eidesstattliche Versicherung.....	55
Time-Lapse Aufnahmen	56

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAK	Cdk-aktivierende Kinase
Cdk	Cyclin-abhängigen Kinasen
CDKI	Cyclin-abhängigen Kinasen Inhibitoren
d	Tag
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethylen-2'-Desoxyuridine
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FC	Fold Change
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
M.m.	Mus musculus
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
NGS	Normal Goat Serum
P0	Passage 0
P1	Passage 1
P2	Passage 2
P3	Passage 3
P4	Passage 4
P5	Passage 5
P6	Passage 6
P10	Passage 10
PFA	Paraformaldehyd
Rb	Retinoblastom
T0	Zustand im Gewebe
x g	mal Gravitationskraft
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Eingesetzte Versuchstiere.....	14
Tabelle 2 Verwendete Geräte und Hilfsmittel.....	14
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien.....	15
Tabelle 4 Verwendete Kits.....	15
Tabelle 5 Chemikalien.....	16
Tabelle 6 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	17
Tabelle 7 Verwendete Software.....	17
Tabelle 8 Zusammensetzung des HEPES-Eagle-Medium, Isolationsmedium und Digestionsmedium	18
Tabelle 9 Übersicht über die einzusetzenden Volumina für alle Zellkulturmethoden.....	20
Tabelle 10 Zellzyklusgene und ihr $\Delta P0T0$ und $\Delta P10T0$ Fold Change.....	40

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau des Pankreas.....	5
Abbildung 2 Darstellung acinärer Strukturen im exokrinen Pankreas.....	6
Abbildung 3 Die Phasen des Zellzyklus.....	8
Abbildung 4 Die Anaphase der Mitose.....	9
Abbildung 5 Der Zellzyklus und die phasenspezifischen Cyclin/Cdk Komplexe.....	11
Abbildung 7 Abbildung eines mit Zellkulturmedium gefülltem Ibidi.....	22
Abbildung 6 Prinzip des Click-it Assays.....	22
Abbildung 8 Prinzip der Zellzyklusmessung mit dem Durchflusszytometer.....	24
Abbildung 9 Beispielbild der Zelllinie M _{Apan10P5} von der Click-it-Analyse in der 20-fachen Vergrößerung.....	27
Abbildung 10 Analyse der Proliferationseigenschaften exokriner Mauspankreaszelllinien mit dem Click it Assay.....	29
Abbildung 11 Proliferationsverhalten exokriner Mauspankreaszellen in in vitro Kultivierung.....	30
Abbildung 12 Durchflusszytometrische Analyse mit 7-AAD.....	31
Abbildung 13 Vergleich der Bestimmung des Proliferationsverhaltens mittels des Click-it-Assays und der durchflusszytometrischen Messung.....	32
Abbildung 14 Bildauswahl der Aufnahmen des Time-Lapse Mikroskops.....	33
Abbildung 15 Time-Lapse Aufnahme der Einzelzellen.....	34
Abbildung 16 Heatmap über die Veränderung der Genexpression von Passage zu Passage.....	36
Abbildung 17 Die Regulation des Zellzyklus.....	37

1 Einleitung

Zielsetzung

Der Vorgang der Zellproliferation dient zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktion eines Organismus. Im menschlichen Körper sterben pro Tag mehrere hundert Millionen Zellen, die durch Teilung vorhandener Zellen wieder ersetzt werden müssen. Der Prozess der Zellproliferation ist dabei ein komplexer Vorgang aus Zellteilung und Wachstum, der über strikte Regulationsmechanismen organisiert wird. Im ausgewachsenen Organismus ist nur noch ein kleiner Teil der Zellen proliferativ, während der Rest der differenzierten Zellen ihre Aufgabe im Organismus ausführen. Allerdings ist es für einige Zellen möglich, zum Beispiel zur Heilung von Verletzungen, wieder mit der Zellteilung zu beginnen. Ein Beispiel dafür sind Leberzellen, die bei Verletzung die Regeneration des Organs ermöglichen. (Cantz, Manns, & Ott, 2008) Die Veröffentlichung „*Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells*“ von Daniel H. Rapoport et al. der Arbeitsgruppe Zelltechnologie des Fraunhofer Instituts für Marine Biotechnologie in Lübeck zeigt, dass menschliche Pankreaszellen aus dem exokrinen Teil des Pankreas innerhalb der *in vitro* Kultivierung die Eigenschaften von multipotenten Stammzellen entwickeln. Sie beginnen ab der ersten Passage zu proliferieren und differenzieren zu Zelltypen aus verschiedenen Keimblättern. Durch den Isolationsprozess aus dem Gewebe werden die Zellen von ihren normalen Zellkontakten getrennt und sind in der *in vitro* Kultivierung keiner Steuerung durch den Organismus mehr ausgesetzt. (Rapoport, Schickanz, Gürleyik, Zühlke, & Kruse, 2009) Diese radikalen Veränderungen führt Rapoport als eine mögliche Ursache für die Umstellung des Proliferationsverhaltens der Zellen an. In dieser Arbeit sollte das Proliferationsverhalten exokriner Mauspankreaszellen nach Isolation aus dem Gewebsverband untersucht werden. Dabei galt es herauszufinden, ob exokrine Pankreaszellen dieses anderen Modellorganismus ein ähnliches proliferatives Verhalten in der *in vitro* Kultivierung wie menschliche Pankreaszellen aufweisen. Zu Vergleichen waren dabei der Zeitpunkt des Beginns der Proliferation und das generelle proliferative Verhalten der Zellen. Dabei sollte ergänzend zu Rapoports Veröffentlichung auch die Änderung der Genexpression innerhalb der Zellen betrachtet werden.

Grundlagen

Die Bauchspeicheldrüse oder das Pankreas ist ein keilförmiges Organ, das Enzyme zum Aufschluss des Nahrungsbreis produziert. Auf Grund ihrer komplexen Funktion und als Verursacher von Diabetes-Erkrankungen liegt es seit vielen Jahren im Fokus der Wissenschaft.

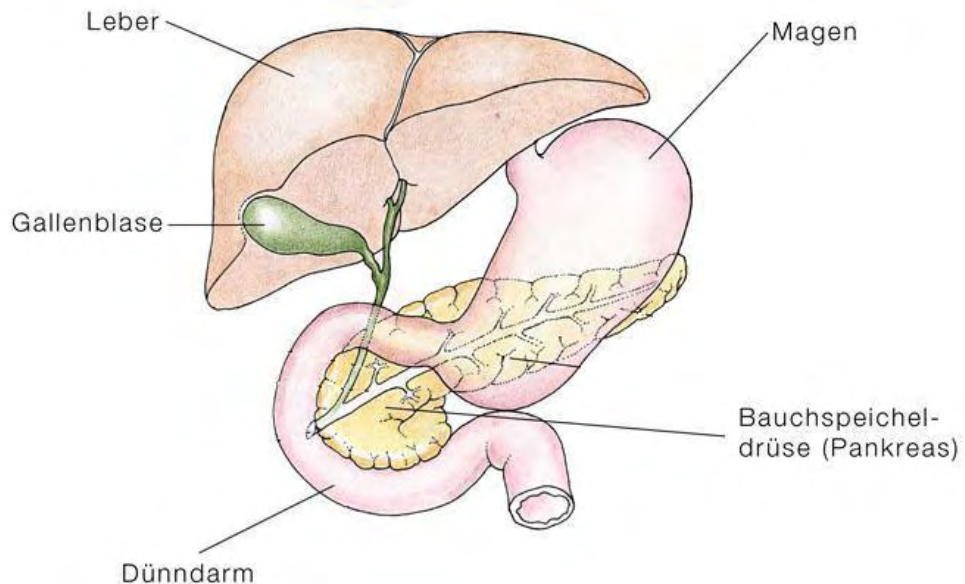


Abbildung 1 Aufbau des Pankreas. Das Pankreas besitzt eine Art L-Form und steht in enger Verbindung mit dem Zwölffingerdarm. Das Pankreasgewebe ist mit Gängen durchzogen, durch die die produzierten Pankreasenzyme in den Zwölffingerdarm gelangen. (verändert nach Krämer, 2006)

Das Mauspankreas wiegt etwa 20 mg und liegt quer im Oberbauch. Es ist deutlich in einen Milz- und einen Duodenalschenkel geteilt, wobei es in enger Verbindung zum Zwölffingerdarm steht. Somit ist ein Teil von ihm mit der Milz verbunden, der andere liegt an den Magen an. (Salomon, Geyer & Gille, 2001) Das Pankreas besteht zu 71 % aus Wasser, zu 13 % aus Proteinen und aus einem zwischen 3 bis 20 % variablen Fettsäureanteil. (Bockman, 1993)

Das Pankreas setzt sich aus endokrinen und exokrinen Abschnitten zusammen. Der exokrine Teil produziert Verdauungsenzyme, die für das Aufschließen von Fetten, Kohlenhydraten und Eiweißen zuständig sind, und gibt diese in den Zwölffingerdarm ab. Die vom Pankreas produzierten Enzyme können in einer aktiven Form oder als Vorstufe vorliegen. Zu den aktiven Enzymen gehören Amylase und Lipase, zu den Vorstufen Trypsinogen und Proelastase. Die Vorstufen werden zum Schutz vor Selbstverdauung erst nach Abgabe in den Zwölffingerdarm durch enzymatische Spaltung aktiviert. Zur Neutralisation des sauren Milieus im Zwölffingerdarm besitzt das Pankreassekret einen hohen Bicarbonatgehalt.

(Silbernagl & Despopoulos, 2012) Neben den Enzymen setzt es sich hauptsächlich aus Wasser und Ionen zusammen.

Neben dem großen Anteil an exokrinen Zellen gehört auch ein kleiner Teil an endokrinen Zellen zum Pankreasgewebe. Die endokrinen Zellen liegen in Gruppen zu mehreren hundert Zellen in den exokrinen Bereichen als die sogenannten Langerhanschen Inseln vor. Sie machen etwa 1 bis 2 % des gesamten Pankreasgewebes aus. Im endokrinen Teil werden Hormone produziert, die in das Blut abgegeben werden. Hauptaufgabe ist die Insulin- und Glucagonproduktion. Beide Hormone regulieren den Blutzuckerspiegel. Dabei bestehen die Langerhanschen Inseln zu 80 % aus Betazellen, die speziell für die Insulinproduktion zuständig sind.

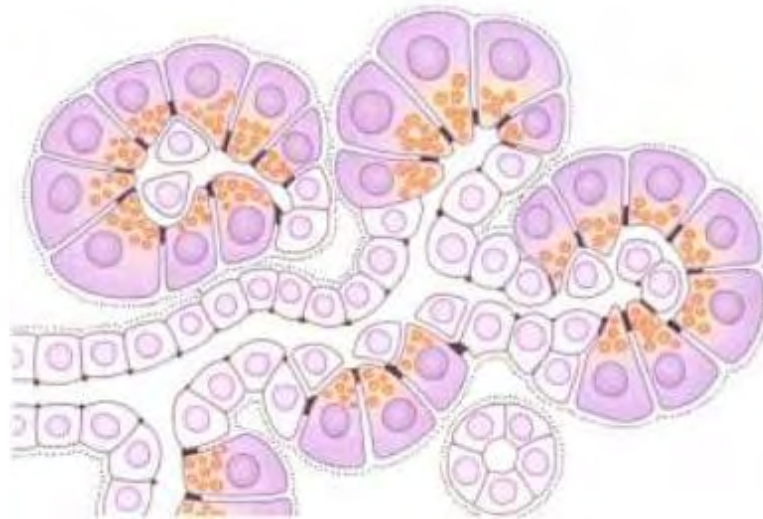


Abbildung 2 Darstellung acinärer Strukturen im exokrinen Pankreas. Die lila Zellen bilden die Acini, die weißen die Gangzellen des Pankreas. (verändert nach Heinzeller & Büsing, 2001)

Das gesamte Pankreas ist von einer dünnen Schicht aus Bindegewebe umgeben, dessen Scheidewände in das Innere des Pankreas wachsen und es in viele kleine Lappen unterteilen. Die Lappen bilden den exokrinen Anteil des Pankreas. Aufgebaut ist das exokrine Pankreas aus Acini und Sekretionsgängen. Die Acini sind die Endstücke der Sekretionsgänge, die zur Weiterleitung des produzierten Sekrets und teilweise zur Speicherung von diesem dienen. In der Regel sind drei bis fünf Acini zu einem pyramidenförmigen Komplex zusammengeschlossen und münden in einen gemeinsamen Gang. Diese Komplexe sind von einer Basallamina eingefasst. Der Acinus selbst setzt sich aus serösen Drüsenzellen zusammen, die um einen Acinusgang angeordnet sind. Die Acini variieren in ihrer Form von kugelig bis langgestreckt. Kleine helle, isoprismatische Zellen mit runden hellen Kernen bilden das Epithel der zahlreichen Schaltstücke. Diese Schaltstücke werden auch als

zentroazinäre Zellen bezeichnet und befinden sich einzeln oder in kleinen Gruppen in den Endstücken. (Heinzeller & Büsing, 2001) Die zentroazinäre Zellen beteiligen sich an der Bicarbonatsekretion.

Während der Fokus der Forscher in den letzten Jahren vielfach auf den Betazellen der Langerhanschen Inseln des Pankreas lag, weitet dieser sich immer weiter auf das gesamte Pankreasgewebe aus. Zum Einen konnten Zellen des exokrinen Pankreas in Betazellen umprogrammiert werden, was die große Plastizität dieser Zellen zeigt. (Zhou, Brown, Kanarek, Rajagopal, & Melton, 2008) Zum Anderen wurde ein großes Regenerationspotential der Pankreaszellen nach Verletzung und Krankheit nachgewiesen. (Bonner-Weir, Baxter, Schuppin & Smith, 1993) Ein Regenerationsvorgang setzt vor allem den Austausch kranker und abgestorbener Zellen voraus, was nur durch Zellwachstum realisiert werden kann.

Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus. (Gillett & Barnes, 1998) Unter dem Begriff Zellzyklus wird dabei der sich wiederholende Ablauf von Ereignissen zwischen zwei Zellteilungen verstanden. (Schmitz, 2011) Je nach Zelltyp beträgt die Gesamtdauer eines Zellzyklus *in vivo* zwischen 18,5 und 24 Stunden. Der Zellzyklus kann in die Interphase und die Mitose-Phase unterteilt werden. In der Interphase sind das Zellwachstum und verschiedene Stoffwechselaktivitäten angesiedelt. In der mitotischen Phase kommt es zur Verdopplung der Chromosomen und deren Aufteilung auf die Tochterzellen. Im Anschluss daran werden die Kernteilung und die vollständige Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen realisiert. Näher betrachtet besteht der Zellzyklus allerdings aus vier voneinander abgegrenzten Phasen. Dabei gibt es zwei funktionelle Phasen, die sogenannte S-Phase (Synthese-Phase) und die M-Phase (Mitose-Phase) sowie zwei Wachstumsphasen die G1- und G2-Phase. Das G steht hierbei für gap (engl. Lücke). Diese Gap-Phasen ermöglichen der Zelle die Kontrolle der jeweils vorangegangenen Zellzyklusphasen auf deren korrekten Abschluss und Schädigungen an der DNA. (Hengst, 2003)

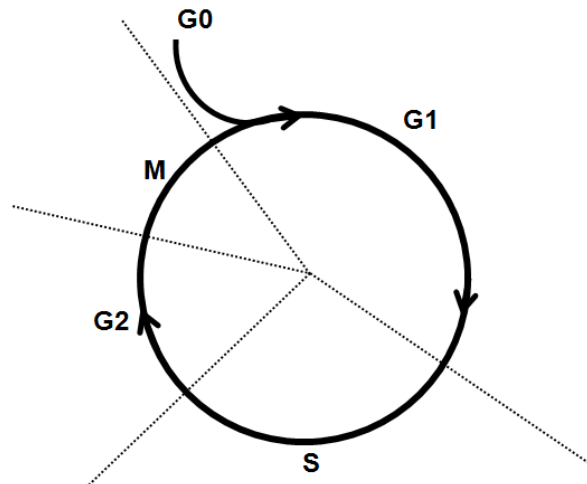


Abbildung 3 Die Phasen des Zellzyklus. Der Zellzyklus unterteilt sich in die G1, S, G2 und M-Phase. Zellen, die sich nicht mehr im Zellzyklus befinden, verweilen in der G0-Phase, bis sie ein Signal zum Wiedereintritt in den Zyklus erhalten.

Die G1-Phase erfolgt im Anschluss an eine Mitose und wird deshalb auch als postmitotische Phase bezeichnet. Bei einer proliferierenden Zelle werden in der G1-Phase die nach der Zellteilung noch fehlenden Kompartimente, wie zum Beispiel das Cytoplasma, ergänzt und die nächste Synthesephase durch Produktion der benötigten Enzyme und Proteine vorbereitet. Des Weiteren erfolgt die Produktion der für die Proteinsynthese benötigten mRNAs und es werden Reparaturmechanismen angeschaltet, die eventuell beschädigte DNA reparieren. All diese Schritte verursachen einen erhöhten Energiebedarf der Zelle, der durch die Produktion energiereicher Verbindungen wie Desoxyribonukleotid-Triphosphate abgedeckt wird. (Schmitz, 2011) Im Anschluss an die G1-Phase erfolgt die S-Phase. Zur erfolgreichen Durchführung einer Zellteilung muss die DNA einer Zelle vor der Teilung der Zelle verdoppelt werden, was in dieser Phase realisiert wird. Nach erfolgter DNA-Replikation tritt die Zelle in die G2-Phase über, die auch als postsynthetische oder prämitotische Phase bezeichnet wird. In dieser Phase erfolgen die Prozessierung der in der G1-Phase produzierten Enzyme sowie die Auflösung der Zellkontakte zu den Nachbarzellen. Weiterhin wird Flüssigkeit in die Zelle aufgenommen und weitere zellteilungsspezifische Proteine produziert. Im Anschluss folgt die M-Phase mit der mitotischen Teilung der Zelle. Die Mitose wird dabei in die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt, in denen die Chromosomen kondensieren, sich an der Äquatorialebene der Zelle orientieren und durch den Spindelapparat zu den Polen der Zelle auseinander gezogen werden. Danach erfolgt die Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen.

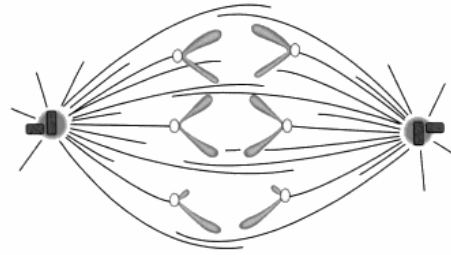


Abbildung 4 Die Anaphase der Mitose. Nach Verknüpfung der Spindelfasern mit den Chromatiden, werden diese in der Anaphase getrennt und zu den beiden Polen der Zelle gezogen. Dadurch können zwei Tochterzellen mit identischem Chromosomensatz gebildet werden. (Knippers, 2001)

Nach Durchlaufen eines Zellzyklus beginnt dieser erneut. Bei Ausbleiben bestimmter Signale kann die Zelle aus der G1-Phase, abweichend vom normalen Zellzyklus, in die sogenannte G0-Phase eintreten. Diese Phase ist eine Ruhephase, in der bereits ausdifferenzierte Zellen verbleiben und ihre jeweilige Aufgabe im Organismus verrichten. (Campbell & Reece, 2009) In dieser Phase befindet sich ein Großteil aller Zellen in einem ausgewachsenen Organismus. Zellen, die ihr Teilungspotential vollkommen verloren haben, werden als terminal-differenzierte Zellen bezeichnet. (Royer, Grinstein & Janz, 1999) Allerdings kann der G0-Zustand auch reversibel sein. (Andreoff, Goodrich & Pardee, 2000) Leberzellen können zum Beispiel bei Gewebeschädigungen aus der G0-Phase wieder in die aktive G1-Phase eintreten, um das beschädigte Gewebe zu ersetzen. (Cantz et al., 2008)

Der Eintritt der Zelle von G0 in den Zellzyklus oder das Fortlaufen der Zelle im Zellzyklus allgemein wird über verschiedene Signalwege induziert. Bei den Signalen wird zwischen externen und internen Faktoren unterschieden. Ein interner Faktor ist zum Beispiel die Zellgröße. Unterhalb einer kritischen Zellgröße bleibt das Signal zur Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen aus. Außerdem erfolgt an bestimmten Kontrollpunkten eine Kontrolle der DNA auf Schäden und die Kontrolle der korrekten DNA-Replikation sowie eine Kontrolle des korrekten Teilungsvorganges bei der Mitose. (Schmitz, 2011) Treten Fehler an einem dieser Kontrollpunkte auf, werden interne Signalwege zur Problembehebung aktiviert. Bei den externen Faktoren handelt es sich unter anderem um chemische oder physikalische Umwelteinflüsse, die bestimmte Signalwege im Inneren der Zelle aktivieren. Eines dieser mitogenen Signale wird durch das Nährstoffangebot induziert. Wachstumsfaktoren binden an Rezeptoren, die eine Signaltransduktion in den Zellkern auslösen. Hier werden wiederum Transkriptionsfaktoren induziert, die den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus veranlassen. (Royer et al., 1999) Weiterhin ist die Anzahl der Nachbarzellen für den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus entscheidend. Sind zu viele Zellen im direkten Kontakt zu der Zelle vorhanden, setzt die sogenannte Kontaktinhibierung ein, die unkontrolliertes Wachstum

verhindert. Auch können externe DNA-Schädigungen durch beispielsweise UV-Licht zum Zellzyklusarrest führen. Sowohl die externen als auch die internen Faktoren wirken auf die gleichen Kontrollpunkte im Zellzyklus. (Andreeff et al., 2000)

Diese Kontrollpunkte haben die Aufgabe, Schädigungen der Zelle und unkontrolliertes Zellwachstum zu vermeiden. Es gibt den Restriktionspunkt (R), der am Übergang zwischen der G1- und S-Phase lokalisiert ist. An diesem Punkt wird der Zellzyklus nur fortgesetzt, wenn alle Voraussetzungen für ein erfolgreiches Durchlaufen des Zyklus gegeben sind. (Graw, 2010) Vor dem Übertreten dieses Punktes ist die Zelle noch von mitogenen Signalen wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren abhängig. Nach Passage dieses Punktes hat sie diese Abhängigkeit verloren und ein gesamter Zellzyklus muss durchlaufen werden. (Alberts et al., 2002) Am G2-Kontrollpunkt innerhalb des Zyklus wird die exakte DNA-Replikation kontrolliert. Fehler bei der DNA-Replikation könnten zur Entartung der Zelle oder sogar zum Zelltod führen. (Hartwell & Weinert, 1989) Danach folgt der M-Phasen Kontrollpunkt. Bei Teilung der Schwesterchromatiden, in der Anaphase der Mitose, bleiben die Chromatiden so lange zusammen, bis alle Kinetochore mit der mitotischen Spindel verbunden sind. Erst nach Abschluss dieses Vorgangs wird ein Enzym, das das Fortlaufen im Zellzyklus erlaubt, aktiviert. (Campbell & Reece, 2009). Bleiben die Zellen dauerhaft in einer Zellzyklusphase außerhalb der G0/G1 Phase arretiert, werden Zelltodsignalwege aktiviert. Darüber wird sichergestellt, dass nur Zellen überleben, die den Zellzyklus korrekt durchlaufen haben. (Blagosklonny, 1999)

Neben diesen molekularen Kontrollmechanismen wird der Zellzyklus über eine Reihe weiterer Mechanismen gesteuert. In einer Maus werden etwa 578 Gene im Zellzyklus exprimiert. (Ishida et al., 2001) Nach Stimulation einer Zelle durch Wachstumsfaktoren werden Transkriptionsfaktoren induziert, die ihrerseits so genannte Immediate Early Gene anschalten, die häufig selbst Transkriptionsfaktoren sind. Beispiele dafür sind c-Jun, c-Fos oder c-Myc, die nach Aktivierung weitere Zellzyklusaktivierungen induzieren. In Fibroblasten werden sogar bis zu 66 verschiedene Immediate Early Gene in den ersten Minuten des Zellzyklus angeschaltet. (Fambrough, McClure, Kazlauskas & Lander, 1999) Entscheidend für den folgenden erfolgreichen Ablauf des Zellzyklus ist die Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk), die zur Familie der Serin-Threonin Kinasen gehören. (Hartwell & Weinert, 1989) In Säugetierzellen sind bisher sechs unterschiedliche Cdk (Cdk 1, Cdk 2, Cdk3, Cdk 4, Cdk 6 und Cdk 7) mit einer durchschnittlichen molekularen Masse von 30 bis 36 kD bekannt. (Harper & Adams, 2001) Zur Aktivierung einer Cdk muss es zur Komplexbildung mit einem Cyclin kommen. Die Expression der Cycline oszilliert im Verlaufe des Zellzyklus, so dass je nach Zellzyklusphase bestimmte Cycline hoch oder runter reguliert werden. So kann der Eintritt der Zelle aus der G0 in die G1-Phase nur durch

die Interaktion von Cyclin D mit Cdk4 oder 6 geschehen. Wobei zur vollständigen Aktivierung dieses Holoenzym sowohl eine Phosphorylierung durch die Cdk-aktivierende Kinase (CAK) der Untereinheit Theorin 160 des Cdk als auch eine Dephosphorylierung der Untereinheiten Theorin 14 und Tyrosin 15 des Cdk durch Cdc25 erfolgen muss. (Harper & Adams, 2001) Die CAK setzt sich dabei aus Cyclin H und Cdk 7 zusammen.

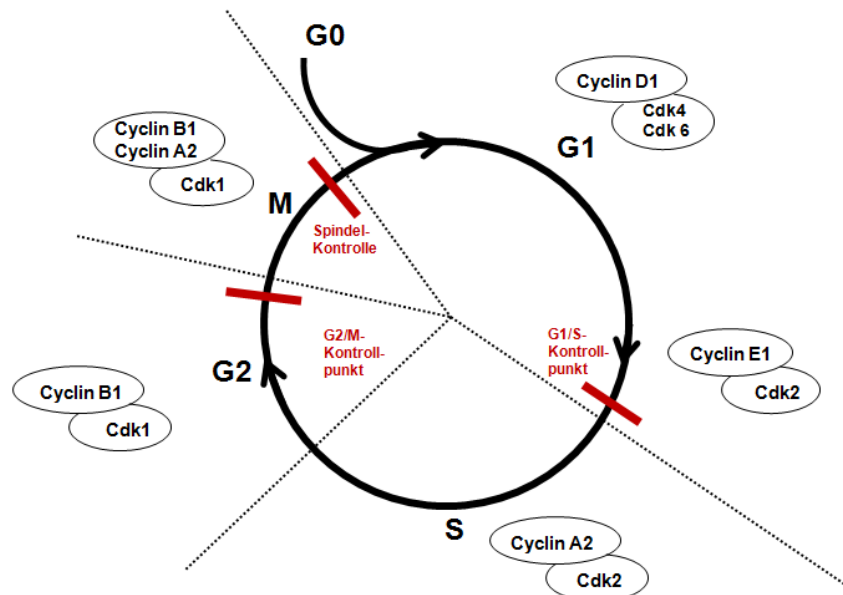


Abbildung 5 Der Zellzyklus und die phasenspezifischen Cyclin/Cdk Komplexe. Jede Phase des Zellzyklus wird durch einen bestimmten Cyclin/Cdk-Komplex gesteuert. Vor Verlassen der jeweiligen Phase, muss dieser phasenspezifische Komplex abgebaut werden. Weiter sind die Kontrollpunkte des Zellzyklus zu erkennen. Die Punkte dienen zur Vermeidung von DNA Schäden oder Fehlern bei dem Vorgang der Zellteilung.

Dieses Prinzip der Aktivierung einer bestimmten Cdk durch ein spezifisches Cyclin erstreckt sich über alle Zellzyklusphasen. Ein Cyclin E/Cdk2-Komplexe initiiert in der späten G1 bzw. frühen S-Phase die DNA-Replikation und Duplikation der Centrosomen. In der S-Phase reguliert ein Cyclin A/Cdk2, in der späten S-Phase und am S/G2 Übergang ein Cyclin A/Cdk1 und in der G2-Phase ein Cyclin B/Cdk1 Komplex den Zellzyklus. Der Cyclin B/Cdk1 Komplex phosphoryliert zum Beispiel Histon 1 und Lamine, wodurch die Chromosomen kondensieren und die Kernmembran aufgelöst wird. Andere Substratproteine der aktivierten Holoenzyme sind zum Beispiel Proteine der Retionblastom-Familie (Rb).

Rb-Proteine sind transkriptionelle Repressoren, die die Fähigkeit besitzen, reversibel an Transkriptionsfaktoren wie E2F zu binden. (Johnson & Schneider-Broussard, 1998) Durch die Bindung von E2F an ein Rb-Protein wird dieses an den Promotor eines Gens gebunden

und hemmt die Transkription. Die Bindung von Rb-Proteinen und E2F wird dabei über den Phosphorylierungsstatus des Rb-Proteins reguliert. (Schmitz, 2011; Tamrakar, Rubin, & Ludlow, 2000) Liegt das Protein am Anfang der G1-Phase in der hypophosphorylierten Form vor, wirkt es als Repressor. Durch eine Phosphorylierung durch einen Cyclin D/Cdk4-Komplex löst sich die Bindung zwischen E2F und dem Rb-Protein, E2F wird freigesetzt und die promotorhemmende Wirkung aufgehoben. Durch einen weiteren Phosphorylierungsschritt in der späten G1-Phase durch einen Cyclin E/Cdk2-Komplex wird das Rb-Protein in einen hyperphosphorylierten Zustand versetzt. Dieser Zustand wird erst mit Eintritt in die M-Phase wieder aufgehoben. Das freigesetzte E2F-Protein hat verschiedene Wirkungsräume. Unter anderem geht es eine Wechselwirkung mit Proteinen der DP-Proteinfamilie ein, wodurch es ein biologisch aktiver Transkriptionsfaktor wird. Dadurch wird die Transkription von zum Beispiel Histonen, Dihydrofolatreduktasen und Ribonukleotidreduktasen ausgelöst, was die Progression der Zelle aus der G1 in die S-Phase ermöglicht. (Johnson & Schneider-Broussard, 1998) E2F nimmt damit eine Schlüsselrolle für den G1/S-Phasen Übergang ein. Während dieser Rb/E2F-Regulationsweg schon weitestgehend erforscht ist, sind andere Substrate der Cyclin/Cdk Komplexe noch relativ unklar. Bekannt sind die drei grundlegenden Regulationsmechanismen der Cdks. Einmal wird, wie bereits erwähnt, in jedem Stadium des Zellzyklus ein bestimmtes Cyclin exprimiert. Während die Cdks während des Zellzyklus eine relativ lange Halbwertszeit besitzen und im Überschuss vorhanden sind, werden die meisten phasenspezifischen Cycline beim Übergang der Zelle in die nächste Zellzyklusphase abgebaut. (Johnson & Schneider-Broussard, 1998) Der Abbau der einzelnen Cycline wird dabei durch Proteasomen vermittelt. Die Cycline werden erst durch bestimmte Ubiquitin-regulierende Enzyme modifiziert und dann abgebaut. (Ciechanover, 1998) In den meisten Fällen ist der Abbau des entsprechenden Cyclins sogar zwingend für das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus notwendig. (Koepp, Harper, Elledge, & Hughes, 1999) Den zweiten Regulationsmechanismus bildet die Aktivierung des Holoenzym durch das CAK. Der dritte Regulationsmechanismus ist eine negative Regulation. Es gibt die Familie der Inhibitoren der Cyclin-anhängigen Kinase Inhibitoren (CDKI), die zu den Tumorsuppressorgenen gehört und in zwei Gruppen unterteilt wird. Einmal die CIP/KIP-Familie und die INK4-Familie, die beide inhibitorische Einflüsse auf die Cdks ausüben. Zu den CIP/KIP-Proteinen gehören $p21^{CIP1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$. Sie hemmen Cyclin/Cdk-Komplexe, was die Hypophosphorylierung des Rb-Proteins verhindert. Dadurch wird wiederum die Transkription gehemmt. (Graw, 2010) Ein Beispiel dafür ist $p27^{Kip1}$, das in seiner Funktion als negativer Zellzyklusregulator die Aktivität des für den G1/S-Phasen Übergang notwendigen Cyclin E/Cdk2-Komplex hemmt. (Polyak et al., 1994) Auf dieser Ebene besteht eine direkte Verbindung zu dem Tumorsuppressorgen p53. Bei einer DNA-Schädigung kommt es zur Aktivierung dieses Proteins, was seinerseits p21

induziert. Eine zu hohe Konzentration an p21 kann zu Zellzyklushemmungen und Aktivierung verschiedener Reparaturmechanismen führen. Die INK4-Familie inhibiert hingegen spezifisch Cdk 4 und Cdk 6, was speziell die Progression der Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase verhindert. Zu der Familie der INK4-Proteine gehören unter anderem p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c und p19INK4d. (Roussel, 1999)

Der Zellzyklus setzt sich somit aus einem Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Faktoren zusammen, durch die die genetische Stabilität gewährleistet werden kann.

2 Materialien

Tabelle 1 Eingesetzte Versuchstiere

Versuchstiere	
<i>Name</i>	<i>Beschreibung</i>
FVB/NJ	Homozygote Wildtypmaus, Generation F95pF100, Stock Nummer 001800, Jackson Mice Laboratory, Alter 5 bis 8 Wochen

Tabelle 2 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Verwendete Geräte und Hilfsmittel		
<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
Axiovert 40c	Zeiss, Jena	Mikroskop
BD FACS Calibur	BD, Heidelberg	Zytometer
Biosafe® MD	Cryotherm, Kirchen/Sieg	Kryotank
CB 150#04-62254	Binder, Tuttlingen	Brutschrank
Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg	Zentrifuge
Cool Cell Boxen	Biocision, San Diego (USA)	Zelleinfrierbox
Cun 3933	Liebherr, Lübeck	Kühlschrank
Cytospin 4	Thermo Scientific, Marietta (USA)	Cytospin
Eppendorf Research® Pipette 0.5-10 µL	Eppendorf, Hamburg	Pipette
Eppendorf Research® Pipette 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg	Pipette
Eppendorf Research® Pipette 10-100 µL	Eppendorf, Hamburg	Pipette
GFL 3031	HASSA, Lübeck	Schütteltisch
IKA Rct basic	IKAMAG, Staufen	Heiz-/Rührkombination
Kajair	Bioguard, Planegg-Steinkirchen	Sicherheitswerkbank
Kern 770	Kern, Balingen	Waage
Lab 850	SchottInstruments, Mainz	pH-Meter
Mini Spin	Eppendorf, Hamburg	Tischzentrifuge
NucleoCounter	IUL Instruments, Königswinter	Zellzahlbestimmung
Observer Z.1	Zeiss, Jena	Fluoreszenzmikroskop
PAP-Pen	Abcam, Cambridge (UK)	
Stripettor costar	Brand, Wertheim	Pipettierhilfe
Ultra low	Sanyo, Wood Dale (USA)	Gefrierschrank
WNE 22	Memmert, Schwabach	Wasserbad

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien		
<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
µ-Dish 35mm,low	Ibidi, München	Zellkulturschale
2,0 ml Kryo-Röhrchen	TPP, Trasadingen (Schweiz)	Kryo-Röhrchen
Deckgläser 18mm	Eydam, Kronshagen	Deckgläser rund
Dispenser 99002	TPP, Trasadingen (Schweiz)	Zellkulturschaber
epT.I.P.S 10 µl	Eppendorf, Hamburg	Pipettenspitzen
epT.I.P.S 1000µl	Eppendorf, Hamburg	Pipettenspitzen
epT.I.P.S 200 µl	Eppendorf, Hamburg	Pipettenspitzen
FACS Röhrchen 5ml	Sarstedt, Nümbrecht	Falconröhrchen
Falconröhrchen 15ml	Sarstedt, Nümbrecht	Falconröhrchen
Falconröhrchen 50ml	Sarstedt, Nümbrecht	Falconröhrchen
Gazefilter	Lechleiter Gmbh, Fuchstal	Gazefilter
Menzel Gläser Superfrost Plus	Thermo Scientific	Objektträger
MoliNea plus L	Hartmann, Heidenheim	Hygieneunterlage
Multiwellplatte 6-Well	TPP, Trasadingen (Schweiz)	6-Well
NucleoCassetes	IUL Instruments, Königswinter	Zellzählung
Pastuerpipetten ohne Wattestopfen	Roth, Karlsruhe	Absaugspitzen
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht	Reagiergefäß
Serilogical Pipet Space Saver (5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Falcon, Heidelberg	Glaspipette
Surgical Disposable Scalpels	Braun, Tuttlingen	Skalpell
Zellkulturflasche 25 cm ²	TPP, Trasadingen (Schweiz)	Zellkulturflasche
Zellkulturflasche 75 cm ²	TPP, Trasadingen (Schweiz)	Zellkulturflasche

Tabelle 4 Verwendete Kits

Verwendete Kits		
<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
Click-iT EdU Alexa Fluor [®] 488 Imaging Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt	Proliferationsassay

Tabelle 5 Chemikalien

Chemikalien	
<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
7-AAD CellStainingSolution	eBioscience, Frankfurt
Accumax™ (Accutase)	Merck Millipore, Billerica (USA)
Aceton	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin	PAA, Cölbe
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Collagenase	Serva, Heidelberg
DAPI	Roche, Grenzach-Wyhlen
DMEM, + 4.5 g/l Glucose, - Pyruvat, - NaHCO ₃	GIBCO, Darmstadt
DMSO	Biochrom, Berlin
DPBS, 1x, - CaCl ₂ , -MgCl ₂ , steril	GIBCO, Darmstadt
FACSClean	BD, Heidelberg
FACSRinse	BD, Heidelberg
FKS (Fötale Kälberserum)	PAA, Cölbe
Gentamycin	Biochrom, Berlin
HCl	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
L-Glutamine	PAA, Cölbe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	J.T. Baker, Center Valley (USA)
Normal Goat Serum	Vector Labs, Burlingame (USA)
NucleoCounter Reagent A	ChemoMetec, Lillerød (Dänemark)
NucleoCounter Reagent B	Chemometec, Lillerød (Dänemark)
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Ringer Fresenius	Plastipur, Austin (USA)
Sucrose (D-Saccharose)	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10 x)	PAA, Cölbe
Vectashield H-1000	Vector Labs, Burlingame (USA)

Table 6 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Verwendete Lösungen	
<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
1xTrypsin-EDTA	10 ml Trypsin (10 x), 90 ml PBS
10 % Zellkulturmedium	445 ml DMEM, 50 ml FKS, 5ml Penicillin/Streptomycin
20 % Zellkulturmedium	395 ml DMEM, 100 ml FKS, 5 ml Penicillin/Streptomycin
3 % BSA in PBS	3 g BSA, 100 ml PBS
Einfriermedium	10 ml DMSO, 90 ml FKS
FACS-Puffer	10 ml PBS, 1 ml FKS
HEPES-Stammlösung	2,383 g HEPES, 100 ml Aqua bidest (pH 7,6)

Table 7 Verwendete Software

Verwendete Kits		
<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Office	Datenanalyse, Erstellung der Balkendiagramme
IGOR Pro	WaveMetrics	Erstellung der Heatmaps, Datenanalyse
BD CellQuest Pro	BD	Auswertung und Darstellung der FACS Messung

3 Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

Präparation von Mauspankreaszellen

Zur Vorbereitung der Präparation von Mauspankreaszellen wurde eine HEPES-Stammlösung hergestellt, die sich aus 2,383 g HEPES auf 100 ml Aqua bidest (pH 7,6) zusammensetzt.

Für jede Präparation wurden HEPES-Eagle-Medium, Isolationsmedium und Digestionsmedium frisch angesetzt und steril filtriert. Die Medien setzten sich wie folgt zusammen.

Table 8 Zusammensetzung des HEPES-Eagle-Medium, Isolationsmedium und Digestionsmedium

Medium	Zusammensetzung
HEPES-Eagle-Medium	29,7 ml DMEM 300 µl L-Glutamin 3,3 ml HEPES-Stammlösung
Isolationsmedium	32 ml HEPES-Eagle-Medium 8 ml 5% BSA 200 µl 0,1M CaCl ₂ pH 7,45-7,46
Digestionsmedium	20 ml Isolationsmedium 4 mg Collagenase pH 7,45-7,46

Im ersten Schritt wurde das Pankreas der Versuchsmaus entnommen, von überschüssigem Fett- und Bindegewebe befreit und mit Skalpell und Schere in kleine Stücke zerteilt. Im Anschluss wurde das zerkleinerte Gewebe in ein Becherglas mit Digestionsmedium überführt und mit einer Schere weiter zerstückelt. Die Suspension wurde mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % O₂, was als Carbogengas bezeichnet wird, begast und 20 Minuten mit Aluminiumfolie abgedeckt bei 37 °C und 150 Zyklen auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation bei 37 °C wurde das Digestionsmedium vorsichtig abgenommen und das Gewebe weiter mit der Schere zerkleinert. Im nächsten Schritt wurde das Isolationsmedium hinzugegeben, das Becherglas geschwenkt und der Überstand erneut abgesaugt. Danach erfolgte eine weitere Inkubation für 15 Minuten unter Carbogengas bei 37 °C auf dem Schüttler. Anschließend wurde das Gewebe mit Glaspipetten in absteigender Größe weiter mechanisch zerkleinert. Üblicherweise wurde mit der 20 ml Pipette begonnen und alle Pipetten bis zur 2 ml Pipette verwendet. Dann wurde alles durch einen 200 µm Gazefilter in ein 15 ml Falcon filtriert und bei 130 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand unter einer

Sicherheitswerkbank vorsichtig absaugt und das Pellet in dem entsprechenden Medienvolumen für die angestrebte Zellkulturflasche in 20%tigem DMEM Nährmedium aufgenommen. Nach Bedarf wurde zur Abtötung von Bakterien Gentamycin (1%) hinzugefügt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei den frisch präparierten Zellen erfolgte nach 48 Stunden ein Medienwechsel, um abgestorbene und nicht adhärente Zellen zu entfernen.

Medienwechsel

Die Pankreaszellen mussten in regelmäßigen Abständen mit frischem Zellkulturmedium versorgt werden. In dem Medium ist ein Indikatorfarbstoff enthalten, der sich bei einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich gelb färbt und somit einen Hinweis auf die Stoffwechselaktivitäten der Zellen gibt. In der Regel wurde der Medienwechsel im Abstand von 4 Tagen durchgeführt, wobei die Zellen in Passage 0 in 20 %tigem Medium, in den darauf folgenden Passagen in 10 %tigem Medium kultiviert wurden.

Nach Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop erfolgte der Medienwechsel unter der Sicherheitswerkbank. Zuerst wurde das alte Medium abgesaugt. Je nach Bedarf erfolgte dann ein Waschschrift mit Phosphate Buffered Saline (PBS). Im Anschluss daran wurde neues 37 °C warmes Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen erneut unter dem Mikroskop kontrolliert. Danach wurden sie bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

Passagieren von Zellen

Wird die vollständige Bedeckung (Konfluenz) der dargebotenen Oberfläche in der Zellkulturflasche durch die Zellen erreicht, müssen diese von dem Zellkulturflaschenboden abgelöst und auf einer größerer Oberfläche, zum Beispiel einer größeren Zellkulturflasche, ausgesät werden (passagiert). Dabei wurde mit zwei verschiedenen Verdauungsenzymen zur Ablösung der Zellen gearbeitet. Für das Ablösen der Zellen wurde in der Regel Trypsin eingesetzt. Zur Vorbereitung der Zellen für die durchflusszytometrische Analyse wurde mit Accutase gearbeitet. Während Trypsin bei zu langer Einwirkzeit schädlich für die Zellen sein kann, ist Accutase wesentlich schonender für die Zellen und es können lange Einwirkzeiten realisiert werden, was zu einer besseren Vereinzelung der Zellen führt.

Zellpassage mit Trypsin

Im ersten Schritt wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die entsprechende Menge Trypsin-EDTA in die Zellkulturflasche gegeben und die Kultur für zwei Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin-EDTA Gemisch löst die Zellen vom Flaschenboden ab, ist aber bei zu langer Einwirkzeit giftig für die Zellen, da es die Zellmembran zerstören kann. Nach Ende der Inkubationszeit sollten die Zellen durch vorsichtiges Klopfen vom Zellkulturflaschenboden ablösbar sein. Falls dies nicht der Fall war, wurden sie durch den umsichtigen Einsatz eines Schabers von dem Flaschenboden gelöst.

Danach wurde der Suspension zur Inaktivierung des Trypsin-EDTA Gemisches die doppelte Menge an Zellkulturmedium zugesetzt. Nach Überführen in ein Falcon, wurde die Suspension für 5 Minuten bei 180 x g zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren bildete sich am Falconboden ein Zellpellet. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Zusammen mit dem frischen Medium wurden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Tabelle 9 Übersicht über die einzusetzenden Volumina für alle Zellkulturmethoden

	6-Well	Flasche 25 cm²	Flasche 75 cm²
Medium	2,5 ml	5 ml	15 ml
PBS	1-1,5ml	2-3 ml	5-10 ml
Trypsin	0,5 ml	1 ml	2 ml
Einfriermedium	-	500 µl	750 µl

Zellablösung mit Accutase

Zum Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden und Herstellung einer Einzelzellsuspension für die durchflusszytometrische Analyse wurde Accutase eingesetzt. Für die Analyse wurden die Zellen bis zur Konfluenz in mittleren Flaschen kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit je 7ml Accutase bedeckt und für 35 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach den ersten 15 Minuten der Inkubationszeit wurden die Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren weiter gelöst. Nach Ablauf der gesamten Inkubationszeit wurde erneut resuspendiert und die Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Dabei war im Gegensatz zum Ablösen mit Trypsin kein Ablöschen mit Medium notwendig. Dann erfolgten die Bestimmung der Zellzahl mit dem NucleoCounter und weitere Schritte zur Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie. (siehe Zellzyklusmessung mit dem Durchflusszytometer)

Einfrieren von Zellen

Um Zellen für spätere Versuche einzulagern, wurden in regelmäßigen Abständen Teile der Zellen oder auch ganze Zelllinien in einen Kryotank überführt.

Dazu wurden die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche gelöst (siehe Zellpassage mit Trypsin) und das nach dem Zentrifugationsschritt entstandene Pellet in einer geeigneten Menge Einfriermedium aufgenommen. Nach Überführung der Suspension in ein Kryoröhrchen, kam dieses in eine Einfrierbox für Zellen, die ihrerseits in einen -80 °C Tiefkühlschrank gestellt wurde. Die Einfrierbox gewährleistete eine Temperaturreduktion von einem Grad pro Minuten, was zusammen mit dem Einfriermedium zur Vermeidung von Eiskristallbildung dient. Nach spätestens einem Tag wurden die Röhrchen in einen Kryotank umgelagert.

Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen und Anlegen einer Zellkultur aus den eingefrorenen Zellen wurde das Einfriergefäß aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad leicht angetaut. Die Zellen wurden unter der Sicherheitswerkbank in ein Falconröhrchen mit 37 °C warmem Medium überführt und für 5 Minuten bei 180 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in dem passenden Volumen für die gewünschte Schale/Flasche resuspendiert und ausgesät.

3.2 Zellzahlbestimmung mit dem NucleoCounter

Zur exakten Bestimmung der Zellzahl für die durchflusszytometrische Analyse wurde der NucleoCounter verwendet. Dieses Gerät bestimmt die Zahl der Zellkerne durch eine Propidium Iodid- Fluoreszenzfärbung, wobei im Vergleich zur manuellen Zählung ein wesentlich größeres Messvolumen eingesetzt werden kann.

Nach dem Ablösung der Zellen vom Zellkulturflaschenboden wurden 50 µl der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl NucleoCounter Reagent A gemischt. Im Anschluss wurden 50 µl NucleoCounter Reagent B hinzugefügt. Danach wurde die Suspension in eine NucleoCounter Kassette gesogen und mit dem NucleoCounter gemessen, wobei von dem Gerät eine Zellzahl angegeben wurde, die mit dem Faktor 3 multipliziert die Zellzahl pro Milliliter ergab.

3.3 Zellfixierung mit Methanol/Aceton

Um die Strukturen in den zu untersuchenden Zellen zu fixieren, die Stoffwechselfvorgänge zu unterbrechen und Zerfallserscheinungen entgegenzuwirken, war für die Click-it-Analyse ein Fixierungsschritt der Zellen notwendig. Es wurde mit einer Methanol/Aceton-Fixierung gearbeitet, bei der die Proteine innerhalb der Zelle ausgefällt werden.

Nach einmaligen Spülen der Zellen oder des Cytospin-Präparates mit PBS, wurde für 5 Minuten mit einer eisgekühlten Methanol-Aceton Lösung fixiert. Methanol und Aceton lagen dabei im Verhältnis 7:3 vor. Zur Kernfärbung wurde der Lösung DAPI (1:1000) zugefügt. Im Anschluss folgten drei Waschschrte mit PBS. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.4 Click-iT Proliferationsassay

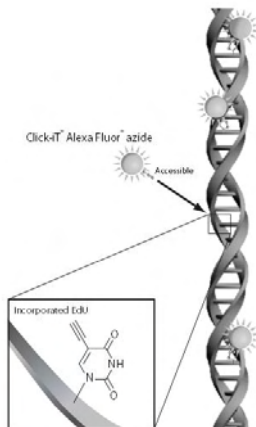


Abbildung 6 Prinzip des Click-it Assays. Das Alexa Fluor® Azide 488 bindet an das in die DNA eingebaute EdU ohne das eine DNA Denaturierung notwendig ist. (Life Technologies Corporation., 2011)

Das Click-iT Edu Cytometry Assay der Firma Invitrogen ist eine Methode zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Zellen. Eine Möglichkeit zum Nachweis proliferierender Zellen ist die Detektion von neusynthetisierter DNA. Die bekannteste Methode arbeitet dabei unter dem Einsatz von Bromdesoxyuridin (BrdU). BrdU ist ein radioaktives ^3H -Thymidin, das statt der Base Thymin in die DNA eingebaut wird und dort detektiert werden kann. Nachteil dieser Methode ist die Gefährdung des Forschers durch die radioaktive Belastung. Das Click-it-Proliferationsassay der Firma Invitrogen arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie das BrdU-Assay. Das Thyminanalogon 5-Ethyl-2'-Desoxyuridine (EdU) wird anstelle von Thymin in neusynthetisierte DNA eingebaut. Während im BrdU Assay zur Detektion eine Denaturierung der DNA notwendig ist, kann die Click-Reaktion bei intakter DNA erfolgen. Der Farbstoff Alexa Fluor® 488 bindet an das, in die DNA eingebaute EdU, und kann unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Die Detektion basiert dabei auf einer Click-Reaktion zwischen einem Azid und einem Alkin, die durch Kupfer katalysiert wird.

Zur Vorbereitung des Click-iT- Proliferationsassays wurden die Zellen in Ibidi ausgesät und dem Medium EdU (1:1000) zugesetzt. Zur Dokumentation der DNA-Synthese von Zellen in Passage 0 wurde je ein Ibidi nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und nach Ende der Passage mit Methanol/Aceton fixiert. Zur Unterscheidung zwischen den adhärennten und nicht adhärennten Zellen in Passage 0 wurde vor der Fixierung der Überstand des jeweiligen Ibidi abgenommen und ein Cytospin durchgeführt (siehe Cytospin). Dieses Präparat wurde ebenfalls Methanol/Aceton fixiert. Sowohl die Zellen in den Ibidi als auch die Präparate auf den Objektträgern wurden mit PBS bedeckt bei 4 °C bis zur Detektion gelagert

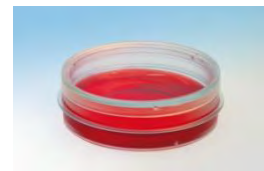


Abbildung 7 Abbildung eines mit Zellkulturmedium gefülltem Ibidi (Ibidi GmbH, 2002)

Für die Dokumentation der DNA-Synthese von Zellen in höheren Passagen wurden je Zelllinie drei Ibidi kultiviert und die Zellen am Ende der Passage mit Methanol/Aceton fixiert.

Zur Detektion des EdU wurde ein Reaktionsmix aus folgenden Komponenten hergestellt. Die Volumenangaben beziehen sich auf einen 500 µl Gesamtansatz, der zur Färbung eines Ibidi oder Objektträgers ausreicht.

430 µl	Reaktionspuffer (Komponente D)
20 µl	CuSO ₄ (Komponente H)
1,2 µl	Alexa Fluor [®] Azid (Komponente B)
50 µl	1x Click-iT EdU buffer additive (Komponente F)

Zur Vorbereitung der Detektion wurden die fixierten Zellen zwei Mal mit 3 % BSA in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Ibidi's und Objektträger mit je 500 µl Reaktionsmix bedeckt und für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgte ein weiterer Waschschriff mit 3 % BSA in PBS, wonach die Zellen mit Vectashield eingedeckt wurden und unter dem Mikroskop analysiert werden konnten. Dazu wurden die Zellen bei 495 nm (Emission 519 nm) angeregt.

3.5 Cytospin

Bei einer Cytospin werden Zellen mittels Zentrifugalkraft auf einen klar definierten Bereich eines Objektträgers sedimentiert. Vorteil dieser Technik ist, dass so auch nicht adhärenente Zellen bzw. Suspensionszellen auf einem Objektträger fixiert und später in die Auswertung mit einbezogen werden können.

Um das Proliferationsverhalten nicht adhärenenter Mauspankreaszellen in Passage 0 zu untersuchen, wurde vor Fixierung der Zellen der Überstand der Ibidi's abgenommen und mittels einer Tischzentrifuge bei voller Drehzahl zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen, in den Tropfen-Trichter des Cytospingerätes pipettiert und für fünf Minuten bei höchster Drehzahl zentrifugiert. So wurden die Zellen auf einen bestimmten Bereich eines Objektträgers aufgebracht, wobei es zum Auffangen von Restflüssigkeit eine spezielle Filterkarte gibt. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde das Präparat mit einem hydrophoben PAP-Pen umrahmt und mittels Methanol/Aceton fixiert.

3.6 Zellzyklusmessung mit dem Durchflusszytometer

Das Durchflusszytometer oder auch Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) ist ein Gerät zur Zellanalyse. Die Zellen können hiermit anhand ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften bezüglich ihrer Zellgröße, Granularität und Struktur der Zellmembran untersucht werden. Bei der Messung mit dem Durchflusszytometer werden Einzelzellen in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl durch einen Laserstrahl geführt. Die emittierten Lichtsignale werden gemessen und in elektronische Signale umgewandelt. Das Vorwärtsstreulicht stellt

dabei ein Maß für die Zellgröße dar, das Seitenstreulicht ein Maß für die Zellgranularität und Zellkomplexität. Bei Proben, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt sind, wird neben den oben genannten Parametern zusätzlich die Stärke des Fluoreszenzsignals mit dem Durchflusszytometer aufgenommen. Der Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD bindet stöchiometrisch an die DNA der Zellen und kann so zur Zellzyklusanalyse eingesetzt werden. Der DNA-Gehalt einer Zelle ist von der jeweiligen Zellzyklusphase der Zelle abhängig. Zellen, die sich in der G0/G1-Phase befinden, haben einen einfachen (diploiden) Chromosomensatz. Zellen in der G2-Phase haben einen doppelten (tetraploiden) Chromosomensatz, was dazu führt, dass ihr emittiertes Fluoreszenzfärbungssignal der 7-AAD Färbung doppelt so stark ist, wie das von Zellen aus der G0/G1-Phase. Apoptotische Zellen haben häufig einen geringeren Anteil an DNA als G0/G1-Zellen, wodurch ihr Fluoreszenzsignal sehr niedrig ausfällt.

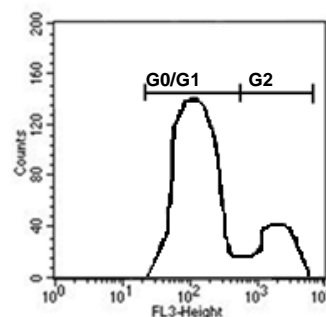


Abbildung 8 Prinzip der Zellzyklusmessung mit dem Durchflusszytometer. Bei der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD ergeben sich zwei Peaks. Bei dem Peak mit dem niedrigeren Fluoreszenzsignal handelt es sich um Zellen in der G0/G1-Phase. Die Zellen mit der stärkeren Fluoreszenz befinden sich in der G2-Phase.

Vorbereitung der Zellen

Für die Analyse mittels des Durchflusszytometers wurden Zellen verschiedener Zelllinien in Passage 6 bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden mit Accutase (siehe Zellablösung mit Accutase) vereinzelnd und die Zellzahl mit dem NucleoCounter bestimmt. Nach Zentrifugation bei 180 x g wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 4 ml FACS-Puffer aufgenommen. Danach erfolgte erneut eine Zentrifugation, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen. Zur Fixierung wurde die Zellsuspension unter vorsichtigem Resuspendieren mit 5 ml eisgekühlten 70 %igen Ethanol versetzt. Die fixierten Zellen wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Färbung und Messung der Zellen am FACS

Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Messung wurden je $2,5 \times 10^5$ Zellen in 96-Well-Platten aliquotiert. Anschließend wurde die Platte für 5 Minuten bei 275 x g zentrifugiert und der Überstand durch vorsichtiges Ausklopfen verworfen. Daraufhin wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 275 x g zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen in 200 µl

FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von je 20 µl CellViabilitySolution wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der Farbstoff 7-AAD interkaliert stöchiometrisch in die DNA. Je mehr DNA in den Zellen vorhanden ist, desto mehr Farbstoff wird gebunden und desto größer ist das Fluoreszenzsignal. Zur Messung wurde der FL3-Detektor eingesetzt. Je Zelllinie wurden 10.000 Zellereignisse analysiert und die Messergebnisse mit der Software CellQuest Pro ausgewertet.

3.7 Time-Lapse Aufnahmen

Ein Time-Lapse Mikroskop ist ein Mikroskop, mit dem Zeitrafferaufnahmen durchgeführt werden können. Es befindet sich in einem Inkubator, in dem für die Zellen optimale Kultivierungsbedingungen eingestellt werden können, was Langzeitbeobachtungen von Zellen in der Zellkultur möglich macht. Es wurde mit dem Time-Lapse Mikroskop Olympus IX81 von Zeiss gearbeitet.

Nach Präparation wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in 20 %tigem Medium in einem Well einer 6-Well-Platte kultiviert. Es wurde mit Zellen von zwei Mäusen gearbeitet. Von einer Zelllinie wurde das Auswachsen eines Acinus aufgenommen und von der anderen ein Bereich mit Einzelzellen, um das Wachstum einzelner Zellen beobachten zu können. Begonnen wurden beide Aufnahmen etwa 48 h nach Präparation der Zellen, zu dem Zeitpunkt, an dem die meisten Zellen auf den Boden des Kultivierungsgefäßes abgesunken waren. Ein Großteil der Zellen lag nach der Präparation in Zellclustern vor, die auf die Organisation der Zellen im Pankreasgewebe in Acini zurückzuführen sind. Die Time-Lapse Aufnahme des Acinus dauerte 118 Stunden. Die Aufnahmezeit der Einzelzellen erstreckte sich über 120 Stunden, wobei alle 15 Minuten mit der im Mikroskop integrierten Kamera eine Aufnahme gemacht wurde. Der Fokus der Kamera wurde dabei auf den Boden der Multiwellplatte eingestellt.

3.8 Microarray Analyse

Eine Microarray Analyse ermöglicht eine Expressionsanalyse einer großen Anzahl bestimmter Gene. Anhand des Vergleichs des Expressionsniveaus zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Lebenszyklus eines einzelnen Versuchstieres oder verschieden behandelter Versuchstiere, können so die Unterschiede in der Genexpression ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten wurden in der Arbeitsgruppe Zelltechnologie der Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie in Lübeck gewonnen. Eingesetzt wurden

männliche FVB/NJ Mäuse der Charles River Laboratories. Es wurde zwei Tieren das Pankreas entnommen und eine RNA-Präparation mit dem QIAGEN RNeasy Mini Kit durchgeführt. Weiter wurde von Zellen aus drei verschiedenen Mauspankreas-Zelllinien jeweils am Ende der Passage ebenfalls eine RNA-Präparation mit dem QIAGEN RNeasy Mini Kit durchgeführt. Dies wurde mit Zellen der Passage 0 bis 6 und Passage 10 durchgeführt. Das Probenmaterial wurde von dem Unternehmen AROS Applied Biotechnology A/S¹ einer Microarray Analyse unterzogen. Eingesetzt wurde dazu das Affymetrix Mouse Gene 1.1 ST Array.

Die Normalisierung der Daten wurde im Anschluss von Dr. Andrej-Nikolai Spiess² aus der Abteilung für Andrologie der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Hamburg vorgenommen.

Zur weiteren Datenanalyse und Erstellung der Heatmap wurden das Programm IGOR Pro 6 und Microsoft Excel 2007 verwendet. Bei der Analyse wurde vor allem der Unterschied der Genexpression zwischen T0 und P0 betrachtet, weshalb für diese Zeitpunkte hierfür die Ermittlung des Fold Change (FC) erfolgte. Diese mathematische Operation beschreibt wie stark zwei Variablen voneinander differieren und ergibt sich aus der Formel:

$$FC = 2^{(P0-T0)}$$

Ein FC von 1 bedeutet keine Änderung der Genexpression zwischen T0 und P0. Ein Wert kleiner als 1 bedeutet eine negative Regulation des betroffenen Gens, ein Wert größer als 1 beschreibt eine positive Regulation des Gens. Zur besseren Visualisierung der FC-Werte bei negativer Regulation wurden die negativen Kehrwerte dieser Werte ermittelt. Dazu wurde eine WENN-Funktion in Excel angesetzt. Mit der Funktion

$$= WENN (FC < 1; -\frac{1}{FC}; FC)$$

wurden alle FC-Werte, die kleiner als 1 waren, als ihr negativer Kehrwert dargestellt.

¹ AROS Applied Biotechnology, A/S Brendstrupgaardsvej 102, 8200 Aarhus N, Denmark

² Dr. Andrej-Nikolai Spiess, Abteilung für Andrologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Haus W 38, Martinistr. 52, 20246 Hamburg

4 Ergebnisse

Für die Dokumentation des Proliferationsverhaltens exokriner Mauspankreaszellen nach Isolation aus dem Gewebsverband wurde mit verschiedenen Untersuchungsmethoden gearbeitet. Zum Einen wurde das Click-it-Assay verwendet mit dem DNA-Synthese in den Zellen detektiert werden kann. Dabei wurden exokrinen Mauspankreaszellen aus den Passagen 0, 5, 6 und 10 eingesetzt. Zur Überprüfung des Assay wurde weiter eine durchflusszytometrische Analyse mit dem Farbstoff 7-AAD durchgeführt. Zum Anderen wurden Time-Lapse Aufnahmen von Mauspankreaszellen in Passage 0 durchgeführt, um das Auswachsen der präparierten Zellen und den Proliferationsbeginn bildlich zu dokumentieren. Weiter wurde die Änderung der Genexpression zwischen Passage 0 und 10 mittels einer Genexpressionsanalyse in die Arbeit einbezogen.

4.1 Untersuchung des Proliferationsverhaltens mit dem Click-it-Assay

Das Click-it-Assay wird zum Nachweis neusynthetisierter DNA eingesetzt. Das Thyminanalogon EdU wird in neusynthetisierte DNA eingebaut und kann mit dem Farbstoff Alexa Fluor[®] detektiert werden. Wie in Abbildung 9 gezeigt, leuchten positive Zellen dabei grün, während Zellen ohne neusynthetisierte DNA durch DAPI-Färbung blau gefärbt bleiben.

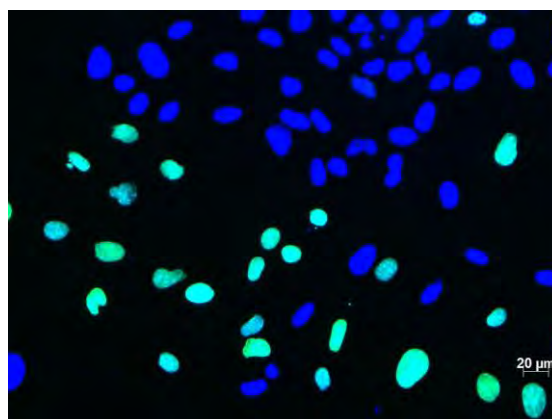


Abbildung 9 Beispielbild der Zelllinie MApan10P5 von der Click-it-Analyse in der 20-fachen Vergrößerung. Angefärbt sind jeweils die Zellkerne der Zellen. Zellen mit blauem Zellkern haben noch nicht mit der DNA-Synthese begonnen. Zellen mit grünem Kern haben DNA synthetisiert und dabei EdU in die neue DNA eingebaut. Durch die Detektion mit Alexa Fluor[®] leuchten diese Zellen grün.

Um einen Vergleich der Zelllinien exokriner Mauspankreaszellen höherer Passagen untereinander zu erhalten, wurden Click-it-Analysen mit mindestens drei unterschiedlichen Zelllinien aus Passage 5, 6 und 10 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in jeweils drei Ibidi bis zur Konfluenz unter der Zugabe von EdU bei jedem Medienwechsel kultiviert und nach Färbung unter dem Mikroskop der Anteil an positiven Zellen bestimmt. Je nach Anzahl der Zellen pro Ibidi wurden durchschnittlich 800 Zellen pro Passage und Zelllinie ausgezählt. Dabei wurde eine Zelllinie über Passage 5, 6 und 10, andere über zwei Passagen und einige der verwendeten Zelllinien jeweils nur in einer Passage betrachtet. Über alle untersuchten Zelllinien und Passagen lag der niedrigste Anteil an Zellen mit neusynthetisierter DNA mit 41,35 % bei MApan22bP10 in Passage 10, der größte mit 66,57 % bei MApan58bP6 in Passage 6.

Der prozentuale Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen bewegte sich in Passage 5 zwischen 58,56 % und 62,42 %, in Passage 6 lag der Anteil zwischen 43,85 % und 66,57 % und in Passage 10 zwischen 41,35 % und 66,20 %. Daraus wurde für jede Passage die Standardabweichung der einzelnen Zelllinien ermittelt. Dabei trat im Vergleich der Passagen untereinander mit nur 1,6 % die niedrigste Standardabweichung in Passage 5 auf. In Passage 6 betrug die Standardabweichung 8,3 % und in Passage 10 lag sie bei 11%. Obwohl die Zellen aus verschiedenen Mäusen stammen, zeigten sie ein sehr ähnliches Verhalten in der *in vitro* Kultivierung. Auch bei dem Vergleich der Passagen untereinander konnten keine entscheidenden Unterschiede zwischen den Passagen selbst festgestellt werden. Der durchschnittliche Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen in Passage 5 lag bei 60,22 %, in Passage 6 bei 58,70 % und in Passage 10 bei 57,56% (siehe Abbildung 10), was einen Unterschied von 3 % zwischen den verschiedenen Passagen ausmachte.

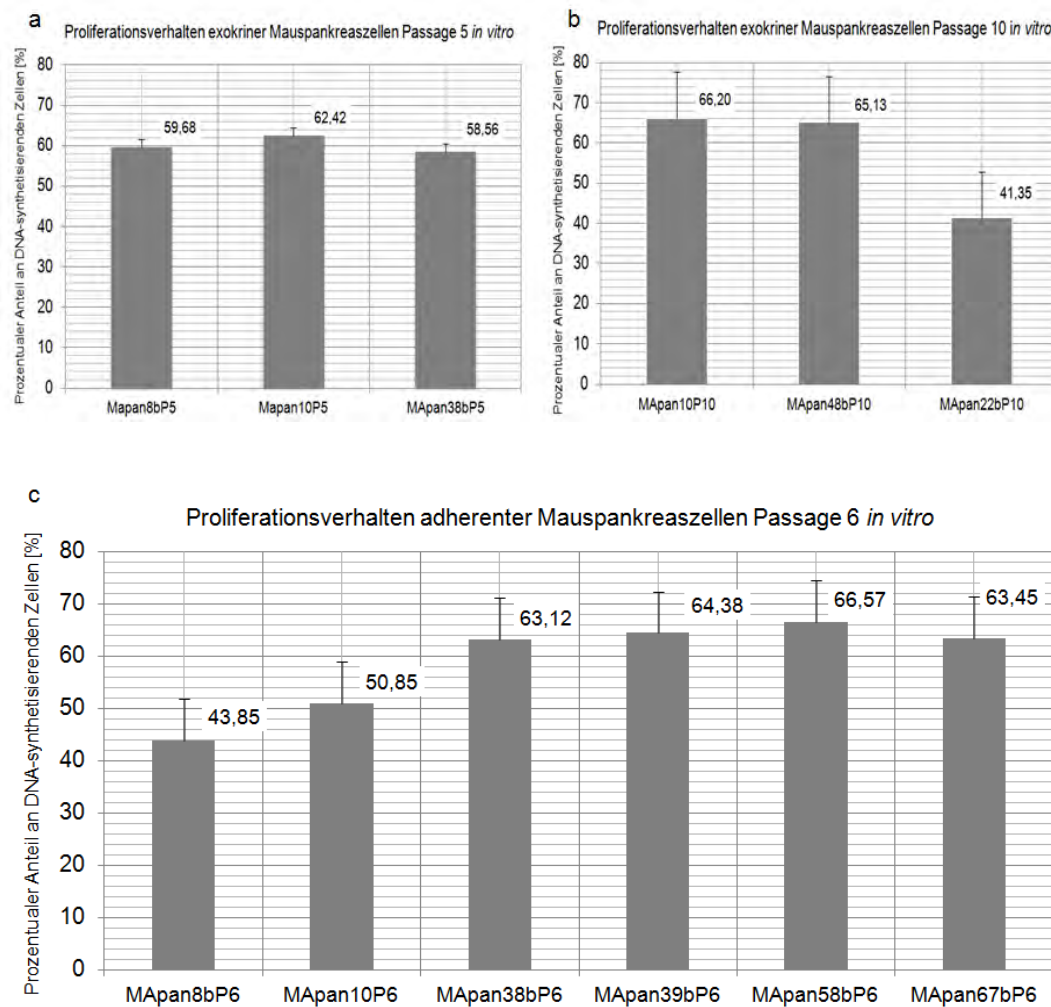


Abbildung 10 Analyse der Proliferations-eigenschaften exokriner Mauspankreaszelllinien mit dem Click it Assay. Es wurde von drei Zelllinien aus Passage 5 und 10 und mit sechs Zelllinien aus Passage 6 eine Click it-Analyse durchgeführt. In a sind die untersuchten Zelllinien aus Passage 5, in b die Zelllinien aus Passage 10 und in c die Zelllinien aus Passage 6 dargestellt. Der Anteil an Zellen mit neusynthetisierter DNA bewegte sich im Vergleich der Passagen P5, P6 und P10 zwischen 41,35 % und 66,15 %.

Im nächsten Schritt wurde das Proliferationsverhalten exokriner Mauspankreaszellen in Passage 0 untersucht. Dazu wurden Pankreata in Kultur genommen und die Zellen unter Zugabe von EdU in Ibdis kultiviert. Die Ibdis wurden im 24-Stunden Takt mit Methanol/Aceton fixiert, wobei das erste Ibidi 24 h nach Präparation der Zellen fixiert wurde. Außerdem wurden die nicht adhärenente Zellen aus dem Überstand der Ibdis mittels des Cytospingerätes auf Objektträger aufgebracht. So sollte festgestellt werden, ob auch nicht adhärenente Pankreaszellen DNA synthetisieren. Allerdings konnte bei den Präparaten der noch nicht adhärenente Zellen keine einzige DNA-synthetisierende Zelle detektiert werden. Bei den adhärenente Zellen konnte nach 48 h in Kultur ein Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen von 1,45 % nachgewiesen werden. Nach 72 h stieg dieser Anteil auf 8,47 % an und nach 96 h erreichte er mit 55,71 % den höchsten Anteil an positiven Zellen über die gesamte Kultivierungsdauer in P0. Nach weiteren 24 h sank der Anteil auf 37 % ab, wobei er sich

dann nach 144 h Kultivierungsdauer bei 46,81 % und nach 168 h bei 50,06 % befand. Am Ende der Passage konnte für 49,12 % der Zellen ein proliferatives Verhalten nachgewiesen werden. Während sich in den ersten 120 h nach Präparation der Zellen noch kein konstantes Proliferationsverhalten innerhalb der Kultur eingestellt hatte, stellte dieses sich 144 h nach Präparation der Zellen ein. Nach 144 h bis zum Ende der Passage bewegte sich der Anteil der DNA-synthetisierenden Zellen zwischen 46,81 % und 50,06 %, was etwa dem Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen in Passage 5, 6 und 10 entsprach. In Passage 5 betrug der durchschnittliche Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen 60,22 %, in Passage 6 entsprach er 58,70 % und in Passage 10 lag er bei 57,56 %.

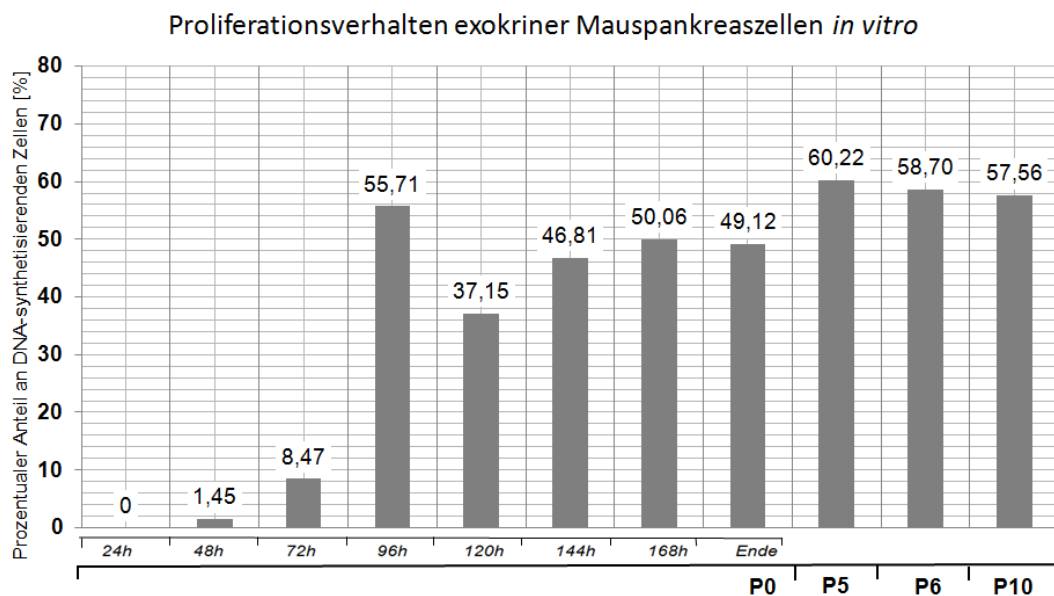


Abbildung 11 Proliferationsverhalten exokriner Mauspankreaszellen in *in vitro* Kultivierung Zur Dokumentation des Proliferationsverhaltens exokriner Mauspankreaszellen nach Isolation aus dem Gewebsverband in Passage 0 wurden Pankreata in Kultur genommen und die Zellen in *Ibidis* unter Zugabe von EdU kultiviert. Der Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen stieg in P0 von 1,45 % nach 48 h bis zum Ende der Passage bis auf 49,12 %. Dargestellt ist weiter der Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen in P5, P6 und P10.

4.2 Verifizierung der Ergebnisse des Click-it-Assays durch die Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung der Ergebnisse des Click-it-Assays wurde eine durchflusszytometrische Messung der Zellen mit dem Farbstoff 7-AAD durchgeführt. Mit dem Durchflusszytometer können einzelne Zellen bezüglich ihrer Zellgröße und Granularität untersucht werden. Des Weiteren können die Zellen durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfärbungen auf Grund ihrer Eigenschaften unterschieden werden. Die Zellen werden im Durchflusszytometer durch einen Laserstrahl geleitet, wobei das gestreute Licht gesammelt und in elektrische Signale umgewandelt wird. Der Farbstoff 7-AAD bindet stöchiometrisch

an die DNA der Zellen, wodurch über die Stärke des Fluoreszenzsignals auf den DNA Gehalt der Zelle geschlossen werden kann.

Zur Durchführung der durchflusszytometrischen Messung und Vergleich mit dem Click-it-Assay wurden drei Zelllinien aus Passage 6 jeweils in einer mittleren Zellkulturflasche und 3 Ibidis bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen für das Click-it-Assay wurden dann mit Methanol/Aceton fixiert und die Detektionsschritte des Assay durchgeführt. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen mit Accutase vom Zellkulturflaschenboden abgelöst, vereinzelt und nach mehreren Waschschritten mit 70%igen Ethanol fixiert. Danach erfolgten die Färbung mit 7-AAD und die Messung am Durchflusszytometer.

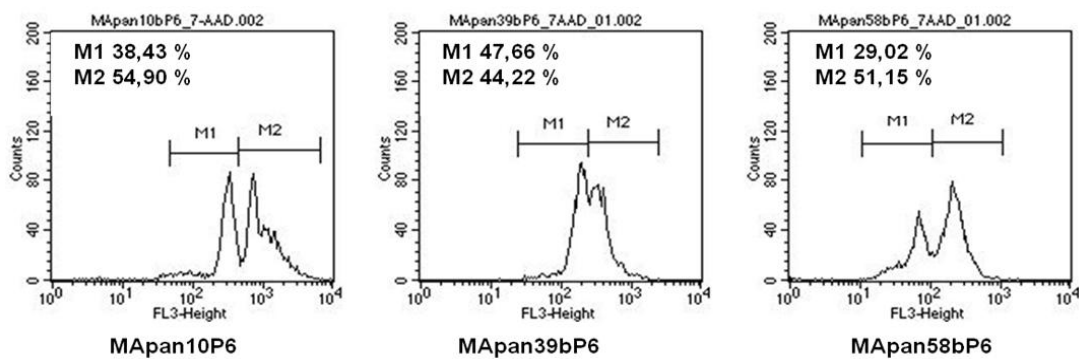


Abbildung 12 Durchflusszytometrische Analyse mit 7-AAD. Es wurden Zellen der Zelllinien MApan10P6, MApan38bP6 und MApan58bP6 mit 7-AAD nach Protokoll gefärbt und mit dem Durchflusszytometer gemessen. Für die Auswertung wurde die Eigenfluoreszenz von dem Messergebnis subtrahiert und die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen. Im Anschluss erfolgte die Aufteilung in die Peaks M1 und M2, die den jeweiligen Anteil der gemessenen Zellen aus der G0/1 bzw. G2-Phase darstellen.

Bei allen drei Messungen ergaben sich zwei Peaks, wobei die Auftrennung der Peaks von MApan39bP6 sehr schlecht erfolgt ist. Das Fluoreszenzsignal bewegte sich bei allen Zelllinien zwischen 10^2 und 10^4 , wobei sich die unterschiedlichen Signalstärken über Unterschiede zwischen den Zelllinien erklären lassen. Mit der Software Cell Quest Pro wurde die Peakbreiten und der jeweilige prozentuale Anteil der Peaks an den gemessenen Zellen bestimmt. Unter der Annahme, dass der Peak mit dem stärkeren Fluoreszenzsignal die Zellen aus der G2-Phase enthält, wurden diese Daten für den Vergleich mit dem Click-it-Assay herangezogen.

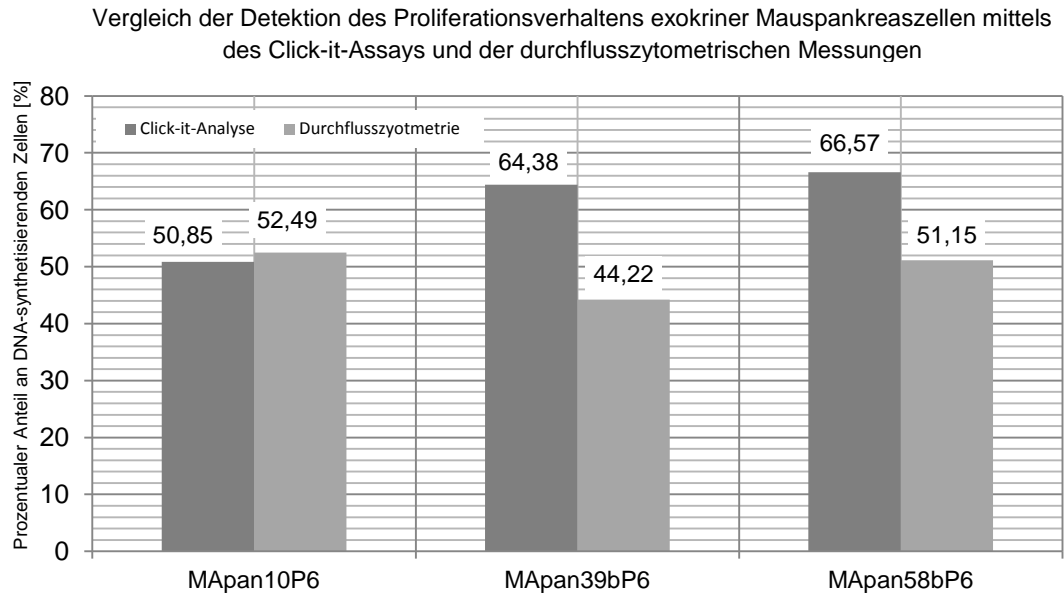


Abbildung 13 Vergleich der Bestimmung des Proliferationsverhaltens mittels des Click-it-Assays und der durchflusszytometrischen Messung. Von Zellen dreier verschiedener Zelllinien wurde das Click-it-Assay und eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Mit beiden Methoden wurde der Anteil an proliferierenden Zellen bestimmt, der in der Grafik verglichen wird. Zwischen den Zelllinien ergab sich höchstens ein Unterschied von 20 % zwischen den Messungen mit den beiden Methoden.

Von der Zelllinie MApan10P6 haben laut der durchflusszytometrischen Analyse 52,49 % der Zellen DNA repliziert. Im Click-it-Assay ergab sich für diese Zelllinie ein Anteil von 50,85 % an Zellen mit DNA-Synthese. Damit unterschieden sich die Ergebnisse beider Methoden nur um circa 2 %. Ein um den Faktor 10 größerer Unterschied ergab sich für die Zelllinie MApan39bP6. Hier machten im Durchflusszytometer nur 44,22 % und bei dem Click-it-Assay 64,38 % den Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen aus. Auch bei der Zelllinie MApan58bP6 gab es einen prozentualen Unterschied von 16 % zwischen den Ergebnissen beider Methoden. Bei dieser Zelllinie waren 51,15 % der Zellen bei der Messung mit dem Durchflusszytometer positiv für DNA-Synthese. 66,57 % betrug der Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen im Click-it-Assay.

4.3 Time-Lapse Aufnahme

Mittels des Click-it-Assays und der durchflusszytometrischen Messung konnten DNA-synthetisierende Mauspankreaszellen in der nullten Passage detektiert werden. Gleichzeitig wurden diese Ergebnisse durch das Erreichen von Konfluenz in der Zellkultur unterstützt. Um den zeitlichen Beginn der Proliferation und die Teilung der Zellen bildlich festzuhalten, wurden zwei Time-Lapse Aufnahmen von frisch präparierten Zellen vorgenommen. Dazu wurde ein Mikroskop verwendet, das alle 15 Minuten automatisch ein Bild von den Zellen

machte. Während bei der einen Aufnahmeserie ein einziger Acinus in dem Zellkulturgefäß über etwa sieben Tage beobachtet wurde, wurde in der zweiten Time-Lapse Aufnahme bewusst eine Stelle in dem Zellkulturgefäß gewählt, in dem nur Einzelzellen vorlagen. Gestartet wurden beide Aufnahmen jeweils 48 Stunden nach der Isolierung der Zellen aus dem Gewebe, um den Zellen bzw. dem Acinus ausreichend Zeit zum Absinken und Adhärenieren auf dem Zellkulturflaschenboden zu geben. Bei beiden Aufnahmen wurde direkt vor Aufnahmestart ein Medienwechsel durchgeführt. (Aufnahmen siehe Anhang)

Bei der Aufnahme des Acinus konnte bereits bei Start der Aufnahme eine geringfügige Ausbreitung auf dem Zellkulturgefäßboden beobachtet werden. In den ersten Stunden nach Aufnahmestart brach die Basallamina an einigen Stellen auf und erste feine Zellauswüchse wurden sichtbar. Etwa neun Stunden nach Aufnahmestart zerbrach die Lamina vollständig und immer mehr Zellen wuchsen aus dem Acinus aus. Der Acinus schien in gewisser Weise auf dem Boden des Zellkulturgefäßes zu zerschmelzen. Während die Zellen aus ihm herauswuchsen, näherte er sich immer weiter dem Zellkulturgefäßboden an.

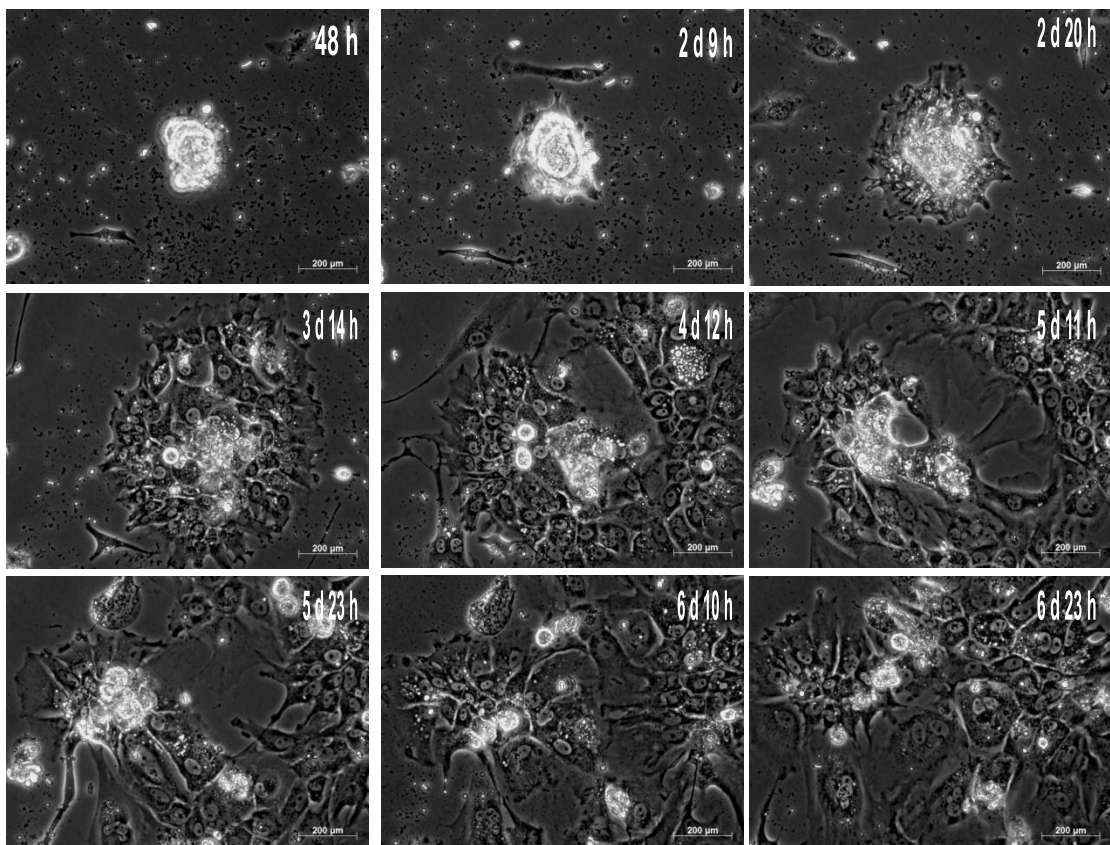


Abbildung 14 Bildauswahl der Aufnahmen des Time-Lapse Mikroskops. Die Auswahl beginnt mit einem Bild des Acinus 48 h nach der Präparation der Zellen. Insgesamt sechs Tage und 23 h nach Präparation der Zellen wurde die Aufnahme beendet. Dazwischen konnte das Auswachsen des Acinus auf dem Zellkulturflaschenboden beobachtet werden.

Mit fortschreitendem Auswachsen veränderten die Zellen unregelmäßig ihre Form. Sie wurden lang und schmal oder breiteten sich über große Flächen aus. Dabei waren vor allem in den Randbereichen des auswachsenden Acinus große flache Zellen zu beobachten. Einige Zellen wanderten aus dem Fokus des Mikroskops hinaus, andere zogen sich über mehrere Stunden kugelig zusammen und verteilten sich dann weiter in der Zellkulturflasche. In einigen Zellen war ein doppelter Kern zu erkennen. Allerdings konnte über die gesamte Zeit keine Zellteilung beobachtet werden, obwohl die Zellen innerhalb weniger Tage nach Aufnahmeende konfluent wurden und eine Zellpassage durchgeführt werden musste.

Auch bei Aufnahme des Bereichs mit Einzelzellen konnten erste adhärierende Zellen beim Aufnahmestart beobachtet werden, auf die der Fokus des Mikroskops eingestellt wurde. Die einzelnen Zellen veränderten über den gesamten Aufnahmezeitraum immer wieder ihre Form. Während die Einen sich über den Zellkulturgefäßboden ausbreiteten, zogen sich die Anderen stark zusammen. Einige wanderten aus dem Bildbereich der Aufnahme. Vereinzelt konnten Zellen beobachtet werden, die durch Anheftung neue Zellkontakte zu ihren Nachbarzellen herstellten. Ansonsten wirkten die Zellen bereits wenige Stunden nach Aufnahmestart ungewöhnlich groß, was meist ein Indiz für eine spontane Differenzierung ist. Tatsächlich konnte keine einzige Zellteilung über den Aufnahmezeitraum beobachtet werden und auch nach Beendigung der Time-Lapse Aufnahme verblieben die Zellen mehrere Wochen im Zellkulturgefäß ohne das eine Zunahme der Zellzahl beobachtet werden konnte. Die Kontrollzellen im Brutschrank waren hingegen nach wenigen Tagen in Kultur konfluent.

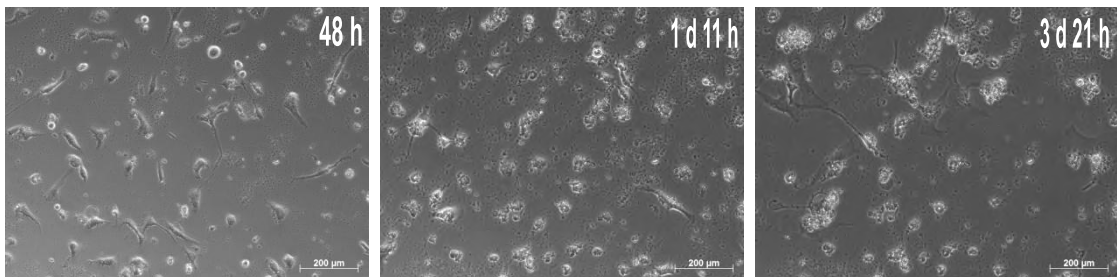


Abbildung 15 Time-Lapse Aufnahme der Einzelzellen. Gezeigt sind drei Abbildungen aus der Time-Lapse Aufnahme. Eine Abbildung 48 Stunden nach Präparation der Zellen, eine nach einem Tag und 11 Stunden und die letzte bildet den Zustand der Zellen nach 3 Tagen und 21 Stunden ab. Dabei war über den kompletten Aufnahmezeitraum keine Zunahme der Zellzahl zu beobachten.

4.4 Auswertung der Genexpressionsanalyse

Mit Wiedereintritt in den Zellzyklus verändert sich die Genexpression einer Zelle. Zur Dokumentation der Veränderung der Genexpression in den exokrinen Mauspankreaszellen nach deren Präparation wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dafür wurden

RNA-Proben direkt aus dem Gewebe und von Zellen aus Passage 0 bis 6 und Passage 10 von dem Unternehmen AROS Applied Biotechnology mittels eines Affymetrix-Genchips untersucht und die Rohdaten von Dr. Anrej-Nikolai Spiess normalisiert. Im Folgenden wurden diese Daten bezüglich ihrer Verbindung zum Zellzyklus näher analysiert und geordnet.

In einer Maus werden etwa 578 Gene im Zellzyklus exprimiert, aber nur einige wenige davon sind Schlüsselregulatoren. Einmal gibt es die Early Genes, die wenige Minuten nach mitogener Stimulation angeschaltet werden und verschiedene Signalkaskaden in der Zelle induzieren. Weiterhin gibt es Transkriptionsfaktoren, deren Aufgabe es ist, auf Reaktion von mitogenen Signalen die Early Genes zu aktivieren und weitere Signalkaskaden innerhalb des Zellzyklus zu steuern. Eine ähnliche Aufgabe haben auch Zellzyklus regulierende Signalmoleküle, die wichtige Signale zur Induktion oder Aktivierung innerhalb des Zellzyklus weiterleiten. Neben all diesen verschiedenen Formen von Signalmolekülen sind die tatsächlichen Motoren des Zellzyklus die Cyclin/Cdk-Komplexe. Jede Phase wird von einem bestimmten Komplex gesteuert, der weitere Zellzyklus-regulierende Funktionen überwacht. Des Weiteren gibt es die Tumorsuppressorgene, die unter anderem die Cyclin/Cdk-Komplexe inhibieren können und so bei DNA-Schäden den Zellzyklus so lange aufhalten, bis das Fortlaufen des Zyklus mit exakt replizierter DNA möglich ist. Anhand dieser grundsätzlichen Vorgänge wurden bestimmte Zellzyklus-regulierende Gene aus den Rohdaten ausgewählt und deren Änderung der Genexpression über die Passagen verfolgt.

Um eine genaue Veränderung der Genexpression der Zellen über die verschiedenen Passagen zeigen zu können, sind in der folgenden Heatmap jeweils die Differenzen zwischen den aufeinanderfolgenden Passagen aufgetragen. Dabei bedeutet Schwarz kaum Veränderung, Rot zeigt alle Werte mit einer mittleren Differenz zwischen den Passagen und mit Gelb sind große Differenzen kennzeichnet.

Bei Betrachtung der Heatmap ergibt sich, dass ausnahmslos die Differenz zwischen den Zellen im Gewebe und P0 Ende den größten Wert und somit die stärkste Veränderung aufweist. Zwischen den folgenden Passagen sind die Differenzen wesentlich geringer, wobei bei vielen Zellen kaum noch eine Veränderung der Genexpression des jeweiligen Gens zu erkennen ist, was durch die dunkelrote Farbgebung gezeigt wird.

Heatmap über den Unterschied zwischen den aufeinanderfolgenden Passagen

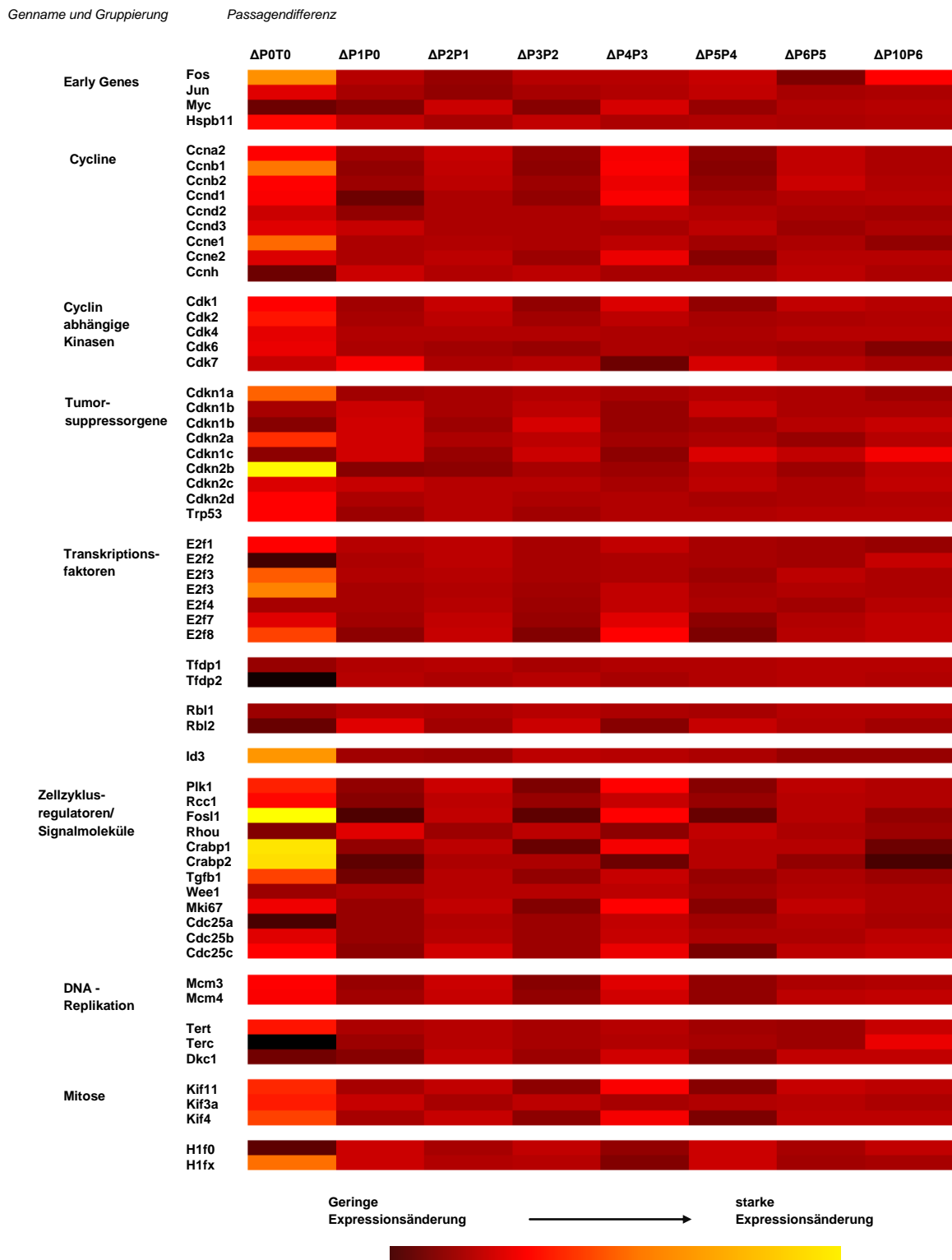


Abbildung 16 Heatmap über die Veränderung der Genexpression von Passage zu Passage. In der Heatmap sind die Differenzen zwischen den Passagen mittels unterschiedlicher Farbtöne abgebildet. Große Differenzen haben einen gelblichen Farbcode. Je geringer die Differenz zwischen den aufeinanderfolgenden Passagen ist, desto dunkler ist das Feld in der Heatmap.

Anhand der Heatmap konnte gezeigt werden, dass die größte Änderung der Genexpression in den Zellen zwischen den Zellen im Organismus (T0) und dem Ende der Passage 0 lag. Aus diesem Grunde wurde zur näheren Untersuchung der $\Delta P0T0$ Differenz der Fold Change berechnet. Der Fold Change ist ein Maß für die Änderung der Expression eines Gens.

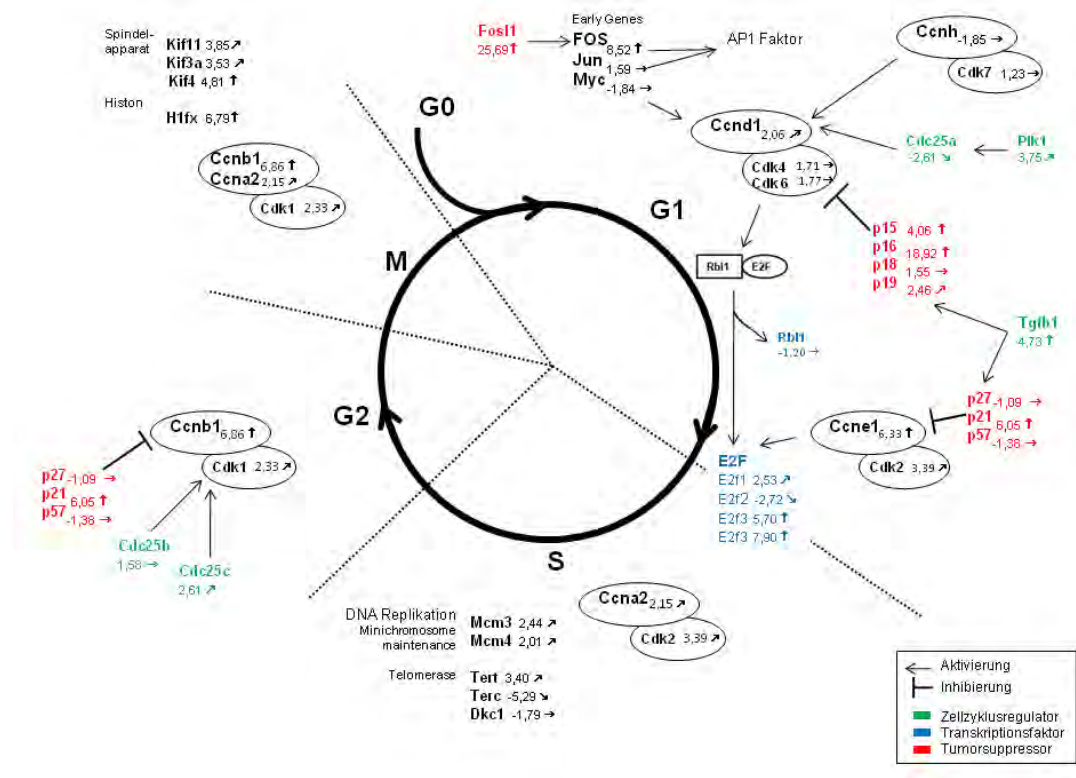


Abbildung 17 Dargestellt ist die Regulation des Zellzyklus in den verschiedenen Phasen durch die Cyclin/Cdk-Komplexe und die beteiligten Signalmoleküle, Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressoren.

Die Grafik stellt die grundlegenden Abläufe des Zellzyklus mit dem jeweiligen P0T0 Fold Change der Gene dar, wobei der Übersichtlichkeit halber nicht alle Signalwege sondern nur Ausschnitte davon eingezeichnet sind. Gene mit einem Fold Change zwischen -2 und 2 wurden dabei als Gene ohne signifikante Expressionsänderung betrachtet. Gene mit einem Fold Change zwischen 2 und 4 als Gene mit mittlerer Expressionsänderung und alle Gene mit einem höheren Fold Change als stark hochregulierte Gene. Gleiches gilt für die herunter regulierte Gene. Gene mit einem Fold Change zwischen -2 und -4 gelten als mittelmäßig in ihrer Expression gesenkt und eine Genexpression kleiner als -4 wird als stark herunter reguliert gewertet.

Zu Beginn des Zellzyklus werden verschiedene Early Genes durch Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Fos1 1 aktiviert, die dann entscheidende Schritte der Zelle zur Progression von G0 in G1 induzieren. Fos1 wies eine starke Änderung der Genexpression um den Faktor 25 auf, was den größten aller T0P0 Fold Change Wert der betrachteten Gene bildet. Fos11

induziert das Early Gen Fos, das einen Fold Change von 8,52 aufwies. Die beiden anderen ausgewählten Early Genes Jun und Myc zeigten keine gesteigerte Expression. Zu Beginn des Zellzyklus muss der Ccd1/Cdk4,6 Komplex aktiviert werden. Dies geschieht zum Einen durch die Early Genes. Weiter gibt es einen Aktivierungsschritt durch den CyclinH/Cdk7 Komplex. Allerdings konnte bei diesem Komplex kaum Änderung in der Genexpression festgestellt werden. Dagegen betrug der Fold Change der Polo-like-Kinase (Plk1) 3,75. Diese Kinase induziert Cdc25a, was ebenfalls aktivierend auf den Cyclin D/ Cdk4,6 wirkt. All diese Aktivierungen führten zu einem Fold Change von 2,06 bei Cyclin D, wobei die Expression von Cdk4 und 6 nicht explizit angestiegen ist. Wesentliche größere Fold Change Zahlen ergaben sich für die anderen Cycline, zum Beispiel für Cyclin B mit einem Fold Change von 6,86. Auch hatten sämtliche Cyclin abhängige Kinasen einen Fold Change von mindestens 2. Damit waren all diese überaus wichtigen Faktoren für den Zellzyklus hochreguliert. Aber auch bei Regulationswegen innerhalb des Zyklus waren gestiegene Fold Change Zahlen zu finden. Entscheidend für den G1/S Übergang ist die Freisetzung des E2F Faktors, der wiederum ein Transkriptionsfaktor ist. Die E2F-Familie ist in Aktivatoren und Repressoren geteilt. Von den Aktivatoren wiesen sowohl E2f1 als auch E2f3 eine Änderung der Genexpression um mehr als den Faktor 2 zwischen T0 und P0 auf. Auch konnte ein Anstieg des Fold Change von funktionellen Zellzyklusgenen verfolgt werden. Von den Genen, die unter dem Namen Minichromosome Maintenance zusammengefasst werden und für die Initiation und Elongation der DNA-Replikation in der S-Phase zuständig sind, zeigten zum Beispiel MCM3 und MCM 4 einen mittelhohen Fold Change. Bei den Telomerasen konnte kein einheitlicher Anstieg der Genexpression beobachtet werden. Während die Genexpression von Tert anstieg, blieb die Expression von Dkc1 gleich und die Expression von Terc wurde sogar herunter reguliert. Tert und Terc bilden einen Telomerasekomplex, weshalb ein ähnliches Verhalten beider Gene zu erwarten gewesen wäre. In der M-Phase der Mitose kommt es zur Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen zu deren Realisierung die Ausbildung des Spindelapparates von entscheidender Bedeutung ist. Ausgewählte Spindelgene wie zum Beispiel Kif4 zeigten einen einheitlichen Anstieg des Fold Changes. Auch das Histongen H1fx wurde in P0 6,73-fach stärker exprimiert als in T0. Für den reibungslosen Ablauf des Zellzyklus sind neben all den aktivierenden Genen auch Supressorgene wie die Tumorsuppressorgene zuständig. Sie verhindern einen unkontrollierten Ablauf des Zellzyklus und vermitteln Reparaturmechanismen bei Fehlern im Zellzyklus, wodurch sie der Krebsentstehung entgegen wirken. Die wichtigsten Tumorsuppressorgene im Zellzyklus sind p15, p16, p18, p19, p21 und p57. Von diesen sechs Genen zeigten drei Gene keine Veränderung zwischen T0 und P0, während die drei anderen hochreguliert worden sind. Der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle ausgewählten Gene in die Zellzyklusgrafik eingefügt worden und finden sich in der folgenden Tabelle. (Tabelle 10)

Neben den gezeigten Early Genes gehören auch die sogenannten Heat Shock Proteine, die vor allem in Zellstresssituationen gebildet werden. Als Beispiel eines dieser Proteine wurde Hsbp11 ausgewählt, das zu Beginn des Zellzyklus gebildet wird und in den Messdaten ein Fold Change von 3 aufweist. Das Tumorsuppressorgen Trp53 ist ein weiteres wichtiges Gen, das nicht in der Grafik aufgeführt ist. In ruhenden Zellen ist p53 kaum nachweisbar, in proliferierenden Zellen ist das Protein ein wichtiger Regulator. Zwischen T0 und P0 ergab sich für das Protein eine knappe Verdreifachung der Expression. Auch weitere Zellzyklusregulatoren wie Rhou, Crapb1 und 2, und Rcc1 erfuhren eine Steigerung der Genexpression. Anhand der angelegten Kriterien zur Veränderung der Genexpression wurden von den 61 ausgewählten Genen 33 hochreguliert, 23 hatten keine Veränderung der Genexpression und 5 wurden abweichend zum normalen Ablauf des Zellzyklus herunter reguliert. Das bedeutet, dass 54 % Zellzyklusgene hochreguliert worden sind. Um diese Tendenz zu verifizieren und den wenigen Genen, deren Expressionsänderung sich erst ab Passage 1 stabilisiert, Rechnung zu tragen, wurde zum Vergleich der Fold Change von T0 zu Passage 10 berechnet. Bei dem Vergleich der Fold Change Zahlen zwischen TOP0 und TOP10 ergaben sich die größten Auffälligkeiten im Bereich der Zellzyklusregulatoren. Bei beiden Crapb Proteinen sanken die Fold Change Zahlen entschieden ab. Bei Crapb2 fiel sie sogar von 15,61 auf 1,19. Auch die Fold Change Zahl von Tgfb1 sank von 4,73 auf 1,85 ab. Für die restlichen Gene gab es in den meisten Fällen eine Vergrößerung des Fold Change, aber anhand der angelegten Bewertungskriterien für die Änderung der Genexpression nur für 12 Gene eine Änderung ihrer Einstufung der Stärke der Genexpression. Weiterhin gab es mit Myc, E2F, Tfdp2, Terc, Myb und H1f0 6 Gene, deren Genexpression trotz wichtiger Aufgaben im Zellzyklus herunter reguliert wurden. Somit trat bei 19 der Gene keine entscheidende Änderung der Genexpression auf und 36 wurden hochreguliert. Damit stieg die Genexpression bezogen auf den TOP10 Fold Change für 59 % aller untersuchten Gene.

Tabelle 10 Zellzyklusgene und ihr $\Delta P0T0$ und $\Delta P10T0$ Fold Change

<i>Gen</i>	<i>mRNA Name</i>	<i>Fold Change</i> <i>$\Delta P0T0$</i>	<i>Fold Change</i> <i>$\Delta P10T0$</i>
Early Gene			
Fos	M. m. FBJ osteosarcoma oncogene	8,52 ↑	14,70 ↑
Jun	M. m. Jun oncogene	1,59 →	1,18 →
Myc	M. m. myelocytomatosis oncogene	-1,84 →	-2,33 ↘
Hspb11	M. m. heat shock protein family B member 11	3,04 ↗	4,04 ↑
Cycline			
Ccna2	M. m. cyclin A2	2,15 ↗	3,00 ↗
Ccnb1	M. m. cyclin B1	6,86 ↑	7,69 ↑
Ccnb2	M. m. cyclin B2	2,57 ↗	3,82 ↗
Ccnd1	M. m. cyclin B2	2,06 ↗	1,54 →
Ccnd2	M. m. cyclin D2	1,32 →	1,02 →
Ccnd3	M. m. cyclin D3	1,57 →	1,68 →
Ccne1	M. m. cyclin E1	6,33 ↑	4,86 ↑
Ccne2	M. m. cyclin E2	1,53 →	2,08 ↗
Ccnh	M. m. cyclin H	-1,85 →	-1,20 →
Cyclin abhängige Kinase			
Cdk1	M. m. cyclin-dependent kinase 1	2,33 ↗	3,01 ↗
Cdk2	M. m. cyclin-dependent kinase 2	3,39 ↗	3,37 ↗
Cdk4	M. m. cyclin-dependent kinase 4	1,71 →	2,05 ↗
Cdk6	M. m. cyclin-dependent kinase 6	1,77 →	-1,48 →
Cdk7	M. m. cyclin-dependent kinase 7	1,23 →	2,23 ↗
Tumorsuppressorgene			
Cdkn1a	M. m. cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	6,05 ↑	4,16 ↑
Cdkn1b	M. m. cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	-1,09 →	1,32 →
Cdkn1b	M. m. cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	-1,42 →	1,14 →
Cdkn1c	M. m. cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	-1,38 →	2,74 ↗
Cdkn2a	M. m. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	4,06 ↑	4,85 ↑
Cdkn2b	M. m. cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)	18,92 ↑	7,69 ↑
Cdkn2c	M. m. cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18)	1,55 →	2,86 ↗
Cdkn2d	M. m. cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19)	2,46 ↗	2,38 ↗
Trp53	M. m. transformation related protein 53	2,83 ↗	2,80 ↗
Transkriptionsfaktoren			
E2f1	M. m. E2F transcription factor 1	2,53 ↗	2,32 ↗
E2f2	M. m. E2F transcription factor 2	-2,72 ↘	-2,47 ↘
E2f3	M. m. E2F transcription factor 3	5,70 ↑	5,38 ↑
E2f3	M. m. E2F transcription factor 3	7,90 ↑	7,38 ↑
E2f4	M. m. E2F transcription factor 4	-1,07 →	-1,14 →
E2f7	M. m. E2F transcription factor 7	1,57 →	2,01 ↗
E2f8	M. m. E2F transcription factor 8	4,81 ↑	5,17 ↑
Tfdp1	M. m. transcription factor Dp 1	-1,26 →	1,03 →
Tfdp2	M. m. transcription factor Dp 2	-4,37 ↘	-3,54 ↘
Rbl1	M. m. retinoblastoma-like 1 (p107)	-1,20 →	-1,07 →
Rbl2	M. m. retinoblastoma-like 2	-1,96 →	-1,28 →
Id3	M. m. inhibitor of DNA binding 3	9,09 ↑	5,22 ↑

Fortsetzung Tabelle 10

<i>Gen</i>	<i>mRNA Name</i>	<i>Fold Change</i> <i>ΔP0T0</i>	<i>Fold Change</i> <i>ΔP10T0</i>
Zellzyklusregulatoren/Signalmoleküle			
Plk1	M. m. polo-like kinase 1 (Drosophila)	3,75 ↗	4,13 ↑
Rcc1	M. m. regulator of chromosome condensation 1	3,02 ↗	2,19 ↗
Fos11	M. m. fos-like antigen 1	25,69 ↑	5,55 ↑
Rhou	M. m. ras homolog gene family, member U	-1,51 →	-1,33 →
Crabp1	M. m. cellular retinoic acid binding protein I	16,04 ↑	9,14 ↑
Crabp2	M. m. cellular retinoic acid binding protein II	15,61 ↑	1,19 →
Tgfb1	M. m. transforming growth factor, beta 1	4,73 ↑	1,85 →
Wee1	M. m. WEE 1 homolog 1	-1,19 →	1,01 →
Mki67	M. m. antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	1,88 →	2,11 ↗
Cdc25a	M. m. cell division cycle 25 homolog A	-2,61 ↘	-3,67 ↘
Cdc25b	M. m. cell division cycle 25 homolog B	1,58 →	1,70 →
Cdc25c	M. m. cell division cycle 25 homolog C	2,61 ↗	3,11 ↗
DNA Replikation			
Mcm3	M. m. minichromosome maintenance deficient 3	2,44 ↗	2,37 ↗
Mcm4	M. m. minichromosome maintenance deficient 4	2,01 ↗	2,58 ↗
Tert	M. m. telomerase reverse transcriptase	3,40 ↗	3,62 ↗
Terc	M. m. telomerase RNA component	-5,29 ↘	-4,22 ↘
Dkc1	M. m. dyskeratosis congenita 1, dyskerin homolog	-1,79 →	-1,78 →
Mitose			
Kif11	M. m. kinesin family member 11	3,85 ↗	6,22 ↑
Kif3a	M. m. kinesin family member 3A	3,53 ↗	4,58 ↑
Kif4	M. m. kinesin family member 4	4,81 ↑	6,16 ↑
H1f0	M. m. H1 histone family, member 0	-2,12 ↘	-1,28 →
H1fx	M. m. H1 histone family, member X	6,79 ↑	7,18 ↑

5 Diskussion

Im lebenden Gewebe zeigen Pankreaszellen eine geringe Proliferationsrate von nur 2 bis 3 Prozent, welche mit der Proliferationsrate des Gehirns zu vergleichen ist. (Leblond & Walker, 1956) Allerdings ist bekannt, dass viele Zellen in der *in vitro* Kultivierung ein völlig anderes Verhalten als im Gewebe zeigen (Elsässer, Adler & Kern, 1993), so auch Pankreaszellen. Zum Beispiel hat Rapoport et al. herausgefunden, dass menschliche exokrine Pankreaszellen in der *in vitro* Kultivierung stammzellähnliche Eigenschaften entwickeln. Sie beginnen zu proliferieren und differenzieren in Zellen verschiedener Keimblätter. (Rapoport et al., 2009) Während Rapoport sich mit menschlichen exokrinen Pankreaszellen beschäftigt hat, war das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung von exokrinen Mauspankreaszellen. Dabei lag der Fokus speziell auf dem Proliferationsverhalten der exokrinen Mauspankreaszellen nach Isolation aus dem Gewebsverband. Im pankreatischen Gewebe liegt ein Großteil der Zellen im G0-Zustand vor. In diesem Zustand verweilen die Zellen und verrichten ihre Aufgabe im Organismus. Während es beispielsweise für Erythrozyten oder Epidermiszellen nicht mehr möglich ist in den G1-Zustand zurückzukehren. Können einige Zellen, wie Zellen aus Leber oder Niere, unter bestimmten Bedingungen wieder in den Zellzyklus eintreten. (Elsässer et al., 1993) Rapoport's humane Pankreaszellen begannen zum Beispiel nach der ersten Passage mit der Proliferation. Somit war von Interesse dieser Arbeit, den Zeitpunkt des Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus im Mausmodellorganismus zu bestimmen und weiter eine Quantifizierung der proliferierenden Zellen durchzuführen, um weitere Rückschlüsse beispielsweise bezüglich ihrer Herkunft ziehen zu können.

Um proliferierende Zellen nachzuweisen, besteht eine Möglichkeit in der Detektion von neusynthetisierter DNA. Dies erfolgte in dieser Arbeit unter anderem mit dem Click-it-Assay. Die Zellen wurden unter Zugabe von EdU, einem Thyminanalogon, kultiviert und das Analogon am Passagenende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] detektiert. Wie Eingangs angeführt, besteht ein großer Unterschied zwischen dem Verhalten von Zellen *in vivo* und *in vitro*. Deshalb wurden in einem ersten Schritt die Click-it-Analysen mit Zellen aus Passage 5, 6 und 10 durchgeführt, um das Proliferationsverhalten von Zellen in höheren Passagen aufzuzeigen, die in der *in vitro* Kultivierung etabliert waren. Bei diesen Passagen bestand die Vermutung, dass sie durch den längeren Kultivierungszeitraum bereits an die Bedingungen der *in vitro* Kultivierung angepasst sind. Weiterhin sollte in diesem Versuch die Vergleichbarkeit verschiedener Zelllinien untereinander festgestellt werden. Dafür wurden Zellen von acht verschiedenen Zelllinien ausgewählt, die zum Teil über mehrere Passagen, zum Teil nur in einer einzigen Passage analysiert wurden. Für die Zellen der

Passage 5 ergab sich ein mittlerer Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen von 60,22 %, für die Zellen in Passage 6 ein Anteil von 58,70 % und für die Zellen in Passage 10 57,56 %. Daraus ergab sich eine Standardabweichung zwischen den Passagen von 1 %. Aber auch die Abweichung der verschiedenen Zelllinien in den einzelnen Passagen voneinander bewegte sich nur zwischen 2 und 11 %. Überprüft wurde das Ergebnis des Click-it-Assays durch Anwendung einer weiteren Methode zur Zellzyklusmessung, der durchflusszytometrischen Analyse mit dem Farbstoff 7-AAD. Dieser Farbstoff bindet stöchiometrisch an die DNA, was Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt der Zelle zulässt. Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus haben einen tetraploiden DNA-Gehalt, während die Zellen nach der Zellteilung einen diploiden Chromosomensatz haben, was zu unterschiedlich starken Fluoreszenzsignalen führt. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit den Selben drei Zelllinien aus Passage 6, mit denen auch die Click-it-Analyse durchgeführt worden waren, realisiert. Für die drei Zelllinien aus Passage 6 bewegte sich der durch das Durchflusszytometer ermittelte Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen zwischen 44,22 % und 52,49 %. Insgesamt betrachtet lag der größte Unterschied zwischen beiden Methoden bei 16 %. Mögliche Verfälschungen der Messung am Durchflusszytometer können unter anderem durch schlechte Vereinzlung der Zellen entstanden sein. Kleben zwei Zellen aneinander haben sie ein ähnliches großes Fluoreszenzsignal wie eine Zelle mit doppeltem DNA-Gehalt. Auch können beim Click-it-Assay die geringen Zellzahlen, die analysiert wurden, nicht ausreichend für eine generelle Aussage über das Zellverhalten gewesen sein. Somit liegen die Abweichungen der Ergebnisse der zwei Methoden im erwarteten Rahmen und zeigen, dass das Click-it-Assay bei einer ausreichenden Menge an untersuchten Zellen zuverlässige Ergebnisse liefert.

Zusammenfassend ergab sich aus den Analysen der Zelllinien von Passage 5, 6 und 10, ein Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen zwischen 50 und 60 % bezogen auf die Gesamtzellzahl. Hervorzuheben sind dabei die geringen Unterschiede sowohl in den Passagen selber als auch beim Vergleich der Passagen untereinander. Die Zellen wichen in ihrem Proliferationsverhalten um weniger als 20 % voneinander ab, was als Beleg dafür gewertet werden kann, dass in diesen höheren Passagen eine Stabilisierung des Zellverhaltens eingesetzt hat. Ein weiterer Grund für diese geringe Abweichung ist möglicherweise der Einsatz so genannter Inzuchtmäuse, bei denen jeweils genetisch identische Geschwistertiere verpaart werden, so dass genetische Veränderungen nur durch Mutationen auftreten. Unterschiede können sich dadurch erklären, dass die Zellen nicht synchronisiert wurden und sich somit in unterschiedlichen Zellzyklus/Lebensphasen befanden.

Unterstützt wird diese Beobachtung der Stabilisierung des Zellverhaltens durch das Ergebnis der Auswertung der Microarray-Analyse. Für das Microarray wurden RNA-Proben direkt aus dem Pankreasgewebe einer Maus und von *in vitro* kultivierten exokrinen Zellen aus Passage 0 bis 6 und Passage 10 von dem Unternehmen AROS Applied Biotechnology A/S analysiert. Die Daten wurden von Dr. Andrej-Nikolai Spiess normalisiert und im Rahmen dieser Arbeit bezüglich ausgewählter Zellzyklusgene analysiert. Während zwischen den Proben aus dem Gewebe und Zellen der Passage 0 ein großer Unterschied in der Genexpression zu verzeichnen war, unterschieden sich die folgenden Passagen kaum in ihrer Genexpression, was ebenfalls für eine Stabilisierung des Proliferationsverhaltens in diesen Passagen spricht.

Durch die Zellpräparation verlieren die Zellen den Kontakten zu ihren Nachbarzellen und sind nicht mehr den hormonellen Einflüssen durch den Organismus ausgesetzt, die laut Elsässer et al. die wichtigsten Regulatoren für das Pankreas sind. (Elsässer et al., 1993) Weiterhin werden die Zellen großem Stress durch die freigesetzten Pankreasenzymen ausgesetzt. Die Beobachtung, dass sich die größten Expressionsänderungen des Microarrays zwischen P0 und T0 befanden, legt nahe, dass auch innerhalb der Zelle die größten Änderungen zwischen T0 und P0 bzw. in P0 selbst entstehen und somit der Proliferationsbeginn in P0 zu finden sein sollte. Deshalb wurde im Folgenden die nullte Passage näher betrachtet. Im ersten Schritt wurden Time-Lapse Aufnahmen des Auswachsens eines Acinus und von Einzelzellen durchgeführt. In der Time-Lapse Aufnahme des Acinus konnte beobachtet werden, wie die Zellen aus dem Acinus auswuchsen und sich auf dem Zellkulturflaschenboden ausbreiteten. Zwar waren viele Veränderungen der Zellmorphologie zu beobachten, aber keine einzige Zellteilung. Obwohl keine Proliferation in den Aufnahmen beobachtet werden konnte, waren die Zellen 20 Tage nach der Präparation konfluent. Daraus ergab sich die Frage, ob die Konfluenz durch das Auswachsen der Acini oder tatsächlich durch Proliferation realisiert wurde. Deshalb wurde im nächsten Schritt eine weitere Time-Lapse Aufnahme durchgeführt, in der ein Bereich in dem Zellkulturgefäß mit Einzelzellen gewählt wurde. Auch bei dieser Aufnahme konnte keine Zellteilung über den Aufnahmezeitraum beobachtet werden. Allerdings entwickelten sich diese Zellen auch nach Beendigung der Time-Lapse Aufnahme sehr schlecht und wirkten differenziert. Eine Kontrolle aus den Selben präparierten Zellen, die zeitgleich im Brutschrank kultiviert wurde, entwickelte sich vollkommen normal. Das lässt auf einen Fehler in den Kultivierungsbedingungen bei der Time-Lapse Aufnahme, zum Beispiel eine zu niedrige Temperatur oder falscher CO₂-Gehalt schließen.

Zur näheren Untersuchung der nullten Passage wurde neben den Time-Lapse Aufnahmen eine Click-it-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen aus dem Pankreasgewebe

präpariert und unter Zugabe von EdU, einem Thyminanalogon, in Ibdidis kultiviert. Diese Ibdidis wurden im 24-Stunden-Takt fixiert und anschließend das EdU detektiert, um den Zeitpunkt des Proliferationsbeginns feststellen zu können. Weiterhin wurden Cytospins von den Zellen im Überstand der Ibdidis angefertigt. In der Click-it-Analyse des Überstandes der Ibdidis wurde zu keinem Zeitpunkt DNA-synthetisierende Zellen nachgewiesen, was dafür spricht, dass die Adhärenz der Zellen notwendig für den Proliferationsbeginn ist. Bei den adhärennten Zellen wurden 48 h nach Präparation der Zellen die ersten DNA-synthetisierenden Zellen gefunden, die 1,45 % der adhärennten Zellen ausmachten. Nach 72 h stieg der Anteil auf 8,47 % und nach 96 h erreichte er mit 55,71 % einen Höchststand. Zwischen 120 h nach Präparation und bis zum Ende der Passage bewegte sich dieser Anteil zwischen 37,15 % bis 50,06 % und stellte sich somit auf einen ähnlichen Anteil wie am Ende der Passagen 5, 6 und 10 ein. Neben dem Click-it-Assay können wiederum die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der RNA-Proben zur Unterstützung dieser These herangezogen werden. Handelt es sich bei den Zellen des Pankreas um Zellen, die innerhalb der nullten Passage wieder in den Zellzyklus eingetreten sind, gibt es eine Vielzahl von Genen, die dazu aktiviert werden müssen. Um diese Veränderung darstellen zu können, wurde für alle ausgewählten Gene der Fold Change zwischen T0 und P0 sowie zwischen T0 und P10 bestimmt. Gene mit einem Fold Change größer als 2 wurden dabei als signifikant hochreguliert betrachtet, genauso wie Gene mit einem Fold Change kleiner als -2 als signifikant herunter reguliert gewertet wurden. Für den TOP0 Fold Change ergab sich anhand der angelegten Kriterien, dass zwischen T0 und P0 54 % der untersuchten Zellzyklusgene hochreguliert worden sind. Aus dem TOP10 Fold Change, der berechnet wurde, um auch Gene deren Expression sich erst später stabilisiert hat, Rechnung zu tragen, ergaben sich sogar 59 % hochregulierte Zellzyklusgene.

Die wohl wichtigsten Gene für ein erfolgreiches Durchlaufen des Zellzyklus sind die Cycline und Cyclin abhängige Kinasen. (Murray, 2004) Andere Studien zeigen zwar, dass vielfach der Zellzyklus auch ohne eines dieser Cycline funktioniert, aber die Versuchstiere meist gewisse Defizite aufweisen (Ciemerych et al., 2002). Versuchsmäuse mit einem Cyclin E Defizit waren in der Lage den Zellzyklus normal zu durchlaufen, aber Zellen dieser Mäuse, die sich in der G0-Phase befanden, gelang der Wiedereintritt in den Zellzyklus nicht. (Geng et al., 2003) Von den untersuchten Cyclinen in dieser Arbeit wurden Cyclin A2, B1, B2, D1 und E1 hochreguliert, was somit als erstes Indiz für den Wiedereintritt der untersuchten Zellen in den Zellzyklus gerechnet werden kann. Von den Cyclin abhängigen Kinasen hatten zwei der fünf untersuchten einen TOP0 Fold Change von mehr als 2. Bei dem Fold Change zwischen T0 und P10 sogar vier der fünf. Somit konnte diese Gengruppe ebenfalls als hochreguliert betrachtet werden und deckt sich mit der gestiegenen Expression der Cycline,

die zusammen mit den Cyclin abhängigen Kinasen ein Holoenzym im Zellzyklus bilden. (Alberts et al., 2002) Die Regulierung der Cycline geschieht über ein eng verknüpftes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren, Signalmolekülen und Tumorsuppressoren. Zum Beispiel werden gleich nach mitogener Stimulation die sogenannten Early Genes angeschaltet, die weitere Signalkaskaden in der Zelle aktivieren. Von den untersuchten Early Genes stach das Fos-Gen mit einem TOP0 Fold Change von 8,52 entschieden hervor. Dieses Gen bildet zusammen mit dem Jun-Gen den Anaphasenpromoting Faktor, der einen Hauptregulator für den Ablauf der Mitose bildet. (Peters, 2006) Aber auch auf Ebene der Transkriptionsfaktoren war häufig eine gesteigerte Genexpression zu finden. E2F1 hatte beispielsweise einen TOP0 Fold Change von 2,53 und ist ein Regulator für den Eintritt in die S-Phase, ohne den der Zellzyklus nicht fehlerfrei ablaufen kann (DeGregori & Johnson, 2006). Der höchste TOP0 Fold Change bei den untersuchten Transkriptionsfaktoren trat bei Id3 mit einem Fold Change von 9,09 auf. Eine Überexpression von Id3 scheint eine aktivierende Wirkung auf den Zellzyklus zu haben. (Kee & Bronner-Fraser, 2005) Der bekannte Proliferationsmarker Mki67 (Van Dierendonck, Keijzer, Van de Velde & Cornelisse, 1989) zeigte zwischen T0 und P0 noch keinen erhöhten Fold Change. Im Vergleich zwischen T0 und P10 ergab sich aber eine Verdopplung der Genexpression, was die Stabilisierung des geänderten Proliferationsverhaltens der Zellen in Kultur zeigt. Auch auf Ebene der funktionellen Gene für die S- oder M-Phase konnte eine Steigerung der Genexpression ermittelt werden. Beispielsweise ist das Gen kif3a ein entscheidender Faktor für die Anlagerung des Spindelapparates, die Trennung der Chromosomen und des Mitose Kontrollpunktes und wird auch von anderen Studien als wichtiges Mitosegen geführt. (Haraguchi, Hayashi, Jimbo, Yamamoto & Akiyama, 2006; Walczak & Mitchison, 1996) Das Gen hatte in diesem Fall einen TOP0 Fold Change von 3,53. Auch Gene der DNA-Replikation wie Mcm3 und Mcm4 wurden zweifach stärker exprimiert als im Organ. Essentiell für den kontrollierten Ablauf des Zellzyklus sind weiter die Tumorsuppressorgene, ohne die der Zellzyklus außer Kontrolle geraten kann und die Krebsentstehung begünstigt wird (Graw, 2010) Auch bei diesen Genen wie zum Beispiel Cdkn2b oder Cdkn2d stellt sich eine Expressionserhöhung bereits zwischen T0 und P0, mit einem Fold Change von 18 bzw. 2, ein. Zusammenfassend ergab sich für den TOP0 Fold Change, dass insgesamt von den 61 ausgewählten Genen 33 hochreguliert worden sind, 23 keine Veränderung zeigten und 5 herunter reguliert wurden. Bei dem TOP10 Fold Change verschob sich dieses Verhältnis noch etwas, so dass 36 hochreguliert wurden, 19 keine Veränderung zeigten und sogar 6 herunter reguliert wurden. Zu der kleinen Anzahl an herunter regulierten Genen gehörte zum Beispiel das Gen E2F2, das ein entscheidender Zellzyklusregulator ist und somit im Zellzyklus eine gesteigerte Expression zeigen müsste. (DeGregori & Johnson, 2006) Grund für diese herabgesenkte Expression könnte die vielfach zyklische Expression von

Zellzyklusgenen sein. Ein Großteil aller Zellzyklusgene wird nur in bestimmten Phasen des Zyklus exprimiert und danach wieder abgebaut. (Koepp et al., 1999) Somit können Schwankungen in der Genexpression durch den Einsatz der nicht synchronisierten Zellen entstanden sein. Wie die geringen Unterschiede im Ergebnis der Microarray-Analyse zwischen P1 und P10 aber zeigen, scheint in jedem Fall eine generelle Änderung des Expressionsmusters vorzuliegen. Weiterhin ist bekannt, dass die RNA Konzentration nicht in allen Fällen mit der vorhandenen Proteinkonzentration korreliert, wie zum Beispiel bei dem Tumorsuppressorgen p27. (Hengst, 2003) Wegen der auf Grund der Zellpräparation fehlende Steuerung der Zellen durch den Organismus besteht weiter die Möglichkeit, dass andere vom normalen Zellzyklus abweichende Signalwege eingeschaltet worden sind, die diese Senkung der Expression der 5 bzw. 6 Gene verursacht haben. Da aber alle anderen grundsätzlichen Zellzyklusregulatoren aus verschiedenen Phasen des Zellzyklus eine Steigerung der Genexpression oder zumindest keine Änderung ins Negative gezeigt haben, kann trotz der herunter regulierten Gene von einer Aktivierung des Zellzyklus in P0 ausgegangen werden.

Zwar konnten in den Time-Lapse Aufnahmen keine Zellteilungen beobachtet werden, dennoch sprechen zum Einen die Ergebnisse der Micoarray Analyse mit Aktivierung der wichtigsten Zellzyklusregulatoren dafür, dass tatsächlich Zellteilung stattgefunden hat. Zum Anderen kann diese These auch durch die Ergebnisse der Click-it Analyse untermauert werden. Das Thyminanalogon EdU wird nur bei der Synthese von neuer DNA in die entstehende DNA eingebaut. Damit ist es ein sicherer Nachweis für die DNA-Replikation der S-Phase des Zellzyklus (Buck, Bradford, Gee & Agnew, 2008) und zeigt, dass die Zelle den ersten Kontrollpunkt im Zellzyklus, den Restriktionspunkt, bereits überwunden hat und in den Zellzyklus eingetreten ist. Ist die Zelle erst einmal im Zellzyklus, muss dieser durchlaufen werden, die Zelle kann nicht mehr in die G0-Phase zurückkehren. (Alberts et al., 2002) Natürlich können Zellen im Zellzyklus am G2/M- oder Spindelkontrollpunkt arretiert werden, allerdings führt eine zu lange Arretierung dort zum Einschalten verschiedener Apoptosewege. Dieser Mechanismus verhindert das Überleben von Zellen, die den Zellzyklus nicht vollständig durchlaufen haben. (Blagosklonny, 1999) In den Click-it-Analysen ergab sich zum Ende der Passage jeweils ein Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen von 50 bis 60 %. Wäre ein Großteil der Zellen in einer Zellzyklusphase arretiert worden und apoptotisch, wäre keine Konfluenz der Zellen möglich gewesen und ein Großteil der Zellen wäre gestorben. Zusammen mit der Beobachtung der Zunahme der Zellzahl in der Zellkultur und den Ergebnissen der Microarray Analyse kann somit angenommen werden, dass die Zellen sich tatsächlich geteilt haben.

Im Unterschied zu Rapoport's menschlichen Pankreaszellen konnten somit bereits 48 Stunden nach Zellpräparation erste proliferative Mauspankreaszellen in der nullten Passage

nachgewiesen werden. Bereits nach 144 Stunden stellte sich in der nullten Passage ein Anteil an proliferierenden Zellen von etwa 50 Prozent ein, der auch in den folgenden Passagen aufrechterhalten wurde. Über die Gründe, die zu diesem starken Anstieg des Proliferationsverhaltens der Pankreaszellen im Vergleich zum Verhalten im Gewebe geführt haben, können nur Vermutungen angestellt werden. Rapoport konnte in seiner Arbeit erst in der ersten Passage proliferative Zellen nachweisen. Nach einem Trypsin-Verdau wuchsen 11 bis 17 % der Zellen aus P0 in dem neuen Zellkulturgefäß an und begannen mit der Proliferation. Er führt deshalb verschiedene Thesen für den Proliferationsbeginn an, eine davon ist der Verdau extrazellulärer Matrixkomponenten zum Ablösen der Zellen. Die Zellen würden in der nullten Passage noch durch eine Art Kontaktinhibierung durch die Nachbarzellen gehemmt werden und erst nach Vereinzelung durch den Trypsin-Verdau mit der Zellteilung beginnen. (Rapoport et al., 2009) Dieser These widerspricht, dass in dieser Arbeit den Mauszellen bereits in der nullten Passage proliferatives Verhalten nachgewiesen werden konnte. Damit konnten die Mauszellen auch ohne einen Vereinzelungsschritt mit der Proliferation beginnen. Ein Grund für diesen frühen Proliferationsbeginn könnte ein Unterschied zwischen den Modellorganismen sein. Alleine die Stoffwechselgeschwindigkeit der Maus ist um das siebenfache höher als die eines Menschen (Buselmaier & Traverdian, 2006), was zu der Vermutung führt, dass auch der Wiedereintritt der Mauszellen in den Zellzyklus in der *in vitro* Kultivierung wesentlich schneller realisiert wird.

Bekannt ist außerdem, dass einige Zellen in der Lage sind ein regeneratives Programm anzuschalten. (Martin & Parkhurst, 2004) Gerade das Pankreas scheint ein großes Regenerationspotential zu besitzen. So wurde gezeigt, dass das Rattenpankreas nach einem Verlust von etwa 90 % des Gewebes wieder regenerieren kann. (Bonner-Weir et al., 1993) Bei einer weiteren Studie, bei der vor allem exokrines Gewebe des Pankreas durch die Fütterung von Ethionin zerstört worden ist, begann die Regeneration des Gewebes bereits 48 Stunden nach Beginn der Fütterung. (Fitzgerald et al., 1968) Trotz des Einsatzes einer Ratte als Modellorganismus, deckt sich dieses Ergebnis mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Bei der durchgeführten Click-it-Analyse konnten ebenfalls 48 Stunden nach Präparation der Zellen, die ersten adhären und proliferativen Zellen nachgewiesen werden. Somit zeigte sich eine erste sichtbare Reaktion auf die *in vitro* Kultivierung. Führt man dann Rapoports These an, die auch von anderen Forschungsgruppen vertreten wird, dass die *in vitro* Kultivierung einen verwundungs- oder entzündungsähnlichen Zustand darstellt (Bouwens, 2004; Strobel et al., 2007; Xu et al., 2008), kann vermutet werden, dass die Pankreaszellen *in vitro* eine Art regeneratives Programm einschalten und deshalb mit der Proliferation beginnen. Der Unterschied zu dem Zustand *in vivo* ist dabei die fehlende Regulation durch den Organismus. (Rapoport et al., 2009) Während diese Regenerationsfähigkeit des Pankreas

bereits Gegenstand vieler Forschungen ist, besteht eine kontroverse Diskussion bezüglich der Herkunft der proliferativen Zellen. Neben den endokrinen und exokrinen Zellen und den Gangzellen, befindet sich ein geringer Anteil an Pankreasstammzellen im pankreatischen Gewebe. (Elsässer et al., 1993; Grapin-Botton, 2005; Rapoport et al., 2009) Wie auch in Rapoports Untersuchungen wurden in dieser Arbeit ein Großteil der exokrinen Zellen adhärent, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den proliferativen Zellen tatsächlich um exokrine Zellen und nicht diese seltene Stammzellpopulation handelt. In der Arbeitsgruppe Zelltechnologie des Fraunhofer Instituts für Marine Biotechnologie wird weiter an der Charaktisierung der exokrinen Mauspankreaszellen und auch Zellen anderer Modellorganismen in der *in vitro* Kultivierung gearbeitet. Anschließend an diese Arbeit wäre eine genauere Betrachtung der Veränderungen innerhalb der Zelle notwendig. Handelt es sich tatsächlich um G0-Zellen, die in die G1-Phase eintreten ohne zu dedifferenzieren (Elsässer et al., 1993) oder muss erst eine Dedifferenzierung erfolgen? (Rapoport et al., 2009) In Rapoports Studie verlieren die menschlichen Pankreaszellen ihre Pankreaszellmerkmale, wobei es interessant wäre, ob dies auch bei den Mauspankreaszellen der Fall ist. Dabei ist vor allem der Weg der Microarrayanalyse eine zukunftsorientierte Methode. Mit RNA-Proben beispielsweise von verschiedenen Zeitpunkten aus der nullten Passage könnten noch genauere Rückschlüsse auf die Änderungen innerhalb der Signalwege der Zelle gezogen werden. Ein genaueres Verständnis der Veränderungen innerhalb der Zellen in der *in vitro* Kultivierung bildet den Grundstein für ein noch genaueres Zellverständnis und ist ein weiterer Schritt für die Nutzung des Potentials der Pankreaszellen in der *in vitro* Kultivierung.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Proliferationsverhalten exokriner Mauspankreaszellen nach Isolierung aus dem Gewebsverband untersucht werden. Das Pankreas hat im lebenden Organismus nur eine geringe Proliferationsrate von 2 bis 3 Prozent. Allerdings konnte in den letzten Jahren ein großes Regenerationspotential des Pankreas gezeigt werden. Auch konnte den Pankreaszellen eine große Plastizität nachgewiesen werden. So auch in der Veröffentlichung von Daniel H. Rapoport „*Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells*“. In der *in vitro* Kultivierung entwickelten die humanen exokrinen Pankreaszellen stammzellähnliche Eigenschaften. Sie begannen ab der ersten Passage zu proliferieren und differenzierten spontan in Zellen unterschiedlicher Keimblätter. Anlehnend an die Veröffentlichung Rapoport's beschäftigte sich diese Arbeit mit dem Proliferationsverhalten exokriner Pankreaszellen aus dem Modellorganismus Maus. Ziel war die Bestimmung des Zeitpunktes des Proliferationsbeginns und die Quantifizierung der proliferierenden Zellen. Eingesetzt wurde dazu das Click-it-Assay zum Nachweis proliferierender Zellen, dessen Ergebnis mittels einer durchflusszytometrischen Messung verifiziert wurde. In den exokrinen Mauspankreaszellen konnte bereits 48 Stunden nach Isolierung aus dem Gewebsverband neusynthetisierte DNA nachgewiesen werden, wobei sich der Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen bis zum Ende der Passage zwischen 50 und 60 % einstellte. Dieser Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen konnte auch in höheren Passagen jeweils zum Ende der Passage detektiert werden. In den durchgeführten Time-Lapse Aufnahmen konnte keine Zellteilung beobachtet werden: Allerdings wurden auf molekularer Ebene die wichtigsten Gene für den Zellzyklus der nullten Passage in der *in vitro* Kultivierung signifikant höher exprimiert als im Gewebe. Somit sprechen sowohl die gesteigerte Genexpression als auch der Nachweis der DNA-Synthese für einen Proliferationsbeginn in Passage 0, was ein Unterschied zu den humanen exokrinen Pankreaszellen darstellt.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed., pp. 990–110). New York: Garland Science.
- Andreeff, M., Goodrich, D. W., & Pardee, A. B. (2000). Cell Proliferation, Differentiation and Apoptosis. (5, Ed.) *Cancer Medicine*. BC Decker. Retrieved April 20, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20860/>
- Blagosklonny, M. V. (1999). A node between proliferation, apoptosis, and growth arrest. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 21(8), 704–9. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199908)21:8<704::AID-BIES10>3.0.CO;2-5
- Bockman, D. E. (1993). Anatomy of the Pancreas. *The Pancreas Biology, Pathobiology, and Disease* (2nd ed., pp. 1–8). New York: Raven Press.
- Bonner-Weir, S., Baxter, L. a, Schuppin, G. T., & Smith, F. E. (1993). A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes*, 42(12), 1715–1720.
- Bouwens, L. (2004). Islet morphogenesis and stem cell markers. *Cell biochemistry and biophysics*, 40(3 Suppl), 81–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289645>
- Buck, S. B., Bradford, J., Gee, K. R., & Agnew, B. J. (2008). Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques*, 44(4), 2008. Retrieved from <http://www.biotechniques.com/BiotechniquesJournal/2008/June/Detection-of-S-phase-cell-cycle-progression-using-5-ethynyl-2-deoxyuridine-incorporation-with-click-chemistry-an-alternative-to-using-5-bromo-2-deoxyuridine-antibodies/biotechniques-45243.html?service=print>
- Buselmaier, W., & Traverdian, G. (2006). *Humangenetik für Biologen* (p. 299). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2009). *Biologie* (8th ed., pp. 303–327). Pearson Studium.
- Cantz, T., Manns, M. P., & Ott, M. (2008). Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell and tissue research*, 331(1), 271–282. doi:10.1007/s00441-007-0483-6
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2727–2730. doi:10.1073/pnas.95.6.2727
- Ciemerych, M. a, Kenney, A. M., Sicinska, E., Kalaszczynska, I., Bronson, R. T., Rowitch, D. H., Gardner, H., et al. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes & development*, 16(24), 3277–89. doi:10.1101/gad.1023602

- DeGregori, J., & Johnson, D. G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Current molecular medicine*, 6(7), 739–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17100600>
- Elsässer, H.-P., Adler, G., & Kern, H. F. (1993). Replication and Regeneration of the Pancreas. In Raven Press (Ed.), *The Pancreas Biology, Pathobiology, and Disease* (Second., pp. 75–86). New York.
- Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, a, & Lander, E. S. (1999). Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell*, 97(6), 727–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10380925>
- Fitzgerald, P. J., Herman, L., Carol, B., Roque, a, Marsh, W. H., Rosenstock, L., Richards, C., et al. (1968). Pancreatic acinar cell regeneration. *The American journal of pathology*, 52(5), 983–1011. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22828498>
- Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., Rideout, W. M., et al. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*, 114(4), 431–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941272>
- Gillett, C. E., & Barnes, D. M. (1998). Demystified ... cell cycle. *Molecular pathology : MP*, 51(6), 310–6.
- Grapin-Botton, A. (2005). Ductal cells of the pancreas. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(3), 504–10. doi:10.1016/j.biocel.2004.07.010
- Graw, J. (2010). *Genetik* (5th ed., pp. 184–190). Springer-Verlag.
- Haraguchi, K., Hayashi, T., Jimbo, T., Yamamoto, T., & Akiyama, T. (2006). Role of the kinesin-2 family protein, KIF3, during mitosis. *The Journal of biological chemistry*, 281(7), 4094–9. doi:10.1074/jbc.M507028200
- Harper, J. W., & Adams, P. D. (2001). Cyclin-dependent kinases. *Chemical reviews*, 101(8), 2511–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749386>
- Hartwell, L. H., & Weinert, T. a. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4930), 629–634. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683079>
- Heinzeller, T., & Büsing, C. M. (2001). *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg* (pp. 200–203). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hengst, L. (2003). *Regulation der Zellproliferation* (pp. 1–7).
- Ibidi GmbH. (2002). Ibidi cells in focus. Retrieved from <http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-ibidi-Standard-Bottom/m-Dish-35mm-high>
- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., & Nevins, J. R. (2001). Role for E2F in Control of Both DNA Replication and Mitotic Functions as Revealed from DNA Microarray Analysis. *Molecular and Cellular Biology*, 21(14), 4684–4699. doi:10.1128/MCB.21.14.4684

- Johnson, D., & Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Bioscience*. Retrieved April 24, 2013, from <http://www.bioscience.org/1998/v3/d/johnson1/d447-458.htm>
- Kee, Y., & Bronner-Fraser, M. (2005). To proliferate or to die: role of Id3 in cell cycle progression and survival of neural crest progenitors. *Genes & development*, *19*(6), 744–755. doi:10.1101/gad.1257405
- Knippers, R. (2001). *Molekulare Genetik* (9th ed., p. 159). Stuttgart: Thieme.
- Koepp, D. M., Harper, J. W., Elledge, S. J., & Hughes, H. (1999). How the Cyclin Became a Cyclin : Regulated Proteolysis in the Cell Cycle. *Cell*, *97*(C), 431–434.
- Krämer, S. (2006). Chronische Pankreatitis. *Chronische Pankreatitis*. Retrieved from <http://www.eesom.com/go/WM9RTEDY11TQ3GHM6MG4H2AF4CDL6E0U>
- Leblond, C. P., & Walker, B. (1956). Renewal of Cell Populations. *Physiological Reviews*, *36*(2), 255–275.
- Life Technologies Corporation. (2011). Click-iT® EdU Imaging Kits. Retrieved from <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp10338.pdf>
- Martin, P., & Parkhurst, S. M. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *131*(13), 3021–3034. doi:10.1242/dev.01253
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, *116*(2), 221–234. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744433>
- Peters, J.-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *7*(9), 644–656. doi:10.1038/nrm1988
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., & Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Development*, *8*(1), 9–22. doi:10.1101/gad.8.1.9
- Rapoport, D. H., Schick Tanz, S., Gürleyik, E., Zühlke, C., & Kruse, C. (2009). Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells. *Annals of anatomy*, *191*(5), 446–458. doi:10.1016/j.aanat.2009.07.002
- Roussel, M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*, *18*(38), 5311–5317. doi:10.1038/sj.onc.1202998
- Royer, H.-D., Grinstein, E., & Janz, M. (1999). Regulation des Zellzyklus und therapeutische Implikationen. *Der Onkologe*, *5*(10), 884–890. doi:10.1007/s007610050545
- Salomon, F. V, Geyer, H., & Gille, U. (2001). Anatomische Besonderheiten der Maus. *Anatomie für die Tiermedizin* (2nd ed., pp. 750–752). Enke Verlag.
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur* (3rd ed., pp. 13–23). Springer Spektrum.

- Silbernagl, S., & Despopoulos, A. (2012). *Taschenatlas Physiologie* (8th ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Strobel, O., Dor, Y., Alsina, J., Stirman, A., Lauwers, G., Trainor, A., Castillo, C. F.-D., et al. (2007). In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology*, *133*(6), 1999–2009. doi:10.1053/j.gastro.2007.09.009
- Tamrakar, S., Rubin, E., & Ludlow, J. W. (2000). Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Frontiers in Bioscience*, *5*, 121–137.
- Van Dierendonck, J. H., Keijzer, R., Van de Velde, C. J., & Cornelisse, C. J. (1989). Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer research*, *49*(11), 2999–3006. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2720660>
- Walczak, C. E., & Mitchison, T. J. (1996). Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: function and regulation. *Cell*, *85*(7), 943–946. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674121>
- Xu, X., D'Hoker, J., Stangé, G., Bonné, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Castele, M., et al. (2008). Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*, *132*(2), 197–207. doi:10.1016/j.cell.2007.12.015
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D. a. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*, *455*(7213), 627–32. doi:10.1038/nature07314

Anhang

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen benutzt habe.

Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter der Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Die Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt worden oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Ort und Datum

Unterschrift

Time-Lapse Aufnahmen