

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang A. Linke-

TRPC1-Kanäle bei der druckabhängigen Aktivierung von pankreatischen Sternzellen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Matthias Gruner

aus Moers

2020

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Frank U. Müller
1. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Albrecht Schwab
2. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Guiscard Seebohm
Tag der mündlichen Prüfung:	09.06.2020

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie II

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang A. Linke –

Referent: Univ.-Prof. Dr. Albrecht Schwab

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Guiscard Seeböhm

ZUSAMMENFASSUNG

TRPC1-Kanäle bei der druckabhängigen Aktivierung von pankreatischen Sternzellen

Gruner, Matthias

Die Quelle des tumorfördernden Stromas im Pankreaskarzinom sind pankreatische Sternzellen (PSCs). Ruhende PSCs des gesunden Pankreas werden im Pankreaskarzinom aktiviert. Der hydrostatische Druck ist im Pankreaskarzinom erhöht. Er aktiviert bereits aktivierte PSCs zusätzlich. Daran ist der Kationenkanal *Transient Receptor Potential Canonical 1 Channel* (TRPC1) beteiligt, der in manchen Zellarten am Ca^{2+} -Einstrom bei Entleerung der intrazellulären Speicher (*store operated calcium entry* (SOCE)) beteiligt ist. Diese Arbeit untersucht die initiale Aktivierung ruhender PSCs durch Druck und ob TRPC1 an dieser Aktivierung sowie am SOCE in PSCs beteiligt ist.

Ruhende murine PSCs (angezeigt LANUV NRW, AZ 84-03.05.50.15.010, 25.03.2015) wurden isoliert und normalem Atmosphärendruck (Kontrolle) oder kontinuierlichem zusätzlichem Druck ($\Delta+100$ mmHg) ausgesetzt. Die Aktivierung wurde durch Färbung von perinukleären Lipidtröpfchen mit Nile-Red und Immunfluoreszenz-Färbung von α -smooth muscle actin (α -SMA) in Wildtyp (WT)-PSCs und TRPC1-*knockout* (KO)-PSCs analysiert. Die Migration von WT-PSCs (Kontrolle/ $\Delta+100$ mmHg Druck) wurde videomikroskopisch beobachtet. Der SOCE in ruhenden und aktivierten WT- und TRPC1-KO-PSCs wurde durch Calciumbildung nach Speicherentleerung mit Thapsigargin analysiert.

Zunehmende α -SMA-Expression, weniger Lipidtröpfchen und schnellere Migration zeigten eine zusätzliche Aktivierung der PSCs durch Druck in den ersten Tagen nach der Isolation. Die α -SMA-Expression war unter Druck nur in den ersten 48 h erhöht, weniger Lipidtröpfchen waren unter Druck nach 24 h zu sehen. TRPC1-KO-PSCs zeigten keine vermehrte α -SMA-Expression unter Druck. Die Höhe des SOCE war in WT- und TRPC1-KO-PSCs gleich, jedoch war in TRPC1-KO-PSCs die Menge des Speicher- Ca^{2+} erhöht.

Ruhende PSCs werden morphologisch und funktionell durch Druck aktiviert, wobei *in vitro* die Aktivierung durch die Zellkultur den Druckeffekt überwiegt. TRPC1 ist essentieller Bestandteil der Druckaktivierung. TRPC1 ist in PSCs nicht direkt am SOCE beteiligt.

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2020

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel „TRPC1-Kanäle bei der druckabhängigen Aktivierung von pankreatischen Sternzellen“

im Institut für Physiologie II

unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. 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.



Münster, 31.07.2019

Matthias Gruner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Pankreaskrebs.....	1
1.2	Desmoplasie/Tumorstroma.....	1
1.3	Pankreatische Sternzellen	2
1.3.1	PSCs in Ruhe	2
1.3.2	Aktivierung der PSCs.....	2
1.3.3	Rolle der PSCs im PDAC.....	4
1.4	Mechanik	5
1.4.1	Mechanosensibilität	6
1.4.2	Erhöhter Druck im PDAC	6
1.4.3	Wirkung von Druck auf PSCs	7
1.5	TRPC1.....	8
1.5.1	TRPC1 als mechanosensitiver Kanal.....	10
1.5.2	TRPC1 im store operated calcium entry	10
2	Zielsetzung	13
3	Methoden.....	14
3.1	Zellkultur	14
3.1.1	Kulturbedingungen	14
3.1.2	Passage der Zellen und Zellzählung.....	14
3.2	Mäuse und TRPC1-KO	15
3.3	Isolation der PSCs	16
3.4	Druckbehandlung	17
3.5	Nachweis von Lipidtröpfchen	18
3.5.1	Experimentaufbau	18
3.5.2	Nile Red-Färbung	18
3.5.3	Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung.....	19
3.6	α -SMA-Färbung.....	19

3.6.1	Immunfluoreszenzfärbung	20
3.6.2	Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung.....	20
3.7	Zellmigration	21
3.7.1	Vorbereitung der Migrationsexperimente	21
3.7.2	Druckerzeugung und Versuchsaufbau der Migrationsexperimente	22
3.7.3	Auswertung der Migration	23
3.8	Ca ²⁺ -Messungen.....	24
3.8.1	Vorbereitung der Zellen und Aufbau	25
3.8.2	Ablauf der Messung.....	26
3.8.3	Auswertung	27
3.9	Statistik und graphische Darstellung	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Beschleunigung des Verlustes von Lipidtröpfchen durch Druck	30
4.2	α-SMA-Färbung.....	32
4.2.1	Vermehrte α-SMA-Fluoreszenz durch Druck nur in WT-PSCs	34
4.2.2	Kleinere und rundere PSCs bei TRPC1-KO.....	36
4.3	Migration.....	39
4.3.1	Stärkerer Anstieg der Geschwindigkeit unter Druck	39
4.3.2	Kleinere Fläche der PSCs unter Druck	43
4.4	Ca ²⁺ -Messungen.....	45
4.4.1	Keine Unterschiede des Ca ²⁺ in unstimulierten PSCs	47
4.4.2	Erhöhtes Speicher-Ca ²⁺ in TRPC1-KO-PSCs	47
4.4.3	Kein Unterschied im SOCE zwischen WT- und TRPC1-KO-PSCs.....	49
4.4.4	Blockade des SOCEs	51
5	Diskussion	53
5.1	Experimentelle Erzeugung des Druckes	53
5.2	Schnellere Aktivierung ruhender PSCs durch Druck	54
5.2.1	Aktivierung durch die Zellkultur	54
5.2.2	Aktivierung durch Druck.....	57

5.3	TRPC1 als notwendiger Bestandteil der druckabhängigen Aktivierung	58
5.4	Die Rolle der TRPC1-Kanäle für den Ca ²⁺ -Haushalt der PSCs	59
5.4.1	Erhöhtes Speicher-Ca ²⁺ in TRPC1-KO-PSCs	60
5.4.2	Keine direkte Rolle von TRPC1 im SOCE in PSCs	61
5.5	Mechanismus der Druckaktivierung und Rolle des TRPC1	63
5.5.1	TRPC1 als Druck-Mechanosensor	63
5.5.2	TRPC1 in der autokrinen Stimulation	65
5.6	Pathophysiologischer Kontext und Ausblick	66
6	Materialien und Geräte	68
6.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	68
6.2	Geräte	70
6.3	Software	71
7	Literaturverzeichnis	73
8	Abkürzungsverzeichnis	83
9	Abbildungsverzeichnis	85
10	Tabellenverzeichnis	86
11	Danksagung	87
12	Lebenslauf	88

1 Einleitung

1.1 Pankreaskrebs

Pankreaskrebs ist eine der bedrohlichsten Krebserkrankungen. In Europa ist Pankreaskrebs die vierthäufigste Krebstodesursache bei Männern und Frauen mit etwa 91.000 prognostizierten Todesfällen für 2019. Pankreaskrebs ist unter den geläufigen Krebserkrankungen die tödlichste und fast jeder Betroffene stirbt an den Folgen. Die 5-Jahres-Überlebensrate in Europa liegt bei nur 4 %. Zusätzlich ist es eine der wenigen Krebserkrankungen, bei denen es in den letzten Jahren zu einem Anstieg der Todesfälle gekommen ist. Zum einen liegt dies an der alternden Bevölkerung, denn Alter ist einer der Hauptrisikofaktoren des Pankreaskrebs, zum anderen hat intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten im Gegensatz zu Fortschritten bei anderen Krebserkrankungen kaum zu verringerter Letalität geführt (17, 64).

Die häufigste der bösartigen Neoplasien des Pankreas mit >95 % ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) (69). Häufig wird deshalb der Begriff Pankreaskarzinom synonym mit PDAC verwendet. Pankreaskarzinome gehen aus Vorläufern wie intraepithelialen Neoplasien oder intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien durch eine weitere Anhäufung von Mutationen hervor. Problematisch ist das Fehlen von Frühsymptomen sowie Früherkennungsmaßnahmen, was mit für die schlechte Prognose verantwortlich ist. Zusammen mit schneller hämatogener und lymphogener Metastasierung sowie aggressivem lokalem Wachstum werden die meisten Pankreaskarzinome somit in einem inoperablen und nur noch palliativ behandelbarem Stadium diagnostiziert. Den einzigen möglichen kurativen Ansatz stellt die operative Therapie (gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie mit z. B. Gemcitabin) dar. Palliativ werden verschiedene Chemotherapie-Regime, meist ebenfalls mit Gemcitabin als wichtigem Bestandteil, verwendet (53). Insgesamt verlängern jedoch auch aktuelle Kombinations-Chemotherapien das Überleben nur um wenige Monate (75).

1.2 Desmoplasie/Tumorstroma

Ein Tumor besteht aus mehr als nur den Tumorzellen, er hat ein Stroma mit Immunzellen, Fibroblasten und Endothelzellen sowie extrazellulärer Matrix (ECM). In den letzten Jahren stellte sich die Wichtigkeit dieses sogenannten Tumormikromilieus (*tumor*

microenvironment (TME)) mit veränderter Zusammensetzung der ECM, Zytokinen, Hypoxie und verändertem pH-Wert heraus. Nur im Zusammenspiel von TME und Tumorzellen kann ein Tumor völlig verstanden werden (47). Dies gilt insbesondere für das PDAC: Es weist ein dichtes und entzündliches, kollagenreiches Stroma auf, welches desmoplastisches Stroma genannt wird. Über 80 % der Tumormasse bestehen aus Stroma (33). Dieses desmoplastische TME fördert über Faktoren wie Hypoxie und parakrin wirkende Stoffe die Progression des PDAC (33).

Neben veränderten „biochemischen“ Faktoren zeichnet sich das TME durch veränderte mechanische Eigenschaften wie erhöhte Steifigkeit und Druck aus. Die erhöhte Steifigkeit im PDAC führt zu vermehrter Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und zu vermehrter epithelial-mesenchymaler Transition der Tumorzellen (94). Der erhöhte Druck führt zusammen mit der schlechten Vaskularisierung dazu, dass Chemotherapeutika den Tumor kaum erreichen können und ist somit besonders bedeutsam (80, 87).

1.3 Pankreatische Sternzellen

Die Hauptquelle des Bindegewebes im PDAC und in der chronischen Pankreatitis sind die myofibroblasten-ähnlichen pankreatischen Sternzellen (PSCs) (6). Sie wurden erstmals 1982 beschrieben, die genaue Charakterisierung und die erste Isolation erfolgte jedoch erst 1998 (5, 11, 113). Morphologisch und funktional ähneln PSCs den länger bekannten hepatischen Sternzellen, die in der Leberfibrose eine wichtige Rolle spielen (7). PSCs können entweder in einem ruhenden oder aktivierten Zustand vorliegen.

1.3.1 PSCs in Ruhe

Im gesunden Pankreas sind die PSCs im ruhenden Zustand. Sie sind zwischen Azini, Ausführungsgängen und Blutgefäßen lokalisiert, wobei sie die Azini sternförmig umgeben (5). Sie exprimieren Vimentin, Desmin und saures Gliafaserprotein und sind durch ihre Vitamin-A-haltigen Lipidtröpfchen gekennzeichnet. Die ruhenden PSCs sind nach der Isolation in der Zellkultur klein und rund. Die Lipidtröpfchen liegen dort perinukleär vor (7). Die Funktion der ruhenden PSCs ist noch wenig erforscht. Sie sezernieren Matrix-Metalloproteasen und deren Inhibitoren und sind vermutlich für den Umbau der ECM zuständig. Weitere mögliche Funktionen der ruhenden PSCs sind eine Rolle in der angeborenen Immunantwort oder als Stammzellen (39).

1.3.2 Aktivierung der PSCs

Beeinträchtigungen des Pankreas wie bei Entzündungen, Krebs oder Trauma führen zu einer Aktivierung der PSCs (Abbildung 1). Sie zeigen dann eine myofibroblasten-ähnliche Morphologie, exprimieren α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) und verlieren ihre

Lipidtröpfchen. In Zellkultur vergrößern sie ihre Fläche deutlich. Die PSCs proliferieren, migrieren, schütten Zytokine aus und produzieren massenhaft Proteine der ECM (7).

Potente Faktoren für eine Aktivierung der PSCs sind Zytokine und Wachstumsfaktoren wie *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *Transforming growth factor- β* (TGF- β) und Tumornekrosefaktor- α (7). Auch die veränderten mechanischen Eigenschaften des umliegenden Gewebes im PDAC können die PSCs aktivieren. Auf einer weichen Matrix bleiben PSCs im ruhenden Zustand, wohingegen sie auf einer steifen Matrix aktiviert werden (54). PSCs können durch erhöhten Druck aktiviert werden (s. 1.4.3) (36, 112). Weiterhin konnten Alkohol, Endotoxin, oxidativer Stress, Hyperglykämie, Endothelin-1 und Fibrinogen als Aktivatoren der PSCs identifiziert werden (7). Die Zytokinausschüttung aktivierter PSCs führt über para- und autokrine Signalwege zur Verstärkung und Verselbstständigung der Aktivierung (39).

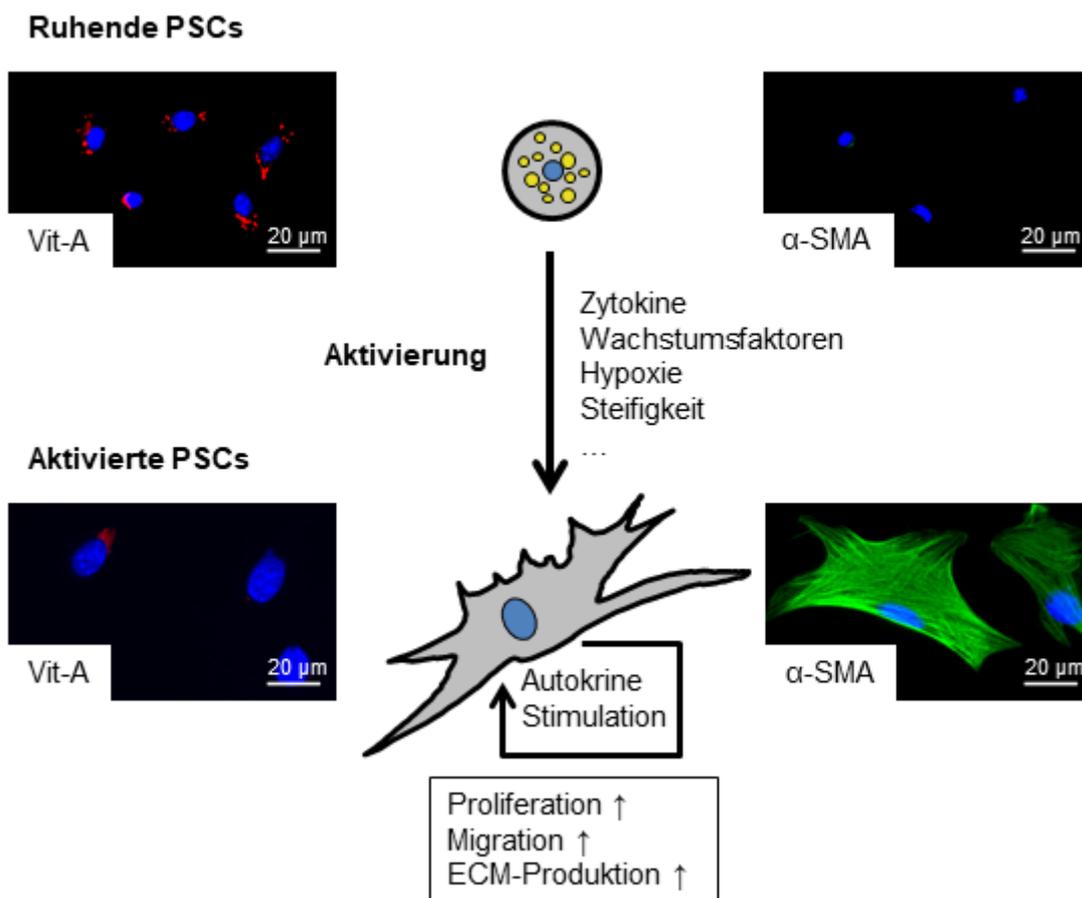


Abbildung 1. Aktivierung der PSCs. Ruhende PSCs sind klein, rund und haben perinukleäre, Vitamin A (Vit-A)-haltige Lipidtröpfchen. Nach Aktivierung breiten sich die PSCs deutlich aus, verlieren die Lipidtröpfchen und exprimieren α -Smooth Muscle Actin (α -SMA). Sie proliferieren, migrieren, produzieren extrazelluläre Matrix (ECM) und fördern autokrin ihre weitere Aktivierung.

Interessanterweise wird in hepatischen Sternzellen zwischen „*initiation*“ und „*perpetuation*“ der Aktivierung mit verschiedenen Mechanismen unterschieden (58). In PSCs unterscheidet sich die initiale Aktivierung ruhender PSCs ebenfalls von der Aufrechterhaltung und weiteren Aktivierung bereits aktivierter PSCs. So führt Insulin nur in aktivierten PSCs, nicht in ruhenden, zu einer vermehrten Kollagen-I-Expression (119).

Verschiedene intrazelluläre Signalwege konnten für die Vermittlung der Aktivierung identifiziert werden. Eine wichtige Rolle für Fibrose und Proliferation spielen z. B. die drei *mitogen-activated-protein-Kinasen* (MAP-Kinasen): ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*), p38 MAP-Kinase und JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) (117). Weitere identifizierte Signalkaskaden umfassen den Sonic-Hedgehog-Signalweg (SHH-Signalweg), den *peroxisome proliferator-activated receptor γ* und den *nuclear factor- κ B* (68).

Eine weitere Station der Signalwege sind Ca^{2+} -Signale und Ionenkanäle. Diese regulieren generell eine Vielzahl zellulärer Funktionen von Migration über Apoptose bis zu Proliferation. Dies gilt auch für PSCs. PSCs sind nicht erregbar und nicht mit den umliegenden Zellen elektrisch gekoppelt (44, 45). Die Rolle verschiedener Ionenkanäle war bis vor kurzem unklar, doch konnten in den letzten Jahren relevante Kanäle wie verschiedene *transient receptor potential*-Kanäle (TRP-Kanäle) (36, 78, 120), der für die Migration wichtige $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ (103) oder der Purinrezeptor P2X7 (46) identifiziert werden. Auch hier unterschied sich die initiale Aktivierung ruhender PSCs von der Aufrechterhaltung in bereits aktivierten PSCs. Bradykinin löste in ruhenden und aktivierten PSCs starke Ca^{2+} -Signale aus; Trypsin, Thrombin und PDGF führten hingegen nur in aktivierten PSCs zu einer Reaktion (115).

1.3.3 Rolle der PSCs im PDAC

PSCs sind für die Progression des PDAC essentiell. Die PSC-Population im PDAC stammt hauptsächlich aus residenten ruhenden PSCs, zum Teil auch aus Knochenmarkzellen (96). Damit sind die Aktivierung ruhender PSCs und die Rekrutierung zu den Läsionen durch Migration oder Proliferation besonders interessant. Die Tumorzellen schütten z. B. PDGF und TGF- β aus, die die Aktivierung, die Proliferation, Migration und ECM-Produktion der PSCs fördern. Aktivierte PSCs schütten wiederum z. B. PDGF und insulinähnliche Wachstumsfaktoren aus. Diese fördern Proliferation, Migration und verminderte Apoptose der Tumorzellen, wodurch es zu einem Kreislauf der gegenseitigen Aktivierung kommt (7, 67). PSCs versorgen die PDAC-Zellen in dem nährstoffarmen TME mit Nährstoffen (99). Überdies können PSCs zusammen mit PDAC-Zellen zu Metastasen migrieren, was die Metastasierung begünstigt (118).

Olive et al. inhibierten die Aktivierung von PSCs im Mausmodell durch Inhibition des SHH-Signalweges. Dies führte bei manifester Tumorerkrankung zu verbesserter Perfusion des Tumors und zu längerem Überleben (80). In klinischen Studien ließen sich diese Ergebnisse nicht bestätigen und neben der tumorfördernden Wirkung des TME und der PSCs zeigten sich auch schützende Effekte des Stromas im PDAC (18). Im PDAC-Mausmodell (allerdings bei sehr jungen Mäusen) zeigte sich daraufhin, dass organspezifische Deletion oder Inhibition des SHH-Signalwegs vor Tumorentstehung zu größtenteils stromafreien, aber aggressiven und dedifferenzierten Tumoren mit verkürztem Überleben der Mäuse führen (93). Die Deletion von α -SMA-positiven Myofibroblasten (wie PSCs) führt ebenfalls zu aggressiveren, invasiveren Tumoren (82).

PSCs und Stroma scheinen damit tumorprotektive sowie tumorfördernde Wirkungen zu haben, die je nach Zeitpunkt der Progression und Kontext hervortreten können. Statt der kompletten Entfernung des Tumorstromas könnte deshalb das „*stromal reprogramming*“, eine Beeinflussung der Funktion der PSCs, der Schlüssel für eine Therapie des PDAC sein (4). Das TME ist weiterhin ein äußerst vielversprechendes Ziel in der Therapie des PDAC. Kürzlich zeigten sich die ersten klinischen Erfolge einer gegen das Tumorstroma gerichteten Therapie: Das Enzym Hyaluronidase spaltet das wasserspeichernde ECM-Makromolekül Hyaluronan und reduziert den intratumoralen Druck. Dies führt zu einer verbesserten Perfusion des Tumors und einer höheren Gemcitabin-Konzentration im Tumor. In einer aktuellen Phase-II-Studie verlängerte sich das progressionsfreie Überleben bei Therapie mit einer Hyaluronidase zusätzlich zur Therapie mit nab-Paclitaxel/Gemcitabin, besonders in Hyaluronan-reichen Tumoren (48). Bei einer Kombination mit dem FOLFIRINOX-Schema hingegen hatte die Hyaluronidase überwiegend nachteilige Effekte (90). Phase-III-Studien laufen aktuell und könnten die Wertigkeit dieser Therapie weiter klären.

1.4 Mechanik

Tumoren wie das PDAC zeigen mechanische Eigenschaften, die sich deutlich vom umliegenden Gewebe unterscheiden. Erst die erhöhte Steifigkeit eines Tumors führt dazu, dass er als hartes Objekt bei der Palpation zu erkennen ist (74). Die Wahrnehmung mechanischer Stimuli generell ist essentiell für den Menschen und seine Zellen. Fühlen und Hören nehmen äußere Reize wahr, und innere Reize wie Propriozeption oder der Blutfluss sind von großer Bedeutung. Auf die einzelne Zelle können eine Reihe mechanischer Stimuli wie Dehnung (*stretch*), osmotische Zellschwellung, Scher-/Schubspannung (*shear stress*), Membraneindellungen oder verschiedene Steifigkeiten der umliegenden ECM einwirken (50, 91). In diesem Kapitel wird zuerst auf

Mechanosensibilität eingegangen und dann der erhöhte Druck als besondere Eigenschaft des desmoplastischen TME des PDAC dargestellt. Hierbei werden alle Druckangaben als Relativwerte zum normalen Atmosphärendruck von 760 mmHg (101,3 kPa) angegeben.

1.4.1 Mechanosensibilität

Bei der Übertragung mechanischer Signale müssen verschiedene Begriffe unterschieden werden: Mechanosensitivität im engeren Sinne beschreibt die initiale Wahrnehmung von mechanischen Signalen durch Rezeptoren der Zelle. Mechanotransduktion beschreibt die Übersetzung der mechanischen Signale in eine Reaktion der Zelle (50). Auf welchen molekularen Grundlagen Mechanosensitivität und Mechanotransduktion basieren, ist an vielen Stellen unklar. Eine Rolle spielen die ECM, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen, das Zytoskelett und die Plasmamembran mit verschiedenen Membranproteinen (50, 102). Zu diesen Membranproteinen gehören die mechanosensitiven Ionenkanäle (MSCs), die meist Kationenkanäle sind und sich auf einen mechanischen Reiz öffnen. Sie können entweder direkt durch mechanische Reize gesteuert werden (MSCs im engeren Sinne) oder nur an der Mechanotransduktion beteiligt sein (102). Zwei verschiedene Mechanismen werden für die Steuerung der MSCs diskutiert: Zum einen das „*tethered*“-Modell, bei dem weitere Strukturen an den Kanal angebunden sind und ihn darüber, wie an einem Kabel, öffnen können. Zum anderen das „*force from lipid*“-Modell, bei dem Veränderungen der Membranspannung allein (z. B. durch Biegung) ohne Hilfsstrukturen den Kanal steuern können. Beispiele für eukaryotische MSCs sind die *two-pore-domain*-Kaliumkanäle $K_{2P}2.1$ und $K_{2P}4.1$ und die seit kürzerem bekannten Kanäle Piezo1 und Piezo2. Auch Kanäle aus der TRP- und der epithelialer-Natriumkanal-/*Acid-sensing-ion-channel*-Familie werden als MSCs diskutiert. Bei diesen Kanälen ist jedoch weniger klar, ob sie direkt durch Membranspannung gesteuert werden oder nur an der Mechanotransduktion beteiligt sind (91, 102).

1.4.2 Erhöhter Druck im PDAC

Der Druck in murinen orthotopen PDACs ist deutlich gegenüber dem Druck im normalen Pankreas erhöht. Provenzano et al. maßen einen Mittelwert von etwa 100 mmHg im PDAC und 10 mmHg im normalen Pankreas. Erhöhter interstitieller Flüssigkeitsdruck war die Ursache des erhöhten Druckes. Das in der ECM vorliegende Makromolekül Hyaluronan spielt dabei eine wichtige Rolle, es bildet eine gelartige Phase, in der Wasser immobil „gefangen“ ist. Abbau des Hyaluronans führt zu einer Normalisierung des intratumoralen Drucks (87). Im Gegensatz führten Stylianopoulos et al. hauptsächlich den sogenannten „*solid stress*“ als Ursache für den erhöhten, die Blutgefäße komprimierenden Druck in Tumoren auf. Erhöhter interstitieller Flüssigkeitsdruck sei keine hinreichende Erklärung. Der *solid stress* entsteht durch die in einem begrenzten Volumen

proliferierenden Tumorzellen sowie durch Proliferation und Kontraktion der Stromazellen und wird durch Matrixkomponenten wie Kollagen weitergeleitet (104). Die genaue Ursache des erhöhten Druckes sowie der Einfluss von *solid stress* und interstitiellem Flüssigkeitsdruck, die korrekte Messmethode und die exakte Höhe des Druckes sind umstritten (19, 23). Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die Druckverhältnisse im PDAC unbestrittenerweise von denen des normalen Pankreas deutlich.

Außerhalb des Fokus dieser Arbeit und trotzdem von Interesse ist ein weiteres Krankheitsbild, die chronische Pankreatitis. Sie besitzt eine hohe Morbidität und ist wie das PDAC durch exzessive, PSC-verursachte Fibrose gekennzeichnet (7). Der interstitielle Druck ist in der chronischen Pankreatitis deutlich erhöht, sodass sich einige der kommenden Punkte auf dieses Krankheitsbild übertragen lassen (29).

1.4.3 Wirkung von Druck auf PSCs

In verschiedenen Zellarten (31, 51) und auch in PSCs konnte gezeigt werden, dass Druck als mechanischer Stimulus wirkt. Ein erhöhter Druck von 80 und 100 mmHg hat stimulierende Wirkung auf aktivierte PSCs mit vermehrter Kollagensekretion, vermehrter Proliferation, vermehrter α -SMA-Expression, verstärkter Migration und vermehrter TGF- β -Sekretion (36, 112). Druck scheint ruhende PSCs in den aktivierten Zustand versetzen zu können, doch wurde dies bisher nur auf morphologischer Ebene gezeigt (9).

Der Ablauf der Mechanotransduktion von Druck ist wenig erforscht. MSCs spielen in aktivierten PSCs eine essentielle Rolle in der weiteren Aktivierung durch Druck. Die Expression verschiedener MSCs veränderte sich unter Druck. Insbesondere konnte dabei eine Rolle für den möglicherweise mechanosensitiven *Transient receptor potential canonical 1 channel* (TRPC1) gezeigt werden. Während Druck zu einer verstärkten Migration und verstärktem Ca^{2+} -Einstrom in Wildtyp-PSCs (WT-PSCs) führte, war diese Reaktion in TRPC1-*knockout*-PSCs (KO-PSCs) deutlich abgeschwächt (36). Weitere Mechanismen der Mechanotransduktion von Druck in PSCs umfassen reaktive Sauerstoffspezies und den MAP-Kinase-Signalweg (9, 112).

Zusammenfassend spielen in der Entstehung des Druckes Proteine der ECM, wie Hyaluronan oder Kollagen, eine entscheidende Rolle. Diese Proteine werden durch PSCs ausgeschüttet. Der erhöhte Druck aktiviert wiederum die PSCs. Dies könnte einen Teufelskreislauf bilden, dessen Beeinflussung die Therapie des PDAC verbessern könnte.

1.5 TRPC1

Der TRPC1-Kanal gehört zu der großen Familie der TRP-Kanäle. TRP-Kanäle sind ubiquitär exprimierte, meist non-selektive Kationenkanäle. Für den non-selektiven TRPC1-Kanal steht die Ca^{2+} -Leitfähigkeit im Fokus der meisten Studien. TRP-Kanäle besitzen sechs Transmembranregionen und bilden Tetramere aus vier gleichen (Homotetramere) oder unterschiedlichen (Heterotetramere) Untereinheiten mit einer zentralen Pore. Verschiedene TRP-Kanäle können von einer großen Vielfalt an Stimuli gesteuert werden, dazu zählen so unterschiedliche wie Capsaicin und Menthol, Hitze und Kälte, mechanische Stimuli, pH-Änderungen oder G-Protein-gekoppelte Signalwege. Die TRP-Kanäle der Säugetiere können in sechs Unterfamilien unterteilt werden, die TRPC (Canonical)-, TRPV (Vanilloid)-, TRPM (Melastatin)-, TRPA (Ankyrin)-, TRPML (Mucolipin)- und TRPP (Polycystin)-Kanäle. Zu den TRPC-Kanälen gehören sieben Kanäle, die in drei Subgruppen zusammengefasst werden: TRPC1/4/5, TRPC2 und TRPC3/6/7 (116).

Auch in PSCs konnten TRP-Kanäle nachgewiesen werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TRPC6-Kanäle an der Reaktion von PSCs auf Hypoxie (78), TRPC1-Kanäle an der Reaktion auf Druck (36) und TRPV4-Kanäle an der Reaktion auf Alkohol beteiligt sind (120). Von den TRPC-Kanälen werden TRPC1/2/3/4/6 in murinen PSCs exprimiert, TRPC5/7 nicht exprimiert (78).

TRPC-Kanäle werden u. a. nach Binden extrazellulär vorliegender Agonisten an bestimmte Rezeptoren über eine Signalkaskade gesteuert. Dies ist der sogenannte Rezeptor-gesteuerte Ca^{2+} -Einstrom (ROCE) (Abbildung 2A): Nach Bindung eines Agonisten an einen heptahelikalen Rezeptor (G-protein-gekoppelter Rezeptor) „aktiviert“ dieser ein G_q -Protein, das in die $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert. Die $G\alpha_q$ -Untereinheit aktiviert die membranständige Phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$). Die $PLC\beta$ bildet aus dem Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) die second messenger Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). DAG kann dann über die Proteinkinase C oder direkt Calciumkanäle der Plasmamembran öffnen, über die der ROCE erfolgt. IP_3 bindet an den IP_3 -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER) und führt dort zu einer Ca^{2+} -Freisetzung. Bei Beendigung des Signals wird Ca^{2+} wieder aus dem Cytosol entfernt. Dies geschieht über eine Plasmamembranpumpe, über einen Austauscher in der Plasmamembran und über die Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), die Ca^{2+} in das ER pumpt. Die Kanäle der TRPC3/6/7-Subgruppe werden im Rahmen des ROCE durch DAG aktiviert (116). Der Aktivator im ROCE für TRPC1/4/5 wurde noch nicht sicher identifiziert,

wahrscheinlich spielt die Aktivierung durch PIP_2 und eine direkte Aktivierung durch $\text{G}\alpha_q$ eine Rolle (72).

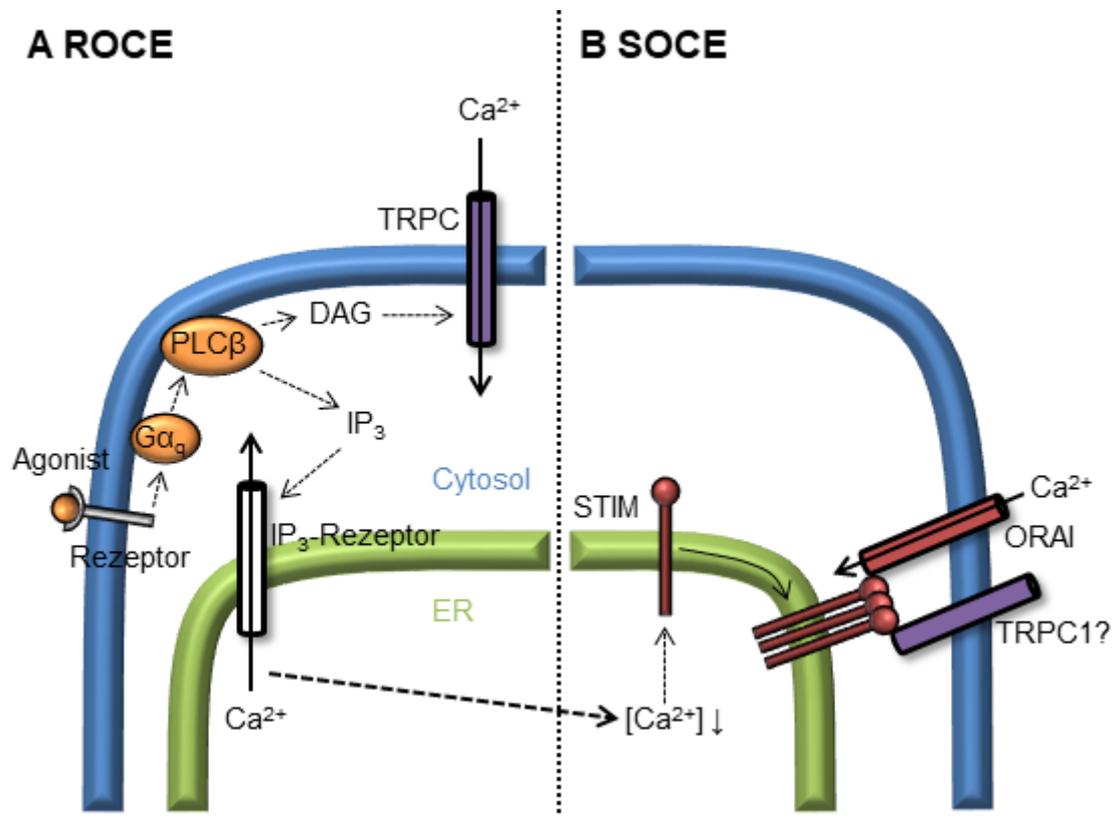


Abbildung 2. Receptor-gesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (ROCE) und store-operated calcium entry (SOCE). **A:** Nach Bindung eines Agonisten aktiviert ein Rezeptor ein $\text{G}\alpha_q$ -Protein, das die Phospholipase $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$) aktiviert. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). DAG aktiviert TRPC-Kanäle in der Plasmamembran und damit den ROCE. IP_3 führt zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). **B:** Die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führt zu erniedrigter Ca^{2+} -Konzentration im ER. Das Sensorprotein STIM erkennt dies, oligomerisiert und aktiviert den Kanal Orai, über den der SOCE erfolgt. Die Beteiligung von TRPC1-Kanälen an dieser Stelle des SOCEs wird diskutiert.

Für TRPC1-Kanäle wurde eine Beteiligung an verschiedenen Formen des Calciumeinstroms postuliert. TRPC1-Kanäle könnten im ROCE, als MSC (s. 1.5.1) sowie im sogenannten store-operated calcium entry (SOCE) (s. 1.5.2) eine Rolle spielen. Ob TRPC1-Kanäle funktionelle Homotetramere in der Plasmamembran bilden, ist umstritten (26). In Überexpressionssystemen konnten Homotetramere nur im ER, aber nicht in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Co-Expression mit TRPC4/5 war nötig, damit TRPC1-Kanäle in der Plasmamembran erschienen (2). Auch ist es nicht gelungen, den Strom durch homomere TRPC1-Kanäle zu messen (26). TRPC1-Kanäle bilden allerdings eine Reihe an Heterotetrameren, sodass dies in der Diskussion der Rolle des TRPC1 im

physiologischen Kontext beachtet werden muss. Nachgewiesen werden konnte eine Heteromerbildung mit TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 in verschiedenen Stöchiometrien sowie mit TRPP2, TRPV4 und TRPV6 (26). In diesen Heterotetrameren beeinflusst TRPC1 die Funktion des Kanals und ist an der Kanalpore beteiligt, was insbesondere für TRPC1/4- und TRPC1/5-Heteromere gezeigt werden konnte (95, 101).

1.5.1 TRPC1 als mechanosensitiver Kanal

In welcher Form der TRPC1-Kanal ein MSC ist, ist stark umstritten. Mehrere Autoren gehen von einer indirekten Rolle des TRPC1 in der Mechanotransduktion aus (26, 30, 102), andere halten hingegen eine Mechanosensitivität im engeren Sinne aller TRP-Kanäle für möglich (61).

TRPC1-Kanäle konnten in Membranteilen aus Froschoozyten nachgewiesen werden, die in Patch-Clamp-Messungen einen deutlichen Strom auf Dehnung zeigten; Überexpression von TRPC1 verstärkte den Strom >10-fach, Knockdown von TRPC1 verminderte ihn deutlich (66). Dies konnte allerdings in folgenden Experimenten der gleichen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden, in CHO-Zellen und COS-Zellen führte Überexpression von TRPC1 nicht zu vermehrter Mechanosensitivität. Der überexprimierte Kanal lag in diesen Zellen allerdings hauptsächlich im ER und nicht in der Plasmamembran, wie bei den Froschoozyten, vor (41). Auch zeigten murine TRPC1-KO-Gefäßmuskelzellen gegenüber WT-Zellen keine veränderten Ströme als Reaktion auf Dehnung (25). Allerdings ist es möglich, dass die Mechanosensitivität sich je nach zellulärem Kontext unterscheidet und die Bildung von Heteromeren mit z. B. TRPC4/5 oder den möglich mechanosensitiven Kanälen TRPP2 oder TRPV4 notwendig ist (28, 84). Auch die Interaktion mit weiteren Membranproteinen sowie mit dem Zytoskelett könnte eine Rolle spielen (84).

Es bleibt insgesamt unklar, ob der TRPC1-Kanal ein MSC im engeren Sinne ist und direkt durch mechanische Stimuli gesteuert werden kann. Dass er jedoch eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion spielt, zeigen eine Reihe von Studien in unterschiedlichen Organsystem *in vitro* und *in vivo*. Beispielsweise führten TRPC1-KO und Knockdown zu verringerter Migration und reduziertem Ca^{2+} -Anstieg nach Dehnung des Untergrunds migrierender Zellen *in vitro* (35). *In vivo* änderten TRPC1-KO-Mäuse ihr Verhalten bei Berührungen weniger und zeigten deutlich verminderte Aktionspotentiale in isolierten afferenten Nerven auf leichten Druck (40).

1.5.2 TRPC1 im store operated calcium entry

Der SOCE ist eine Form des Ca^{2+} -Einstroms, der in nahezu allen Zellen existiert und der in nicht-erregbaren Zellen die Hauptform des Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran

darstellt. KO der am SOCE beteiligten Gene führt z. B. zu gestörter Entwicklung des Bewegungsapparats, Verlust der erworbenen Immunität und schnellem Versterben entsprechender Mäuse (89). Auch in PSCs wurde der SOCE nachgewiesen (38, 44). Der SOCE ist ein Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran, der bei Entleerung der Ca^{2+} -Speicher der Zelle, also hauptsächlich des ER, auftritt. Physiologisch entleeren hauptsächlich Agonisten mit folgender Aktivierung der PLC β und somit IP $_3$ -vermitteltem Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER die Speicher (s. 1.5). Experimentell kann die Speicherentleerung ohne Agonisten direkt durch Thapsigargin oder *Cyclopiazonic acid* erfolgen. Sie blockieren die SERCA, was zu einem passiven Ausstrom des Ca^{2+} aus dem ER über „Leak-Kanäle“ ohne erneutes Auffüllen führt. Der SOCE dient zum einen dem Wiederauffüllen der zellulären Ca^{2+} -Speicher, zum anderen der Verstärkung, Aufrechterhaltung und Modulation des Ca^{2+} -Signals. Hierbei ist nicht nur die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration relevant, sondern auch die örtliche Komponente innerhalb von Mikrodomänen der Zelle sowie die zeitliche Komponente (86).

In verschiedenen Zellen konnte für den SOCE der sogenannte *Ca²⁺-release-activated-Ca²⁺-Kanal* (CRAC-Kanal) verantwortlich gemacht werden. Als molekulare Komponenten des Kanals konnten *Stromal interaction molecule 1* (STIM1) als Ca^{2+} -Sensor im ER und Orai1 als eigentlicher Ionenkanal in der Plasmamembran identifiziert werden (89). STIM1 ist ein Transmembranprotein des ER und hat eine Ca^{2+} -bindende Domäne. Wenn die Ca^{2+} -Konzentration im ER absinkt, dissoziiert Ca^{2+} von STIM1 ab. Daraufhin oligomerisiert STIM1 zu punktförmigen Komplexen nahe der Plasmamembran. STIM1 rekrutiert Orai1 in der Plasmamembran zu den Komplexen und interagiert physisch direkt mit Orai1. Der Ionenkanal Orai1 öffnet sich und lässt Ca^{2+} einströmen (Abbildung 2B). Der Strom über die Plasmamembran durch diesen Komplex, der Ca^{2+} -selektiv ist, wird I_{CRAC} genannt (3).

Neben STIM/Orai wird eine Rolle weiterer Kanäle im SOCE vermutet, besonders diskutiert wird TRPC1 (26, 89). Schon vor der Identifizierung von STIM1/Orai1 wurde TRPC1 als bedeutend im SOCE identifiziert (16). Bei Speicherentleerung treten nicht- Ca^{2+} -selektive Ströme auf, die somit nicht zu I_{CRAC} , aber gut zu den nicht-selektiven TRPC-Kanälen passen (24). Diese Ströme werden in ihrer Gesamtheit I_{SOC} (*store-operated current*) genannt (3). Knockdown von TRPC1 führt zu reduziertem I_{SOC} , und STIM1 kann mit TRPC1-Kanälen interagieren (20, 49, 76), wobei die genaue Interaktion von STIM, Orai und TRPC1 noch unklar ist. TRPC1 ist dabei wahrscheinlich nicht am CRAC-Kanal beteiligt, sondern bildet abgegrenzte Kanäle mit STIM1, wie durch Ambudkar et al postuliert (3): Ca^{2+} -Einstrom durch Orai1 ist notwendig, um TRPC1-Kanäle aus Vesikeln zur Plasmamembran zu rekrutieren, wo TRPC1 mit STIM1

Cluster bildet (20). Zusätzlich reicht Überexpression von STIM1/Orai1 aus, um I_{CRAC} hervorzurufen (85).

Andere Studien zeigten gegensätzlich keine Rolle von STIM1 und ORAI1 in der Aktivierung von TRPC1-Kanälen (22). Auch zeigte sich keine Reduktion des SOCEs in arteriellen glatten Muskelzellen und Thrombozyten einer TRPC1-KO-Maus (25, 111). Eine mögliche Erklärung wäre hier eine zelltypspezifische Funktion der TRPC1-Kanäle im SOCE, da in Speicheldrüsenzellen derselben TRPC1-KO-Mäuse sowie in Adipozyten der SOCE deutlich reduziert war (62, 97). Auch könnte sich die physiologische Situation von der in Überexpressionssystemen unterscheiden.

Ca^{2+} -Einstrom hat im SOCE unterschiedliche zelluläre Funktionen, je nachdem, ob er durch CRAC- oder SOC-Kanäle erfolgt (20, 81). Zusammenfassend ist deshalb die Charakterisierung der Rolle von TRPC1 im SOCE in verschiedenen Zelltypen physiologisch relevant.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Rolle des TRPC1-Kanals in der druckabhängigen initialen Aktivierung ruhender PSCs charakterisiert werden. Das Verständnis der PSCs ist essentiell, um Ansätze zur Therapie des PDAC zu finden. Der Druck ist im PDAC erhöht, und erhöhter Druck ist ein Faktor, der aktivierte PSCs weiter aktiviert. Dabei spielt TRPC1 eine entscheidende Rolle. Jedoch unterscheiden sich sowohl die Stimuli, die PSCs aktivieren, als auch der Ca^{2+} -Haushalt zwischen ruhenden und aktivierten PSCs. Diese Erkenntnisse lassen sich deshalb nicht ohne weiteres auf die initiale Aktivierung ruhender PSCs übertragen. Das Verständnis der initialen Aktivierung ist allerdings von großer Relevanz, denn die Population der aktivierten PSCs im PDAC entspringt aus den residenten, ruhenden PSCs. Wie TRPC1 an dieser Aktivierung beteiligt ist, ist unklar. TRPC1-Kanäle könnten im Rahmen der Aktivierung Einfluss auf den SOCE haben, doch die Rolle der TRPC1-Kanäle im SOCE ist umstritten und in den PSCs völlig unbekannt. Daraus leiten sich die Ziele dieser Arbeit ab, es sollen

- 1) die Aktivierung ruhender PSCs durch Druck nachvollzogen werden,
- 2) die Rolle von TRPC1 in dieser Aktivierung untersucht werden,
- 3) die Rolle von TRPC1 im SOCE in Rahmen der Aktivierung von PSCs untersucht werden.

Dafür sollen frisch isolierte, ruhende, primäre murine PSCs unter Kontrollbedingungen und unter Druck verglichen werden. Die Expression von α -SMA und das Vorhandensein von Lipidtröpfchen werden als etablierte morphologische Marker der Aktivierung fluoreszenzmikroskopisch untersucht; die Migration von PSCs wird als funktioneller Marker der Aktivierung videomikroskopisch beurteilt. Um die Rolle von TRPC1 zu ergründen, werden zusätzlich TRPC1-KO-PSCs bei der Aktivierung untersucht. Der SOCE nach Depletion der intrazellulären Speicher und Auslösung des SOCE wird in ruhenden und aktivierten TRPC1-KO- und WT-PSCs verglichen, um die Rolle von TRPC1 im SOCE zu untersuchen.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kulturbedingungen

Für die folgenden Experimente wurden murine, primäre PSCs verwendet. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten steril. Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/Ham's F12 im Verhältnis 1:1 mit einem Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) und Penicillin/Streptomycin verwendet (Tabelle 1). Die PSCs wurden im Inkubator bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ unter Umgebungsdruck bebrütet.

Die PSCs wurden entweder bis zur Passage 2 (P2) kultiviert oder direkt nach der Isolation verwendet. Für die Kultivierung bis P2 erfolgte der Wechsel des Mediums am 1. und 2. Tag nach der Isolation, danach jeden 3. Tag. Sobald die PSCs nach 5-6 Tagen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert und im Verhältnis 1:2 aufgeteilt (s. 3.1.2). Weitere Passagen erfolgten im Verhältnis 1:1. Die Zellkultur aktiviert die PSCs, P2-PSCs entsprechen aktivierten PSCs. In den meisten Experimenten wurden die PSCs allerdings direkt nach der Isolation verwendet. Das Medium wurde in diesem Fall nicht ausgetauscht, um die autokrine Stimulation aufrechtzuerhalten. Das genaue Vorgehen ist bei den jeweiligen Experimenten beschrieben.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Substanz	Hersteller	Anteil
DMEM/Ham's F12 1:1 mit Glutamin und HCO ₃ ⁻	Sigma-Aldrich	89 %
Penicillin G (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)	Biochrom	1 %
Fetales Kälberserum	GE Healthcare	10 %

3.1.2 Passage der Zellen und Zellzählung

Um die PSCs vom Boden der Zellkulturschale abzulösen und entweder für die weitere Kultur („Passage“) oder für Experimente zu verwenden, wurden die PSCs mit Trypsin behandelt. Zuerst wurde das alte Medium abgesaugt und die Schale zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ohne Ca²⁺ und ohne Mg²⁺ gewaschen, um die für die Adhäsion an der Schale wichtigen Ionen zu entfernen. 0,25 %-Trypsin/0,02 %-Ethyldiamintetraacetat-PBS-Lösung wurde auf die Schale gegeben. Nach

5-10 minütiger Inkubation im Inkubator waren die PSCs abgelöst und die Reaktion wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt.

Für die weitere Kultur wurden die PSCs auf neue Schalen verteilt. Für die Experimente erfolgte eine Zählung der Zellen. Hierfür wurde die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 210 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 250 µl Medium resuspendiert. Anschließend wurde in der Neubauer *improved*-Zählkammer die Teilchendichte der Zellen in der Suspension bestimmt. Danach wurde ein der gewünschten Zellzahl entsprechendes Volumen mit Zellkulturmedium auf das gewünschte Zielvolumen verdünnt.

3.2 Mäuse und TRPC1-KO

Die PSCs wurden aus WT-Mäusen einer C57BL/6J-Linie der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der medizinischen Fakultät Münster und aus WT- und TRPC1-KO-Mäusen einer TRPC1-KO-Linie (basierend auf einem 1:1 Hintergrund aus 129/Sv:C57BL/6J) isoliert (25).

Für die Ca²⁺-Messungen und dort, wo es möglich war, für die Fluoreszenzmikroskopie, wurden bei Verwendung von TRPC1-KO-Mäusen als Kontrolle WT-Wurfgeschwister eingesetzt. Die Mäuse waren 3-9 Monate alt. Mäuse beider Geschlechter wurden zufällig eingesetzt. Für die Migrationsexperimente und für einen Teil der Fluoreszenzmikroskopieexperimente wurden vergleichbare WT-Mäuse der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung eingesetzt. Die Mäuse waren 2-5 Monate alt. Mäuse beider Geschlechter wurden zufällig eingesetzt. Die Haltung der Tiere erfolgte bei einem konstanten 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus unter kontrollierten Temperatur- und Luftfeuchtigkeits-Bedingungen. Die Tiere wurden mit handelsüblichem Standardfutter und Leitungswasser ad libitum gefüttert. Das Wohlergehen der Tiere wurde täglich kontrolliert. Wasser, Futter und die Einstreu der Käfige wurden einmal pro Woche gewechselt.

Die TRPC1-KO-Linie wurde von Dietrich et al. (25) hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der terminale Teil von Exon 8 des TRPC1-Gens sowie ein Teil von Intron 8 wurden durch einen Selektionsmarker ersetzt. In den TRPC1-KO-Mäusen führte dies beim Spleißen zur Entfernung von Exon 8 und direkter Verbindung der Exons 7 und 9. Dies führte zu einem *frameshift* und zu einem Stopcodon in Exon 9. Im Western Blot und in der Immunfluoreszenz der Membran konnte kein TRPC1-Kanal mehr nachgewiesen werden (62), was auf einen Abbau des nicht-funktionellen Proteins schließen lässt. TRPC1-KO-Mäuse sind gesund und fruchtbar mit einer normalen Anzahl an Nachkommen, zeigen aber in einigen Organsystemen Unterschiede (25, 26).

Die Genotypisierung der Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion führten Jana Welzig und Benedikt Fels durch. Die Entnahme von Organen und Gewebe zu wissenschaftlichen Zwecken wurde dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unter dem Aktenzeichen 84-03.05.50.15.010 am 25.03.2015 angezeigt.

3.3 Isolation der PSCs

Zur Isolation der PSCs wurde ein modifiziertes Protokoll von Haanes et al. verwendet (46). Das Protokoll basiert auf unterschiedlich schneller Adhäsion der verschiedenen Zellarten des Pankreas an einer Zellkulturschale.

Zunächst wurde die Maus mittels Isofluran und zervikaler Dislokation getötet. Nach Desinfektion der Haut wurde das Abdomen mittels Querschnitt weit eröffnet. Das Pankreas der Maus wurde entnommen. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, Blutgefäße oder den Darm nicht zu verletzen. Das entnommene Pankreas wurde mit 5 ml *Gey's Balanced Salt Solution* gewaschen und mit einer Schere zerkleinert. Dabei wurde aufschwimmendes Fett entfernt. Das Gewebe wurde in einer Lösung aus 3 ml *Gey's Balanced Salt Solution* und 3 mg Kollagenase P für 25 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurde mehrfach auf und ab pipettiert und 5 ml vorgewärmte *Gey's Balanced Salt Solution* hinzugefügt, um die Suspension zu durchmischen. Als nächstes wurde die Kollagenase durch Zentrifugation für 8 min bei 300 x g und anschließendem Absaugen des Überstands entfernt. Das Pellet wurde in 2x5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Ø 100 mm-Zellkulturschale, die vorher für 10 min mit FKS beschichtet wurde, gegeben und für 2 h im Inkubator belassen. Nun erfolgte der entscheidende Schritt der Isolation: Die PSCs adhären schneller und stärker als die restlichen Zellen der Suspension wie Azinuszellen, Inselzellen oder auch pankreatische Fibroblasten. Dies wurde sich zu Nutze gemacht, indem die Schale mehrfach kräftig mit einer Pipette mit Zellkulturmedium gewaschen wurde und lose adhären Zellen entfernt wurden. Dies wurde wiederholt, bis unter dem Lichtmikroskop nur noch möglichst viele kleine, runde und schwarze Zellen zu sehen waren. Diese stellten PSCs dar. Nun wurde die Schale mit 10 ml Zellkulturmedium belassen.

Da diese Methode bereits im Labor etabliert war und auch in den folgenden Experimenten typische PSC-Marker gesehen werden konnten, kann man davon ausgehen, dass es sich bei den isolierten Zellen um PSCs handelte.

3.4 Druckbehandlung

Für die Experimente mit Druckbehandlung wurde ein Druck von 100 mmHg (13 kPa) über dem atmosphärischen Druck verwendet. Ein Druck von 100 mmHg konnte im PDAC nachgewiesen werden und hatte in verschiedenen Studien eine stimulierende Wirkung auf die PSCs (s. 1.4.3). Der Druck wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden erzeugt. Hauptsächlich wurde die im Folgenden beschriebene Druckkammer verwendet. Da dies während der Migrationsexperimente nicht möglich war, wurde dort der Druck über eine Wassersäule erzeugt (s. 3.7.2).

Die Druckkammer wurde für das Institut durch die feinmechanische Werkstatt der medizinischen Fakultät der Universität Münster gebaut und u. a. durch Fels et al. verwendet und beschrieben (36). Die PSCs wurden in der Zellkulturschale in der Druckkammer positioniert und die Kammer in einem Inkubator bei normalen Kulturbedingungen von 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und Umgebungsdruck platziert. Die Kontrollzellen befanden sich außerhalb der Druckkammer im selben Inkubator. Die Druckkammer bestand aus „Plexiglas“ (Polymethylmethacrylat). An einem Einlass wurde eine Pumpe angeschlossen, die Luft aus dem Inkubator ansaugte und in die Druckkammer presste (Abbildung 3). Am Auslass wurde zum einen ein Manometer angeschlossen, um den Druck in der Kammer überwachen und ggf. regulieren zu können, zum anderen ein Auslassventil, um eine kontrollierte Luftzirkulation zu ermöglichen.

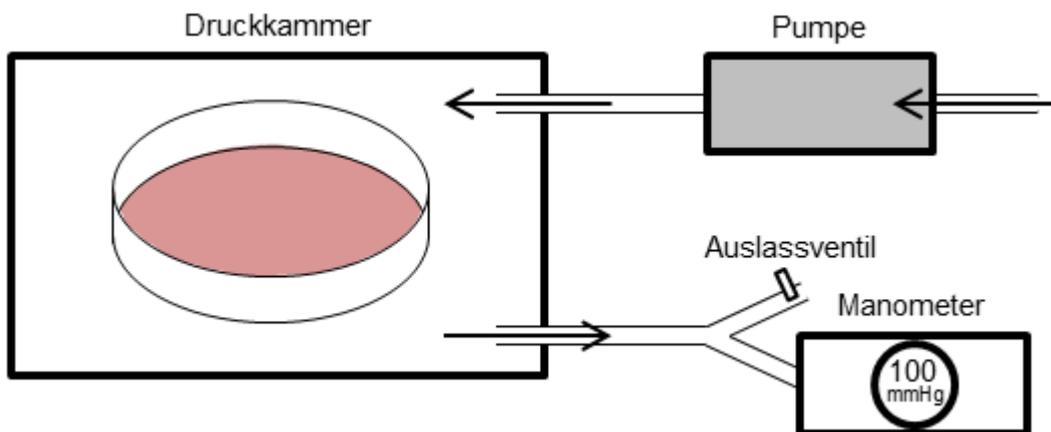


Abbildung 3. Aufbau der Druckkammer. Die PSCs wurden in ihrer Schale in der Druckkammer positioniert. Durch eine Pumpe wurde Luft aus dem Inkubator in die Druckkammer gepresst. Am Auslass wurde der Druck gemessen. Über das Auslassventil fand eine kontrollierte Luftzirkulation statt.

3.5 Nachweis von Lipidtröpfchen

Um die Aktivierung von PSCs unter Druck verfolgen zu können, wurden verschiedene Marker analysiert. Ein gut untersuchtes morphologisches Merkmal ist der Verlust der Vitamin-A-haltigen Lipidtröpfchen: Ruhende PSCs besitzen viele perinukleäre Lipidtröpfchen, aktivierte PSCs deutlich weniger oder keine (11). Im folgenden Experiment wurden die PSCs unter Kontrollbedingungen oder Druck auf das Vorhandensein von Lipidtröpfchen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Isolation getestet. Zu diesem Zweck wurde der Farbstoff Nile Red verwendet, der in hydrophiler Umgebung nicht, aber in hydrophober Umgebung stark rot fluoresziert (42). Der Farbstoff ist somit spezifisch für Lipidtröpfchen, aber nicht für Vitamin A. Die Exzitationswellenlänge beträgt 515 nm-560 nm und die Emissionswellenlänge über 590 nm.

3.5.1 Experimentaufbau

Für die Experimente wurden die PSCs direkt nach der Isolierung abgelöst und gezählt (s. 3.1.2). Vorher wurden gereinigte und sterilisierte Ø 20 mm-Glasdeckgläschen in einer 12-Well-Platte für 15 min mit Poly-L-Lysin beschichtet. Darauf wurden je 30.000 PSCs in 2 ml Medium ausgesät und zur Adhäsion für 2 h im Inkubator gelassen. Danach wurden die ersten Deckgläschen entnommen und fixiert, im Folgenden Zeitpunkt „0 h“ genannt (insgesamt 6 h nach Beginn der Isolation). Die weiteren Deckgläschen wurden in der Druckkammer oder unter Kontrollbedingungen in demselben Inkubator platziert. Jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h und 120 h wurden Deckgläschen entnommen und fixiert.

Für die Fixierung wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Dann wurden die PSCs mit 3,5 %-para-Formaldehyd-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Unreagierte Aldehyd-Gruppen wurden mit 0,1 mM-Glycin-Lösung für 10 min blockiert. Die fixierten PSCs wurden in PBS bei 4 °C bis zur Färbung aufbewahrt.

Für verschiedene Zeitpunkte wurden ggf. PSCs von unterschiedlichen Mäusen untersucht, da in jeder Isolation nur wenige PSCs gewonnen werden konnten. Für einen bestimmten Zeitpunkt unter Kontrollbedingungen und Druck wurden jeweils PSCs der gleichen Maus untersucht.

3.5.2 Nile Red-Färbung

Zur Färbung wurden 0,5 mg/ml Nile Red in Aceton gelöst, davon wurden 16 µl in 750 µl Glycerin und 250 µl Wasser gelöst, womit sich eine Konzentration von 25 µM Nile Red ergab. Von dieser Lösung wurden 20 µl auf Parafilm vorgelegt und die Deckgläschen für 15 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei 100 % Luftfeuchtigkeit gefärbt.

Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträger mit Einbettmedium eingebettet. Zur zusätzlichen Färbung der Zellkerne wurde das Einbettmedium zuvor mit 4'-6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) versetzt. Bis zum Trocknen des Einbettmediums wurden die Objektträger bei 4 °C aufbewahrt.

3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Für die Auswertung wurde das Mikroskop Axiovert 200 (Carl Zeiss) mit einem 40er Öl-Objektiv und der RT-SE-Spot-Kamera (Visitron Systems), kontrolliert von der MetaVue-Software (Visitron), verwendet. Die verwendeten Filter sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bei jedem Objektträger wurden die Zellen in der DAPI-Färbung lokalisiert und 20 Bilder beider Färbungen an zufälligen Stellen aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug 7 ms für DAPI und 12 ms für Nile Red.

Die Auswertung erfolgte qualitativ: PSCs mit deutlich gefärbten perinukleären Lipidtröpfchen wurden als „Nile Red-positiv“ bezeichnet; sonst als „Nile Red-negativ“. Nun wurde der Anteil der positiven Zellen pro Deckgläschen ermittelt.

Tabelle 2: Wellenlängen der Filter für die Fluoreszenzmikroskopie

Farbstoff	Exzitationsfilter	Emissionsfilter	Strahlteiler
Nile Red	540-552 nm	>590 nm	580 nm
DAPI	365 nm	422-468 nm	395 nm
Alexa 488	450-490 nm	515-565 nm	510 nm

3.6 α -SMA-Färbung

Als weiterer Marker der Sternzellaktivierung wurde α -SMA untersucht. Im aktivierten Zustand exprimieren PSCs α -SMA, während es im ruhenden Zustand kaum nachzuweisen ist (5). Hier wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Erstantikörper gegen α -SMA und einem mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 (Alexa 488) gekoppelten Zweitantikörper angewendet. Die Zellen wurden dann einzeln unter dem Mikroskop analysiert. In diesem Experiment wurden WT- und TRPC1-KO-PSCs unter Kontrollbedingungen oder Druck in Abhängigkeit von der Zeit nach der Isolation untersucht.

Der Aufbau des Experiments entspricht dem für die Analyse der Lipidtröpfchen beschriebenen (s. 3.5.1), zusätzlich wurden für die Zeitpunkte 0 h, 24 h und 48 h TRPC1-KO-PSCs untersucht.

3.6.1 Immunfluoreszenzfärbung

Da α -SMA intrazellulär vorliegt, müssen die Zellen permeabilisiert werden. Dafür wurde 0,2 %-Triton-X-100-Lösung für 10 min verwendet. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 45 min Inkubation mit 10 %-Boviner-Serumalbumin-Lösung blockiert. Als nächstes wurden die Zellen mit dem Erstantikörper gegen α -SMA (Tabelle 3) inkubiert. Von dieser Lösung wurden 20 μ l auf Parafilm vorgelegt und die Deckgläschen für 16 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer bei 100 % Luftfeuchtigkeit gefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur mit dem mit Alexa 488 gekoppelten Zweitantikörper (Tabelle 3) gefärbt. Als letztes wurden die Deckgläschen mit Einbettmedium, das mit DAPI versehen wurde, auf Objektträger eingebettet. Bis zum Trocknen des Einbettmediums wurden die Objektträger bei 4 °C aufbewahrt. Zwischen allen Schritten wurden die Deckgläschen mehrfach mit PBS gewaschen.

Tabelle 3: Antikörper für die Immunfluoreszenz

Verwendung	Antikörper	Herkunftstier	Hersteller	Verdünnung in BSA/PBS ¹
Erstantikörper	Anti- α -SMA	Maus	Sigma	1:400
Zweitantikörper	Anti-Maus, Alexa 488-gekoppelt	Ziege	Invitrogen	1:400

¹10 %-Bovine-Serumalbumin-PBS-Lösung

3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Für die Auswertung wurde wie bei der Nile Red-Färbung das Mikroskop Axiovert 200 (Carl Zeiss) mit einem 40er Öl-Objektiv und der RT-SE-Spot-Kamera (Visitron Systems), kontrolliert von der MetaVue-Software (Visitron), verwendet. Die verwendeten Filter sind in Tabelle 2 beschrieben. Bei jedem Objektträger wurden die Zellen in der DAPI-Färbung lokalisiert und 20 Bilder an zufälligen Stellen aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug 7 ms für DAPI und 50 ms mit einem Binning von 1 für α -SMA/Alexa 488.

Zur Auswertung wurden die komplett abgebildeten Zellen in der Software ImageJ umrandet und die projizierte Fläche, die mittlere Intensität und der sogenannte Strukturindex bestimmt. Zusätzlich wurde neben jeder Zelle ein Stück Hintergrund umrandet und die Intensität dort bestimmt. Aus projizierter Fläche und mittlerer Intensität der Zelle abzüglich der Intensität des Hintergrunds wurde die sogenannte „Gesamtintensität“ berechnet, die mit der Menge an α -SMA in der Zelle korreliert: Gesamtintensität=(Zellintensität-Hintergrundintensität)*Fläche.

Als sogenannter Strukturindex wurde die „Circularity“ bestimmt: Circularity= $(4\pi \cdot \text{Fläche}) / \text{Umfang}^2$. Die Circularity kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

Je runder eine Zelle ist, desto mehr nähert sich der Wert 1 an. Je mehr Ausläufer die Zelle hat bzw. je mehr die Form von einem Kreis abweicht, desto mehr nähert sich der Wert 0 an (Abbildung 4).

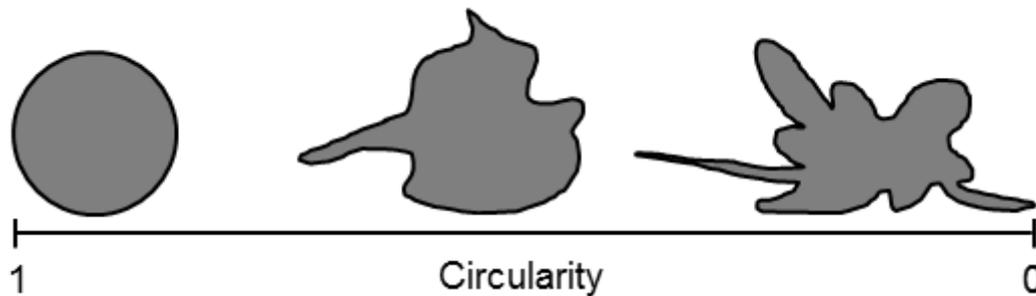


Abbildung 4. Circularität. Die Circularität beschreibt die Struktur und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Eine 1 entspricht dabei einem perfekten Kreis. Wenn die Zelle Ausläufer bildet oder ellipsenförmiger wird, nähert sich die Circularität zunehmend 0 an.

3.7 Zellmigration

Als funktioneller Marker der Sternzellaktivierung wurde das Migrationsverhalten analysiert. Aktivierte PSCs migrieren schneller als ruhende PSCs (7). In diesem Experiment wurde das Migrationsverhalten einzelner PSCs unter dem Videomikroskop beobachtet. Die Videomikroskopie wurde direkt nach der Isolation oder 72 h später gestartet; es wurden PSCs unter Kontrollbedingungen oder Druck verglichen.

3.7.1 Vorbereitung der Migrationsexperimente

Für die Migrationsexperimente wurden zuerst Ibidi μ -Slides (μ -Slide I^{0.6} Luer) mit einer 2D-Matrix versehen. Die μ -Slides bestehen aus einem in der Mitte gelegenen Kanal mit einer Höhe von 600 μ m und einem Volumen von 150 μ l sowie zwei Reservoirs, die durch den Kanal verbunden werden (s. Abbildung 5). Eine Matrix, die der desmoplastischen Matrix im PDAC ähnelt, wurde auf Eis hergestellt (Tabelle 4). Von dieser Matrix wurden 150 μ l in den Kanal appliziert und für 2 h im Inkubator zur Polymerisation gelassen. Danach wurde die Flüssigkeit im Kanal durch Zellkulturmedium ausgetauscht, indem der Kanal zweimal mit 150 μ l Medium durchgespült wurde. Dies konnte durch leichtes Schräghalten der μ -Slides und direktes Absaugen der Flüssigkeit an der anderen Seite unterstützt werden. Die Matrix wurde lichtmikroskopisch auf ihre Intaktheit kontrolliert.

Für die Experimente wurden die PSCs direkt nach der Isolierung abgelöst und gezählt (s. 3.1.2). 15.000 PSCs in 150 μ l Zellkulturmedium wurden in die Kanäle der μ -Slides gefüllt, wobei das vorhandene Medium entfernt wurde. Nach 2 h Adhäsion im Inkubator konnten die Experimente für den Zeitpunkt „0 h“ (insgesamt 6 h nach Start der Isolierung)

gestartet werden. Für die Experimente nach 72 h wurden die Reservoirs der μ -Slides mit PSCs mit je 60 μ l Medium aufgefüllt und die μ -Slides entweder für 72 h unter Kontrollbedingungen oder in der Druckkammer im selben Inkubator platziert.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Migrationsmatrix

Substanz	Konzentration	Volumen	Endkonzentration	Matrixzusammensetzung
RPMI 10x	104 g/l	25 μ l	10,4 g/l	-
HEPES 10x	100 mM	25 μ l	10 mM	-
NaOH	1 M	1,2 μ l	pH 7,4	-
H ₂ O	-	124 μ l	-	-
Laminin	1 mg/ml	10 μ l	40 μ g/ml	4,46 %
Fibronectin	1 mg/ml	10 μ l	40 μ g/ml	4,46 %
Kollagen IV	0,9 mg/ml	1,5 μ l	5,4 μ g/ml	0,602 %
Kollagen III	1 mg/ml	3 μ l	12 μ g/ml	1,34 %
Kollagen I	4 mg/ml	50 μ l	800 μ g/ml	89,15 %

Die aufgeführte Matrix wurde für die Experimente im Verhältnis 1:10 in H₂O weiter verdünnt.

3.7.2 Druckerzeugung und Versuchsaufbau der Migrationsexperimente

Vor dem Start des Experiments wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht, da während des Experiments die CO₂-Atmosphäre nicht aufrechterhalten werden konnte. Das Migrationsmedium bestand aus HCO₃⁻-freiem RPMI-Medium mit 20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) sowie einem Zusatz von FKS und Penicillin/Streptomycin (Tabelle 5). Davon wurden dreimal 100 μ l auf einer Seite des Kanals appliziert und das alte Medium auf der anderen Seite entfernt, um das Medium nahezu komplett zu ersetzen.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Migrationsmediums

Substanz	Hersteller	Anteil
RPMI-1640 modifiziert mit HEPES und Glutamin	Sigma	89 %
Penicillin G (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 μ g/ml)	Biochrom	1 %
Fetales Kälberserum	GE Healthcare	10 %

Zur Erzeugung des Druckes wurde ein Ende der μ -Slides fest verschlossen (Abbildung 5). Am zweiten Ende der μ -Slides wurde mit einem dichten Luer-Lock-Verschluss ein

Plastikschlauch angeschlossen, der mit einem mit Medium gefüllten Reservoir in Form einer Spritze verbunden war. Diese wurde auf 136 cm Höhe gehängt, wodurch ein Druck in Höhe von 100 mmHg aufgebaut wurde.

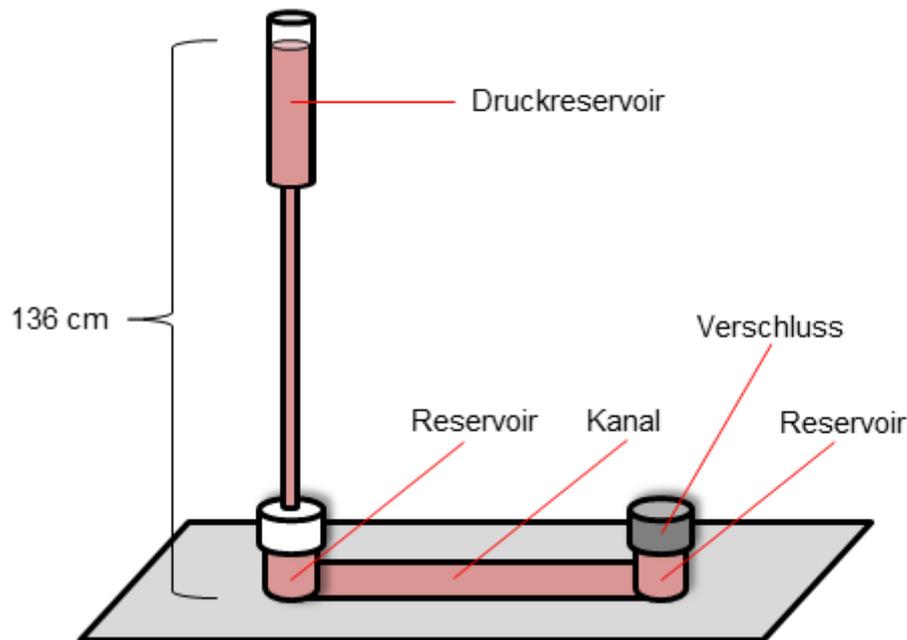


Abbildung 5. Aufbau der Druckerzeugung für die Migrationsexperimente. Die PSCs wurden in den Kanal eines μ -Slides ausgesät. Ein Reservoir wurde fest verschlossen, an das Reservoir auf der anderen Seite wurde ein ebenfalls mit Medium gefüllter Schlauch mit einem Druckreservoir am Ende angeschlossen und auf 136 cm Höhe gehängt, was einem Druck von 100 mmHg entsprach.

Die μ -Slides wurden für das Experiment in vorgewärmten Kammern (37 °C) auf inversen Durchlichtmikroskopen (Carl Zeiss Axiovert 25 und Carl Zeiss Axiovert 40C) platziert. Es wurden 20er und 10er Objektive verwendet. Jeweils 4 Filme wurden parallel aufgenommen. Die Mikroskope wurden durch die Programme HiPic und Wasabi gesteuert.

In diesem Aufbau wurde über 24 h jede 10 min ein Bild der PSCs aufgenommen und das erzeugte Video ausgewertet.

3.7.3 Auswertung der Migration

Für die Auswertung wurden jeweils die ersten 2 h, die mittleren 2 h und die letzten 2 h eines Videos ausgewertet, d. h. bei den Filmen nach 0 h die Stunden 0-2, 11-13 und 22-24; bei den Filmen nach 72 h die Stunden 72-74, 83-85 und 94-96.

Es wurden pro Film alle migrierenden, adhärenen PSCs ausgewertet. Zur Analyse wurden die PSCs im Programm „Amira“ per Hand in jedem Bild umrandet. Die entstehenden Daten wurden in der Software ImageJ und einem durch unser Institut

erstellten Plug-in weiter analysiert. Der Schwerpunkt der PSCs wurde berechnet und die Bewegung in x- und y-Richtung erfasst. Daraus wurde die sogenannte Translokation, also die direkte zwischen Start- und Zielpunkt liegende Strecke, sowie die tatsächlich zurückgelegte Gesamtstrecke bestimmt (Abbildung 6). Die Geschwindigkeit der PSCs pro Intervall ergibt sich aus der Strecke und dem Zeitabstand (10 min) zwischen den Bildern. Weiterhin wurde die sogenannte Direktionalität erfasst, die beschreibt, wie gerichtet die Migration erfolgt. Die Direktionalität ist der Quotient aus tatsächlich zurückgelegter Strecke und Translokation (Direktionalität=Translokation/Tatsächliche Strecke). Auch die projizierte Fläche der PSCs und der Strukturindex (s. 3.6.2) wurden erfasst.

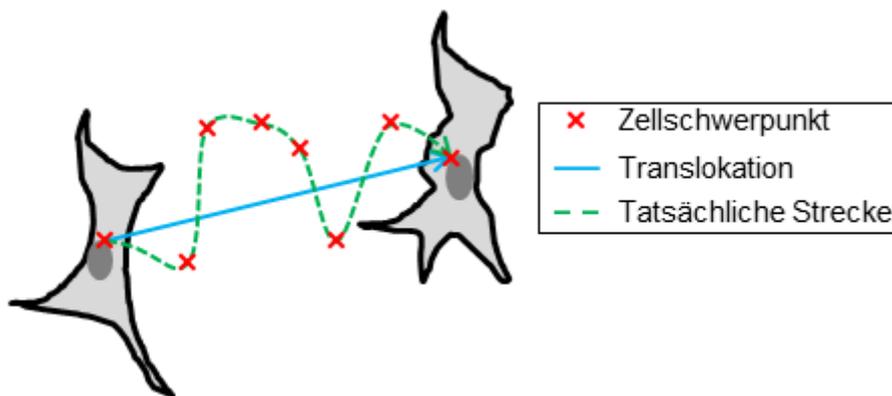


Abbildung 6. Auswertung der Migration. Es wurde der Zellschwerpunkt berechnet und die Bewegung des Schwerpunkts verfolgt. Die Translokation bezeichnet die grade Strecke zwischen Start- und Zielpunkt der Zelle. Die tatsächlich zurückgelegte Strecke wurde verwendet, um die Direktionalität und die Geschwindigkeit pro Intervall zu berechnen.

3.8 Ca²⁺-Messungen

Der SOCE ist eine der wichtigsten Quellen des Ca²⁺-Einstroms in nicht-erregbaren Zellen. Inwieweit TRPC1-Kanäle dabei in den PSCs dafür eine Rolle spielen, ist unbekannt. In diesem Experiment wurde der SOCE in TRPC1-WT- und TRPC1-KO-PSCs verglichen. Mögliche Unterschiede zwischen ruhenden und älteren, aktivierten PSCs sollten aufgedeckt werden. Es wurden Messungen der Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit Hilfe des Farbstoffs Fura-2 auf Einzelzellebene durchgeführt.

Fura-2 ist ein ratiometrischer Ca²⁺-Farbstoff, reagiert also bei Anregung auf zwei verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich auf die Anwesenheit von Ca²⁺. Fura-2 cheliiert Ca²⁺, dabei zeigt die Ca²⁺-gebundene Form ihre maximale Emissionsintensität bei einer Anregung mit 340 nm, die Ca²⁺-freie Form bei einer Anregung mit 380 nm. Bildet man das Verhältnis der Emissionsintensität bei Anregung mit den zwei verschiedenen Wellenlängen, erhält man den Quotienten. Der Quotient korreliert positiv mit der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und ist weitgehend unabhängig von der Menge an Farbstoff und Ausbleichen (43). Für die Beladung der Zellen wurde Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) verwendet, hier ist das polare Fura-2 an Acetoxymethylester gebunden und kann die Plasmamembran überwinden. In der Zelle werden die Acetoxymethylester durch unspezifische Esterasen abgespalten, wodurch Fura-2 die Zelle nicht mehr verlassen kann und akkumuliert.

Die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher des ER wurden für die Messung mit Ca^{2+} -freier Lösung und 2 μM Thapsigargin entleert. Thapsigargin ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der SERCA, die Ca^{2+} vom Cytosol in das ER pumpt. Blockiert man die SERCA, tritt das Ca^{2+} passiv aus den Speichern aus und kann nicht zurückgepumpt werden. Neben einem kurzfristigen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt die Entleerung der Speicher zu einer Aktivierung der SOC-Kanäle (92). Das erneute Hinzufügen von Ca^{2+} in die extrazelluläre Lösung führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die auf den SOCE zurückzuführen ist. In einem Teil der Experimente wurde der SOCE mit 10 μM BTP2 geblockt.

3.8.1 Vorbereitung der Zellen und Aufbau

Für die Experimente wurden PSCs auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glasbodenschalen ausgesät. Als ruhende PSCs wurden PSCs der Passage 0 (P0) verwendet. Auf Grund der geringen Zellzahl wurden für die Experimente mit den P0-PSCs Einsätze (Ibidi Culture-Insert 2-Well) verwendet, die eine Fläche von 0,22 cm^2 auf den Glasbodenschalen abgrenzten. Nach der Beschichtung wurden je 8000 PSCs in 70 μl Zellkulturmedium in die Einsätze ausgesät und die Schalen im Inkubator platziert. Nach 2 h Adhäsion wurden die Schalen mit Medium aufgefüllt. Die Ca^{2+} -Messungen wurden am nächsten Tag durchgeführt, direkt vor der Färbung wurden die Einsätze aus den Schalen entfernt.

Für die Versuche mit den aktivierten PSCs wurde eine Zellkulturschale, die sich für mehrere Tage in Passage 1 befand (s. 3.1), auf jeweils 5 Glasbodenschalen ausgesät und befand sich somit in Passage 2. Diese PSCs wurden am nächsten Tag gemessen. Insgesamt wurden pro Maus für die P0-PSCs 6, für die P2-PSCs 10 Schalen gemessen.

Die Zellen wurden im Dunkeln mit 1 ml Medium mit 3 μM Fura-2-AM (Stammlösung 0,5 mM Fura-2-AM in Dimethylsulfoxid (DMSO)) für 30 min im Inkubator gefärbt. Danach wurde die Schale einmal mit HEPES-gepufferter modifizierter Ringerlösung (Tabelle 6) gewaschen und mit 2 ml Ringerlösung für 10 min im Wärmeschrank inkubiert.

Die Schalen wurden dann in das Mikroskop (Carl Zeiss Axiovert 200) mit einem 40er Öl-Objektiv gebracht und die Zellen in der Durchlichtmikroskopie fokussiert. Zum Wechsel der Lösungen besaß der Messplatz eine Superfusionseinrichtung aus einem zuführenden

Schlauch, der am Rande der Schale positioniert wurde, und einer Absaugung. Die Absaugung wurde so positioniert, dass sich genau 2 ml in der Schale befanden. Um die Exzitationswellenlänge zu verändern, wurde ein Polychromator (VisiChrome High Speed Polychromator System) verwendet. Es wurde direkt nacheinander mit einer Wellenlänge von 340 nm für 260 ms sowie mit einer Wellenlänge von 380 nm für 175 ms belichtet. Die Emission wurde mit einem Strahlteiler ab 400 nm und einem Emissionsfilter mit 510 nm von der pco.edge-Kamera aufgezeichnet. Die Emission wurde bei 510 nm mit einem Binning von 2 aufgezeichnet. Das Akquisitionsintervall betrug 10 s. Die Software VisiView diente der Steuerung des gesamten Aufbaus.

3.8.2 Ablauf der Messung

Die komplette Messung wurde bei 37 °C durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 6 beschrieben, die Ionenkonzentrationen der Lösungen wurden jeweils überprüft.

Die PSCs wurden mit Ringerlösung superfundiert, bis der Quotient nach wenigen Minuten auf einem Plateau war. Dann wurden die PSCs mit 0 mM- Ca^{2+} -Lösung mit 1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA, einem Ca^{2+} -Chelator) für 4 min superfundiert, um das Ca^{2+} aus der extrazellulären Lösung zu entfernen. Die Superfusion wurde dann pausiert und Thapsigargin mit 0 mM- Ca^{2+} -Lösung vorsichtig hinzu pipettiert. Dies ergab eine Thapsigargin-Konzentration von 2 μM (DMSO-Konzentration von 0,2 %) in der Schale (Tabelle 7). Die Schale wurde für 7 min inkubiert, die Reaktion aufgezeichnet und auf 2 ml abgesaugt (s. Abbildung 20). Danach wurde eine Ca^{2+} -Konzentration von 2 mM und eine Thapsigargin-Konzentration von weiterhin 2 μM in der Schale hergestellt. Es wurde 5 mM- Ca^{2+} -Lösung mit Thapsigargin hinzu pipettiert, die freie Ca^{2+} -Konzentration von 2 mM ergibt sich aus der Konzentration von 0,5 mM EGTA und der Ca^{2+} -Konzentration von 2,5 mM, da nahezu das komplette EGTA in Ca^{2+} -gebundener Form vorlag. Dies wurde rechnerisch mit Hilfe des Programmes „Maxchelator“ (CA-EGTA-Calculator v1.3) überprüft (13). Zusätzlich wurde dies für jede Lösung experimentell überprüft. Die Reaktion wurde entweder für weitere 8 min aufgezeichnet oder es wurde nach 3 min mit 10 μM BTP2 (DMSO-Konzentration 0,3 %) geblockt und die Messung weitere 3 min durchgeführt. Hierfür wurde 2 mM- Ca^{2+} -Lösung mit Thapsigargin und BTP2 hinzugegeben.

Tabelle 6: Lösungen für die Ca²⁺-Messungen

Substanz	Konzentration			
	Ringerlösung	0 mM-Ca ²⁺ -Lösung	2 mM-Ca ²⁺ -Lösung	5 mM-Ca ²⁺ -Lösung
NaCl	122,5 mM	122,5 mM	122,5 mM	122,5 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM
MgCl ₂	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaOH	pH 7,4 bei 37 °C	pH 7,4 bei 37 °C	pH 7,4 bei 37 °C	pH 7,4 bei 37 °C
CaCl ₂	1,2 mM	-	2 mM	5 mM
EGTA	-	1 mM	-	-
Glucose	5,5 mM	-	-	-

Tabelle 7: Substanzen für die Ca²⁺-Messungen

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel	Substanzkonzentration bei Messung
Thapsigargin (abcam)	1 mM	DMSO	2 µM
BTP2 (abcam)	10 mM	DMSO	10 µM

3.8.3 Auswertung

Für die Auswertung wurde ein möglichst großer Bereich mit ausreichender Intensität unter Aussparung des Zellkerns in jeder Zelle in der VisiView-Software markiert (Abbildung 7). Zusätzlich wurde eine Region des Hintergrunds markiert. Von den gemessenen Intensitäten bei Anregung mit 340 nm bzw. 380 nm wurde jeweils die Intensität des Hintergrunds subtrahiert, um mögliche Schwankungen der Helligkeit auszugleichen. Der Verlauf jeder einzelnen Zelle wurde in Microsoft Excel ausgewertet und der Quotient bestimmt: $\text{Quotient} = \frac{\text{Intensität}_{340 \text{ nm}}}{\text{Intensität}_{380 \text{ nm}}}$.

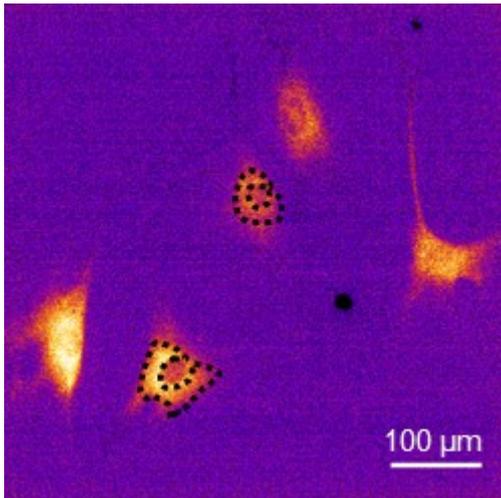


Abbildung 7. Auswertung der Ca^{2+} -Messungen. Bild des Quotienten der Emissionen bei Exzitation mit 340 nm bzw. 380 nm in P2-PSCs bei den Ca^{2+} -Messungen. Hell gelb leuchtende Bereiche besitzen einen hohen, violette Bereiche einen niedrigen Quotienten. Zwei PSCs sind beispielhaft wie für die Auswertung markiert.

Für die weitere Auswertung wurden die Zellen berücksichtigt, die nicht bedeutend von der üblichen PSC-Morphologie abweichen, die eine Mindestintensität von 10 aufwiesen und deren Kurvenverlauf nicht grob vom üblichen Verlauf abwich. Wurden Zellen abgespült oder gerieten aus dem Fokus, wurden sie bis zu diesem Zeitpunkt ausgewertet.

Zuerst wurde der Quotient in „Ruhe“, also bei Erreichen des Plateaus bei Superfusion mit Ringerlösung, bestimmt. Hierfür wurde der Mittelwert aus 5 Bildern, also aus 50 s Messung, vor Lösungswechsel zur 0 mM- Ca^{2+} -Lösung gebildet. Dieser Ruhewert diente als Grundlage zur Normalisierung der weiteren Quotientenwerte der folgenden Auswertung: $\text{normalisierter Quotient} = \text{Quotient}_{\text{aktuell}} / \text{Quotient}_{\text{Ruhe}}$. Zur Auswertung der Menge an Ca^{2+} in den intrazellulären Speichern wurde der Peak des normalisierten Quotienten bei Zugabe von Thapsigargin beurteilt. Das Maximum des Peaks wurde als Mittelwert über 30 s um den höchsten Wert angegeben. Weiterhin wurde die Differenz („Delta“) zwischen dem Maximum des Peaks und des Mittelwerts direkt vor Beginn des Anstiegs bestimmt. Zusätzlich wurde die Form des Peaks verglichen. Die Kurvenverläufe aller Zellen wurden so übereinander gelegt, dass sich der Beginn des Anstiegs bei Thapsigargin-Zugabe am selben Zeitpunkt befand. Für jeden Zeitpunkt wurde ein Mittelwert über alle Zellen gebildet. Die Auswertung des SOCEs erfolgte analog, indem der Peak bei Zugabe von 2 mM Ca^{2+} nach Entleerung der Speicher analysiert wurde. Auch hier wurden das Maximum des Peaks, das Delta und der Verlauf der Kurven analysiert. Zusätzlich wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) über 6 min ab Beginn des Anstiegs ausgewertet. Die AUC wurde nur für die Schalen ohne BTP2 bestimmt.

3.9 Statistik und graphische Darstellung

Die Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 gesammelt und statistisch mit Origin 8 Pro ausgewertet. Für die statistische Auswertung wurden alle Messpunkte als unabhängig angesehen. Werte im Fließtext werden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler oder als Median angegeben.

Die Darstellung mittels Boxplot zeigt das 0,25-Quantil, den Median als Strich innerhalb der Box und das 0,75-Quantil. Die Whisker umfassen den letzten Wert, der innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstand liegt. Die einzelnen Messwerte sind mit einem Symbol aufgeführt. In Balken- und Liniendiagrammen wird das arithmetische Mittel angegeben, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des arithmetischen Mittels dar. In Graphiken wird ein signifikanter Unterschied mittels „*“ gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede von entscheidendem Interesse mittels „ns“. Die Anzahl an verschiedenen Mäusen pro Gruppe wird mit N angegeben, die Anzahl an einzelnen Messpunkten mit n.

Als Signifikanzniveau wurde 0,05 gewählt, Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zuerst wurden die Daten mittels Shapiro-Wilk-Test und Analyse der Histogramme auf Normalverteilung untersucht. Zum Vergleich nicht-normalverteilter Daten wurde bei ungepaarten Proben der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei Experimenten mit gepaarten Messwerten (bei der Auswertung der Migrationsexperimente einer Gruppe zwischen verschiedenen Zeitpunkten) wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Test verwendet. Bei ungepaarten, normalverteilten Daten wurde der t-Test verwendet. Wurden mehrere Stichproben an einem Zeitpunkt verglichen (bei den Ca^{2+} -Messungen und bei der α -SMA-Färbung), wurde bei nicht-normalverteilten Daten zuerst der Kruskal-Wallis-Test angewandt und als Post-Hoc-Test zwischen vorher festgelegten Gruppen der Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau wurde in diesen Fällen mittels Bonferroni-Holm-Prozedur angepasst. Bei normalverteilten Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mittels ANOVA und als Post-Hoc-Test der t-Test mit Anpassung des Signifikanzniveaus mittels Bonferroni-Holm-Prozedur verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Beschleunigung des Verlustes von Lipidtröpfchen durch Druck

Um zu untersuchen, inwiefern Druck die Aktivierung ruhender PSCs beschleunigt, wurden die Lipidtröpfchen der PSCs analysiert. Ruhende PSCs weisen eine hohe Anzahl an Vitamin-A-haltigen Lipidtröpfchen auf, die im Zuge der Aktivierung verloren gehen. Für dieses Experiment wurden WT-PSCs für die Zeit des Versuches entweder Kontrollbedingungen oder Druck von 100 mmHg ausgesetzt. Kurz nach dem Aussäen („0 h“) sowie nach 24 h, 48 h, 72 h und 120 h wurden Deckgläschen entnommen, fixiert und Zellkerne mit DAPI sowie Lipidtröpfchen mit Nile Red gefärbt. Die PSCs wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop qualitativ analysiert: PSCs mit deutlichen perinukleären Lipidtröpfchen wurden als „Nile Red-positiv“, die anderen PSCs als „Nile Red-negativ“ bezeichnet.

In Abbildung 8 sind repräsentative Bilder der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt; die Lipidtröpfchen sind rot, die Zellkerne blau gefärbt. Bei 0 h sind die Lipidtröpfchen direkt um den Zellkern lokalisiert, groß und teilweise schwer zu erkennen. Nach 24 h zeigt sich der größte Anteil der PSCs mit gut sichtbaren Lipidtröpfchen. Unter Kontrollbedingungen sind mehr Lipidtröpfchen-haltige PSCs als unter Druck nachweisbar. Danach nimmt die Anzahl an Lipidtröpfchen ab, nach 120 h sind nur noch wenige PSCs Lipidtröpfchen-haltig. Zusätzlich nehmen die Größe der Zellen und der Zellkerne deutlich zu.

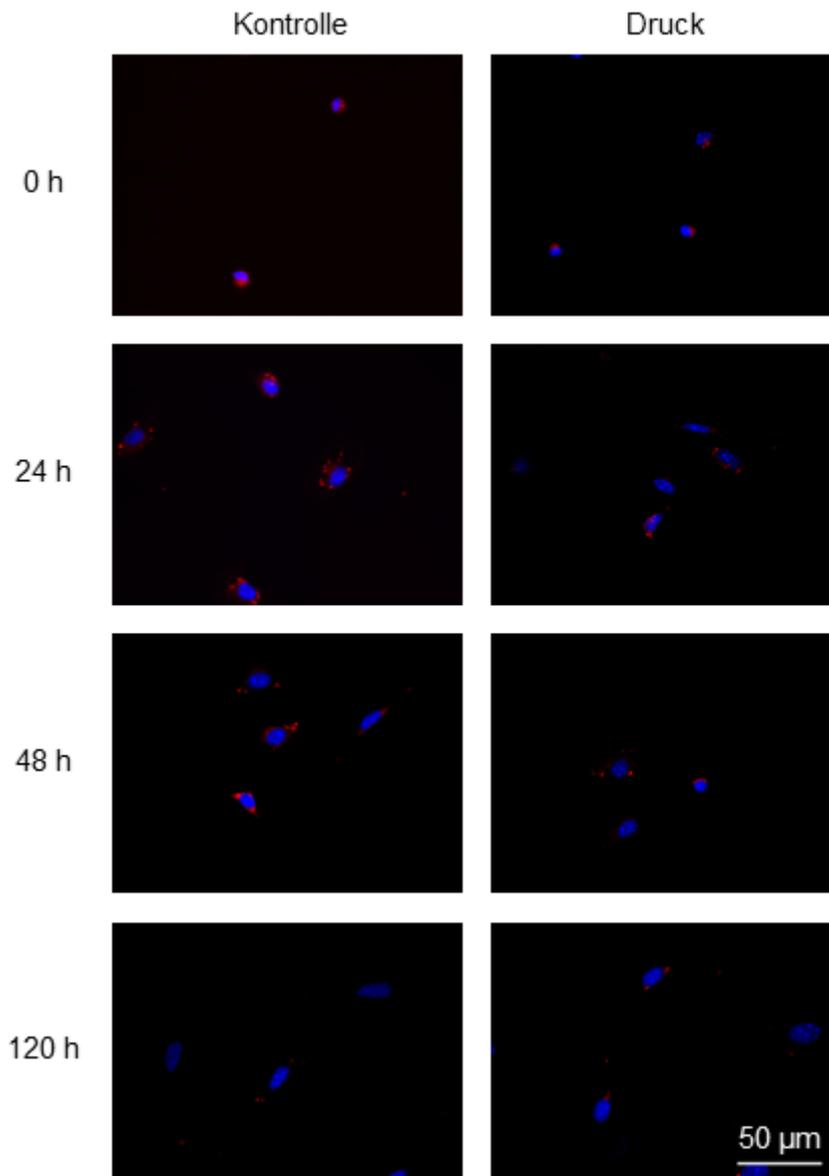


Abbildung 8. Repräsentative Ausschnitte der Nile Red-Färbung. Lipidtröpfchen sind mit Nile Red in rot dargestellt, Zellkerne mit DAPI in blau. Bei 24 h zeigen sich die meisten PSCs mit deutlich sichtbarer perinukleärer Färbung, nach 120 h hat dies deutlich abgenommen.

In Abbildung 9 ist der Anteil an Nile Red-positiven PSCs pro Deckgläschen dargestellt. Kurz nach der Isolation, zum Zeitpunkt 0 h, sind im Median nur 28,6 % der PSCs Nile Red-positiv. Dieser Anteil ist nach 24 h deutlich angestiegen und beträgt im Median für die PSCs unter Kontrollbedingungen 59,8 % und unter Druck 38,7 %. Der Anteil fällt über den weiteren Zeitpunkten wieder ab. Ausnahme ist ein geringer, nicht signifikanter Anstieg bei 48 h für die PSCs unter Druck. Nach 120 h sind nur noch 25,1 % (Kontrolle) bzw. 27,1 % (Druck) der PSCs Nile Red-positiv. Dies spricht für eine zunehmende druckunabhängige Aktivierung der PSCs über die Zeit zumindest zwischen 24 h und 120 h.

Deutlich weniger PSCs unter Druck sind gegenüber Kontrollbedingungen nach 24 h Nile Red-positiv. PSCs unter Druck werden innerhalb der ersten 24 h nach Isolation also schneller aktiviert. Zu den späteren Zeitpunkten gibt es jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen mehr.

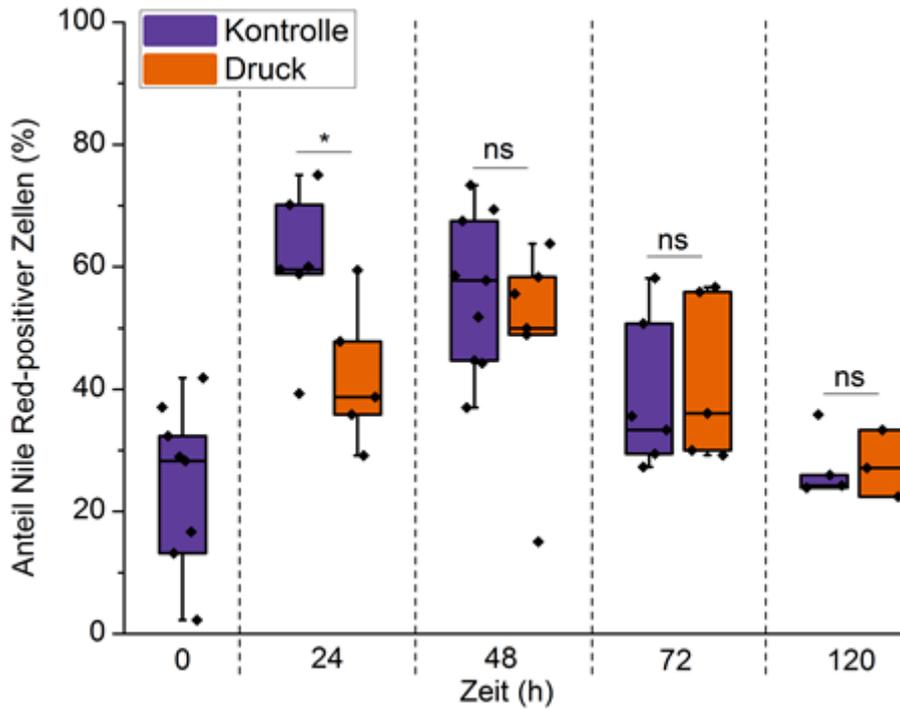


Abbildung 9. Auswertung der Nile Red-Färbung. Anteil Nile Red-positiver PSCs (PSCs mit Lipidtröpfchen) pro Deckgläschen. Der Anteil der Nile Red-positiven PSCs nimmt von 0 h auf 24 h zu, danach nimmt der Anteil bis 120 h wieder ab. Nach 24 h sind unter Druck weniger PSCs Nile Red-positiv als unter Kontrollbedingungen. $N(0-72\text{ h})=4-5$, $N(120\text{ h})=3$; $n(0-72\text{ h})=5-9$, $n(120\text{ h})=3-4$.

4.2 α -SMA-Färbung

Als nächstes wurde die Expression von α -SMA untersucht, einem weiteren gut etablierten Marker der PSC-Aktivierung. Werden die PSCs aktiviert, exprimieren sie vermehrt α -SMA. Hier wurden sowohl WT- als auch TRPC1-KO-PSCs untersucht, um die Rolle der TRPC1-Kanäle in der Aktivierung der ruhenden PSCs durch Druck zu analysieren. Wie bei den Experimenten mit Nile Red wurden die PSCs für die Zeit des Versuches entweder Kontrollbedingungen oder Druck von 100 mmHg ausgesetzt. Nach definierten Zeitpunkten kurz nach dem Aussäen („0 h“) sowie nach 24 h, 48 h, 72 h und 120 h wurden Deckgläser entnommen, fixiert und mit DAPI sowie gegen α -SMA gefärbt.

In Abbildung 10 sind repräsentative Bilder aus der Färbung dargestellt. α -SMA ist grün gefärbt, Zellkerne sind mit DAPI in blau gefärbt. Während kurz nach der Isolation am

Zeitpunkt 0 h nur eine minimale Färbung zu erkennen ist, nimmt diese über die Zeit deutlich zu. Nach 48 h sind PSCs mit der typischen Struktur von Aktinfasern im Zellinneren erkennbar, nach 120 h besitzt der Großteil der PSCs diese Struktur. Die PSCs werden über die Zeit deutlich größer und breiten sich mehr aus. Unter Druck ist die Intensität nach 24 h höher als unter Kontrollbedingungen.

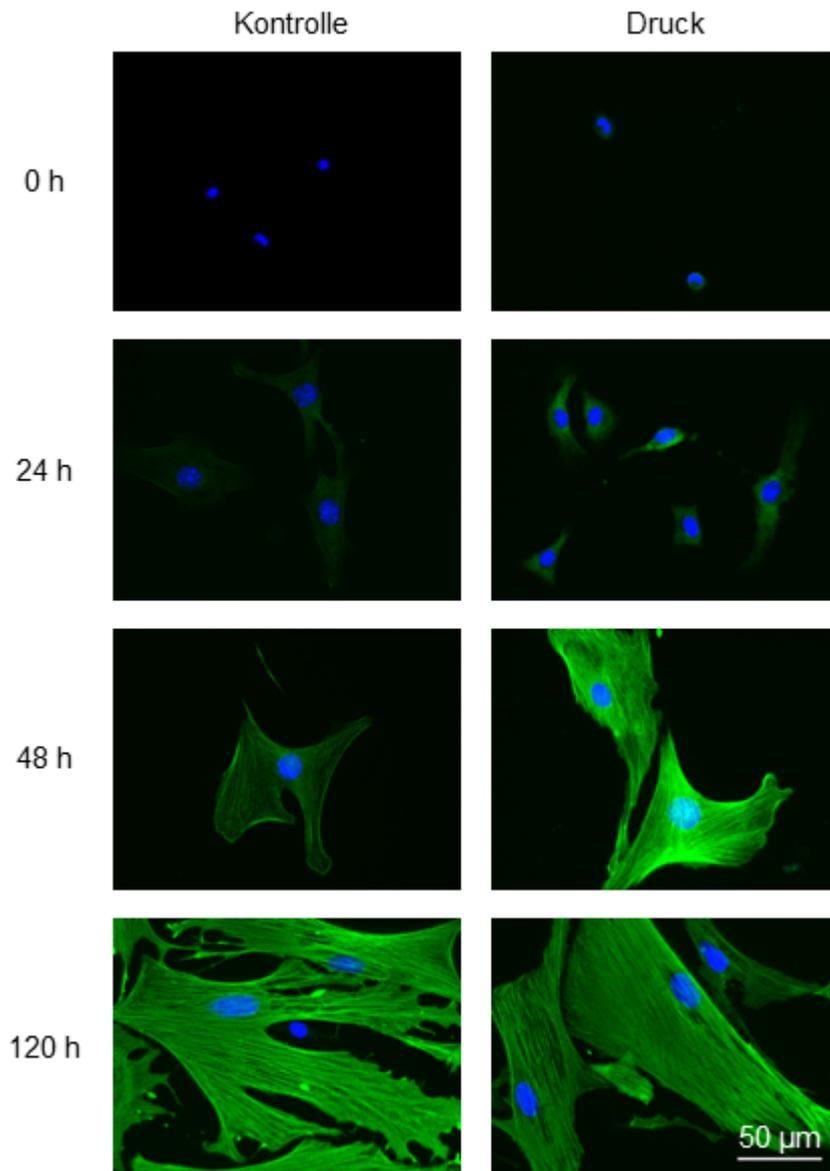


Abbildung 10. Repräsentative Ausschnitte der Färbung für α -SMA. α -SMA ist mittels Immunfluoreszenz grün gefärbt, Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Direkt nach der Isolation (0 h) ist nur eine minimale Färbung zu erkennen, die Intensität nimmt über die Zeit deutlich zu. Nach 48 h ist die typische Morphologie der Aktinfasern zu erkennen. Nach 120 h wird dies noch sichtbar deutlicher. Bei 24 h ist die Intensität unter Druck gegenüber der Kontrolle erhöht.

4.2.1 Vermehrte α -SMA-Fluoreszenz durch Druck nur in WT-PSCs

In der Quantifizierung in Abbildung 11 wird die Gesamtintensität (s. 3.6.2) als Marker der α -SMA-Expression gezeigt. Die Intensität des gefärbten α -SMA steigt im Zeitverlauf stark an, weswegen eine logarithmische Skalierung der y-Achse gewählt wurde. Zu Beginn beträgt die Gesamtintensität im Median 9,7. Sie steigt in der Kontrolle nach 120 h auf das 26-fache auf 253,2 an, unter Druck bis auf das 23-fache nach 72 h mit 221,4. Wie bei den Nile Red-Experimenten werden die PSCs über die Zeit zunehmend aktiviert.

Im Vergleich zwischen Kontrolle und Druck ist die α -SMA-Gesamtintensität unter Druck nach 24 h und 48 h mit einem Median von 32,1 bzw. 86,4 deutlich höher als unter Kontrollbedingungen mit einem Median von 15,6 bzw. 41,0. Nach 72 h und 120 h findet sich dieser Unterschied zwischen Kontrolle und Druck nicht mehr. Dies spricht dafür, dass bei den frühen Zeitpunkten bis 48 h nach der Isolation die PSCs unter Druck stärker bzw. schneller aktiviert sind als die PSCs unter Kontrollbedingungen.

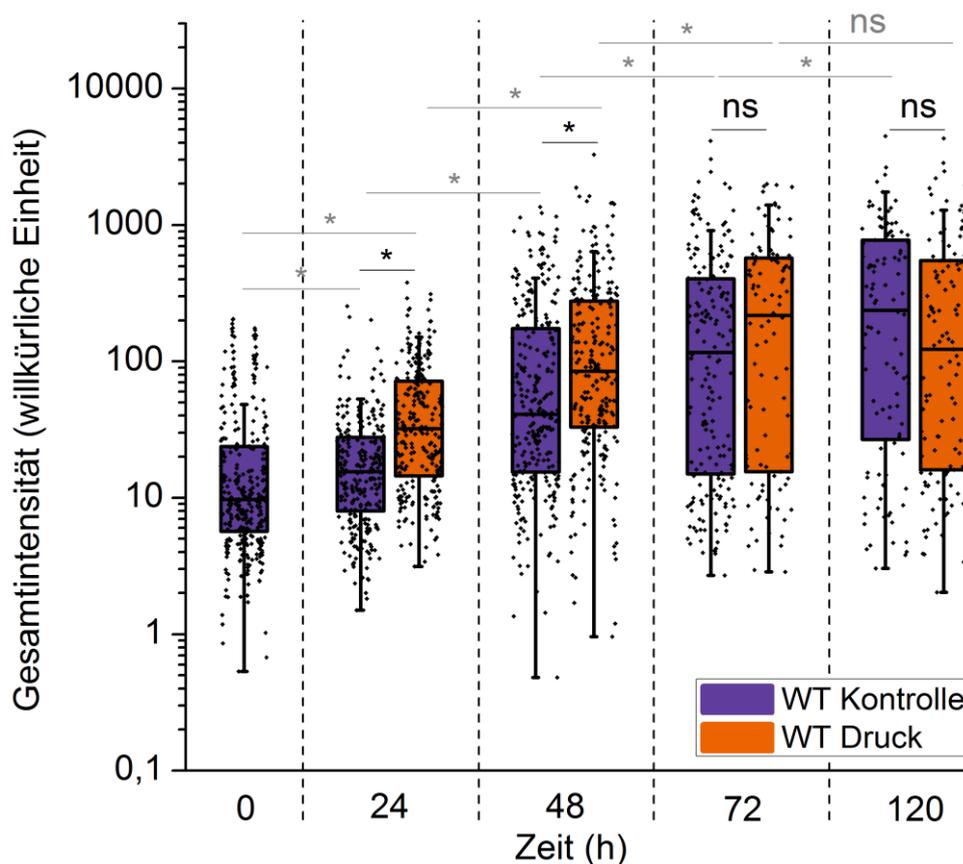


Abbildung 11. Gesamtintensität der α -SMA-Färbung in WT-PSCs. Die Intensität nimmt über die Zeit unter Kontrollbedingungen und unter Druck zu. Die Intensität ist unter Druck bei 24 h und 48 h höher, dieser Unterschied ist bei späteren Zeitpunkten nicht mehr vorhanden. Auf Grund der großen Intensitätsunterschiede ist die y-Achse logarithmisch skaliert. $N(0-48\text{ h})=4-5$, $N(72-120\text{ h})=3$; $n=104-347$.

Um den Einfluss des TRPC1-Kanals auf die frühe Aktivierung zu untersuchen, wurden Experimente mit den TRPC1-KO-PSCs für Zeitpunkte bis 48 h durchgeführt. Die Untersuchung späterer Zeitpunkte erschien wegen des fehlenden Unterschieds in den WT-PSCs nicht sinnvoll. In Abbildung 12 werden die in der vorherigen Abbildung dargestellten Werte für die WT-PSCs um die Werte für die TRPC1-KO-PSCs ergänzt. Nach 24 h ist kein Unterschied zwischen Kontrolle und Druck in den TRPC1-KO-PSCs festzustellen (Median 18,7 bzw. 19,2). Nach 48 h ist die Intensität in den TRPC1-KO-PSCs unter Druck sogar niedriger als bei den TRPC1-KO-PSCs unter Kontrollbedingungen (Median 36,7 bzw. 68,7). Druck führt somit in den TRPC1-KO-PSCs, im Gegensatz zu den WT-PSCs, nicht zu einer vermehrten α -SMA-Intensität und damit nicht zu einer vermehrten Aktivierung.

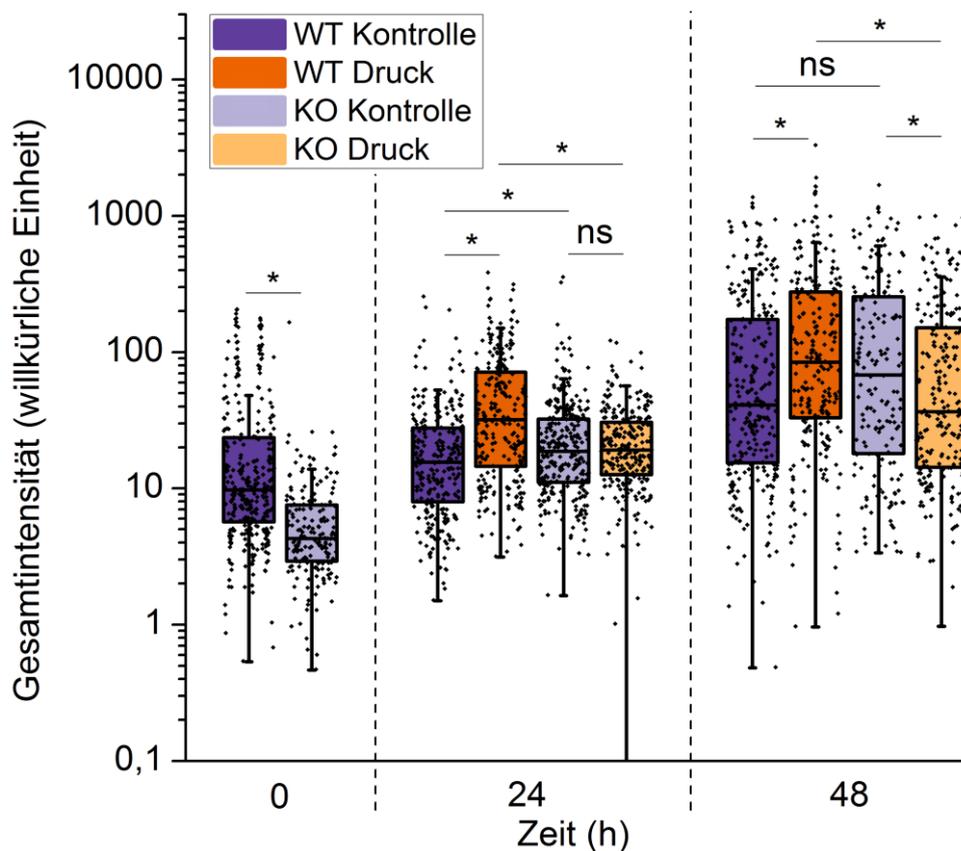


Abbildung 12. Gesamtintensität der α -SMA-Färbung in WT- und TRPC1-KO-PSCs. Während nach 24 h und 48 h die WT-PSCs unter Druck eine höhere Intensität aufweisen, ist bei den TRPC1-KO-PSCs nach 24 h kein Unterschied zwischen Kontrolle und Druck festzustellen. Nach 48 h zeigt sich in den TRPC1-KO-PSCs sogar eine höhere Intensität in der Kontrolle. Am Start der Messung ist die Intensität in den WT- gegenüber den TRPC1-KO-PSCs höher. Die Intensitäten der WT-PSCs sind aus Abbildung 11 erneut dargestellt. $N(WT)=4-5$, $N(KO)=3$; $n=183-347$.

Im Vergleich von WT-PSCs und TRPC1-KO-PSCs zeigt sich, dass die Gesamtintensität bei 0 h bei den WT-PSCs mit 9,7 etwa zweifach höher als die der TRPC1-KO-PSCs mit

einem Median von 4,3 liegt. Unter Kontrollbedingungen weisen die WT-PSCs nach 24 h eine minimal niedrigere Intensität als die TRPC1-KO-PSCs (Median 15,6 bzw. 18,7) auf, während nach 48 h kein Unterschied besteht. Unter Druck weisen die WT-PSCs sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine deutlich höhere Intensität als die TRPC1-KO-PSCs auf. Nur WT-PSCs sind also vermehrt durch Druck aktivierbar.

Zusammenfassend führt Druck nur in WT-PSCs, jedoch nicht in TRPC1-KO-PSCs, zu einer vermehrten α -SMA-Färbung und somit zu einer vermehrten Aktivierung.

4.2.2 Kleinere und rundere PSCs bei TRPC1-KO

Neben der Intensität wurde die Morphologie der PSCs in der α -SMA-Färbung beurteilt.

Die projizierte Fläche der WT-PSCs nimmt über die Zeit zwischen 0 h und 120 h kontinuierlich zu (Abbildung 13A). Am Start sind die PSCs $131,3 \pm 8,5 \mu\text{m}^2$ groß. Sie breiten sich deutlich bis auf $2849,0 \pm 213,2 \mu\text{m}^2$ in der Kontrolle bzw. $2651,2 \pm 169,0 \mu\text{m}^2$ unter Druck aus. Die projizierte Fläche unterscheidet sich zwischen PSCs unter Kontrollbedingungen und Druck nicht.

Auch TRPC1-KO-PSCs unter Kontrollbedingungen und Druck unterscheiden sich nicht (Abbildung 13B). Allerdings sind TRPC1-KO-PSCs kleiner als die entsprechenden WT-PSCs. Bei 0 h sind die TRPC1-KO-PSCs $96,4 \pm 13,9 \mu\text{m}^2$ groß, nach 24 h $510,5 \pm 21,3 \mu\text{m}^2$ (Kontrolle) bzw. $532,9 \pm 25,4 \mu\text{m}^2$ (Druck) groß, wohingegen die WT-PSCs nach 24 h $683,6 \pm 30,3 \mu\text{m}^2$ (Kontrolle) bzw. $732,5 \pm 29,4 \mu\text{m}^2$ (Druck) groß sind. Nach 48 h unterscheiden sich WT- und TRPC1-KO-PSCs nicht mehr signifikant.

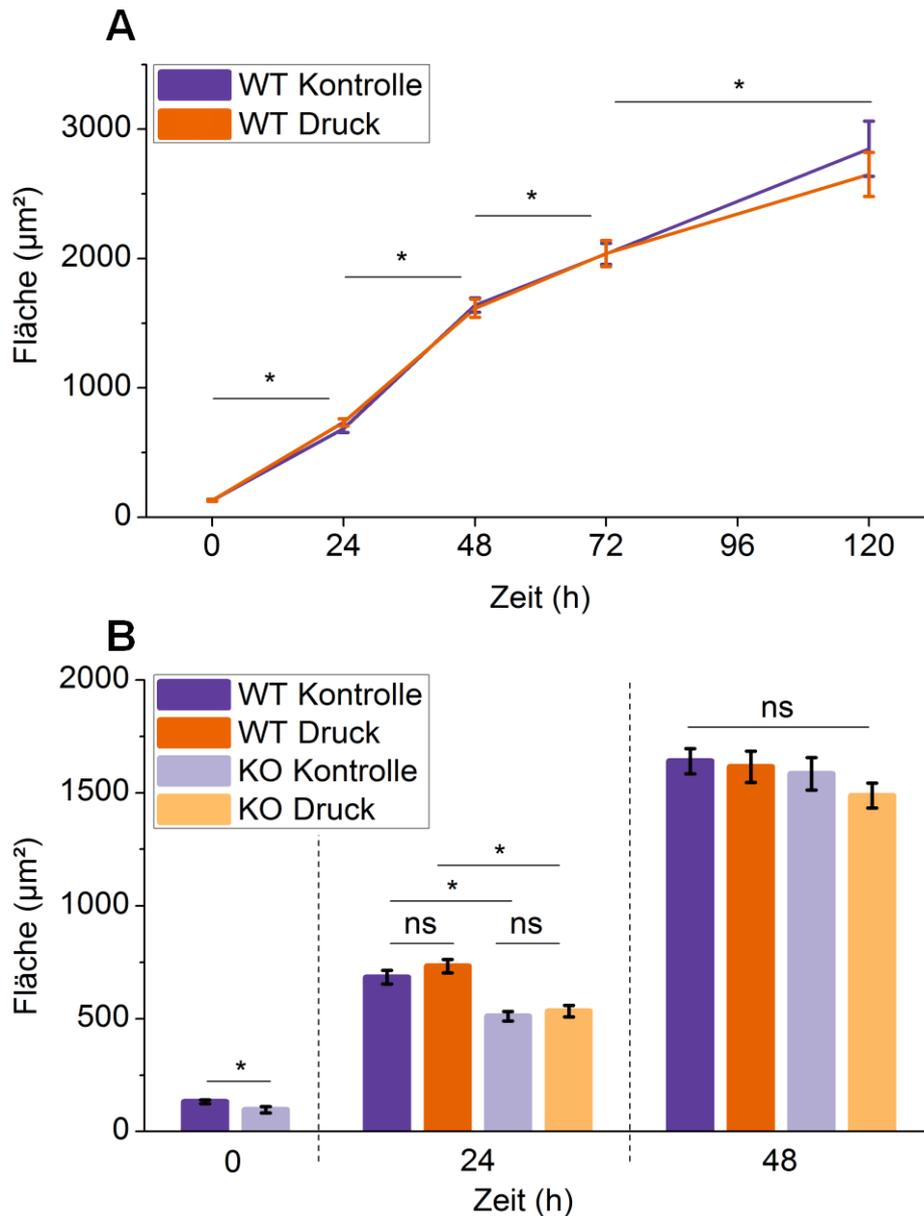


Abbildung 13. Projizierte Fläche pro Zelle in der Färbung für α -SMA. A: In den WT-PSCs nimmt die Fläche über die Zeit zu. PSCs unter Kontrollbedingungen und Druck unterscheiden sich nicht. **B:** Vergleich von WT- und TRPC1-KO-PSCs: Die Werte für den WT entsprechen denen in A. Auch in den TRPC1-KO-PSCs nimmt die Fläche über die Zeit zu. Bei 0 h und nach 24 h sind die TRPC1-KO-PSCs kleiner als die WT-PSCs. PSCs unter Druck und Kontrollbedingungen unterscheiden sich in den TRPC1-KO-PSCs nicht. $N(0-48\text{ h WT})=4-5$, $N(72-120\text{ h})=3$, $N(\text{KO})=3$; $n=104-347$.

Zur Beurteilung der Form der PSCs wurde der Strukturindex „Circularity“ (s. 3.6.2) verwendet. Komplette runde Zellen haben einen Wert von 1, je mehr die Zellen von der Kreisform abweichen und sich verzweigen, desto mehr nähert sich der Wert 0 an. In den WT-PSCs wird der Strukturindex mit zunehmender Zeit kleiner, die PSCs verändern ihre Form von rundlich hin zu ausgebreitet und verzweigt (Abbildung 14A). Er beträgt bei 0 h

$0,82 \pm 0,01$, nach 120 h $0,31 \pm 0,02$ unter Kontrollbedingungen bzw. $0,31 \pm 0,02$ unter Druck. PSCs unter Kontrollbedingungen und Druck unterscheiden sich nicht. Auch die TRPC1-KO-PSCs werden im Laufe der Zeit weniger rundlich. Beim Vergleich von WT- und TRPC1-KO-PSCs (Abbildung 14B) fällt auf, dass die TRPC1-KO-PSCs zu allen beobachteten Zeitpunkten einen höheren Strukturindex als die WT-PSCs aufweisen, insgesamt also rundlicher sind. Nach z. B. 24 h unter Kontrollbedingungen weisen die WT-PSCs einen Strukturindex von $0,60 \pm 0,01$, die TRPC1-KO-PSCs von $0,69 \pm 0,01$ auf.

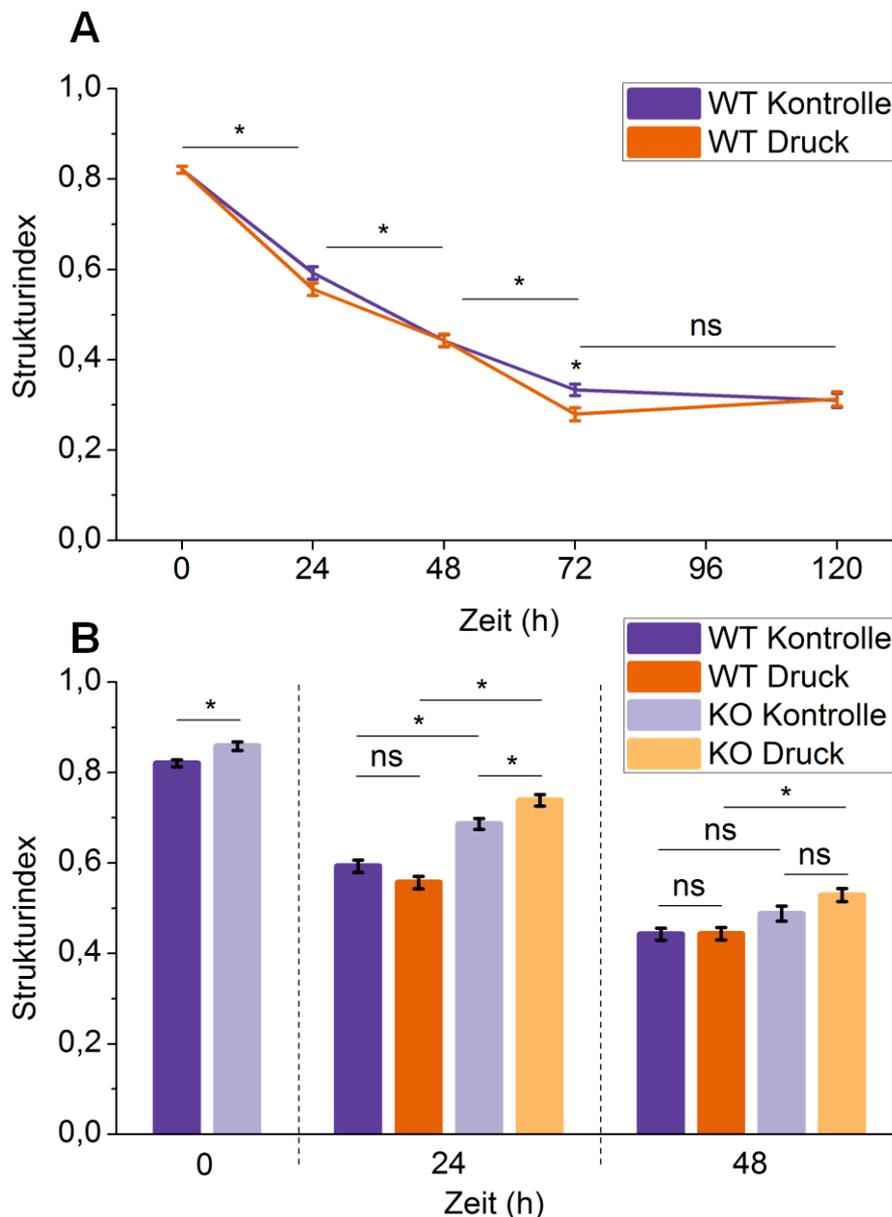


Abbildung 14. Strukturindex in der Färbung für α -SMA. **A:** In den WT-PSCs nimmt der Strukturindex über die Zeit unter Kontrollbedingungen und Druck ab. **B:** Vergleich von WT- und TRPC1-KO-PSCs: Die Werte für den WT entsprechen denen in A. Auch in den TRPC1-KO-PSCs nimmt der Strukturindex über die Zeit ab. TRPC1-KO-PSCs weisen einen höheren Strukturindex als WT-PSCs auf. $N(0-48 \text{ h WT})=4-5$, $N(72-120 \text{ h})=3$, $N(\text{KO})=3$; $n=104-347$.

Zusammenfassend nimmt die projizierte Fläche im Zeitverlauf in allen Gruppen zu und die PSCs verändern ihre Form von rundlich zu der „sternförmigen“ Form. TRPC1-KO-PSCs sind sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Druck kleiner und rundlicher als die WT-PSCs.

4.3 Migration

Nachdem in der frühen Phase der Aktivierung bei den morphologischen Markern ein Unterschied zwischen Kontrollbedingungen und Druck erkennbar war, sollte die Funktion der PSCs untersucht werden. Aktivierte PSCs migrieren schneller als ruhende PSCs, weswegen primär die Geschwindigkeit im Fokus steht. Zusätzlich ist die Migrationsfähigkeit für die pathophysiologische Funktion der PSCs im PDAC relevant. Für dieses Experiment wurden die PSCs auf einer dem desmoplastischen Stroma ähnlichen Matrix ausgesät. Die PSCs wurden dann direkt oder nach 72 h Inkubation unter Kontrollbedingungen bzw. Druck analysiert. Sie wurden dann für 24 h mit dem Videomikroskop beobachtet. Die ersten 2 h, die mittleren 2 h und die letzten 2 h des Films wurden ausgewertet. Für die gesamte Dauer des Experiments wurden die PSCs entweder Kontrollbedingungen oder 100 mmHg Druck ausgesetzt.

4.3.1 Stärkerer Anstieg der Geschwindigkeit unter Druck

Die Geschwindigkeit der PSCs in jedem Intervall sowie der Geschwindigkeitszuwachs (Δ) der PSCs zwischen Start und Ende der Messung ist in Abbildung 15 dargestellt. Frisch isolierte PSCs werden in der beobachteten Zeit bis 24 h durchgehend schneller. Die Geschwindigkeit verdreifacht sich in etwa von $0,07 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ (Kontrolle) bzw. $0,07 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ (Druck) bei 0 h bis auf $0,18 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$ (Kontrolle) bzw. $0,23 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$ (Druck) (Abbildung 15A). Der Geschwindigkeitszuwachs ist in den PSCs unter Druck höher: Zwischen Start und Ende der Messung steigt die Geschwindigkeit in den PSCs unter Kontrollbedingungen um $0,11 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$, in den PSCs unter Druck um $0,16 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$ an (Abbildung 15B). Im Vergleich der absoluten Geschwindigkeit zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Druck und Kontrolle, allerdings haben die PSCs unter Druck eine Tendenz zur höheren Geschwindigkeit.

Bei Start des Migrationsexperiments nach 72 h sind die PSCs mit $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ (Kontrolle) bzw. $0,13 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$ (Druck) (Abbildung 15C) überraschenderweise langsamer als am Ende der Messung nach 24 h. Die PSCs werden auch hier über die Zeit deutlich schneller und sind in der Mitte des Beobachtungszeitraums nahe ihrer Maximalgeschwindigkeit, die höher als die Geschwindigkeit der PSCs nach 24 h ist. Sie beträgt am Ende des Beobachtungszeitraums nach 96 h $0,29 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$ (Kontrolle)

bzw. $0,34 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$ (Druck). Der Geschwindigkeitszuwachs ist in den PSCs unter Druck höher: Zwischen Start und Ende der Messung steigt die Geschwindigkeit in den PSCs unter Kontrollbedingungen um $0,14 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$, in den PSCs unter Druck um $0,21 \pm 0,03 \mu\text{m}/\text{min}$ an (Abbildung 15D).

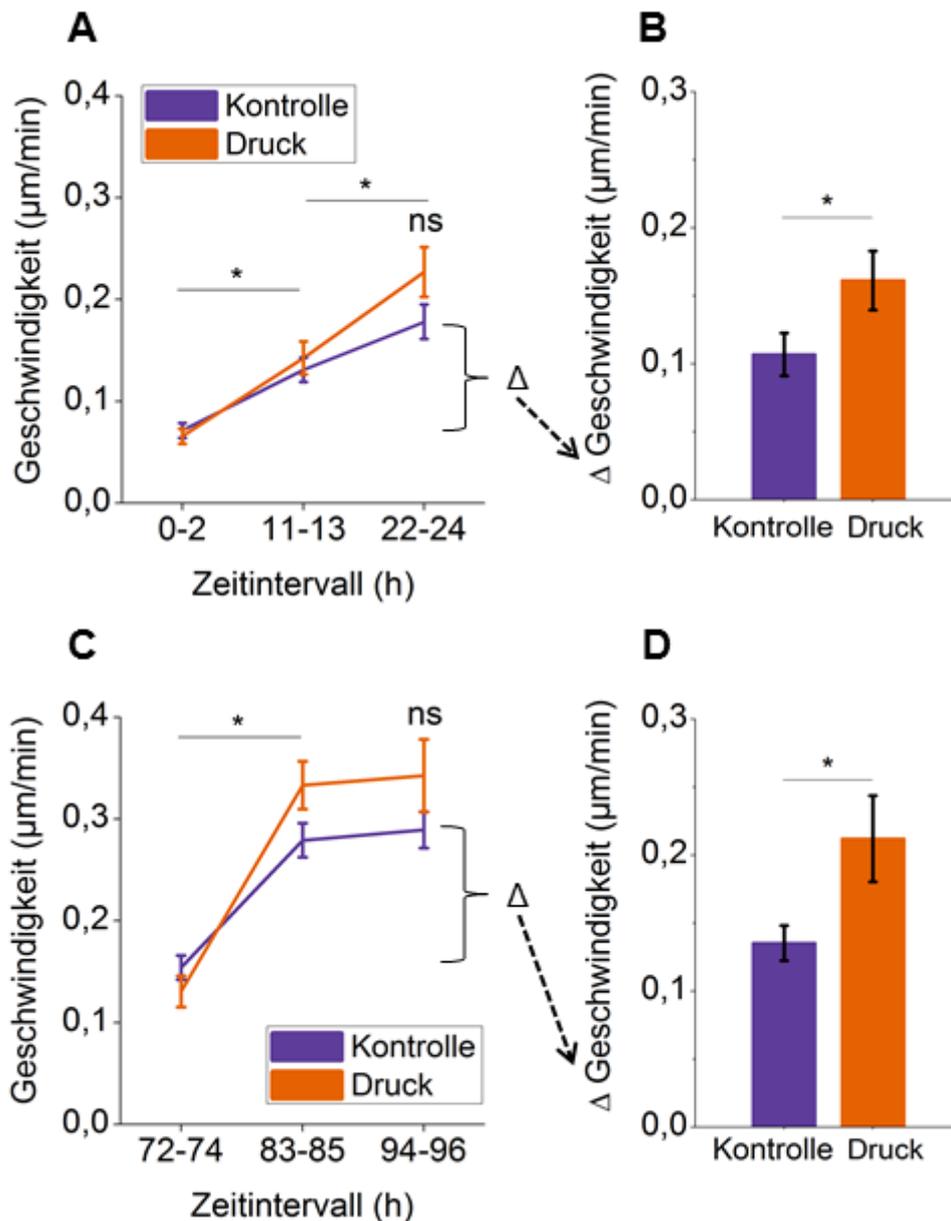


Abbildung 15. Geschwindigkeit der PSCs. **A:** Absolute Geschwindigkeit direkt nach der Isolation. **B:** Geschwindigkeitsanstieg zwischen 0 h und 24 h. **C:** Absolute Geschwindigkeit nach 72 h. **D:** Geschwindigkeitsanstieg zwischen 72 h und 96 h. Die Geschwindigkeit nimmt über die Zeit zu, wobei die PSCs nach 72 h, bis auf den ersten Messpunkt, schneller sind als die frisch isolierten PSCs. PSCs unter Druck sind im Vergleich mit PSCs unter Kontrollbedingungen tendenziell schneller. Im Vergleich des Anstiegs der Geschwindigkeit zeigt sich, dass diese unter Druck stärker ansteigt. $N=3$; $n=27-33$.

Auch die Translokation, die direkte zwischen Start- und Zielpunkt liegende Strecke (s. Abbildung 6), nimmt bei den frisch isolierten PSCs über die Zeit zu. Sie steigt von $2,98 \pm 0,53 \mu\text{m}$ (Kontrolle) bzw. $4,17 \pm 0,47 \mu\text{m}$ (Druck) am Start auf $6,47 \pm 1,36 \mu\text{m}$ (Kontrolle) bzw. $7,51 \pm 1,03 \mu\text{m}$ (Druck) am Ende der Messung (Abbildung 16A). Dieser Anstieg ist weniger deutlich als der der Geschwindigkeit. Dies erklärt sich in Abbildung 17A, die die Direktionalität darstellt: Die Direktionalität wird aus der Translokation geteilt durch die tatsächlich zurückgelegte Strecke berechnet und gibt an, wie gerichtet Zellen migrieren. Die Direktionalität der Bewegung ist am Startpunkt der Messung (mit $0,42 \pm 0,05$ unter Kontrollbedingungen bzw. $0,67 \pm 0,05$ unter Druck) höher als in der Mitte und am Ende der Messung (mit $0,33 \pm 0,04$ unter Kontrollbedingungen bzw. $0,32 \pm 0,03$ unter Druck). Gegen Ende der Messung bewegen sich die PSCs also schneller, aber weniger gerichtet. Die PSCs am Start der Messung bewegen sich unter Druck weiter als die PSCs unter Kontrollbedingungen, auch wenn die zurückgelegte Distanz nur klein ist. An den weiteren Zeitpunkten lässt sich kein Unterschied bei der Translokation oder der Direktionalität zwischen Kontrollbedingungen und Druck der frisch isolierten PSCs feststellen.

Nach 72 h liegt die Translokation insgesamt höher als bei den frisch isolierten PSCs, was gut zu den ebenfalls höheren Geschwindigkeiten passt (Abbildung 16B). Es gibt einen Trend zu abnehmender Direktionalität über den Beobachtungszeitraum und zunehmender Translokation, der allerdings weniger deutlich als bei den frisch isolierten PSCs ausfällt (Abbildung 17B). Die Translokation unterscheidet sich zwischen Kontrollbedingungen und Druck nicht. Die Direktionalität unterscheidet sich nur im letzten beobachteten Zeitabschnitt zwischen Kontrollbedingungen und Druck, mit einer höheren Direktionalität von $0,50 \pm 0,05$ in der Kontrolle gegenüber $0,33 \pm 0,03$ unter Druck.

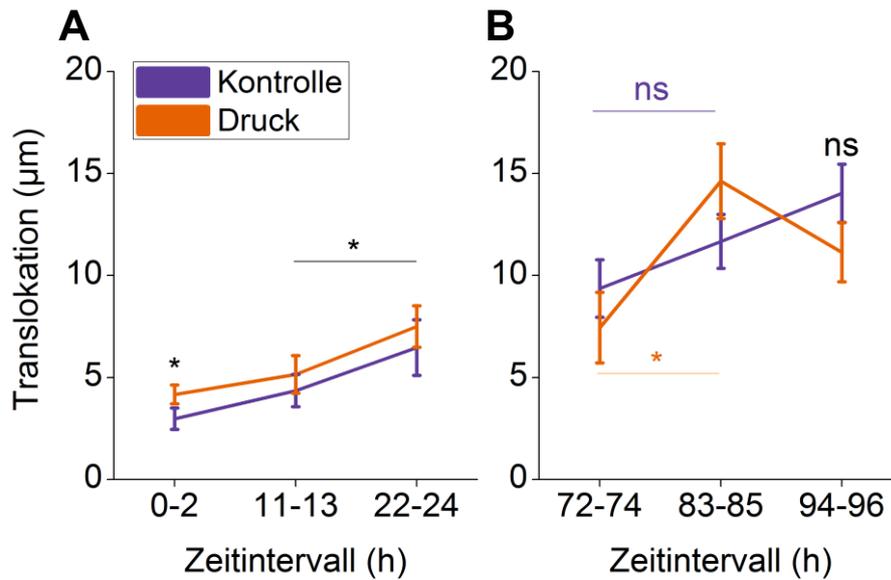


Abbildung 16. Translokation der PSCs. **A:** direkt nach der Isolation. **B:** nach 72 h. Die Translokation steigt über die Zeit an, wobei sich die PSCs nach 72 h weiter bewegen als die frisch isolierten PSCs. Die frisch isolierten PSCs bewegen sich im Vergleich von Kontrollbedingungen und Druck am ersten Messpunkt unter Druck weiter, im Rest der Messungen unterscheidet sich die zurückgelegte Strecke nicht. $N=3$; $n=27-33$.

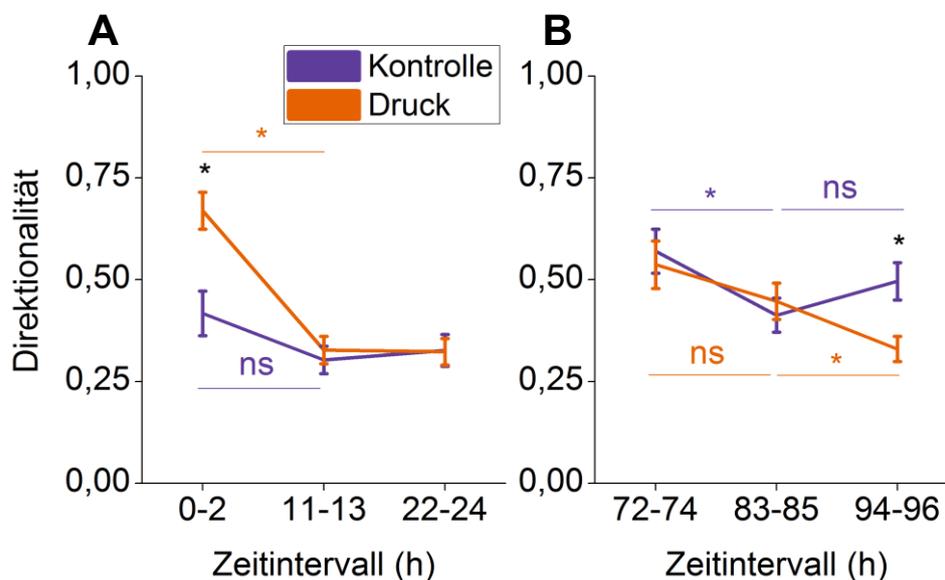


Abbildung 17. Direktionalität der PSCs. **A:** direkt nach der Isolation. **B:** nach 72 h. Die Direktionalität fällt in den frisch isolierten PSCs zwischen Anfang und Mitte der Messung ab. In der Gruppe nach 72 h zeigt sich eine leicht über die Zeit abfallende Direktionalität. Im Vergleich von Kontrollbedingungen und Druck zeigt sich am ersten Messpunkt der frisch isolierten PSCs eine höhere Direktionalität unter Druck. $N=3$; $n=27-33$.

Zusammenfassend bewegen sich die PSCs über die Zeit schneller und weiter, was für eine zunehmende Aktivierung der PSCs spricht. Die PSCs unter Druck zeigen einen höheren Geschwindigkeitszuwachs, was für eine verstärkte Aktivierung spricht.

4.3.2 Kleinere Fläche der PSCs unter Druck

Neben der Analyse der Migration werden die Form und projizierte Fläche der PSCs in den Migrationsexperimenten beurteilt.

Die frisch isolierten PSCs werden über die Zeit größer, von $383,1 \pm 40,2 \mu\text{m}^2$ (Kontrolle) bzw. $294,1 \pm 25,2 \mu\text{m}^2$ (Druck) auf $864,3 \pm 115,2 \mu\text{m}^2$ (Kontrolle) bzw. $701,1 \pm 73,1 \mu\text{m}^2$ (Druck) (Abbildung 18A). PSCs unter Kontrollbedingungen und PSCs unter Druck sind gleich groß mit einer Tendenz zu größeren PSCs unter Kontrollbedingungen.

Nach 72 h sind die PSCs deutlich größer als die frisch isolierten PSCs. Die projizierte Fläche steigt über die Zeit weiter an, von $2648,5 \pm 214,4 \mu\text{m}^2$ (Kontrolle) bzw. $1920,7 \pm 242,0 \mu\text{m}^2$ (Druck) auf $3111,3 \pm 246,1 \mu\text{m}^2$ (Kontrolle) bzw. $2848,8 \pm 378,8 \mu\text{m}^2$ (Druck) (Abbildung 18B). Dabei sind die PSCs zu Anfang und zur Mitte der Beobachtung unter Kontrollbedingungen größer als unter Druck.

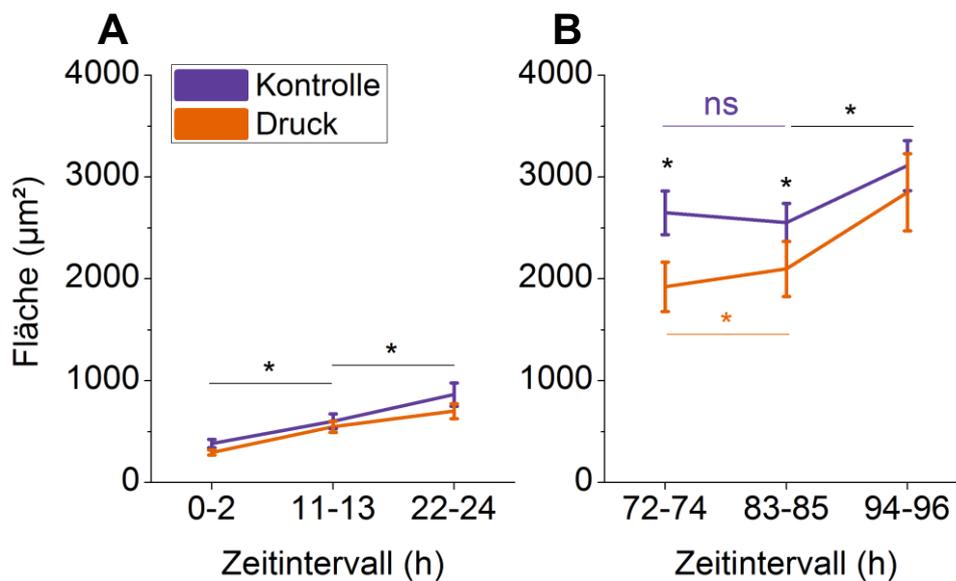


Abbildung 18. Projizierte Fläche der PSCs. A: direkt nach der Isolation. **B:** nach 72 h. Die PSCs werden über die Zeit größer, wobei die PSCs nach 72 h deutlich größer als die frisch isolierten sind. Zwischen Druck und Kontrolle zeigt sich in der Gruppe der frisch isolierten kein signifikanter Unterschied, in der Gruppe nach 72 h sind die PSCs unter Kontrollbedingungen am Anfang der Messung größer. N=3; n=27-33.

Der Strukturindex fällt über die Zeit, die PSCs werden weniger rundlich (Abbildung 19). Nach 24 h sind die PSCs in der Kontrolle mit einem Strukturindex von $0,42 \pm 0,04$ rundlicher als unter Druck mit $0,32 \pm 0,03$ (Abbildung 19A).

Nach 72 h sind die PSCs mit einem Strukturindex von $0,14 \pm 0,01$ (Kontrolle) bzw. $0,19 \pm 0,02$ (Druck) deutlich weniger rund als die frisch isolierten PSCs (Abbildung 19B). Der Strukturindex sinkt auch dort vom Start der Messung zu den beiden anderen Messpunkten ab. Die PSCs unter Druck sind gegensätzlich zur Messung nach 24 h rundlicher als die PSCs unter Kontrollbedingungen, allerdings ist der Unterschied nur gering.

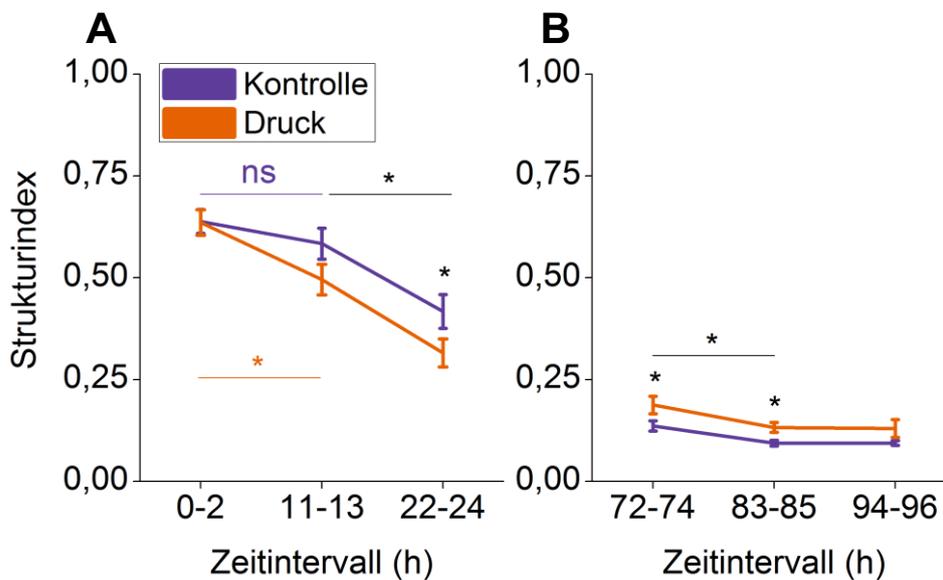


Abbildung 19. Strukturindex der PSCs. **A:** direkt nach der Isolation. **B:** nach 72 h. Der Strukturindex fällt über die Zeit ab, die PSCs werden weniger rundlich. Nach 72 h sind die PSCs deutlich weniger rund als die frisch isolierten PSCs. Die frisch isolierten PSCs sind in der Kontrolle gegenüber PSCs unter Druck nach 24 h runder. Nach 72 h sind die PSCs unter Druck jedoch runder, wobei der Unterschied nur klein ist. $N=3$; $n=27-33$.

Zusammenfassend werden die PSCs über die Zeit größer und der Strukturindex nimmt ab, die PSCs ähneln morphologisch zunehmend ihrer aktivierten, sternförmigen Form. PSCs unter Druck sind leicht kleiner, während die Aussage des Strukturindex uneindeutig ist.

4.4 Ca²⁺-Messungen

In den vorausgehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch Druck in den TRPC1-KO-PSCs anders verläuft. Wie TRPC1 dies vermittelt, ist unklar, da die Funktion von TRPC1 in den PSCs unbekannt ist. Eine mögliche Erklärung wäre eine Abschwächung des SOCEs. Der SOCE ist eine der wichtigen Formen des Ca²⁺-Einstroms in PSCs und TRPC1-Kanäle spielen in einigen Zellarten eine Rolle im SOCE (s. 1.5.2). Um zu beurteilen, ob TRPC1 eine Rolle im SOCE der PSCs spielt, sollen Unterschiede zwischen aktivierten und ruhenden WT- und TRPC1-KO-PSCs untersucht werden. Als ruhende PSCs wurden frisch isolierte, einen Tag alte PSCs (P0) verwendet. Als aktivierte PSCs wurden ältere, durch die Zellkultur aktivierte PSCs (P2) verwendet. Experimente mit Druck wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Für die folgenden Experimente wurden PSCs mit Fura-2 gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop der Quotient der Emissionsintensität bei Anregung mit 340 nm und 380 nm bestimmt. Dieser korreliert positiv mit der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Zuerst wurde ein „Ruhewert“ bei Superfusion mit Ringer bestimmt. Die weiteren hier aufgezeigten Werte sind Relativwerte („normalisierter Quotient“) in Bezug auf diesen Ruhewert je Zelle.

In Abbildung 20 wird eine einzelne Messung einer Zelle beispielhaft gezeigt: Nach der Superfusion mit Ringer erfolgt die Superfusion mit 0 mM-Ca²⁺-Lösung, was zu einem Absinken der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt. Die Ca²⁺-Speicher des ER werden durch Hinzufügen von Thapsigargin, welches die SERCA blockiert und die Wiederaufnahme von Ca²⁺ in das ER stoppt, weiter depletiert. Diese Entleerung führt kurzzeitig zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Durch Hinzufügen von 2 mM-Ca²⁺-Lösung bei entleerten Speichern und somit aktivierten SOC-Kanälen wird der SOCE ausgelöst. Zuletzt kann der SOCE durch Hinzufügen von BTP2 als unspezifischem Blocker der SOC-Kanäle gestoppt werden. Neben dem Verlauf der Messung wird in Abbildung 20 die Auswertung gezeigt. Nach der Bestimmung des Ruhewertes (1) wird die Speicherentleerung (2) als Maximum des Peaks und als Delta quantifiziert. Der SOCE (3) wird ebenfalls als Maximum des Peaks und als Delta quantifiziert. Zusätzlich wird in den Schalen, zu denen kein BTP2 hinzugefügt wurde, die AUC über 6 min nach Beginn des SOCE gemessen.

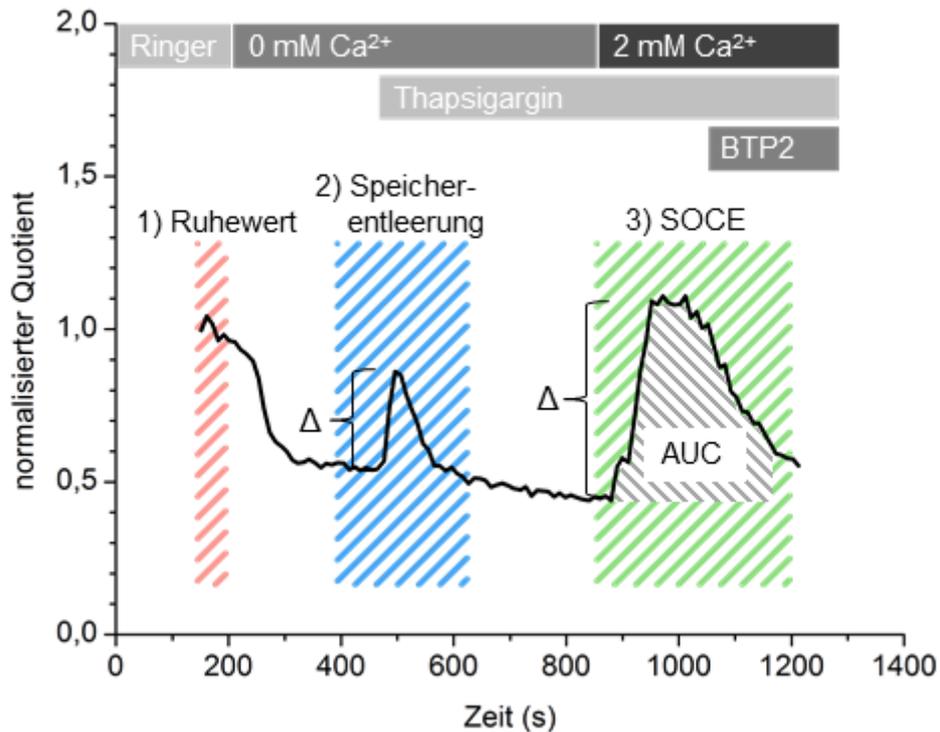


Abbildung 20. Verlauf der Ca²⁺-Messung und Schema der Auswertung. Beispielhafter Verlauf des normalisierten Quotienten einer kompletten Messung für eine einzelne Zelle. Die Zelle wurde mit Ringer-Lösung superfundiert und ein Ruhewert (1) bestimmt. Danach wird die Lösung durch Ca²⁺-freie Lösung ersetzt und Thapsigargin zum Entleeren der intrazellulären Speicher hinzugefügt. Die Speicherentleerung (2) wird als Maximum des Peaks und als Delta analysiert. Danach wird der SOCE durch Wiederhinzufügen von Ca²⁺ ausgelöst. Auch hier (3) wird das Maximum des Peaks und das Delta analysiert. Zusätzlich wird die Fläche unter der Kurve (AUC) gemessen. Zuletzt kann der SOCE noch durch BTP2 geblockt werden.

4.4.1 Keine Unterschiede des Ca^{2+} in unstimulierten PSCs

Der Ruhewert des Quotienten bei Superfusion der PSCs mit Ringerlösung korreliert mit der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der PSCs ohne weitere Stimulation. Der Ruhewert des Quotienten unterscheidet sich zwischen WT- und TRPC1-KO- sowie zwischen P0- und P2-PSCs nicht (Abbildung 21). Die absoluten Werte des Quotienten liegen zwischen 1,85 und 2.

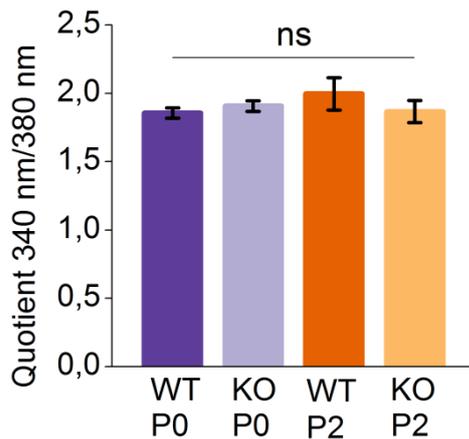


Abbildung 21. Ruhewert des Quotienten. Bei Superfusion mit Ringer zeigen sich keine Unterschiede zwischen WT- und TRPC1-KO-PSCs oder zwischen P0- und P2-PSCs. $N=3$; $n(P0)=132-140$, $n(P2)=23-26$.

4.4.2 Erhöhtes Speicher- Ca^{2+} in TRPC1-KO-PSCs

Zur Analyse der Menge des Ca^{2+} in den intrazellulären Speichern wurde der Peak bei Zugabe von Thapsigargin („Speicherentleerung“) analysiert. In Abbildung 22A ist die Form des Peaks in den verschiedenen Gruppen durch Mittelung jeweils aller Zellen dargestellt: Das Maximum unterscheidet sich und die Peaks der P2-PSCs liegen höher als die der P0-PSCs. Die grundlegende Form der Peaks ist vergleichbar. Sowohl das Maximum des Peaks (Abbildung 22B) als auch das Delta (Abbildung 22C) ist bei den P2-PSCs höher als bei den P0-PSCs. Dies gilt sowohl für die WT-PSCs als auch für die TRPC1-KO-PSCs. Das Delta liegt in den P2-PSCs doppelt so hoch wie in den P0-PSCs, es steigt von $0,20 \pm 0,02$ auf $0,40 \pm 0,05$ (WT) und von $0,30 \pm 0,03$ auf $0,62 \pm 0,10$ (TRPC1-KO). Es kann bei den älteren, aktivierten PSCs also mehr Ca^{2+} aus den Speichern freigesetzt werden als bei den ruhenden, frisch isolierten PSCs.

Im Vergleich von WT-PSCs und TRPC1-KO-PSCs ist eine Tendenz zu höheren Werten für die TRPC1-KO-PSCs erkennbar. Ein Unterschied besteht allerdings nur bei dem Delta zwischen den P0-PSCs: Das Delta des Peaks bei Speicherentleerung liegt in den WT-PSCs bei $0,20 \pm 0,02$, in den TRPC1-KO-PSCs bei $0,30 \pm 0,03$. Tendenziell kann bei den TRPC1-KO-PSCs also mehr Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern freigesetzt werden.

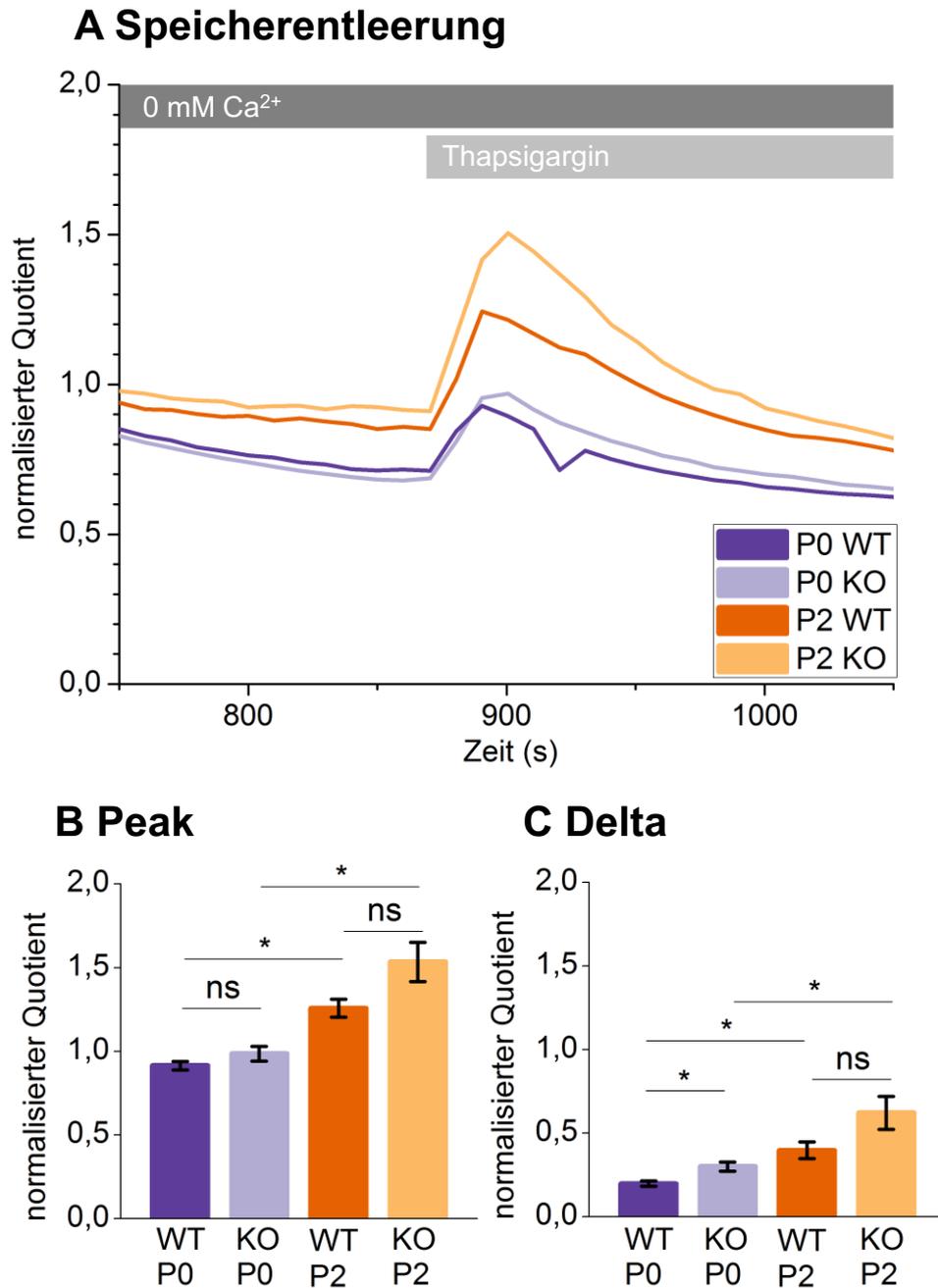


Abbildung 22. Speicherentleerung. **A:** gemittelte Kurven. Der Peak bei Zugabe von Thapsigargin, der mit der Menge an Ca²⁺ in den intrazellulären Speichern korreliert, wurde analysiert. Die Kurven des normalisierten Quotienten der einzelnen Zellen wurden so übereinandergelegt, dass der Anstieg des Peaks an der gleichen Stelle beginnt und dann gemittelt. Der Peak hat in den verschiedenen Gruppen eine ähnliche Form, allerdings unterscheidet sich dessen Maximum. Der Peak ist bei den P2-PSCs höher als bei den P0-PSCs. **B:** Peak-Maximum. Der normalisierte Quotient liegt bei den P2-PSCs höher als bei den P0-PSCs. **C:** Delta. Das Delta des normalisierten Quotienten liegt bei den P2-PSCs höher als bei den P0-PSCs. Zusätzlich ist das Delta bei den P0-PSCs in den TRPC1-KO-PSCs gegenüber den WT-PSCs höher. N=3; n(P0)=121-140, n(P2)=21-26.

4.4.3 Kein Unterschied im SOCE zwischen WT- und TRPC1-KO-PSCs

Bei entleerten Speichern wird Ca^{2+} wieder hinzugefügt und der SOCE ausgelöst. In Abbildung 23A ist die Form des Peaks in den verschiedenen Gruppen durch Mittelung aller Zellen dargestellt. Die grundlegende Form des Peaks ist vergleichbar, und nur das Maximum, mit tendenziell höheren Werten bei den P0-PSCs, unterscheidet sich. Insbesondere ist der SOCE auch in den TRPC1-KO-PSCs vorhanden.

Der SOCE ist in WT- und TRPC1-KO-PSCs gleich hoch, in der Quantifizierung des SOCE zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Dies gilt sowohl für das Maximum des Peaks (Abbildung 23B) als auch für das Delta (Abbildung 23C).

Überraschenderweise liegen sowohl das Maximum des Peaks als auch das Delta in den P0-PSCs höher als in den P2-PSCs. Das Delta der WT-PSCs liegt bei $0,76 \pm 0,03$ (P0) bzw. $0,52 \pm 0,07$ (P2), in den TRPC1-KO-PSCs bei $0,84 \pm 0,03$ (P0) bzw. $0,55 \pm 0,06$ (P2). In dieser Messung erfolgt der SOCE in den aktivierten PSCs weniger schnell bzw. stark.

Um eine weitere Aussage über den SOCE machen zu können, wurde die AUC des SOCEs berechnet. Unterschiede, die durch länger anhaltenden Einstrom entstehen könnten, können so analysiert werden. Auch hier zeigt sich eine Tendenz zu größerem SOCE in den P0-PSCs (Abbildung 23D). Zusätzlich ist in den P0-WT-PSCs die AUC mit $160,5 \pm 6,9$ niedriger als in den P0-TRPC1-KO-PSCs mit $195,2 \pm 11,3$. Dies weist darauf hin, dass in den ruhenden TRPC1-KO-PSCs der SOCE anhaltender ist.

Zusammenfassend hat TRPC1 keine direkte Beteiligung am SOCE in PSCs. Er sorgt aber möglicherweise für eine zeitliche Begrenzung des SOCEs.

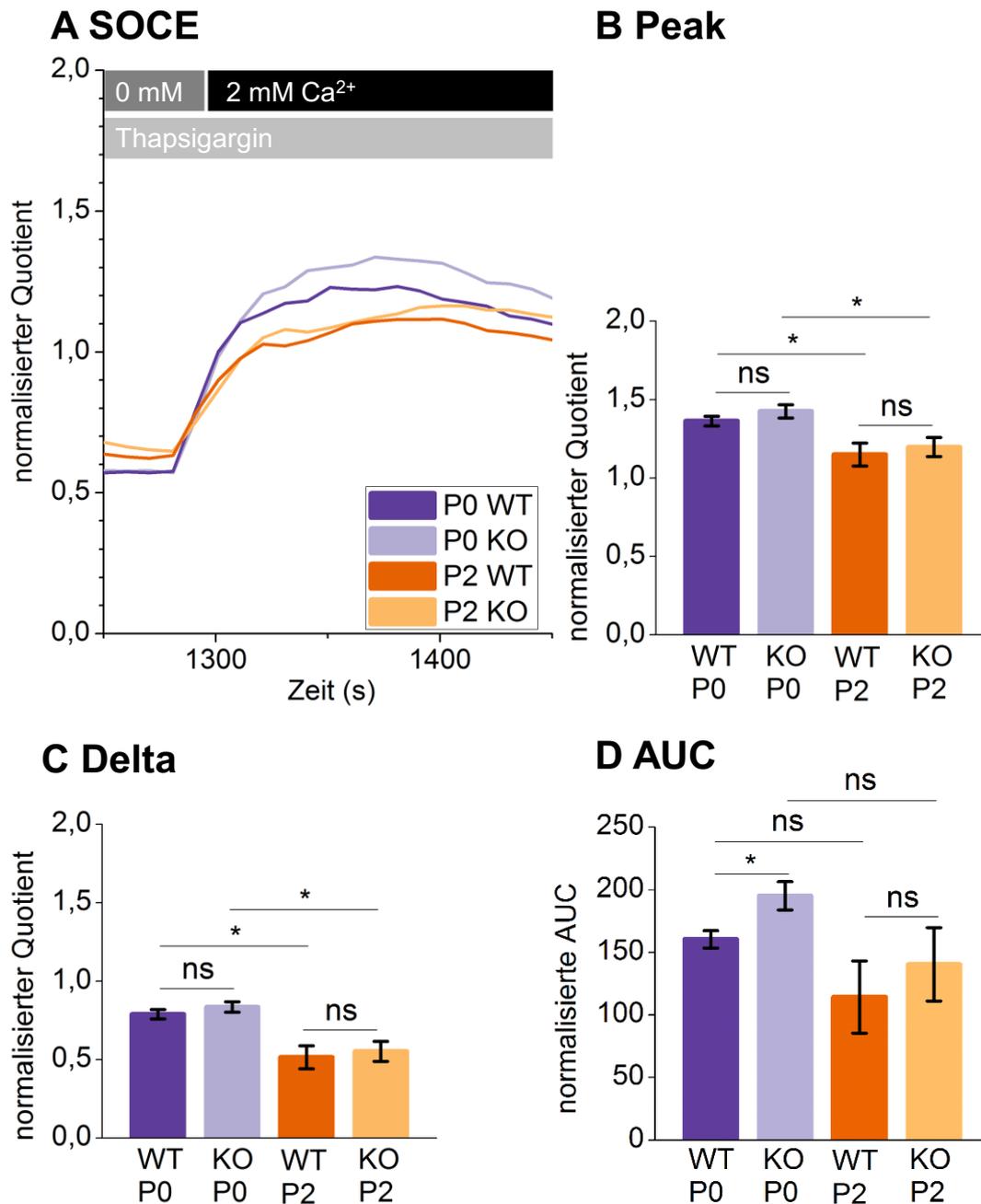


Abbildung 23. SOCE. A: gemittelte Kurven. Der Anstieg bei Zugabe von Ca^{2+} , der den SOCE darstellt, wurde analysiert. Die Kurven des normalisierten Quotienten der einzelnen Zellen wurden so übereinandergelegt, dass der Anstieg des Peaks an der gleichen Stelle beginnt und dann gemittelt. Der Peak hat in den verschiedenen Gruppen eine ähnliche Form, allerdings unterscheidet sich dessen Maximum. Der Peak ist bei den P2-PSCs niedriger als bei den P0-PSCs. **B:** Peak-Maximum. Der normalisierte Quotient liegt bei den P2-PSCs niedriger als bei den P0-PSCs. WT- und TRPC1-KO-PSCs unterscheiden sich nicht. **C:** Delta. Das Delta des normalisierten Quotienten liegt bei den P2-PSCs niedriger als bei den P0-PSCs. WT- und TRPC1-KO-PSCs unterscheiden sich nicht. **D:** AUC. Fläche unter der Kurve über 6 min ab initialem Anstieg. Die AUC ist bei den P0-TRPC1-KO-PSCs gegenüber den P0-WT-PSCs höher. $N=3$; $n(\text{P0})=117-139$, $n(\text{P2})=21-25$; AUC: $n(\text{P0})=75-107$, $n(\text{P2})=12-13$.

4.4.4 Blockade des SOCEs

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem analysierten Peak nach Ca^{2+} -Zugabe um den SOCE handelt, wurde bei einem Teil der Experimente der SOCE 3 min nach Ca^{2+} -Zugabe mit BTP2 geblockt. In Abbildung 24 wird der SOCE durch Mittelung aller Zellen, diesmal in Gruppen mit und ohne BTP2 aufgeteilt, dargestellt. Nach dem initialen Anstieg des SOCEs fällt der normalisierte Quotient in allen Gruppen, auch ohne BTP2, ab. Schwarz markiert ist der Teil der PSCs, bei denen an der mit Pfeil markierten Stelle BTP2 hinzugefügt wurde. Der Abfall nach Zugabe von BTP2 fällt deutlich steiler aus als ohne BTP2. Bei dem zuvor analysierten Anstieg handelt es sich also um den SOCE. Zwischen WT- und TRPC1-KO- sowie P0- und P2-PSCs unterscheidet sich der Abfall nicht signifikant.

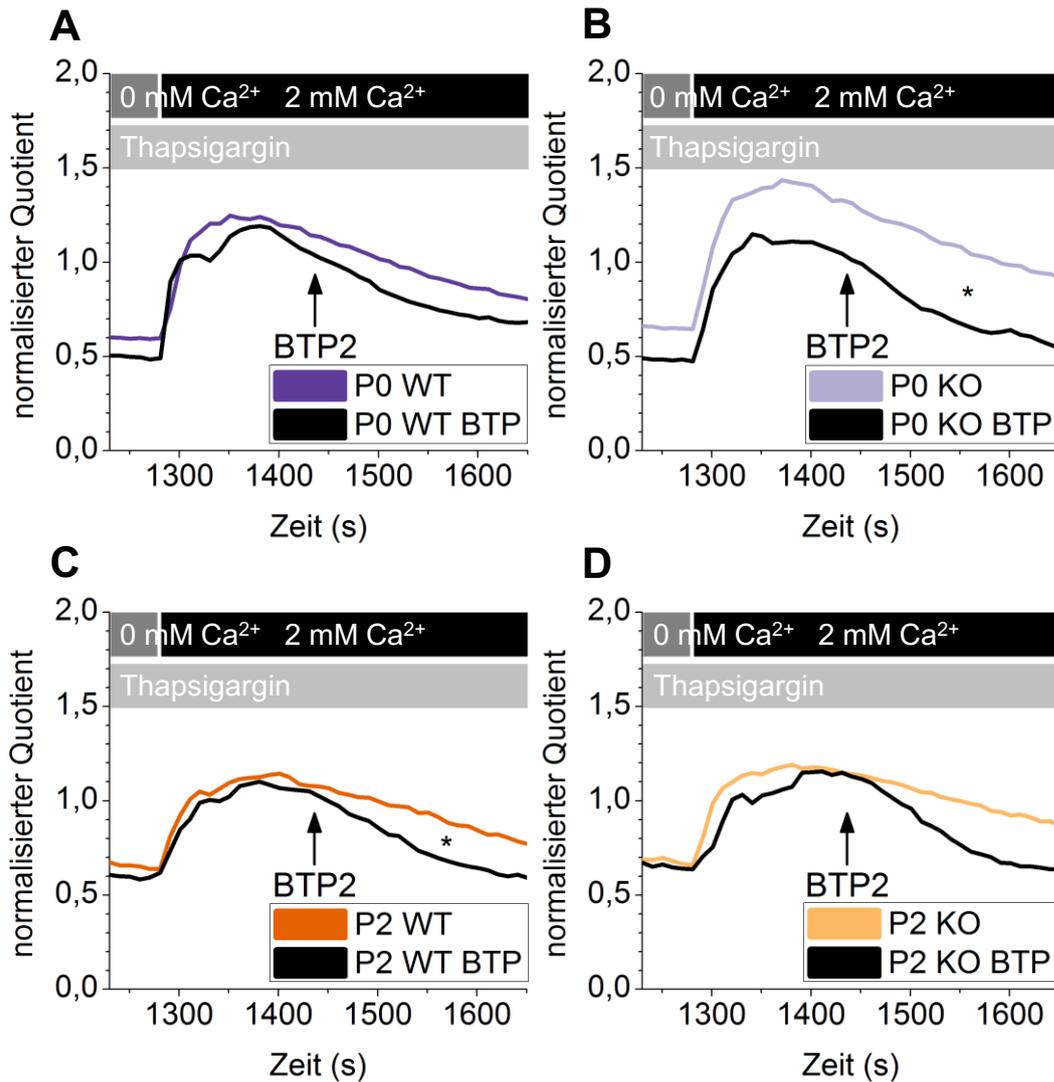


Abbildung 24. Blockade des SOCEs mit BTP2. Die Kurven des normalisierten Quotienten der einzelnen Zellen wurden so übereinandergelagert, dass der Anstieg des Peaks an der gleichen Stelle beginnt und dann gemittelt. PSCs wurden entweder nach Zugabe von Ca²⁺ zum Auslösen des SOCEs nicht weiter beeinflusst oder bei der mit einem Pfeil markierten Stelle mit BTP2 zur Blockade des SOCEs versetzt. In beiden Gruppen fällt der normalisierte Quotient nach einem Maximum ab, die Zugabe von BTP-2 führt aber zu einem deutlich steileren Abfall des normalisierten Quotienten. N=3; n(P0, BTP)=19-32, n(P0, kein BTP)=75-107, n(P2, BTP)=8-13, n(P2, kein BTP)=12-15.

5 Diskussion

Der erhöhte Druck im PDAC (87) führt *in vitro* zur vermehrten Aktivierung von PSCs (36). Die aktivierten PSCs im PDAC rekrutieren sich aus residenten, ruhenden PSCs. Deshalb ist die initiale Aktivierung ruhender PSCs von Bedeutung. In dieser Arbeit sollte die Rolle des Drucks in der Aktivierung der ruhenden PSCs bestätigt werden. Druck hatte in den ersten 48 h nach Isolierung mit Zunahme von α -SMA und Abnahme der Lipidtröpfchen einen zusätzlich aktivierenden Effekt, wobei eine deutliche Aktivierung alleine durch die Kultivierung auf dem harten Boden der Zellkulturschalen vorlag (54). Die PSCs bewegten sich unter Druck schneller. Es konnte bereits in aktivierten PSCs gezeigt werden, dass TRPC1 für diese Aktivierung durch Druck wichtig ist (36). Dies wurde hier in den ruhenden PSCs untersucht: In TRPC1-KO-PSCs zeigte sich keine vermehrte α -SMA-Expression unter Druck. In ruhenden PSCs ist TRPC1 also für die Aktivierung durch Druck notwendig. Um die Funktion der TRPC1-Kanäle im Rahmen der Aktivierung in PSCs weiter zu charakterisieren, wurde erstmals die Rolle der TRPC1-Kanäle im SOCE der PSCs charakterisiert. Bei Stimulation mit Thapsigargin zeigte sich in den TRPC1-KO-PSCs unerwartet eine stärkere Füllung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Der SOCE unterschied sich zwischen TRPC1-KO- und WT-PSCs nicht, nur eine gering höhere AUC war in den TRPC1-KO-PSCs festzustellen. Der TRPC1-Kanal ist damit am SOCE in den PSCs nicht direkt beteiligt. Überraschenderweise war der SOCE in den aktivierten PSCs geringer als in den ruhenden PSCs, wobei dies methodische Gründe hat.

5.1 Experimentelle Erzeugung des Druckes

Es ist unklar, wie gering erhöhter Druck auf Zellen wirkt, trotzdem zeigen viele Studien in verschiedenen Zellen Effekte von erhöhtem Druck. Erhöhter Druck führt z. B. in Chondrozyten zu einer erhöhten Produktion von Proteinen der ECM. Dies wurde allerdings für sehr hohe Drücke von 1-10 MPa (7.500-75.000 mmHg) untersucht (31), wohingegen der Druck im PDAC nur 100 mmHg erreicht. Niedrigere Drücke haben allerdings ebenfalls in verschiedenen Zellarten wie Astrozyten (15 mmHg), Endothelzellen (100 mmHg) oder Lungenkrebszellen (20 mmHg) Effekte (51, 65, 88). Einige dieser Studien konnten jedoch nicht repliziert werden. Es wurde insgesamt eine Wirkung von nur gering erhöhtem Druck auf Zellen bezweifelt (56, 110). Deswegen müssen Artefakte, die in den Experimenten statt des eigentlichen Drucks auf die PSCs eingewirkt haben könnten, betrachtet werden.

Die Veränderung der Partialdrücke von O_2 und CO_2 in der Druckkammer könnte einen Einfluss auf die PSCs haben. Bei einer Erhöhung des Druckes von 760 mmHg (Atmosphärendruck) auf 860 mmHg ändert sich der Sauerstoffpartialdruck nur um 13,2 %, und es ist unwahrscheinlich, dass diese leichte Zunahme der Hyperoxie die PSCs beeinflusst. Relevant könnte dies für die Änderung des CO_2 -Partialdruckes von 38 mmHg auf 43 mmHg sein. Von diesem hängt der pH-Wert im Medium ab. Dies würde im gepufferten Medium den pH-Wert um 0,06 verringern. Experimentell konnte kein Unterschied des pH-Werts festgestellt werden (36). Bestätigenderweise zeigten Watanabe et al. mit einer Variante der Druckkammer einen Effekt auf PSCs. Sie erhöhten den Druck nicht durch Luft, sondern durch zusätzliches Helium in der Gasphase, und konnten so die Partialdrücke von O_2 und CO_2 konstant halten (9, 112).

Bei einer Erzeugung des Drucks durch eine Wassersäule wie bei den Migrationsexperimenten wurde beschrieben, dass vielfach Hypoxie und nicht Druck der beeinflussende Faktor war. Durch die lange Flüssigkeitsschicht könne nicht genügend Sauerstoff zu den Zellen diffundieren (56). Die hier verwendeten μ -Slides (Höhe 600 μ m) sind allerdings gaspermeabel, eine Hypoxie der PSCs kann als unwahrscheinlich angesehen werden. Denkbar wäre, dass in den flexiblen μ -Slides die Druckerzeugung zu einer Dehnung des Untergrunds und damit der PSCs führt. Makroskopisch konnte jedoch keine Dehnung erkannt werden. Ausgeschlossen werden kann eine Dehnung für den rigiden Deckglasuntergrund bei den Färbungen. Insgesamt aktivierte Druck die PSCs in beiden grundlegend unterschiedlichen Methoden der Druckerzeugung in dieser Arbeit. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass die beschriebenen Effekte durch den eigentlichen Druck zustande kommen.

5.2 Schnellere Aktivierung ruhender PSCs durch Druck

In dieser Arbeit wurde zuerst gezeigt, dass Druck einen aktivierenden Einfluss auf ruhende PSCs hat. Dieser war geringer als der aktivierende Effekt durch die Zellkulturbedingungen. Der Verlust von Lipidtröpfchen, die α -SMA-Expression und die Migrationsgeschwindigkeit wurden vorrangig untersucht.

5.2.1 Aktivierung durch die Zellkultur

Der Verlust von Lipidtröpfchen ist ein etablierter Marker der PSC-Aktivität und auch in dieser Arbeit reliabel (7, 32). Mikroskopisch konnten die Lipidtröpfchen durch die Färbung mit Nile Red gut identifiziert werden. Der Anteil der PSCs mit Lipidtröpfchen war nach 24 h maximal und nahm dann über die Zeit ab. Dies war zu erwarten und spricht für die Aktivierung der PSCs durch die Zellkultur. Auffällig ist jedoch, dass bei 0 h, kurz nach der

Isolation, deutlich weniger PSCs als Lipidtröpfchen-positiv klassifiziert wurden als nach 24 h. Eine höhere Aktivität direkt nach der Isolation als Erklärung ist nicht zu erwarten und in Anbetracht der Morphologie der PSCs dort auszuschließen. Zwei Erklärungen für dieses Phänomen liegen vermutlich nebeneinander vor. Als erstes könnten die Reinheit der Zellkultur in den ersten Stunden nach der Isolation und damit der Anteil Lipidtröpfchen-positiver Zellen zunehmen. In verschiedenen Studien für verschiedene Isolationsmethoden hatten die PSC-Kulturen erst nach 24 h eine Reinheit von >95 %, wohingegen nach 0 h noch Kontaminationen vorlagen (5, 11). Als zweites war es bei den frisch isolierten PSCs bei 0 h schwierig, die Lipidtröpfchen zu identifizieren. Die Lipidtröpfchen waren klein, nur in einer Ebene der Mikroskopie zu erkennen und der Zellkern füllte die PSCs fast aus. Als negativ klassifizierte PSCs könnten demnach trotzdem Lipidtröpfchen enthalten.

Die Erhöhung der α -SMA-Expression ist ein weiterer etablierter Marker der PSC-Aktivität (7, 32). Hier ist davon auszugehen, dass α -SMA spezifisch gefärbt wurde, da in den aktivierten PSCs die typische Aktinstruktur zu erkennen war. Sowohl unter Druck als auch unter Kontrollbedingungen nahm die Gesamtintensität über die Zeit deutlich zu, und qualitativ gingen die PSCs von diffuser Färbung zu einer deutlich strukturierten Färbung über. Dies spricht für die vermehrte Aktivierung über Zeit und passt gut zu den Ergebnissen der Lipidtröpfchen-Färbung. Der Zeitrahmen der Aktivierung entspricht dem in anderen Studien (11, 115). Die PSC-Population war allerdings in den Versuchen deutlich heterogen. Während einige PSCs nach 48 h die typische Aktinstruktur zeigten, waren andere nach 120 h noch nicht aktiviert. Passenderweise waren nach 120 h noch in einem kleinen Anteil der PSCs Lipidtröpfchen nachzuweisen. Die Gesamtintensität zeigte dementsprechend eine große Spannweite. Eine Heterogenität der primären Zellkultur ist normal und könnte z. B. durch eine unterschiedlich starke Voraktivierung *in vivo* bedingt sein.

Als funktioneller Marker der PSC-Aktivierung wurde die Migrationsgeschwindigkeit untersucht. Die PSCs wurden über die Zeit schneller, also durch die Zellkultur aktiviert. Die Geschwindigkeit lag in der gleichen Größenordnung wie in anderen Studien. Die PSCs erreichten nach 92 h Geschwindigkeiten, die für aktivierte PSCs beschrieben wurden (36, 103). Die Zunahme der projizierten Fläche und die Abnahme des Strukturindex über die Zeit spricht ebenfalls für eine Aktivierung der PSCs. Unerwartet war, dass die Geschwindigkeit zu Beginn des Experiments nach 72 h niedriger lag als am Ende des ersten Experiments nach 24 h. Hierfür kommen besonders zwei sich überschneidende Erklärungen in Frage. Eine besondere Rolle spielt, dass direkt vor Start der Videomikroskopie bei 0 h und 72 h das Medium gewechselt werden musste, um

Pufferung durch HEPES statt $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ zu ermöglichen. Einerseits könnten die PSCs sich diesem Mediumwechsel anpassen müssen, insbesondere an den veränderten pH-Wert zwischen HCO_3^- -haltigem und HCO_3^- -freiem Medium. Andererseits beruht die Geschwindigkeitszunahme auf der autokrinen Stimulation der PSCs (78). Beispielsweise führt PDGF zu einer autokrinen Aktivierung von PSCs (7). Neben einer Aktivierung der PSCs wirkt PDGF stark chemotaktisch auf PSCs und steigert die ungerichtete Migration (Chemokinese) (103). Die Entfernung dieses chemokinetisch wirkenden Stoffs durch den Mediumwechsel erklärt die langsamere Geschwindigkeit zu Beginn des Experiments nach 72 h gut. Um eine Beeinflussung durch den Mediumwechsel auszuschließen, müsste der Versuch modifiziert werden: Die Migration könnte in einem gasdichten Objektträger beobachtet und $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepuffertes Medium verwendet werden. Dafür könnte das erhöht stehende (und für den Druck zuständige) Mediumreservoir offen in einen CO_2 -Inkubator gestellt werden. Eine Pumpe zwischen Objektträger und Reservoir befördert wie von Lei et al. beschrieben frisches Medium vom Reservoir Richtung Objektträger und verbrauchtes Medium zurück (56).

Neben der Geschwindigkeit wurden die Translokation und die Direktionalität untersucht. Die Direktionalität nahm über die Zeit ab, die PSCs bewegen sich schneller und ungerichteter. Die Direktionalität schwankte allerdings deutlich und die Abnahme über die Zeit ist nicht überall klar erkennbar. Auch ein klarer Unterschied zwischen Druck und Kontrolle ist nicht erkennbar. In diesem Versuch lag kein Zytokingradient vor, der eine Richtung beeinflussen könnte, und die Matrix schien lichtmikroskopisch gleichmäßig über den Kanal verteilt zu sein. Als Erklärung wäre denkbar, dass die autokrine chemokinetische Stimulation zu einer weniger gerichteten Bewegung führt.

Die hier beobachtete Aktivierung der ruhenden PSCs alleine durch die Zellkultur erfolgt in allen Studien zu PSCs, wenn die PSCs nicht durch spezielle Maßnahmen ruhend gehalten werden (32). Vor allem die Kultivierung auf dem harten Plastikboden einer Zellkulturschale hat eine aktivierende Wirkung. Die Kultivierung auf einem der normalen Matrix ähnlichen Untergrund hält die PSCs hingegen ruhend (8). Eine Erklärung für diese Aktivierung ist die variierende Steifigkeit des Untergrunds. Die Steifigkeit des Glases, auf dem die Zellen für die Färbungen kultiviert wurden, liegt bei mehreren GPa. Es ist viele Größenordnungen steifer als das gesunde Pankreas mit etwa 1 kPa (94). PSCs werden durch eine steife Matrix mit 25 kPa aktiviert, während sie auf einer weichen Matrix mit 1 kPa im ruhenden Zustand verbleiben. Die weiche Matrix versetzt sogar aktivierte PSCs in den ruhenden Zustand (54). Anders als bei den Färbungen auf Glas wurde bei den Migrationsexperimenten eine auf Kollagen I basierende Matrix, der der desmoplastischen Matrix im PDAC ähnelt, verwendet. Auf dieser können die PSCs eine höhere

Geschwindigkeit erreichen. Auch diese Matrix aktiviert die PSCs. Die Genexpression verändert sich ähnlich wie bei der Kultivierung auf einem steifen Untergrund (8). Möglicherweise spielt bei einer nur dünnen Kollagen-I-Schicht ebenfalls die Steifigkeit der Zellkulturschale eine Rolle.

5.2.2 Aktivierung durch Druck

Unter Druck war nach 24 h der Anteil von Lipidtröpfchen gegenüber Kontrollbedingungen vermindert und die PSCs damit verstärkt aktiviert. Die α -SMA-Intensität war nach 24 h und 48 h erhöht. Zu den späteren Zeitpunkten war übereinstimmend zur Lipidtröpfchen-Färbung kein Unterschied zwischen Kontrollbedingungen und Druck mehr erkennbar. Druck wirkte zu den frühen Zeitpunkten zusätzlich aktivierend. Langfristig überwiegte jedoch der Effekt der Aktivierung durch die harten Zellkulturschalen als stärkerer Stimulus. Die Geschwindigkeit nahm unter Druck im Vergleich zu Kontrollbedingungen sowohl zwischen 0 h und 24 h als auch zwischen 72 h und 96 h jeweils um etwa 50 % stärker zu. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass ruhende PSCs durch Druck auch auf funktioneller Ebene vermehrt aktiviert werden. Anders als bei den Färbungen besteht auch noch nach 96 h ein Unterschied zwischen PSCs unter Kontrollbedingungen und Druck. Die Wirkung von Druck auf die PSCs scheint von weiteren Umgebungsfaktoren abhängig zu sein. Auch könnte Druck auf funktioneller Ebene einen sichtbareren Einfluss haben als bei der morphologischen Konversion vom ruhenden zum aktivierten Zustand. Um alleine den Einfluss des Druckes auf die Aktivierung ruhender PSCs zu untersuchen, müssten die PSCs in einem ruhenden Zustand gehalten werden. Dafür könnte eine physiologische Umgebung mit einer weichen 3D-Matrix verwendet werden. Möglicherweise reicht dann die geringe Stimulation durch Druck aus, um autokrine Stimulation und die Selbstaufrechterhaltung der Aktivierung anzustoßen.

Nach 72 h waren die PSCs unter Kontrollbedingungen und Druck bemerkenswerterweise nahezu gleich schnell, obwohl nach 24 h ein deutlicher Trend zu höherer Geschwindigkeit unter Druck zu sehen ist. Auch dies könnte über die Entfernung der autokrin wirksamen Zytokine durch den Mediumwechsel erklärt werden. Eine vermehrte Ausschüttung von TGF- β unter Druck konnte für aktivierte PSCs gezeigt werden (112). Ob frisch isolierte PSCs unter Druck vermehrt Zytokine ausschütten, könnte überprüft werden: PSCs könnten mit Überstand von PSCs unter Kontrollbedingungen und unter Druck versehen und die Migration verglichen werden. Hier würde man erwarten, dass sich PSCs mit Drucküberstand verstärkt bewegen. Zum Ausschluss des Effekts kleiner Moleküle könnten die Überstände ultrafiltriert werden und nur die Proteine verwendet werden.

Druck führt ebenfalls zu einer Veränderung der Form der PSCs: Die projizierte Fläche der PSCs war nach 72 h unter Druck in den Migrationsexperimenten geringer. Im Gegensatz

führt Druck in Lungenkrebszellen zu einer größeren Fläche und einem größeren Zellvolumen. In Bronchialepithelzellen wiederum hat Druck keinen Einfluss auf das Volumen (51). Der Effekt des Druckes auf die Fläche ist also zelltypspezifisch. In Endothelzellen führt Druck zu vermehrter Kontraktion von Aktin-Myosin des Zellkortex, dies könnte übertragen auf die PSCs zu einer kleineren projizierten Fläche führen (88). Die Größenänderung war hier allerdings gering und der physiologische Effekt ist fraglich. Die PSCs in der α -SMA-Färbung waren zu vergleichbaren Zeitpunkten kleiner und runder als die PSCs in diesem Migrationsexperiment. Dies wird zum einen darauf zurückzuführen sein, dass bei den Färbungen schmale Ausläufer wie Lamellipodien nicht erfasst wurden, da nur die gefärbten Bereiche in der Auswertung umrandet wurden. Zum anderen unterschied sich die Matrix und es ist gut vorstellbar, dass sich die PSCs auf Kollagen besser ausbreiten können als auf Glas.

Insgesamt hat Druck nicht nur in präaktivierten PSCs einen Effekt. Der zusätzliche aktivierende Effekt des Druckes auf ruhende PSCs nach 24 h und 48 h könnte gerade für die initiale Aktivierung vom ruhenden zum aktivierten Zustand Bedeutung haben. In dieser Aktivierung kann die autokrine Stimulation durch Zytokine eine wesentliche Rolle spielen.

5.3 TRPC1 als notwendiger Bestandteil der druckabhängigen Aktivierung

Der TRPC1-Kanal ist in ruhenden PSCs wie in den präaktivierten PSCs ein Bestandteil der Mechanotransduktion von Druck. Nach 24 h und 48 h führte Druck nur in WT-PSCs und nicht in TRPC1-KO-PSCs zu vermehrter α -SMA-Expression.

Nach 48 h war die α -SMA-Intensität in den TRPC1-KO-PSCs unter Druck sogar niedriger als unter Kontrollbedingungen. Der TRPC1-Kanal könnte dementsprechend für die Anpassung der PSCs an die veränderten Umgebungsbedingungen unter Druck nötig sein, bei seinem Fehlen wird die Aktivierung verzögert. Dass Druck negative Effekte auf Zellen haben kann, zeigt sich z. B. in der vermehrten Apoptose von retinalen Neuronen (1). Allerdings zeigen PSCs unter Druck keine Veränderung der Vitalität (112).

Veränderungen der TRPC1-Expression haben Einfluss auf die Zellmorphologie. Die TRPC1-KO-PSCs waren insbesondere bei 0 h und nach 24 h runder und um etwa 30 % kleiner als die WT-PSCs. TRPC1-KO-Fibroblasten haben gegensätzlich eine größere projizierte Fläche als die WT-Zellen (35). Auch das Zellvolumen ist in TRPC1-Knockdown-Zellen deutlich erhöht. Dafür kommen zwei Erklärungen in Frage. Diese Zellen adhärieren weniger stark (34). Übertragen auf die PSCs könnten sich die nur schwach adhärierenden PSCs zu Beginn nicht so stark ausbreiten und wären kugelig, wohingegen sich nach

48 h die Adhäsion normalisiert hätte. Zweitens könnte eine höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu einer verstärkten Kontraktion führen (60, 101). Um dies zu überprüfen, sollte zuerst das Zellvolumen der PSCs im Verhältnis zur projizierten Fläche bestimmt werden. Die Versuche sollten auf einer physiologischen Matrix wiederholt werden und die Adhäsion der TRPC1-KO-PSCs könnte z. B. mittels *single-cell force spectroscopy* gemessen werden.

5.4 Die Rolle der TRPC1-Kanäle für den Ca^{2+} -Haushalt der PSCs

In den Ca^{2+} -Messungen zeigte sich ein erhöhtes Speicher- Ca^{2+} in TRPC1-KO-PSCs sowie keine direkte Rolle von TRPC1 im SOCE. Dies liefert Hinweise darauf, wie TRPC1 an der druckabhängigen Aktivierung beteiligt sein könnte und charakterisiert die Rolle von TRPC1 generell weiter.

Die hier verwendete Depletion der Speicher mit Thapsigargin in nominell Ca^{2+} -freier Lösung und das erneute Hinzufügen von Ca^{2+} ist ein vielfach verwendetes Protokoll zum Auslösen des SOCE. Es besitzt eine hohe Spezifität für den SOCE (14). Die Hinzugabe von BTP2 3 min nach Start des SOCE führte zu einem verstärkten Abfall der Ca^{2+} -Konzentration. BTP2 blockt in der hier verwendeten Konzentration von 10 μM unspezifisch SOC- und CRAC-Kanäle in Sekunden bis Minuten. Nanomolare Konzentrationen wirken erst nach längerer Inkubation (100, 107). Bei dem hier analysierten Peak handelt es sich also um den SOCE. Da die Substanzen hier jeweils hinzu pipettiert worden sind, wäre es denkbar, dass dies als mechanische Stimulation Effekte auf die PSCs hat. Dies war allerdings nicht der Fall. Das alleinige Hinzupipettieren von 0 mM- Ca^{2+} -Lösung ohne Thapsigargin führte nicht zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, mit Thapsigargin hingegen zu einem deutlichen Anstieg.

Der Ruhewert der Ca^{2+} -Konzentration unterschied sich zwischen ruhenden (P0) und aktivierten (P2) PSCs nicht. Auch überrascht der niedrigere SOCE in aktivierten PSCs. Man würde in den stärker migrierenden und proliferierenden aktivierten PSCs tendenziell eine höhere Ca^{2+} -Konzentration erwarten. Auch zeigten Won et al. verstärkte Ca^{2+} -Signale bei Stimulation mit Agonisten wie ATP in aktivierten PSCs bereits in niedrigerer Konzentration als in ruhenden PSCs (115). Dies könnte sich durch die Methodik erklären. Die PSCs ließen sich nur schlecht mit Fura-2 färben. Die aktivierten PSCs wiesen eine deutlich niedrigere Intensität als die ruhenden PSCs auf. Dies erschwert die Vergleichbarkeit des Quotienten zwischen ruhend und aktiviert stark. Um eine definitive Aussage zu treffen, müsste die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration statt des Quotienten verglichen werden. Dafür ist eine Eichung nötig, bei der mittels eines Ionophors am Ende des Versuchs eine maximale und minimale Ca^{2+} -Konzentration in der

Zelle hergestellt wird. Die PSCs blieben dabei allerdings stark aus, viele PSCs starben, und die Emissionsintensität in den schlecht gefärbten PSCs erreichte bei der Eichung Werte, die sich vom Hintergrund nicht unterschieden. Deswegen musste auf die Quotientenwerte zurückgegriffen werden. Nichtsdestotrotz erscheint der Vergleich von WT- und TRPC1-KO-PSCs innerhalb einer Gruppe robust. Auch in den aktivierten PSCs war die Messung trotz niedrigen Intensitätswerten stabil, da eine große Fläche ausgewertet wurde.

5.4.1 Erhöhtes Speicher- Ca^{2+} in TRPC1-KO-PSCs

Bei der Entleerung der intrazellulären Speicher mit Thapsigargin entleerte sich überraschenderweise in den TRPC1-KO-PSCs mehr Ca^{2+} aus den Speichern als in den WT-PSCs. Dies ist nicht intuitiv, bei Verlust eines Calciumkanals würde man eine niedrigere Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle erwarten. Verschiedene Erklärungen kommen in Frage.

Die Speicher könnten kompensatorisch mehr gefüllt sein. In PSCs ist insbesondere der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wichtig (38). Ist dieser Weg blockiert, müssten die Freisetzung aus intrazellulären Speichern und dafür die Füllung der Speicher zunehmen.

Am wahrscheinlichsten ist jedoch eine Veränderung der Kanal-Stöchiometrie. TRPC1-Kanäle liegen in der Plasmamembran in Heteromeren mit TRPC4-Kanälen oder TRPC5-Kanälen vor. Diese Heteromere haben eine niedrigere Ca^{2+} -Permeabilität als die homomeren TRPC4- oder TRPC5-Kanäle. Vergleichbares trifft auf Heteromere mit TRPC3/6/7 zu (101). Bei Verlust von TRPC1 würden sich statt heteromeren TRPC1/4-, TRPC1/3- oder TRPC1/6-Kanälen homomere TRPC3-, TRPC4- und TRPC6-Kanäle in den PSCs bilden können, über die vermehrt Ca^{2+} einströmt. Storch et al. zeigten allerdings in verschiedenen Zellen eine erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei gleichbleibendem gespeichertem Ca^{2+} (101). Denkbar ist, dass PSCs hier jedoch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration eng kontrollieren und die erhöhte Ca^{2+} -Menge in die Speicher pumpen. Auch in neutrophilen TRPC1-KO-Granulozyten ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei Stimulation erhöht. Die Autoren führten dies entweder auf die oben beschriebene Beeinflussung der Ca^{2+} -Permeabilität oder auf die in den neutrophilen Granulozyten vorliegende veränderte Expression anderer Kanäle zurück (60). In TRPC1-KO-PSCs ändert sich die Expression anderer TRPC-Kanäle hingegen nicht (77), sodass grade die Beeinflussung der Ca^{2+} -Permeabilität und das Vorliegen von TRPC1-Kanälen in Heteromeren wahrscheinlich werden. Allerdings ist der Einfluss anderer Kanäle denkbar, z. B. ist die Expression von TRPV4 und TRPM7 in TRPC1-KO-PSCs erhöht (36).

Das erhöhte Speicher- Ca^{2+} könnte in einer alternativen Erklärung durch das Fehlen von TRPC1-Kanälen im ER, und nicht in der Plasmamembran, verursacht werden. Die Funktion der TRPC1-Kanäle im ER ist schlecht charakterisiert. In *Human Embryonic Kidney*-Zellen und Muskelzellen bilden TRPC1-Kanäle bei Überexpression funktionelle Homomere im ER (2, 12). Ob sich dies auf den endogenen TRPC1-Kanal übertragen lässt, ist unklar, bisherige Arbeiten verwendeten nur unspezifische Antikörper als Nachweisversuch (12, 108). Alfonso et al. identifizierten die TRPC1-Kanäle im ER als Agonist-aktiviert. Fehlt solch ein Kanal, der normalerweise zu Ca^{2+} -Ausstrom führt, könnte mehr Ca^{2+} im ER gespeichert sein (2). Hingegen sei der TRPC1-Kanal laut Berbey et al. ein *Leak Channel*, aus dem kontinuierlich Ca^{2+} aus dem ER entströmt (12). Bei der Blockade der SERCA würde man bei Fehlen eines *Leak Channel* einen niedrigeren und vor allem langsameren Ausstrom erwarten, was der vorliegenden Arbeit widerspricht.

Um die Menge an Ca^{2+} in den Speichern genauer und unabhängig von dem Vorhandensein von *Leak Channels* zu überprüfen, könnten die Speicher mit einem Ionophor wie Ionomycin in Ca^{2+} -freier extrazellulärer Lösung entleert werden. Inwieweit die erhöhte Ca^{2+} -Menge in den Speichern der TRPC1-KO-PSCs einen Effekt auf die Physiologie der PSCs hat, ist unklar.

5.4.2 Keine direkte Rolle von TRPC1 im SOCE in PSCs

Der SOCE ist in PSCs eine essentielle Form des Ca^{2+} -Einstroms (44). Er könnte an der Aktivierung der PSCs durch eine Reihe an Stimuli und speziell an der Aktivierung durch Druck beteiligt sein.

Der SOCE in TRPC1-KO- und WT-PSCs war gleich hoch. Der TRPC1-Kanal spielt also in diesem Experiment keine direkte Rolle im SOCE in PSCs. Übereinstimmend ist der SOCE in Thrombozyten (111) und arteriellen glatten Muskelzellen (25) der TRPC1-KO-Mäuse unverändert. In Speicheldrüsenzellen (62) und Adipozyten (97) ist der SOCE hingegen deutlich eingeschränkt. Dies spricht für eine zelltypspezifische Funktion des TRPC1-Kanals im SOCE. Auch Knockdown-Experimente zeigen eine zelltypspezifische Rolle: Der Knockdown von TRPC1 reduzierte in vergleichbaren Versuchsaufbauten den SOCE in *Human Embryonic Kidney*-Zellen, aber nicht in Jurkat-Zellen (humanen T-Lymphozyten) (52).

Der KO eines Gens ist ein sehr gutes Modell zur Aufklärung seiner Funktion, doch bestehen Limitationen. Die Rolle von TRPC1 hängt von den genauen Versuchsbedingungen ab. TRPC1 hatte wie beschrieben im KO-Modell keinen Einfluss auf den SOCE in vaskulären Muskelzellen, in Studien mit anderer Methodik führte der Verlust von TRPC1 in vaskulären Muskelzellen jedoch zu verringertem SOCE (10, 98).

Die gesteigerte Expression anderer am SOCE beteiligter Komponenten könnte in den TRPC1-KO-PSCs die Funktion des TRPC1-Kanals kompensieren. Denkbar wäre dies für TRP-Kanäle oder für STIM/Orai. Beispielsweise wurde für TRPC4-Kanäle eine Funktion im SOCE gezeigt, die nicht generell bestätigt werden konnte (95, 106). Alternativ könnten STIM1 und Orai1 vermehrt exprimiert sein. Ob dies eine Beteiligung von TRPC1 im SOCE ausgleichen könnte, ist jedoch unklar. In *Human Embryonic Kidney*-Zellen, in denen TRPC1-Kanäle am SOCE beteiligt sind, reicht exogene Orai1-Überexpression nicht aus, um das Fehlen von TRPC1 zu kompensieren. Einschränkend wurde in dieser Studie jedoch keine Überexpression von Orai1 zusammen mit STIM1 versucht (52). Um die fehlende Funktion von TRPC1-Kanälen als SOC-Kanäle in PSCs zu bestätigen, könnte die Expression weiterer Kanäle gemessen, der TRPC1-Kanal pharmakologisch blockiert und die Experimente mit Knockdown von TRPC1 wiederholt werden.

Obwohl sich der Peak in den TRPC1-KO-PSCs nicht änderte, war die SOCE-AUC in den TRPC1-KO-PSCs gering erhöht. Dies war überraschend, die meisten Studien zeigten entweder einen fehlenden Einfluss von TRPC1 oder einen reduzierten SOCE bei Fehlen des TRPC1-Kanals (89). Der erhöhte Wert passt jedoch zum erhöhten gespeicherten Ca^{2+} in dieser Arbeit. Zwei Studien zeigten ebenfalls nach Agoniststimulation eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (60, 70). In neutrophilen Granulozyten wurde nicht untersucht, ob dies auf veränderten SOCE zurückzuführen ist, doch in TRPC1-KO-Mastzellen ist der SOCE verstärkt. Der initiale Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist zwischen WT- und TRPC1-KO-Mastzellen vergleichbar. In den TRPC1-KO-Mastzellen steigt die Ca^{2+} -Konzentration dann länger an, was zu der hier vorliegenden erhöhten AUC passt. Von den Autoren wurde dies auf eine reduzierte Feedback-Inhibition des SOCE zurückgeführt.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass in PSCs STIM und Orai für den SOCE verantwortlich sind und der TRPC1-Kanal keine direkte Rolle spielt. Dies gilt sowohl für die ruhenden als auch für die aktivierten PSCs, die Rolle des TRPC1-Kanals im SOCE im Laufe der Aktivierung hat sich nicht verändert. Eine Veränderung des SOCE scheint nicht der Grund der verringerten Aktivierung durch Druck in TRPC1-KO-PSCs zu sein. Hier könnte der TRPC1-Kanal entweder als MSC oder als rezeptorgesteuerter Kanal funktionieren.

5.5 Mechanismus der Druckaktivierung und Rolle des TRPC1

Wie Druck zur Aktivierung der PSCs führt und wie TRPC1 an der Mechanotransduktion beteiligt ist, ist unbekannt. Hier könnten zwei Mechanismen eine Rolle spielen:

- 1) Eine Funktion des TRPC1-Kanals als Mechanosensor oder direkt *downstream* des eigentlichen Mechanosensors.
- 2) Eine Funktion des TRPC1-Kanals in der Sekretion und Wahrnehmung von Zytokinen.

5.5.1 TRPC1 als Druck-Mechanosensor

Aktuell ist wenig erforscht, wie gering erhöhter Druck von Zellen wahrgenommen werden kann. Es ist völlig unklar, was der initiale Mechanosensor ist. Dabei könnten bekannte Mechanosensoren wie das Zytoskelett oder insbesondere Membranproteine wie MSCs und der TRPC1 initiale Mechanosensoren sein.

Für Drücke von mehreren MPa ist eine Beeinflussung von Gleichgewichtsreaktionen im Rahmen klassischer chemischer Konzepte wie dem Prinzip des kleinsten Zwanges denkbar. Es wurde beispielsweise eine Beeinflussung der Polymerisation und Depolymerisation des Zytoskeletts als initialer Effekt des Drucks vermutet (73). Es wurde jedoch postuliert, dass dies für kleinere Drücke keine ausreichende Erklärung sei (63).

Stark im Fokus als initialer Mechanosensor des Druckes liegen deshalb MSCs. In Endothelzellen führt Druck von 100 mmHg in Minuten zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die unspezifische Blockade von MSCs mittels GsMTx-4 führt zu geringerem Ca^{2+} -Anstieg (88). Druck führt weiterhin zu einer verringerten Expression von MSCs in PSCs, vom Autor wurde dies mit einem negativen Feedbackmechanismus erklärt: Vermehrt durch Druck aktivierte MSCs würden weniger exprimiert. Dies galt neben einer Suppression des hier untersuchten TRPC1-Kanals auch für Kanäle wie $\text{K}_{2P}2.1$ oder Piezo1, die sicher mechanosensitiv sind und direkt durch Membranspannung gesteuert werden können (36). Zellen bestehen jedoch größtenteils aus Flüssigkeit und sind quasi inkompressibel (114). Leicht erhöhter, von allen Seiten einwirkender Druck sollte somit nicht zu Dehnung und nicht zu veränderter Membranspannung führen, die normalerweise MSCs steuern würden. Allerdings führt erhöhter hydrostatischer Druck trotzdem zu Veränderungen in der Plasmamembran: Die Plasmamembran geht bereits bei einem Druck von 310 mmHg von einem eher fluiden flüssig-kristallinen Zustand zu einem gelartigeren Zustand über (79). Über diese Veränderungen könnte sich die Membranspannung verändern und MSCs geöffnet werden. Ein weiterer Hinweis darauf, dass Druck die Plasmamembran beeinflussen kann, ist die Wirkung des Blockers GsMTx-4. Dieser wirkt durch Einbau in die Plasmamembran und durch eine Verringerung

erhöhter Membranspannung. Da er in Endothelzellen den Ca^{2+} -Anstieg auf Druck verringern kann, scheint Druck ebenfalls zu erhöhter Membranspannung zu führen. MSCs könnten jedoch in der Wahrnehmung von Druck auch *downstream* des eigentlichen Mechanosensors sein. Druck von 15 mmHg führte in Astrozyten zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Minuten. Die Autoren konnten allerdings in Ca^{2+} -freier extrazellulärer Lösung zeigen, dass dieser Ca^{2+} -Anstieg auf Freisetzung aus den intrazellulären Speichern basiert. Dies steht somit im Gegensatz zu den Erkenntnissen in den Endothelzellen (65). Die Transduktion von Druck unterscheidet sich somit zwischen verschiedenen Zellarten. Dies passt auch zu der unterschiedlichen Expression von MSCs wie Piezo1 oder TRP-Kanälen in verschiedenen Geweben (21, 55).

In dieser Arbeit führte das Fehlen von TRPC1 zu einer verminderten Reaktion auf Druck. In aktivierten PSCs kommt es nach Druckbehandlung zu erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom, in TRPC1-KO-PSCs ist dies verringert (36). Der Ca^{2+} -Einstrom wurde bisher allerdings nicht während der Druckbehandlung gemessen, sodass unklar bleibt, an welcher Stelle der Transduktion der TRPC1-Kanal beteiligt ist. Grundvoraussetzung für die Rolle als initialer Sensor wäre, dass TRPC1-Kanäle durch Membranspannung gesteuert werden. Wie in 1.5.1 beschrieben, ist dies umstritten. Es ist aber vorstellbar, dass Druck zu einer anderen Art der Aktivierung als typische mechanische Reize führt.

Wenn TRPC1-Kanäle nicht die initialen Mechanosensoren bzw. generell keine MSCs sind, könnten sie doch an der Mechanotransduktion beteiligt sein und direkt *downstream* des eigentlichen Mechanosensors liegen. So sind bestimmte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren membranständige Mechanosensoren (102). Diese könnten durch die veränderte Membranspannung unter Druck aktiviert werden und G_q -Proteine aktivieren, die wiederum die TRPC-Kanäle aktivieren können (s. Abbildung 2). Die Aktivierung von G-Proteinen könnte die oben beschriebene Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} in Astrozyten erklären. Auch dass GsMTx-4 in Endothelzellen den Ca^{2+} -Anstieg auf Druck reduziert, muss der initialen Aktivierung G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren nicht widersprechen. Möglicherweise könnte GsMTx-4 neben MSCs weitere Mechanosensoren der Membran wie G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren blockieren. Diese könnten ebenfalls über Membranspannung gesteuert werden und durch GsMTx-4 modifiziert werden (105).

Um die Funktion des TRPC1-Kanals genauer zu charakterisieren, könnte der Ca^{2+} -Einstrom oder die Ca^{2+} -Konzentration in den PSCs während der Druckapplikation gemessen werden und TRPC1-KO- und TRPC1-WT-PSCs verglichen werden. Um den Ursprung des erhöhten Ca^{2+} zu spezifizieren, könnten diese Versuche sowohl in Ca^{2+} -freier extrazellulärer Lösung als auch bei Zugabe eines IP_3 -Rezeptor-Blockers durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz ließe sich auch damit der initiale Sensor nicht

sicher feststellen, die Kanäle könnten noch *downstream* des eigentlichen Sensors geöffnet werden. Sicherer wäre eine Patch-Clamp-Messung. Würde innerhalb von 5 ms Ca^{2+} unter Druck in der whole cell-Konfiguration einströmen, spräche dies für MSCs als primären Sensor (102). Die genaue Umsetzung würde sicherstellen müssen, dass in der Pipette und in der extrazellulären Lösung zeitgleich der Druck erhöht wird, um Dehnung zu vermeiden.

5.5.2 TRPC1 in der autokrinen Stimulation

Neben der direkten Aktivierung durch Druck könnte der TRPC1-Kanal für die druckvermittelte autokrine Aktivierung der PSCs wichtig sein. Die autokrine Stimulation spielt eine große Rolle in der Aktivierung der PSCs und Ionenkanäle, wie der TRPC6-Kanal, sind daran beteiligt (78). Die Migrationsexperimente (s. 5.2.2) und die erhöhte TGF- β -Sekretion unter Druck weisen darauf hin, dass die autokrine Stimulation auch an der Aktivierung durch Druck beteiligt ist (112). Der TRPC1-Kanal könnte entweder an der Transduktion der Signalwirkung der Zytokine oder an der Ausschüttung der Zytokine beteiligt sein.

Da der TRPC1-Kanal in PSCs keine direkte Rolle im SOCE hat, ist die Beteiligung von TRPC1 an der Transduktion in PSCs vom SOCE unabhängig. Ein Beispiel für eine SOCE-unabhängige Funktion von TRPC1-Kanälen in der Transduktion von Zytokinen liefert PDGF: In Glioblastomzellen führt PDGF zu einem SOCE-unabhängigen Ca^{2+} -Einstrom. Dieser SOCE-unabhängige Ca^{2+} -Einstrom wird über das Lipid Sphingosin-1-Phosphat und über TRPC1-Kanäle vermittelt. Der Knockdown von TRPC1 vermindert zusätzlich die Chemotaxis zu PDGF (57). Auch an der Reaktion auf den autokrin wirkenden epidermalen Wachstumsfaktor ist TRPC1 beteiligt (109).

Neben der Transduktion könnte der TRPC1-Kanal an der Ausschüttung oder Produktion der Zytokine beteiligt sein. TRPC1-*knockdown*-Atemwegsepithelzellen schütten bei mechanischer Belastung beispielsweise weniger TGF- β aus (59). In TRPC1-KO-Mäusen ist während Infektionen der Spiegel verschiedener Zytokine wie IL-1 oder IL-6 im Blut reduziert (121). In TRPC1-KO-Adipozyten ist die Sekretion von Zytokinen wie Adiponektin mittels Exozytose verringert (97).

Zusammenfassend könnte TRPC1 sowohl in der Mechanotransduktion als auch als Mechanosensor an der autokrinen Stimulation beteiligt sein. Die genaue Beteiligung bedarf weiterer Forschung.

5.6 Pathophysiologischer Kontext und Ausblick

Die Versuche wurden mit primär-kultivierten murinen PSCs durchgeführt. Wie und mit welchen Limitationen lässt sich diese Situation auf die Situation im menschlichen Pankreas und menschlichen PDAC übertragen? Lassen sich diese Erkenntnisse für die Therapie des PDAC nutzen?

Murine PSCs wurden gewählt, da die Genfunktion mittels KO untersucht werden sollte. Diese Möglichkeit bietet sich nur in einem Tiermodell. Außerdem sind humane ruhende PSCs schwer zu erhalten. Es bestehen Unterschiede zwischen humanen und murinen PSCs, z. B. wird der in den murinen PSCs vorhandene TRPC2-Kanal (78) im Menschen generell nicht exprimiert (116). TRPC2-Kanäle interagieren jedoch z. B. im Rahmen des ROCE nicht mit TRPC1-Kanälen (101). Da eine zelltypspezifische Funktion von TRPC1 postuliert wird, sollten die Ergebnisse in menschlichen PSCs bestätigt werden. Nichtsdestotrotz sind murine primäre PSCs ein gutes Modell für die humanen PSCs (32).

Der experimentell erzeugte Druck wirkte auf die PSCs als hydrostatischer, homogener Druck ein. Der Druck in Tumoren *in vivo* wirkt ebenfalls homogen und fällt erst an den Rändern des Tumors ab (15). Nur die genaue Ursache des erhöhten Drucks im PDAC ist umstritten (s. 1.4.2). Der Einfluss des Druckes auf die Aktivierung der PSCs ist *in vivo* noch nicht explizit untersucht. Untersucht wurde der Einfluss einer Therapie mit dem druckverringernenden Enzym Hyaluronidase und Gemcitabin gegenüber einer Gemcitabin-Monotherapie. Die Therapie mit einer Hyaluronidase verringert in Mäusen die Anzahl an PSCs im Tumor und nicht nur das Tumorstadium. Auch wenn dies hauptsächlich auf eine verbesserte Penetration des Gemcitabins zurückzuführen sein wird, könnte eine verringerte Aktivierung von PSCs auf Grund des durch die Hyaluronidase verringerten Drucks ebenfalls eine Rolle spielen (87).

Im Unterschied zu den Experimenten in der Zellkulturschale wirken *in vivo* eine Vielzahl von Stimuli auf die PSCs ein. Als aktivierende Faktoren wirkten in dieser Arbeit neben dem Druck unterschiedliche Matrices und die autokrine Stimulation sowie besonders der steife Untergrund. Beim morphologischen Übergang von ruhenden zu aktivierten PSCs spielten der Druck und der TRPC1-Kanal gegenüber der Aktivierung durch diese Faktoren in der Zellkultur eine untergeordnete Rolle. Der Druck tritt möglicherweise auch *in vivo* gegenüber anderen Faktoren zurück. *In vivo* wirken Zytokine aus PDAC-Zellen, eine veränderte ECM und besonders die Hypoxie und Azidose im Tumor als aktivierende Faktoren. Außerdem ist die Steifigkeit nicht nur in der Glasschale, sondern auch im PDAC und in den Vorgängerläsionen erhöht, wenn auch um Größenordnungen weniger (94). Jedoch könnten für sich allein nur gering aktivierend wirkende Stimuli wie Druck die

aktivierende Wirkung anderer Stimuli potenzieren und den Übergang vom ruhenden zum aktivierten Zustand anstoßen. In dieser Arbeit zeigte sich zudem ein Einfluss von Druck auf die Migrationsgeschwindigkeit, also auf die Funktion der PSCs. Die Charakterisierung des Einflusses des Druckes im Zusammenspiel mit anderen Stimuli wäre wünschenswert.

Der TRPC1-Kanal könnte auch an der druckunabhängigen Aktivierung der PSCs beteiligt sein. In dieser Arbeit zeigen sich Hinweise auf eine Beteiligung des TRPC1-Kanals an der autokrinen Stimulation, er könnte so an der Transduktion der Wirkung der meisten aktivierenden Stimuli beteiligt sein. Bei der mechanischen Aktivierung der PSCs durch die erhöhte Steifigkeit im Tumor könnte der TRPC1-Kanal als MSC ebenfalls beteiligt sein. Die Untersuchung des Einflusses von TRPC1 auf weitere Aktivatoren, insbesondere mechanobiologische wie erhöhte Steifigkeit, unter Verwendung von TRPC1-KO-PSCs könnte weitere Perspektiven eröffnen.

Neben der Rolle von Ionenkanälen in den PSCs konnte gezeigt werden, dass TRP-Kanäle eine Funktion in Tumorzellen haben und an der Metastasierung beteiligt sind (37). TRPC1-Kanäle sind in PDAC-Zellen für Ca^{2+} -Einstrom und TGF- β -vermittelte Migration essentiell (27). Eine auf den TRPC1-Kanal zielende Therapie könnte möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Metastasierung der Tumorzellen nehmen.

Der TRPC1-Kanal könnte als Teil der druckabhängigen und druckunabhängigen Aktivierung ein mögliches pharmakologisches Ziel sein. Gerade die Modulation anstatt der kompletten Ablation der PSC-Funktion könnte positive Auswirkungen auf die Prognose des PDAC haben. Die Rolle der PSCs im PDAC ist „zeit- und kontextabhängig“ und eine komplette Ablation der PSCs im Mausmodell verschlechterte die Prognose (82, 83, 93). Zur Blockade des TRPC1-Kanals liegen verschiedene unspezifische Inhibitoren vor, einen nur für den TRPC1-Kanal spezifischen Inhibitor gibt es bisher nicht. Kürzlich konnte jedoch ein spezifischer Inhibitor (pico145) für TRPC1/4- bzw. TRPC1/5-Heteromere synthetisiert werden, der gute pharmakokinetische Eigenschaften für einen Einsatz *in vivo* aufweist (71, 95). Die Blockade von Heteromeren ergibt Sinn, da TRPC1-Kanäle hauptsächlich in Heteromeren vorliegen (s. 1.5) und sich in den Ca^{2+} -Messungen dieser Arbeit ebenfalls Hinweise darauf ergaben (s. 5.4.1). Die Wirkung des Inhibitors auf die druckabhängige Aktivierung der PSCs sollte untersucht werden und könnte weitere Hinweise auf den Mechanismus geben.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit eine wichtige Rolle von TRPC1 in der druckabhängigen Aktivierung ruhender PSCs. Die fehlende Rolle von TRPC1 im SOCE in PSCs erklärt die Funktion des Kanals weiter. Eine klinische Anwendung liegt jedoch aktuell noch in der Ferne.

6 Materialien und Geräte

6.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller, Firmensitz Deutschland
12-Well-Platte (<i>Falcon Tissue Culture Dish tissue culture treated</i>)	Corning, Wiesbaden
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Anti-Maus-Antikörper-Alexa-488 (<i>Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 488 Invitrogen</i> Katalognummer A-11029)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Anti- α -SMA-Antikörper (<i>Sigma monoclonal antibody clone 1A4</i> Katalognummer A2547)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (<i>Albumin Bovine Fraction V</i>)	Serva, Heidelberg
BTP2 (Katalognummer Ab144413)	Abcam, Cambridge (UK)
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Deckglas \varnothing 20 mm (Assistent $\text{\textcircled{R}}$)	Karl Hecht Glaswarenfabrik, Sondheim vor der Rhön
DMEM/Ham's F12 1:1 mit Glutamin und HCO_3^- (Katalognummer D8062)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat 1 %	Biochrom, Berlin
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Einbettmedium <i>Dako Fluorescence Mounting Medium</i>	Dako, Hamburg
Fibronektin (Katalognummer 11051407001)	Roche, Mannheim
FKS (<i>Fetal Bovine Serum Gold</i> Katalognummer A15-151)	GE Healthcare Life Sciences, München

Fura-2-AM (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Gey's Balanced Salt Solution</i> mit NaHCO ₃	PAN Biotech, Aidenbach
Glasbodenschale 35/10 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glucose (D-Glucose-Monohydrat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin (Rotipuran)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin <i>analytical grade</i>	Serva, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ibidi μ -Slide I ^{0.6} Luer ibiTreat	Ibidi, Martinsried
Ibidi Culture-Insert 2 Well	Ibidi, Martinsried
Isofluran (Forene 100 %)	Abbott, Wiesbaden
KCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kollagen I (Katalognummer L7213)	Biochrom, Berlin
Kollagen III (Katalognummer 354244)	BD Biosciences, Heidelberg
Kollagen IV (Katalognummer 354233)	BD Biosciences, Heidelberg
Kollagenase P (Katalognummer 11213865001)	Roche Diagnostics, Mannheim
Laminin (Katalognummer L2020)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Nile Red technical grade</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS unsteril	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 μ g/ml	Biochrom, Berlin
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 10x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI-1640 Medium mit 20 mM HEPES und L-Glutamin, ohne NaHCO ₃ (Katalognummer R7388)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Thapsigargin (Katalognummer ab120286)	Abcam, Cambridge (UK)

Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin 2,5 % in PBS (10x)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
<i>Ultra Pure Water</i>	Biochrom, Berlin
Zellkulturschale Ø 35 mm, Zellkulturschale Ø 100 mm (<i>Falcon Tissue Culture Dish tissue culture treated</i>)	Corning, Wiesbaden

6.2 Geräte

Material	Hersteller, Firmensitz Deutschland
40er-Öl-Objektiv EC-Plan NEO FLUAR (Fluoreszenzmikroskopie)	Carl Zeiss, Oberkochen
40er-Öl-Objektiv Fluar (Ca ²⁺ -Messungen)	Carl Zeiss, Oberkochen
Blutgasanalysegerät Abl800 Flex	Radiometer, Krefeld
Filter D510/40m (Ca ²⁺ -Messungen)	Chroma, Bellows Falls (USA)
Filter Set 10 BP 450-490 (Filter Alexa 488 Exzitation)	Carl Zeiss, Oberkochen
Filter Set 10 BP 515-565 (Filter Alexa 488 Emission)	Carl Zeiss, Oberkochen
Filter Set 10 FT 510 (Strahlteiler Alexa 488)	Carl Zeiss, Oberkochen
Filter Set 15 BP 546/12 (Filter Nile Red Exzitation)	Carl Zeiss, Oberkochen
Filter Set 15 FT 580 (Strahlteiler Nile Red)	Carl Zeiss, Oberkochen
Filter Set 15 LP 590 (Filter Nile Red Emission)	Carl Zeiss, Oberkochen
Filter Set 49 BP 445/50 (Filter DAPI Emission)	Carl Zeiss, Oberkochen
Filter Set 49 FT 395 (Strahlteiler DAPI)	Carl Zeiss, Oberkochen
Filter Set 49 G365 (Filter DAPI Exzitation)	Carl Zeiss, Oberkochen
Inkubator CB 210 (für Experimente)	Binder, Tuttlingen
Inkubator Hera Cell 150 (für Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Kamera CCD 94C (Migrationsexperimente)	Sony, Berlin
Kamera CCD XC-ST70CE (Migrationsexperimente)	Hamamatsu Photonics, Herrsching
Kamera RT-SE-Spot-Camera Visitron Systems (Fluoreszenzmikroskopie)	Visitron Systems, Puchheim
Kamera SCMOS pco.edge (Ca ²⁺ -Messungen)	PCO, Kelheim
Mikroskop Axiovert 200 (Ca ²⁺ -Messungen)	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 200 (Fluoreszenzmikroskopie)	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 25 (Migrationsexperimente)	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 40C (Migrationsexperimente)	Carl Zeiss, Oberkochen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Polychromator <i>Visi Chrome High Speed</i> <i>Polychromator System</i>	Visitron Systems, Puchheim
Schüttler Unimax1000/Inkubator1000	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterilbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Strahlteiler LP400 (Ca ²⁺ -Messungen)	Chroma, Bellows Falls (USA)
Zählkammer <i>Neubauer improved Assistent</i> ®	Karl Hecht Glaswarenfabrik, Sondheim vor der Rhön
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau

6.3 Software

Material	Hersteller, Firmensitz Deutschland
Amira	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Excel 2010	Microsoft, München
<i>HiPic Image Control Program</i> (Version 7.1.0)	Hamamatsu Photonics, Herrsching
ImageJ (Version 1.48v)	National Institute of Health (USA)

maxchelator CA-EGTA-Calculator (Version 1.3)	http://maxchelator.stanford.edu/index.html , abgerufen am 02.10.2017
MetaVue (Version 6.3r6)	Visitron Systems, Puchheim
OriginPro 8 (Version 8.0724)	OriginLab, Northampton (USA)
VisiView (Version 2.1.4)	Visitron Systems, Puchheim
<i>Wasabi Image Control Program</i>	Hamamatsu Photonics, Herrsching

7 Literaturverzeichnis

- (1) Agar A, Li S, Agarwal N, Coroneo MT, Hill MA (2006) Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. *Brain Res* 1086: 191-200. doi:10.1016/j.brainres.2006.02.061.
- (2) Alfonso S, Benito O, Alicia S, Angelica Z, Patricia G, Diana K, Vaca L (2008) Regulation of the cellular localization and function of human transient receptor potential channel 1 by other members of the TRPC family. *Cell Calcium* 43: 375-387. doi:10.1016/j.ceca.2007.07.004.
- (3) Ambudkar IS, de Souza LB, Ong HL (2017) TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium* 63: 33-39. doi:10.1016/j.ceca.2016.12.009.
- (4) Ansari D, Carvajo M, Bauden M, Andersson R (2017) Pancreatic cancer stroma: Controversies and current insights. *Scand J Gastroenterol* 52: 641-646. doi:10.1080/00365521.2017.1293726.
- (5) Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS (1998) Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: Identification, isolation, and culture. *Gut* 43: 128-133. doi:10.1136/gut.43.1.128.
- (6) Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS (2004) Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: Role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29: 179-187. doi:10.1097/00006676-200410000-00002.
- (7) Apte MV, Pirola RC, Wilson JS (2012) Pancreatic stellate cells: A starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol* 3: 344. doi:10.3389/fphys.2012.00344.
- (8) Apte MV, Yang L, Phillips PA, Xu Z, Kaplan W, Cowley M, Pirola RC, Wilson JS (2013) Extracellular matrix composition significantly influences pancreatic stellate cell gene expression pattern: Role of transgelin in PSC function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G408-G417. doi:10.1152/ajpgi.00016.2013.
- (9) Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M (2007) Externally applied pressure activates pancreatic stellate cells through the generation of intracellular reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G972-G978. doi:10.1152/ajpgi.00018.2007.
- (10) Avila-Medina J, Mayoral-Gonzalez I, Dominguez-Rodriguez A, Gallardo-Castillo I, Ribas J, Ordonez A, Rosado JA, Smani T (2018) The complex role of store operated calcium entry pathways and related proteins in the function of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle cells. *Front Physiol* 9: 257. doi:10.3389/fphys.2018.00257.
- (11) Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G (1998) Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115: 421-432. doi:10.1016/S0016-5085(98)70209-4.

- (12) Berbey C, Weiss N, Legrand C, Allard B (2009) Transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) operates as a sarcoplasmic reticulum calcium leak channel in skeletal muscle. *J Biol Chem* 284: 36387-36394. doi:10.1074/jbc.M109.073221.
- (13) Bers DM, Patton CW, Nuccitelli R (2010) A practical guide to the preparation of Ca^{2+} buffers. In: Whitaker M (Hrsg.) *Methods in cell biology: Calcium in living cells*. 1. Aufl., Elsevier Inc., Burlington, S. 1-26. doi:10.1016/B978-0-12-374841-6.00001-3.
- (14) Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney Jr. JW (2008) Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods* 46: 204-212. doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.009.
- (15) Boucher Y, Baxter LT, Jain RK (1990) Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: Implications for therapy. *Cancer Res* 50: 4478-4484.
- (16) Brough GH, Wu S, Cioffi D, Moore TM, Li M, Dean N, Stevens T (2001) Contribution of endogenously expressed TRP1 to a Ca^{2+} -selective, store-operated Ca^{2+} entry pathway. *FASEB J* 15: 1727-1738. doi:10.1096/fj.01-0108com.
- (17) Carrato A, Falcone A, Ducreux M, Valle JW, Parnaby A, Djazouli K, Alnwick-Allu K, Hutchings A, Palaska C, Parthenaki I (2015) A systematic review of the burden of pancreatic cancer in Europe: Real-world impact on survival, quality of life and costs. *J Gastrointest Cancer* 46: 201-211. doi:10.1007/s12029-015-9724-1.
- (18) Catenacci DV, Junttila MR, Karrison T, et al. (2015) Randomized phase Ib/II study of gemcitabine plus placebo or vismodegib, a hedgehog pathway inhibitor, in patients with metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 33: 4284-4292. doi:10.1200/JCO.2015.62.8719.
- (19) Chauhan VP, Boucher Y, Ferrone CR, Roberge S, Martin JD, Stylianopoulos T, Bardeesy N, DePinho RA, Padera TP, Munn LL, Jain RK (2014) Compression of pancreatic tumor blood vessels by hyaluronan is caused by solid stress and not interstitial fluid pressure. *Cancer Cell* 26: 14-15. doi:10.1016/j.ccr.2014.06.003.
- (20) Cheng KT, Liu X, Ong HL, Swaim W, Ambudkar IS (2011) Local Ca^{2+} entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca^{2+} signals required for specific cell functions. *PLoS Biol* 9: e1001025. doi:10.1371/journal.pbio.1001025.
- (21) Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330: 55-60. doi:10.1126/science.1193270.
- (22) DeHaven WI, Jones BF, Petranka JG, Smyth JT, Tomita T, Bird GS, Putney Jr. JW (2009) TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *J Physiol* 587: 2275-2298. doi:10.1113/jphysiol.2009.170431.
- (23) DelGiorno KE, Carlson MA, Osgood R, Provenzano PP, Brockenbough JS, Thompson CB, Shepard HM, Frost GI, Potter JD, Hingorani SR (2014) Response to Chauhan et Al.: Interstitial pressure and vascular collapse in pancreas cancer-fluids and solids, measurement and meaning. *Cancer Cell* 26: 16-17. doi:10.1016/j.ccr.2014.06.004.

- (24) Desai PN, Zhang X, Wu S, Janoshazi A, Bolimuntha S, Putney JW, Trebak M (2015) Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message. *Sci Signal* 8: ra74. doi:10.1126/scisignal.aaa8323.
- (25) Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T (2007) Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 455: 465-477. doi:10.1007/s00424-007-0314-3.
- (26) Dietrich A, Fahlbusch M, Gudermann T (2014) Classical transient receptor potential 1 (TRPC1): Channel or channel regulator? *Cells* 3: 939-962. doi:10.3390/cells3040939.
- (27) Dong H, Shim KN, Li JM, Estrema C, Ornelas TA, Nguyen F, Liu S, Ramamoorthy SL, Ho S, Carethers JM, Chow JYC (2010) Molecular mechanisms underlying Ca²⁺-mediated motility of human pancreatic duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C1493-C1503. doi:10.1152/ajpcell.00242.2010.
- (28) Du J, Ma X, Shen B, Huang Y, Birnbaumer L, Yao X (2014) TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel. *FASEB J* 28: 4677-4685. doi:10.1096/fj.14-251652.
- (29) Ebbenhøj N, Borly L, Bulow J, Rasmussen SG, Madsen P (1990) Evaluation of pancreatic tissue fluid pressure and pain in chronic pancreatitis. A longitudinal study. *Scand J Gastroenterol* 25: 462-466. doi:10.3109/00365529009095516.
- (30) Eijkelkamp N, Quick K, Wood JN (2013) Transient receptor potential channels and mechanosensation. *Annu Rev Neurosci* 36: 519-546. doi:10.1146/annurev-neuro-062012-170412.
- (31) Elder BD, Athanasiou KA (2009) Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: From chondrocytes to tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 43-53. doi:10.1089/ten.teb.2008.0435.
- (32) Erkan M, Adler G, Apte MV, et al. (2012) StellaTUM: Current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* 61: 172-178. doi:10.1136/gutjnl-2011-301220.
- (33) Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kong B, Esposito I, Friess H, Kleeff J (2012) The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med* 12: 288-303. doi:10.2174/156652412799218921.
- (34) Fabian A, Fortmann T, Dieterich P, Riethmüller C, Schön P, Mally S, Nilius B, Schwab A (2008) TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells. *Pflugers Arch* 457: 475-484. doi:10.1007/s00424-008-0515-4.
- (35) Fabian A, Bertrand J, Lindemann O, Pap T, Schwab A (2012) Transient receptor potential canonical channel 1 impacts on mechanosignaling during cell migration. *Pflugers Arch* 464: 623-630. doi:10.1007/s00424-012-1169-9.
- (36) Fels B, Nielsen N, Schwab A (2016) Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of murine pancreatic stellate cells. *Eur Biophys J* 45: 657-670. doi:10.1007/s00249-016-1176-4.

- (37) Fels B, Bulk E, Petho Z, Schwab A (2018) The Role of TRP Channels in the Metastatic Cascade. *Pharmaceuticals (Basel)* 11: 48. doi:10.3390/ph11020048.
- (38) Ferdek PE, Jakubowska MA, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Petersen OH (2016) Bile acids induce necrosis in pancreatic stellate cells dependent on calcium entry and sodium-driven bile uptake. *J Physiol* 594: 6147-6164. doi:10.1113/JP272774.
- (39) Ferdek PE, Jakubowska MA (2017) Biology of pancreatic stellate cells-more than just pancreatic cancer. *Pflugers Arch* 469: 1039-1050. doi:10.1007/s00424-017-1968-0.
- (40) Garrison SR, Dietrich A, Stucky CL (2012) TRPC1 contributes to light-touch sensation and mechanical responses in low-threshold cutaneous sensory neurons. *J Neurophysiol* 107: 913-922. doi:10.1152/jn.00658.2011.
- (41) Gottlieb P, Folgering J, Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Bowman C, Bichet D, Patel A, Sachs F, Martinac B, Hamill OP, Honore E (2008) Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Arch* 455: 1097-1103. doi:10.1007/s00424-007-0359-3.
- (42) Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985) Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100: 965-973. doi:10.1083/jcb.100.3.965.
- (43) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
- (44) Gryshchenko O, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Petersen OH (2016) Ca^{2+} signals mediated by bradykinin type 2 receptors in normal pancreatic stellate cells can be inhibited by specific Ca^{2+} channel blockade. *J Physiol* 594: 281-293. doi:10.1113/JP271468.
- (45) Gryshchenko O, Gerasimenko JV, Peng S, Gerasimenko OV, Petersen OH (2018) Calcium signalling in the acinar environment of the exocrine pancreas: Physiology and pathophysiology. *J Physiol* 596: 2663-2678. doi:10.1113/JP275395.
- (46) Haanes KA, Schwab A, Novak I (2012) The P2X7 receptor supports both life and death in fibrogenic pancreatic stellate cells. *PLoS One* 7: e51164. doi:10.1371/journal.pone.0051164.
- (47) Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- (48) Hingorani SR, Zheng L, Bullock AJ, Seery TE, Harris WP, Sigal DS, Braithe F, Ritch PS, Zalupski MM, Bahary N, Oberstein PE, Wang-Gillam A, Wu W, Chondros D, Jiang P, Khelifa S, Pu J, Aldrich C, Hendifar AE (2018) HALO 202: randomized phase II study of PEGPH20 plus nab-paclitaxel/gemcitabine versus nab-paclitaxel/gemcitabine in patients with untreated, metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 36: 359-366. doi:10.1200/JCO.2017.74.9564.
- (49) Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I_{crac} and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 8: 1003-1010. doi:10.1038/ncb1454.

- (50) Jansen KA, Donato DM, Balcioglu HE, Schmidt T, Danen EH, Koenderink GH (2015) A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1853: 3043-3052. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.007.
- (51) Kao YC, Jheng JR, Pan HJ, Liao WY, Lee CH, Kuo PL (2017) Elevated hydrostatic pressure enhances the motility and enlarges the size of the lung cancer cells through aquaporin upregulation mediated by caveolin-1 and ERK1/2 signaling. *Oncogene* 36: 863-874. doi:10.1038/onc.2016.255.
- (52) Kim MS, Zeng W, Yuan JP, Shin DM, Worley PF, Muallem S (2009) Native store-operated Ca^{2+} influx requires the channel function of Orai1 and TRPC1. *J Biol Chem* 284: 9733-9741. doi:10.1074/jbc.M808097200.
- (53) Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP (2016) Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16022. doi:10.1038/nrdp.2016.22.
- (54) Lachowski D, Cortes E, Pink D, Chronopoulos A, Karim SA, Morton JP, Del Rio Hernandez AE (2017) Substrate rigidity controls activation and durotaxis in pancreatic stellate cells. *Sci Rep* 7: 2506. doi:10.1038/s41598-017-02689-x.
- (55) Lee K, Lee BM, Park CK, Kim YH, Chung G (2019) Ion channels involved in tooth pain. *Int J Mol Sci* 20: 2266. doi:10.3390/ijms20092266.
- (56) Lei Y, Rajabi S, Pedrigi RM, Overby DR, Read AT, Ethier CR (2011) In vitro models for glaucoma research: Effects of hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 6329-6339. doi:10.1167/iovs.11-7836.
- (57) Lepannetier S, Zanou N, Yerna X, Emeriau N, Dufour I, Masquelier J, Muccioli G, Tajeddine N, Gailly P (2016) Sphingosine-1-phosphate-activated TRPC1 channel controls chemotaxis of glioblastoma cells. *Cell Calcium* 60: 373-383. doi:10.1016/j.ceca.2016.09.002.
- (58) Li JT, Liao ZX, Ping J, Xu D, Wang H (2008) Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol* 43: 419-428. doi:10.1007/s00535-008-2180-y.
- (59) Li N, He Y, Yang G, Yu Q, Li M (2019) Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of airway remodeling. *Respir Res* 20: 91. doi:10.1186/s12931-019-1050-x.
- (60) Lindemann O, Strodthoff C, Horstmann M, Nielsen N, Jung F, Schimmelpfennig S, Heitzmann M, Schwab A (2015) TRPC1 regulates fMLP-stimulated migration and chemotaxis of neutrophil granulocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1853: 2122-2130. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.12.037.
- (61) Liu C, Montell C (2015) Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 22-25. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.067.
- (62) Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC, Pani B, Dietrich A, Paria BC, Swaim WD, Beech D, Yildirim E, Singh BB, Birnbaumer L, Ambudkar IS (2007) Attenuation of store-operated Ca^{2+} current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17542-17547. doi:10.1073/pnas.0701254104.

- (63) Macdonald AG, Fraser PJ (1999) The transduction of very small hydrostatic pressures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 122: 13-36. doi:10.1016/S1095-6433(98)10173-3.
- (64) Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E (2019) European cancer mortality predictions for the year 2019 with focus on breast cancer. *Ann Oncol* 30: 781-787. doi:10.1093/annonc/mdz051.
- (65) Mandal A, Shahidullah M, Delamere NA (2010) Hydrostatic pressure-induced release of stored calcium in cultured rat optic nerve head astrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 3129-3138. doi:10.1167/iops.09-4614.
- (66) Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7: 179-185. doi:10.1038/ncb1218.
- (67) Marzoq AJ, Mustafa SA, Heidrich L, Hoheisel JD, Alhamdani MSS (2019) Impact of the secretome of activated pancreatic stellate cells on growth and differentiation of pancreatic tumour cells. *Sci Rep* 9: 5303. doi:10.1038/s41598-019-41740-x.
- (68) Masamune A, Shimosegawa T (2009) Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol* 44: 249-260. doi:10.1007/s00535-009-0013-2.
- (69) Matthaios D, Zarogoulidis P, Balgouranidou I, Chatzaki E, Kakolyris S (2011) Molecular pathogenesis of pancreatic cancer and clinical perspectives. *Oncology* 81: 259-272. doi:10.1159/000334449.
- (70) Medic N, Desai A, Olivera A, Abramowitz J, Birnbaumer L, Beaven MA, Gilfillan AM, Metcalfe DD (2013) Knockout of the *Trpc1* gene reveals that TRPC1 can promote recovery from anaphylaxis by negatively regulating mast cell TNF- α production. *Cell Calcium* 53: 315-326. doi:10.1016/j.ceca.2013.02.001.
- (71) Minard A, Bauer CC, Wright DJ, Rubaiy HN, Muraki K, Beech DJ, Bon RS (2018) Remarkable progress with small-molecule modulation of TRPC1/4/5 channels: Implications for understanding the channels in health and disease. *Cells* 7: 52. doi:10.3390/cells7060052.
- (72) Myeong J, Ko J, Kwak M, Kim J, Woo J, Ha K, Hong C, Yang D, Kim HJ, Jeon JH, So I (2018) Dual action of the $G\alpha_q$ -PLC β -PI(4,5)P $_2$ pathway on TRPC1/4 and TRPC1/5 heterotetramers. *Sci Rep* 8: 12117. doi:10.1038/s41598-018-30625-0.
- (73) Myers KA, Rattner JB, Shrive NG, Hart DA (2007) Hydrostatic pressure sensation in cells: Integration into the tensegrity model. *Biochem Cell Biol* 85: 543-551. doi:10.1139/o07-108.
- (74) Nagelkerke A, Bussink J, Rowan AE, Span PN (2015) The mechanical microenvironment in cancer: How physics affects tumours. *Semin Cancer Biol* 35: 62-70. doi:10.1016/j.semcancer.2015.09.001.
- (75) Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W, Palmer DH (2018) Therapeutic developments in pancreatic cancer: Current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15: 333-348. doi:10.1038/s41575-018-0005-x.

- (76) Ng LC, O'Neill KG, French D, Airey JA, Singer CA, Tian H, Shen XM, Hume JR (2012) TRPC1 and Orai1 interact with STIM1 and mediate capacitative Ca^{2+} entry caused by acute hypoxia in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C1156-C1172. doi:10.1152/ajpcell.00065.2012.
- (77) Nielsen N (2015) Function of ion transport proteins in pancreatic stellate cells (PSCs) [zugl. Dissertation]. Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Münster.
- (78) Nielsen N, Kondratska K, Ruck T, Hild B, Kovalenko I, Schimmelpfennig S, Welzig J, Sargin S, Lindemann O, Christian S, Meuth SG, Prevarskaya N, Schwab A (2017) TRPC6 channels modulate the response of pancreatic stellate cells to hypoxia. *Pflugers Arch* 469: 1567-1577. doi:10.1007/s00424-017-2057-0.
- (79) Nirmalanandhan VS, Hurren R, Cameron WD, Gronda M, Shamas-Din A, You L, Minden MD, Rocheleau JV, Schimmer AD (2015) Increased pressure alters plasma membrane dynamics and renders acute myeloid leukemia cells resistant to daunorubicin. *Haematologica* 100: e406-e408. doi:10.3324/haematol.2015.129866.
- (80) Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. (2009) Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324: 1457-1461. doi:10.1126/science.1171362.
- (81) Ong HL, Jang SI, Ambudkar IS (2012) Distinct contributions of Orai1 and TRPC1 to agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals determine specificity of Ca^{2+} -dependent gene expression. *PLoS One* 7: e47146. doi:10.1371/journal.pone.0047146.
- (82) Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. (2014) Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25: 719-734. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005.
- (83) Pang TCY, Wilson JS, Apte MV (2017) Pancreatic stellate cells: What's new? *Curr Opin Gastroenterol* 33: 366-373. doi:10.1097/MOG.0000000000000378.
- (84) Patel A, Sharif-Naeini R, Folgering JR, Bichet D, Duprat F, Honore E (2010) Canonical TRP channels and mechanotransduction: From physiology to disease states. *Pflugers Arch* 460: 571-581. doi:10.1007/s00424-010-0847-8.
- (85) Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443: 230-233. doi:10.1038/nature05122.
- (86) Prakriya M, Lewis RS (2015) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 95: 1383-1436. doi:10.1152/physrev.00020.2014.
- (87) Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR (2012) Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21: 418-429. doi:10.1016/j.ccr.2012.01.007.
- (88) Prystopiuk V, Fels B, Simon CS, Liashkovich I, Pasrednik D, Kronlage C, Wedlich-Soldner R, Oberleithner H, Fels J (2018) A two-phase response of endothelial cells to hydrostatic pressure. *J Cell Sci* 131: jcs206920. doi:10.1242/jcs.206920.

- (89) Putney JW, Steinckwich-Besancon N, Numaga-Tomita T, Davis FM, Desai PN, D'Agostin DM, Wu S, Bird GS (2017) The functions of store-operated calcium channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 900-906. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.11.028.
- (90) Ramanathan RK, McDonough SL, Philip PA, Hingorani SR, Lacy J, Kortmansky JS, Thumar J, Chiorean EG, Shields AF, Behl D, Mehan PT, Gaur R, Seery T, Guthrie KA, Hochster HS (2019) Phase IB/II randomized study of FOLFIRINOX plus pegylated recombinant human hyaluronidase versus FOLFIRINOX alone in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: SWOG S1313. *J Clin Oncol* 37: 1062-1069. doi:10.1200/JCO.18.01295.
- (91) Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A (2015) Mechanically activated ion channels. *Neuron* 87: 1162-1179. doi:10.1016/j.neuron.2015.08.032.
- (92) Redondo PC, Rosado JA (2015) Store-operated calcium entry: Unveiling the calcium handling signalplex. In: Jeon KW (Hrsg.) *International review of cell and molecular biology* Volume 316. 1. Aufl., Elsevier Inc., Amsterdam, S. 183-226. doi:10.1016/bs.ircmb.2015.01.007.
- (93) Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, Dekleva EN, Saunders T, Becerra CP, Tattersall IW, Westphalen CB, Kitajewski J, Fernandez-Barrena MG, Fernandez-Zapico ME, Iacobuzio-Donahue C, Olive KP, Stanger BZ (2014) Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25: 735-747. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021.
- (94) Rice AJ, Cortes E, Lachowski D, Cheung BCH, Karim SA, Morton JP, Del Rio Hernandez A (2017) Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 6: e352. doi:10.1038/oncsis.2017.54.
- (95) Rubaiy HN, Ludlow MJ, Henrot M, et al. (2017) Picomolar, selective, and subtype-specific small-molecule inhibition of TRPC1/4/5 channels. *J Biol Chem* 292: 8158-8173. doi:10.1074/jbc.M116.773556.
- (96) Scarlett CJ (2013) Contribution of bone marrow derived cells to the pancreatic tumor microenvironment. *Front Physiol* 4: 56. doi:10.3389/fphys.2013.00056.
- (97) Schaar A, Sun Y, Sukumaran P, Rosenberger TA, Krout D, Roemmich JN, Brinbaumer L, Claycombe-Larson K, Singh BB (2019) Ca²⁺ entry via TRPC1 is essential for cellular differentiation and modulates secretion via the SNARE complex. *J Cell Sci* 132: jcs231878. doi:10.1242/jcs.231878.
- (98) Shi J, Miralles F, Birnbaumer L, Large WA, Albert AP (2017) Store-operated interactions between plasmalemmal STIM1 and TRPC1 proteins stimulate PLCβ1 to induce TRPC1 channel activation in vascular smooth muscle cells. *J Physiol* 595: 1039-1058. doi:10.1113/JP273302.
- (99) Sousa CM, Biancur DE, Wang X, Halbrook CJ, Sherman MH, Zhang L, Kremer D, Hwang RF, Witkiewicz AK, Ying H, Asara JM, Evans RM, Cantley LC, Lyssiotis CA, Kimmelman AC (2016) Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* 536: 479-483. doi:10.1038/nature19084.
- (100) Steinckwich N, Fripiat JP, Stasia MJ, Erard M, Boxio R, Tankosic C, Doignon I, Nüße O (2007) Potent inhibition of store-operated Ca²⁺ influx and superoxide production

in HL60 cells and polymorphonuclear neutrophils by the pyrazole derivative BTP2. *J Leukoc Biol* 81: 1054-1064. doi:10.1189/jlb.0406248.

(101) Storch U, Forst AL, Philipp M, Gudermann T, Mederos y Schnitzler M (2012) Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *J Biol Chem* 287: 3530-3540. doi:10.1074/jbc.M111.283218.

(102) Storch U, Mederos y Schnitzler M, Gudermann T (2012) G protein-mediated stretch reception. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1241-H1249. doi:10.1152/ajpheart.00818.2011.

(103) Storck H, Hild B, Schimmelpfennig S, Sargin S, Nielsen N, Zaccagnino A, Budde T, Novak I, Kalthoff H, Schwab A (2017) Ion channels in control of pancreatic stellate cell migration. *Oncotarget* 8: 769-784. doi:10.18632/oncotarget.13647.

(104) Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, Smith BL, Ferrone CR, Hornicek FJ, Boucher Y, Munn LL, Jain RK (2012) Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 15101-15108. doi:10.1073/pnas.1213353109.

(105) Suchyna TM, Tape SE, Koeppe RE2, Andersen OS, Sachs F, Gottlieb PA (2004) Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers. *Nature* 430: 235-240. doi:10.1038/nature02743.

(106) Sundivakkam PC, Freichel M, Singh V, Yuan JP, Vogel SM, Flockerzi V, Malik AB, Tirupathi C (2012) The Ca^{2+} sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) is necessary and sufficient for the store-operated Ca^{2+} entry function of transient receptor potential canonical (TRPC) 1 and 4 channels in endothelial cells. *Mol Pharmacol* 81: 510-526. doi:10.1124/mol.111.074658.

(107) Sweeney ZK, Minatti A, Button DC, Patrick S (2009) Small-molecule inhibitors of store-operated calcium entry. *ChemMedChem* 4: 706-718. doi:10.1002/cmdc.200800452.

(108) Tajeddine N, Zanou N, Van Schoor M, Lebacq J, Gailly P (2010) TRPC1: Subcellular localization? *J Biol Chem* 285: 1e1. doi:10.1074/jbc.L109.073221.

(109) Tajeddine N, Gailly P (2012) TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 287: 16146-16157. doi:10.1074/jbc.M112.340034.

(110) Tworkoski E, Glucksberg MR, Johnson M (2018) The effect of the rate of hydrostatic pressure depressurization on cells in culture. *PLoS One* 13: e0189890. doi:10.1371/journal.pone.0189890.

(111) Varga-Szabo D, Authi KS, Braun A, Bender M, Ambily A, Hassock SR, Gudermann T, Dietrich A, Nieswandt B (2008) Store-operated Ca^{2+} entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch* 457: 377-387. doi:10.1007/s00424-008-0531-4.

(112) Watanabe S, Nagashio Y, Asaumi H, Nomiyama Y, Taguchi M, Tashiro M, Kihara Y, Nakamura H, Otsuki M (2004) Pressure activates rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G1175-G1181. doi:10.1152/ajpgi.00339.2004.

- (113) Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y (1982) Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn* 58: 837-858. doi:10.2535/ofaj1936.58.4-6_837.
- (114) Wilkes RP, Athanasiou KA (1996) The intrinsic incompressibility of osteoblast-like cells. *Tissue Eng Part A* 2: 167-181. doi:10.1089/ten.1996.2.167.
- (115) Won JH, Zhang Y, Ji B, Logsdon CD, Yule DI (2011) Phenotypic changes in mouse pancreatic stellate cell Ca^{2+} signaling events following activation in culture and in a disease model of pancreatitis. *Mol Biol Cell* 22: 421-436. doi:10.1091/mbc.E10-10-0807.
- (116) Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 62: 381-404. doi:10.1124/pr.110.002725.
- (117) Xu XF, Liu F, Xin JQ, Fan JW, Wu N, Zhu LJ, Duan LF, Li YY, Zhang H (2018) Respective roles of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members in pancreatic stellate cell activation induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *Biochem Biophys Res Commun* 501: 365-373. doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.176.
- (118) Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Fiala-Beer E, Zhang X, Yang L, Biankin AV, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV (2010) Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol* 177: 2585-2596. doi:10.2353/ajpath.2010.090899.
- (119) Yang J, Waldron RT, Su HY, Moro A, Chang HH, Eibl G, Ferreri K, Kandeel FR, Lugea A, Li L, Pandol SJ (2016) Insulin promotes proliferation and fibrosing responses in activated pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311: G675-G687. doi:10.1152/ajpgi.00251.2016.
- (120) Zhang LP, Ma F, Abshire SM, Westlund KN (2013) Prolonged high fat/alcohol exposure increases TRPV4 and its functional responses in pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R702-R711. doi:10.1152/ajpregu.00296.2012.
- (121) Zhou X, Ye Y, Sun Y, Li X, Wang W, Privratsky B, Tan S, Zhou Z, Huang C, Wei YQ, Birnbaumer L, Singh BB, Wu M (2015) Transient receptor potential channel 1 deficiency impairs host defense and proinflammatory responses to bacterial infection by regulating protein kinase $C\alpha$ signaling. *Mol Cell Biol* 35: 2729-2739. doi:10.1128/MCB.00256-15.

8 Abkürzungsverzeichnis

AUC	Fläche unter der Kurve
CRAC-Kanal	<i>Ca²⁺-Release-activated-Ca²⁺-Kanal</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM/Ham's F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositoltrisphosphat
KO	Knockout
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated-protein-Kinase</i>
MSC	Mechanosensitiver Ionenkanal
P0	Passage 0
P2	Passage 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLCβ	Phospholipase Cβ

PSC	Pankreatische Sternzelle
ROCE	Rezeptor-gesteuerter Ca ²⁺ -Einstrom
SERCA	Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SOC	<i>Store-operated calcium/store-operated current</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i>
STIM1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TME	<i>Tumor microenvironment,</i> Tumormikromilieu
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPA	<i>Transient receptor potential ankyrin</i>
TRPC1	<i>Transient receptor potential canonical 1</i>
TRPM	<i>Transient receptor potential melastatin</i>
TRPML	<i>Transient receptor potential mucolipin</i>
TRPP	<i>Transient receptor potential polycystin</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
WT	Wildtyp
α-SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Aktivierung der PSCs.	3
Abbildung 2. Rezeptor-gesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (ROCE) und store-operated calcium entry (SOCE).	9
Abbildung 3. Aufbau der Druckkammer.	17
Abbildung 4. Circularity.	21
Abbildung 5. Aufbau der Druckerzeugung für die Migrationsexperimente.	23
Abbildung 6. Auswertung der Migration.	24
Abbildung 7. Auswertung der Ca^{2+} -Messungen.	28
Abbildung 8. Repräsentative Ausschnitte der Nile Red-Färbung.	31
Abbildung 9. Auswertung der Nile Red-Färbung.	32
Abbildung 10. Repräsentative Ausschnitte der Färbung für α -SMA.	33
Abbildung 11. Gesamtintensität der α -SMA-Färbung in WT-PSCs.	34
Abbildung 12. Gesamtintensität der α -SMA-Färbung in WT- und TRPC1-KO-PSCs.	35
Abbildung 13. Projizierte Fläche pro Zelle in der Färbung für α -SMA.	37
Abbildung 14. Strukturindex in der Färbung für α -SMA.	38
Abbildung 15. Geschwindigkeit der PSCs.	40
Abbildung 16. Translokation der PSCs.	42
Abbildung 17. Direktionalität der PSCs.	42
Abbildung 18. Projizierte Fläche der PSCs.	43
Abbildung 19. Strukturindex der PSCs.	44
Abbildung 20. Verlauf der Ca^{2+} -Messung und Schema der Auswertung.	46
Abbildung 21. Ruhewert des Quotienten.	47
Abbildung 22. Speicherentleerung.	48
Abbildung 23. SOCE.	50
Abbildung 24. Blockade des SOCEs mit BTP2.	52

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Zellkulturmediums.....	14
Tabelle 2: Wellenlängen der Filter für die Fluoreszenzmikroskopie.....	19
Tabelle 3: Antikörper für die Immunfluoreszenz	20
Tabelle 4: Zusammensetzung der Migrationsmatrix.....	22
Tabelle 5: Zusammensetzung des Migrationsmediums.....	22
Tabelle 6: Lösungen für die Ca ²⁺ -Messungen	27
Tabelle 7: Substanzen für die Ca ²⁺ -Messungen	27

11 Danksagung

Ich danke an erster Stelle Herrn Professor Schwab für die Überlassung des Themas, für die freundliche und intensive Betreuung und Unterstützung und dafür, dass er jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Ich danke Herrn Dr. Benedikt Fels für die freundschaftliche und ausgezeichnete Betreuung und für die vielfältige Hilfe im und außerhalb des Labors sowie beim Schreibprozess.

Ich danke dem Team der Physiologie II für die freundschaftliche Aufnahme. Ich danke dem gesamten Team für die Hilfe und Anleitung bei der Arbeit. Ich danke Dr. Etmar Bulk, Dr. Verena Hofschroer, Dr. Otto Lindemann, Dr. Karolina Najder, Dr. Zoltán Pethö, Sarah Sargin, Sandra Schimmelpfennig und Jana Welzig für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor und der Auswertung. Ich danke meinen Mitdoktoranden für die gegenseitige Motivation.

Ich danke Herrn Professor Seebohm für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Ich danke dem Medizinerkolleg für die Betreuung und die finanzielle Unterstützung.

Ich danke besonders meinen Eltern Dietmar Gruner und Rita Riedel-Gruner für jede mögliche Unterstützung. Ich danke besonders meinen Freunden für die emotionale Unterstützung. Zusätzlich danke ich Sara Reinartz Groba, Matthias Fischer und Hannes Renken für ihre Hilfe bei der Korrektur.

12 Lebenslauf

