

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Oberleithner -

Charakterisierung des Migrationsverhaltens von
pankreatischen duktalem Adenokarzinomzellen bei
der Comigration mit pankreatischen Sternzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Bruns, Philipp
aus Coesfeld

2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Albrecht Schwab
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Bayram Edemir

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Oberleithner -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Albrecht Schwab
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Bayram Edemir

Zusammenfassung

Charakterisierung des Migrationsverhaltens von pankreatischen duktalem Adenokarzinomzellen bei der Comigration mit pankreatischen Sternzellen

Bruns, Philipp

Pankreatische Sternzellen (PSC) spielen eine tragende Rolle bei der Progression und Invasivität des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC). Zwischen PDAC-Zellen und PSC finden gegenseitige Stimulationsvorgänge statt, die zu einer starken Fibrose des Tumorstromas (Desmoplasie) und höheren Metastasierungsraten führen. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Migrationsverhaltens von PDAC-Zellen bei Comigration mit PSC und der Beteiligung von ausgewählten Rezeptoren, Ionenkanälen und Transportproteinen. Dazu wurden Videomikroskopie von einzelnen Zellen und Zellverbänden, proteinanalytische Methoden und Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration durchgeführt. Es wurde hauptsächlich die PDAC-Zelllinie BxPC3 verwendet.

Eine Steigerung der Zellmigration von vereinzelt BxPC3-Zellen zeigte sich unter Einfluss von EGF (epidermal growth factor), konditioniertem Medium von PSC-Kulturen und durch Inhibitor des $K_{Ca}3.1$ -Kaliumkanals. Eine Verringerung der BxPC3-Motilität ergab sich durch Inhibitor des Na^+/H^+ -Austauschers NHE1. Die An- oder Abwesenheit von PSC führte bei BxPC3-Zellverbänden zu keiner Änderung der Migrationsaktivität, und BxPC3-Zellen waren im umgekehrten Fall nicht zu einer Stimulation des PSC-Verbandes in der Lage, der aber auf EGF positiv reagierte.

Pankreatische Sternzellen sind unter bestimmten Umständen in der Lage die Zellmigration von PDAC-Zellen zu stimulieren, aber es ergeben sich aus den hier dargestellten Ergebnissen neue Fragen und Ansätze für zukünftige Untersuchungen. Weiterhin ist der NHE1 notwendig für die PDAC-Migration. EGF besitzt auf beide Zelltypen einen stimulierenden Effekt.

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2014

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Charakterisierung des Migrationsverhaltens von pankreatischen duktalem Adenokarzinomzellen bei der Comigration mit pankreatischen Sternzellen

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Institut für Physiologie II

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. med. Albrecht Schwab

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum:

Münster, 18.10.2013

Name:

Philipp Bruns

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
1 Abkürzungsverzeichnis	6
2 Einleitung	10
2.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas	10
2.2 Charakterisierung pankreatischer Sternzellen	11
2.3 Zellmigration	13
2.4 Calcium bei der Zellmigration	14
2.5 Der EGF-Rezeptor	15
2.6 Der Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher NHE1	16
2.7 Der K _{Ca} 3.1-Kaliumkanal	16
2.8 Ziel der Arbeit	17
3 Material und Methoden	20
3.1 Zellkultur	20
3.2 Proteinbiochemische Methoden	21
3.2.1 Herstellung von Proteinlysaten	21
3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	21
3.2.3 SDS-Gelelektrophorese für den K _{Ca} 3.1	22
3.2.4 Westernblot	25
3.2.5 Proteindetektion	26
3.3 Einzelzellmigrations-Experimente	26
3.4 Wundheilungsassays	29
3.5 [Ca ²⁺] _i -Messungen	31

INHALTSVERZEICHNIS

3.6	Zelltracking Software „Sabine“	33
3.7	Statistische Methoden und graphische Darstellung	34
4	Ergebnisse	36
4.1	Nachweis des $K_{Ca}3.1$ -Kanals	36
4.2	Ergebnisse der Einzelzellmigrations Experimente	37
4.2.1	Stimulation von BxPC3-Zellen durch EGF und konditioniertes Sternzell-Medium	37
4.2.2	Hemmung der PDAC-Migration durch Inhibition des NHE1	39
4.2.3	Stimulation von BxPC3-Zellen durch Inhibition des $K_{Ca}3.1$ - Kanals	41
4.3	Ergebnisse mit der „Sabine“-Software	44
4.4	Ergebnisse des Wundheilungsassays	45
4.4.1	Effekt der Comigration auf BxPC3-Zellen	46
4.4.2	Effekt der Comigration auf RLT-PSC-Zellen	47
4.4.3	Stimulation von BxPC3- und RLT-PSC-Zellen durch EGF	48
4.4.4	Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals im Wundheilungsassay	49
4.5	Ergebnisse der $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen	51
5	Diskussion	53
5.1	EGF stimuliert Migrationsvorgänge beim PDAC	54
5.2	Der NHE1 ist notwendig für die PDAC Migration	56
5.3	Optimierung der Migrationsvorgänge beim PDAC durch TRAM34	58
5.4	Gegenseitige Stimulation von BxPC3- und RLT-PSC-Zellen?	60
5.5	Eignung der „Sabine“-Software für die Migrationsanalyse	63
6	Ausblick	64
7	Liste verwendeter Chemikalien	66
8	Liste verwendeter Geräte und Software	68
	Literaturverzeichnis	70
	Danksagung	79
	Lebenslauf	80

Abbildungsverzeichnis

1	Schema der PDAC-PSC-Interaktion	12
2	Schema der Zellmigration	14
3	Ziel der Arbeit	18
4	Schema des MagicMark Proteinstandard	23
5	Schema der Gelelektrophorese	24
6	Aufbau des Westernblots	25
7	Schema des Wundheilungsassays	29
8	Auswertung der Wundheilungsassays	30
9	Fluoreszenzemission von Fura-2	32
10	Zelltracking Software „Sabine“	34
11	Nachweis des $K_{Ca}3.1$ -Kanals	36
12	Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen mit EGF und konditioniertem Sternzell-Medium	38
13	Trajektorien von BxPC3-Zellen mit EGF und konditioniertem Sternzell- Medium	38
14	Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen mit HOE642 und HOE642+EGF	40
15	Trajektorien von BxPC3-Zellen mit HOE642 und HOE642+EGF . .	40
16	Translokation und Trajektorien von AsPC1-Zellen ohne und mit HOE642	41
17	Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen mit DMSO und EGF	42
18	Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen mit TRAM34 und EGF	42
19	Trajektorien von BxPC3-Zellen mit DMSO, TRAM34 und EGF . . .	43
20	„Amira“- und „Sabine“-Trajektorien	44
21	Wundmigration von BxPC3-Zellen gegen RLT-PSC-Zellen	46
22	Wundmigration von RLT-PSC-Zellen gegen BxPC3-Zellen	47
23	Wundmigration von BxPC3-Zellen mit EGF	48
24	Wundmigration von RLT-PSC-Zellen mit EGF	49

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

25	Wundmigration von BxPC3-Zellen mit TRAM34	50
26	Wundmigration von RL1-PSC-Zellen mit TRAM34	50
27	Calcium-Messung mit BxPC3-Zellen	52
28	Schema der EGF Wirkung	55
29	Schema der Funktion von NHE1 und EGF	58
30	Schema der Funktion des $K_{Ca}3.1$ -Kanals	60
31	Neuer Ansatz der Comigration	65

Tabellenverzeichnis

1	Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers	21
2	Zusammensetzung des 5 % Sammelgels	23
3	Zusammensetzung des 10 % Trenngels	23
4	Zusammensetzung des Probenpuffers	24
5	Zusammensetzung des Laufpuffers	24
6	Zusammensetzung des Transferpuffers	26
7	Zusammensetzung der Kollagenmatrix	27
8	Testsubstanzen für die Migrationsexperimente	28
9	Lösungen für die Ca ²⁺ -Messung	33
10	Vergleich der „Sabine“-Software mit „Amira“	45

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A	Ampere (Stromstärke)
A	Fläche
α	Alpha
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
β	Beta
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca^{2+}	Calciumion
CaCl_2	Calciumchlorid
CCD	charge-coupled device
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
EGTA	Ethylenglycolbisaminoethylethertetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF2	Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (fibroblast growth factor 2)
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acidic protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonation
Hepes	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HOE642	NHE1 Inhibitor (Cariporid)
HSC	Hepatische Sternzellen (hepatic stellate cells)
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Phosphatidylinositoltrisphosphat
K _{Ca} 3.1	Calcium-aktivierter Kalium-Kanal 3.1
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
λ	Lambda (Wellenlänge)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ms	Millisekunde
mL	Milliliter

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MLCK	myosin light chain kinase
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mol	Mol (Stoffmenge)
μ	Mu
μ L	Mikroliter
μ M	Mikromol
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
ng	Nanogramm
NHE1	Natrium-Protonen-Austauscher 1
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NTR1	Neurotensin-Rezeptor 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS mit 0,05% Tween
PDAC	Duktales Pankreas Adenokarzinom (pancreatic ductal adenocarcinoma)
PDGF	Plättchen Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor)
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PMCA	plasma membrane calcium ATPase
PSC	Pankreas Sternzellen (pancreatic stellate cells)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
raf	rat fibrosarcoma Protein
ras	rat sarcoma Protein
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGF β	transforming growth factor beta
TRAM34	K _{Ca} 3.1 Inhibitor
TRP	transient receptor potential

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

v	Geschwindigkeit
V	Volt (Spannung)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

2

Einleitung

2.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Maligne Tumore der Bauchspeicheldrüse führten 2010 zu 1,8 % (ca. 15000) der Todesfälle in Deutschland, wobei die Tendenz in den letzten Jahren leicht zugenommen hat [69]. Der häufigste Pankreastumor ist mit über 90 % das duktales Adenokarzinom („pancreatic ductal adenocarcinoma“ (PDAC)). Die Diagnose erfolgt oft auf Grund keiner bzw. unspezifischer Symptome erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, sodass in über 85 % der Fälle nur noch eine palliative Therapie statt einer ggf. kurativen Operation möglich ist. Darüber hinaus kommt es früh zur Metastasierung. Bislang fehlt eine effektive Chemo- oder Strahlentherapie, woraus eine schlechte 5-Jahres-Überlebensrate resultiert, die 2008 in Deutschland bei 7-8 % lag. Als gesicherte Risikofaktoren für das PDAC gelten Rauchen und Alter, dennoch werden auch genetische Einflüsse vermutet [1, 57]. Bösartige Neoplasien des Pankreas gehören aus diesen Gründen zu den Tumoren mit der schlechtesten Prognose.

Typisch für die Entstehung des PDAC sind Mutationen des Tumorsuppressors p53 und des Protoonkogens kras. Diese führen zur Störung der DNA-Reparatur, stark gesteigerter Mitoserate und Ausschaltung der Apoptose [15, 26]. Auch findet sich eine Überexpression mehrerer Rezeptorproteine in den Tumorzellen. So sind in 90 % der PDAC der Neurotensin-Rezeptor 1 (NTR1) und in 70 % der EGF-Rezeptor in erhöhtem Maße vorhanden. Beide führen unter anderem über den ras/raf/MAPK-Signalweg zur Übertragung von Proliferationsstimuli in den Zellkern und sind mit einem gesteigerten Risiko für Lymphknoten- und Fernmetastasen korreliert [47, 52, 54].

2. EINLEITUNG

Ein Charakteristikum des PDAC ist die starke Anreicherung von Bindegewebe im Tumorstroma, was als Desmoplasie-Reaktion bezeichnet wird [6]. Die Konzentration von Kollagen ist im desmoplastischen Gewebe dreifach höher als im normalen Pankreasgewebe, wobei besonders Kollagen I, III und V erhöht sind. Annähernd die gleiche Zusammensetzung findet sich bei Tumor-induzierter und alkoholischer chronischer Pankreatitis [29]. Auch der Anteil an Fibronectin ist im PDAC und seinen Metastasen gesteigert [6]. Interessanterweise wird der Großteil dieser Proteine nicht von den Tumorzellen selbst synthetisiert, sondern von pankreatischen Stromazellen, den Pankreas-Sternzellen [5, 6, 48]. Die starke Bindegewebsanreicherung umschließt sowohl Tumorzellen als auch Gefäße und führt zu einer verminderten Durchblutung und starker Hypoxie im Tumorgewebe mit daraus resultierender niedriger Zellproliferationsrate. Dies ist einer der Hauptgründe für das schlechte therapeutische Ansprechen des PDAC, da das Chemotherapeutikum die Tumorzellen nicht erreicht [7, 35, 43].

PDAC Zellen produzieren Cytokine und Wachstumsfaktoren wie $TGF\beta-1$, $IL-1\beta$ und $IL-6$, die im Tumorgewebe eine Entzündungsreaktion durch die Aktivierung von Immunzellen auslösen. Immunzellen synthetisieren wiederum Faktoren, die stimulierend auf den Tumor wirken [7, 22, 43]. Erstaunlicherweise besitzt $TGF\beta$ selber in der Anfangsphase der PDAC-Entstehung suppressive Eigenschaften auf die Tumorzellen, jedoch erhält es im fortgeschrittenen Verlauf meist stimulierende Funktion [39].

Zusammenfassend existieren mit diversen Rezeptoren, den Pankreas-Sternzellen, Hypoxie, Angiogenese und der Entzündungsreaktion eine Reihe von Zielen für eine Therapie des PDAC. Dennoch sind viele Dinge im Bezug auf die Bedeutung und Interaktion zwischen diesen Faktoren noch unklar, was die gezielte Behandlung leider momentan noch schwierig bis unmöglich gestaltet.

2.2 Charakterisierung pankreatischer Sternzellen

Pankreatischen Sternzellen (PSC) wurden erstmals 1982 als Vitamin A-speichernde Zellen im Pankreasgewebe beschrieben [76]. Die Isolierung, weitere Charakterisierung, sowie die Namensgebung als „Sternzellen“ erfolgte jedoch erst 1998. So ist die Expression der Intermediärfilamente Desmin und Vimentin, sowie der Proteine GFAP und α -SMA charakteristisch [2, 4]. Der genaue Ursprung der Fibroblasten-ähnlichen kontraktilen Zellen ist noch nicht vollends geklärt: Sie sind wahrscheinlich mesodermalen Ursprungs, wobei sich der größte Teil der Zellpopulation im Pankreas ent-

2. EINLEITUNG

wickelt. Gut ein Fünftel der Zellen scheint aber ursprünglich aus dem Knochenmark zu stammen [21, 75]. Weiterhin besteht eine sehr enge Verwandtschaft mit den hepatischen Sternzellen (HSC) [21]. Die PSC selbst machen nur ca. 4 % der Zellen des Pankreas aus und sind hauptsächlich um Azinuszellen lokalisiert, mit denen sie über lange Cytoplasmaausläufer in Kontakt treten [2].

In den letzten Jahren wurde die wesentliche Beteiligung der PSC bei der Entwicklung und Progression des duktales pankreatischen Adenokarzinoms (PDAC) immer deutlicher. Im normalen Pankreasgewebe liegen die Zellen in einem Ruhezustand vor, der durch die Speicherung von Vitamin A, geringe Produktion von ECM-Molekülen, minimale Proliferation und fehlende Expression von α -SMA gekennzeichnet ist. Eine Aktivierung durch oxidativen Stress, Ethanol, Cytokine, PDGF, TGF β (letztere drei werden auch von PDAC-Zellen freigesetzt) und andere Stimuli führt jedoch zu einer deutlichen Änderung des Zellstoffwechsels [2, 6, 48]. Aktivierte Sternzellen verlieren die Fähigkeit zur Speicherung von Vitamin A und exprimieren α -SMA. Weiterhin wird die Proliferation gesteigert, Rezeptoren für PDGF und TGF β verstärkt ausgebildet, und es kommt zu einer massiven Synthese von Fibronectin, Kollagen I und Kollagen III. Dies führt im Tumorgewebe zur Desmoplasie-Reaktion, die förderlich für Wachstums- und Metastasierungsprozesse ist [5, 6, 48, 59].

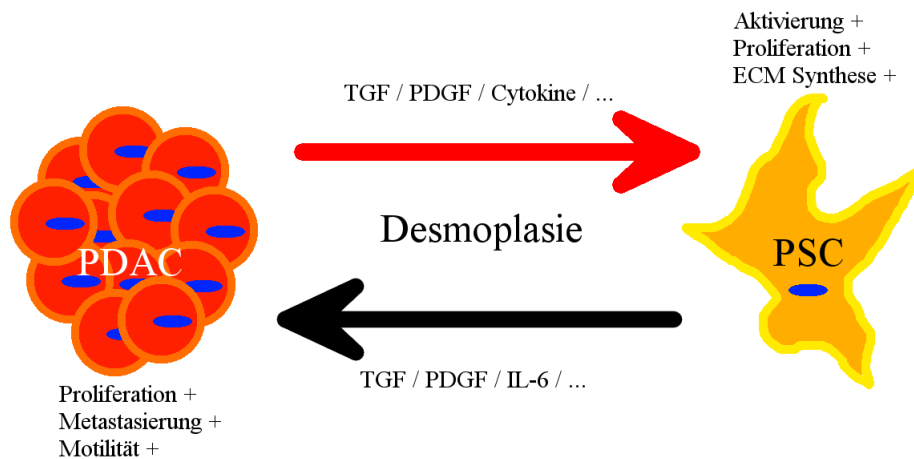


Abbildung 1: Schema der PDAC-PSC-Interaktion

Es wurde gezeigt, dass konditionierte Medien von PDAC-Zellkulturen einen steigenden Einfluss auf die Motilität und ECM-Produktion der PSC besitzen. An dieser Stimulation sind PDGF, TGF und FGF2 beteiligt [5]. In Boyden-Kammer-Assays konnte für PSC-PDAC-Cokulturen eine erhöhte Motilität nachgewiesen werden [74]. Weiterhin führt der Kontakt zu Tumorzellen zu einer vermehrten Synthese von Matrixmetalloproteinasen wie MMP-2, die die Tumorausbreitung zusätzlich begünstigen

2. EINLEITUNG

[61]. Durch die Aktivierung der PSC entsteht für das PDAC eine positive Rückkopplung, da wiederum wachstumsfördernde Mediatoren wie PDGF, TGF β und IL-6 von aktivierten PSC freigesetzt werden [48]. Die pankreatischen Sternzellen sind somit wesentlicher Bestandteil im Gefüge zwischen Tumor und Pankreasgewebe.

2.3 Zellmigration

Unter Zellmigration versteht man die aktive Fortbewegung von Zellen, wobei gerichtete und ungerichtete Bewegungen möglich sind. Die Fähigkeit von Zellen zur Migration spielt bei vielen physiologischen Prozessen eine große Rolle. Während der Embryonalentwicklung wandern Stammzellen gezielt an ihren Bestimmungsort, um sich dort weiter zu differenzieren. Neutrophile Granulozyten und andere Zellen des Immunsystems sind in der Lage, aus dem Blutstrom in entzündetes Gewebe einzudringen und Pathogene zu beseitigen. Bei Wundheilungsprozessen migrieren Epithelzellen in die Wunde, um diese schneller zu decken [63]. Auch für pathophysiologische Prozesse hat die Zellmigration zentrale Bedeutung. Durch sie sind Tumorzellen unter anderem in der Lage, sich über Gewebegrenzen hinwegzusetzen und an anderen Stellen des Organismus Metastasen zu bilden [25]. Ein weiteres Beispiel ist die Migration von Monocyten bei der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques [78]. Die Untersuchung des Mechanismus der Zellbewegung bei bestimmten Erkrankungen könnte so zum besseren Verständnis ihrer Pathophysiologie beitragen.

Bei der Fortbewegung auf einer zweidimensionalen Oberfläche lässt sich eine Polarisierung der Zellen in Vorder- und Hinterende erkennen. Das vordere Ende wird Pseudopodium genannt und von dem flachen, ca. 300 nm dicken Lamellipodium oder Filopodien, punktförmigen Ausläufern, gebildet. Beide Strukturen besitzen ein ausgeprägtes Aktin-Cytoskelett, aber keine Zellorganellen und Mikrotubuli. Das Hinterende mit dem Zellkörper wird als Uropodium bezeichnet [44, 63].

Der Mechanismus der Zellmigration setzt eine initiale Protrusion des Lamellipodiums durch die Neuausbildung von F-Aktin-Filamenten voraus. Am hinteren Ende des Lamellipodiums sind diese an Myosin-Moleküle gekoppelt, wodurch bei Kontraktion des Aktin-Myosin-Netzwerkes die Retraktion des Zellkörpers erfolgt. An diesem Vorgang sind Myosin II-Proteine beteiligt und die regulatorische Aktivität des kleinen G-Proteins Rho und der Rho-Kinase nötig [51, 81]. Weiterhin ist ein ständiger Auf- und Abbau von fokalen Kontakten erforderlich, der zum großen Teil

2. EINLEITUNG

über Integrine und Matrix-Proteoglykane vermittelt wird, um der Zelle Halt auf ihrem Untergrund zu geben [8]. Integrine sind $\alpha\beta$ -heterodimere transmembranöse Glykoproteine, die Kontakt zur Zellumgebung herstellen und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen können [37].

In den meisten Fällen findet Zellmigration in Organismen innerhalb der dreidimensionalen extrazellulären Matrix (ECM) statt, wo Faktoren wie Zusammensetzung, Steifigkeit und Porengröße fördernden oder hemmenden Einfluss auf die Fortbewegung der Zelle besitzen [22, 49]. Zelleigene Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind allerdings in der Lage, Kollagenfibrillen und andere Matrixproteine zu spalten und die Bewegung durch die ECM zu erleichtern [23].

Einen weitreichenden Einfluss auf die Migration haben darüber hinaus Ionenkanäle und Transportproteine, die viele Eigenschaften der Zelle regulieren. Dazu gehören unter anderem intrazelluläre Ionenverteilungen, das Zellvolumen, der pH-Wert, das Membranpotential oder die Ausbildung Zell-Matrix-Kontakten [66].

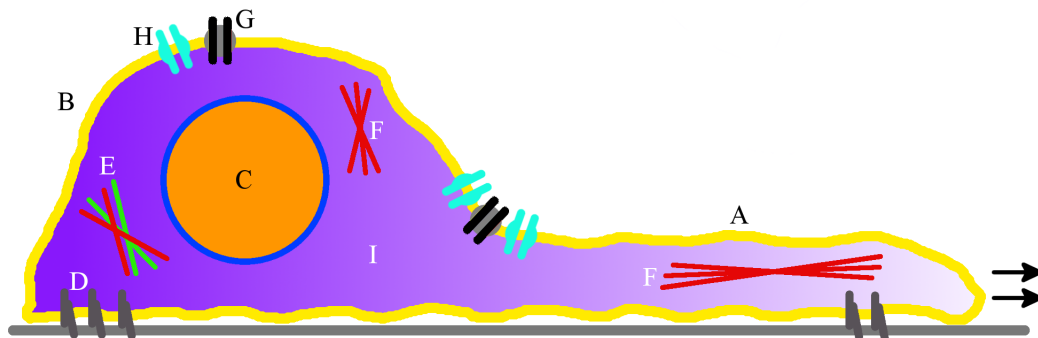


Abbildung 2: Schema der Zellmigration

Schema über an der Zellmigration beteiligte Zellbestandteile.

A Lamellipodium, B Uropodium, C Nucleus, D fokale Kontakte, E Aktin-Myosin-Netzwerk, F Aktin-Filamente, G Transportproteine, H Ionenkanäle, I intrazellulärer Ca^{2+} -Gradient

2.4 Calcium bei der Zellmigration

Calcium-Ionen (Ca^{2+}) sind an fast allen wichtigen Signaltransduktionsprozessen im menschlichen Organismus beteiligt und werden für eine Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen benötigt. Die Herzaktivität, die Apoptose oder die Sekretion von Insulin aus den Pankreaszellen und viele weitere Prozesse wären ohne Ca^{2+} -Regulation nicht möglich [12, 20, 56]. Aus diesem Grund wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentra-

2. EINLEITUNG

tion $[Ca^{2+}]_i$ genau reguliert und beträgt in den meisten Zellen im Ruhezustand ungefähr 10^{-7} mol/L. Dafür sind unter anderem der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher NCX, die Ca^{2+} -ATPase PMCA und TRP-Ionenkanäle („transient receptor potential“) verantwortlich, wobei eine Vielzahl weiterer Kanäle Einfluss auf $[Ca^{2+}]_i$ hat [17, 18]. Für die BxPC3 PDAC-Zellen konnte die Expression von NCX1, TRPC1, TRPC4 und TRPC6 nachgewiesen werden [17].

Für die bei der Zellmigration ablaufenden Umstrukturierungen im Cytoskelett ist eine genaue Regulierung der $[Ca^{2+}]_i$ nötig. Bei migrierenden Zellen besteht ein intrazellulärer Calciumgradient mit hoher $[Ca^{2+}]_i$ am Hinterende und geringer $[Ca^{2+}]_i$ am Vorderende, der sich bei einem Richtungswechsel umkehrt [11]. Diesem Gradienten entspricht gleichzeitig die Ca^{2+} /Calmodulin-vermittelte Aktivierung der MLCK (myosin light chain kinase), die über die Aktivierung von Myosin II die Kontraktion und Retraktion des Zellhinterendes bewirkt [51]. Weiterhin konnten regionale Ca^{2+} -Pulse in den Ausläufern des Lamellipodiums nachgewiesen werden, wobei die Protrusion des Lamellipodiums durch niedrige und die Retraktion durch hohe Ca^{2+} -Pulse gekennzeichnet ist [73].

Die $[Ca^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_o$ regulieren auch die Aktivität von Integrinen. Ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ vermittelt so eine Integrin-Aktivierung und Konformationsänderung in den ECM-bindenden Zustand [71]. Zugleich behindert eine hohe $[Ca^{2+}]_o$ das Bindungsverhalten der meisten Integrine, wohingegen eine niedrige $[Ca^{2+}]_o$ eher die Integrin-Bindung verbessern [37].

2.5 Der EGF-Rezeptor

Der „epidermal growth factor receptor“ EGFR (auch ErbB1 oder HER1) ist ein 170 kDa großes, transmembranöses Glykoprotein und gehört mit vier anderen Rezeptoren zur Gruppe der ErbB-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Rezeptor-Liganden sind unter anderem EGF und $TGF\alpha$, deren Bindung eine Dimerisierung von zwei Rezeptorproteinen bewirkt und die Phosphorylierung von Tyrosin-Molekülen der Zielproteine ermöglicht [52]. Bei EGF handelt es sich um ein einkettiges Polypeptid aus 53 Aminosäuren [9]. Die Signaltransduktion des EGFR erfolgt hauptsächlich über den ras/raf/MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalweg [52]. Zusätzlich findet auch eine Aktivierung des PIP2/PLC γ /IP3-DAG Signalwegs statt, wobei IP3 die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher herbeiführt [9].

Der EGFR stimuliert die Migration und das Wachstum von Zellen und beein-

2. EINLEITUNG

flusst auch die Expression von Proteinen der Apoptosekaskade wie Bcl und Bax. Viele Karzinome, so auch das PDAC, sind durch eine Überexpression des EGFR gekennzeichnet, die mit einer erhöhten Invasivität und Proliferationsrate korreliert ist [54]. Die Steigerung der Zellmotilität unter EGF-Einfluss erfolgt unter anderem über Veränderungen der Aktin-Polymerisation im Zellcortexbereich und die MAPK-vermittelte Destabilisierung fokaler Kontakte [55, 80]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EGF-Stimulation beim Cervixkarzinom die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers NHE1, die auch beim PDAC eine Rolle spielt, steigert, indem die Degradierung vorhandener NHE1-Moleküle verringert wird [13].

2.6 Der Na^+/H^+ -Austauscher NHE1

Die Familie der humanen Na^+/H^+ -Austauscher besteht aus 9 bekannten Isoformen, von denen der NHE1 ubiquitär von allen Zellen exprimiert wird. Hauptaufgabe des NHE1 ist die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH (pH_i) und des Zellvolumens über den Austausch von Protonen gegen Natrium- oder Lithium-Kationen [32]. Auch für die Zellmigration ist die Aktivität des NHE1 notwendig: Die Migration humaner Melanomzellen wird durch verminderte NHE1-Expression oder Inhibition mit dem Hemmstoff HOE642 (Cariporid) wesentlich reduziert. Dieser Effekt bleibt dabei unbeeinflusst vom extrazellulären pH [70]. Beim Cervixkarzinom führt eine gesteigerte Aktivität des NHE1 zu einer erhöhten Invasivität der Tumorzellen in das umliegende Gewebe [13]. PDAC-Zelllinien wie BxPC3 werden unter Stimulation mit dem Neuropeptid Neurotensin zu einer Überexpression des Natrium-Protonen-Austauschers angeregt, die einen Abfall des extrazellulären pH zur Folge hat [46].

Die NHE1-Beteiligung an der Zellmigration lässt sich unter anderem darauf zurückführen, dass unmittelbar an fokalen Kontakten durch die Aktivität des NHE1 pH-Nanodomänen erzeugt werden, die Einfluss auf die Funktion regionaler Adhäsionsmoleküle besitzen. Bei migrierenden Zellen ist der NHE1 direkt mit fokalen Kontakten assoziiert, die zugleich Ankerpunkte für das Cytoskelett darstellen [36]. Zudem sorgt der NHE1 für den Aufbau und Erhalt intra- und extrazellulärer pH-Gradienten über die Oberfläche von migrierenden Zellen [40].

2.7 Der $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kaliumkanal

Der $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanal (IK1, SK4) gehört mit anderen verwandten Proteinen zur Gruppe der Calcium-aktivierten Kalium-Kanäle. Der 47 kDa große Kanal besitzt 6 Trans-

2. EINLEITUNG

membrandomänen und eine C-terminal intrazellulär gebundene Calmodulin-Domäne, die als Ca^{2+} Sensor fungiert [72]. Es existieren diverse Inhibitoren für die Gruppe der Calcium aktivierten Kalium-Kanäle, die aber zum Großteil nicht einen spezifischen Kanal blockieren, sondern vor allem bei höheren Konzentrationen auch andere Kanäle, z.B. spannungabhängige Kalium-Kanäle, inhibieren. Zur Inhibition des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals wurde in dieser Arbeit das Clotrimazol-Derivat TRAM34 verwendet [79]. 100 nM TRAM34 können in PDAC-Zellen den gemessenen Kanalstrom auf ca. 10 % der Norm absenken [30]. Ein neuerer Inhibitor des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals ist das Senicapoc, welches unter anderem zur Therapie der Sichelzellanämie eingesetzt werden kann [3].

Im menschlichen Organismus findet sich der Kanal in Erythrozyten, T-Lymphozyten und glatten Muskelzellen und ist an der Regulation von Proliferation und Membranpotential beteiligt [72]. Weiterhin spielt er eine Rolle bei Flüssigkeitshaushalt und Sekretionsvorgängen in Drüsengeweben wie Dickdarm, Lunge und Pankreas. In den β -Zellen des Pankreas führt eine Hemmung des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ unter anderem zu einer Steigerung der Glucosetoleranz und einer Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration [20]. Bei der Pathophysiologie des Asthma bronchiale sind $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanäle an der Aktivierung von T-Zellen und der IgE-Freisetzung aus Mastzellen beteiligt und modulieren so die anaphylaktische Reaktion [10].

Bezogen auf die Zellmigration sorgt eine Verringerung der Aktivität des Kanals bei den meisten Zellen, z.B. Fibroblasten, Bronchialepithelzellen oder glatten Muskelzellen, für eine verminderte Migrationsgeschwindigkeit [66]. Die Stimulation von Nierenepithelzellen mit FGF2 führt über eine Aktivitätssteigerung von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanälen zu gesteigerter Migrationsaktivität, die sich durch $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Inhibition unterdrücken lässt. Bei diesem Mechanismus ist die Aktivität des NHE1 essentiell wichtig, um die Verringerung des Zellvolumens durch K^+ -Austrom durch die $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanäle zu kompensieren [33].

Auch die heterologe Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) mit dem $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanal führte zu einer gesteigerten Migration dieser Zellen [64]. In den PDAC-Zelllinien BxPC3 und MiaPaCa-2 führt eine Hemmung des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals mit TRAM34 zu einer deutlichen Reduktion der Proliferationsrate [30].

2.8 Ziel der Arbeit

Die Therapie von malignen Neoplasien gehört zu den anspruchsvollsten Gebieten der Medizin und beschäftigt eine Vielzahl von Wissenschaftlern auf der ganzen

2. EINLEITUNG

Welt. Durch die Erforschung der pathophysiologischen Prozesse der Tumorentstehung und -erhaltung gelang es in den letzten Jahrzehnten immer wieder, bessere Therapiekonzepte für bestimmte Erkrankungen zu entwickeln und so Überleben und Lebensqualität der Betroffenen zu steigern. Beispiele dafür sind die Entdeckung der Adenom-Karzinom-Sequenz mit ihren Auswirkungen auf weitere Forschung zur Behandlung des Colonkarzinoms oder die Antikörpertherapie mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab beim Mammakarzinom [58, 77]. Das duktales Adenokarzinom (PDAC) des Pankreas gehört leider zu den Tumoren, die nach wie vor mit schlechter Prognose und einem hohen Anteil an Therapieversagen einhergehen [1]. In den letzten Jahren zeigte sich immer mehr die vorrangige Bedeutung der pankreatischen Sternzellen (PSC) bei der Progression des PDAC. Es wurden eine Vielzahl von Faktoren wie EGF und $TGF\beta$ identifiziert, die die gegenseitige Aktivierung von PDAC und PSC aufrechterhalten und zur Desmoplasie-Reaktion des Tumorstromas beitragen [6]. Für die Entstehung von Metastasen, die durch PSC gefördert wird, ist die Zellmigration ein notwendiger Vorgang. Über den genauen Mechanismus der Interaktion zwischen Adenokarzinom und Sternzellen und den daran beteiligten Kanälen und Rezeptoren bleiben allerdings immer noch Fragen offen.

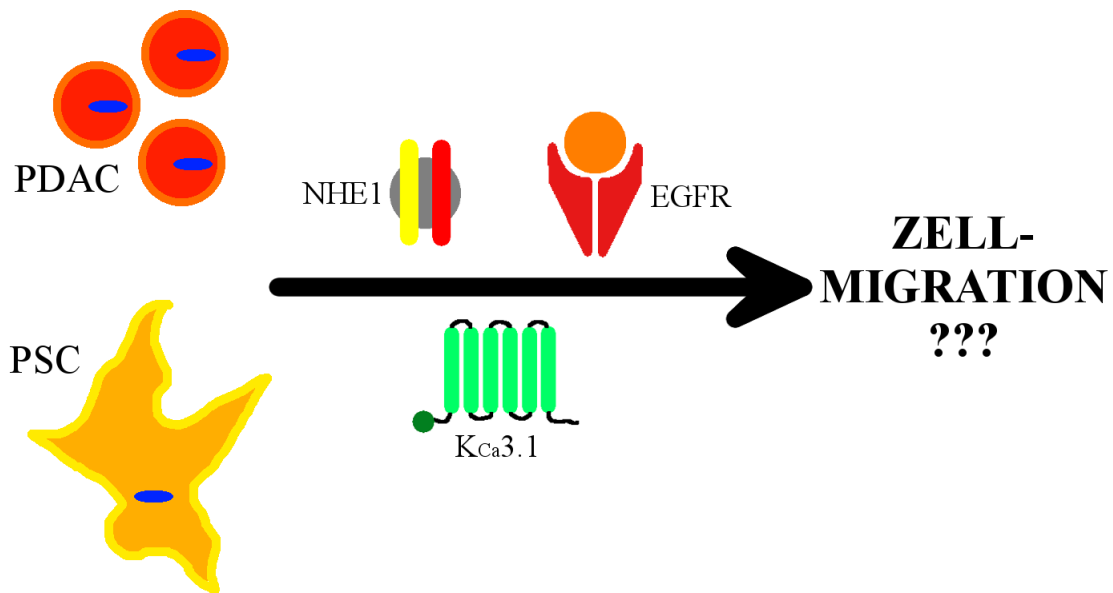


Abbildung 3: Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von EGFR, NHE1 und $K_{Ca}3.1$ -Kanal bei der Comigration von PDAC-Zellen und Pankreas-Sternzellen.

In dieser Arbeit sollte durch Videomikroskopie der direkte Einfluss der PSC auf das Migrationsverhalten von humanen PDAC-Zellen im Ansatz der Comigration unter-

2. EINLEITUNG

sucht werden und die Beteiligung des EGFR, des NHE1 und des $K_{Ca}3.1$ -Kanals bei der PDAC-Migration charakterisiert werden. Die stimulierende Eigenschaft der PSC und des EGFR auf die Tumorzellen wurde bereits nachgewiesen, jedoch ist der Einsatz von Videomikroskopie und Cokultur auf diese Weise noch nicht erfolgt. Darüber hinaus ist auch die Rolle von NHE1 und $K_{Ca}3.1$ so noch nicht untersucht worden.

Anfangs sollten die Auswirkungen der drei genannten Rezeptor- und Transport-Proteine auf einzelne PDAC-Zellen in Einzelzellmigrations-Experimenten mit dem Effekt von konditionierten PSC-Medien verglichen werden. Im nächsten Schritt sollte die Migration beider Zelltypen zur gleichen Zeit im Ansatz des Wundheilungsassays untersucht werden, um gegebenenfalls direkte Stimulationseffekte zu entdecken. Weiterhin war geplant, auch in diesem Ansatz eine Beteiligung von EGFR und des $K_{Ca}3.1$ -Kanals zu untersuchen. Darüber hinaus sollten Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Wundheilungsassay erfolgen, um festzustellen, ob eventuelle Effekte aus den Migrationsexperimenten sich über Veränderungen von $[Ca^{2+}]_i$ erklären lassen.

3

Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet: AsPC1-Zellen, eine pankreatische Adenokarzinom-Zelllinie, entstammen ursprünglich aus einer 62 Jahre alten Patientin mit einem Adenokarzinom des Pankreaskopfes. Die zweite pankreatische Adenokarzinom-Zelllinie, BxPC3, wurde erstmals aus einem Karzinom des mittleren Pankreasteils einer 61 jährigen Patientin gewonnen [15].

Als humane pankreatische Sternzelllinie wurden RLT-PSC-Zellen benutzt, die zur Immortalisierung mit dem SV40 Large T-Antigen und einer humanen Telomerase-untereinheit (hTERT) transfiziert wurden. Transfektion und Zellkultur führten bei diesen Zellen allerdings zu Veränderungen am Zellkern mit einer durchschnittlichen Chromosomenzahl von 60 bei immortalisierten Sternzellen [31]. Ruhende Sternzellen werden durch die Zellkultur zudem in den aktivierten Zustand versetzt [34].

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. BxPC3-Zellen wurden in Hydrogencarbonat-gepuffertem RPMI 1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und einem pH-Wert von 7,4 kultiviert. Bei den AsPC1-Zellen wurde das gleiche Medium zusätzlich mit 1 % Glutamin (Glutamax) versetzt, ohne das das Zellwachstum stark eingeschränkt war. Für die RLT-PSC-Zellen wurde ein Gemisch aus 50 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 50 % HAM/F12 und 10 % FCS verwendet.

Da es sich bei allen Zelllinien um adhärenente Zellen handelt, wurde zum Lösen der Zellen von den Kulturschalen eine Trypsin-EDTA-Lösung verwendet (Tumorzellen 0,25 % für 10min / Sternzellen 0,05 % für 10min).

3. MATERIAL UND METHODEN

Das konditionierte Sternzell-Medium für die Migrationsexperimente wurde folgendermaßen gewonnen: Von einer ca. 70 % konfluenten Zellkulturschale mit RLT-PSC-Zellen wurde das Medium komplett abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium mit einer sterilen Spritze abgesaugt und durch einen Sterilfilter gepresst. Das Filtrat wurde als konditioniertes RLT-PSC-Medium für die Experimente eingesetzt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die 80-90 % konfluenten Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mit 200-300 μL RIPA-Lysepuffer versetzt. Nach 3 min erfolgte die Lösung der Zellen von der Schale mit Hilfe eines Zellkratzers. Die Zellmasse wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und 30 min bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde das Lysat bei 4°C und 14000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand vom entstandenen Pellet getrennt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Substanz	Konzentration
NaCl	150 mM
Natriumdesoxycholat	1 % Vol.
Nonoxinol 40	1 % Vol.
PBS (Lösungsmittel)	-
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1 % Vol.
TRIS-HCl (ph 7,6)	25 mM

Tabelle 1: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers

3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit dem BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific. Der Reaktionsmechanismus basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung, gefolgt von der Komplexbildung von Cu^{1+} -Ionen und zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA). Die Absorption von Licht mit 562 nm Wellenlänge durch die entstandene violette Komplexverbindung ist annähernd linear zur Proteinkonzentration.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde deren Absorption mit

3. MATERIAL UND METHODEN

derer von Standards bekannter Konzentration verglichen.

Die Proteinstandards und Proben wurden auf Eis aufgetaut und jeweils 10 μL in eine Mikrowellplatte pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von jeweils 200 μL Reaktionslösung mit anschließender Inkubation für 30 min bei 37°C. Nach der Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurde die Extinktion photometrisch bei $\lambda=562$ nm bestimmt und die Proteinkonzentrationen anhand der bekannten Standardkonzentrationen berechnet.

3.2.3 SDS-Gelelektrophorese für den $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$

Das Prinzip der SDS-Gelelektrophorese ist die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine werden durch Natriumdocylsulfat (SDS), Dithiothreitol (DTT) und Hitze denaturiert. DTT reduziert die Schwefelatome der Proteindisulfidbrücken und spaltet diese. Zugleich bricht das negativ geladene SDS die nicht kovalenten Bindungen in der Proteinkette und lagert sich proportional zum Molekulargewicht an das Protein an, wodurch die Proteineigenladung durch die negative Ladung des SDS maskiert wird. Im elektrischen Feld wandern die Proteine dann durch ein Acrylamidgel zur Anode (+) und werden auf ihrem Weg durch die Poren des Gels nach ihrem Molekulargewicht getrennt, da kleine Proteine sich schneller durch die Poren bewegen können. Weiterhin wird den Proben Bromphenolblau als negativ geladener Farbstoff hinzugefügt, um den Endpunkt der Elektrophorese optisch sichtbar zu machen.

Um eine homogene Verteilung der Proteine zu gewährleisten, wird dem eigentlichen Trenngel ein großporiges Sammelgel vorgeschaltet, das eine anfängliche Konzentrierung der Proteine an der Übergangszone bewirkt. Zur anschließenden Zuordnung der Proteinbanden zu einem Molekulargewicht werden Standardproteingemische mit bekanntem Bandenmuster zusätzlich zu den Proben auf das Gel aufgetragen.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde ein Tank-Blot-System verwendet, bei dem die Gelelektrophoresekammer komplett mit Laufpufferlösung gefüllt ist. Bei der Gelherstellung wurde zuerst das Trenngel vorbereitet und in die Kammer gefüllt. Nach 20 min Polymerisationszeit wurde das Sammelgel oben auf das Trenngel gegeben, sowie der Platzhalter für die Geltaschen eingesetzt. Die folgende Zeit zur Polymerisation betrug mindestens 1 h. Die Gelkammer wurde über Nacht feucht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Proben aufgetaut, durchmischt und jeweils 16 μL gleicher Proteinmasse in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Die Verdünnung erfolgte ggf.

3. MATERIAL UND METHODEN

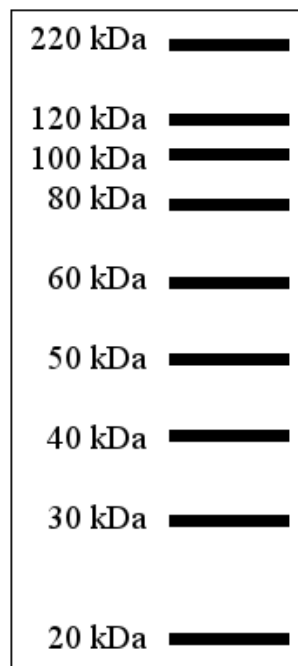


Abbildung 4: Schema des MagicMark Proteinstandard

Die Nutzung eines Proteinmarkers mit Banden definierter Größe ermöglicht es, am Ende der Proteindetektion die Banden der untersuchten Proteine zu identifizieren.

Substanz	Volumen
ddH ₂ O	1,3 mL
Roti-Gel A	0,375 μ L
Roti-Gel B	0,15 μ L
TRIS/SDS 0,5 M	0,5 μ L
TEMED	2,5 μ L
APS 10 %	25 μ L

Tabelle 2: Zusammensetzung des 5 % Sammelgels

Substanz	Volumen
ddH ₂ O	1,25 mL
Roti-Gel A	1,62 μ L
Roti-Gel B	0,67 μ L
TRIS/SDS 1,5 M	1,3 mL
TEMED	3,75 μ L
APS 10 %	25 μ L

Tabelle 3: Zusammensetzung des 10 % Trenngels

mit RIPA-Puffer. In den verschiedenen Blots wurden Proteinmengen zwischen 12 und 38 μ g verwendet. Zu jeder Probe wurden 4 μ L des Probenpuffers hinzugegeben. Dann wurden alle Proben für 5 min bei 95°C aufgekocht und kurz zentrifugiert. In

3. MATERIAL UND METHODEN

die erste Geltasche wurden 2 μL „Magic Marker“ gegeben, in die folgenden jeweils 20 μL der Proben und in die letzte 5 μL Proteinstandard. Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Substanz	Konzentration
Bromphenolblau	0,05 % Vol.
Dithiothreitol	100 mM
SDS	2 % Vol.
Glycerol	10 % Vol.
TRIS (pH 7,6)	50 mM

Tabelle 4: Zusammensetzung des Probenpuffers

Substanz	Masse / Volumen
SDS	3,5 mmol
Glycin	190 mmol
TRIS (pH 7,6)	25 mmol
ddH ₂ O	auf 1 L

Tabelle 5: Zusammensetzung des Laufpuffers

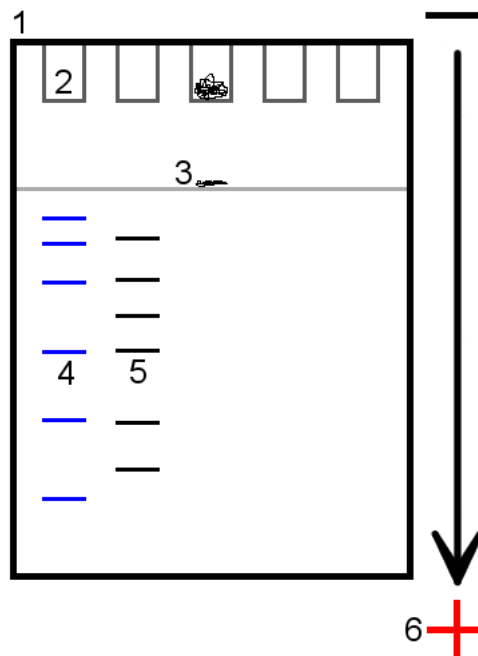


Abbildung 5: Schema der Gelelektrophorese

1 Elektrophoresegel, 2 Geltasche für Proteine, 3 Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel, 4 gefärbter Standardmarker, 5 Auftrennung der Proteine (auf Gel nicht sichtbar), 6 Wanderungsrichtung der Proteine von der Kathode (-) zur Anode (+)

3. MATERIAL UND METHODEN

3.2.4 Westernblot

Die Westernblot-Technik wird verwendet, um die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem instabilen Gel auf eine robustere Membran zu übertragen. Dazu wird die Membran auf dem Gel platziert und eine Spannung zwischen Gel und Membran angelegt. Durch den Stromfluss wandern die Proteine so auf die Membran (Anodenseite).

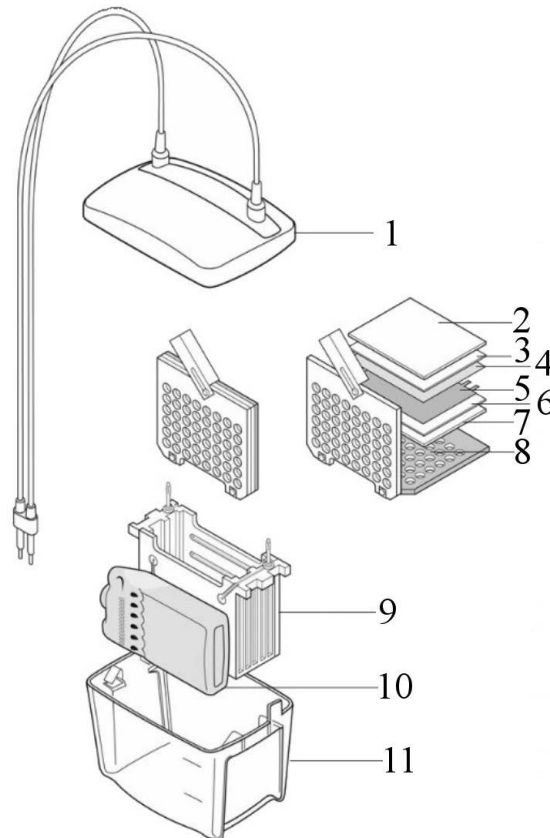


Abbildung 6: Aufbau des Westernblots

1 Deckel, 2 Faserplatte, 3 Filterpapier, 4 PVDF-Membran, 5 Gel, 6 Filterpapier, 7 Faserplatte, 8 Halterungskassette, 9 Elektrodeneinheit, 10 Kühlakku, 11 Puffertank
(Modifiziert nach Bio-Rad Protein Blotting Guide)

Für den Westernblot wurde eine zuvor in Methanol aktivierte Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) verwendet. Die Kammer wurde wie abgebildet vorbereitet und mit Transferpufferlösung gefüllt. Der Probentransfer fand über Nacht bei 4°C statt, wobei die elektrische Spannung automatisch so geregelt wurde, dass kontinuierlich eine Stromstärke von 0,02 A bestand. Anschließend wurde die Membran für 1 h in eine 5 % Magermilch-PBS-T-Lösung eingelegt. Das Milchprotein bindet an die PVDF-Membran und verhindert anschließend das unspezifische Binden von An-

3. MATERIAL UND METHODEN

tikörpern. Eine weitere Lagerung erfolgte immer in PBS.

Substanz	Masse / Volumen
Glycin	50 mmol
TRIS (pH 7,6)	5 mmol
Methanol	100 mL
ddH ₂ O	auf 1 L

Tabelle 6: Zusammensetzung des Transferpuffers

3.2.5 Proteindetektion

Zur Detektion der Zielproteine auf der Membran wurden zwei Antikörper verwendet. Der erste Antikörper ist spezifisch gegen das gewünschte Protein gerichtet. Im zweiten Schritt wird ein zweiter Antikörper verwendet, der an den ersten Antikörper bindet. Zur Detektion der Proteinbande ist der zweite Antikörper mit einem Peroxidase-Enzym gekoppelt, das bei Zugabe eines entsprechenden Substrats eine Chemolumineszenz erzeugt.

Der erste Antikörper gegen den K_{Ca}3.1 wurde 1:1000 mit in PBS-T gelöster Magermilch verdünnt und über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Das Auswaschen von ungebundenen Antikörpern erfolgte mit PBS-T. Danach wurde der zweite Peroxidase-gekoppelte Antikörper 1:10000 verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben.

Zur Detektion der Proteinbanden wurden das Kit „SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ von Thermo Scientific sowie eine Belichtungskammer der Firma Biorad verwendet. Die Aquisition wurde mit der Software „Quantity One“ gesteuert.

3.3 Einzelzellmigrations-Experimente

Alle Migrationsexperimente fanden auf einer zweidimensionalen Oberfläche statt. Das zweidimensionale System hat den Vorteil der relativ leichten Handhabung und eignet sich gut, um die Grundzüge der Zellmigration zu untersuchen. Versuche mit einer dreidimensionalen Matrix brachten hier leider keine verwertbaren Ergebnisse.

Um das Migrationsverhalten eines einzelnen Zelltyps zu charakterisieren, wurden am Tag vor dem Experiment Zellkulturflaschen mit einer Proteinmatrix beschichtet, die

3. MATERIAL UND METHODEN

Bestandteile der im lebenden Organismus vorhandenen extrazellulären Matrix imitieren sollte. Für alle Migrations- und Wundheilungsexperimente wurde die gleiche Matrix verwendet (s. Tabelle 7). Die Matrixzusammensetzung ähnelt dem Stroma des desmoplastischen PDAC-Gewebes [6, 29].

Substanz	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
RPMI 5x	52 g/L	200 μ L	10,4 g/L
HEPES 5x	50 mmol/L	200 μ L	10 mmol/L
NaOH	1 mol/L	15 μ L	-
ddH ₂ O	-	263 μ L	-
Laminin	1 mg/mL	60 μ L	60 μ g/mL
Fibronectin	1 mg/mL	40 μ L	40 μ g/mL
Kollagen IV	0,45 mg/mL	12 μ L	5,4 μ g/mL
Kollagen III	1,2 mg/mL	10 μ L	12 μ g/mL
Kollagen I	4 mg/mL	200 μ L	800 μ g/mL

Tabelle 7: Zusammensetzung der Kollagenmatrix

Die einzelnen Komponenten der Matrix wurden vorsichtig im Eis aufgetaut und gemischt. Pro Migrationsflasche (12,5 cm²) wurden jeweils 200 μ L der Matrix mit einer Pipette gleichmäßig verteilt. Die Flaschen wurden über Nacht im Inkubator bei 37°C gelagert, um das Proteingemisch polymerisieren zu lassen. Zur Gewährleistung des Gasaustausches wurde der Flaschendeckel nur locker angeschraubt.

Es wurden Einzelzellmigrations-Experimente mit AsPC1- und BxPC3-Zellen durchgeführt.

Für das Experiment wurden die Zellen aus der Kulturschale abgelöst und die Suspension für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Dann erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit frischem Medium. Die Zellzahl der Suspension wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer improved) bestimmt. Dazu wurden 15 μ L in den Zählbereich unter die Deckglasplatte eingebracht. Es wurden alle Zellen in den 4 großen in das Glas eingeschliffenen Quadraten gezählt. Die Zellkonzentration ergab sich aus folgendermaßen:

$$\text{Zellen} * 10^4 / \text{mL} = \frac{\text{Zellzahl}}{4}$$

Dann wurden die Zellen in die beschichteten Flaschen eingebracht, sodass sich 2×10^5 Zellen in der Flasche befanden. Hier wurden zwei unterschiedliche Adhäsionsbedingungen gewählt:

3. MATERIAL UND METHODEN

A. Die Zellen adhärten 3 h lang in FCS-haltigem Medium.

B. Die Zellen adhärten 24 h lang in FCS-freiem Medium.

Letzteres diente dazu, die Zellen sensibler für eine Stimulation zu machen, da dem FCS-freiem Medium Wachstumsfaktoren fehlen und daher ein verminderter Zellstoffwechsel verglichen mit den in FCS-haltigem Medium kultivierten Zellen bestand. Nach der Adhäsionszeit wurden nicht adhärenente Zellen ausgewaschen und die Flaschen mit 2 mL FCS-freiem Medium gefüllt. Die in Tabelle 8 aufgelisteten Substanzen wurden je nach Experiment hinzugefügt.

Substanz	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O	-	2 μ L	-
EGF	100 μ g/mL	2 μ L	100 ng/mL
HOE642	10 mmol/L	2 μ L	10 μ mol/L
TRAM34 (in DMSO)	20 mmol/L	1 μ L	10 μ mol/L
DMSO	-	1 μ L	-

Tabelle 8: Testsubstanzen für die Migrationsexperimente

Für 15 min erfolgte eine Lagerung im Inkubator mit lockerem Deckel. Danach wurde der Deckel fest verschraubt, um den CO₂-Gehalt möglichst konstant zu halten. Die Flaschen wurden unter die auf 37°C vorgeheizten Mikroskope gestellt und das Experiment gestartet. Die Bildaquisition erfolgte mit Videokameras und der Software „HiPic“ bzw. „Wasabi“. Das Aquisitionintervall wurde auf 10 min eingestellt und die Zellen 3 h lang beobachtet.

Für die Auswertung wurde die Software „Amira“ verwendet, um die Zellen auf jedem Bild des Films zu markieren (Segmentierung). Nachfolgend wurde die Software „ImageJ“ benutzt, um die Segmentierungsdaten als Position und Geschwindigkeit der einzelnen Zellen auszuwerten.

Für die Analyse der Daten wurden Geschwindigkeit, Translokation zwischen Start- und Endpunkt, sowie die Direktionalität der Translokation herangezogen. Über die manuell markierten äußeren Umrisse der Zelle wurde dazu der Zellmittelpunkt bestimmt. Die Verschiebung des Zellmittelpunktes zwischen zwei Bildern wurde anschließend mit dem Bildaquisitionsintervall in Beziehung gesetzt und daraus die Geschwindigkeit der Zellmigration berechnet. Die Translokation ist die Strecke zwischen dem Zellmittelpunkt auf dem ersten und letzten Bild des Films. Die Direktionalität ergibt sich aus dem Quotienten der tatsächlich zurückgelegten Strecke und der Translokation und ist ein Maß für die Geradlinigkeit der Migration.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.4 Wundheilungsassays

Beim Wundheilungsassay wird die Migrationsbewegung eines kompletten Zellverbandes beim Schließen eines Wundspalts in diesem Verband dargestellt.

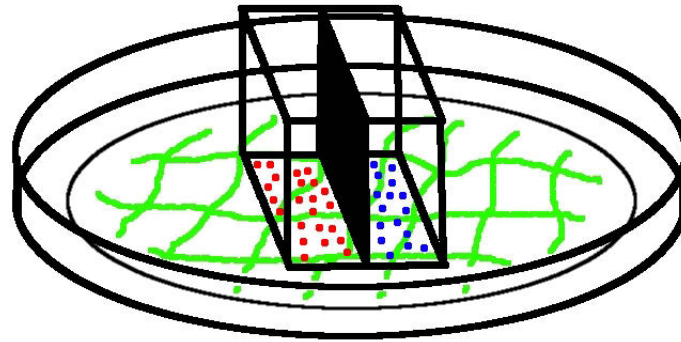


Abbildung 7: Schema des Wundheilungsassays

Die Zellkulturschale wurde mit Kollagen-Matrix beschichtet und die Zellen anschließend im Zellkultureinsatz ausgesät. Der mittlere Steg des Einsatzes trennt die beiden Zellpopulationen und erzeugt so die „Wunde“.

Die Versuche wurden in Zellkulturschalen mit 3,5 cm Durchmesser durchgeführt, welche vorab mit der Kollagenmatrix beschichtet wurden. Auf die Matrix in der Mitte der Schale wurde mit einer sterilen Pinzette je ein Zellkultureinsatz der Firma Ibidi positioniert, der aus zwei Kammern für das Zellwachstum und einem Trennsteg von 0,5 mm Breite besteht. In die seitlichen Kammern wurden $6 \cdot 10^4$ BxPC3-Zellen bzw. $5 \cdot 10^4$ RLT-PSC-Zellen in ihren jeweiligen FCS haltigen Medien eingebracht. Der übrige Bereich der Schale blieb bis auf die Zugabe von 200 μL PBS frei, um einem Austrocknen vorzubeugen. Die Schale wurde aus dem selben Grund zusätzlich noch mit „Parafilm“ umwickelt und zwei Tage bei 37°C im Inkubator gelagert.

Vor dem Experiment wurde der Zellkultureinsatz entfernt und die Schale vorsichtig mit FCS freiem und HEPES-gepuffertem RPMI-Medium gespült. Das Füllvolumen betrug final 2 mL. HEPES wurde für die Experimente als Puffer verwendet, da der pH-Wert wegen mangelnder CO_2 -Dichtigkeit der Schalen mit einem Hydrogencarbonat-Puffer über die Beobachtungszeit nicht stabil blieb. Weiterhin wurden je nach Experiment die gleichen Substanzen, mit Ausnahme von HOE642, wie bei den Einzelzellmigrations-Experimenten hinzugefügt (s. Tabelle 5).

Die Schalen wurden erneut mit „Parafilm“ umwickelt und in die vorgeheizten Kam-

3. MATERIAL UND METHODEN

mern der Mikroskope gestellt, sodass der zellfreie Bereich parallel zur oberen Bildkante ausgerichtet war und sich die BxPC3-Zellen auf der oberen Seite befanden. Die Filme wurden für 15 h mit einem Bildaquisitionsintervall von 10 min aufgenommen. Die verwendeten Zellkombinationen waren BxPC3-Zellen in beiden Kammern, RLT-PSC-Zellen in beiden Kammern sowie BxPC3-Zellen in der oberen und RLT-PSC-Zellen in der unteren Kammer, jeweils kombiniert mit den oben aufgelisteten Substanzen.

Für die Auswertung wurde die erste Stunde verworfen, um Effekte durch die Entfernung des Zellkultureinsatzes zu minimieren. Ausgewertet wurden die Stunden 2 bis 13 mit der daraus resultierenden Zeit von 12 h.

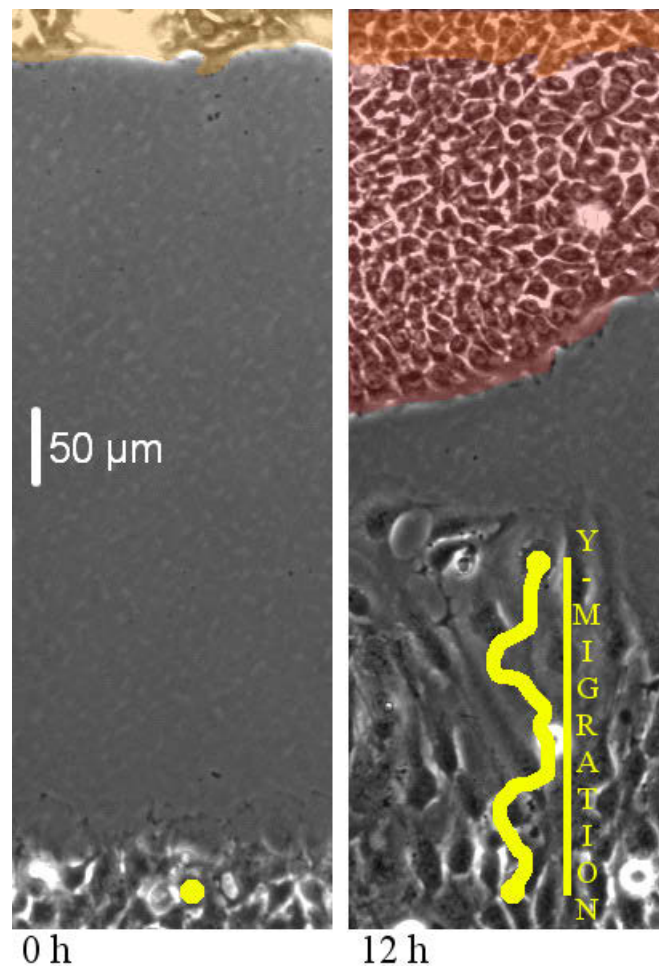


Abbildung 8: Auswertung der Wundheilungsassays

Zur Auswertung der Migration der BxPC3-Zellen (oben) wurden die Differenzen in der bedeckten Wundfläche verwendet. Für die RLT-PSC Zellen (unten) wurden die Pfade einzelner Zellen markiert, da die Zellen keinen kompakten Verband bilden, und die „Y-Migration“ in die Wunde betrachtet.

3. MATERIAL UND METHODEN

Da die BxPC3-Zellen einen kontinuierlichen festen Verband bildeten, wurde die Migrationsbewegung mit Hilfe der „ImageJ“ Software als Zunahme der mit BxPC3-Zellen bedeckten Wundfläche dargestellt und auf die Breite der Wunde normalisiert. Dies war notwendig, da die verschiedenen Mikroskope unterschiedliche Vergrößerungen besaßen, wodurch die Flächenänderungen unterschiedlich beobachtet wurden.

Wundbewegung BxPC3-Zellen: $\frac{\text{Differenz der mit Zellen bedeckten Fläche zwischen 2 Bildern } [\mu\text{m}^2]}{\text{Breite der Wunde } [\mu\text{m}]} [\mu\text{m}]$

Für die RLT-PSC-Zellen erfolgte die Auswertung wie bei den Einzelzellmigrations-Experimenten nach Y-Translokation und Migrationsgeschwindigkeit, wobei wegen der geringen Vergrößerung die Zellmittelpunkte manuell per Hand markiert wurden. Die Y-Translokation entspricht auf den Bildern der vertikalen Migration in die Wunde hinein oder hinaus. Seitliche horizontale Bewegungen wurden hierbei nicht betrachtet, weil so eine bessere Vergleichbarkeit zur Wundmigration des BxPC3-Zellverbandes bestand. Zur Veranschaulichung der Auswertung dient Abbildung 8.

3.5 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen

Die Messung der cytosolischen Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in mit Kollagenmatrix beschichteten Glasbodenschälchen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 durchgeführt. Dabei erfolgte die Vorbereitung der Zellen wie bei den Wundheilungsassays mit der Ausnahme, dass die Zellkultureinsätze bereits 4 h vor der Messung entfernt wurden, um den Zellen Zeit zur Migration zu geben. Vor Beginn der eigentlichen Messung wurden die Zellen für 30 min bei 37°C unter Lichtausschluss mit 6 μL Fura-2-AM in 1 mL Medium beladen, was einer Konzentration von 3 μM Fura-2-AM entsprach.

Fura-2-AM ist der Acetoxymethylester des Fura-2, der die passive Durchdringung der Zellmembran ermöglicht. Im Cytosol wird der Acetoxymethylester durch zelleigene Esterasen abgespalten und hindert das Fura-2 am Verlassen der Zelle. Fura-2 ist ein Chelator, der Ca^{2+} -Ionen bindet. Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm. Ca^{2+} -gebundenes Fura-2 besitzt sein Absorptionsmaximum bei 340 nm und freies Fura-2 bei 380 nm. Die Emissionswellenlänge beträgt jeweils 510 nm. Diese Eigenschaften ermöglichen die ratiometrische Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Zellen.

Die Messung erfolgte an einem Axiovert 200 Mikroskop mit einem 40x Ölimmersions-

3. MATERIAL UND METHODEN

objektiv und einem Bildaquisitionsintervall von 15 s. Zur Kontrolle des Versuchsablaufs wurde die MetaFluor Software verwendet. Alle verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 40°C erwärmt und mit Hilfe eines kontinuierlichen Perfusionsystems in die Zellkulturschale eingebracht, wobei die effektive Perfusionstemperatur 37°C betrug. Zu Anfang fand eine 10 minütige Kontrollphase statt, in der mit Ringerlösung gespült wurde. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit EGF-Ringerlösung und danach für weitere 10 min mit EGF-TRAM34-Ringerlösung perfundiert. Im Anschluss erfolgte die Eichung mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin, das die freie Diffusion von Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle ermöglicht. Für den Minimalwert wurde eine Ca^{2+} -freie Eichlösung mit EGTA, einem Ca^{2+} -Chelator, und Ionomycin verwendet und für den Maximalwert eine Eichlösung mit 5 mM CaCl_2 und Ionomycin. Die Eichwerte beziehen sich jeweils auf die minimale bzw. maximale Fluoreszenzemission aller vorhandenen Fura-2-Moleküle in Ca^{2+} -freiem bzw. gebundenem Zustand.

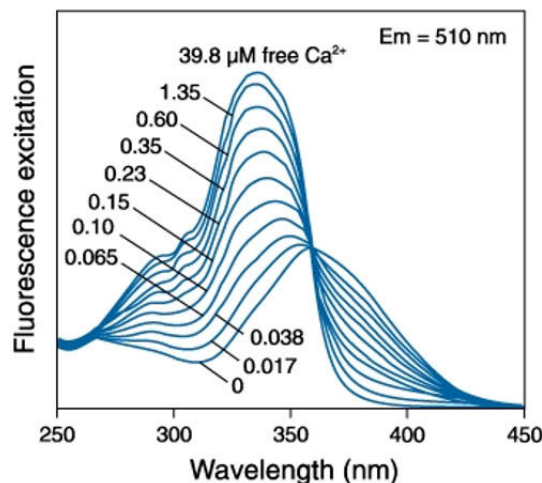


Abbildung 9: Fluoreszenzemission von Fura-2

Zusammenhang der Stärke der Fluoreszenzemission (510 nm) von Fura-2, der Exzitationswellenlänge und der freien Ca^{2+} -Konzentration von 0 bis 39,8 μM (aus Produktinformation „Fura Calcium Indicators“, Invitrogen)

Bei der Auswertung wurde jeweils unspezifische Fluoreszenz in Zell-freien Arealen bestimmt, von den Bildern subtrahiert und einzelne Messregionen auf die Zellen gelegt. Bei den RLT-PSC-Zellen wurden jeweils drei Regionen außerhalb des Zellkernbereiches gewählt. Die BxPC3-Zellen wurden auf Grund ihrer Größe zu mehreren Zellen in einzelnen Regionen zusammengefasst. Zur Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit der MetaFluor Software wurde folgende Formel verwendet:

3. MATERIAL UND METHODEN

	1. Ringer -lösung	2. Lösung EGF	3. Lösung EGF TRAM34	4. Eichlösung 0 Ca ²⁺	5. Eichlösung ↑Ca ²⁺
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
NaCl [mM]	122,5	122,5	122,5	122,5	122,5
KCl [mM]	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4
CaCl ₂ [mM]	1,2	1,2	1,2	-	5 (wasserfrei)
EGTA [mM]	-	-	-	5	-
MgCl ₂ [mM]	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
HEPES [mM]	10	10	10	10	10
Glucose [mM]	5,5	5,5	5,5	-	-
Ionomycin [μ mol/L]	-	-	-	1	1
EGF [ng/mL]	-	100	100	-	-
TRAM34 [μ mol/L]	-	-	10	-	-

Tabelle 9: Lösungen für die Ca²⁺-Messung

$$[Ca^{2+}]_i = Kd * Q * \frac{(R-R_{min})}{(R_{max}-R)} \quad [24]$$

Der Kd-Wert entspricht der Dissoziationskonstante von Fura-2 und Ca²⁺, in diesem Fall 224 nmol/L. R gibt jeweils den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm an. Rmin entspricht dem minimalen Quotienten bei der Eichung mit Ca²⁺-freier Lösung und Rmax dem maximalen Quotienten bei der Eichung mit 5 mM Ca²⁺. Q beschreibt den Quotienten der minimalen (Fmin) und maximalen (Fmax) Fluoreszenzintensität bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm.

3.6 Zelltracking Software „Sabine“

Die Durchführung einer manuellen Segmentierung der aus den Einzelzellmigrations-Experimenten stammenden Bildern mit der Software Amira ist ein sehr zeitaufwendiger Prozess. In Kooperation mit Prof. Burger und Michael Möller vom Institut für Numerische und Angewandte Mathematik der WWU Münster wurde eine Software („Sabine“) entwickelt, die in der Lage ist, den bis dahin manuellen Vorgang der Segmentierung der Einzelzellmigrations-Experimente automatisch durchzuführen. Das Programm macht sich dabei die unterschiedlichen Positionen der Zellen zwischen zwei Bildern des Films zu nutze [42]. Die Zellen werden anfänglich manuell markiert. Nach Ende des automatischen Tracking-Vorgangs wurde kontrolliert, für

3. MATERIAL UND METHODEN

welche Zellen die Segmentierung erfolgreich war.

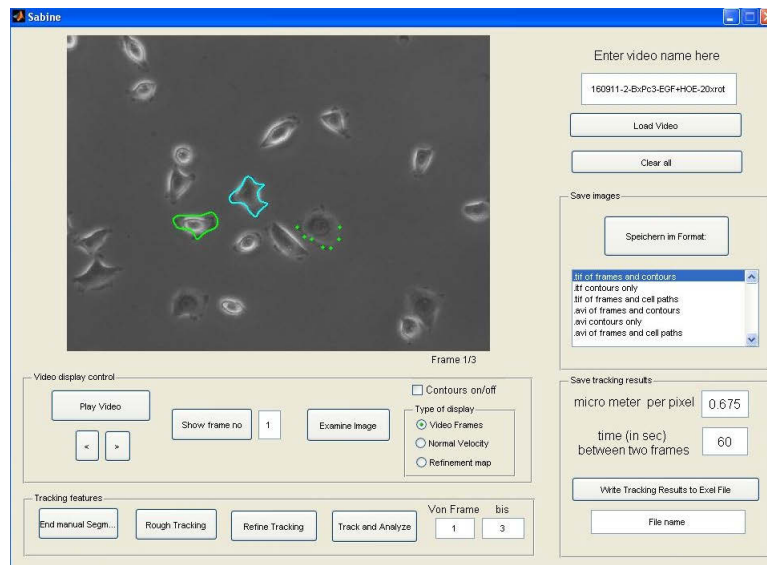


Abbildung 10: Zelltracking Software „Sabine“

Für die Einzelzellmigrations-Experimente mit den AsPC1-Zellen wurden Ergebnisse aus der manuellen und der automatischen Segmentierung verglichen.

3.7 Statistische Methoden und graphische Darstellung

Für die Festlegung der statistischen Signifikanz wurde das Signifikanzniveau 5% ($p \leq 0,05$) gewählt. Die statistische Auswertung erfolgte mit „SPSS Statistics 21“ der Firma IBM. Zuerst wurden die Histogramme und Schiefen der jeweiligen Werteverteilungen betrachtet, um eine annähernde Normalverteilung zu prüfen. Diese war jedoch nie in allen miteinander zu vergleichenden Gruppen gegeben. Aus diesem Grund wurde zur Prüfung des Signifikanzniveaus der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben verwendet. In der Ergebnisdarstellung werden Werte $p \leq 0,05$ im Folgenden als Sternchen dargestellt.

In Liniendiagrammen, z.B. zur Darstellung des Zeit-Geschwindigkeits-Verlaufes bei der Zellmigration, werden jeweils Mittelwerte verwendet und die Schwankungsbreite als Standardfehler (SEM) angegeben. In Box-Plot-Diagrammen, z.B. zur Darstellung der Translokation bei der Zellmigration, enthält die Box immer 50% der Werte und den Median der Werteverteilung. Die Antennen (Whiskers) geben das 5-95-Perzentil an und schließen somit 90% der Werte ein.

3. MATERIAL UND METHODEN

Bei den Diagrammen zur Darstellung der Trajektorien der Migration der Einzelzellen entspricht der rote Kreis jeweils dem Median der Gesamttranslokation aller Zellen in der entsprechenden Gruppe.

4

Ergebnisse

4.1 Nachweis des $K_{Ca}3.1$ -Kanals

Zum Nachweis des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in RLT-PSC, BxPC3-Zellen und einer weiteren PDAC-Zelllinie, den Colo357-Zellen, wurden Proteinlysate dieser Zellen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde ein Westernblot durchgeführt und der

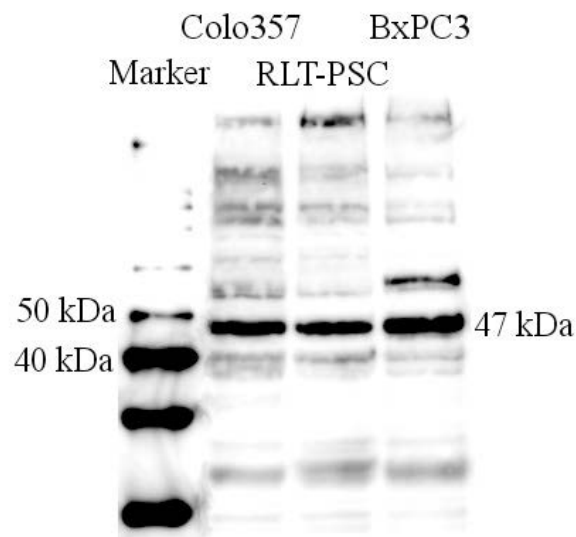


Abbildung 11: Nachweis des $K_{Ca}3.1$ -Kanals

Die Proteinbande bei 47 kDa entspricht dem Molekulargewicht des $K_{Ca}3.1$ -Kanals und zeigt dessen Expression in den drei Zelllinien.

Kanal mit spezifischen Antikörpern detektiert. Ein exemplarisches Ergebnis ist in

4. ERGEBNISSE

Abbildung 11 dargestellt.

Hier zeigt sich, dass alle drei Zelltypen den $K_{Ca}3.1$ -Kanal, der sich als deutlich gefärbte Bande bei 47 kDa zeigt, exprimieren. Eine Inhibition des Kanals mit dem Hemmstoff TRAM34 ist daher möglich. Der Nachweis wurde dreimalig mit jeweils neuen Proteinlysaten wiederholt. Als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinauftragung wurde ein Westernblot für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt.

4.2 Ergebnisse der Einzelzellmigrations Experimente

Die Auswertung wurde mit Ausnahme der AsPC1-Zellen manuell mit der „Amira“ Software durchgeführt. Die gegebenen Geschwindigkeits- und Translokationsangaben beziehen sich immer auf 3 h Versuchsdauer und den Median der jeweiligen Gruppe, da dieser stabiler gegen extreme Werte ist. Die Mittelwerte verhalten sich vom Verhältnis jedoch ähnlich. In den eckigen Klammern hinter dem jeweiligen Wert ist der Standardfehler (SEM) angegeben. Ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen ist in den Diagrammen durch einen Balken mit Sternchen gekennzeichnet, der die beiden Gruppen in der Legende verbindet. In den Diagrammen mit den Trajektorien der einzelnen Zellen entspricht der rote Kreis dem Median der Translokation in der entsprechenden Gruppe.

4.2.1 Stimulation von BxPC3-Zellen durch EGF und konditioniertes Sternzell-Medium

Diese Migrationsexperimente wurden mit BxPC3-Zellen durchgeführt, die 3 h in FCS haltigem Medium adhären konnten (Bedingung A / s. Methoden).

In der Kontrolle zeigte sich eine mediane Migrationsgeschwindigkeit von $0,48 [0,04] \mu\text{m}/\text{min}$. Unter Zugabe von EGF und dem konditionierten PSC-Medium steigerte sich die Geschwindigkeit auf $0,75 [0,07] \mu\text{m}/\text{min}$ bzw. $0,67 [0,06] \mu\text{m}/\text{min}$. Auch bei der Translokation zeigte sich ein Anstieg in beiden Gruppen ($56,6 [9,5] \mu\text{m}$ bzw. $60,1 [8,1] \mu\text{m}$) gegenüber der Kontrolle ($45,7 [5,2] \mu\text{m}$). Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Direktionalität der Migration mit $0,53$ für die Kontrolle, $0,49$ für EGF und $0,53$ für das konditionierte Medium. Auch das phänotypische Erscheinungsbild der Zellen während der Migration zeigte keine Auffälligkeiten. Die

4. ERGEBNISSE

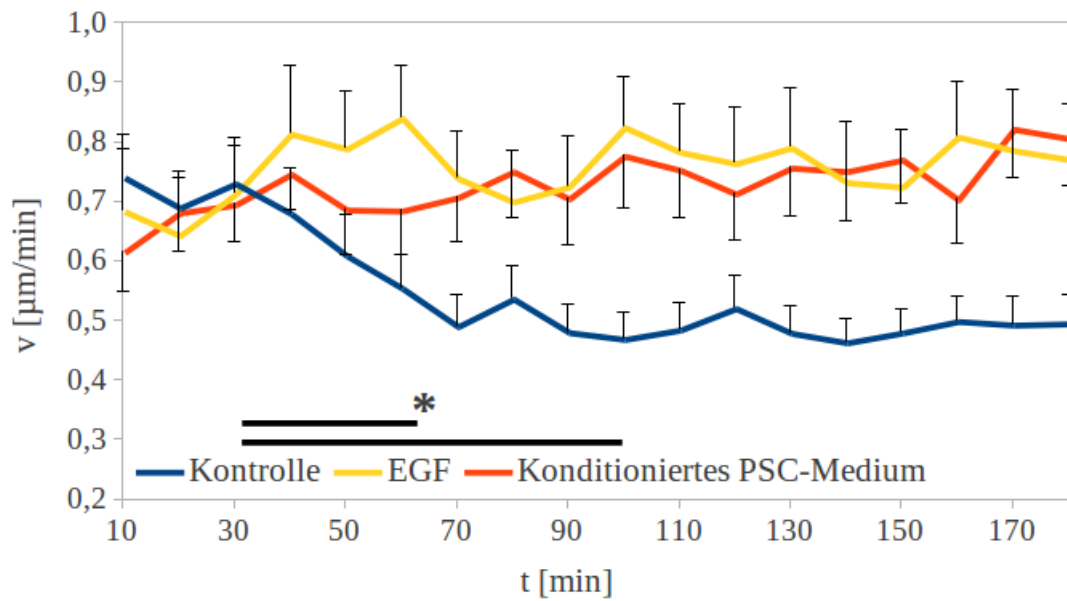


Abbildung 12: Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen mit EGF und konditioniertem Sternzell-Medium

Mittlere Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen während der Einzelzellmigrations-Experimente unter Zugabe von EGF bzw. konditioniertem PSC-Medium.

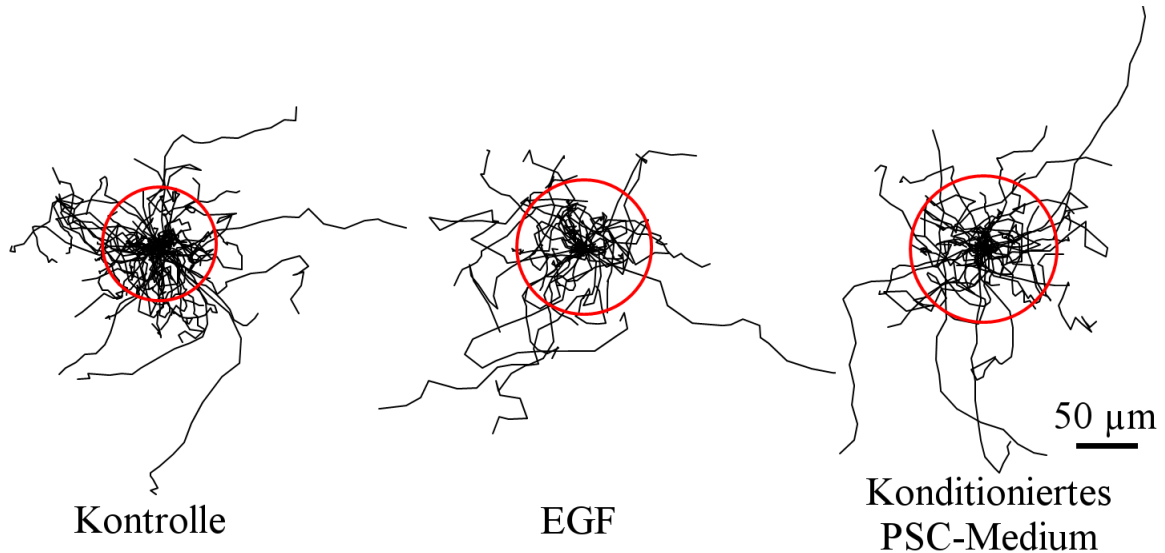


Abbildung 13: Trajektorien von BxPC3-Zellen mit EGF und konditioniertem Sternzell-Medium

Auf einen gemeinsamen Startpunkt normierte Trajektorien von BxPC3-Zellen (Kreis = Median) während der Einzelzellmigrations-Experimente unter Zugabe von EGF bzw. konditioniertem Sternzell-Medium.

4. ERGEBNISSE

Ergebnisse für Geschwindigkeit und Zellpfad-Trajektorien sind in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

Der initiale Abfall der Geschwindigkeit in der Kontrollgruppe könnte auf den nachlassenden Effekt des fehlenden FCS zurückzuführen sein. In dieser Gruppe fehlt also die Stimulation, die anscheinend durch EGF bzw. das konditionierte PSC-Medium gegeben ist, da hier die Geschwindigkeit nicht abfällt.

EGF und von Sternzellen sezernierte Faktoren wirken also stimulierend auf die Zellmigration von BxPC3-Zellen. Aus diesem Grund wurde EGF in den weiteren Experimenten mit den BxPC3-Zellen immer mit eingesetzt, um den Einfluss von HOE642 und TRAM34 auf den EGF-Effekt zu untersuchen. In der nächsten Versuchsreihe wurde die Migration nach Hemmung des NHE1 mit HOE642 beobachtet, da EGF auch eine Wirkung auf den Abbau von NHE1-Proteinen besitzt [13].

Die stimulierenden Effekte von EGF und konditioniertem PSC-Medium zeigten sich nicht bei den AsPC1-Zellen.

4.2.2 Hemmung der PDAC-Migration durch Inhibition des NHE1

Hier wurden AsPC1- und BxPC3-Zellen in Medium mit FCS ausgesät (Bedingung A / s. Methoden). Die Auswertung der BxPc3-Migration erfolgte wie üblich mit „Amira“. Hier zeigte sich in der Kontrollgruppe eine mediane Geschwindigkeit von 0,48 [0,04] $\mu\text{m}/\text{min}$ und Translokation von 45,7 [5,2] μm . Nach Hemmung des NHE1 verringerte sich die Geschwindigkeit auf 0,33 [0,04] $\mu\text{m}/\text{min}$ und die Translokation auf 25,1 [6,1] μm . Bei der Kombination von EGF mit HOE642 ergaben sich Werte von 0,62 [0,04] $\mu\text{m}/\text{min}$ und 47,3 [5,2] μm , die gegenüber der reinen EGF-Stimulation erniedrigt waren. Es fanden sich keine Unterschiede bei Direktionalität und Morphologie der Zellen. Die Direktionalität betrug bei der Kontrolle 0,53, mit HOE642 0,46 und mit der Kombination HOE642 und EGF 0,47.

Bei den AsPC1-Zellen erfolgte die Auswertung mit der „Sabine“ Software. Die mediane Translokation betrug in der Kontrollgruppe 21,8 [5,9] μm und unter Inhibition des NHE1 mit HOE642 11,1 [2,6] μm .

Die Ergebnisse für die BxPC3-Zellen sind in den Abbildungen 14 und 15, die Werte für Geschwindigkeit und Trajektorien der AsPC1-Zellen in Abbildung 16 dargestellt. Die Inhibition des NHE1 führt bei beiden PDAC-Zelltypen zu einer verminderten Migration und verringert den Stimulationseffekt von EGF auf BxPC3-Zellen. Um zu prüfen, ob eine Inhibition des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals ebenfalls in der Lage ist, den EGF-

4. ERGEBNISSE

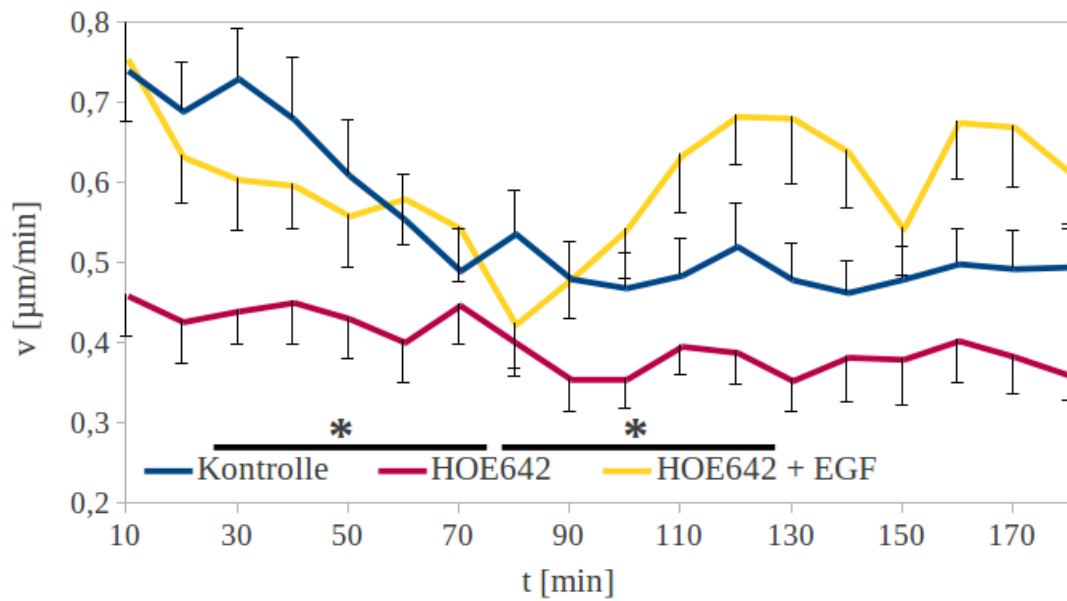


Abbildung 14: Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen mit HOE642 und HOE642+EGF

Mittlere Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen während der Einzelzellmigrations-Experimente unter Zugabe von HOE642 bzw. HOE642 mit EGF.

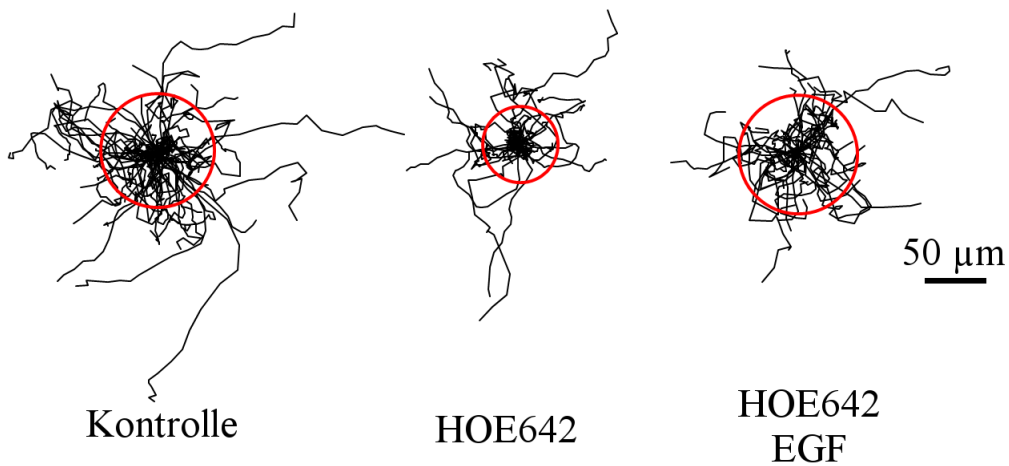


Abbildung 15: Trajektorien von BxPC3-Zellen mit HOE642 und HOE642+EGF

Auf einen gemeinsamen Startpunkt normierte Trajektorien von BxPC3-Zellen (Kreis = Median) während der Einzelzellmigrations-Experimente unter Zugabe von HOE642 bzw. HOE642 mit EGF.

Effekt abzumindern, wurden in der nächsten Versuchsreihe EGF, das Lösungsmittel DMSO und der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibitor TRAM34 eingesetzt.

4. ERGEBNISSE

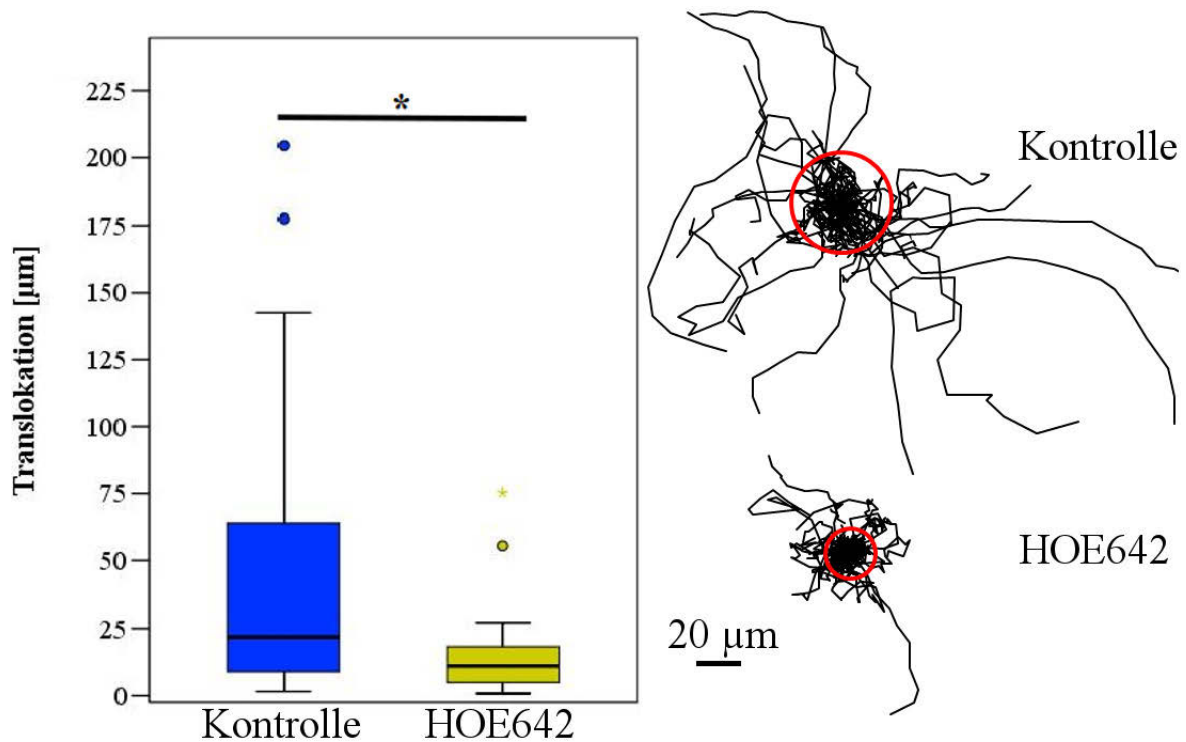


Abbildung 16: Translokation und Trajektorien von AsPC1-Zellen ohne und mit HOE642

Links: Mittlere Translokation von AsPC1-Zellen während der Einzelzellmigrations-Experimente unter Zugabe von HOE642 / Rechts: Auf einen gemeinsamen Startpunkt normierte Trajektorien von AsPC1-Zellen unter Zugabe von HOE642 (Kreis = Median).

4.2.3 Stimulation von BxPC3-Zellen durch Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals

Die Experimente zur Hemmung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals wurden nur mit BxPC3-Zellen unter zwei verschiedenen Voraussetzungen durchgeführt (Bedingung A und B / s. Methoden). In der ersten Versuchsreihe wurden die Zellen 3 h in FCS-haltigem Medium ausgesät und die Inhibition erfolgte mit 10 $\mu\text{mol/L}$ TRAM34. Bei der zweiten Versuchsreihe erfolgte die Zelladhäsion über 24 h in FCS-freiem Medium, um die Grundaktivität der Zellen zu verringern, und es wurden 1 $\mu\text{mol/L}$ TRAM34 sowie wiederum 100 ng/mL EGF eingesetzt. Beide Ansätze führten zu dem gleichen Resultat, weshalb hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Ergebnisse des zweiten Experiments dargestellt werden. Weiterhin erfolgte eine Kontrolle mit dem TRAM34-Lösungsmittel DMSO.

Bei der Betrachtung der Kontrollgruppe fallen die geringere mediane Geschwindigkeit

4. ERGEBNISSE

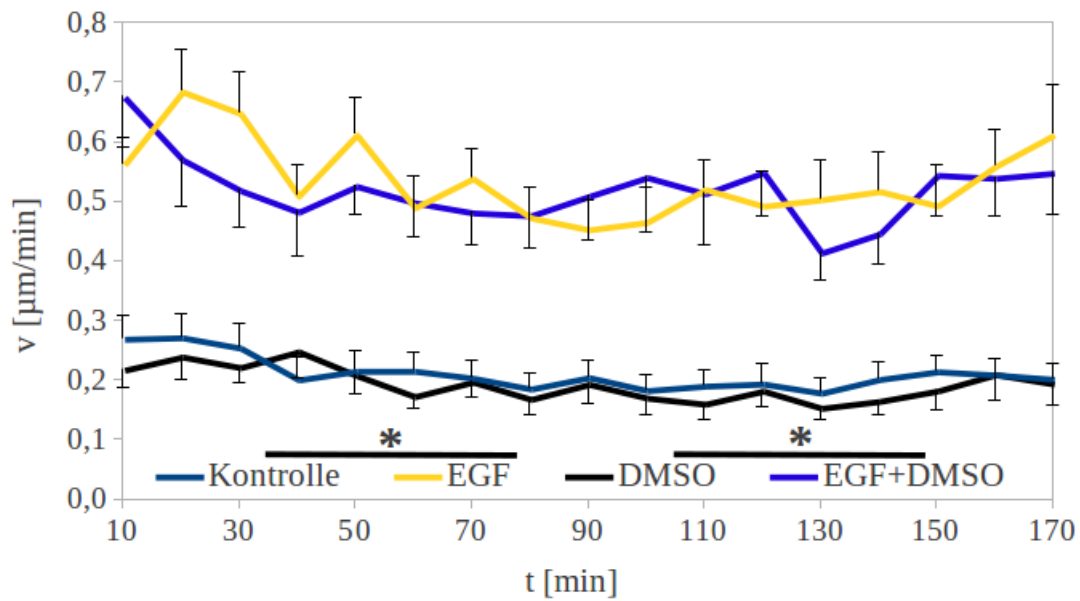


Abbildung 17: Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen mit DMSO und EGF
Mittlere Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen während der Einzelzellmigrations-Experimente unter Zugabe von EGF bzw. DMSO.

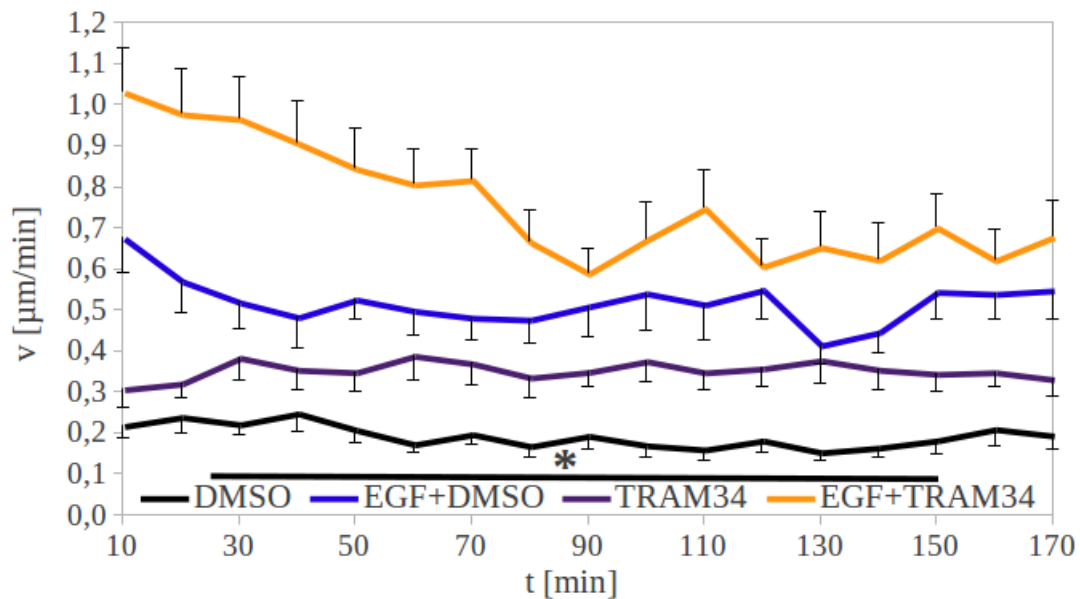


Abbildung 18: Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen mit TRAM34 und EGF

Mittlere Geschwindigkeit von BxPC3-Zellen während der Einzelzellmigrations-Experimente unter Zugabe von TRAM34 bzw. EGF.

von $0,16 [0,02] \mu\text{m}/\text{min}$ und Translokation von $15,1 [3,2] \mu\text{m}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe der anderen Experimente auf. Dies zeigt, dass es durch die Kul-

4. ERGEBNISSE

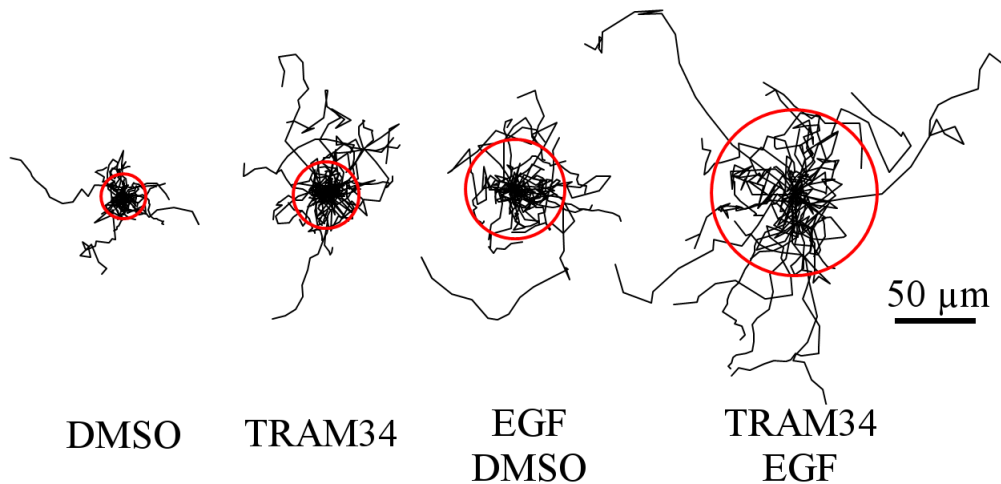


Abbildung 19: Trajektorien von BxPC3-Zellen mit DMSO, TRAM34 und EGF

Auf einen gemeinsamen Startpunkt normierte Trajektorien von BxPC3-Zellen (Kreis = Median) während Einzelzellmigrations-Experimente unter Zugabe von DMSO, TRAM34 bzw. EGF.

tivierung der Zellen in FCS-freiem Medium gelungen ist, die Grundstimulation der Zellen zu verringern. Die DMSO-Kontrolle zeigte mit $0,17 [0,03] \mu\text{m}/\text{min}$ und $13,0 [2,7] \mu\text{m}$ keinen signifikanten Unterschied zu Kontrolle. Die Inhibition des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals erhöhte die Geschwindigkeit auf $0,3 [0,04] \mu\text{m}/\text{min}$ und die Translokation auf $20,0 [3,5] \mu\text{m}$. Eine Steigerung fand sich auch hier bei EGF-Zugabe mit $0,49 [0,04] \mu\text{m}/\text{min}$ und $34,5 [4,0] \mu\text{m}$, wozu sich in der Kombination von EGF-DMSO wieder mit $0,46 [0,05] \mu\text{m}/\text{min}$ und $31,8 [3,7] \mu\text{m}$ kein Unterschied zeigen ließ. Wurden EGF und TRAM34 zusammen verwendet ergab sich eine weitere Steigerung der Geschwindigkeit auf $0,71 [0,05] \mu\text{m}/\text{min}$ und der Translokation auf $52,3 [9,0] \mu\text{m}$. Bei Direktionalität (Kontrolle $0,51$ / EGF $0,42$ / DMSO $0,5$ / TRAM34 $0,44$ / EGF+TRAM34 $0,51$) und Zellmorphologie fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse für die Geschwindigkeit sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt. Die Trajektorien finden sich in Abbildung 19.

Die Kultivierung der BxPC3-Zellen in FCS-freiem Medium verringert ihre Grundaktivität, auf die das Lösungsmittel DMSO bezogen auf die Migration keinen Einfluss besitzt. Unerwartet zeigt sich die Steigerung der BxPC3-Zellmigration durch die Inhibition des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals mit TRAM34. EGF stimuliert auch hier BxPC3-Zellen und zeigte gemeinsam mit TRAM34 eine synergistische Aktivierung der Migration. Die in den Einzelzellmigrations-Experimenten beobachteten Effekte von EGF und TRAM34 wurden im nächsten Schritt im Wundheilungsassay und damit mit größeren

4. ERGEBNISSE

Zellverbänden überprüft. Zugleich bestand die Möglichkeit, BxPC3- und RLT-PSC-Zellen gleichzeitig zu betrachten, um zu testen, ob sich der Effekt des konditionierten PSC-Mediums direkt durch einen RLT-PSC-Zellverband reproduzieren lässt. Die Ergebnisse finden sich in Abschnitt 4.4.

Es folgt die Ergebnisauswertung für die automatische Zell-Tracking Software „Sabine“, die sich nur für die Auswertung von Einzelzellmigrations-Experimenten eignete.

4.3 Ergebnisse mit der „Sabine“-Software

Die Prüfung der automatischen Zell-Tracking Software „Sabine“ erfolgte anhand von 17 AsPC1-Zellen aus 4 verschiedenen Migrationsfilmen. Die automatisch ermittelten Ergebnisse der Zellen, bei denen der Trackingvorgang ohne Fehler bis zum Ende durchgeführt werden konnte, wurden mit den manuell bestimmten Werten im Bezug auf Geschwindigkeit und Translokation verglichen. Ein Vergleich der Zellflächen war auf Grund mangelnder Qualität der Ergebnisse nicht möglich.

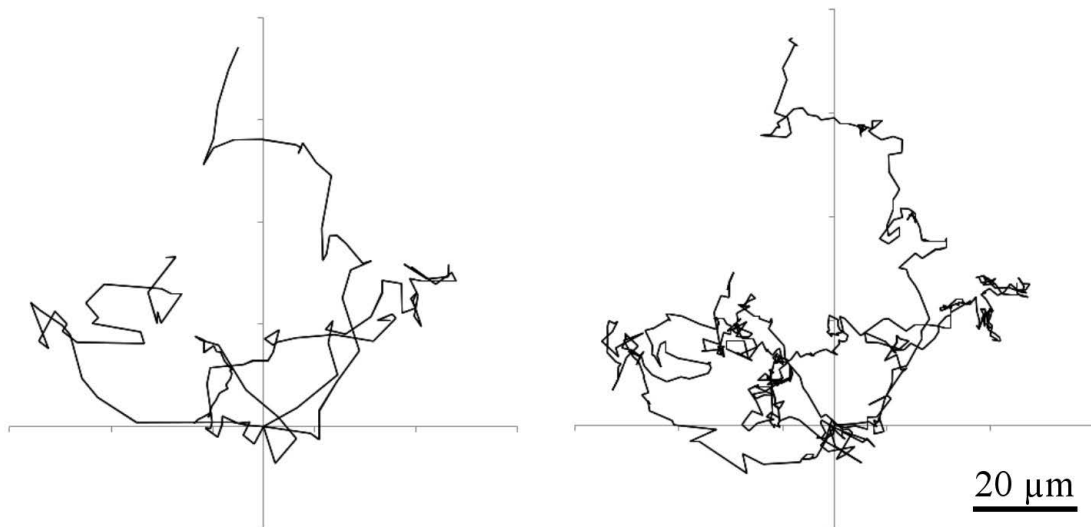


Abbildung 20: „Amira“- und „Sabine“-Trajektorien

Beispiel für die mit „Amira“ (links) und „Sabine“ (rechts) bestimmten Trajektorien (je 5 Zellen), die auf einen gemeinsamen Startpunkt (Schnittpunkt des Koordinatenkreuzes) normiert wurden. Die Nutzung von „Sabine“ vereinfacht die Verwendung kleinerer Bildaquisitionsintervalle mit dem Ergebnis feinerer Trajektorien.

Die mittleren Werte für Geschwindigkeit und Translokation für die 4 Filme sind in Tabelle 10 dargestellt. Durchschnittlich ergaben sich für die Geschwindigkeit bei „Sabine“ $0,63 [0,05] \mu\text{m}/\text{min}$ und Amira $0,47 [0,07] \mu\text{m}/\text{min}$, sowie für die Transloka-

4. ERGEBNISSE

Film	v S [$\mu\text{m}/\text{min}$]	v A [$\mu\text{m}/\text{min}$]	T S [μm]	T A [μm]
1	0,56	0,31	46,6	46,2
2	0,57	0,33	40,3	41,4
3	0,97	0,94	60,5	65,7
4	0,53	0,49	35,3	31,1
ges.	0,63	0,47	44,5	44,7

Tabelle 10: Vergleich der „Sabine“-Software (S) mit „Amira“(A)

tion 44,5 [7,4] μm bzw. 44,7 [7,6] μm . Abschließend lässt sich feststellen, dass, unter der Voraussetzung einer manuellen Nachkontrolle des automatischen Vorgangs, die Bestimmung der Zell-Translokation nach beiden Methoden mit gleichwertiger Genauigkeit bestimmt werden kann. Zudem lässt sich mit geringerem Aufwand ein feinerer Zellpfad (Abbildung 20) bestimmen, da mit „Sabine“ die Nutzung kleinerer Bildaquisitionsintervalle möglich ist. Für die Ermittlung der Geschwindigkeit eignet sich das „Sabine“-Programm allerdings zum jetzigen Zeitpunkt nicht.

4.4 Ergebnisse des Wundheilungsassays

BxPC3-Zellen bildeten im Wundheilungsassay einen geschlossenen und kompakten Verband, aus dem sich keine einzelnen Zellen lösten. Der Zusammenhalt der RLT-PSC-Zellen war wesentlich geringer, und die Zellen trennten sich bereits nach kurzer Zeit.

Für die Erfassung der Migrationsgeschwindigkeit von BxPC3-Zellen wurde der Zuwachs an der mit Zellen bedeckten Fläche herangezogen und auf die Breite des Bildausschnittes normiert, da nicht alle Kameras an den Mikroskopen die gleiche Auflösung besaßen. Daraus resultiert die mittlere Strecke, die der BxPC3-Zellverband in die Wunde zurücklegt. Dieses Vorgehen war bei den RLT-PSC-Zellen nicht möglich, da kein zusammenhängender Verband bestand. Deshalb wurden pro Experiment exemplarisch 10 Zellen zufällig ausgewählt und Geschwindigkeit sowie Migration in die Wunde hinein bestimmt.

In den eckigen Klammern hinter den angegebenen Werten ist wieder der Standardfehler (SEM) angegeben.

4. ERGEBNISSE

4.4.1 Effekt der Comigration auf BxPC3-Zellen

In den Experimenten mit einzelnen BxPC3-Zellen zeigte sich eine Stimulation der Migration durch das konditionierte Sternzell-Medium. Aus diesem Grund bestand die Annahme, dass im Wundheilungsassay die Wundschlussbewegung der BxPC3-Zellen durch die Anwesenheit von RLT-PSC-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite beschleunigt wird.

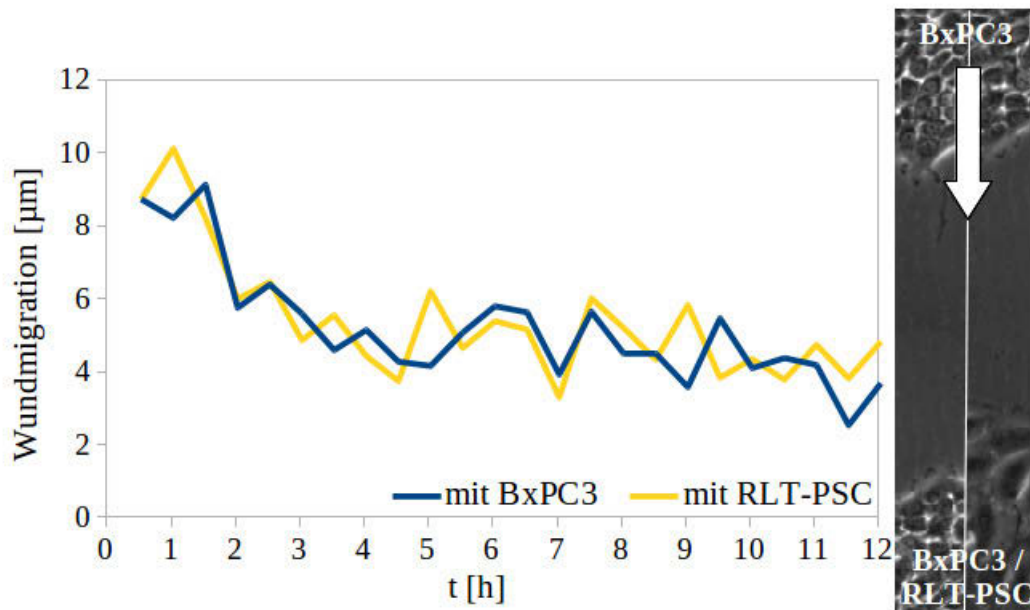


Abbildung 21: Wundmigration von BxPC3-Zellen gegen RLT-PSC-Zellen

Migration des BxPC3-Zellverbandes in die Wunde bei der Migration gegen BxPC3-Zellen bzw. RLT-PSC-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite.

Die Auswertung der BxPC3-Zellen zeigte eine mittlere Migration in die Wunde pro 30 Minuten von $5,3 [1,2] \mu\text{m}$ in der Kontrollgruppe mit BxPC3-Zellen auf der anderen Wundseite. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied mit RLT-PSC-Zellen auf dieser Seite, da die Migration in die Wunde pro 30 min hier $5,4 [1,4] \mu\text{m}$ betrug (Abbildung 21). Zellmorphologische Unterschiede waren ebenfalls nicht zu beobachten.

Die Stimulation der Tumorzellen durch Sternzellen ist also im Wundheilungsassay der Stimulation durch die Tumorzellen selbst nicht über- oder unterlegen. Es folgen analog die Ergebnisse für die RLT-PSC-Zellen.

4. ERGEBNISSE

4.4.2 Effekt der Comigration auf RLT-PSC-Zellen

Analog zu der Erwartung bei den BxPC3-Zellen bestand auch bei den RLT-PSC-Zellen die Vermutung, dass ihre Migration in die Wunde durch die Anwesenheit der Tumorzellen beschleunigt wird, weil andere Experimente eine Stimulation der RLT-PSC-Zellen durch konditionierte Medien der Tumorzellen im Einzelzellmigrations-Experiment gezeigt hatten.

Die mittlere Geschwindigkeit der Migration betrug in reinen RLT-PSC-Wundassays $0,26 [0,01] \mu\text{m}/\text{min}$ mit einer mittleren Translokation von $85,0 [5,2] \mu\text{m}$ in die Wunde. Für die Assays mit BxPC3-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite ließen sich die Werte $0,24 [0,01] \mu\text{m}/\text{min}$ und $64,6 [3,6] \mu\text{m}$ bestimmen (Abbildung 22). Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Zellmorphologie.

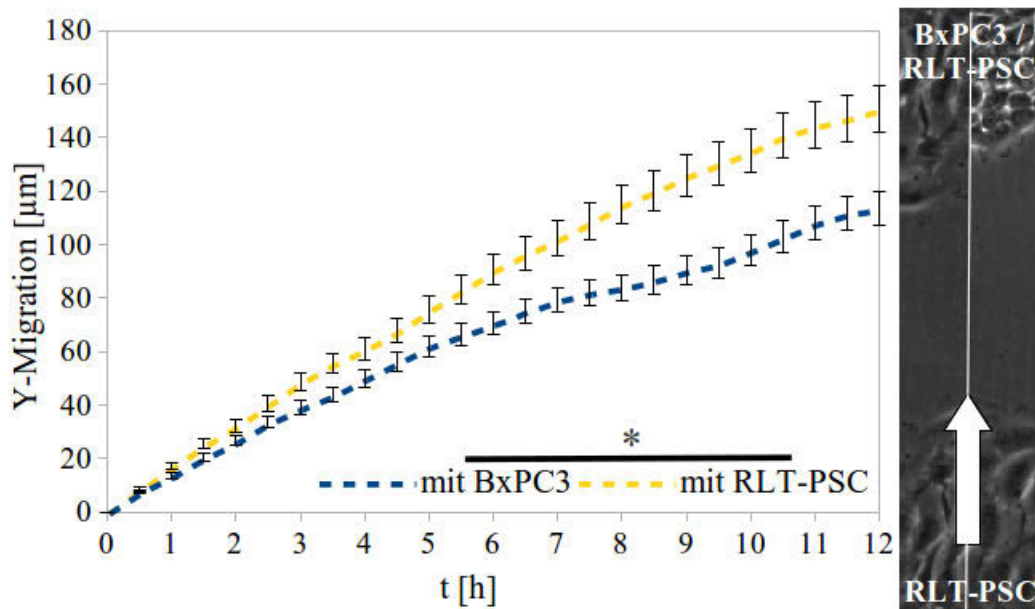


Abbildung 22: Wundmigration von RLT-PSC-Zellen gegen BxPC3-Zellen

Kumulative Gesamtmigration in Y-Richtung der RLT-PSC-Zellen bei der Migration gegen BxPC3-Zellen bzw. RLT-PSC-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite.

Wider Erwarten führte die Anwesenheit von Sternzellen auf der gegenüberliegenden Seite bei den RLT-PSC-Zellen zu einer besseren Wundschlussbewegung bei annähernd gleicher Migrationsgeschwindigkeit, als es in Anwesenheit von BxPC3-Zellen der Fall war. Zugleich betrug die Direktionalität mit RLT-PSC-Zellen auf der gegenüberliegenden Seite $0,79 [0,02]$ und mit BxPC3-Zellen $0,63 [0,03]$. Beide Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Sternzellen eine größere chemotaktische Attraktivität auf andere Sternzellen besitzen, als die Tumorzellen auf Sternzellen.

4. ERGEBNISSE

Nachdem mit diesen beiden Experimenten der Grundeffekt von BxPC3- und RLT-PSC-Zellen aufeinander bestimmt wurde, erfolgte die Prüfung der Effekte von EGF und TRAM34 auf den Zellverband in diesem Versuchsaufbau, um die Frage zu beantworten, ob EGF und TRAM34 den gleichen stimulierenden Effekt wie in den Einzelzellmigrations-Experimenten zeigen.

4.4.3 Stimulation von BxPC3- und RLT-PSC-Zellen durch EGF

In diesem Ansatz befanden sich auf der gegenüberliegenden Wundseite immer BxPC3-Zellen. Hier bestätigte sich die stimulierende Wirkung von EGF auf die Zellen. So wurde die Wundmigration pro 30 min bei den BxPC3-Zellen von $5,3 [1,2] \mu\text{m}$ in Anwesenheit von EGF auf $7,7 [1,0] \mu\text{m}$ gesteigert (Abbildung 23).

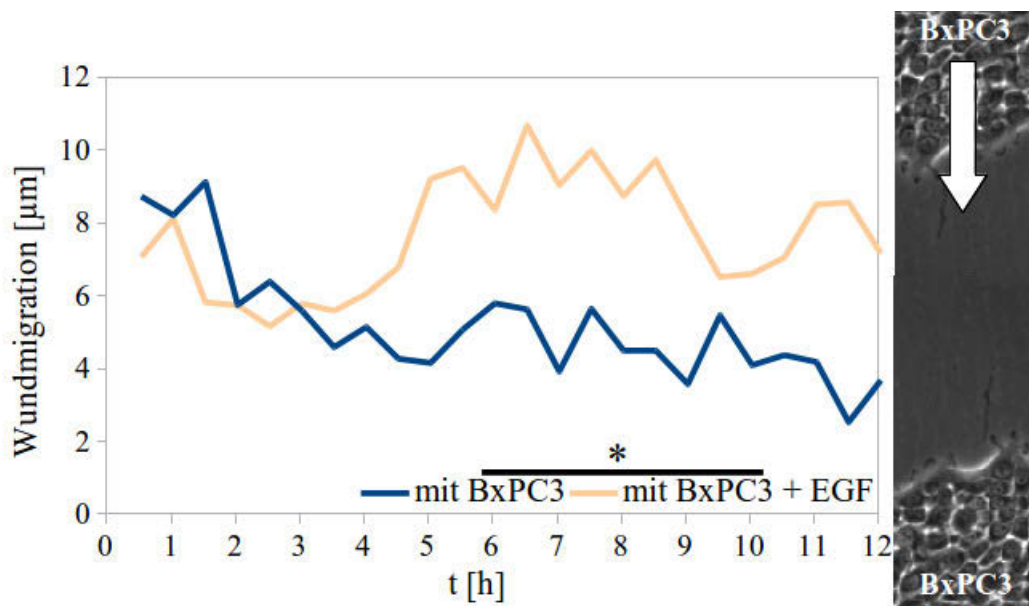


Abbildung 23: Wundmigration von BxPC3-Zellen mit EGF

Migration des BxPC3-Zellverbandes in die Wunde bei der Migration gegen BxPC3-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite unter Zugabe von EGF.

Bei den RLT-PSC-Zellen betragen die Mittelwerte für Geschwindigkeit und Migration in die Wunde in der Kontrollgruppe $0,24 [0,01] \mu\text{m}/\text{min}$ und $64,6 [3,6] \mu\text{m}$ und in der EGF-Gruppe $0,27 [0,01] \mu\text{m}/\text{min}$ und $80,1 [5,0] \mu\text{m}$ (Abbildung 24). Bezüglich der Zellmorphologie ergaben sich bei beiden Zelltypen keine auffallenden Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die stimulierende Wirkung auf die Zellmigration von EGF auf Tumor- und Sternzellen

4. ERGEBNISSE

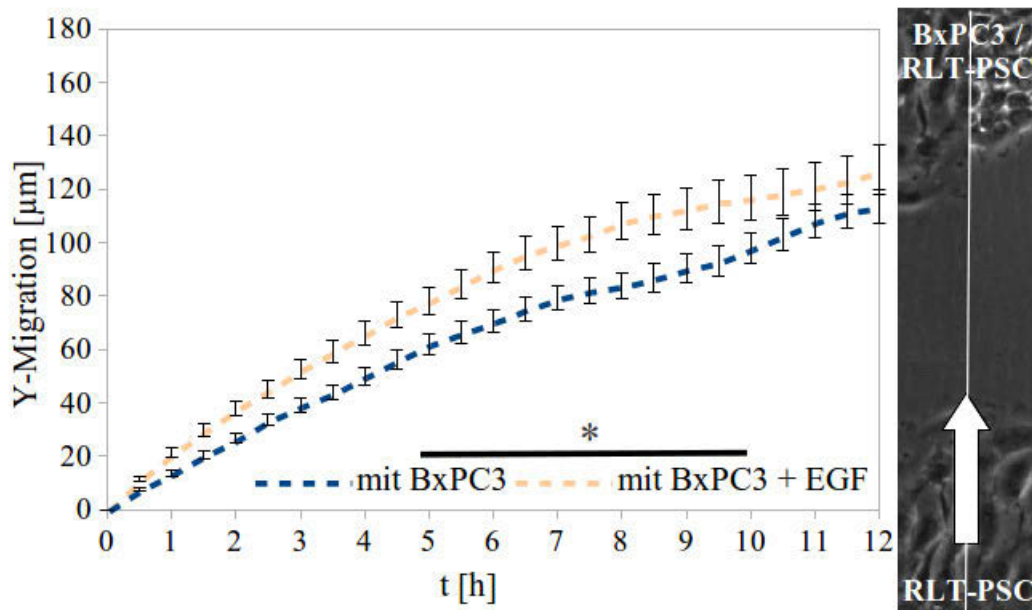


Abbildung 24: Wundmigration von RLT-PSC-Zellen mit EGF
Kumulative Gesamtmigration in Y-Richtung der RLT-PSC-Zellen bei der Migration gegen BxPC3-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite unter Zugabe von EGF.

zeigt sich auch im Wundheilungsassay. Es folgt in diesem Zusammenhang die Auswertung für TRAM34.

4.4.4 Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals im Wundheilungsassay

Die Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals erfolgte mit TRAM34, und auf der gegenüberliegenden Seite der Wunde befand sich der jeweils andere Zelltyp. Ziel war es zu überprüfen, ob die in den Einzelzellmigrations-Experimenten festgestellte Stimulation der Zellen sich auch auf den Wundheilungsassay übertragen lässt.

Bei den BxPC3-Zellen führte die Inhibition des Kanals zu einem Anstieg der mittleren Wundmigration pro 30 min von $5,4 [1,4] \mu\text{m}$ in der Kontrollgruppe auf $8,7 [1,9] \mu\text{m}$. Allerdings ergab sich hier auch ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und der DMSO-Gruppe mit $7,3 [1,7] \mu\text{m}$. DMSO scheint also auf den Zellverband anders zu wirken als auf die einzelnen Zellen (Abbildung 25).

In unserem Labor wurden bereits Einzelzellmigrations-Experimente mit stimulierten RLT-PSC-Zellen nach Zugabe von TRAM34 durchgeführt. Hier zeigte sich eine Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit und eine Änderung der Zellmorphologie mit Bildung von langen Cytoplasmaausläufern. Hieraus ergab sich die Frage, ob sich diese Ergebnisse auch im Wundassay und bei Anwesenheit von BxPC3-Zellen repro-

4. ERGEBNISSE

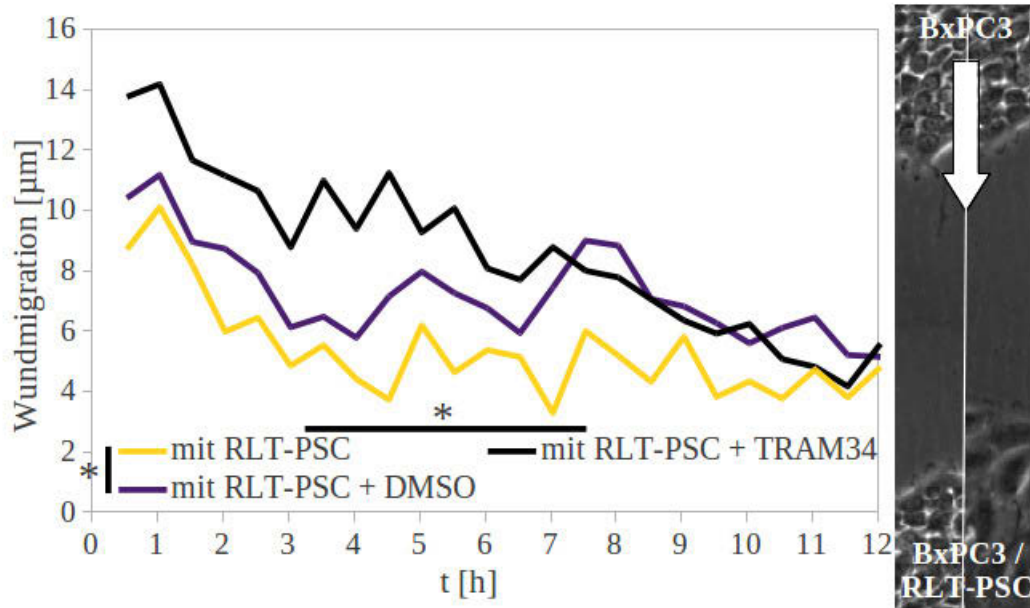


Abbildung 25: Wundmigration von BxPC3-Zellen mit TRAM34
Migration des BxPC3-Zellverbandes in die Wunde bei der Migration gegen RLT-PSC-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite unter Zugabe von DMSO und TRAM34.

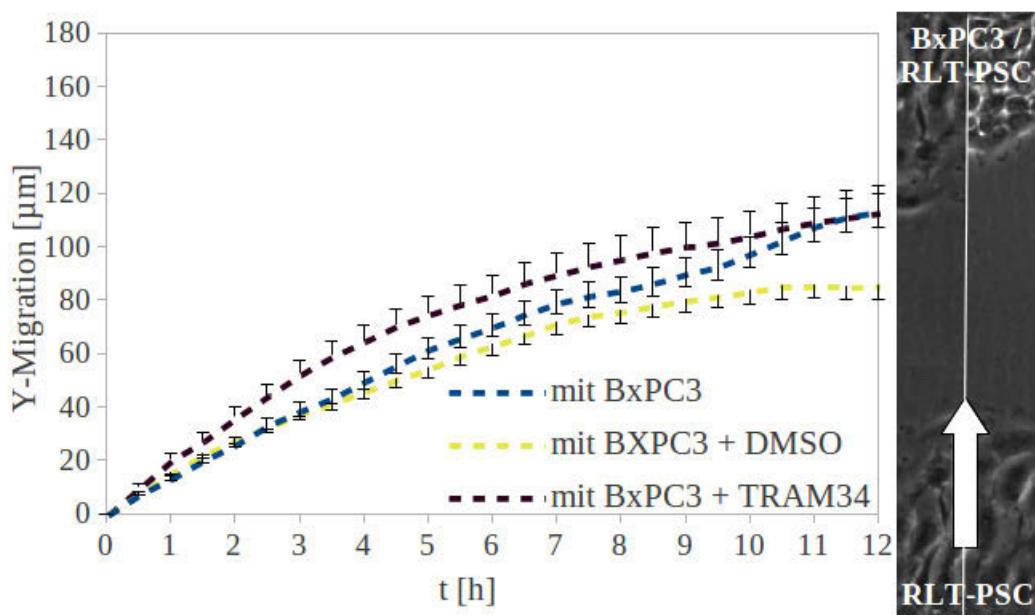


Abbildung 26: Wundmigration von RLT-PSC-Zellen mit TRAM34
Kumulative Gesamtmigration in Y-Richtung der RLT-PSC-Zellen bei der Migration gegen BxPC3-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite unter Zugabe von DMSO und TRAM34.

4. ERGEBNISSE

duzieren lassen.

Im Wundassay ergab sich in der Kontrollgruppe der RLT-PSC-Zellen eine mittlere Geschwindigkeit von $0,24 [0,01] \mu\text{m}/\text{min}$ bei einer Wundmigration von $64,6 [3,6] \mu\text{m}$. Die $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Inhibition führte bei den Sternzellen zu einer mittleren Geschwindigkeit von $0,24 [0,01] \mu\text{m}/\text{min}$ und einer mittleren Translokation in die Wunde von $73,5 [6,0] \mu\text{m}$ (Abbildung 26). Hier zeigte sich kein signifikanter Effekt von TRAM34 auf die RLT-PSC-Zellen, und es ließen sich keine zellmorphologischen Auffälligkeiten beobachten.

DMSO verringerte die Geschwindigkeit zwar auf $0,2 [0,01] \mu\text{m}/\text{min}$, war aber nicht in der Lage, die Wundmigration mit $56,7 [3,2] \mu\text{m}$ signifikant zu verändern.

TRAM34 hatte hier einen positiven Effekt auf die Migration der BxPC3-Zellen, allerdings auch DMSO. Die Migration der RLT-PSC-Zellen wurde von TRAM34 nicht beeinflusst.

Aus den im Wundheilungsassay gewonnenen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob EGF oder TRAM34 ihre Effekte auf die Migration des BxPC3-Zellverbandes über eine Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Konzentration bewirken. Aus diesem Grund wurden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen durchgeführt.

4.5 Ergebnisse der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen

Bei den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen gelangen die am besten verwertbaren Ergebnisse mit den BxPC3-Zellen in Kombination mit den RLT-PSC-Zellen. Bei den anderen Versuchsbedingungen ergaben sich widersprüchliche Reaktionen der Zellen, die zu stark auf die Belichtung und die ggf. veränderte Flussgeschwindigkeit beim Lösungswechsel reagierten.

Der mittlere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Wert der BxPC3-Zellen pendelte sich nach 10 Minuten Kontrollphase bei ca. 55 nM ein. Während der Kontrollphase wurde kontinuierlich mit Ringerlösung perfundiert. Die Zugabe von EGF bewirkte mit ungefähr 8 Minuten Verzögerung einen Anstieg des Calciums auf ca. 65 mM. Bei der folgenden Zugabe von EGF mit TRAM34 stagnierte der Anstieg mit leicht fallender Tendenz (Abbildung 27). Beim Lösungswechsel ist davon auszugehen, dass nach Umstellung der Perfusion die komplette Lösung in den Glasbodenschälchen nach 1-2 min ausgetauscht war.

Die Messung zeigt, dass EGF in der Lage ist, den intrazellulären Calcium-Spiegel der BxPC3-Zellen in geringem Maße zu steigern. Eine anschließende Hemmung des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals durch Zugabe von TRAM34 unterbindet den Anstieg. Allerdings

4. ERGEBNISSE

scheinen die Zellen auch auf die Belichtung oder die Perfusion zu reagieren, wie der anfängliche Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ zeigt.

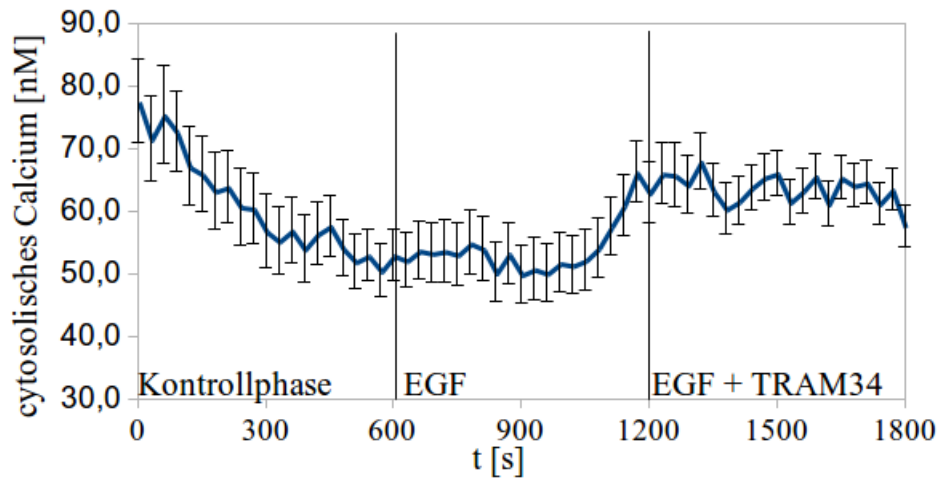


Abbildung 27: Calcium-Messung mit BxPC3-Zellen

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ in BxPC3-Zellen im Wundheilungsassay mit RLT-PSC-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite. Nach 10 min Spülung mit Ringerlösung erfolgte für jeweils weitere 10 min die Perfusion mit Ringerlösungen mit EGF bzw.

EGF + TRAM34 Zusatz. Die vertikalen Linien geben jeweils den Beginn des Lösungswechsels an, sodass davon auszugehen ist, dass die Lösung 1-2 min später komplett ausgetauscht war.

5

Diskussion

Die Zellmigration ist ein essentieller Bestandteil für viele physiologische und pathophysiologische Vorgänge in Organismen. Im Hinblick auf die Entstehung von malignen Tumoren ermöglicht sie zum einen Immunzellen das Aufspüren entarteter Zellen und deren Zerstörung, zum anderen ist Migration aber auch nötig für die Entstehung von Metastasen und die Überwindung von Kompartimenten der extrazellulären Matrix mit anschließender Absiedlung der Tumorzellen in anderen Geweben. Dabei sind zwei allgemeine Faktoren zu unterscheiden: Der generelle Mechanismus der Migration durch das komplexe Zusammenspiel von Protrusion des Lammelipodiums und Retraktion des Zellkörpers über die ständige Modifizierung von Aktin-Filamenten und die reversible Bindung von Adhäsionsmolekülen zur extrazellulären Matrix bestimmt Form und Geschwindigkeit der Migration einer einzelnen Zelle [44, 63, 81]. Dieser Teil wurde im Wesentlichen in dieser Arbeit betrachtet. Der andere Bereich bezieht sich auf die Fähigkeit von Zellen zur Bewegung in eine spezielle Richtung, die Chemotaxis, bei der Gradienten verschiedener extrazellulärer Botenstoffe in der Lage sind, die Zelle gezielt zu lenken [28].

Die allgemeine Stoffwechselaktivität von Zellen spielt vor allem in der Tumorbiologie eine übergeordnete Rolle, da viele therapeutische Ansätze auf eine Reduzierung des Zellstoffwechsels der Tumorzellen abzielen, um deren Proliferationsrate zu senken. Beim PDAC sind die therapeutischen Möglichkeiten allerdings eingeschränkt, und man hofft, mit den pankreatischen Sternzellen einen neuen Ansatzpunkt gefunden zu haben. Zur genauen Rolle der Sternzellen im Zusammenspiel mit den PDAC-Zellen, vor allem im Bezug auf die Zellmigration, bleiben allerdings noch Fragen offen, obwohl die Stimulierung der PDAC-Proliferation und der Gewebe-Desmoplasie bereits bekannt sind [5, 48].

Wie in jedem Tumor ist auch die Expression von Ionenkanälen, Rezeptoren und

5. DISKUSSION

Transportproteinen ein oft auch prognostisch wichtiger Punkt. Eine Änderung der Expression von Calcium-transportierenden Proteinen, wie z.B. dem TRPV6-Rezeptor oder der Ca^{2+} -ATPase PMCA, können sowohl für die Proliferation notwendige Stoffwechselwege aktivieren als auch den Apoptosevorgang behindern [19]. Beim PDAC wird meistens der EGFR überexprimiert, was mit gesteigerter Tumorproliferation und Invasivität einhergeht [54]. Gleiches wurde auch für den Na^+/H^+ -Austauscher NHE1 in anderen Tumoren, allerdings noch nicht für das PDAC, gezeigt [13]. Weiterhin führt eine Inhibition des Calcium-aktivierten Kalium-Kanals $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ in PDAC-Zellen zu einer Verminderung der Proliferationsrate, wobei der Effekt auf die Zellmigration dieser Zellen noch unklar ist [30]. Auch andere Bereiche wie die Schmerzwahrnehmung können durch veränderte Expressionsmuster im Tumorgewebe modifiziert werden. Bei Pankreastumoren wurde in diesem Zusammenhang eine verstärkte Expression des an der Nozizeption beteiligten Rezeptors TRPV1 nachgewiesen [53].

5.1 EGF stimuliert Migrationsvorgänge beim PDAC

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein aktivierender Ligand einer Reihe von Rezeptoren, wie z.B. des Tyrosinkinase-Rezeptors EGFR. Eine Bindung von EGF an den EGFR bewirkt unter anderem über den ras/raf/MAPK-Signalweg eine Steigerung von Proliferation und Migration in vielen Zellen [52, 54].

Für die BxPC3- und die RLT-PSC-Zellen konnte in allen durchgeführten Experimenten eine deutliche Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit festgestellt werden. Bei den Tumorzellen wurde dies sowohl bei der Migration einzelner Zellen als auch bei der des Zellverbandes beobachtet. Einzelne BxPC3-Zellen ließen sich auch durch das konditionierte Medium der RLT-PSC-Zellen stimulieren, was sich gut mit der bereits beschriebenen Freisetzung von EGF aus pankreatischen Sternzellen erklären ließe, wenn sich auch aus den hier festgestellten Ergebnissen der Zusammenhang nicht sicher belegen lässt. Zur weiteren Abklärung könnte die Möglichkeit einer Inhibition des EGFR in Kombination mit dem konditionierten Sternzell-Medium in Erwägung gezogen werden.

Auf Ebene des intrazellulären Calciums ließ sich in den BxPC3-Zellen eine leichte Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter EGF zeigen. Wahrscheinlich ist eine Freisetzung des Calciums aus intrazellulären Speichern, obwohl die Herkunft hier nicht geklärt

5. DISKUSSION

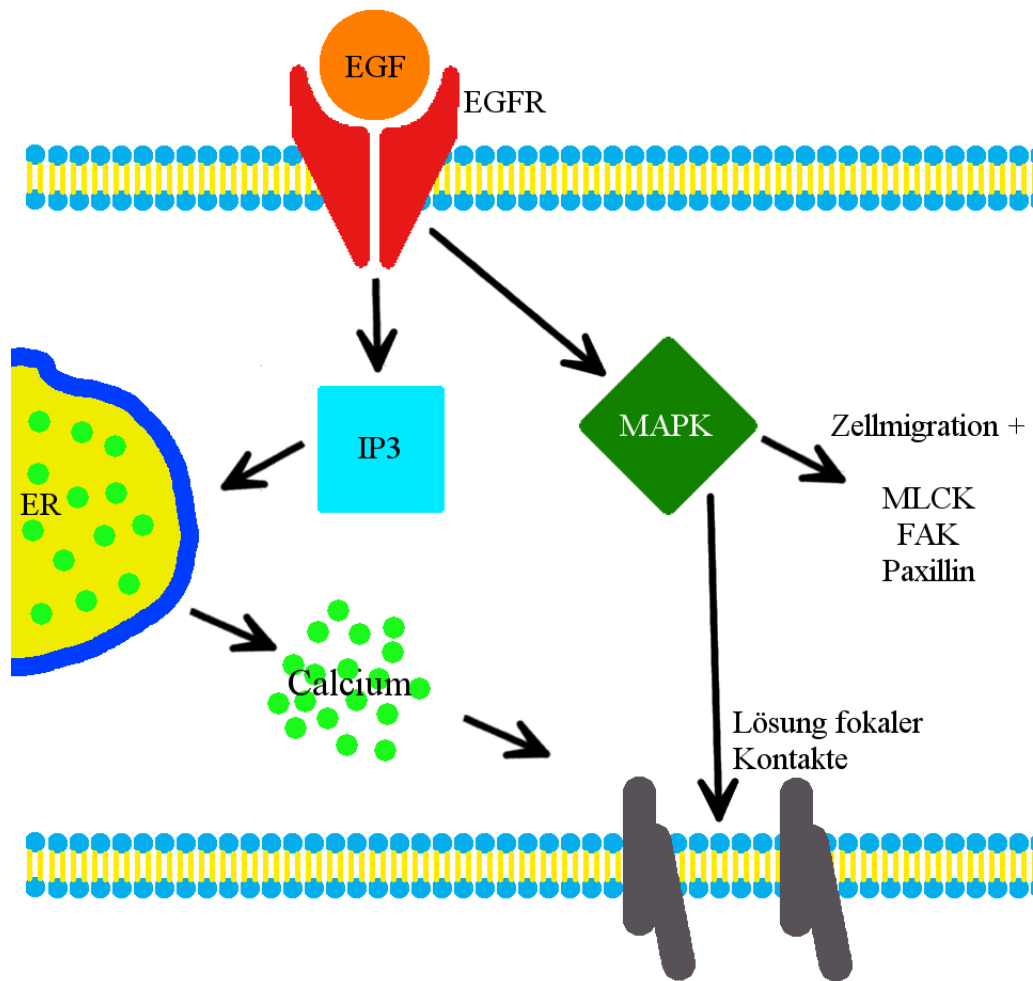


Abbildung 28: Schema der EGF Wirkung

EGF aktiviert über den EGFR den IP₃-Signalweg, der eine Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) bewirkt, und den MAPK-Signalweg, über den fokale Kontakte gelockert und die Zellmigration gefördert wird.

wurde. Grund für diese Annahme ist, dass EGF über Phosphatidylinositoltrisphosphat (IP₃) die intrazelluläre Calciumfreisetzung fördert [9]. Die Aktivierung des EGFR führt über die Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C γ (PLC γ) zur Entstehung von IP₃, das an den IP₃-Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum bindet. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einem Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER in das Cytoplasma [9, 14]. Der geringe Ausfall des Anstiegs lässt allerdings eher darauf schließen, dass die stimulierende Wirkung von EGF auf die Migration der Zellen über andere Signalwege als die Veränderung der [Ca²⁺]_i abläuft. Der Typ des EGFR-Signalweges lässt hier eine Optimierung der Aktivität von an der Migration beteiligten Proteinen durch Phosphorylierung sowie

5. DISKUSSION

eine Steigerung der Proteinexpression vermuten. Die Aktivierung der MAPK über den EGFR, ras und raf führt so unter anderem zu einer Phosphorylierung der MLCK (myosin light chain kinase), der FAK (focal adhesion kinase) und dem fokalen Protein Paxillin [27, 67, 68]. Um dies zu prüfen, könnte eine Westernblot-Analyse des Protein-Phosphorylierungsstatus dieser Proteine durchgeführt werden. Die Destabilisierung fokaler Kontakte durch EGF über die eben genannten Proteine könnte außerdem dazu beitragen, die Lösung von der Kollagenmatrix zu erleichtern und so die Zellmigration zu beschleunigen. Die Stärke der Zelladhäsion unter EGF-Einfluss ließe sich durch die Durchführung eines Adhäsionsassays vereinfacht abbilden.

5.2 Der NHE1 ist notwendig für die PDAC Migration

Der Natrium-Protonen-Austauscher NHE1 ist wesentlich an der Aufrechterhaltung von intrazellulärem pH und des Zellvolumens beteiligt. Zudem wurde bei vielen Zelltypen eine Beteiligung an der Zellmigration nachgewiesen [32, 66, 70].

Die Notwendigkeit der Aktivität des NHE1 für die normale Migration von AsPC1- und BxPC3-Zellen zeigte sich in der eindeutig verringerten Geschwindigkeit beider Zellreihen, wenn der NHE1 mit dem Hemmstoff HOE642 inhibiert wurde. Dies ist vereinbar mit dem Effekt der NHE1-Inhibition auf andere Zelltypen und der Beeinflussung von fokalen Adhäsionsmolekülen durch NHE1-regulierte pH-Nanodomänen [36, 70]. Auch die Struktur des corticalen Aktinnetzwerks der migrierenden Zelle wird durch den NHE1 beeinflusst. Dafür ist die direkte Verbindung zu den Aktin-Bindeproteinen Ezrin, Radixin und Moesin verantwortlich, die bei Hemmung der NHE1-Funktion zu einer gestörten Aktin-Regulation führen könnte [16]. Die verringerte NHE1-Aktivität führt zu einer extrazellulären Alkalinisierung und beeinträchtigt dadurch die Bindung zwischen Integrinen und Matrix [36]. Zugleich wird die Ausbildung des intra- und extrazellulären pH-Gradienten in migrierenden Zellen gestört: Die Gradienten flachen durch die reduzierte NHE1-Funktion ab [40]. Dies spielt auch eine wesentliche Rolle für die Metastasierung von Tumorzellen: Die vom NHE1 erzeugten pH-Gradienten sind essentiell für die Ausbildung von invasiven Cytoplasmaausläufern, mit deren Hilfe sich die Tumorzelle durch die extrazelluläre Matrix bewegt. Für diesen Vorgang sind besonders die Proteine Cortactin und Cofilin zusammen mit dem NHE1 von Bedeutung [38]. Weiterhin kann die NHE1-Inhibition über die Modulation colokalisierter fokaler Kontakte, die mit dem Cytoskelett ver-

5. DISKUSSION

ankert sind, die Reorganisation des Cytoskeletts stören [36]. In stark NHE1 exprimierenden Tumoren wie dem PDAC kann also eine Hemmung der NHE1-Aktivität zu einer Störung von Metastasierungsprozessen führen.

Im PDAC findet sich weiterhin eine Überexpression des EGF-Rezeptors [54]. Es erfolgte eine Verminderung des stimulierenden Effekts von EGF auf die Zellmigration von BxPC3-Zellen bei gleichzeitiger Inhibition des NHE1. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Stimulation der Migration durch EGF und ihrer Hemmung für NHE1-Inhibition unterschiedliche Wirkungsmechanismen zugrunde liegen könnten. Am Anfang der Experimente wurde hier die Migrationsgeschwindigkeit gegenüber reiner EGF-Stimulation gesenkt und stieg im weiteren Verlauf wieder an. Diese Beobachtung könnte ein Beleg dafür sein, dass zu Beginn der Effekt der NHE1-Inhibition im Vordergrund steht. Der spätere Anstieg der Geschwindigkeit ließe sich durch eine verminderte Degradierung von vorhandenen NHE1-Molekülen erklären, die durch EGF bewirkt werden könnte [13]. So könnte die NHE1-Funktion vielleicht z.T. wiederhergestellt werden, da es sich bei HOE642 um einen kompetitiven Hemmstoff handelt [62], und der späte Geschwindigkeitsanstieg in den Experimenten mit reinem HOE642-Zusatz fehlt. Einer erhöhten Anzahl von NHE1-Proteinen stünden so die gleiche Anzahl an HOE642-Molekülen gegenüber.

Eine ganz andere Möglichkeit zur Erklärung des späten Anstiegs der Migrationsgeschwindigkeit wäre, dass EGF nach einiger Zeit andere Transportproteine und Kanäle aktiviert. Diese könnten den NHE1-Ausfall z.T. kompensieren oder die Migration über andere Mechanismen wieder positiv beeinflussen. Ein Beispiel hierfür wäre die EGF-induzierte Phosphorylierung und Membraninsertion des Ca^{2+} -Kanals TRPC4 [45].

Ein möglicher Erklärungsansatz für den HOE642-Effekt wäre, dass die Zellmigration über die Inhibition des NHE1 und die damit verbundene Störung von pH-Gradienten und fokalen Adhäsionsmolekülen behindert wird. Dadurch wird die stimulierende Wirkung von EGF reduziert, da die ordnungsgemäße Regulation der fokalen Adhäsionen für die Zellmigration unerlässlich ist und die Effekte von EGF auf diese Regulation angewiesen sind. Es wäre auch denkbar, dass die Inhibition eher auf struktureller Ebene wirkt, und die Struktur von Teilen des mit dem NHE1 verbundenen Aktin-Cytoskeletts für die Migration nachteilig verändert. Da aber die Aktivität des NHE1 so weitreichende Auswirkungen für die Zelle besitzt, könnten hier auch noch ganz andere Mechanismen und Signalwege von Bedeutung sein.

5. DISKUSSION

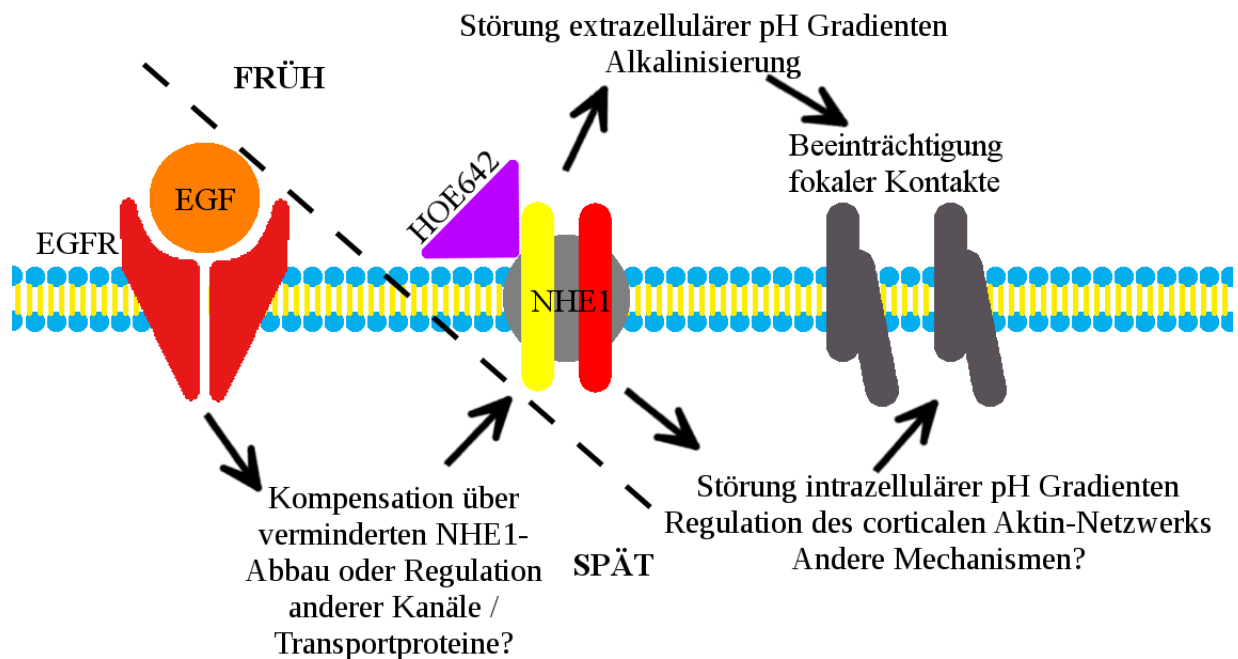


Abbildung 29: Schema der Funktion von NHE1 und EGF

Zu Beginn könnte die Inhibition des NHE1 durch HOE642 zu einer extrazellulären Alkalinisierung führen, die das Bindungsverhalten fokaler Kontakte beeinträchtigt und die Zellmotilität vermindert. Zugleich könnte die Struktur des corticalen Aktin-Netzwerkes gestört werden. Später wäre es möglich, dass durch die EGF-Wirkung die NHE1-Degradierung blockiert und andere Kanäle und Transportproteine aktiviert werden.

5.3 Optimierung der Migrationsvorgänge beim PDAC durch TRAM34

Der Calcium-aktivierte Kaliumkanal $K_{Ca}3.1$ besitzt diverse physiologische Funktionen und ist auch bei der Zellmigration involviert. Bei migrierenden Zellen zeigte sich ein vesikulärer Transport des Kanals zum führenden Ende des Lamellipodiums [65]. Eine Inhibition des Kanals führte bei verschiedenen Zelltypen, darunter Fibroblasten und Epithelzellen, zu einer verminderten Motilität [66, 72].

Wider Erwarten zeigte sich bei den BxPC3-Zellen bei Einzelzellmigrations-Experimenten und Wundheilungsassay ein deutlicher Anstieg von Migrationsgeschwindigkeit und Translokation, wenn der $K_{Ca}3.1$ -Kanal mit TRAM34 gehemmt wurde. Dabei kann für die Einzelzellmigrations-Experimente eine Störung durch das TRAM34-Lösungsmittel DMSO ausgeschlossen werden, da sich kein Unterschied zu den Kontrollen ergab. Im Wundheilungsassay bewirkte DMSO allerdings auch eine Ver-

5. DISKUSSION

stärkung der Migration, wenn auch schwächer als TRAM34. Dies deutet darauf hin, dass BxPC3-Zellen im Verband z.T. anders auf äußere Stimuli reagieren als vereinzelte Zellen. In Kombination mit EGF ergab sich ein additiver Effekt auf die Steigerung der Motilität bei einzelnen Tumorzellen.

Eine mögliche Erklärung für das optimierte Migrationsverhalten bei den BxPC3-Zellen ist die Verschiebung der $[Ca^{2+}]_i$ auf ein für die Migration günstigeres Niveau. Theoretisch depolarisiert die Zelle durch die Hemmung des Kaliumkanals, was eine verminderte Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom bewirken würde. Für einzelne BxPC3-Zellen ist die Überprüfung dieser These nicht erfolgt. Der Zellverband reagiert auf TRAM34 allerdings nur mit einem schwachem Abfall der $[Ca^{2+}]_i$. Daher ist es wahrscheinlich, dass der $K_{Ca}3.1$ -Kanal die Migration noch über andere Mechanismen als die $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst. Hier wäre die Veränderung der Zelladhäsion durch Modulation des Bindungsverhaltens von Integrinen ein möglicher Ansatz. Denkbar wäre auch die Beeinflussung des an der Migration beteiligten Ca^{2+} -Kanals Orail, der wahrscheinlich mit dem $K_{Ca}3.1$ -Kanal colokalisiert ist [60]. Dies wurde hier aber nicht geprüft und die geringe Änderung der Ca^{2+} -Konzentration spräche auch eher dagegen.

Bezogen auf die Kombination EGF-TRAM34 bei den Einzelzellmigrations-Experimenten legen die Ergebnisse nahe, dass die jeweiligen stimulierenden Mechanismen der beiden Stoffe unterschiedlich sind, da sich ein deutlicher additiver Effekt zeigte. So könnte EGF eher auf Ebene intrazellulärer Proteine wie der MAPK und der MLCK wirken. Der $K_{Ca}3.1$ -Kanal beeinflusst möglicherweise eher die membranständigen Kontaktproteine.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit, die sich bei der Verwendung jeglichen Hemmstoffs anführen lässt, ist, dass TRAM34 nicht 100 % spezifisch an den $K_{Ca}3.1$ -Kanal bindet und auch andere Proteine und Signalwege, die bei der Migration involviert sind, zusätzlich beeinflusst. So werden z.B. die Ca^{2+} -Kanäle TRPA1 und TRPV1 durch Clotrimazol, die Grundsubstanz von TRAM34, aktiviert [41].

Die RLT-PSC-Zellen zeigten in früheren Einzelzellmigrations-Experimente, die allerdings auf einer anderen Kollagenmatrix durchgeführt wurden, eine durch TRAM34 verringerte Migration unter Ausbildung von langen Cytoplasmaausläufern, wenn die Zellen vorher stimuliert wurden. In den hier durchgeführten Wundheilungssays zeigte sich keine der beiden Veränderungen; die Geschwindigkeit unterschied sich nicht wesentlich von der der Kontrollgruppe. Die RLT-PSC-Zellen scheinen sich also entweder auf verschiedenen Matrices anders zu verhalten oder in einem größeren

5. DISKUSSION

Zellverband resistenter gegen TRAM34 zu sein. Zwar lösen sich die Zellen schnell aus dem Verband, aber es herrscht ein wesentlich engerer Kontakt zwischen den Zellen als bei den durchgeführten Einzelzellmigrations-Experimenten. Möglicherweise zeigt TRAM34 hier bei den RLT-PSC-Zellen aber scheinbar keine Wirkung, weil die Stimulation durch die BxPC3-Zellen zu geringfügig ist, um einen Effekt deutlich hervortreten zu lassen. Diese These lässt sich dadurch stützen, dass die BxPC3-Zellen im Wundheilungsassay weniger in der Lage waren die RLT-PSC-Zellen zu stimulieren, als die RLT-PSC-Zellen selbst.

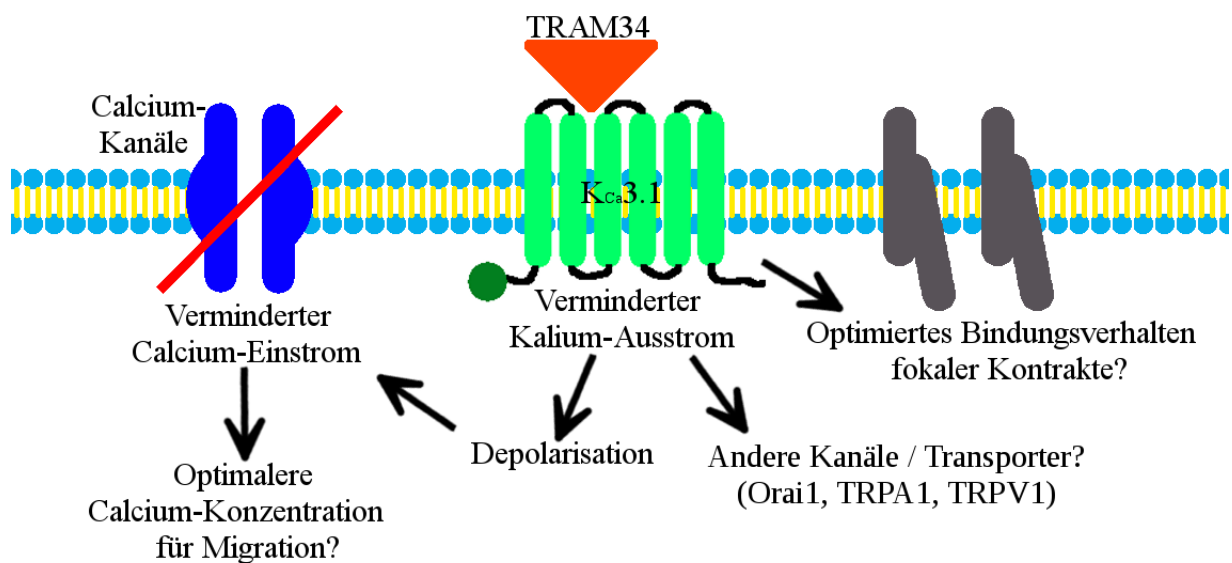


Abbildung 30: Schema der Funktion des $K_{Ca}3.1$ -Kanals

Die Steigerung der Zellmigration bei BxPC3-Zellen unter Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals könnte durch die Optimierung des Bindungsverhaltens fokaler Kontakt oder / und durch eine für die Migration günstigere intrazelluläre Calcium-Konzentration zustande kommen.

5.4 Gegenseitige Stimulation von BxPC3- und RLT-PSC-Zellen?

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob eine gegenseitige Stimulation zwischen PDAC-Zellen und Pankreas-Sternzellen auf Ebene der Zellmigration vorhanden ist. Mehrere Arbeiten zeigten bereits, dass es gemeinsame Stimulationsmechanismen z.B. über $TGF\beta$ oder IL-6 gibt, die die Proliferation beider Zell-

5. DISKUSSION

typen steigern [22, 48]. Bezogen auf die Migration und Motilität der Zellen gibt es jedoch nur indirekte Hinweise mit Boyden-Kammer-Assays und durch die Steigerung der Invasivität des PDAC durch PSC [74]. Von MiaPaCa2-Zellen und Panc1-Zellen konditionierte PDAC-Medien von zeigten im Wundheilungsassay einen stimulierenden Einfluss auf humane PSC-Zellen [6].

In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich ein heterogenes Bild zwischen Einzelzellmigrations-Experimenten und Wundheilungsassays. In den Einzelzellmigrations-Experimenten ist eine klare Stimulation von BxPC3-Zellen durch das konditionierte Medium der RLT-PSC-Zellen vorhanden. Für den umgekehrten Fall, also die Migration von RLT-PSC-Zellen und konditioniertem PDAC-Medium, konnte in früheren in unserem Labor durchgeführten Experimenten ebenfalls eine Stimulation der RLT-PSC-Zellen beobachtet werden. Sezernierte Faktoren beider Zelltypen besitzen also stimulierende Eigenschaften auf die jeweils anderen Zellen. Die genaue Zusammensetzung der konditionierten Medien ist nicht bekannt, und es wird sich um eine große Anzahl verschiedener Moleküle handeln. Dennoch ist es gut vorstellbar, dass zumindest bei den BxPC3-Zellen EGF einer der wichtigeren Faktoren ist, da sich ähnliche Migrationsgeschwindigkeiten mit EGF und dem konditionierten Sternzell-Medium erzielen lassen. Eine genauere Differenzierung, z.B. durch die Inhibition des EGFR unter Zugabe von konditioniertem Sternzell-Medium, wäre hier zu überlegen. Auch wäre es in Hinblick auf den im folgenden beschriebenen Sachverhalt sinnvoll, BxPC3-Einzelzellmigrations-Experimente mit Zugabe von konditioniertem BxPC3-Medium durchzuführen.

Entgegen der Ergebnisse aus den Versuchen mit den konditionierten Medien zeigte sich im Wundheilungsassay bei den BxPC3-Zellen kein Unterschied zwischen der An- oder Abwesenheit von RLT-PSC-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite bezüglich der Wundmigration. Es gibt drei Thesen zur Klärung dieser Beobachtung: Erstens könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass das Flüssigkeitsvolumen in der Zellkulturschale zu groß war, als dass sich in dem Beobachtungszeitraum von 12 h stimulierend wirksame Konzentrationen an sezernierten Faktoren ausbilden konnten. Zweitens wäre es denkbar, dass der BxPC3-Zellverband zu groß und „träge“ für eine adäquate Reaktion ist und Zellen an der hinteren Seite des Verbandes einen der Wunde entgegengesetzten Zug bewirken. Als drittes wäre es möglich, dass durch die umfangreichere Vorbereitung und die anderen Bedingungen im Wundheilungsassay die Adhäsion der Zellen auf der Kollagenmatrix gegenüber den Einzelzellmigrations-

5. DISKUSSION

Experimenten verändert ist.

Zur Überprüfung würde es sich anbieten, Wundheilungsassays ohne Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite durchzuführen, um die unstimulierte Migration des Zellverbandes der BxPC3-Zellen zu betrachten. Dann gibt es drei denkbare Möglichkeiten: Erstens migriert der Zellverband langsamer in die Wunde, was dafür spräche, dass BxPC3 und RLT-PSC-Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite einen ähnlichen stimulierenden Effekt besitzen. Zweitens könnte die Geschwindigkeit ähnlich sein und für die These des zu großen Flüssigkeitsvolumens sprechen. Oder drittens migriert der BxPC3-Verband in die entgegengesetzte Richtung, was ein Beleg dafür wäre, dass Zellen vom Hinterende des Verbandes Zugwirkung ausüben.

Die RLT-PSC-Zellen zeigten eine höhere Wundheilungsbewegung und eine bessere chemotaktische Attraktivität, wenn sich im Wundheilungsassay auch auf der anderen Wundseite Sternzellen befanden. Diese Bewegung war mit BxPC3-Zellen auf der anderen Wundseite geringer ausgeprägt, woraus folgt, dass die Sternzellen sich in diesem Ansatz selbst mehr stimulieren, als es die Tumorzellen können. Diese Beobachtungen sprechen wiederum gegen die These des zu großen Flüssigkeitsvolumens. Allerdings sind die Ausgangsbedingungen hier anders, da die RLT-PSC-Zellen keinen geschlossenen Verband bilden und sich von Anfang an trennen. Auch hier wäre es nötig, Wundheilungsassays mit Sternzellen ohne gegenüberliegende Zellen durchzuführen, um zu differenzieren, ob die BxPC3-Zellen doch, aber ggf. schwächer, stimulierend wirken.

Die Tatsache, dass Sternzellen sich gegenseitig stimulieren, war zu erwarten, da die gleichen sezernierten Faktoren, die auf die Tumorzellen wirken (z.B. PDGF), auch auf die Sternzellen selbst wirken können. Auch ist davon auszugehen, dass durch die Zellkultur alle verwendeten RLT-PSC-Zellen aktiviert wurden und so zum einen stärkere sekretorische Aktivität besitzen und zum anderen auch selbst anfälliger für Stimulation sind. Dadurch ist es vorstellbar, dass die RLT-PSC-Zellen bereits auf geringere Konzentrationen von Stimulantien reagieren können, als es den BxPC3-Zellen im Wundheilungsassay möglich ist, und daraus die unterschiedlichen Ergebnisse resultieren.

Zusammenfassend lässt sich auf alle Fälle festhalten, dass die gegenseitige Stimulation von PDAC-Zellen und Pankreas-Sternzellen unter bestimmten Voraussetzungen möglich ist und ein fördernder Einfluss auf die Zellmigration und Zellmotilität besteht. So lässt sich die gesteigerte Invasivität des PDAC im Zusammenspiel mit den

5. DISKUSSION

Sternzellen nachvollziehen.

5.5 Eignung der „Sabine“-Software für die Migrationsanalyse

Die vorhergehend dargestellten Auswertungsvergleiche zwischen der halbautomatischen Zelltracking-Software „Sabine“ und der manuellen Methode mit „Amira“ zeigen, dass sich durchaus verwertbare Ergebnisse mit „Sabine“ erzielen lassen. Dies bleibt allerdings auf die Analyse der Zellpfade und der Translokation beschränkt, da sich für Geschwindigkeit und Zellfläche keine hinreichend genauen Resultate ergeben. Weiterhin stellt die Verwendung von „Sabine“ auch an die Art des zu analysierenden Films besondere Anforderungen: Es dürfen sich nicht zu viele Zellen im Gesichtsfeld befinden, da ansonsten die Wahrscheinlichkeit von Zellkollisionen erhöht wird, wodurch das Programm oft nicht mehr differenzieren kann, welche Bereiche zu welcher Zelle gehören. Ein entsprechend klein gewähltes Bildaquisitionsintervall erleichtert die Analyse. Weiterhin sind eine höhere Vergrößerung und gute Kontrasteinstellung günstiger, aber nicht essentiell für verwertbare Ergebnisse. Eine Nachkontrolle der analysierten Bilder und Zellen ist aber in jedem Fall notwendig, um diejenigen Zellen herauszufiltern, bei denen das automatische Tracking vollständig ohne Fehler erfolgt ist.

Zusammenfassend ist „Sabine“ durchaus eine gute Alternative, solange die genannten Voraussetzungen eingehalten werden und es nur um die Zelltranslokation geht. Besonders für Filme mit wenigen Zellen, langem Beobachtungszeitraum und kurzem Aquisitionsintervall fällt die Zeitersparnis gegenüber der manuellen Methode ins Gewicht. Verbesserungswürdig sind allerdings noch die Erkennung der Zellkonturen und die Differenzierung von zwei Zellen nach Kollisionen.

6

Ausblick

Aus den hier gewonnenen Ergebnissen ergeben sich einige neue Ansätze für weitere Experimente zur Beantwortung offener Fragen.

Zukünftige Einzelzellmigrations-Experimente sollten mit PDAC-Zellen und Sternzellen im Hinblick auf die Beteiligung von EGF bei der Stimulation durch die jeweiligen konditionierten Medien durchgeführt werden. Hierbei wäre eine Inhibition des EGFR unter Zugabe von konditioniertem Medium ein Ansatz. Auch wäre die Durchführung von Westernblots im Hinblick auf die Expression des EGFR in BxPC3- und RLT-PSC-Zellen sinnvoll.

Alle hier durchgeführten Migrationsexperimente fanden auf einer mit Kollagenmatrix beschichteten 2D-Oberfläche statt. In vivo findet die Zellmigration jedoch in den meisten Fällen in einer 3D-Umgebung statt. Um ein mehr an die physiologische Situation angelehntes Modell zu erhalten, sind Experimente mit einzelnen PDAC- und Sternzellen in einer 3D-Kollagenmatrix geplant und z.T. schon mit verwertbaren Ergebnissen durchgeführt wurden. Auch in diesem Ansatz bietet es sich an, den Einfluss des EGFR, des NHE1 und der $K_{Ca}3.1$ -Kanals auf die Migration und die Durchdringung der Matrix zu untersuchen.

Zu Klärung der schon beschriebenen heterogenen Ergebnisse des Wundheilungsassays ist die Durchführung von Wundassays mit nur einem Zelltyp und ohne Zellen auf der gegenüberliegenden Wundseite erforderlich. So ließe sich die grundlegende Migrationsaktivität des BxPC3-Verbandes bzw. der RLT-PSC-Zellen erfassen und mit den schon vorhandenen Ergebnissen in Beziehung setzen.

Aus Pilot-Experimenten zur Comigration zwischen einzelnen BxPC3- und RLT-PSC-Zellen ergab sich eine interessante Einzel-Beobachtung: RLT-PSC-Zellen gruppierten sich nach einiger Zeit um eine Zellinsel aus BxPC3-Zellen. Hieraus ergab sich der Plan, auf einer Kollagenmatrix BxPC3-Zellinseln heranwachsen zu lassen und

6. AUSBLICK

später einzelne RLT-PSC-Zellen hinzuzugeben. Sollte sich diese einmalige Beobachtung reproduzieren lassen, spräche dies für die direkte Attraktivanz von Sternzellen durch die Tumorzellen. Weiterhin könnte die Beteiligung des EGFR, des NHE1 und des $K_{Ca}3.1$ -Kanals auf den Prozess einer ggf. vorhandenen Sternzell-Attraktivanz näher untersucht werden.

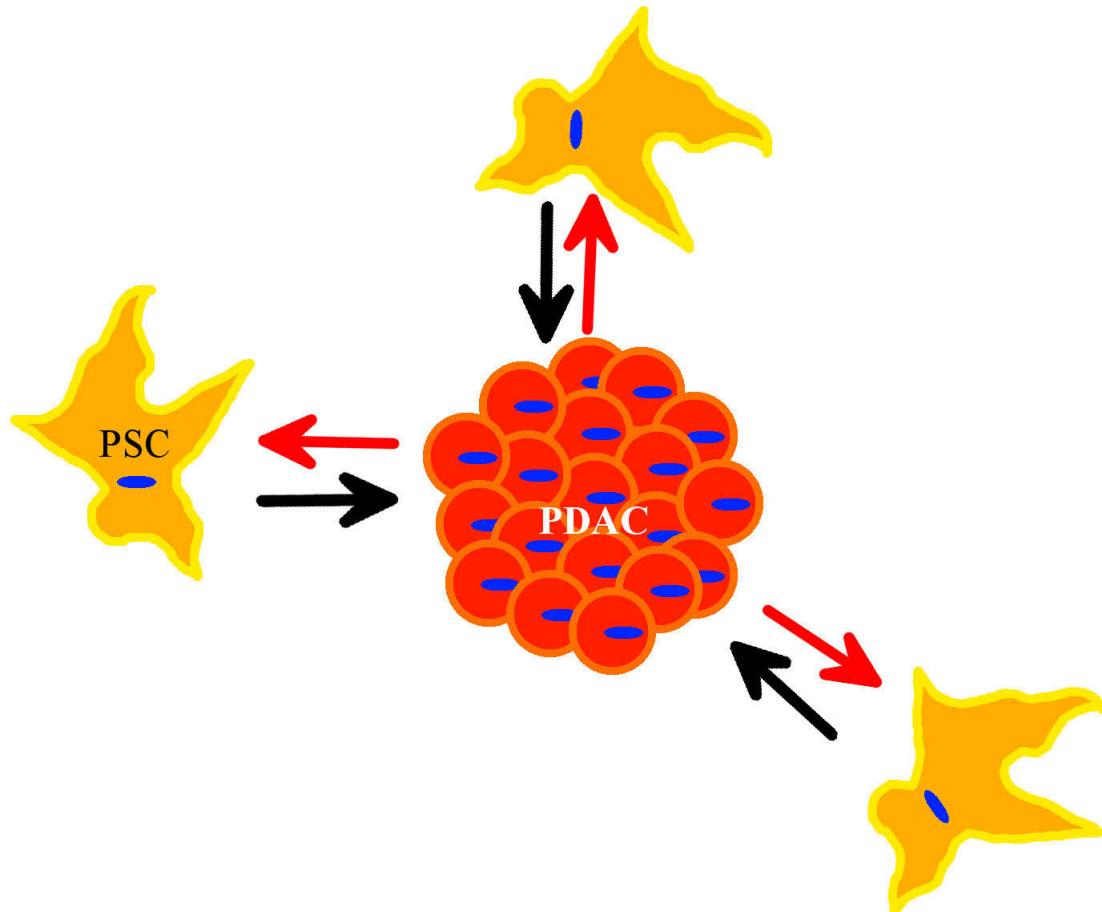


Abbildung 31: Neuer Ansatz der Comigration

Ein neuer Ansatz für weitere Comigrationsexperimente könnte die Aussaat von PDAC-Zellinseln mit nachfolgender Zugabe von Sternzellen sein.

Die Arbeit mit Sternzell-Zellkulturlinien wie den RLT-PSC wirft das Problem auf, dass die Zellen schon durch die lange Kultivierung in einen aktivierten Zustand versetzt werden. Um diese Problem zu umgehen, werden in unserem Labor Primärkulturen von Sternzellen aus dem Pankreas von Mäusen isoliert. Dadurch ist es möglich, Sternzellen zu erhalten, die sich noch im ruhenden Zustand befinden. Außerdem ergibt sich die Gelegenheit des Vergleichs zwischen den Eigenschaften den humanen RLT-PSC und den murinen Primärkulturen hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens.

7

Liste verwendeter Chemikalien

Substanz	Firma
Antikörper K _{Ca} 3.1	Sigma-Aldrich
Antikörper POD goat-anti-rabbit	Sigma-Aldrich
Ampuwa [®]	Fresenius Kabi
APS	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
CaCl ₂ wasserfrei	Merck
Complete Mini Proteaseninhibitor	Roche
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
DMEM	gibco
Dithiothreitol	Boehringer
EGF (human)	Sigma-Aldrich
EGTA	Sigma-Aldrich
F-12	gibco
Fibronectin	Roche
Foetal Bovine Serum	PAA
Foetal Calf Serum	PAA
Glutamax	Invitrogen
Glycin	Serva
HEPES	Sigma-Aldrich
HOE642 (Cariporid)	Sanofi-Aventis Pharma
Immersionöl [®]	Zeiss
Ionomycin Calcium Salz	MP Biomedicals

7. LISTE VERWENDETER CHEMIKALIEN

Substanz	Firma
KCl	Merck
Kollagen I (human)	Biochrom
Kollagen III (human)	BD Biosciences
Kollagen IV (human)	BD Biosciences
Laminin	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Fluka
NaCl	Carl Roth
NaHCO ₃	Merck
NaOH Plätzchen	Merck
Nonoxinol 40	Sigma-Aldrich
Page Ruler [®] Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Sucrose	Sigma-Aldrich
Natriumdesoxycholat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Super Signal [®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific
TEMED	Carl Roth
TRAM34	UC Davis (freundliche Überlassung von Frau Heike Wulff)
TRIS	Carl Roth
Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% Lösung	Biochrom
TWEEN 20	Sigma-Aldrich

8

Liste verwendeter Geräte und Software

Gerät / Software	Firma
Amira High Performance 3D Visualization Software	Visualization Sciences Group (VSG)
AxioCam MRm	Zeiss
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
Axiovert 100 Mikroskop	Zeiss
CoolSnap Camera	Visitron Systems
Cubis Feinwaage	Sartorius
Culture-Inserts	Ibidi
Falcon [®] 14 mL Polypropylen Röhrrchen	BD Biosciences
Falcon [®] 25 mL Zellkulturflasche	BD Biosciences
Fresco 21 Zentrifuge	Heraeus
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
Glasbodenschälchen 35 mm	Greiner Bio-One
HAL 100 Fluoreszenzlampe	Zeiss
HeraSafe Sterilwerkband	Heraeus
HiPic 32 Image Control Program	Hamamatsu Photonics
LD A-Plan 5x Objektiv	Zeiss
LD A-Plan 10x Objektiv	Zeiss
LD A-Plan 20x Objektiv	Zeiss
LD A-Plan 32x Objektiv	Zeiss
MetaFluor	MDS Analytical Technology

8. LISTE VERWENDETER GERÄTE UND SOFTWARE

Gerät / Software	Firma
Mikroreaktionsgefäß 0,5 mL	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäß 1,5 mL	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäß 2,0 mL	Sarstedt
Multifuge 1 S-R Zentrifuge	Heraeus
Observer.D1 Mikroskop	Zeiss
PowerPac HC	Bio-Rad
Schüttler für Reaktionsgefäße	Stuart
SPSS Statistics 21	IBM
Kleine Zentrifuge	Sprout
Uniblit ^z ® Shutter Driver	Visitron Systems
Universal Hood II	Bio-Rad
Video Camera XC-ST70CE	Sony
Video Camera Module XC-77CE	Sony
VisiChrome High Speed Polychromator System	Visitron Systems
Wasabi Image Control Program	Hamamatsu Photonics
Wärmeplatte für Mikroreaktiongefäße	Grant
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH
Zellkratzer 25 cm	Sarstedt
Zellkulturschale 100 mm	BD Biosciences
Zellkulturschale 60 mm	BD Biosciences

Literaturverzeichnis

- [1] **Aho U, Zhao X, Löhr M, Andersson R.** Molecular mechanisms of pancreatic cancer and potential targets of treatment. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 42: 279-296, 2007
- [2] **Apte M, Haber P, Applegate T, Norton I, McCaughan G, Korsten M, Pirola R, Wilson J.** Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43: 128-133, 1998
- [3] **Ataga KI, Smith WR, De Castro LM, Swerdlow P, Sauntharajah Y, Castro O, Vichinsky E, Kutlar A, Orringer EP, Rigdon GC, Stocker JW.** Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood* 111: 3991-3997, 2008
- [4] **Bachem M, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid R, Menke A, Siech M, Berger H, Grünert A, Adler G.** Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115: 421-432, 1998
- [5] **Bachem M, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G.** Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128: 907-921, 2005
- [6] **Bachem M, Zhou S, Buck K, Schneiderhan W, Siech M.** Pancreatic stellate cells – role in pancreas cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery* 393: 891-900, 2008
- [7] **Bao B, Ali S, Ahmad A, Azmi A, Li Y, Banerjee S, Kong D, Sethi S, Aboukameel A, Padhye SB, Sarkar FH.** Hypoxia-induced aggressiveness of pancreatic cancer cells is due to increased expression of VEGF, IL-6 and

LITERATURVERZEICHNIS

- miR-21, which can be attenuated by CDF treatment. *Public Library of Science One* 7: e50165. doi:10.1371/journal.pone.0050165, 2012
- [8] **Binamé F, Pawlak G, Roux P, Hibner U.** What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Molecular Biosystems* 6: 648-661, 2010
- [9] **Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P.** The epidermal growth factor. *Cell Biology International* 19: 413-430, 1995
- [10] **Bradding P, Wulff H.** The K^+ channels $K_{Ca}3.1$ and $K_v1.3$ as novel targets for asthma therapy. *British Journal of Pharmacology* 157: 1330-1339, 2009
- [11] **Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA, Fay FS.** Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* 254(5032): 703-706, 1991
- [12] **Chen PS, Joung B, Shinohara T, Das M, Chen Z, Lin SF.** The initiation of the heart beat. *Circulation Journal* 74: 221-225, 2010
- [13] **Chiang Y, Chou C-Y, Hsu K-F, Huang Y-F, Shen M-R.** EGF upregulates Na^+/H^+ exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness. *Journal of Cellular Physiology* 214: 810-819, 2008
- [14] **Decrock E, De Bock M, Wang N, Gadicherla AK, Bol M, Delvaeye T, Vandenabeele P, Viken M, Bultynck G, Krysko DV, Leybaert L.** IP3, a small molecule with a powerful message. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833: 1772-1786, 2013
- [15] **Deer E, Gonzalez-Hernandez J, Coursen J, Shea J, Ngatia J, Scaife C, Firpo M, Mulvihill S.** Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39: 425-435, 2010
- [16] **Denker SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayr H, Barber DL.** Direct binding of the Na^+-H^+ exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H^+ translocation. *Molecular Cell* 6: 1425-1436, 2000

LITERATURVERZEICHNIS

- [17] **Dong H, Shim KN, Li JMJ, Estrema C, Ornelas TA, Nguyen F, Liu S, Ramamoorthy SL, Ho S, Carethers JM, Chow JYC.** Molecular mechanisms underlying Ca^{2+} -mediated motility of human pancreatic duct cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 299: 1493-1503, 2010
- [18] **Dreval V, Dieterich P, Stock C, Schwab A.** The role of Ca^{2+} transport across the plasma membrane for cell migration. *Cellular Physiology and Biochemistry* 16: 119-126, 2004
- [19] **Dubois C, Abeele FV, Prevarskaya N.** Targeting apoptosis by the remodelling of calcium-transporting proteins in cancerogenesis. *Federation of European Biochemical Societies Journal* doi:10.1111/febs.12246, 2013
- [20] **Düfer M, Gier B, Wolpers D, Krippeit-Drews P, Ruth P, Drews G.** Enhanced glucose tolerance by SK4 channel inhibition in pancreatic β -cells. *Diabetes* 58: 1835-1843, 2009
- [21] **Erkan M, Adler G, Apte M, Bachem M, Buchholz M, Detlefsen S, Esposito I, Friess H, Gress T, Habisch H-J, Hwang R, Jaster R, Kleeff J, Klöppel G, Kordes C, Logsdon C, Masamune A, Michalski C, Oh J, Phillips P, Pinzani M, Reiser-Erkan C, Tsukamoto H, Wilson J.** StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* 61: 172-178, 2011
- [22] **Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski C, Kleeff J.** Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer. *Experimental Oncology* 32: 128-131, 2010
- [23] **Friedl P, Wolf K.** Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Reviews* 28: 129-135, 2009
- [24] **Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.** A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260: 3440-3450, 1985
- [25] **Hart I, Goode N, Wilson R.** Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* 989: 65-84, 1989
- [26] **Hezel A, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA.** Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 20: 1218-1249, 2006

LITERATURVERZEICHNIS

- [27] **Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Han EH, Kim HG, Song GY, Kwon K, Jeong TC, Jeong HG.** Suppression of EGF-induced tumor cell migration and matrix metalloproteinase-9 expression by capsaicin via the inhibition of EGFR-mediated FAK/Akt, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK, and AP-1 signaling. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: 594–605, 2011
- [28] **Iglesias PA, Devreotes PN.** Biased excitable networks: how cells direct motion in response to gradients. *Current Opinion in Cell Biology* 24: 245-253, 2012
- [29] **Imamura T, Iguchi H, Manabe T, Ohshio G, Yoshimura T, Wang ZH, Suwa H, Ishigami S, Imamura M.** Quantitative analysis of collagen and collagen subtypes I, III, and V in human pancreatic cancer, tumor-associated chronic pancreatitis, and alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreas* 11: 357-364, 1995
- [30] **Jäger H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S.** Blockage of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Molecular Pharmacology* 65: 630 - 638, 2004
- [31] **Jesnowski R, Fürst D, Ringel J, Chen Y, Schrödel A, Kleeff J, Kolb A, Schareck W, Löhr M.** immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Laboratory Investigation* 85: 1276-1291, 2005
- [32] **Kemp G, Young H, Fliegel L.** Structure and function of the human $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger isoform 1. *Channels* 2: 329-36, 2008
- [33] **Kessler W, Budde T, Gekle M, Fabian A, Schwab A.** Activation of cell migration with fibroblast growth factor-2 requires calcium-sensitive potassium channels. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 456: 813-823, 2008
- [34] **Kruse M-L, Hildebrand P, Timke C, Fölsch U, Schäfer H, Schmidt W.** Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid / stellate cells. *Pancreas* 23: 49-54, 2001
- [35] **Liu H, Ma Q, Xu Q, Lei J, Li X, Wang Z, Wu E.** Therapeutic potential of perineural invasion, hypoxia and desmoplasia in pancreatic cancer. *Current Pharmaceutical Design* 18: 2395–2403, 2012

LITERATURVERZEICHNIS

- [36] **Ludwig FT, Schwab A, Stock C.** The Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) generates pH nanodomains at focal adhesions. *Journal of Cellular Physiology* 228: 1351-1358, 2013
- [37] **Luo BH, Carman CV, Springer TA.** Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual Review of Immunology* 25: 619-647, 2007
- [38] **Magalhaes MAO, Larson DR, Mader CC, Bravo-Cordero JJ, Gil-Henn H, Oser M, Chen X, Koleske AJ, Condeelis J.** Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. *Journal of Cell Biology* 195: 903-920, 2011
- [39] **Mahadevan D, Von Hoff DD.** Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* 6: 1186-1197, 2007
- [40] **Martin C, Pedersen SF, Schwab A, Stock C.** Intracellular pH gradients in migrating cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 300: 490 - 495, 2011
- [41] **Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, D'Hoedt D, Donovan-Rodriguez T, Viana F, Nilius B, Voets T.** Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *Journal of Neuroscience* 28: 576-586, 2008
- [42] **Möller M, Burger M, Dieterich P, Schwab A.** A framework for automated cell tracking in phase contrast microscopic videos based on normal velocities. *arXiv:1203.5914 [q-bio.QM]*
- [43] **Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H.** Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1 β . *Cancer Research* 64: 1331-1337, 2004
- [44] **Nabi I.** The polarization of the motile cell. *Journal of Cell Science* 112: 1803-1811, 1999
- [45] **Odell AF, Scott JL, Van Helden DF.** Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation, membrane insertion, and activation of transient receptor potential channel 4. *Journal of Biological Chemistry* 280: 37974-37987, 2005

LITERATURVERZEICHNIS

- [46] **Olszewski U, Hlozek M, Hamilton G.** Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 by neurotensin signaling in pancreatic cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393: 414-419, 2010
- [47] **Olszewski-Hamilton U, Hamilton G.** Dependence of relative expression of NTR1 and EGFR on cell density and extracellular pH in human pancreatic cancer cell lines. *Cancers* 3: 182-197, 2011
- [48] **Omary B, Lugea A, Lowe A, Pandol S.** The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *Journal of Clinical Investigation* 117: 50-59, 2007
- [49] **Pathak A, Kumar S.** Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness. *Integrative Biology* 3: 267-278, 2011
- [50] **Phillips P, Wu M, Kumar R, Doherty E, McCarroll J, Park S, Pirola R, Wilson J, Apte M.** Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut* 52: 677-682, 2003
- [51] **Post PL, DeBiasio RL, Taylor DL.** A fluorescent protein biosensor of myosin II regulatory light chain phosphorylation reports a gradient of phosphorylated myosin II in migrating cells. *Molecular Biology of the Cell* 6: 1755-1768, 1995
- [52] **Preis M, Korc M.** Kinase signaling pathways as targets for intervention in pancreatic cancer. *Cancer Biology & Therapy* 9: 754-763, 2010
- [53] **Prevarskaya N, Zhang L, Barrit G.** TRP channels in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772: 937-946, 2007
- [54] **Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Czyzewska J, Kemon A.** Expression of epidermal growth factors and apoptosis markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 47: 667-671, 2009
- [55] **Rijken PJ, van Hal GJ, van der Heyden MAG, Verkleij AJ, Boonstra J.** Actin polymerization is required for negative feedback regulation of epidermal growth factor-induced signal transduction. *Experimental Cell Research* 243: 254-262, 1998

LITERATURVERZEICHNIS

- [56] **Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C.** Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13: 566-578, 2012
- [57] **Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V..** Krebs in Deutschland 2007/2008, 2012
- [58] **Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JM, Wolmark N.** Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine* 353: 1673-1684, 2005
- [59] **Saotome T, Inoue H, Fujimiya M, Fujiyama Y, Bamba T.** Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. *Pancreas* 14: 373-382, 1997
- [60] **Schmidt E-M, Münzer P, Borst O, Kraemer BF, Schmid E, Urban B, Lindemann S, Ruth P, Gawaz M, Lang F.** Ion channels in the regulation of platelet migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415: 54-60, 2011
- [61] **Schneiderhan W, Diaz F, Fundel M, Zhou S, Siech M, Hasel C, Möller P, Gschwend J, Seufferlein T, Gress T, Adler G, Bachem M.** Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. *Journal of Cell Science* 120: 512-519, 2006
- [62] **Scholz W, Albus U, Counillion L, Gögelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, Schölkens BA.** Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovascular Research* 29: 260-268, 1995
- [63] **Schwab A.** Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *American journal of physiology. Renal Physiology* 280: F739-F747, 2001

LITERATURVERZEICHNIS

- [64] Schwab A, Wulf A, Schulz C, Kessler W, Nechyporuk-Zloy V, Römer M, Reinhardt J, Weinhold D, Dieterich P, Stock C, Hebert S. Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *Journal of Cellular Physiology* 206: 86-94, 2006
- [65] Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Gassner B, Schulz C, Kessler W, Mally S, Römer M, Stock C. Spatial redistribution of calcium sensitive potassium channels (hK_{Ca}3.1) in migrating cells. *Journal of Cellular Physiology* 227: 686-696, 2011
- [66] Schwab A, Fabian A, Hanley P, Stock C. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiological Reviews* 92: 1865-1913, 2012
- [67] Sen A, De Castro I, DeFranco DB, Deng FM, Melamed J, Kapur P, Raj GV, Rossi R, Hammes SR. Paxillin mediates extranuclear and intranuclear signaling in prostate cancer proliferation. *Journal of Clinical Investigation* 122: 2469–2481, 2013
- [68] Smith KD, Wells A, Lauffenburger DA. Multiple signaling pathways mediate compaction of collagen matrices by EGF-stimulated fibroblasts. *Experimental Cell Research* 312: 1970-1982, 2006
- [69] Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik
- [70] Stüwe L, Müller M, Fabian A, Waning J, Mally S, Noel J, Schwab A, Stock C. pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. *Journal of Physiology* 585: 351-360, 2007
- [71] Tharmalingam S, Daulat AM, Antflick JE, Ahmed SM, Nemeth EF, Angers S, Conigrave AD, Hampson DR. Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins. *Journal of Biological Chemistry* 286: 40922-40933, 2011
- [72] Tharp D, Bowles D. The intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (K_{Ca}3.1) in vascular disease. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 7: 1-11, 2009
- [73] Tsai FC, Meyer T. Ca²⁺ pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells. *Current Biology* 22: 837-842, 2012

LITERATURVERZEICHNIS

- [74] **Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV.** Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Research* 68: 2085-2093, 2008
- [75] **Watanabe T, Masamune A, Kikuta K, Hirota M, Kume K, Satho K, Shimosegawa T.** Bone marrow contributes to the population of pancreatic stellate cells in mice. *Gastrointestinal and Liver Physiology* 297: G1138-G1146, 2009
- [76] **Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y.** Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anatomica* 58: 837-858, 1982
- [77] **Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW.** Colorectal cancer. *Lancet* 365: 153-165, 2005
- [78] **Woolard K, Geissmann F.** Monocytes in arteriosclerosis: subsets and functions. Nature reviews. *Cardiology* 7: 77-86, 2010
- [79] **Wulff H, Miller MJ, Hänsel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG.** Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8151-8156, 2000
- [80] **Xie H, Pallero MA, Gupta K, Chang P, Ware MF, Witke W, Kwiatkowski DJ, Lauffenburger DA, Murphy-Ullrich JE, Wells A.** EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated $\text{PLC}\gamma$ signaling pathway. *Journal of Cell Science* 111: 615-624, 1998
- [81] **Yam P, Wilson C, Ji L, Hebert B, Barnhart E, Dye N, Wiseman P, Danuser G, Theriot J.** Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *Journal of Cell Biology* 178: 1207-1221, 2007

Danksagung

Lebenslauf