



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Die Rolle von Insulin in der Hepatokarzinogenese:
Vergleich von 2D und 3D Zellkulturen als Modell für
in-vitro Studien“

verfasst von / submitted by

Magdalena Preis

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the
degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Bettina Grasl-Kraupp

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Hepatozelluläres Karzinom (HCC).....	6
1.1.1	Hepatozyten.....	6
1.1.1.1	Zellerneuerung und Apoptose der Hepatozyten	6
1.1.2	Entstehung von HCC.....	7
1.1.3	Risikofaktoren für HCC.....	9
1.1.3.1	Das Metabolische Syndrom.....	10
1.2	Insulin	11
1.2.1	Stoffwechselwege des Insulins	11
1.2.2	Insulin in der Leber	12
1.2.3	Wachstum unter Insulin.....	14
1.2.4	Insulin in Hepatozellulären Karzinomzellen.....	15
1.3	Vorarbeiten der Gruppe	17
1.3.1	Änderung der Genexpression durch Insulin in präneoplastischen Rattenhepatozyten	17
1.3.2	Änderung der Genexpression durch Insulin in humanen hepatozellulären Karzinomzellen .	18
1.3.3	Unterschiede in der Malignität der Zelllinien	18
1.3.4	Zellkulturmodelle mit Hepatozyten	19
1.4	Fragestellung und Ziele	19
2	MATERIAL UND METHODIK.....	21
2.1	Zelllinien	21
2.1.1	HCC-1.2 Zellen.....	21
2.1.2	HepG2 Zellen.....	21
2.1.3	HMEC-1	21
2.2	2D Experimente	21
2.2.1	Insulinbehandlung der Zellen für RNA Isolierung	21
2.2.1.1	Behandlungsgruppen	22
2.2.1.2	RNA-Isolierung.....	22
2.2.1.3	Messung der RNA Konzentration	23
2.2.1.4	Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	23

2.2.1.5	Primer Design	24
2.2.1.6	Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	24
2.2.2	Insulinbehandlung der Zellen unter TGF- β 1 induzierter Apoptose	26
2.2.2.1	Formalin-Fixierung der Zellen	26
2.2.2.2	Hoechst-Färbung.....	27
2.3	3D Experimente.....	27
2.3.1	Spheroidbildung.....	27
2.3.2	Herstellung der Methylcellulose (MC).....	27
2.3.3	Mediumwechsel	28
2.3.4	Behandlung mit Insulin.....	28
2.3.4.1	RNA Isolierung.....	29
2.3.5	Proliferationsfördernder Effekt von Insulin: Auswertung mittels EdU.....	29
2.3.5.1	Formalin- und Carnoy-Fixierung der Spheroide	30
2.4	Verwendete Geräte.....	32
2.5	Verwendete Substanzen	32
2.6	Verwendete Primer	33
2.7	Verwendete Puffer	33
2.8	Verwendete Medien	34
2.9	Verwendete Lösungen.....	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Part I. Entwicklung von 3D Modellen.....	35
3.1.1	Spheroide aus HepG2, HCC-1.2 und HCC-2 Zellen.....	35
3.1.2	Methylzellulose (MC) Zusatz.....	36
3.1.3	Spheroide aus epithelialen und mesenchymalen Zellen	37
3.2	Part II. Reaktion der Zelllinien auf Insulin	40
3.2.1	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase 1 (PCK1) Expression.....	40
3.2.2	Glukose-6-Phosphatase (G6Pc) Expression	42
3.2.3	Schlussfolgerung	45
3.3	Part III. Proliferationsfördernde Effekte des Insulins	45
3.3.1	Wachstum der Spheroide aus HepG2 Zellen unter Insulin.....	46

3.3.2	Wachstum der Spherode aus HCC-1.2 Zellen unter Insulin.....	48
3.4	Part IV. Anti-apoptotische Effekte des Insulins.....	50
3.4.1	Anti-apoptotische Effekte des Insulins in HepG2 Zellen	51
3.4.2	Anti-apoptotische Effekte des Insulins in HCC-1.2 Zellen	53
3.4.3	Effekte des Insulins auf die Zellproliferation in Spheroiden	54
3.4.4	Schlussfolgerung	55
4	DISKUSSION	56
4.1	Spherode als 3D Modell des hepatozellulären Karzinoms	56
4.2	Methylcellulose im 3D Modell	57
4.3	Eignung des Modells für die Fragestellung	58
4.4	Proliferationsfördernde Effekte unter Insulin in Spheroiden.....	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
5.1	Einleitung.....	61
5.2	Methoden.....	61
5.3	Ergebnisse.....	61
5.4	Konklusion	62
6	ABSTRACT	63
6.1	Introduction.....	63
6.2	Methods	63
6.3	Results	63
6.4	Conclusion	64
7	QUELLENVERZEICHNIS	65
7.1	Literaturverzeichnis	65

8	ANHANG	67
8.1	Statistische Analysen.....	67
8.1.1	Einstichproben t-Test.....	67
8.1.1.1	Expressionslevel von PCK1 im 2D Modell mit HepG2 Zellen.....	67
8.1.1.2	Expressionslevel von PCK1 im 2D Modell mit HCC-1.2 Zellen.....	67
8.1.1.3	Expressionslevel von PCK1 im 3D Modell mit HepG2 Zellen.....	68
8.1.1.4	Expressionslevel von PCK1 im 3D Modell mit HCC-1.2 Zellen.....	68
8.1.1.5	Expressionslevel von G6Pc im 2D Modell mit HepG2 Zellen.....	68
8.1.1.6	Expressionslevel von G6Pc im 2D Modell mit HCC-1.2 Zellen.....	69
8.1.1.7	Expressionslevel von G6Pc im 3D Modell mit HepG2 Zellen.....	69
8.1.1.8	Expressionslevel von G6Pc im 3D Modell mit HCC-1.2 Zellen.....	70
8.1.1.9	Wachstumskurve des 3D Modells von HepG2 Zellen	70
8.1.1.10	Wachstumskurve des 3D Modells von HCC-1.2 Zellen.....	71
8.1.2	Zweistichproben t-Test.....	72
8.1.2.1	Anti-apoptotischer Effekt unter Insulin in HepG2 Zellen	72
8.1.2.2	Anti-apoptotischer Effekt unter Insulin in HCC-1.2 Zellen	73
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	75
10	TABELLENVERZEICHNIS	76
11	DANKSAGUNG.....	77

1 Einleitung

1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Weltweit gehört das hepatozelluläre Karzinom mit steigender Inzidenz zu den fünf häufigsten Krebserkrankungen [1]. Die Ursachen dafür sind vielfältig, die Behandlungsmöglichkeiten limitiert und die Erfolgsquote mäßig. Daher ist es besonders wichtig zu verstehen, wie diese Erkrankung entsteht, um das Ausbrechen verhindern zu können.

1.1.1 Hepatozyten

HCC geht von den Hepatozyten, den Zellen des Leberparenchyms aus, die etwa 80% des Lebervolumens ausmachen. Hepatozyten besitzen zwei Pole, den Gallenpol und den Blutpol [2].

Der Gallenpol liegt an der apikalen Membran, auch kanalikuläre Membran genannt. Die Gallenkanälchen werden zwischen benachbarten Membranen zweier Hepatozyten ausgebildet. Dort befinden sich zahlreiche Transportproteine (Carrier), zum Beispiel hBSEP (human bile salt export pump), über die die Hepatozyten konjugierte Gallensalze und andere Stoffe der Gallenflüssigkeit an die Gallenkanälchen abgeben [2, 3].

Der Blutpol liegt an der basolateralen Membran, auch sinusoidale Membran genannt, und ist für den Stoffaustausch der Hepatozyten mit dem Blutstrom verantwortlich. Daher ist die Membran des Blutpols dicht mit zahlreichen Transportern, wie den Glukosetransportern (GLUT) besetzt [2].

1.1.1.1 Zellerneuerung und Apoptose der Hepatozyten

Die Leber kann sich über eine Steuerung des Gleichgewichts zwischen Zellerneuerung und Absterben der Zellen durch Apoptose gezielt anpassen. Sie ist befähigt eine Regeneration des Gewebes vorzunehmen, wenn es zu Verletzungen oder Zellverlust kommt, ebenso wie bei Gewichtsverlust schrumpfen. um dem Körpergewicht proportional zu verbleiben [2].

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, hat keine Entzündungsreaktion zur Folge [4], vielmehr kommt es zu einem geordneten Kondensieren des Zytoplasmas und Ablösen der apoptotischen Zelle von seinen Nachbarzellen. Das Chromatin kondensiert und es werden sogenannte „apoptotic bodies“ (apoptotische Körper) gebildet, die dazu dienen die gebildeten Zellfragmente phagozytierbar zu machen.

Die Apoptose von Hepatozyten kann unter anderem durch Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) ausgelöst werden, ein Tumorsuppressor, der mit seiner anti-mitogenen Wirkung [5] Insulin entgegenwirkt wirken [6] und Apoptose in Hepatozyten zu induzieren vermag. Die Signalkaskade, die in der Apoptose endet, beginnt bei der Bindung von TGF- β 1 an seinen Serin-Threonin-Kinase Typ II Rezeptor, der daraufhin Serin-Threonin-Kinase Typ I Rezeptor phosphoryliert. Die Kinase Typ I rekrutiert Smads, die mit Smad-4 einen Komplex bilden und in den Zellkern translozieren. Durch die Transkription von Target-Genen werden Proteine synthetisiert, die die Freisetzung von Cytochrom c und die Bildung des Apoptosom-Komplexes bewirken. TGF- β 1 ist somit ein extrinsisches Apoptogen, das durch die Freisetzung von Cytochrom c die Apoptose vermittelt [7].

Die Apoptose ist in Krebszellen ein unterdrückter Prozess. Wenn sich Hepatozyten anfangen im Krebsprozess zu verändern, unterscheiden sie sich zunächst nur marginal von gesunden Hepatozyten, da die Hepatokarzinogenese ein diskreter mehrstufiger Prozess (siehe Abbildung 1) ist, der sich über Tumorstadien entwickelt und im Folgenden beschrieben wird [8].

1.1.2 Entstehung von HCC

Die Hepatokarzinogenese setzt sich aus Tumorinitiation, Promotion und Progression zusammen (siehe Abbildung 1).

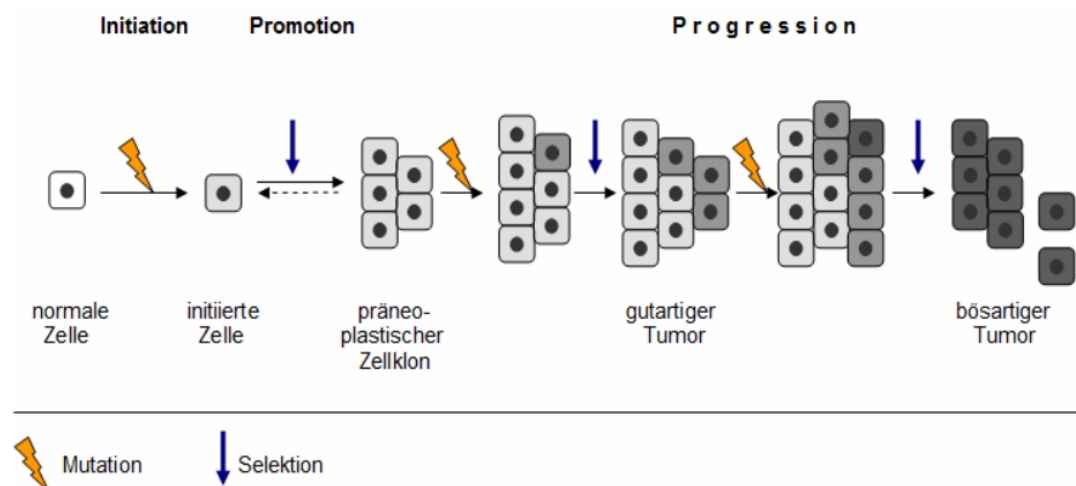


Abbildung 1: Mehr-Stufen-Modell der Karzinogenese

Modifiziert nach Baumgärtner und Gruber (2010) [8]. Die Tumorentstehung ist ein mehrstufiger Prozess und besteht aus Initiation, Promotion und Progression. Es sind mehrere Mutationen in kritischen wachstumsregulierenden Genen notwendig, damit ein gutartiger Tumor entsteht. Durch zusätzliche Mutationen entsteht ein maligner Tumor [2].

Voraussetzung der Initiation sind Genmutationen, die spontan entstehen können, aber auch durch Viren oder karzinogene Substanzen ausgelöst werden können. Zum Beispiel kann der Hepatitis-B-Virus (HBV) eine chronische Hepatitis auslösen, wodurch das Risiko für das Auftreten eines Leberkarzinoms um ein Vielfaches erhöht wird [9]. Im Rahmen einer chronischen Entzündung wird von den Zellen des Immunsystems vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Nitritoxid (NO) produziert, die als karzinogene Substanzen agieren können, indem sie DNA Schäden auslösen. Ein weiteres Beispiel für eine karzinogene Substanz ist Aflatoxin B1, ein Mykotoxin, das über die Nahrung aufgenommen wird, zu DNA Addukten führt und über die Bildung von Mutationen in den betroffenen Genen den Krebsprozess auslösen kann [10].

Besonders schwerwiegend sind Genmutationen, die die Zellteilung und/oder Apoptose verändern, indem sie Tumorsuppressorgene ausschalten oder Protoonkogene aktivieren. Tumorsuppressorgene, zum Beispiel p53, sitzen an der Schnittstelle von Apoptose und Zellzyklus und sind in mehr als 50% aller humanen Tumore mutiert [3]. Protoonkogene werden durch Mutationen zu Onkogenen, zum Beispiel kann das GTP bindende Protein Rat sarcoma (RAS) durch eine einzige Mutation seine Bindungsstelle für seine GTPase verlieren, somit konstitutiv aktiviert bleiben und permanent Wachstumssignale auslösen. [3]

Ein Tumor entsteht erst durch Akkumulation zahlreicher Mutationen, die sowohl aktivierende als auch inaktivierende Effekte in den betroffenen Genen entfalten können [3].

Auf die Initiation folgt die Phase der Tumorpromotion. Die Tumorpromotion ist gekennzeichnet durch die selektive klonale Proliferation von initiierten genmutierten Zellen zu Tumorstadien (Präneoplasien) und gutartigen Adenomen. Das Größenwachstum der Läsionen ist durch eine Kombination von gesteigerter Zellteilung und/oder gesenktem Absterben der Zellen durch Apoptose möglich. Diese Verschiebung des Gleichgewichts vom Zelltod hin zur Zellerneuerung wurde bei vielen tumorpromovierenden Substanzen beobachtet [3, 11].

Durch die Beendigung des Stimulus eines Tumorpromotors und damit verbundener erhöhter apoptotischen Aktivität kann sich der Tumor, beziehungsweise die Vorstufe eines Tumors, wieder zurückbilden [11].

Weitere Mutationen und eine anhaltende Zellproliferation führen zur letzten Stufe der Karzinogenese, der Tumorprogression. In dieser Phase akquiriert der Tumor einen bösartigen Phänotyp. Die fortgeschrittene Karzinogenese zeichnet sich durch Zellen aus, die oftmals ein praktisch unbegrenztes replikatives Potential besitzen aufgrund einer vermehrten Expression von Telomerase [11]. Nach einer regionalen Metastasierung kann durch die Invasion von Blut- und Lymphgefäßen schließlich im gesamten Organismus gestreut werden. Multiple Metastasen sind die Folge des destruktiven und invasiven Verhaltens [3].

1.1.3 Risikofaktoren für HCC

Wichtige Risikofaktoren für HCC sind Virusinfektionen (vor allem Hepatitis B und C Virus), chronischer Alkoholkonsum, das metabolische Syndrom, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2. Sie können zu oxidativem Stress, chronischer Entzündung, und im komplexen Zusammenspiel mit Insulinresistenz auch zu Hyperinsulinämie führen. Hyperinsulinämie kann langfristig durch Einfluss auf die Hepatozyten, Endothelzellen und hepatische Sternzellen, Vorstufen eines Leberkrebs auslösen (siehe Abbildung 2) [12].

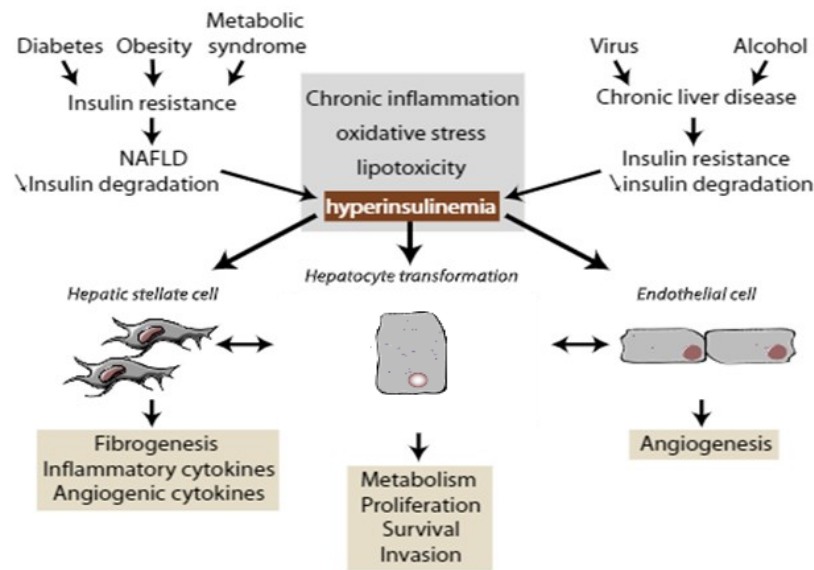


Fig. 2. Pathogenic pathways that may link hyperinsulinaemia to HCC development and progression.

Abbildung 2: Verschiedenste Risikofaktoren für HCC

Risikofaktoren wie Virusinfektionen, chronischer Alkoholkonsum, das metabolische Syndrom, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 können oxidativen Stress, chronischer Entzündung und im komplexen Zusammenspiel mit Insulinresistenz auch Hyperinsulinämie auslösen. Hyperinsulinämie hat einen Einfluss auf die Hepatozyten, Endothelzellen und hepatische Sternzellen und kann zu Vorstufen von Leberkrebs führen [12, 13].

In den westlichen Ländern nimmt vor allem die chronische Überernährung zu, deren Kennzeichen unter anderem ein permanent erhöhter Insulinspiegel der Patienten ist. Folgeerkrankungen der chronischen Überernährung sind zum Beispiel das Metabolische Syndrom, Adipositas, die nicht-alkoholbedingte Fettleber (NAFL) und Diabetes Mellitus Typ 2 (DM Typ 2) zu. Das Metabolische Syndrom wird aufgrund seiner zunehmenden Prävalenz in den Industrieländern als Zivilisationserkrankung bezeichnet. [14, 15].

1.1.3.1 Das Metabolische Syndrom

Das Metabolische Syndrom ist eine Stoffwechselerkrankung und setzt sich aus Adipositas, Hypertonie, Lipidstoffwechselstörungen und DM Typ2 zusammen [14].

Sowohl das Metabolische Syndrom, als auch DM Typ2, sind häufig durch eine Insulinresistenz gekennzeichnet. Bei einer Insulinresistenz befinden sich in den Körperzellen, vorwiegend im Leber-, Muskulatur- und Fettgewebe, Insulin Rezeptoren, die unempfindlich gegen Insulin geworden sind. Die Rezeptoren reagieren bei einer partiellen Insulinresistenz teilweise auf Insulin, bei der

absoluten Insulinresistenz reagieren sie gar nicht mehr auf dieses Hormon. Eine partielle Insulinresistenz kann anfangs vom Körper durch eine erhöhte Insulinsekretion kompensiert werden. Eine stetige Hyperinsulinämie kann eine partielle Insulinresistenz wiederum verstärken, indem es die Insulinrezeptoren an den Zellen runterreguliert [16].

Die Ursachen einer Insulinresistenz können genetisch bedingt sein, zum Beispiel durch Defekte der Insulinrezeptoren oder einer verminderten Expression von Insulinrezeptoren [3]. Eine Insulinresistenz kann auch im Laufe einer medikamentösen Behandlung des DM Typ2 entstehen, wenn gegen das zugeführte Insulin Autoantikörper gebildet werden, die schließlich auch gegen körpereigenes Insulin aktiv werden [3].

Insulinresistenz und Hyperinsulinämie stehen in einem komplexen Wechselspiel zueinander und treiben sich gegenseitig an [17].

Eine ständige maximale Auslastung und Überproduktion von Insulin im Pankreas bewirken allerdings zelluläre Schäden im endokrinen pankreatischen Gewebe. Die Folge ist eine verringerte Insulinsekretion, bis hin zur Entwicklung eines absoluten Insulinmangels beim Untergang der β -Zellen [12].

1.2 Insulin

Insulin ist ein potentes anaboles und adipogenes Hormon und besitzt wachstumsfördernde Eigenschaften. Es wird in den β -Zellen der Langerhans-Inseln in der Pankreas synthetisiert, in Vesikeln gespeichert und bei Bedarf kontrolliert ans Blut abgegeben. Die Hormonsekretion wird über die Glukosekonzentration im Blutplasma gesteuert, da die Senkung des Blutglukosespiegels die Hauptfunktion des Insulins ist. Sezerniertes Insulin gelangt zunächst über die Pfortader in die Leber, wo auf der Oberfläche der Hepatozyten Insulinrezeptoren in sehr hoher Dichte exponiert sind. Die Insulinkonzentration ist in der Leber, das das erste Zielorgan ist, bis zu zehnfach höher als in den peripheren Organen, der Muskulatur und dem Fettgewebe, zu denen es weitertransportiert wird [2, 3].

1.2.1 Stoffwechselwege des Insulins

Insulin spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung zahlreicher Enzyme. Katabole Stoffwechselwege in der Leber, dem Fettgewebe und Muskeln, wie die Glykogenolyse oder die Lipolyse werden unter Insulin Einfluss gebremst.

Anabole Stoffwechselwege wie die Glykogenbiosynthese, die Lipogenese und der Proteinaufbau werden unter Insulin Einfluss gesteigert. So trägt Insulin dazu bei, dass sich der Organismus gemäß seinem Energie- und Ernährungszustand anpassen kann und bei ausreichend vorhandenen Ressourcen das Zellwachstum und die Zellproliferation fördert [3].

Die Hauptaufgabe des Insulins ist die Senkung des Blutglukosespiegels. Es werden insulinabhängige und insulinunabhängige Glukosetransporter unterschieden. Da Leberzellen, Nervenzellen, Erythrozyten, und β -Zellen des Pankreas zum Erhalt der vitalen Funktionen notwendig sind, werden sie über den insulinunabhängigen GLUT-1 oder -2 Transporter mit Glukose versorgt. Myozyten und Adipozyten hingegen sind insulinabhängige Glukoseverwerter und werden von GLUT4 Transportern versorgt [3].

Im Gegensatz zu Hepatozyten und Myozyten speichern Adipozyten praktisch keine Glukose in Form des Glykogens. Stattdessen wird die Glukose in Adipozyten zu 3-Phosphoglycerat abgebaut, das ein essentieller Baustein für die Triacylglycerinsynthese ist [3].

1.2.2 Insulin in der Leber

Sezerniertes Insulin bindet auf der Oberfläche der Hepatozyten an den Insulin Rezeptor (IR-A oder IR-B) und bewirkt eine Aktivierung verschiedener Kinase-Kaskaden über intrazelluläre Transkriptionsfaktoren [3], die in den Zellkern translozieren und an das insulin-responsive-element (IRE) binden. Promotoren der Zielgene werden dadurch aktiv und erhöhen die Expression insulinempfindlicher Gene.

Insulin stimuliert bei hohem Blutglukosespiegel die Glykogensynthese durch die Aktivierung des PI(3)K-Signalweg und einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase B (Akt), die wiederum die Aktivität der Glykogensynthase erhöhen kann, indem es die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) inaktiviert [18]. Es resultiert eine erhöhte Glykogensynthese, da die Glykogensynthase Glukose in Glykogen umwandelt. Ebenso stimuliert Insulin bei hohem Blutglukosespiegel Enzyme der Glykolyse (Schritte der Glykolyse siehe Abbildung 3), beispielsweise das Schlüsselenzym Phosphofruktokinase-1 und die Glukokinase (GCK) [19].

Insulin inhibiert die Glukoneogenese (Schritte der Glukoneogenese siehe Abbildung 3), indem es den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt über das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase1 (PCK1) inhibiert und die

Transkription der Gene für Glukose-6-Phosphatase (G6Pc) reduziert. G6Pc katalysiert den letzten Schritt der Glukoneogenese, in dem es ein Phosphatrest abspaltet und Glukose freisetzt. PCK1 katalysiert den Schritt vom Oxalacetat zum Phosphoenolpyruvat und ist der wichtigste Kontrollpunkt der Glukoneogenese [20].

Außerdem stimuliert Insulin in den Hepatozyten die Lipogenese durch verstärkte Aktivierung der Pyruvatkinase und damit gesteigerter Acetyl-CoA Synthese. Gleichzeitig werden die Lipolyse und β -Oxidation durch Insulin inhibiert, unter anderem indem die Acylcarnitin-Transferase gedrosselt wird.

Insgesamt verschiebt Insulin in der Leber und den Muskeln die ATP-Produktion und Energiegewinnung von der Lipolyse, hin zur Glykolyse [3].

Analog dazu wird die Proteinsynthese in den Hepatozyten stimuliert und die Proteolyse inhibiert [3].

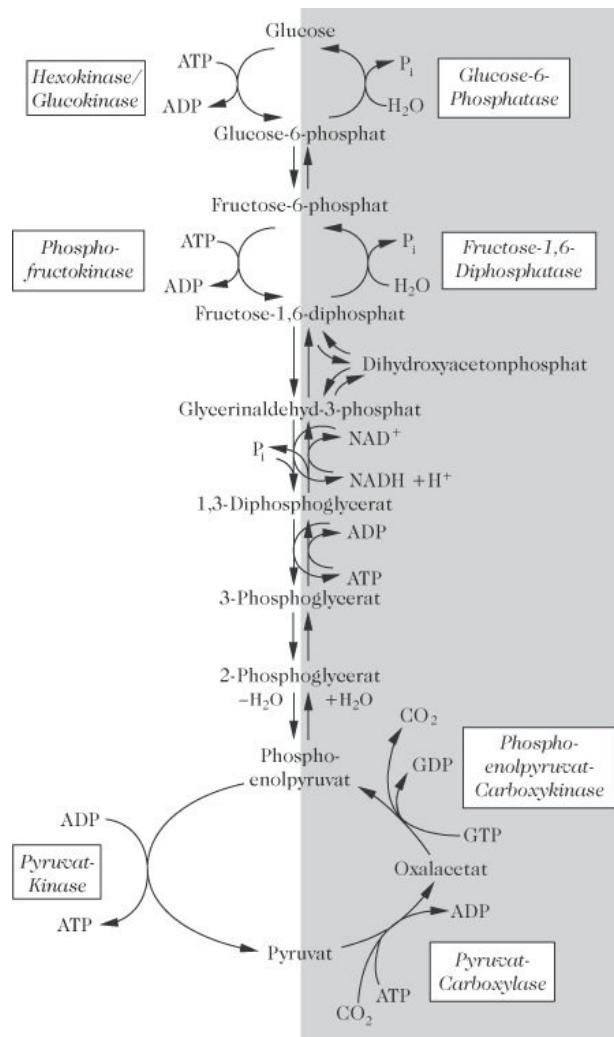


Abbildung 3: Überblick über Reaktionen und Schlüsselenzyme der Gluconeogenese (rechts) und Glycolyse (links).

Insulin forciert die Glykolyse und hemmt die Gluconeogenese, um den Blutzuckerspiegel zu senken [21].

1.2.3 Wachstum unter Insulin

Insulin kann sowohl eine Hypertrophie, die Zunahme des Zellvolumens, induzieren, indem es Protein- und Glykogenspeicher in Muskelzellen und Fettspeicher in Fettzellen füllt [3], als auch eine Hyperplasie, die Zunahme der Zellzahl, fördern. Diese Eigenschaften beruhen teilweise darauf, dass die Insulin Rezeptoren IR-A und IR-B eine große Strukturähnlichkeit mit Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-Rezeptoren und Insulin-like growth factor -2 (IGF-2)-Rezeptoren aufweisen. IR-A und IR-B sind Isoformen des Insulinrezeptors, die als Spleißvarianten aus dem Primärtranskript entstehen, und ebenso wie der IGF-Rezeptor aus einem Heterotetramer aufgebaut sind. Ein Heterotetramer besteht aus den über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten α und β und besitzt eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosin-Kinase Aktivität. Letztere ist für

die Aktivierung durch Autophosphorylierung des Rezeptors notwendig. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit sind Insulin- und IGF- Rezeptor- Untereinheiten in der Lage, miteinander einen Hybridrezeptor zu bilden. Die Hybridrezeptoren sprechen sowohl auf Insulin als auch IGF-1 an. Ebenso kann Insulin an den reinen IGF-1 Rezeptor binden und so Zellteilung induzieren. Da IGF-1 eines der potentesten Wachstumshormone im Körper ist, können durch die Bindung von Insulin am IGF-1 Rezeptor starke Wachstumsreize gesetzt werden [3, 22].

IR-A kann sowohl Insulin als auch IGF I und II erkennen und wird in Tumoren und fetalen Zellen exprimiert. Anti-apoptotische und mitogene Effekte gehen auf IR-A zurück [23], weswegen der Rezeptor mit aggressiven Krebsarten assoziiert wird (siehe Abbildung 2) [22].

IR-B hingegen kann nur von Insulin aktiviert werden und trägt vor allem der Senkung des Blutglukosespiegels in Leber, Muskeln und Fettgewebe bei [3].

Hyperinsulinämie bewirkt in den Hepatozyten unter anderem eine verstärkte Expression von IR-A und eine reduzierte Expression von IR-B. Dies ist bereits ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Insulin und seinen möglichen tumorpromovierenden Eigenschaften in der Leber.[12]

IR-A und IR-B rekrutieren Insulin Rezeptor Substrate (IRS1/2), die als Andockstelle für Adapterproteine, wie Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb-2) dienen. Dadurch können verschiedene Kaskaden aktiviert werden: der Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/ Proteinkinase B (auch AKT)/ mammalian target of rapamycin (mTOR) Signalweg, der PI3K/AKT/ forkhead box O (FOXO) Signalweg und der RAS/ mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Signalweg. Insbesondere letzterer nimmt eine wichtige Rolle für Zellwachstum und Proliferation ein [22].

Aufgrund des komplexen Zusammenspiels zwischen Insulin und IGF können Aussagen über reine Effekte durch Insulinrezeptoren nicht getroffen werden, da Effekte über IGF Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden können [24].

1.2.4 Insulin in Hepatozellulären Karzinomzellen

Je nach Phase der Hepatokarzinogenese verändert sich das Verhalten und Reaktionsvermögen der Hepatozyten auf Insulin. Um die Funktion des Insulins in der Karzinogenese verstehen zu können, müssen seinen Stoffwechselwegen in der Leber ein besonderes Augenmerk gewidmet werden, da sich die

Auswirkungen des Insulins in der Leber von den Effekten des Insulins in anderen Gewebezellen unterscheidet [12, 23].

Die Reprogrammierung des Metabolismus ist für die Hepatokarzinogenese entscheidend, da für die hohe DNA Syntheserate ausreichend Ribose Bausteinen synthetisiert werden müssen, um eine verstärkte Zellproliferation zu ermöglichen und folglich eine ausreichende Energieversorgung der schnell proliferierenden Zellen notwendig ist [23]. Dementsprechend findet bei der Reprogrammierung eine Verschiebung des Metabolismus Richtung Pentosephosphatweg statt [11, 25].

Der Pentosephosphatweg kann in eine oxidative und eine nicht-oxidative Phase unterteilt werden.

Der Ausgangsstoff Glukose-6-Phosphat (G6P) wird in der oxidativen Phase in drei Reaktionsschritten in die Pentose Ribulose-5-Phosphat (R5P) umgewandelt, wobei auch NADPH entsteht. R5P dient als Synthesebaustein der Nukleotidsynthese für Nukleinsäuren. NADPH dient in anabolen Prozessen als Reduktionsäquivalent.

In der nicht-oxidativen Phase werden verschiedene Glukose-Metabolite schließlich zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fructose-6-Phosphat. Beide Produkte können prinzipiell über die Glukoneogenese wieder in G6P umgewandelt werden, oder in der Glykolyse zur Energiegewinnung verwendet werden [3].

Mit dem beschleunigten Glukosefluss und der gesteigerten Glykolyse im Zuge der Reprogrammierung, steigt auch der Insulin-aktivierte Glukose-Metabolismus und die Aktivität von GLUT1 und GLUT2. Die Glukoneogenese und alle beteiligten Enzyme werden hingegen während der Karzinogenese unterdrückt, vermutlich, da es Stoffwechselwege mit zusätzlichem Energieverbrauch darstellen [23].

Dass HCC Zellen eine schwerwiegende Dysregulation von Insulin-abhängigen Stoffwechselwegen aufweisen, konnte bereits in der Arbeit von Chettouh et al., 2015 nachgewiesen werden [12]. Auch die Überexpression von Insulin Rezeptoren, besonders der Isoform IR-A, in HCC Zellen wurde von Chettouh et al. festgestellt (siehe Abbildung 2) [12].

Ob und ab welchem Stadium der Hepatokarzinogenese Insulin eine Rolle in der Krebsentstehung spielt, war Teil der Forschung unserer Arbeitsgruppe und wird im Folgenden beschrieben.

1.3 Vorarbeiten der Gruppe

1.3.1 Änderung der Genexpression durch Insulin in präneoplastischen Rattenhepatozyten

Die Forschung der genauen Mechanismen von eventuell verstärkten Signalwegen des Insulins in benignen präneoplastischen Rattenhepatozyten war Teil der Arbeiten unserer Arbeitsgruppe.

Präneoplastischen Hepatozyten sind Vorstufen des hepatozellulären Karzinoms und wurden in gesunden Ratten-Leberzellen durch die Behandlung der Ratten mit N-Nitrosomorpholin (NNM) induziert. Die Hepatozyten wurden anschließend von der Rattenleber isoliert, kultiviert und mit Insulin behandelt.

Um die präneoplastischen Hepatozyten auf Insulinsensitivität zu testen, wurde das Expressionslevel von Genen des Glukosestoffwechsels bei Zugabe von Insulin überprüft. Dabei konnte via quantitativer Real-Time Polymerase Chain Reaktion (RT-qPCR) nachgewiesen werden, dass Insulin das Expressionslevel seiner Zielgene steigern kann. Die Ergebnisse wiesen somit auf eine vorerst verbleibende Sensitivität auf Insulin bei ersten Vorstufen des Leberkrebses [25]. Im nächsten Schritt wurde die Expression wichtiger Enzyme des Pentosephosphatweges in präneoplastischen Rattenhepatozyten untersucht. Es wurde eine stärkere Unterdrückung der Gluconeogenese durch Insulin in präneoplastischen Hepatozyten als in normalen Hepatozyten festgestellt, da eine reduzierte Expression der PCK1, G6Pc und Fructose-1, 6-Biphosphatase (FBP1) vorgefunden wurde [22]. Die Expression der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PD), Transketolase (TKT) und Transaldolase 1 (TALDO 1) waren hingegen erhöht. Die Enzyme TKT und TALDO sind an der Synthese von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fructose-6-Phosphat beteiligt. G6PD ist an der Produktion von NADPH beteiligt.

Die Ergebnisse wiesen insgesamt auf einen erhöhten Glykogenlevel und daher eine erhöhte Kapazität der Energiespeicherung präneoplastischer Zellen im Vergleich zu normalen Hepatozyten unter Insulin. Die Resultate bestätigten, dass ein veränderter Kohlenhydrat Stoffwechsel eine verstärkte DNA Synthese

und damit eine erhöhte Zellproliferation in präneoplastischen Ratten-Hepatozyten bewirkt [25]. Daher dürfte Insulin durch eine verstärkte Nukleotidsynthese schon in frühesten Vorstufen der Hepatokarzinogenese an einer Reprogrammierung des Stoffwechsels beteiligt sein [25].

1.3.2 Änderung der Genexpression durch Insulin in humanen hepatozellulären Karzinomzellen

Im nächsten Schritt wurde der Fokus auf human relevante, maligne Systeme gesetzt. Dafür dienten 2D Zellkulturmodelle der Zelllinie HCC-1.2 und HepG2. Wachstumskurven unter Zugabe von Insulin lieferten mit vorangegangenen Experimenten vergleichbare Ergebnisse und deuteten auf eine erhöhte Sensitivität von Karzinomzellen gegenüber den anabolen Wirkungen Insulins hin. HCC-1.2 Zellen, eine schwach aggressive hepatozelluläre Karzinomzelllinie zeigte außerdem via fluorescence-activated cell sorting (FACS) eine leichte Zunahme der S- und G2/M- Phase auf. Eine solche Momentaufnahme der Zellen unter Insulineinfluss via FACS konnte bei HepG2 Zellen nicht gemacht werden, da die Polyploidie dieser stärker aggressiven Zelllinie mit dem Prinzip des FACS Experiments nicht vereinbar waren.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse ebenfalls für eine mögliche tumorpromovierende Wirkung des Insulins.

1.3.3 Unterschiede in der Malignität der Zelllinien

Um ein möglichst breites Spektrum im Verlauf der Hepatokarzinogenese mit Daten abdecken zu können, war es wichtig Zelllinien mit unterschiedlicher Malignität zu testen.

Das human relevante, benigne System wurde, wie eben beschrieben, bisher mit den HCC-1.2 Zellen teilweise untersucht. Die Daten über HCC-1.2 Zellen sollten mit dieser Arbeit um ein neues Zellkulturmodell erweitert werden.

Die stark maligne Zelllinie HepG2 wurde von Tobias Morgenbesser unserer Arbeitsgruppe untersucht. Mit dieser Arbeit wiederum sollten die Daten der HepG2 Zellen erweitert werden.

Die hepatozellulären Zelllinien HCC-1.2 und HepG2 unterscheiden sich in ihrer reproduktiven Überlebensfähigkeit in vitro und Malignität in vivo. HepG2 Zellen zeigen klonale Teilungsfähigkeiten einer stark entarteten Zelllinie in SCID Mäusen auf, während HCC-1.2 Zellen praktisch nicht in der Lage sind spontan Klone und Tumore zu bilden. [26]

1.3.4 Zellkulturmodelle mit Hepatozyten

Aufgrund der beiden Pole eines Hepatozyten und den unterschiedlichen Funktionen der Pole (siehe Kapitel 1.1.1), hat die Ausrichtung der Zellen bei Experimenten einen besonderen Stellenwert.

Im 2D Modell knüpfen Hepatozyten adhärente Zellkontakte mit der Oberfläche der Zellkulturflasche und orientieren ihre basolaterale Membrandomäne in Richtung des Mediums, um möglichst viele Nährstoffe aus dem Serum ziehen zu können. Zell-Zellkontakte sind im 2D Modell nur marginal bei Konfluenz der Zellen erreichbar. Damit ist auch die Möglichkeit, an der apikalen Membran Gallenkanälchen auszubilden, gering.

Im 3D Modell befinden sich die Zellen in einer sphärischen Konformation, wodurch mehr Zellkontakte ermöglicht werden. Außerdem ist es für Hepatozyten in Spheroiden möglich, sich ihrer Polarität entsprechend auszurichten. Das konnte bereits bei HepaRG Zellen nachgewiesen werden, die im 3D Modell in der Lage waren, Gallenkanälchen auszubilden. Ob dies auch bei Zelllinien im weiter fortgeschrittenen Stadium der Karzinogenese, zum Beispiel HCC-1.2 und HepG2 möglich ist, ist nicht geklärt, allerdings auch nicht auszuschließen.

Jedenfalls kann durch Spheroidbildung die physiologische Polarisierung der Hepatozyten in vivo besser simuliert werden und Forschungen an metabolischen Vorgängen können an Bedeutung gewinnen.

1.4 Fragestellung und Ziele

„Fungiert Insulin als endogener Tumorpromotor in der
Hepatokarzinogenese?“

Nachdem in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe eine verstärkte Nukleotidsynthese durch Insulin in Rattenhepatozyten nachgewiesen werden konnte, war der nächste Schritt die Etablierung eines geeigneten 3D Modells mit den humanen Karzinomzelllinien HCC-1.2 und HepG2. Mit Hilfe dieses Modells sollten Erkenntnisse über die Rolle des Insulins und seinen wachstumsfördernden Qualitäten im Stadium der fortgeschrittenen Tumorprogression an Bedeutung gewinnen.

Die Ziele dieser Arbeit können zusammengefasst werden mit:

Part I: Entwicklung und Etablierung eines 3D Modells mit den Zelllinien HCC-1.2 und HepG2

Part II: Prüfung auf Insulinsensitivität der Zellkulturmodelle anhand der Enzyme Glukose-6-Phosphatase (G6Pc) und Pyruvat-Carboxykinase-1 (PCK1)

Part III: Proliferationsfördernder Effekt durch Insulin anhand des entwickelten Zellkulturmodells

Part IV: Anti-apoptotischer Effekt durch Insulin im 2D Zellkulturmodell

2 Material und Methodik

2.1 Zelllinien

2.1.1 HCC-1.2 Zellen

Die Zelllinie HCC-1.2 ist eine epitheliale humane Zelllinie, die von einem männlichen 56-Jährigen mit Hepatitis C und Leberkrebs isoliert und kultiviert wurde [27].

2.1.2 HepG2 Zellen

Die Zelllinie HepG2 ist eine epitheliale humane Zelllinie, die von einem hepatozellulären Karzinom eines männlichen 15-jährigen Kaukasiers abstammt. Die Zellen sezernieren Plasmaproteine, wie zum Beispiel Albumin, α 2-Makroglobulin, α 1-Antitrypsin, Transferrin und Plasminogen. HepG2 Zellen werden häufig in Arzneistoffmetabolismus und Hepatotoxizitäts-Studien verwendet. Mit ihrer epithelialen Morphologie behalten sie viele der Funktionen von differenzierten Hepatozyten. Sie haben unter den gewählten Zelllinien die höchste Proliferationsrate [28].

2.1.3 HMEC-1

HMEC-1 (human dermal microvascular endothelial cells) ist eine mesenchymale humane Zelllinie, die in der Zellkulturflasche eine typische „Steinpflaster“-ähnliche Morphologie aufweist und im Matrigel röhrenartige Formen ausbildet. HMEC-1 exprimieren Oberflächenantigene, die typisch für endotheliale Zellen sind, zum Beispiel CD31 und C36, ebenso wie Zelladhäsionsmoleküle, zum Beispiel ICAM-1 und CD44. HMEC-1 ist die erste immortalisierte humane endotheliale Zelllinie, die morphologische, phenotypische und funktionale Eigenschaften einer normalen humanen endothelialen Zelle beibehält [29].

2.2 2D Experimente

2.2.1 Insulinbehandlung der Zellen für RNA Isolierung

Es wurden 2 Kontrollgruppen und 2 Behandlungsgruppen pro Experiment gehalten. Pro Gruppe und Erntezeitpunkt wurden 2 Petrischalen mit je 1×10^5 Zellen in 1,5ml Medium durchgeführt. Nach 24h wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Serum-freien Medium gewaschen. Anschließend wurden HCC-1.2 Zellen mit RPMI Medium +11,1mM Glukose +1% FCS versetzt und für 72h ausgehungert. HepG2 Zellen benötigten kein FCS und wurden mit RPMI Medium +11,1mM Glukose ausgehungert.

2.2.1.1 Behandlungsgruppen

Nach 72h Aushungern der Zellen, wurden sie mit folgender Behandlung versetzt:

Behandlung der HepG2 Zellen	Medium
Kontrolle	RPMI-Medium + 10% Serum + Glukose (11,11mM)
Kontrolle	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
0,1nM Insulin	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
2,0nM Insulin	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
Behandlung der HCC-1.2 Zellen	Medium
Kontrolle	RPMI-Medium + 10% Serum + Glukose (11,11mM)
Kontrolle	RPMI-Medium + 1% Serum + Glukose (11,11mM)
0,1nM Insulin	RPMI-Medium + 1% Serum + Glukose (11,11mM)
2,0nM Insulin	RPMI-Medium + 1% Serum + Glukose (11,11mM)

Tabelle 1: Behandlungsgruppen der Zellen für RT-qPCR Experimente

Insulin wurde im Serum-freien RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) Medium gelöst und auf die Zellen aufgebracht.

2.2.1.2 RNA-Isolierung

Bei der RNA Isolierung, sowie den folgenden Schritten, wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit Filter verwendet, um zu verhindern, dass die RNA mit RNAsen oder anderen störenden Substanzen in Kontakt kommt. Die RNA Isolierung erfolgte 6h, 10h und 24h nach der Behandlung. Die Zellen wurden mit 1.5ml 1xPBS pro Petrischale gewaschen, PBS entfernt und die Zellen mit 300µl peqGOLD Trifast lysiert. Der Doppelansatz pro Behandlungsgruppe wurde in ein Eppendorfer Tube vereint und sofort auf Eis gekühlt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Alle folgenden Schritte, bis auf die Inkubation bei Raumtemperatur, wurden auf Eis durchgeführt. Je Eppendorfer Tube wurde 60µl Chloroform (auf -20°C gelagert) zugegeben, die Tubes für 15sek invertiert und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10min bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Im organischen Chloroform sammelten sich bei der Zentrifugation Proteine an, während sich RNA in der oberen, wässrigen Phase anreicherte. Daher wurde zum Abtrennen der Proteine die obere Phase abgenommen und in einem neuen Tube mit 150µl Isopropanol gut vermischt. Die RNA wurde über Nacht bei -80°C im Isopropanol gefällt.

2.2.1.3 Messung der RNA Konzentration

Nach dem Ausfällen der RNA in Isopropanol wurde die RNA gewaschen. Dafür wurden die Proben für 10min bei 12000g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das entstandene RNA Pellet mit 300µl 70% Ethanol (mit DEPC H₂O verdünnt) pro Eppendorfer Tube gewaschen. Um das Pellet vollständig zu waschen und vom Rand des Eppendorfer Tubes zu lösen, wurde das Tube kurz gevortext und nochmals für 8min bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Der Waschalkohol wurde möglichst vollständig abgenommen und das RNA Pellet im Tube für ca. 5min bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurden 50µl DEPC Wasser hinzugegeben und die RNA darin gelöst. Das Tube wurde kurz gevortext und die RNA Konzentration mittels Nanodrop bestimmt. Mit Hilfe der RNA Konzentration konnte das Volumen, das für eine Menge von 2µg RNA notwendig war, bestimmt werden.

2.2.1.4 Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mittels der reversen Transkriptase wird mRNA auf doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 2µg RNA jeder Behandlungsgruppe mit DEPC Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15µl verdünnt. Der RNA Suspension wurde 0.625µl Random Hexamer Primer hinzugefügt, die Probe für 2min auf 72°C erhitzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Random Hexamer Primer sind unterschiedliche Oligonukleotide mit zufälliger Nukleotidabfolge, die sich während der Inkubation von 70°C an die RNA der Probe lagern, um eine Startsequenz für die Polymerisation zu legen. Anschließend wurden 9.375µl des vorbereiteten Mastermixes (siehe Tabelle 2), der reverse Transkriptase enthält, jeder Probe hinzugefügt und für 1h bei 42°C im Biorad Thermocycler inkubiert.

Reverse Transkriptase Mastermix je 2µg RNA/15µl	Volumen (µl)
5x Puffer (Thermo Fisher Scientific)	5,000
dNTP Mix (je 10mM)	1,560
RNase Inhibitor	0,625
DEPC H ₂ O	1,190
MMLV Reverse Transkriptase	1,000

Tabelle 2: Reverse Transkriptase Mastermix für RT-qPCR Experimente

Um die Polymerisation der cDNA zu stoppen und die reverse Transkriptase zu zerstören, wurde abschließend für 5min auf 94°C erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde auf ein Endvolumen von 100µl mit DEPC Wasser verdünnt. Die Proben wurden auf -20°C gelagert.

2.2.1.5 Primer Design

Es wurden Primer designt, um das Expressionslevel bestimmter Enzyme unter Insulinbehandlungen mittels PCR bestimmen zu können. Mithilfe der Datenbank „NCBI-Gene“ wurden die mRNA-Sequenzen der gewünschten Enzyme identifiziert und mithilfe „NCBI-Primerblast“ geblastet. Das Programm „CloneManager“ diente der Erstellung der Primer mit den gewünschten Eigenschaften für ein spezielles Temperaturprotokoll. Die Spezifität und das Vorhandensein von Exon-Exon-Junctions wurden mithilfe der NCBI Datenbank überprüft, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern. Primer wurden zur Herstellung bei der Firma Eurogenetic bestellt.

2.2.1.6 Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Wie in Kapitel 2.2.1.1 – 2.2.1.5 beschrieben, wurden Zellen zunächst mit Insulin behandelt, die RNA aus den Zellen isoliert, quantifiziert und mit reverser Transkriptase zu doppelsträngiger cDNA umgeschrieben. Für die RT-qPCR mit dem Farbstoff SYBR GREEN wurden Primer wie im Kapitel 2.2.1.5 beschrieben designt und von der Firma Eurogenetic hergestellt. Die Zusammensetzung des Mastermixes mit SYBR GREEN erfolgte nach Herstellerangaben folgendermaßen:

RT-qPCR SYBR GREEN	
Master Mix je Probe	Volumen (µl)
2x SYBR GREEN	12.5 µl
DEPC H ₂ O	8.5 µl
Primer forward	1.0 µl
Primer reverse	1.0 µl
cDNA	2.0 µl

Tabelle 3: SYBR GREEN Master Mix für RT-qPCR Experimente

SYBR GREEN ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit cDNA interkaliert und dadurch seine Fluoreszenz steigert. Die Quantifizierung der cDNA eines gesuchten Enzyms erfolgt über Fluoreszenz Messungen, die mit der Anzahl der PCR-Zyklen korrelieren. Je weniger Zyklen notwendig sind, um einen definierten

Wert von Fluoreszenz zu erreichen, desto mehr cDNA ist vorhanden. Der Ct-Wert (Cycle threshold, Schwellenwert Zyklus) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant ansteigt und wird von der Biorad-CFX Maestro software generiert. Weiters wird der Ct-Wert genutzt, um das gesuchte Gen zu normalisieren, und somit vergleichbar zu machen. Dafür wird der Ct-Wert eines housekeeping Gens (β -Actin) dem Ct-Wert des gesuchten Gens abgezogen wird (Δ Ct-Wert). Das housekeeping Gen ist ein Referenzgen, dessen Expressionslevel von den Insulinbehandlungen weitgehend unverändert bleibt. Der Wert $\Delta\Delta$ Ct gibt Auskunft über den relativen Abfall oder Anstieg des gesuchten Gens gegenüber unbehandelten Zellen. Da die Vervielfachung eines Gens einen exponentiellen Zusammenhang zur Basis 2 darstellt, wurde als letzter Schritt der „x-fold-Wert“ mit der folgenden Formel berechnet: $x\text{fold} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Bei Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffes SYBR GREEN wird ein bestimmtes Schema eines Temperaturprogramms der RT-qPCR angewendet (siehe Abbildung 4).

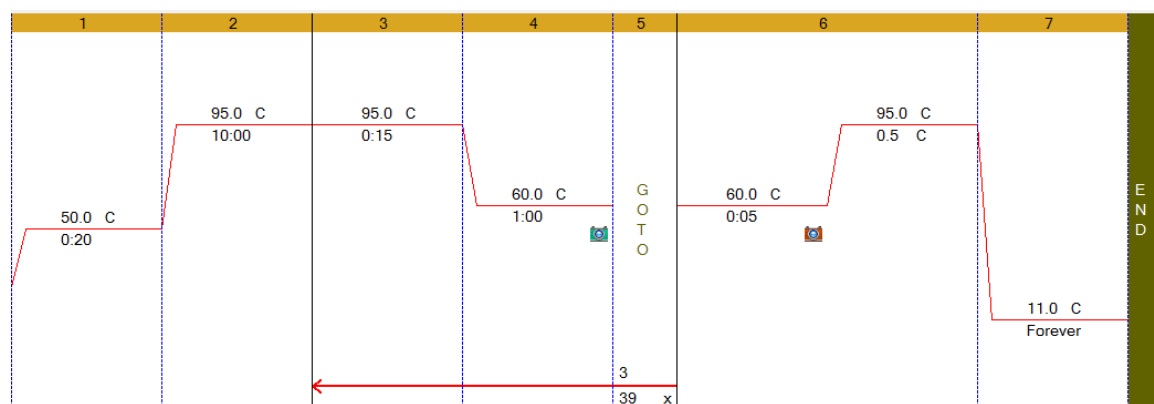


Abbildung 4: Schema der Temperaturprogramms der RT-qPCR bei Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffes SYBR GREEN.

1. Phase: 20sec/50°C, 2. Phase: 10min/95°C, 3. Phase: 15sec/95°C, 4. Phase: 1min/60°C, 5. Phase: zeigt Anzahl der Wiederholungen von Phase 1-4 an, 6. Phase: 5sec/60°C, 50sec/95°C, 7. Phase: 11°C, unendlich

Interpretation der berechneten $\Delta\Delta$ Ct Werte:

> 1,5: Erhöhung der Expression des Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe

= 1: unveränderte Expression des Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe

< 0,5: Verringerung der Expression des Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe

2.2.2 Insulinbehandlung der Zellen unter TGF- β 1 induzierter Apoptose

Für das Experiment im 2D Modell wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in 1,5mL des jeweiligen Zelllinien-spezifischen Mediums mit 10% FCS pro Petrischale (PD35) angesetzt. Nach 24h unter Standardkulturbedingungen wurden die Zellen ausgehungert, um sie für die nachfolgende Behandlung vorzubereiten und reaktiver zu machen. Das Aushungern erfolgte über einen Mediumwechsel auf serumfreies RPMI Medium mit 1%Glukose für 72h bei HepG2 Zellen und für 48h bei HCC-1.2 Zellen. Anschließend wurden je zwei Petrischalen pro Behandlungsgruppe mit TGF- β 1 und/oder Insulin für 6h, 10h und 24h behandelt.

Da sich bald herausstellte, dass nach 6h noch kein Effekt der TGF- β 1 und/oder Insulin einstellte, wurde in den nächsten Experimenten nur mehr für 10h und 24h behandelt.

Folgende Behandlungen wurden durchgeführt:

Behandlung	Medium
Kontrolle	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
TGF- β 1 10 ng/mL	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
TGF- β 1 30 ng/mL	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
TGF- β 1 10 ng/mL + Insulin	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
TGF- β 1 10 ng/mL + Insulin	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
TGF- β 1 30 ng/mL + Insulin	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)
TGF- β 1 30 ng/mL + Insulin	RPMI-Medium – Serum + Glukose (11,11mM)

Tabelle 4: Behandlungsgruppen der Zellen für RT-qPCR Experimente

Bei den ersten Experimenten wurden sämtliche Behandlungsgruppen zusätzlich auch ohne Glukose angesetzt. Dabei verkümmerten die Zellen allerdings während des Aushungerns bereits so stark, dass ein zusätzlicher Effekt des TGF- β 1 nicht mehr ersichtlich war. Daher wurde in den folgenden Experimenten auf Behandlungsgruppen ohne Glukose verzichtet und nur mehr Behandlungsgruppen mit Glukose angesetzt.

2.2.2.1 Formalin-Fixierung der Zellen

Nach erfolgter Behandlungszeit der Zellen mit Insulin und/oder TGF- β 1 ist der vorsichtige Umgang beim Abziehen oder Auftragen von Medium besonders wichtig, da sich apoptotische Zellen typischerweise vom Petrischalenboden lösen und bei schnellen Absaugen des Mediums mitabgesaugt werden können, beziehungsweise beim schnellen Auftragen des Mediums vom Boden abgespült werden können. Daher wurde das Medium sehr vorsichtig entfernt und sehr

vorsichtig mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Die NaCl-Lösung wurde entfernt und die Zellen mit 1mL 4% Formalin „nach Lillie“ pro Petrischale für 90 Minuten bei 4°C fixiert. Anschließend wurde Formalin entfernt und mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.2.2 Hoechst-Färbung

Das Waschwasser wurde entfernt und die DNA mit Hoechst 33342, einem spezifisch blau fluoreszierenden Farbstoff, gefärbt. Hoechst ist ein licht- und oxidationsempfindlicher Fluoreszenzfarbstoff, der neben toten, auch lebende Zellen schnell anfärbt. Hoechst interkaliert mit der DNA und wird mittels Fluoreszenzmikroskop von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 340°nm angeregt [30]. Die DNA leuchtet unter dem Mikroskop blau. Auf die mit Formalin fixierten Zellen wurden 500µl Hoechst-Lösung pro Petrischale aufgetragen und die Zellen am Schüttler mit einer Alufolie abgedeckt für 5min gefärbt. Hoechst wurde entfernt und die Petrischalen vorsichtig mit destilliertem Wasser gewaschen und umgedreht unter dem Abzug getrocknet. Die fixierten, gefärbten und getrockneten Petrischalen wurden ausgestanzt, die Glycerin-Gelatine kurz erwärmt und verflüssigt und die Petrischalen jeweils mit 2-3 Tropfen Gelatine versehen. Die Gelatine wurde auf Luftblasen kontrolliert, die mit einer Nadel ausgestochen wurden, da das Mikroskopieren bei Luftblasen nicht möglich ist. Dann wurde auf die noch flüssige Gelatine ein Deckglas gelegt. So konnten die Präparate bei 4°C gelagert und zum Mikroskopieren verwendet werden.

2.3 3D Experimente

2.3.1 Spheroidbildung

Um solide Spheroiden zu bilden, wurden HCC-1.2 und HepG2 Zellen zu 2000 Zellen in 50µl Medium in antiadhäsiv beschichteten, konkav geformten Wells einer 96er Mikrotiterplatte für 24h-48h inkubiert. Um für die Spheroiden gleiche Bedingungen bezüglich der Umgebungstemperatur zu schaffen und somit eine Vergleichbarkeit der Spheroiden nach einer Behandlung zu ermöglichen, wurden die äußersten Reihen der 96er Mikrotiterplatte nicht genutzt und nur mit Medium gefüllt.

2.3.2 Herstellung der Methylcellulose (MC)

MC wurde in vorpräparierter gelartiger Form bei 4°C vorrätig gehalten und bei Bedarf im Medium der Spheroiden gelöst.

Dafür war es zunächst notwendig 4g der gepulverten Form der MC in einer 250ml Flasche zu autoklavieren. Zu den 4g wurde anschließend 250ml erwärmtes serumfreies RPMI (37°C) zugegeben. Über Nacht wurde mit einem Magnetührstab bei 4°C gerührt und am nächsten Tag unter dem Abzug in 50mL Teile in Zellkulturröhrchen aliquotiert. Die Aliquoten wurden mit 4300 G für 2,5H zentrifugiert, um den Anteil sehr großer, nicht benötigter MC Stränge an den unteren Teil des Röhrchens zu drängen. Von den 50mL wurden dann 40mL aus dem Überstand in ein neues Röhrchen überführt und bei -20°C als Vorrat gelagert. Bei Bedarf wurde die gelierte MC aufgetaut und nochmals bei 4300G für 30min zentrifugiert.

2.3.3 Mediumwechsel

Ein vollständiges Absaugen des Mediums war bei den freischwimmenden Spheroïden in der 96er Mikrotiterplatte nicht möglich, da die Spheroïde mitabgesaugt würden. Nach verschiedenen Vortests wurden daher immer 20µl Medium pro Well zurückgelassen. Da die Zellen zunächst in nur 50µl Medium gehalten wurden, wurde beim ersten Mediumwechsel nur 30µl entnommen und 100µl frisches Medium zugefügt. Ab dem zweiten Mediumwechsel wurden 100µl Medium entfernt und wiederum 100µl zugefügt.

2.3.4 Behandlung mit Insulin

Die Behandlung der Zellen mit Insulin erfolgte immer zeitgleich mit einem Mediumwechsel, indem das Insulin in der entsprechenden Konzentration im Medium aufgelöst wurde. Vor der ersten Behandlung wurden die Spheroïde mit serumfreien RPMI Medium gewaschen, um Reste des Serums zu entfernen und den Insulin Effekt zu forcieren.

Aufgrund der unterschiedlichen Aggressivität der Zelllinien und der damit verbundenen unterschiedlichen Robustheit der Zellen bei Serumentzug wurden verschiedene Serumkonzentrationen während der Insulin Behandlung ausgetestet. HepG2 Zellen wurden ohne Serum während der Insulin-Behandlung gehalten. Das waren optimale Bedingungen, um den reinen Insulin Effekt beobachten zu können. Dies war allerdings nur aufgrund der hohen Robustheit der HepG2 Zelllinie möglich. Bei HCC-1.2 Zellen war das nicht möglich, da diese Zelllinie unter kompletten Serumentzug nicht überlebte. Daher wurde nach Vortests mit 3%, 2% und 1% Serum, 1% Serum für die Zeitspanne des Experiments für ausreichend empfunden.

Für das Experiment mit Insulinbehandlung wurden folgende 4 Gruppen gehalten: eine Kontrollgruppe mit 10% Serum, eine Serum-freie Kontrollgruppe, eine Serum-freie Behandlungsgruppe mit 0,1nM Insulinkonzentration, und eine Serum-freie Behandlungsgruppe mit 2,0nM Insulinkonzentration. Da 3Erntezeitpunkte (6h, 10h und 24h nach der Behandlung) zur RNA-Gewinnung vorgesehen waren, wurden pro Gruppe 8Wells inkubiert, sodass eine 96er Mikrotiterplatte pro Experiment benötigt wurde. An Tag 0 wurden 2000 Zellen in 50µl Medium pro Well inkubiert und 48h abgewartet, bis solide Spheroide entstanden. Dem Medium der HCC-1.2 Zellen wurden 10%MC und dem Medium der HepG2 Zellen 5%MC hinzugefügt. An Tag 2 wurde, wie oben beschrieben, 30µl Medium pro Well vorsichtig abgenommen und mit 100µl Serum-freien Medium gewaschen. Anschließend wurde 100µl der jeweiligen Behandlungslösung (ohne MC) pro Well hinzugefügt.

2.3.4.1 RNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte mit Pipettenspitzen mit Filter und wie im 2D Modell jeweils 6h, 10h und 24h nach der Behandlung. Es wurden 8 Spheroide pro Behandlungsgruppe und Erntezeitpunkt in ein mit 50µl PBS gefülltes Eppendorfer Tube vereint und für 5min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und der Spheroid-Pellet in 100µl PBS gewaschen. Anschließend wurde erneut für 5min bei 12000g zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Spheroid-Pellet mit 300µl peqGOLD Trifast pro Eppendorfer Tube lysiert. Dabei musste aufgrund teilweise niedriger RNA Ausbeute im 3D Modell besonderes Augenmerk auf das vollständige Auflösen der Spheroide gelegt werden. Dementsprechend wurde besonders oft resuspendiert, bevor die Proben bei -80°C gelagert wurden.

Die Schritte „Messung der RNA Konzentration“, „Reverse Transkriptase“, „Primer Design“ und „Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)“ wurden bereits bei 2D Experimenten beschrieben und wurden bei 3D Experimenten in gleicher Weise durchgeführt.

2.3.5 Proliferationsfördernder Effekt von Insulin: Auswertung mittels EdU
EdU (5-ethinyl-2'-deoxyuridin) ist ein Nukleosidanalogon von Thymidin und wird während der DNA Synthese in die DNA eingebaut. Mit Hilfe von EdU sollte es

ermöglicht werden über die DNA Synthese auf die Proliferation im 3D Modell, bei Spheroïden schließen zu können.

Das Experiment wurde analog zu den RT-qPCR Experimenten vorbereitet mit 2 Kontrollgruppen, 2 Behandlungsgruppen, 3 Erntezeitpunkte und 8 Wells pro Gruppe. Für die Medium-Zusammensetzung der Behandlungsgruppen siehe Tabelle 1.

Während der Behandlung der Spheroïde mit Insulin wurde in regelmäßigen Abständen EdU hinzugefügt, sodass sich der Farbstoff während der DNA Synthese bei der Proliferation einbauen konnte.

Nach 10 Tagen Insulinbehandlung der HepG2 Spheroïde beziehungsweise 7 Tagen Insulinbehandlung der HCC-1.2 Spheroïde wurden die Spheroïde fixiert. Da das EdU Imaging Kit zum ersten Mal getestet wurde, wurde sowohl eine Fixierung mit 4% Formalin nach Lillie, als auch eine Fixierung mit Carnoy durchgeführt, um optimale Bedingungen auszutesten.

2.3.5.1 Formalin- und Carnoy-Fixierung der Spheroïde

Zunächst wurde das Medium vorsichtig und möglichst vollständig von den Wells abgenommen und die Spheroïde mit 50µl 1xPBS gewaschen. Die Spheroïde wurden mit 50µl 0,2% Erythrosin B Lösung in 1xPBS gefärbt, um die Spheroïde deutlich sichtbar zu machen. Dies brachte beim Schneiden der eingebetteten Spheroïde eine erhebliche Erleichterung, da es eine Orientierung der Schnittrichtung ermöglichte. Nach dem Färben wurde mit 50µl 1xPBS gewaschen. Ebenso wurde in Vortests mit Eosin gefärbt, was allerdings scheiterte, da im späteren Schritt mit 70% Ethanol gewaschen wurde und dabei die Spheroïde wieder komplett entfärbt wurden. Mit Erythrosin B blieb die Färbung bestehen.

Anschließend wurden die gefärbten Spheroïde für mindestens 2h mit 4% Formalin nach Lillie bei 4°C fixiert. Es folgten 30min Waschen mit 50% Ethanol und 30min Waschen mit 70% Ethanol bei 4°C.

Alle Spheroïde einer Behandlungsgruppe und eines Erntezeitpunktes wurden in einer 3D Schale vorgelegt und erwärmtes, verflüssigtes Histogel vorsichtig aufgetropft. Die Spheroïde sollten dabei möglichst auf einer gemeinsamen Ebene im Histogel aufliegen, sodass im Querschnitt eines Histoschnittes möglichst viele Spheroïde auf gleicher Höhe anfielen und unter dem Mikroskop verglichen werden könnten. Das Histogel verfestigte rasch bei Raumtemperatur

und wurde für 1min bei 4°C verhärtet, um anschließend den Histogel-Block aus den 3D Formen herauslösen zu können. Die Histoblöcke wurden in beschrifteten Histokassetten in 70% Ethanol gelagert, in Paraffin eingebettet, zugeschnitten und mikroskopiert.

Alternativ zur Formalin Fixierung wurde auch die Carnoy Fixierung getestet. Da die Bestandteile der Carnoy Lösung zu aggressiv für die 96er Mikrotiterplatte war und sich die Böden der Wells bei Carnoy Lösung auflösten, wurden alle Spherotide einer Behandlungsgruppe und eines Erntezeitpunktes zunächst in ein Eppendorfer Tube vereint. Das Tube wurde für 2min bei 800rpm zentrifugiert, um das Medium im Überstand möglichst vollständig abnehmen zu können und mit 50µl 0,2%Erythrosin B Lösung in 1xPBS zu färben. Es wurde erneut zentrifugiert, mit 1xPBS gewaschen und 1mL der unter dem Abzug frisch hergestellten Carnoy Lösung pro Eppendorfer Tube hinzugegeben.

Bestandteile der Carnoy Lösung	Anteil (%)
Ethanol	60
Chloroform	30
Eisessig	10

Tabelle 5: Zusammensetzung der Carnoy Lösung

Nach 2h Carnoy Fixierung bei 4°C wurden die Tubes zentrifugiert, die Carnoy Lösung abgenommen und 1mL Isopropanol pro Tube für 30min bei 4°C hinzugefügt. Anschließend wurden die Spherotide wie bei der Formalin Fixierung in den 3D Formen vorgelegt, flüssiges Histogel aufgetropft und die Histogel-Blöcke in beschrifteten Histokassetten in Isopropanol gelagert. Die Histo-Blöcke wurden in Paraffin eingebettet und 3µm dicke Schnitte angefertigt.

2.4 Verwendete Geräte

Gerät	Anbieter	Modell
Autoclav	CertoClav	Multicontrol
Zentrifuge	Eppendorf	5415-R
Zentrifuge	Heraeus	MEGAFUGE 40R,
Inkubator	Thermo Scientific	Thermo HeraCell 150i
Microskop	Nikon	80i BF
Fluoreszenzmikroskop	Nikon	Eclipse Ti-E
Fluoreszenzmikroskop	Nikon	Eclipse E600
Fluoreszenzmikroskop	Nikon	VCC 8i FL
Nanodrop	Thermo Scientific	Nanodrop 1000
Thermo Cycler	Applied Biosystems	C 1000 Thermal cycler
Thermo Cycler	Biorad	CFX

Tabella 6: Verwendete Geräte

2.5 Verwendete Substanzen

Substanz	Anbieter	Produkt Code
5x Reaction Buffer für RT (geliefert im Kit mit MMLV Reverse Transkriptase 200U/μl)	Thermo scientific	#E00381
Acetic Acid 99,5%	Merck	K36163463
Bisbenzimid H 33258 (Hoechst)	Riedel-de Haën	33217
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A6003
Calcium Chloride	Sigma-Aldrich	C5670
Chloroform	Merck	1024452500
D-(+)-Glukose Monohydrate	Sigma-Aldrich	101515251
Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich	D5758
Di-Sodiumhydrogenphosphate	Merck	6586
dNTP Mix 10 mM	Thermo scientific	#R0192
Ethanol 99,5%	AustrAlco	7025
Erythrosin B	Merck Millipore	1.15936.0010
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich	F9665
Formaldehyde 37-40% with 10% Methanol	Merck	K35855803
HistoGel	Thermo scientific	HG-4000-012
Insulin	Serva	26360
Isopropanol 99,5%	Acros Organics	1841130025
Kaiser's Glycerol gelatine	Merck	1092420100
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2x	Thermo scientific	#K0222
MMLV Reverse Transkriptase 200U/μl	Thermo scientific	#E00381
peq-GOLD- Trifast	PeqLab	30-2020
Potassium Dihydrogen Phosphate	Sigma-Aldrich	M7506

RNase Inhibitor 40U/ μ l Sodium Chloride 99,5% (NaCl)	Thermo scientific Sigma	EP0441 57653
--	-------------------------------	-----------------

Tabelle 7: Verwendete Substanzen

2.6 Verwendete Primer

(Homo Sapiens, SYBR GREEN, Hersteller: Eurogenetic)

Ziel Gene	Richtung	Sequence
Hexokinase 4	Forward (5'->3')	TGC-TGA-GAT-GCT-CTT-CGA-CTA-C
Hexokinase 4	Reverse (5'->3')	GAG-AAG-GAT-GCC-CTT-ATC-GAT-G
alpha		
Fetoprotein	Forward (5'->3')	GCG-GCT-GAC-ATT-ATT-ATC-GG
alpha		
Fetoprotein	Reverse (5'->3')	CAA-GCT-GCT-GAA-GCA-TGG
Vimentin	Forward (5'->3')	CTC-CGG-GAG-AAA-TTG-CAG
Vimentin	Reverse (5'->3')	TCA-AGG-TCA-AGA-CGT-GCC-AGA-G
Keratin 8	Forward (5'->3')	CAG-AGA-TGG-AGA-ACG-AAT-TTG
Keratin 8	Reverse (5'->3')	ATA-TAG-CTG-CCT-GAG-GAA-GTT-G
Keratin 18	Forward (5'->3')	CCT-CGC-CAA-GAT-CAT-GGC-AGA-C
Keratin 18	Reverse (5'->3')	AGC-AGC-TCCC-AAC-CTC-AGC-AGA-C
Keratin 19	Forward (5'->3')	GCC-ACT-ACT-ACA-CGA-CCA-TCC
Keratin 19	Reverse (5'->3')	TCA-TCC-GCA-GAG-CCT-GTT-CC

Tabelle 8: Verwendete Primer (Homo Sapiens, SYBR GREEN)

2.7 Verwendete Puffer

Phosphate Buffered Saline (PBS) Zusammensetzung:
8 g Sodium Chloride 99,5 %
0.2 g Calcium Chloride
1.42 g Di-Sodiumhydrogenphosphate
0.27 g Potassium Dihydrogen Phosphate
1000 ml Aqua Bidest

Tabelle 9: Verwendete Puffer

2.8 Verwendete Medien

RPMI	Basismedium, Mediapulver Sigma R6504 in bidestilliertem Wasser gelöst, Natriumhydrogencarbonat und 10% FCS Zugabe
R-Medium	RPMI Medium mit 10% FCS für HCC-1.2
MNP-Medium (Minimum Essential Medium Eagle)	Basismedium mit den notwendigsten Nährstoffen, Mediapulver Sigma M0268 in bidestilliertem Wasser gelöst, Natriumhydrogencarbonat und 10% FCS Zugabe für HepG2
D-Medium (Dulbeccos modification of eagles medium)	Mediapulver Sigma D564 in bidestilliertem Wasser gelöst, Natriumhydrogencarbonat und 10% FCS für HMEC

Tabelle 10: Verwendete Medien

2.9 Verwendete Lösungen

RT-qPCR SYBR GREEN Master Mix	Zusammensetzung:
	12.5 µl 2x SYBR GREEN 8.5 µl DEPC H ₂ O 1.0 µl Primer forward 1.0 µl Primer reverse 2.0 µl cDNA
cDNA Mastermix	Zusammensetzung:
	5 µl 5x Buffer 1.56 µl dNTP mix 0.625 µl RNase Inhibitor 1.19 µl DEPC H ₂ O 1 µl MMLV reverse Transkriptase
DEPC H₂O	Zusammensetzung:
	100 µl Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) 100 ml Aqua Bidest
Formalin nach Lillie	Zusammensetzung:
	200 ml Formaldehyde 37-40% mit 10% Methanol 1800 ml Aqua Bidest 8 ml Sodiumdihydrogenphosphate-1-hydrate 13 ml Di-Sodiumhydrogenphosphate
Hoechst Lösung	Zusammensetzung:
	8 mg Bisbenzimid 1000 ml Aqua Bidest

Tabelle 11: Verwendete Lösungen

3 Ergebnisse

3.1 Part I. Entwicklung von 3D Modellen

Die antiadhäsiv beschichteten, konkav geformten Wells der 96er Mikrotiterplatte stellten sich als sehr gut geeignet für die Spheroidbildung in unseren Experimenten heraus. Zur Unterstützung der Spheroidbildung und zur weiteren Stabilisierung war bei HCC-1.2 Zellen MC sehr hilfreich. Bei ersten Vortests wurde bei jedem Mediumwechsel MC erneut zugegeben. Das stellte sich später als nicht notwendig heraus, da eine einmalige MC Zugabe zu Beginn ausreichte, um einen Anstoß zur Spheroidbildung zu geben. Auch, wenn beim darauffolgenden Mediumwechsel ein Teil der MC mit dem verbrauchten Medium abgenommen wurde, so verblieb doch immer ausreichend MC im Well, um das Spheroid nicht wieder auseinander fallen zu lassen. Beim Mediumwechsel wurde das 96er Well schräg bei etwa 45° gehalten und der Überstand entnommen. Das Spheroid sollte dabei nicht berührt werden, was durch sehr langsames Aufziehen des verbrauchten Mediums möglich war. Ganz ohne MC waren die Spheroide so empfindlich, dass es schwierig war, sie unversehrt zu erhalten, da bei komplett flüssigem Medium das Spheroid dem Sog beim Abziehen des verbrauchten Mediums sofort folgte und meist zerfranst oder aus dem Well entfernt wurde.

Zunächst wurden 1000, 2000 und 3000 Zellen pro Well angesetzt. Bei einer Zellzahl von 2000 Zellen pro Well bildeten sich schnell Spheroide aus, bei 3000 dauerte es etwas länger. Bei 1000 Zellen pro Well waren die Spheroide sehr klein.

Auf Basis dieser Voruntersuchungen wurde bei allen weiteren Experimenten mit 2000 Zellen in 50 µl des Zelllinien-spezifischen Mediums (abzüglich 10% MC bei HCC-1.2 Zellen bzw. 5% MC bei HepG2 Zellen) pro Well weitergearbeitet.

Die Bildung von Spheroide mit HepG2, HCC-1.2 und HCC-2 Zellen verlief aufgrund der divergenten Eigenschaften der Zelllinien sehr unterschiedlich, wie im folgenden Teil dargelegt.

3.1.1 Spheroide aus HepG2, HCC-1.2 und HCC-2 Zellen

Da HepG2 Zellen bereits in der Zellkulturflasche 3D Klone bildeten, war es naheliegend, dass es mit dieser Zelllinie möglich ist, Spheroide zu bilden. Um HepG2 Zellen zur Spheroidbildung anzuregen, wurden sie- wie in Kapitel 3.1

angeführt- zu 2000 Zellen in 50µl Medium pro Well mit MC angesetzt. Unter Standardbedingungen war es möglich Spherioide bis maximal 16 Tage zu erhalten. Nach etwa 16 Tagen verloren die Spherioide an Form und Stabilität und zerfielen. Einzigartig bei den HepG2 Zellen waren die Zellauswüchse auf der Spherioidoberfläche, die über das normale Wachstum hinaus ging. Diese Zellausbuchtungen waren reproduzierbar und fanden um den 14. Tag statt, also kurz vor dem Zerfall der Spherioide.

Weder bei HCC-2, noch HCC-1.2 Zellen konnten solche Auswüchse an der Spherioidoberfläche wieder gefunden werden.

HCC-1.2 Zellen waren nicht in der Lage Klone oder Zellhaufen spontan zu bilden. Trotzdem war es möglich, mit HCC-1.2 Zellen Spherioide über die in Kapitel 3.1 beschriebene Methode und unter Einsatz von MC zu bilden. HCC-1.2-Spherioide waren kurzlebiger als HepG2-Spherioide und beim Mediumwechsel musste besonders vorsichtig und langsam vorgegangen werden, um die HCC-1.2-Spherioide nicht zu zerstören.

Mit HCC-2 Zellen war es trotz MC Zugabe nicht möglich stabile Spherioide zu bilden. Die Zellen waren durch die konkav geformten Böden der Mikrotiterplatte gezwungen schwebende Zellhaufen zu bilden, anstatt sich am Boden der Zellkulturflasche anzuhafte. Allerdings blieben es undefinierte Agglomerationen, die auch mit höheren MC Konzentrationen nicht stabilisiert werden konnten und schon nach wenigen Tagen zerfielen. Daher wurden von weiteren Experimenten mit HCC-2 Zellen im Rahmen dieser Arbeit Abstand genommen.

3.1.2 Methylzellulose (MC) Zusatz

Verschiedene Konzentrationen der MC wurden ausgetestet, um die ideale MC Konzentration für die jeweilige Zelllinie zu finden.

HepG2 Zellen benötigten keine bis wenig MC zur Ausbildung von Spheroiden, allerdings konnte ein minimaler MC Zusatz die Spheroidbildung verbessern. Es wurde ein MC Zusatz in Konzentrationen von 1%, 5%, 10% und 20% getestet. HepG2 Zellen waren bei 10%MC in ihrem Wachstum eingeschränkt während bei 0% bzw. 1%MC verschiedene Formen von runden bis hin zu formlosen Zellverbänden ausgebildet wurden, die nicht reproduzierbar waren. Letztere konnten nicht zur Analyse einer Wachstumskurve herangezogen werden. Zusätzlich waren HepG2 Spherioide mit einer zu niedrigen beziehungsweise

keiner Zugabe von MC instabil und ein Mediumwechsel problematisch. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit und für eine optimale Stabilisierung bei der Spheroidentwicklung wurde daher eine Konzentration von 5%MC bei allen weiteren Experimenten mit HepG2 Spheroide verwendet.

MC hatte bei HCC-1.2 Zellen nicht nur stabilisierende Effekte, sondern war als Adhäsionshilfe notwendig, damit es zu einer Spheroidbildung kommen konnte. Daher wurde bei HCC-1.2 Zellen mit MC 5%, 10% und 20% experimentiert. 5%MC bot nicht ausreichend Adhäsionshilfe zur Spheroidbildung und 20%MC schien die Spheroide in ihrem Wachstum einzuschränken (siehe Abbildung 5). Mit 10%MC schien das Spheroid im Wachstum nicht eingeschränkt zu sein und es entstanden reproduzierbar runde Spheroide, daher wurde diese Konzentration für alle weiteren Experimente verwendet.

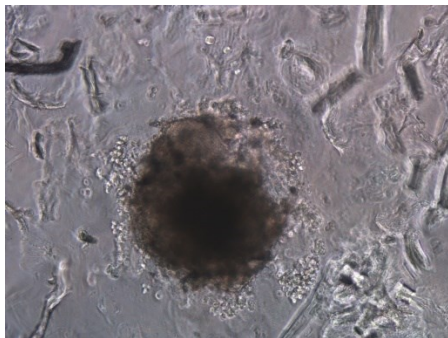


Abbildung 5: HCC-1.2-Spheroid bei 20%MC Zugabe

Das Spheroid ist dunkel, an der Oberfläche ausgefranst und Zellverbände befinden sich außerhalb des Spheroids. Um das Spheroid befinden sich viele MC Bruchstücke, die zwar in der richtigen Konzentration stabilisierend sein können, bei zu hoher Konzentration das Wachstum aber einschränken.

3.1.3 Spheroide aus epithelialen und mesenchymalen Zellen

Im nächsten Schritt wurden Spheroide aus einer Mischung von epithelialen und mesenchymalen Zellen geformt. Als mesenchymale Zelllinie wurden human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1), eine immortalisierte humane Zelllinie gewählt, um sie mit den epithelialen HepG2 oder HCC-1.2 Zellen bei der Spheroidbildung zu mischen. HMEC-1 weisen typische „Steinpflaster“-ähnliche Zellformen in der Zellkulturflasche auf, bilden im Matrigel röhrenartige Formen aus und exprimieren Oberflächenantigene, wie CD31 und C36, ebenso wie Zelladhäsionsmoleküle, wie ICAM-1 und CD44. Im Folgenden werden die Spheroide aus epithelialen und mesenchymalen Zelllinien als HepG2/HMEC-1- bzw. HCC-1.2/HMEC-1-Spheroide bezeichnet.

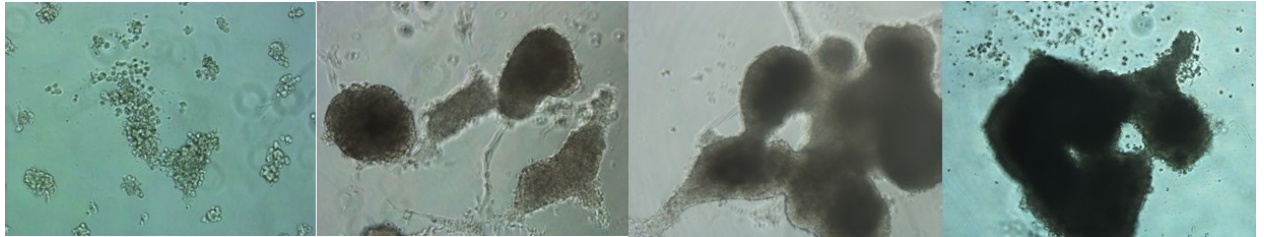
Zunächst wurden HepG2 bzw. HCC-1.2 Zellen und HMEC-1 auf Kompatibilität getestet. Dafür wurde konditioniertes Medium der HMEC-1 im Verhältnis 1:1 zum zellkulturspezifischen Medium den epithelialen Zellen hinzugefügt. Parallel wurde zum Vergleich eine Kontrollgruppe mit unverbrauchtem Medium versetzt. Nach 3 Tagen wurde die Zellzahl der Kontroll- und Behandlungsgruppe jeweils im Doppelansatz mittels Neubauer Kammer ausgezählt und bewertet, ob die Proliferationsrate der HepG2 bzw. HCC-1.2 Zellen von den Zytokinen der HMEC-1 im konditionierten Medium beeinflusst wird. Da kein negativer Effekt bemerkt wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass sich die epithelialen und mesenchymale Zelllinie in einem gemeinsamen Well nicht negativ beeinflussen würden.

Routinemäßig wurden HepG2 Zellen mit MNP-Medium + 10%FCS, HCC-1.2 Zellen mit R-Medium + 10%FCS und HMEC-1 Zellen mit D-Medium + 10%FCS gehalten. In Vorversuchen wurde ausgetestet, ob sich das Wachstum der HepG2 und HMEC-1 Zellen im R-Medium + 10%FCS verändert. Da kein wesentlicher Unterschied des Wachstums zu erkennen war, wurde bei Ko-Inkubationen R-Medium verwendet.

Als nächstes wurde mit dem Verhältnis der Zellzahl experimentiert. HepG2 und HMEC-1 Zellen wurden in verschiedenen Zellzahlverhältnissen ko-inkubiert. Je größer die Anzahl der HMEC-1 Zellen und je kleiner die Anzahl der HepG2 Zellen, desto kleiner wurden die Spheroide, trotz gleichbleibender Gesamtzellzahl. Umgekehrt waren Spheroide mit mehr HepG2 Zellen von Anfang an größer. Größere Spheroide wiesen eine geringere Wachstumsrate als kleinere Spheroide auf.

Bei einem Zellzahlverhältnis von 3 Teilen HMEC-1 und 1 Teil HepG2 Zellen hatten HMEC-1 einen destabilisierenden Effekt, da sie netzartige Gebilde mit HepG2 Zellen bildeten und ein Ausfransen der Spheroidoberfläche bewirkten. Ein Zellzahlverhältnis von 1:1 erwies sich für weitere Experimente am geeignetsten.

Ohne MC Zusatz wurden keine HepG2/HMEC-1-Spheroide erzielt, wie auf der Abbildung 6 zu erkennen ist. Unförmige und zerstreute Zellhaufen anstatt runder Spheroide wurden gebildet.



1.Tag

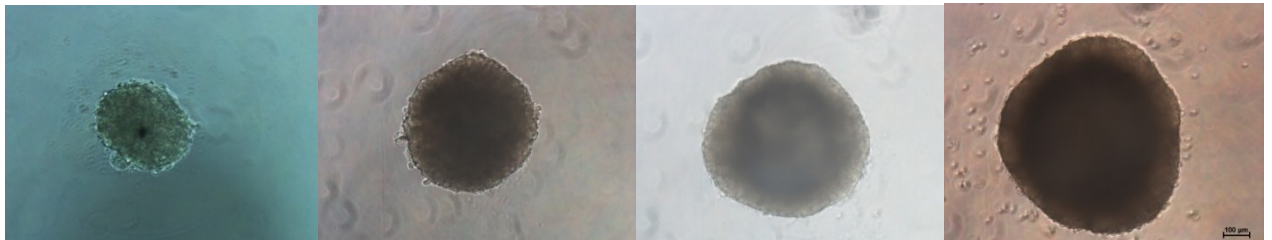
5.Tag

9.Tag

12.Tag

Abbildung 6: HepG2 und HMEC Zellen im Ansatzverhältnis 1:1 ohne MC

Bei 5% MC Zusatz bildeten sich reproduzierbar runde und stabile Spherode aus, siehe Abbildung 7. Diese Konditionen wurden bei allen weiteren Experimenten beibehalten.



1.Tag

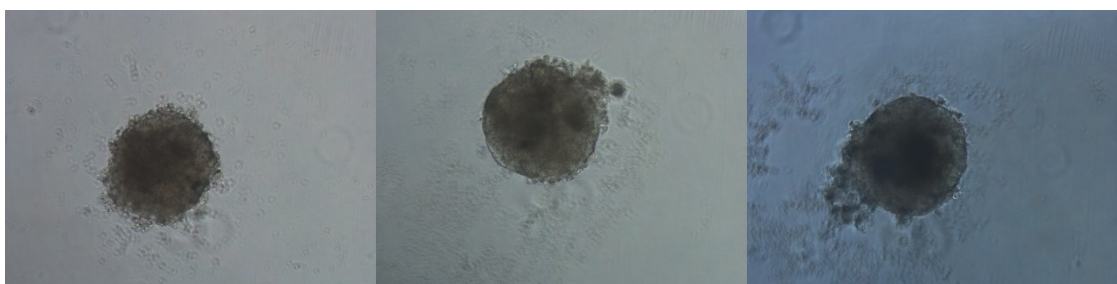
5.Tag

8.Tag

12.Tag

Abbildung 7: HepG2 und HMEC Zellen im Ansatzverhältnis 1:1 mit 5% MC

Bei HCC-1.2/HMEC-1-Spheroiden wurden ebenfalls verschiedene Zellzahlverhältnisse ausgetestet. Wie in Abbildung 8 erkennbar, war ein Verhältnis der HCC-1.2 und HMEC-1 Zellen von 1:2 von Nachteil. Es wurde kein einheitlicher Zellverband gebildet, die Spheroidoberfläche war ausgefranst und nicht glatt.



1.Tag

4.Tag

8.Tag

Abbildung 8: HCC-1.2 und HMEC Zellen im Ansatzverhältnis 1:2 mit 10%MC

Routinemäßig wurde für alle folgenden Experimente ein Verhältnis der HCC-1.2 Zellen und HMEC-1 von 1:1 gewählt, was zur Bildung von einheitlichen Spheroiden führte.

Wie bereits erläutert, wurde beim Ansatz von HepG2/HMEC-1 und HCC-1.2/HMEC-1-Spheroiden ein Verhältnis der Zelllinien von 1:1 gewählt. Ob die

beiden Zelltypen in den Spheroïden tatsächlich im Verhältnis von 1:1 vorlagen und ob dieses Verhältnis konstant war, wurde mit Hilfe der Analyse der Expression von Vimentin, einem endothelialen Marker überprüft. Es wurde ein spezifischer endothelialer Primer generiert, um den Expressionslevel von Vimentin auf mRNA Ebene in den Spheroïden mittels RT-qPCR zu ermitteln.

Da die mRNA Expressionslevel von Vimentin nicht konstant waren, musste angenommen werden, dass das tatsächliche Mischungsverhältnis der epithelialen zu mesenchymalen Zellen in den Spheroïden variabel war. Daher wurde in weiteren Experimenten von gemischten Spheroïden Abstand genommen.

3.2 Part II. Reaktion der Zelllinien auf Insulin

Wie in Kapitel 1.1.2 erläutert, sind Glukose-6-Phosphatase (G6Pc) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1 (PCK1) wichtige Enzyme der Gluconeogenese, deren Expression durch Insulin in Hepatozyten unterdrückt wird. Anhand dieser Enzyme sollte untersucht werden, ob die gewählten Zellkulturmodelle das Hepatozyten spezifische Reaktionsmuster unter Insulin zeigen.

Die Prüfung der Zelllinien auf Insulinsensitivität wurde sowohl im 2D, als auch im 3D Modell durchgeführt. Der Unterschied in der Vorgehensweise lag hierbei, dass im 3D Modell 48h bis zur Spheroïdbildung abgewartet wurde, bevor mit der Insulinbehandlung begonnen wurde. Es wurde mit einer Konzentration von 0,1nM oder 2,0nM Insulin für 6h, 10h und 24h behandelt. Danach wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA Expressionslevel von G6Pc und PCK1 mittels RT-qPCR gemessen.

3.2.1 Phosphoenolpyruvat Carboxykinase 1 (PCK1) Expression

In den Abbildungen 9 und 10 sind die mRNA Level der PCK1 von den Behandlungsgruppen bezogen auf die Kontrollgruppe abgebildet. Die Kontrollgruppe wird in den Abbildungen auf der Y-Achse bei dem Wert 1 als strichlierte Linie angezeigt. Zur statistischen Analyse wurde ein Einstichproben t-Test angewandt. Die einzelnen Messwerte können dem Anhang entnommen werden.

In Abbildung 9 sind die mRNA Expressionslevel der PCK1 im 2D Modell dargestellt. Bei HepG2 Zellen fand nach 10h Insulinbehandlung die stärkste Reduktion der PCK1 Expression statt. Große Standardabweichungen der

Behandlungsgruppe mit 0,1nM Insulinkonzentration verhinderte eine statistische Signifikanz. Die Behandlungsgruppe mit 2,0nM Insulinkonzentration zeigte mit einem p-Wert von 0.0451 eine statistisch signifikante Reduktion der PCK1 Expression. Die Analysen nach 6h und 24h Insulinbehandlung zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Bei HCC-1.2 Zellen unterschieden sich die PCK1 mRNA-Level der Behandlungsgruppen kaum von der Kontrollgruppe. Dementsprechend ergaben auch die statistischen Analysen mit dem Einstichproben t-Test keine Signifikanzen.

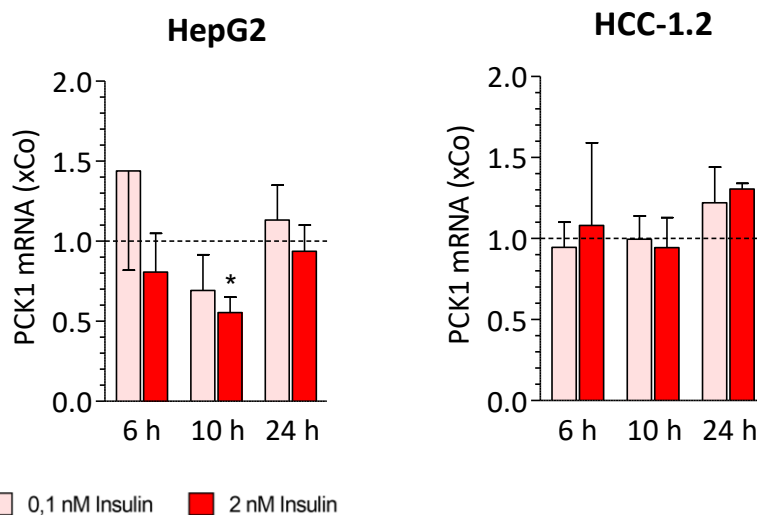


Abbildung 9 : Expression der PCK1 in den Zelllinien HepG2 und HCC-1.2.

24h nach Aussaat wurden die Zellen auf Serum-freies Medium umgestellt und nach weiteren 48h für 6h, 10h und 24h mit einer Konzentration von 0,1 nM oder 2,0 nM Insulin behandelt. Die mRNA Level der PCK1 wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit dem Housekeeping Gene $\beta 2$ Mikroglobulin normiert und als x control dargestellt. Die unbehandelte Kontrollgruppe wird in den Abbildungen auf der Y-Achse bei dem Wert 1 als strichlierte Linie angezeigt. Es sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 unabhängigen Zellproduktionen dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde der Einstichproben t-Test angewendet: (*) $p > 0,05$. Die einzelnen Messwerte können dem Anhang entnommen werden.

In Abbildung 10 sind die mRNA Level der PCK1 im 3D Modell dargestellt. Das Expressionsmuster der PCK1 bei Spheroide unterschied sich deutlich vom Expressionsmuster unter Standardkulturbedingungen.

Bei HepG2 Zellen zeigten die mit 2,0nM Insulinkonzentration behandelten Spheroiden durchgehend eine verstärkte Expression der PCK1 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei einer Insulinkonzentration von 0,1nM wurde hingegen eine teilweise starke Suppression der PCK1 Expression beobachtet. Nach 24h

Behandlung mit 0.1nM Insulinkonzentration fand die stärkste Reduktion der PCK1 Expression statt. Eine große Standardabweichung verhinderte eine statistische Signifikanz mit dem Einstichproben t-Test.

HCC-1.2 Spheroide zeigten nach 10h Behandlung mit 1,0 und 2,0nM Insulinkonzentration die stärkste Suppression der PCK1 Expression. Eine große Standardabweichung der Werte von mit 0,1nM Insulinkonzentration behandelten Spheroide verhindert eine statistische Signifikanz. In der 2,0nM Insulingruppe gab es eine statistisch signifikante Reduktion der PCK1 Expression mit einem p-Wert von 0.0135. Die Analysen nach 6h und 24h Insulinbehandlung zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe bei teilweise sehr großen Standardabweichungen.

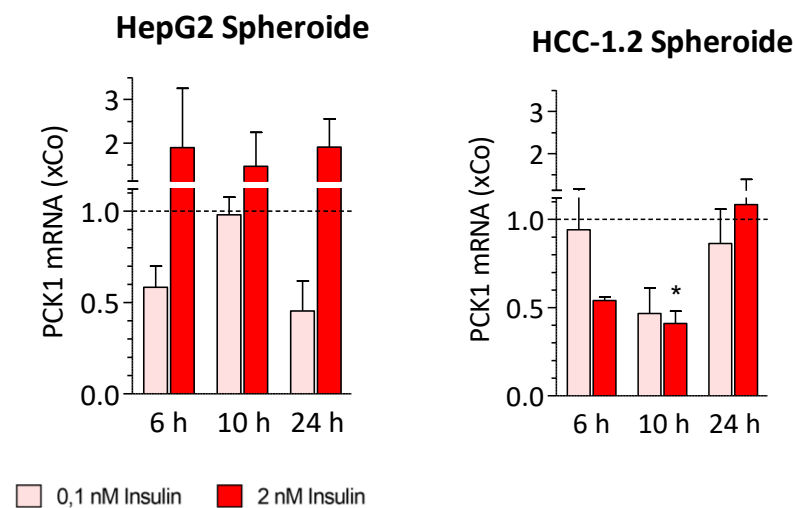


Abbildung 10: Expression der PCK1 bei Spheroide der Zelllinien HepG2 und HCC-1.2.

24h nach Aussaat wurden die Zellen auf Serum-freies Medium umgestellt und nach weiteren 48h für 6h, 10h und 24h mit einer Konzentration von 0,1 nM oder 2,0 nM Insulin behandelt. Die mRNA Level der PCK1 wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit dem Housekeeping Gene $\beta 2$ Mikroglobulin normiert und als x control dargestellt. Die unbehandelte Kontrollgruppe wird in den Abbildungen auf der Y-Achse bei dem Wert 1 als strichlierte Linie angezeigt. Es sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 unabhängigen Zellproduktionen dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde der Einstichproben t-Test angewendet: (*) $p > 0,05$. Die einzelnen Messwerte können dem Anhang entnommen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der in der Literatur beschriebene Effekt von Insulin auf die Expression von PCK1 teilweise bestätigt wurde.

3.2.2 Glukose-6-Phosphatase (G6Pc) Expression

In den Abbildungen 11 und 12 sind die mRNA Level der G6Pc abgebildet. Auch hier wurden die Behandlungsgruppen auf die Kontrollgruppe bezogen dargestellt

und zur statistischen Analyse ein Einstichproben t-Test angewandt. Die genauen Datenwerte können dem Anhang entnommen werden.

In Abbildung 11 sind die mRNA Level der G6Pc unter Standardkulturbedingungen in 2D dargestellt. Bei HepG2 Zellen zeigte die 2,0nM Insulingruppe zu jedem Zeitpunkt eine Reduktion der G6Pc Expression, die 0,1nM Insulingruppe hingegen eine Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die stärkste Reduktion der G6Pc Expression fand nach 10h und bei 2,0nM Insulin statt. Der Einstichproben t-Test ergab mit einem p-Wert von 0,0067 eine statistische Signifikanz zu diesem Zeitpunkt. Nach 6h mit 2,0nM Insulin verhinderte eine große Standardabweichung eine statistische Signifikanz. Die Analysen aller anderen Behandlungsgruppen und Erntezeitpunkte zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Bei HCC-1.2 Zellen variierte die Suppression der G6Pc Expression unter den beiden Insulinbehandlungen, sodass keine Aussage über eine effektivere Insulinkonzentration getroffen werden kann. Zum 6h Erntezeitpunkt bei 0,1nM Insulinkonzentration konnte mit einer sehr kleinen Standardabweichung eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0236 unter Anwendung des Einstichproben t-Tests berechnet werden. Allerdings wurde die kleine Standardabweichung nur nach Elimination eines stark abweichenden Messwertes erreicht. Die Analysen der anderen Insulinbehandlungsgruppen zeigten aufgrund hoher Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe.

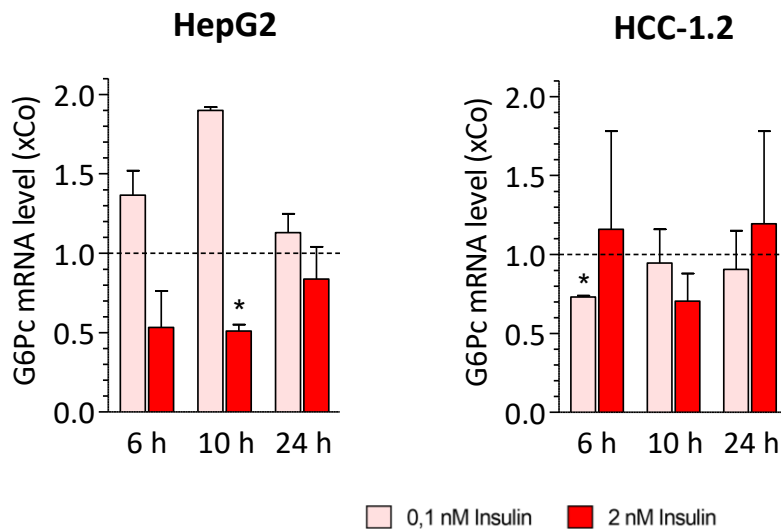


Abbildung 11: Expression der G6Pc in den Zelllinien HepG2 und HCC-1.2.

24h nach Aussaat wurden die Zellen auf Serum-freies Medium umgestellt und nach weiteren 48h für 6h, 10h und 24h mit einer Konzentration von 0,1 nM oder 2,0 nM Insulin behandelt. Die mRNA Level der G6Pc wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit dem Housekeeping Gene $\beta 2$ Mikroglobulin normiert und als x control dargestellt. Die unbehandelte Kontrollgruppe wird in den Abbildungen auf der Y-Achse bei dem Wert 1 als strichlierte Linie angezeigt. Es sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 unabhängigen Zellproduktionen dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde der Einstichproben t-Test angewendet: (*) $p > 0,05$. Die einzelnen Messwerte können dem Anhang entnommen werden.

In Abbildung 12 sind die mRNA Level der G6Pc von HepG2 und HCC-1.2 Spheroiden dargestellt.

Sowohl bei HepG2, als auch bei HCC-1.2 Spheroiden unterschieden sich die mRNA Expressionslevel von G6Pc der Insulin- Behandlungsgruppen nicht stark von der Kontrollgruppe. Dementsprechend ergaben die statistischen Analysen mit dem t-Test keine Signifikanzen.

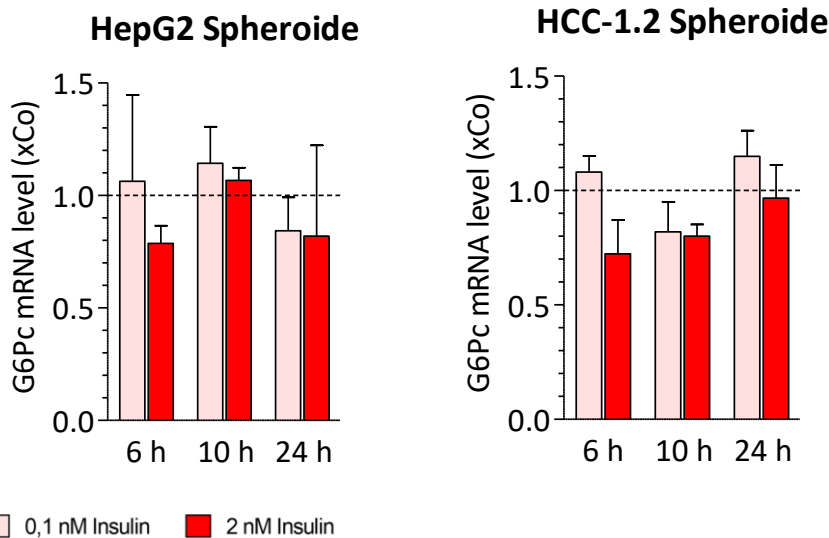


Abbildung 12 : Expression der G6Pc in Spheroiden der Zelllinien HepG2 und HCC-1.2. 24h nach Aussaat wurden die Zellen auf Serum-freies Medium umgestellt und nach weiteren 48h für 6h, 10h und 24h mit einer Konzentration von 0,1 nM oder 2,0 nM Insulin behandelt. Die mRNA Level der G6Pc wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit dem Housekeeping Gene $\beta 2$ Mikroglobulin normiert und als x control dargestellt. Die unbehandelte Kontrollgruppe wird in den Abbildungen auf der Y-Achse bei dem Wert 1 als strichlierte Linie angezeigt. Es sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 unabhängigen Zellproduktionen dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde der Einstichproben t-Test angewendet: (*) $p > 0,05$. Die einzelnen Messwerte können dem Anhang entnommen werden.

3.2.3 Schlussfolgerung

Die mRNA Expressionlevel von PCK1 und G6Pc werden von Insulin in Hepatozyten unterdrückt. Anhand dieser Enzyme konnte in den gewählten Zellkulturmodellen ein Ansprechen auf Insulin teilweise nachgewiesen werden, da eine Reduktion der Genexpression in einigen Fällen statistisch signifikant vorhanden war.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob durch Insulin eine verringerte Apoptose und/oder eine erhöhte Steigerung der Zellteilung in den Zellkulturmodellen nachgewiesen werden kann.

3.3 Part III. Proliferationsfördernde Effekte des Insulins

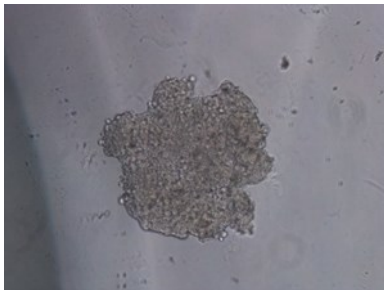
Die Experimente zur Analyse möglicher proliferationsfördernder Effekte des Insulins wurden nur anhand des 3D Modells durchgeführt, da das 2D Modell bereits von Ardita Ferizi mit HCC-1.2 Zellen durchgeführt wurde und von Tobias Morgenbesser mit HepG2 Zellen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden HCC-1.2 und HepG2-Spheroiden im 3D Modell erzeugt und mit Konzentrationen von 0,1nM und 2,0nM Insulin behandelt.

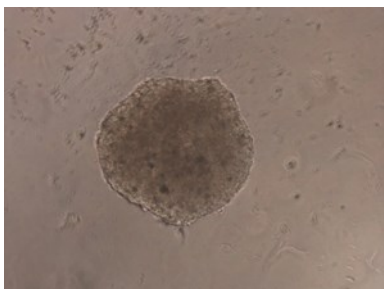
In regelmäßigen zeitlichen Abständen wurden Fotos von den Spheroiden gemacht und die Flächen der Spheroiden auf den Fotos mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ermittelt. Die absoluten Werte der Behandlungsgruppen wurden mit den Werten der Kontrollgruppe normiert. Die relativen Veränderungen der Spheroidgrößen sind in Abbildung 14 und 16 dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Einstichproben-t-Test berechnet. Die genauen Daten zum t-Test können dem Anhang entnommen werden.

3.3.1 Wachstum der Spheroiden aus HepG2 Zellen unter Insulin

Bei einer Konzentration von 0,1nM Insulin und 5%MC wurde das Wachstum und die Stabilität der HepG2 Spheroiden bis zum 19. Tag erhalten



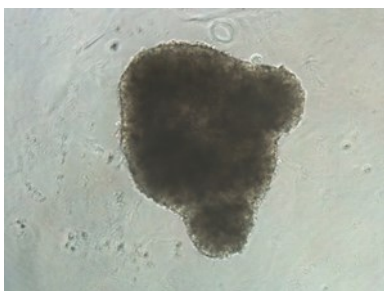
1. Tag: Zellen nutzen MC als Adhäsionshilfe und bilden eine Einheit; Zellverbund sieht locker aus, der Rand ist ausgefranst und nicht rund.



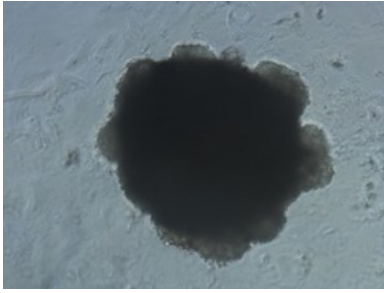
4. Tag: Spheroid erscheint vor allem im Zentrum kompakter, da dunkler; am Rand noch leicht durchscheinend, aber durchaus rund mit glatter Oberfläche.



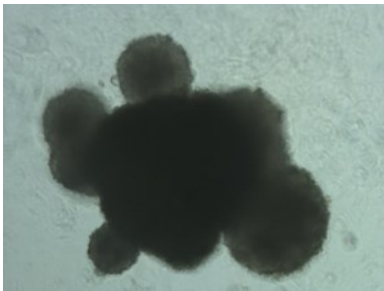
9. Tag: Spheroid sieht eindeutig größer und kompakter/dunkel aus, weitestgehend flache Oberfläche und maximal rund.



12. Tag: erste unregelmäßig verteilte Auswüchse erscheinen auf dem vormals runden Spheroid; Spheroidoberfläche nimmt somit zu.



16. Tag: Auswüchse auf der Oberfläche und Wachstum nehmen weiter zu; Auswüchse sind ähnlich dem ersten Zellverbund leicht semitransparent; die Oberfläche des Spheroids verliert an Ebenheit.



19. Tag: Auswüchse werden im Wachstum dominant, ursprüngliches Spheroid wird überwuchert und schwerer erkennbar.

Abbildung 13: Fotografische Dokumentation eines HepG2 Spheroids

Insulinbehandlung bei einer Konzentration von 2,0nM von Tag 1-19

In der Abbildung 14 ist die Wachstumskurve der HepG2 Spheroide dargestellt. Die mit 2,0nM Insulinkonzentration behandelten Spheroide wiesen ein deutlich stärkeres Wachstum als die Kontrollgruppe auf. Die mit 0,1nM Insulinkonzentration behandelten Spheroide hingegen blieben im Durchschnitt im Größenwachstum eher unbeeinflusst und am Tag 9 sank die Spheroidgröße sogar unter den Wert der Kontrollgruppe. Von Tag 4-9 ist in der Graphik aufgrund der stagnierender Spheroidgröße der mit 2,0nM Insulinkonzentration behandelten Spheroide ein Plateau zu erkennen. Erst nach Tag 9 kam es bei der mit 2,0nM Insulinkonzentration behandelten Spheroide zu einem weiteren verstärkten Wachstumsschub. Den Höhepunkt der Spheroidgröße erreichte die 2,0nM Insulingruppe am 14. Tag, allerdings mit großer Standardabweichung. Daher war unter Anwendung des Einstichproben t-Tests keine statistische Signifikanz vorhanden (siehe Anhang 8.1).

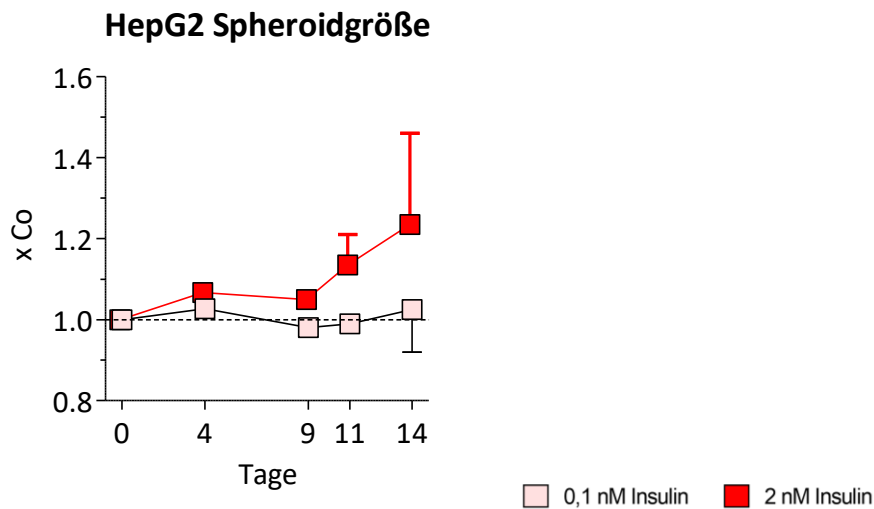
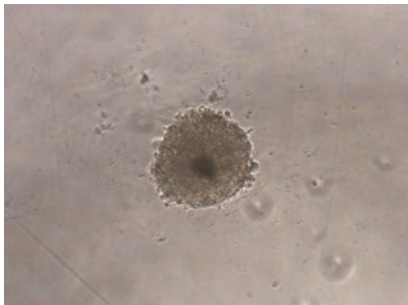


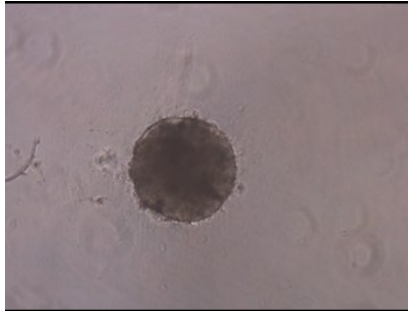
Abbildung 14: Einfluss von Insulin auf das Wachstum von Spheroiden aus HepG2 Zellen.
 HepG2 Spheroide wurden 24h unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend mit einer Konzentration von 0,1nM oder 2,0nM Insulin behandelt. Ab der Insulinbehandlung wurden die Spheroide in regelmäßigen zeitlichen Abständen fotografiert und über das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ die Fläche der Spheroide ermittelt. Die Werte sind x – Control dargestellt. Die Kontrollgruppe ist bei 1.0 der y-Achse liniert dargestellt. Die absoluten Werte der Behandlungsgruppen wurden mit den Werten der Kontrollgruppe normiert, daher sind die relativen Veränderungen der Spheroidgrößen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Einstichproben-t-Test berechnet. Die genauen Daten zum t-Test können dem Anhang entnommen werden. n=3

3.3.2 Wachstum der Spheroide aus HCC-1.2 Zellen unter Insulin

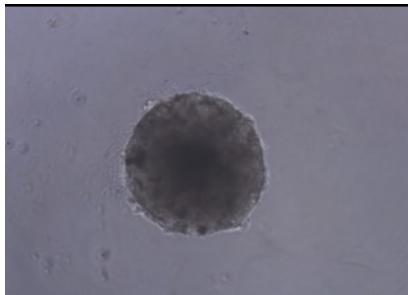
In der Abbildung 15 ist die Entwicklung eines HCC-1.2 Spheroids unter Insulin Behandlung zu sehen. Bei einer Konzentration von 0,1nM Insulin und 5% MC wurde das Wachstum und die Stabilität der HCC-1.2 Spheroide bis zum 14. Tag erhalten.



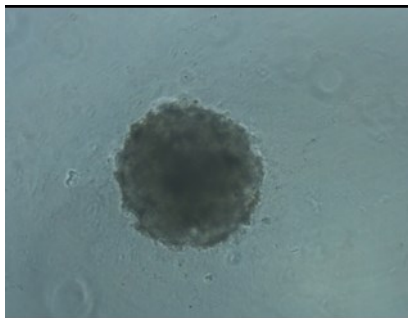
2. Tag: Spheroid ist am Rand durchscheinend, im Zentrum kompakter, da dunkle Schattierungen vorhanden sind. Die Oberfläche des Spheroids ist ausgefranst, aber bereits rund. Insulin wird zugesetzt.



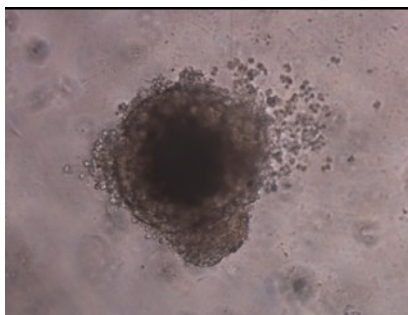
4. Tag: Spheroid ist ein wenig größer und deutlich kompakter/dunkler; die Oberfläche ist flach und maximal rund.



8. Tag: Spheroid ist deutlich größer; Kompaktheit und Dunkelheit des Spheroids scheint gleichgeblieben zu sein; die Oberfläche bleibt flach und rund.



11. Tag: die Oberfläche des Spheroids ist nicht mehr flach, sondern franst aus; ein genaues Umranden des Spheroids zur Ermittlung der Spheroidfläche wird aufgrund der unscharfen Begrenzung der Oberfläche zunehmend problematisch. Die Spheroidgröße nimmt ab.



14. Tag: die Oberfläche des Spheroids ist stark ausgefranst; ein genaues Umranden des Spheroids ist kaum möglich.

*Abbildung 15: Fotografische Dokumentation eines HCC-1.2 Spheroids
Insulinbehandlung mit einer Konzentration von 2,0nM von Tag 2-14*

In der Abbildung 16 ist die Wachstumskurve der HCC-1.2 Spheroide dargestellt. Unter 2,0nM Insulinkonzentration fand das stärkste Wachstum der HCC-1.2 Spheroide statt. Aufgrund der Standardabweichung konnte allerdings unter Anwendung des Einstichproben t-Tests keine statistische Signifikanz berechnet werden, trotz des offensichtlich verstärkten Wachstums an Tag 8, siehe Abbildung 16. Die Spheroidfläche der 0,1nM Insulinkonzentration behandelten Spheroide sank teilweise unter die der Kontrollgruppe und schien unbeeinflusst von der Behandlung.

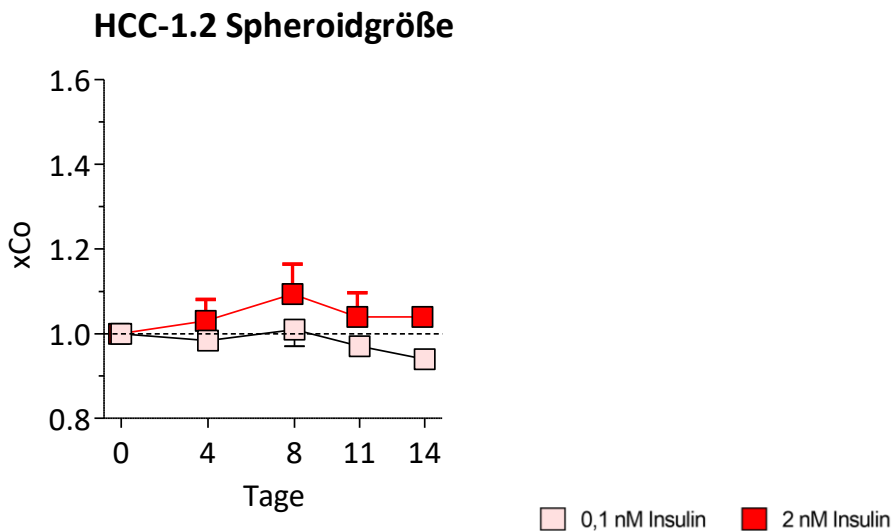


Abbildung 16: Einfluss von Insulin auf das Wachstum von Spheroiden aus HCC-1.2 Zellen.
HCC-1.2 Spheroide wurden 24h unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend mit einer Konzentration von 0,1nM oder 2,0nM Insulin behandelt. Ab der Insulinbehandlung wurden die Spheroide in regelmäßigen zeitlichen Abständen fotografiert und über das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ die Fläche der Spheroide ermittelt. Die Werte sind x – Control dargestellt. Die Kontrollgruppe ist bei 1.0 der y-Achse liniert dargestellt. Die absoluten Werte der Behandlungsgruppen wurden mit den Werten der Kontrollgruppe normiert, daher sind die relativen Veränderungen der Spheroidgrößen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Einstichproben-t-Test berechnet. Die genauen Daten zum t-Test können dem Anhang entnommen werden. n=3

3.4 Part IV. Anti-apoptotische Effekte des Insulins

Die Experimente zur Analyse möglicher anti- apoptotischer Effekte des Insulins wurden nur im 2D Modell durchgeführt.

In Voruntersuchungen zeigte sich eine sehr geringe spontane Apoptose- Rate in unbehandelten Kulturen, die durch Insulin allein kaum beeinflussbar erschienen. Daher wurde vor und während der Insulinbehandlung auf Serum-freie Bedingungen umgestellt, um die Zellen durch das Aushungern zu aktivieren. Zusätzlich wurde mit Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) ein starker pro-apoptotischer Stimulus gesetzt. Es wurde untersucht, ob Insulin diesen pro-apoptotischen Effekt von TGF- β 1 entgegenwirken kann.

Im 2D Modell wurde in Vortests die Apoptose zunächst mit verschiedenen TGF- β 1 Konzentrationen unterschiedlich stark induziert und schließlich eine optimale Konzentration von 30ng/mL TGF- β 1 bestimmt. Neben der TGF- β 1 Behandlung wurden die Zellen mit einer Konzentration von 0,1nM oder 2,0nM Insulin behandelt, um zu untersuchen ob Insulin anti- apoptotische Effekte aufweist. Nach Fixierung und Färbung der Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst, wurde

die Apoptose Inzidenz unter dem Lichtmikroskop mit dem Fluoreszenzfilter für DAPI ausgezählt. Folgende Versuchsgruppen waren bei der Auswertung besonders aussagekräftig: Kontrollgruppe (RPMI), RPMI + 30ng/mL TGF- β 1, RPMI + 30ng/mL TGF- β 1 + 0,1nM Insulinkonzentration (siehe Abbildung 18 und 19). Die ermittelten Apoptose Inzidenzen wurden einem Zweistichproben t-Test unterzogen und werden im Folgenden beschrieben.

3.4.1 Anti-apoptotische Effekte des Insulins in HepG2 Zellen

Das 2D Modell zur Analyse der anti-apoptotischen Effekte des Insulins erwies sich aufgrund der spezifischen Eigenschaften der HepG2 Zelllinie als besondere Herausforderung.

Ziel des Experiments war es, die Zahl der Apoptose Ereignisse nach der Behandlung mit TGF- β 1 und Insulin zu bestimmen. Das ist nur bei einer gleichmäßigen und eher dünnen Aussaat von Zellen möglich. HepG2 Zellen bilden Nester und liegen oft übereinander, anstatt einen Monolayer zu bilden. Die Zellen wurden daher unmittelbar vor dem Aussäen durch das Aufziehen in einer Nadel vereinzelt. Doch wenige Tage später und während der Insulin Behandlung begannen HepG2 Zellen wieder Nester zu bilden, bei denen eine Auswertung erheblich erschwert wurde. Eine zusätzliche Schwierigkeit war der kleine Durchmesser der HepG2 Zellen, die das Auszählen bei sehr geringer Zelldichte ebenfalls erschwerte. Es wurden daher verschiedene Zellzahlen ausgetestet und schließlich die Kulturen nach einer Aussaat von 2×10^5 Zellen pro Petrischale ausgewertet.

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben wurde zur Auswertung des Prozentsatzes an apoptotischen Zellkernen die DNA mit Hoechst gefärbt und apoptotische Kerne pro 1000 ausgewerteter Kerne unter dem Mikroskop ausgezählt. Sämtliche Apoptoseformen, die noch DNA enthielten, konnten mittels Hoechst Färbung ermittelt werden. Eine Detektion von Frühformen der Apoptose war an der Kernmembran aufgrund der Kondensationen der DNA erkennbar. Spätere Formen der Apoptose waren aufgrund der Fragmentierung der Zellkerne sichtbar. Die Fragmentierung konnte entweder bei noch intaktem Zytoplasma oder in Form eines apoptotischen Körperchens, als sogenannte „apoptotic bodies“, erkennbar sein, siehe Abbildung 17. Noch spätere Apoptoseformen waren nur mehr als Zellreste ohne DNA kaum zu erkennen und konnten daher

nicht

erfasst

werden.

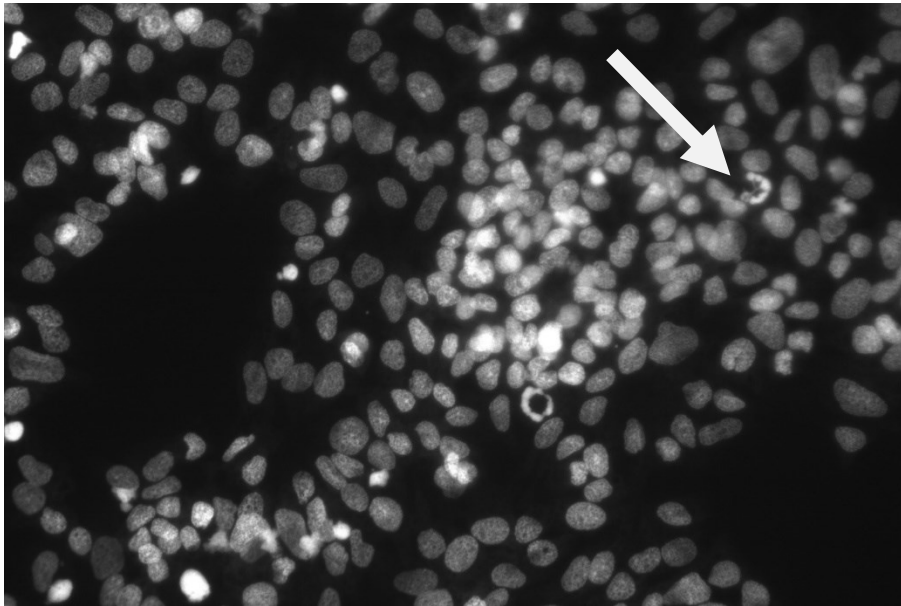


Abbildung 17: DNA in den Zellkernen fluoresziert
Mit Hilfe des DAPI Filters und unter entsprechender UV-Anregung fluoresziert die DNA unter dem Lichtmikroskop aufgrund der DNA Färbung mit Hoechst. Die apoptotischen Kerne wurden identifiziert und der Anteil der apoptotischen Kerne pro 1000 unveränderter Zellkerne ermittelt.

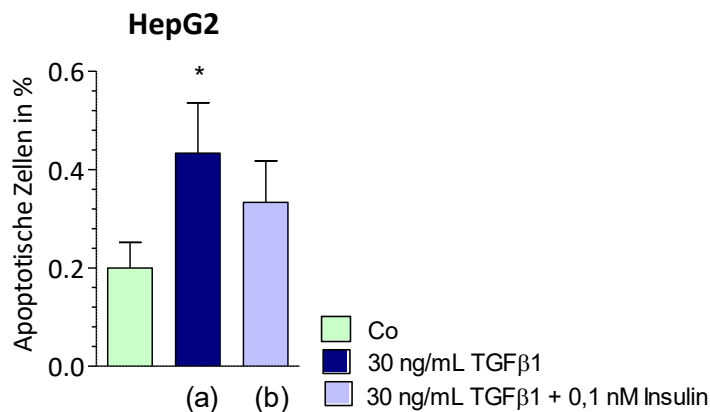


Abbildung 18: Effekt von Insulin auf HepG2 Zellen unter TGF-β1 induzierte Apoptose.
HepG2 Zellen wurden 24h unter Standardkulturbedingungen gehalten und anschließend für 48h auf Serum-freies Medium umgestellt. Danach erhielten die Behandlungsgruppen für 24h 30ng/ml TGF-β1 bzw. 30ng/ml TGF-β1+0,1nM Insulinkonzentration bzw. 30ng/ml TGF-β1+2,0nM Insulinkonzentration. Die Zellen wurden mit Formalin fixiert und die DNA in den Zellkernen mit Hoechst gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop und mit Hilfe des Fluoreszenzfilters DAPI wurde der Anteil sämtlicher apoptotischer Ereignisse ausgezählt. Der Prozentsatz dieser apoptotischen Ereignisse wurde pro 1000 ausgewerteter Zellkerne berechnet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde der Zweistichproben t-Test angewandt: (*) $p=0,0345$: statistisch signifikanter Unterschied ($p<0,05$) zwischen Kontrollgruppe Co vs 30ng/ml TGF-β1(*)

Unter Anwendung des Zweistichproben t-Tests wurde zwischen der Kontrollgruppe und der 30ng/ml TGF-β1 Gruppe (*) ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0345 ($p<0,05$) festgestellt. Zwischen den

Gruppen TGF- β 1 und TGF- β 1+0,1nM Insulinkonzentration war kein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden, teilweise aufgrund der großen Standardabweichung. Eine schwache Reduktion der Apoptose Inzidenz unter Insulin kann an der Graphik erkannt werden. Die genauen Daten des t-Tests können dem Anhang entnommen werden.

3.4.2 Anti-apoptotische Effekte des Insulins in HCC-1.2 Zellen

Die Schwierigkeiten der HepG2 Zelllinie bei der Durchführung des Hoechst Experiments waren bei der HCC-1.2 Zelllinie nicht gegeben. Daher musste die Zellsuspension vor dem Aussäen nicht durch eine Nadel gezogen und vereinzelt werden. Die richtige Zellzahl zu Beginn des Experiments hatte bereits Martin Felber der Arbeitsgruppe ermittelt und wurde mit 2×10^5 Zellen pro Well fortgesetzt.

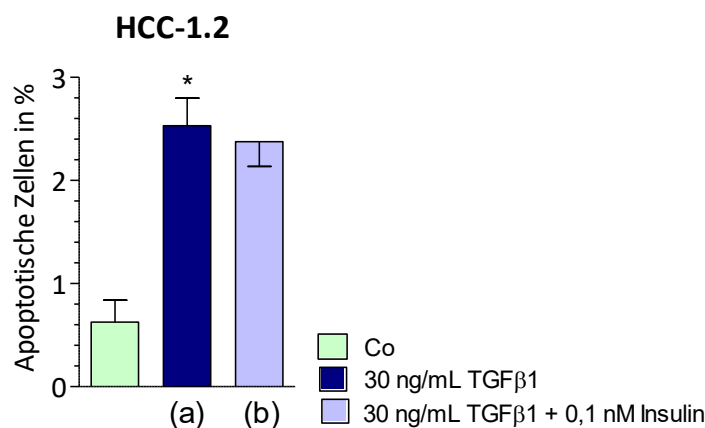


Abbildung 19: Effekt von Insulin auf HCC-1.2 Zellen unter TGF- β 1 induzierte Apoptose.

HCC-1.2 Zellen wurden 24h unter Standardkulturbedingungen gehalten und anschließend für 48h auf Serum-reduziertes Medium umgestellt. Danach erhielten die Behandlungsgruppen für 24h 30ng/ml TGF- β 1 bzw. 30ng/ml TGF- β 1+0,1nM Insulinkonzentration bzw. 30ng/ml TGF- β 1+2,0nM Insulinkonzentration. Die Zellen wurden mit Formalin fixiert und die DNA in den Zellkernen mit Hoechst gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop und mit Hilfe des Fluoreszenzfilters DAPI wurde der Anteil sämtlicher apoptotischer Ereignisse ausgezählt. Der Prozentsatz dieser apoptotischen Ereignisse wurde pro 1000 ausgewerteter Zellkerne berechnet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde der Zweistichproben t-Test angewandt: (*) $p=0,0315$: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Kontrollgruppe Co vs 30ng/ml TGF- β 1(*)

Unter Anwendung des Zweistichproben t-Tests konnte zwischen der Kontrollgruppe Co und der TGF- β 1 Gruppe (*) ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0315 ($p < 0,05$) festgestellt werden. Zwischen den Gruppen TGF- β 1 und TGF- β 1+0,1nM Insulin lag kein statistisch

signifikanter Unterschied vor. Die genauen Daten des t-Tests können dem Anhang entnommen werden.

3.4.3 Effekte des Insulins auf die Zellproliferation in Spheroïden

In 2D Modellen wurde die Zellproliferation unter Insulin- Zugabe bereits von Ardita Ferizi ausgearbeitet. Die Zellproliferation in HepG2 und HCC-1.2- Spheroïden wurde im Rahmen dieser Arbeit mit EdU (5-ethinyl-2`-deoxyuridin) untersucht. EdU ist ein Farbstoff, der sich während der Zellteilung statt Thymidin in die DNA einbaut und mittels einer Farbreaktion zum Fluoreszieren angeregt werden kann. Somit ist es möglich die Zellen zu detektieren, in denen sich die DNA gerade repliziert.

Dafür wurden Spheroïde in Behandlungsgruppen mit bzw. ohne Insulin gehalten und mit EdU angereichert. Die Spheroïde wurden mit Formalin bzw. Carnoy Lösung fixiert und Histoschnitte angefertigt. Die Spheroïdquerschnitte sollten für eine mikroskopische Bestimmung der Inzidenzen von sich replizierenden Zellkernen dienen. Allerdings ist die Zellproliferation im Spheroïdquerschnitt nicht gleichmäßig verteilt, sondern an der Spheroïdoberfläche verstärkt und im Spheroïdkern platzbedingt reduziert. Da die Schnitte der Spheroïde in verschiedenen Ebenen erfolgte, wurde bei einem Schnitt der Polkappe eine verstärkte Proliferation ausgezählt. Wenn das Spheroïd am maximalen Durchmesser angeschnitten wurde, wurde eine reduzierte Proliferation im Zentrum dokumentiert. Dies verfälschte die Werte bei der Quantifizierung der sich teilenden Zellkerne und eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Gruppen war nicht möglich. Daher wurde von einer weiteren Auswertung Abstand genommen.

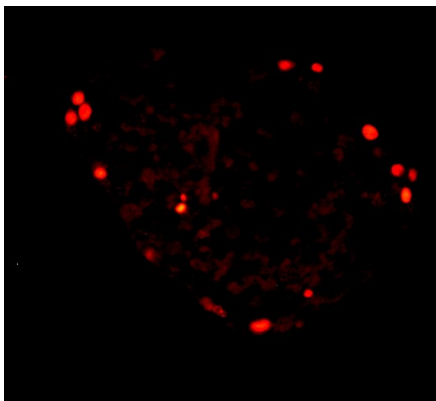


Abbildung 20: Zellproliferation in Spheroïden aus HepG2 Zellen. Die Spheroïde wurden in verschiedenen Behandlungsgruppen gehalten und mit EdU versetzt. Replizierende Zellkerne sind rot dargestellt und befinden sich vermehrt an der Spheroïdoberfläche.

3.4.4 Schlussfolgerung

Der anti-apoptotische und proliferationsfördernde Effekt des Insulins war in geringem Ausmaß, aber nicht statistisch signifikant erkennbar. Der anti-apoptotische Effekt wurde eher bei der niedrigeren Insulinkonzentration von 0,1nM im 2D Modell dokumentiert, während der proliferationsfördernde Effekt bei beiden Zelllinien bei der höheren Insulinkonzentration von 2,0nM im 3D Modell zu erkennen war.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle des Insulins als möglichen Tumorpromotor während der Tumorprogression des hepatozellulären Karzinoms zu untersuchen und ein geeignetes 3D Zellkulturmodell zur Untersuchung dieser Fragestellung zu generieren.

Herkömmliche in vitro Modelle mit Hepatozyten, den Leberparenchymzellen, bestehen in der Regel aus 2D Zellkulturmodellen. Es gibt allerdings Beobachtungen darüber, dass Hepatozyten im 2D Modell rasch dedifferenzieren und leberspezifische Funktionen verlieren. Grund dafür sind, unter anderem, die unter 2D Bedingungen veränderten Zell-Zell- und Zell-Matrix- Interaktionen [31]. Daher ist die Entwicklung eines 3D Modells für aussagekräftige Experimente naheliegend.

In dieser Arbeit konnte anhand eines neu entwickelten 3D Zellkulturmodells dokumentiert werden, dass Insulin einen leichten proliferationsfördernden Effekt auf HepG2 und HCC-1.2 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe hat.

Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Patienten mit einem erhöhten Insulinspiegel, zum Beispiel mit Diabetes mellitus Typ2 oder dem Metabolischen Syndrom, ein erhöhtes Risiko haben, Leberkrebsvorstufen zu entwickeln.

Im Folgenden wird die Wirkung von Insulin in der Hepatokarzinogenese in 2D und 3D Leberzellkulturen vergleichend beschrieben.

4.1 Spheroide als 3D Modell des hepatozellulären Karzinoms

Es gibt verschiedene Ansätze, um ein realitätsnahes Leberzellmodell und ein mikrophysiologisches System zu schaffen. Sie ermöglichen erweiterte hepatische Studien zu Arzneistoff Metabolismus / Toxizität und Lebererkrankungen. Beispiele für Leberzellmodelle sind heterozelluläre Mischungen von parenchymalen und nonparenchymalen Zelltypen in 2D Kokulturen (zum Beispiel selbstaggregierende hepatische Kokultur Modelle), Mikrofluidsysteme (zum Beispiel Chip-basierte Lebersysteme) und 3D Modelle, wie Spheroide, die in dieser Arbeit beschrieben werden [32]. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Etablierung eines 3D Modells des hepatozellulären Karzinoms. Die Herausforderung lag dabei einerseits in der Herstellung langlebiger, stabiler Spheroide, die für Experimente herangezogen werden

können. Andererseits galt es als Hürde die Ergebnisse der Experimente mit Spheroïden richtig zu erfassen.

Spheroïde lassen sich mittels verschiedener Techniken herstellen, zum Beispiel mit Hilfe von Bioreaktoren, mittels hanging drop Methode oder, indem die Zellkultur auf nicht haftenden Oberflächen gehalten wird. [33] Letztere wurde in dieser Arbeit angewendet. Lauschke et al. konnte bei über Bioreaktoren hergestellte Spheroïde funktionale Gallenwege und eine Albuminsynthese in den Hepatozyten feststellen. Allerdings stellen Spheroïde, die in Bioreaktoren hergestellt sind, eine Herausforderung in Hinblick auf eine reproduzierbare Spheroïdgröße dar, was Analysen erschwert. Bei der hanging drop Methode erreicht man reproduzierbare Spheroïdgrößen, indem man kleine Mediumtropfen mit definierter Zellzahlkonzentration auf den Zellkulturdeckel pipettiert und diesen auf der Zellkulturschale umdreht. Die Zellen aggregieren über die Schwerkraft zu Spheroïden. Es gibt Berichte von veränderter Expression von Phase I (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4) und Phase II Enzymen (GSTA1, UGT2B7) im Vergleich zu isolierten Leberzellen. [33] Zusätzlich erschweren nicht veröffentlichte Mediumkomponenten die Interpretation von Ergebnissen.

Auch Spheroïde, die wie in dieser Arbeit beschrieben, auf nicht haftenden Oberflächen hergestellt werden, stellen eine Herausforderung dar. Da sich der Großteil der Zellen im Inneren des Spheroïds befinden, auf die mikroskopisch keine direkte Einsicht möglich ist, ist eine laufende Beurteilung des Zustands der Zellen während einer mehrtägigen Behandlung nicht möglich. Auch kann nicht mit Sicherheit bestätigt werden, ob bei einer Behandlung nur die äußeren Zellen des Spheroïds behandelt werden oder, ob das Spheroïd in seinem Zellverband so locker aufgebaut ist, dass auch Zellen im Inneren von einer Behandlung betroffen sind.

Das Erreichen sämtlicher Zellen mit einer Behandlung ist wesentlich, da dies den physiologischen Bedingungen des hepatozellulären Karzinom am Nächsten kommt.

4.2 Methylcellulose im 3D Modell

Nach dem Experimentieren mit verschiedenen MC-Konzentrationen wurde festgestellt, dass eine zu hohe Konzentration das Wachstum der Spheroïde

einschränkte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den Experimenten die minimal notwendige MC Konzentration eingesetzt und dies als beste Voraussetzung für eine maximale Lebensdauer der Spheroiden beobachtet.

Eine Hypothese zu den Beobachtungen in den Experimenten ist, dass es bei hohen MC Konzentrationen zur Einlagerung der MC im Spheroid kam und diese mit der Nährstoffversorgung aufgrund von Diffusionsstörungen negativ interferiert hat. Das Spheroid wurde zunächst im Spheroidkern, schließlich auch an äußeren Schichten nekrotisch. Andererseits könnte auch die Methylzellulose selbst störend und daher nekrotisierend wirken. Dies ist noch zu erforschen.

4.3 Eignung des Modells für die Fragestellung

Durch Etablierung eines 3D Modells sollten die Forschungen mit Insulin und seinen Effekten in der Hepatokarzinogenese an Bedeutung gewinnen. Besonders in Hinsicht auf die Polarität der Hepatozyten war dies sinnvoll (siehe Kapitel 1.3.4).

Nachdem es gelang, langlebige, stabile und reproduzierbare Spheroiden zu bilden, konnten wir sehen, dass Insulin ähnliche Effekte auf die mRNA Expressionslevel der Enzyme Glukose-6-Phosphatase (G6Pc) und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase-1 (PCK1) und auf das Wachstumsverhalten in HCC-1.2 Zellen und HepG2 Zellen sowohl im 2D, als auch im 3D Modell hatte (siehe Kapitel 3.2 und 3.3). Für die in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung stellte sich das 3D Modell daher als geeignet heraus.

Trotzdem bleibt es weiterhin notwendig, die Spheroiden in ihrer Ausrichtung, ihrer Zelldichte innerhalb des Spheroids und ihrer Ansprechbarkeit auf Behandlungen zu untersuchen. Der Zustand, der sich im Spheroidkern befindlichen Zellen, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, die noch erforscht werden muss, um das Modell vollständig zu verstehen und seine Vorteile ausnutzen zu können bzw. Nachteile möglichst zu vermeiden. Um das Verhalten von Hepatozyten im 3D Modell optimal simulieren zu können, könnte in der Weiterentwicklung des Modells eine endotheliale Zelllinie zugegeben werden. Mit Hilfe der endothelialen Zelllinie könnten Interaktionen in der richtigen 3D Konfiguration mit Bindegewebszellen ermöglicht werden.

4.4 Proliferationsfördernde Effekte unter Insulin in Spheroïden

Um die Rolle von Insulin als möglichen Tumorwachstumsfaktor zu untersuchen, wurden humane Zelllinien mit unterschiedlicher Malignität verwendet. Bei HepG2-Spheroïden konnte unter Insulinzugabe ein deutlich stärkeres Wachstum der gemessenen Spheroïdflächen als bei HCC-1.2-Spheroïden beobachtet werden. Die Ursache für die unterschiedliche Wachstumssteigerungen könnte im Zusammenhang mit der jeweiligen Malignität der Zelllinien stehen. HCC-1.2 Zellen sind weniger aggressiv und weisen daher eine geringere Wachstumssteigerung unter dem Einfluss von Insulin auf, als die malignere HepG2 Zelllinie. Diese Hypothese gilt es noch mit Daten zu verifizieren, da nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass die Dichte der Zellen in den Spheroïden zwischen den Zelllinien variiert. Daher ist die Spheroïdfläche zum Vergleich der beiden Zelllinien kein zuverlässiger Parameter. Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte EdU Experiment konnte für die Beantwortung dieser Fragestellung nicht ausreichend Daten liefern.

Chettouh et al. fasste den Zusammenhang von Hyperinsulinämie bzw. Insulinresistenz und HCC anhand klinischer und epidemiologischer Daten, sowie Untersuchungen an humanen und Tierzellmodellen zusammen. Er kam zu dem Schluss, dass zwischen der Insulinresistenz und der kompensatorisch darauffolgenden Hyperinsulinämie und chronischen Lebererkrankungen eine Verbindung bestehen muss [12]. Seine Untersuchungen wurden allerdings mit deutlich höheren Insulinkonzentrationen als in dieser Arbeit ausgeführt. Die Insulinkonzentration in der Leber ist durch die direkte Nähe zur Bauchspeicheldrüse hoch, eine genaue Konzentration ist allerdings nicht bekannt.

In naher Zukunft werden in unserer Arbeitsgruppe Experimente mit differenzierten HepaRG, die Eigenschaften von adulten Hepatozyten aufweisen, und mit undifferenzierten HepaRG mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften und einer deutlich gesteigerten Zellproliferation durchgeführt. Diese differenzierten bzw. undifferenzierten Zellen dienen als Modell für unveränderte humane Hepatozyten bzw. für präneoplastische Hepatozyten, den frühesten Stadien der Hepatokarzinogenese. Dabei soll die Behandlung mit verschiedenen Insulinkonzentrationen Aufschluss über den Effekt des Hormons auf Zellproliferation, Apoptose und Genexpression geben. Dies könnte das

Verständnis der Wirkung des Hormons während der Tumorpromotion verbessern und eine Ergänzung bieten zu der vorliegenden Arbeit, die mittels Hepatom-Hepatokarzinom-Zelllinien die Hormonwirkung auf weiter fortgeschrittene Stadien der Hepatokarzinogenese untersucht.

5 Zusammenfassung

5.1 Einleitung

Weltweit zählt das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zu den fünf häufigsten Krebserkrankungen mit steigender Inzidenz. Um die Entstehung eines HCC zu verhindern, ist ein Verständnis für die Pathogenese dieser Erkrankung notwendig. Gesichert ist die Tatsache, dass vor allem Patienten, die an einem metabolischen Syndrom, Adipositas, und/oder Hyperinsulinämie leiden, ein erhöhtes Risiko aufweisen an einem HCC zu erkranken. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle des Insulins als möglichen Tumorpromoter während der Hepatokarzinogenese anhand eines neuen 3D Zellkulturmodells zu untersuchen.

5.2 Methoden

Die Hepatomzelllinie HepG2 und die Hepatokarzinomzelllinie HCC-1.2 wurden unter Standardkulturbedingungen in 2D Kulturen gehalten bzw. verwendet, um Spheroiden für 3D Kulturen zu erzeugen. In diesen Modellen wurden die Zelllinien mit Konzentrationen von 0,1nM oder 2,0nM Insulin behandelt. mRNA Expressionslevel von Glukose-6-Phosphatase (G6Pc) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1 (PCK1) wurden mittels RT-qPCR bestimmt. Der proliferationsfördernde Effekt des Insulins wurde im 3D Modell über die Ausmessung der Spheroidfläche mit einem Bildbearbeitungsprogramm überprüft. 2D Kulturen wurden mit 30ng TGF- β 1/ml Medium versetzt, um Apoptose auszulösen. Apoptotische Kerne wurden mittels Hoechst-Färbung dargestellt und der Prozentsatz unter Fluoreszenzmikroskopie pro 1000 ausgewerteter Kerne erfasst.

5.3 Ergebnisse

Die Expression von G6Pc und PCK1 war durch Insulin sowohl im 2D als auch 3D Modell tlw. signifikant unterdrückt, was auf ein Ansprechen der Zellen auf Insulin unter beiden Bedingungen hinweist. Bei der Zelllinie HepG2 war der proliferationsfördernde Effekt bei einer Insulinkonzentration von 2,0nM am deutlichsten erkennbar, allerdings aufgrund der großen Standardabweichung nicht statistisch signifikant. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob Insulin eine durch TGF- β 1 ausgelöste Apoptose-Aktivität unterdrücken kann und daher als „Überlebensfaktor“ wirkt. Der anti-apoptotische Effekt wurde bei der niedrigeren

Insulinkonzentration von 0,1nM im 2D Modell dokumentiert, allerdings nicht mit statistischer Signifikanz.

Die Ergebnisse zeigen die Eignung der Spheroide als 3D Modell für die Untersuchung der möglichen tumorpromovierenden Effekte des Insulins, da (i) eine Insulin Sensitivität der Zelllinien HCC-1.2 und HepG2 an Hand einer typischen „Insulin-Signatur“ auf mRNA-Ebene erkennbar war und (ii) eine leicht proliferationssteigernde Wirkung von Insulin beobachtet werden konnte.

5.4 Konklusion

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Insulin seine typischen metabolischen Effekte, eine leichte wachstumssteigernde Wirkung und schwach anti-apoptotische Effekte im 2D als auch 3D Modell zeigt. Diese Beobachtungen zeigen die Eignung des 3D Modells, die Rolle von Insulin als möglichen Tumorpromotor in der Hepatokarzinogenese zu untersuchen.

6 Abstract

6.1 Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the five most common cancer entities worldwide showing an increasing incidence. In order to prevent the outbreak of HCC, it is necessary to understand the pathogenesis of this malignancy. It is well known, that patients with a metabolic syndrome, obesity and/or hyperinsulinemia, are at an elevated risk to develop HCC. The aim of this thesis is to elucidate the role of insulin as a putative tumour promotor during hepatocarcinogenesis using a new 3D cell culture model.

6.2 Methods

The hepatoma cell line HepG2 and the hepatocarcinoma cell line HCC-1.2 were kept under normal 2D cell culture conditions and were used to generate spheroids for 3D models. Both models were incubated with 0,1nM or 2,0nM insulin. mRNA expression levels of glukose-6-ghosphatase (G6Pc) and phosphoenolpyruvat carboxykinase-1 (PCK1) were measured via RT-qPCR. The effect of insulin on cell proliferation was investigated in 3D models by measuring spheroids sizes using an image-analysis program. In order to induce apoptosis, 2D cell culture models were incubated with 30ng TGF- β 1/ml. The percentage of apoptotic cell nuclei per 1000 unaffected nuclei was determined in Hoechst stained cultures using fluorescence microscopy.

6.3 Results

In 2D as well as in 3D cell culture models, the expression of G6Pc and PCK1 was reduced, in some cases with statistically significance. This fact revealed clearly the reactivity of the cells towards insulin under both conditions. An elevated cell proliferation was more visible in HepG2 cells at an insulin concentration of 2,0nM, although without a statistical significance because of a high standard deviation. The next step was to investigate, if insulin suppresses apoptosis and therefore acts as a survival factor, when cells are incubated with TGF- β 1. The anti-apoptotic effect was more visible at lower insulin levels (0,1nM) in 2D models, but without statistical significance.

The results show that spheroids are a suitable 3D model for the investigation of insulin as putative tumour promotor, i.e., firstly (i), the reactivity of the cell lines HCC-1.2 and HepG2 towards insulin could be proven by a typical "insulin-

signature" in mRNA expression and secondly (ii) an elevated cell proliferation in experiments with insulin was found.

6.4 Conclusion

The present work provides evidence, that insulin induces typical metabolic effects, promotes proliferation and suppresses apoptosis in 2D as well as in 3D cell culture models. These observations show that our 3D model is suitable for investigating the role of insulin as putative tumour promoter during hepatocarcinogenesis.

7 Quellenverzeichnis

7.1 Literaturverzeichnis

1. WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. 2018.
2. Schmidt, R.L., F.; Heckmann, M., *Physiologie des Menschen, Seite 813-817*; 31. Auflage, 2010.
3. Müller-Esterl, *Biochemie, Seite 397-407, 553-562*; 2011.
4. Schulte-Hermann, R., et al., *Concepts of cell death and application to carcinogenesis*. Toxicol Pathol, 1997. 25(1): p. 89-93.
5. Oberhammer, F.A., et al., *Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(12): p. 5408-12.
6. Dooley, S. and P. ten Dijke, *TGF-beta in progression of liver disease*. Cell Tissue Res, 2012. 347(1): p. 245-56.
7. Cain, K. and C. Freathy, *Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome*. Toxicol Lett, 2001. 120(1-3): p. 307-15.
8. Baumgartner, G., *Mehr-Stufen-Modell der Karzinogenese*. 2010.
9. Bruix, J. and J.M. Llovet, *Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2003. 39 Suppl 1: p. S59-63.
10. Kufe, D., Ollock, R. Eichselbaum, R., Bast, R., Gansler, T. Holland, J. and Frei, E., *Cancer Medicine. 6th Edition. BC Decker.*; Seite 17; 2003.
11. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
12. Chettouh, H., et al., *Hyperinsulinaemia and insulin signalling in the pathogenesis and the clinical course of hepatocellular carcinoma*. Liver Int, 2015. 35(10): p. 2203-17.
13. Djiogue, S., et al., *Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs*. Endocr Relat Cancer, 2013. 20(1): p. R1-R17.
14. Hagstrom, H., P. Tynelius, and F. Rasmussen, *High BMI in late adolescence predicts future severe liver disease and hepatocellular carcinoma: a national, population-based cohort study in 1.2 million men*. Gut, 2018. 67(8): p. 1536-1542.
15. El-Serag, H.B., T. Tran, and J.E. Everhart, *Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. 126(2): p. 460-8.
16. Shanik, M.H., et al., *Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?* Diabetes Care, 2008. 31 Suppl 2: p. S262-8.
17. Kim, S.H. and G.M. Reaven, *Insulin resistance and hyperinsulinemia: you can't have one without the other*. Diabetes Care, 2008. 31(7): p. 1433-8.
18. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. 378(6559): p. 785-9.
19. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. 414(6865): p. 799-806.
20. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. Compr Physiol, 2014. 4(1): p. 177-97.
21. D., R., *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, 1999.
22. Wernig C., e.a., „*Glucose: A growth stimulator for early cancer prestages in rat liver*. 2017.
23. Hay, N., *Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?* Nat Rev Cancer, 2016. 16(10): p. 635-49.

24. Parzefall, W., et al., *Effects of insulin, glucagon and triiodothyronine on DNA synthesis in rat hepatocyte primary cultures induced by liver tumour promoters and EGF*. *Toxicol In Vitro*, 1996. 10(2): p. 183-93.
25. Forsthuber M., e.a., *Insulin enhances DNA-Synthesis in preneoplastic rat hepatocytes in primary culture*. 2017.
26. Gaughhofer, C., et al., *Fibroblast growth factor receptor 4: a putative key driver for the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2014. 35(10): p. 2331-8.
27. *Cellosaurus HCC-1.2 (CVCL_0C53)*. 2015; Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0C53.
28. Donato, M.T., L. Tolosa, and M.J. Gomez-Lechon, *Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells*. *Methods Mol Biol*, 2015. 1250: p. 77-93.
29. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. *J Invest Dermatol*, 1992. 99(6): p. 683-90.
30. https://de.wikipedia.org/wiki/Hoechst_33342.
31. Borenstein J., T.V., Tao S., Charest J., *Microfluidic Cell Culture Systems*. Elsevier. 2018. Seite 159-161.
32. Godoy, P., et al., *Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME*. *Arch Toxicol*, 2013. 87(8): p. 1315-530.
33. Lauschke, V.M., et al., *3D Primary Hepatocyte Culture Systems for Analyses of Liver Diseases, Drug Metabolism, and Toxicity: Emerging Culture Paradigms and Applications*. *Biotechnol J*, 2019. 14(7): p. e1800347.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

8 Anhang

8.1 Statistische Analysen

8.1.1 Einstichproben t-Test

8.1.1.1 Expressionslevel von PCK1 im 2D Modell mit HepG2 Zellen

Insulinbehandlungsdauer	6h	6h	10h	10h	24h	24h
Insulinkonzentration	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM
Number of values	2	3	3	3	3	3
Minimum	0,8200	0,4000	0,2500	0,3600	0,8500	0,6500
25% Percentile	0,8200	0,4000	0,2500	0,3600	0,8500	0,6500
Median	1,440	0,7800	0,8800	0,6200	0,9900	0,9400
75% Percentile	2,060	1,240	0,9500	0,6800	1,560	1,220
Maximum	2,060	1,240	0,9500	0,6800	1,560	1,220
Mean	1,440	0,8067	0,6933	0,5533	1,133	0,9367
Std. Deviation	0,8768	0,4206	0,3855	0,1701	0,3761	0,2850
Std. Error	0,6200	0,2429	0,2226	0,09821	0,2171	0,1646
Lower 95% CI of mean	-6,438	-0,2382	-0,2644	0,1308	0,1991	0,2287
Upper 95% CI of mean	9,318	1,852	1,651	0,9759	2,068	1,645
One sample t test						
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	1,440	0,8067	0,6933	0,5533	1,133	0,9367
Discrepancy	-0,4400	0,1933	0,3067	0,4467	-0,1333	0,06333
95% CI of discrepancy	-7.438 to 8.318	-1.238 to 0.8517	-1.264 to 0.6511	-0.8692 to -0.02409	-0.8010 to 1.068	-0.7714 to 0.6447
t, df	t=0.7097 df=1	t=0.7961 df=2	t=1.378 df=2	t=4.548 df=2	t=0.6141 df=2	t=0.3849 df=2
P value (two tailed)	0,6071	0,5095	0,3022	0,0451	0,6017	0,7374
Significant (alpha=0.05)?	No	No	No	Yes	No	No
Sum	2,880	2,420	2,080	1,660	3,400	2,810

8.1.1.2 Expressionslevel von PCK1 im 2D Modell mit HCC-1.2 Zellen

Insulinbehandlungsdauer	6h	6h	10h	10h	24h	24h
Insulinkonzentration	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM
Number of values	3	3	3	3	3	3
Minimum	0,7900	0,5700	0,5900	0,4900	1,000	0,7800
25% Percentile	0,7900	0,5700	0,5900	0,4900	1,000	0,7800
Median	1,100	1,590	0,8500	0,7600	1,180	1,270
75% Percentile	2,340	2,780	1,140	1,130	1,440	1,340
Maximum	2,340	2,780	1,140	1,130	1,440	1,340
Mean	1,410	1,647	0,8600	0,7933	1,207	1,130
Std. Deviation	0,8202	1,106	0,2751	0,3213	0,2212	0,3051
Std. Error	0,4735	0,6386	0,1589	0,1855	0,1277	0,1762
Lower 95% CI of mean	-0,6274	-1,101	0,1765	-0,004815	0,6572	0,3720
Upper 95% CI of mean	3,447	4,394	1,543	1,591	1,756	1,888
One sample t test						
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	1,410	1,647	0,8600	0,7933	1,207	1,130
Discrepancy	-0,4100	-0,6467	0,1400	0,2067	-0,2067	-0,1300
95% CI of discrepancy	-1.628 to 2.448	-2.101 to 3.395	-0.8235 to 0.5435	-1.005 to 0.5915	-0.3429 to 0.7562	-0.6280 to 0.8880
t, df	t=0.8658 df=2	t=1.013 df=2	t=0.8813 df=2	t=1.114 df=2	t=1.618 df=2	t=0.7380 df=2
P value (two tailed)	0,4779	0,4178	0,4711	0,3812	0,2470	0,5374
Significant (alpha=0.05)?	No	No	No	No	No	No
Sum	4,230	4,940	2,580	2,380	3,620	3,390

8.1.1.3 Expressionslevel von PCK1 im 3D Modell mit HepG2 Zellen

Insulinbehandlungsdauer	6h	6h	10h	10h	24h	24h
Insulinkonzentration	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM
Number of values	3	3	3	3	3	3
Minimum	0,3800	0,5200	0,7900	0,6600	0,1300	0,6400
25% Percentile	0,3800	0,5200	0,7900	0,6600	0,1300	0,6400
Median	0,5900	0,5600	1,050	0,7400	0,5700	2,340
75% Percentile	0,7800	4,610	1,100	3,020	0,6600	2,750
Maximum	0,7800	4,610	1,100	3,020	0,6600	2,750
Mean	0,5833	1,897	0,9800	1,473	0,4533	1,910
Std. Deviation	0,2001	2,350	0,1664	1,340	0,2836	1,119
Std. Error	0,1155	1,357	0,09609	0,7737	0,1637	0,6459
Lower 95% CI of mean	0,08630	-3,941	0,5666	-1,856	-0,2512	-0,8692
Upper 95% CI of mean	1,080	7,734	1,393	4,802	1,158	4,689
One sample t test						
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	0,5833	1,897	0,9800	1,473	0,4533	1,910
Discrepancy	0,4167	-0,8967	0,02000	-0,4733	0,5467	-0,9100
95% CI of discrepancy	-0.9137 to 0.08041	-4.941 to 6.735	-0.4335 to 0.3935	-2.856 to 3.802	-1.251 to 0.1579	-1.869 to 3.689
t, df	t=3.607 df=2	t=0.6609 df=2	t=0.2081 df=2	t=0.6118 df=2	t=3.339 df=2	t=1.409 df=2
P value (two tailed)	0,0690	0,5766	0,8544	0,6030	0,0792	0,2942
Significant (alpha=0.05)?	No	No	No	No	No	No
Sum	1,750	5,690	2,940	4,420	1,360	5,730

8.1.1.4 Expressionslevel von PCK1 im 3D Modell mit HCC-1.2 Zellen

Insulinbehandlungsdauer	6h	6h	10h	10h	24h	24h
Insulinkonzentration	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM
Number of values	3	3	3	3	3	3
Minimum	0,5600	0,5200	0,2000	0,2900	0,5500	0,5500
25% Percentile	0,5600	0,5200	0,2000	0,2900	0,5500	0,5500
Median	0,9100	0,5600	0,5100	0,4100	0,8200	1,070
75% Percentile	1,350	1,790	0,6900	0,5300	1,220	1,630
Maximum	1,350	1,790	0,6900	0,5300	1,220	1,630
Mean	0,9400	0,9567	0,4667	0,4100	0,8633	1,083
Std. Deviation	0,3959	0,7220	0,2479	0,1200	0,3371	0,5401
Std. Error	0,2285	0,4168	0,1431	0,06928	0,1946	0,3118
Lower 95% CI of mean	-0,04335	-0,8368	-0,1490	0,1119	0,02595	-0,2584
Upper 95% CI of mean	1,923	2,750	1,082	0,7081	1,701	2,425
One sample t test						
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	0,9400	0,9567	0,4667	0,4100	0,8633	1,083
Discrepancy	0,0600	0,04333	0,5333	0,5900	0,1367	-0,08333
95% CI of discrepancy	-1.043 to 0.9234	-1.837 to 1.750	-1.149 to 0.08243	-0.8881 to -0.2919	-0.9741 to 0.7008	-1.259 to 1.425
t, df	t=0.2625 df=2	t=0.1040 df=2	t=3.727 df=2	t=8.516 df=2	t=0.7022 df=2	t=0.2672 df=2
P value (two tailed)	0,8175	0,9267	0,0650	0,0135	0,5553	0,8143
Significant (alpha=0.05)?	No	No	No	Yes	No	No
Sum	2,820	2,870	1,400	1,230	2,590	3,250

8.1.1.5 Expressionslevel von G6Pc im 2D Modell mit HepG2 Zellen

Insulinbehandlungsdauer	6h	6h	10h	10h	24h	24h
Insulinkonzentration	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM
Number of values	2	3	2	3	3	3

Minimum	1,210	0,2800	1,880	0,4600	0,9300	0,5500
25% Percentile	1,210	0,2800	1,880	0,4600	0,9300	0,5500
Median	1,365	0,3300	1,900	0,4800	1,120	0,7300
75% Percentile	1,520	0,9900	1,920	0,5900	1,340	1,230
Maximum	1,520	0,9900	1,920	0,5900	1,340	1,230
Mean	1,365	0,5333	1,900	0,5100	1,130	0,8367
Std. Deviation	0,2192	0,3963	0,02828	0,07000	0,2052	0,3523
Std. Error	0,1550	0,2288	0,02000	0,04041	0,1185	0,2034
Lower 95% CI of mean	-0,6045	-0,4511	1,646	0,3361	0,6203	-0,03856
Upper 95% CI of mean	3,334	1,518	2,154	0,6839	1,640	1,712
One sample t test						
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	1,365	0,5333	1,900	0,5100	1,130	0,8367
Discrepancy	-0,3650	0,4667	-0,9000	0,4900	-0,1300	0,1633
95% CI of discrepancy	-1.604 to 2.334	-1.451 to 0.5178	0.6459 to 1.154	-0.6639 to -0.3161	-0.3797 to 0.6397	-1.039 to 0.7120
t, df	t=2.355 df=1	t=2.040 df=2	t=45.00 df=1	t=12.12 df=2	t=1.097 df=2	t=0.8030 df=2
P value (two tailed)	0,2557	0,1782	0,0141	0,0067	0,3869	0,5063
Significant (alpha=0.05)?	No	No	Yes	Yes	No	No
Sum	2,730	1,600	3,800	1,530	3,390	2,510

8.1.1.6 Expressionslevel von G6Pc im 2D Modell mit HCC-1.2 Zellen

Insulinbehandlungsdauer	6h	6h	10h	10h	24h	24h
Insulinkonzentration	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM
Number of values	2	3	3	3	4	3
Minimum	0,7200	0,4800	0,7300	0,5300	0,6600	0,4500
25% Percentile	0,7200	0,4800	0,7300	0,5300	0,6700	0,4500
Median	0,7300	0,5400	0,8200	0,5900	0,9250	0,6100
75% Percentile	0,7400	1,780	1,160	0,8800	1,600	1,780
Maximum	0,7400	1,780	1,160	0,8800	1,750	1,780
Mean	0,7300	0,9333	0,9033	0,6667	1,065	0,9467
Std. Deviation	0,01414	0,7338	0,2268	0,1872	0,5078	0,7261
Std. Error	0,01000	0,4237	0,1309	0,1081	0,2539	0,4192
Lower 95% CI of mean	0,6029	-0,8896	0,3400	0,2017	0,2569	-0,8571
Upper 95% CI of mean	0,8571	2,756	1,467	1,132	1,873	2,750
One sample t test						
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	0,7300	0,9333	0,9033	0,6667	1,065	0,9467
Discrepancy	0,2700	0,06667	0,09667	0,3333	-0,06500	0,05333
95% CI of discrepancy	-0.3971 to -0.1429	-1.890 to 1.756	-0.6601 to 0.4668	-0.7983 to 0.1317	-0.7430 to 0.8730	-1.857 to 1.751
t, df	t=27.00 df=1	t=0.1573 df=2	t=0.7383 df=2	t=3.085 df=2	t=0.2560 df=3	t=0.1272 df=2
P value (two tailed)	0,0236	0,8894	0,5372	0,0910	0,8145	0,9104
Significant (alpha=0.05)?	Yes	No	No	No	No	No
Sum	1,460	2,800	2,710	2,000	4,260	2,840

8.1.1.7 Expressionslevel von G6Pc im 3D Modell mit HepG2 Zellen

Insulinbehandlungsdauer	6h	6h	10h	10h	24h	24h
Insulinkonzentration	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM	0,1 nM	2 nM

Number of values	3	3	3	3	3	3
Minimum	0,6400	0,6400	0,9200	0,9600	0,5500	0,0900
25% Percentile	0,6400	0,6400	0,9200	0,9600	0,5500	0,0900
Median	0,7200	0,8100	1,050	1,090	0,9500	0,8900
75% Percentile	1,830	0,9100	1,460	1,150	1,030	1,480
Maximum	1,830	0,9100	1,460	1,150	1,030	1,480
Mean	1,063	0,7867	1,143	1,067	0,8433	0,8200
Std. Deviation	0,6652	0,1365	0,2818	0,09713	0,2572	0,6976
Std. Error	0,3840	0,07881	0,1627	0,05608	0,1485	0,4028
Lower 95% CI of mean	-0,5890	0,4476	0,4432	0,8254	0,2045	-0,9130
Upper 95% CI of mean	2,716	1,126	1,843	1,308	1,482	2,553
One sample t test						
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	1,063	0,7867	1,143	1,067	0,8433	0,8200
Discrepancy	-0,06333	0,2133	-0,1433	-0,06667	0,1567	0,1800
95% CI of discrepancy	-1.589 to 1.716	-0.5525 to 0.1258	-0.5569 to 0.8435	-0.1746 to 0.3080	-0.7955 to 0.4822	-1.913 to 1.553
t, df	t=0.1649 df=2	t=2.707 df=2	t=0.8809 df=2	t=1.189 df=2	t=1.055 df=2	t=0.4469 df=2
P value (two tailed)	0,8842	0,1137	0,4713	0,3565	0,4020	0,6987
Significant (alpha=0.05)?	No	No	No	No	No	No
Sum	3,190	2,360	3,430	3,200	2,530	2,460

8.1.1.8 Expressionslevel von G6Pc im 3D Modell mit HCC-1.2 Zellen

Insulinbehandlungsdauer	6h		10h		24h		24h	
Insulinkonzentration	0,1 nM		0,1 nM		2 nM		2 nM	
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3
Minimum	1,010	0,4700	0,6100	0,7300	0,9300	0,7300	0,9300	0,7300
25% Percentile	1,010	0,4700	0,6100	0,7300	0,9300	0,9300	0,9300	0,7300
Median	1,010	0,7200	0,7900	0,7700	1,220	1,220	1,220	0,9400
75% Percentile	1,220	0,9800	1,060	0,9000	1,300	1,300	1,300	1,230
Maximum	1,220	0,9800	1,060	0,9000	1,300	1,300	1,300	1,230
Mean	1,080	0,7233	0,8200	0,8000	1,150	1,150	1,150	0,9667
Std. Deviation	0,1212	0,2550	0,2265	0,08888	0,1947	0,1947	0,1947	0,2511
Std. Error	0,07000	0,1472	0,1308	0,05132	0,1124	0,1124	0,1124	0,1450
Lower 95% CI of mean	0,7788	0,08984	0,2574	0,5792	0,6664	0,6664	0,6664	0,3430
Upper 95% CI of mean	1,381	1,357	1,383	1,021	1,634	1,634	1,634	1,590
One sample t test								
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	1,080	0,7233	0,8200	0,8000	1,150	1,150	1,150	0,9667
Discrepancy	-0,08000	0,2767	0,1800	0,2000	-0,1500	-0,1500	-0,1500	0,03333
95% CI of discrepancy	-0.2212 to 0.3812	-0.9102 to 0.3569	-0.7427 to 0.3827	-0.4208 to 0.02081	-0.3336 to 0.6336	-0.3336 to 0.6336	-0.3336 to 0.6336	-0.6571 to 0.5904
t, df	t=1.143 df=2	t=1.879 df=2	t=1.376 df=2	t=3.897 df=2	t=1.335 df=2	t=1.335 df=2	t=1.335 df=2	t=0.2300 df=2
P value (two tailed)	0,3715	0,2010	0,3025	0,0600	0,3137	0,3137	0,3137	0,8395
Significant (alpha=0.05)?	No	No	No	No	No	No	No	No
Sum	3,240	2,170	2,460	2,400	3,450	3,450	3,450	2,900

8.1.1.9 Wachstumskurve des 3D Modells von HepG2 Zellen

	0,1nM Insulin	0,1nM Insulin	0,1nM Insulin	0,1nM Insulin	2,0nM Insulin	2,0nM Insulin	2,0nM Insulin	2,0nM Insulin
Days	4,	9,	11,	14,	4,	9,	11,	14,
Number of values	3	2	2	2	3	2	2	2

Minimum	1,000	0,9700	0,9800	0,9200	1,030	1,040	1,060	1,010
25% Percentile	1,000	0,9700	0,9800	0,9200	1,030	1,040	1,060	1,010
Median	1,010	0,9800	0,9900	1,025	1,060	1,050	1,135	1,235
75% Percentile	1,070	0,9900	1,000	1,130	1,110	1,060	1,210	1,460
Maximum	1,070	0,9900	1,000	1,130	1,110	1,060	1,210	1,460
Mean	1,027	0,9800	0,9900	1,025	1,067	1,050	1,135	1,235
Std. Deviation	0,03786	0,01414	0,01414	0,1485	0,04041	0,01414	0,1061	0,3182
Std. Error	0,02186	0,01000	0,01000	0,1050	0,02333	0,01000	0,07500	0,2250
Lower 95% CI of mean	0,9326	0,8529	0,8629	-0,3091	0,9663	0,9229	0,1820	-1,624
Upper 95% CI of mean	1,121	1,107	1,117	2,359	1,167	1,177	2,088	4,094
One sample t test								
Theoretical mean	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Actual mean	1,027	0,9800	0,9900	1,025	1,067	1,050	1,135	1,235
Discrepancy	-0,02667	0,02000	0,01000	-0,02500	-0,06667	-0,05000	-0,1350	-0,2350
95% CI of discrepancy	-0.06739 to 0.1207	-0.1471 to 0.1071	-0.1371 to 0.1171	-1.309 to 1.359	-0.03374 to 0.1671	-0.07706 to 0.1771	-0.8180 to 1.088	-2.624 to 3.094
t, df	t=1.220 df=2	t=2.000 df=1	t=1.000 df=1	t=0.2381 df=1	t=2.857 df=2	t=5.000 df=1	t=1.800 df=1	t=1.044 df=1
P value (two tailed)	0,3468	0,2952	0,5000	0,8512	0,1038	0,1257	0,3228	0,4862
Significant (alpha=0.05)?	No	No	No	No	No	No	No	No
Sum	3,080	1,960	1,980	2,050	3,200	2,100	2,270	2,470

8.1.1.10 Wachstumskurve des 3D Modells von HCC-1.2 Zellen

Day	0,1nM Insulin		0,1nM Insulin		2,0nM Insulin		2,0nM Insulin	
	4,	3	8,	2	4,	3	8,	3
Number of values								
Minimum		0,9500		0,9700		0,9300		0,9900
25% Percentile		0,9500		0,9700		0,9300		0,9900
Median		0,9800		1,010		1,060		1,060
75% Percentile		1,020		1,050		1,100		1,230
Maximum		1,020		1,050		1,100		1,230
Mean		0,9833		1,010		1,030		1,093
Std. Deviation		0,03512		0,05657		0,08888		0,1234
Std. Error		0,02028		0,04000		0,05132		0,07126
Lower 95% CI of mean		0,8961		0,5018		0,8092		0,7867
Upper 95% CI of mean		1,071		1,518		1,251		1,400
One sample t test								
Theoretical mean		1,000		1,000		1,000		1,000
Actual mean		0,9833		1,010		1,030		1,093
Discrepancy		0,01667		-0,01000		-0,03000		-0,09333
95% CI of discrepancy		-0.1039 to 0.07058		-0.4982 to 0.5182		-0.1908 to 0.2508		-0.2133 to 0.4000
t, df		t=0.8220 df=2		t=0.2500 df=1		t=0.5846 df=2		t=1.310 df=2
P value (two tailed)		0,4975		0,8440		0,6180		0,3205
Significant (alpha=0.05)?		No		No		No		No
Sum		2,950		2,020		3,090		3,280

8.1.2 Zweistichproben t-Test

8.1.2.1 Anti-apoptotischer Effekt unter Insulin in HepG2 Zellen

Table Analyzed	ApoHepG2 stat
Column A	Co
vs	vs
Column B	TG
Unpaired t test	
P value	0,0345
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=2.038 df=10
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0.2000 ± 0.05164 N=6
Mean ± SEM of column B	0.4333 ± 0.1022 N=6
Difference between means	-0.2333 ± 0.1145
95% confidence interval	-0.4884 to 0.02178
R square	0,2934
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	3.917, 5, 5
P value	0,1603
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No
Table Analyzed	ApoHepG2 stat
Column B	TG
vs	vs
Column C	TG+I
Unpaired t test	
P value	0,4678
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.7547 df=10
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	0.4333 ± 0.1022 N=6
Mean ± SEM of column C	0.3333 ± 0.08433 N=6
Difference between means	0.1000 ± 0.1325

95% confidence interval	-0.1952 to 0.3952
R square	0,05389
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.469, 5, 5
P value	0,6834
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

8.1.2.2 Anti-apoptotischer Effekt unter Insulin in HCC-1.2 Zellen

<u>Table Analyzed</u>	<u>ApoHCC1/2 stat</u>
<u>Column A</u>	<u>Co</u>
<u>vs</u>	<u>vs</u>
<u>Column B</u>	<u>TG</u>
Unpaired t test	
P value	< 0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.673 df=15
Mean ± SEM of column A	0.9556 ± 0.1097 N=9
Mean ± SEM of column B	2.531 ± 0.2684 N=8
Difference between means	-1.576 ± 0.2778
95% confidence interval	-2.168 to -0.9838
R square	0,6821
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	5.317, 7, 8
P value	0,0315
P value summary	*
Are variances significantly different?	Yes
<u>Table Analyzed</u>	<u>ApoHCC1/2 stat</u>
<u>Column B</u>	<u>TG</u>

vs	vs
Column C	TG+I
Unpaired t test	
P value	0,6725
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.4306 df=16
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	2.531 ± 0.2684 N=8
Mean ± SEM of column C	2.376 ± 0.2406 N=10
Difference between means	0.1553 ± 0.3606
95% confidence interval	-0.6091 to 0.9196
R square	0,01145
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.004, 9, 7
P value	1,0000
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mehr-Stufen-Modell der Karzinogenese.....	7
Abbildung 2: Verschiedenste Risikofaktoren für HCC	10
Abbildung 3: Überblick über Reaktionen und Schlüsselenzyme der Gluconeogenese (rechts) und Glycolyse (links).....	14
Abbildung 4: Schema der Temperaturprogramms der RT-qPCR bei Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffes SYBR GREEN.....	25
Abbildung 5: HCC-1.2-Spheroid bei 20%MC Zugabe	37
Abbildung 6: HepG2 und HMEC Zellen im Ansatzverhältnis 1:1 ohne MC39	
Abbildung 7: HepG2 und HMEC Zellen im Ansatzverhältnis 1:1 mit 5% MC	39
Abbildung 8: HCC-1.2 und HMEC Zellen im Ansatzverhältnis 1:2 mit 10%MC	39
Abbildung 9 : Expression der PCK1 in den Zelllinien HepG2 und HCC-1.2.	41
Abbildung 10: Expression der PCK1 bei Spheroiden der Zelllinien HepG2 und HCC-1.2.	42
Abbildung 11: Expression der G6Pc in den Zelllinien HepG2 und HCC-1.2.	44
Abbildung 12 : Expression der G6Pc in Spheroiden der Zelllinien HepG2 und HCC-1.2.	45
Abbildung 13: Fotografische Dokumentation eines HepG2 Spheroids	47
Abbildung 14: Einfluss von Insulin auf das Wachstum von Spheroiden aus HepG2 Zellen.....	48
Abbildung 15: Fotografische Dokumentation eines HCC-1.2 Spheroids ..	49
Abbildung 16: Einfluss von Insulin auf das Wachstum von Spheroiden aus HCC-1.2 Zellen.	50
Abbildung 17: DNA in den Zellkernen fluoresziert	52
Abbildung 18: Effekt von Insulin auf HepG2 Zellen unter TGF- β 1 induzierte Apoptose.....	52
Abbildung 19: Effekt von Insulin auf HCC-1.2 Zellen unter TGF- β 1 induzierte Apoptose.....	53
Abbildung 20: Zellproliferation in Spheroiden aus HepG2 Zellen.....	54

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Behandlungsgruppen der Zellen für RT-qPCR Experimente ...	22
Tabelle 2: Reverse Transkriptase Mastermix für RT-qPCR Experimente .	23
Tabelle 3: SYBR GREEN Master Mix für RT-qPCR Experimente	24
Tabelle 4: Behandlungsgruppen der Zellen für RT-qPCR Experimente ...	26
Tabelle 5: Zusammensetzung der Carnoy Lösung	31
Tabelle 6: Verwendete Geräte.....	32
Tabelle 7: Verwendete Substanzen	33
Tabelle 8: Verwendete Primer (Homo Sapiens, SYBR GREEN).....	33
Tabelle 9: Verwendete Puffer.....	33
Tabelle 10: Verwendete Medien.....	34
Tabelle 11: Verwendete Lösungen.....	34

11 Danksagung

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich an meine Betreuerin Dr. Bettina Grasl-Kraupp richten, die mich während der 7 Monate im Labor für die Arbeit begeistert hat. Ganz besonders beim Schreiben dieser Arbeit konnte ich mich praktisch, theoretisch und seelisch auf ihre Unterstützung verlassen. Des Weiteren möchte ich mich bei Birgit und Helga bedanken, ohne die ich mir das Labor nicht vorstellen kann, da sie stets für mich da waren, mich anleiteten und mir Mut zusprachen. Zu guter Letzt möchte ich mich für die Unterstützung meiner Familie und das Verständnis und offene Ohr meines Freundes bedanken.