

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie II

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

**Die Rolle mechanosensitiver Ionenkanäle für die  
Aktivierung pankreatischer Sternzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Kuntze, Anna

aus Oelde

2019

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank U. Müller

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Albrecht Schwab

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Timo Strünker

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2019

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologie II – Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Linke  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Albrecht Schwab  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Timo Strünker

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Die Rolle mechanosensitiver Ionenkanäle für die Aktivierung pankreatischer Sternzellen  
Kuntze, Anna

Das pankreatische duktales Adenokarzinom (PDAC) ist ein hochmaligner Tumor mit oft rascher Progression und bislang schlechtem Therapieansprechen. Charakteristisch für das PDAC ist ein deutlich erhöhter Gewebedruck, welcher eine Chemoresistenz bedingt. Dieser hohe Druck ist auf eine exzessive Vermehrung von fibrotischem Gewebe im Tumormikromilieu, die sogenannte „Desmoplasie“, zurückzuführen. Pankreatische Sternzellen (PSCs) sind nicht nur verantwortlich für die Desmoplasie, sondern fördern auch Tumorwachstum und -invasion. Die PSCs selbst werden dabei unter anderem durch die hohen Gewebedrücke aktiviert. In diesem teils noch unklaren Prozess wird von der Beteiligung mechanosensitiver Ionenkanäle bei der Registrierung der Gewebedrücke ausgegangen. Die mechanosensitiven Piezo1- und TRPV4-Kanäle sind in murinen PSCs stark exprimiert. Über ihre Funktion in PSCs ist bis dato jedoch nichts bekannt.

In meiner Arbeit wurden das Migrationsverhalten und die Matrix-Interaktion muriner PSCs (AZ84-02.05.50.15.010; 25.03.2015) unter Piezo1- oder TRPV4-Kanalmodulation als Maß für ihre Aktivierung untersucht. Zudem wurden die kanalabhängige Calcium-Signalgebung und Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette 9 *in vitro* erforscht.

Insbesondere die Piezo1-Stimulation mit Yoda1 erhöht die PSC-Migration. Auf molekularer Ebene führt die Piezo1-Aktivierung zu einem vermehrten Calcium-Einstrom in PSCs und zu einer verstärkten Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette 9. In geringerem Maße sind diese Effekte auch bei TRPV4-Aktivierung der PSCs mit GSK1016790A zu finden. Außerdem erhöht die Piezo1-Aktivierung das Invasionsverhalten von PSCs in Sphäroiden sowie die PSC-Interaktion mit der extrazellulären Matrix.

Die Steigerung der Zellmigration und zugrundeliegender molekularer Mechanismen ist charakteristisch für die Aktivierung von PSCs. Zusammenfassend ergibt sich ein Anhalt für die Beteiligung des Piezo1-Kanals an der druckabhängigen Aktivierung pankreatischer Sternzellen im PDAC.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2019

## ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Die Rolle mechanosensitiver Ionenkanäle für die Aktivierung pankreatischer Sternzellen“ im Institut für Physiologie II, Universitätsklinikum Münster unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Albrecht Schwab

1. selbstständig 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, den 26.02.2019



---

Anna Kuntze

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>II ABILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>II</b>
<b>III TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 DAS PANKREATISCHE DUKTALE ADENOKARZINOM .....	1
1.2 PANKREATISCHE STERNZELLEN .....	2
1.2.1 <i>Charakterisierung pankreatischer Sternzellen</i> .....	2
1.2.2 <i>Der Zusammenhang zwischen Sternzellen und PDAC</i> .....	3
1.2.3 <i>Bedeutung mechanosensitiver Kanäle für die Aktivierung von Sternzellen</i> .....	5
1.3 DER PIEZO1-KANAL .....	6
1.4 DER TRPV4-KANAL.....	8
1.5 ZELLMIGRATION UND CA <sup>2+</sup> -STOFFWECHSEL .....	10
1.6 DREIDIMENSIONAL-KONFIGURIERTE ZELLKULTUREN: SPHÄROIDE .....	12
1.7 ZIELSETZUNG .....	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
2.1 MATERIALIEN.....	15
2.1.1 <i>Medien</i> .....	15
2.1.2 <i>Chemikalien</i> .....	15
2.1.3 <i>Versuchstiere</i> .....	16
2.2 METHODEN.....	17
2.2.1 <i>Isolation von murinen pankreatischen Sternzellen</i> .....	17
2.2.2 <i>Zellkultur, Passagieren und Zellzählung</i> .....	18
2.2.3 <i>Migrationsanalyse pankreatischer Sternzellen</i> .....	19
2.2.4 <i>Migrationsexperimente mit Sternzell-Sphäroiden</i> .....	21
2.2.5 <i>Die Mangan-Quench Technik</i> .....	24
2.2.6 <i>Immunfärbungen pankreatischer Sternzellen</i> .....	27
2.2.7 <i>Piezo1-Kanalfärbungen lebender Sternzellen</i> .....	30
2.3 STATISTISCHE ANALYSEN.....	31
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>32</b>
3.1 MIGRATIONSANALYSE PANKREATISCHER STERNZELLEN .....	32

3.1.1	<i>Piezo1-abhängige Migration</i> .....	32
3.1.2	<i>TRPV4-abhängige Migration</i> .....	36
3.2	PIEZO1-ABHÄNGIGE ZELLMIGRATION IN SPHÄROIDEN.....	40
3.2.1	<i>Endpunktmessungen migrierter Sternzellen aus Sphäroiden heraus</i> .....	41
3.2.2	<i>Microbeads und Matrixinteraktion der PSCs</i> .....	43
3.3	PIEZO1- UND TRPV4-ABHÄNGIGER CALCIUM-EINSTROM .....	45
3.3.1	<i>Ergebnisse der Mangan-Quench-Messungen</i> .....	45
3.3.2	<i>Veränderungen des Zytoskeletts durch Blebbistatin</i> .....	47
3.4	KANAL-ABHÄNGIGE VERÄNDERUNGEN DER MLC-PHOSPHORYLIERUNG .....	50
3.5	KANALDICHEMMESSUNGEN DES PIEZO1-KANALS .....	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>54</b>
4.1	CALCIUM-EINSTROM UND AKTIN-MYOSIN-INTERAKTION IN PSCs.....	55
4.2	DER EINFLUSS DES ZYTOSKELETTS AUF DIE PIEZO1- UND TRPV4-KANALAKTIVITÄT ....	58
4.3	EINFLUSS DES TRPV4-KANALS AUF DIE ZELLMIGRATION .....	62
4.4	EINFLUSS DES PIEZO1-KANALS AUF DIE ZELLMIGRATION.....	64
4.5	PIEZO1-ABHÄNGIGE ZELLMIGRATION IM 3D-ZELLMODELL .....	66
4.6	DIE ERGEBNISSE IM KONTEXT DER PATHOPHYSIOLOGIE DES PDACS .....	68
<b>5</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>85</b>

## II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Interaktion zwischen pankreatischen Sternzellen und pankreatischen Tumorzellen im PDAC
- Abbildung 2 mRNA-Expression des TRPV4- und des Piezo1-Kanals in PSCs (modifiziert nach [49])
- Abbildung 3 Exemplarische Aufnahme eines PSC-Sphäroids
- Abbildung 4 Wachstum pankreatischer Sternzellen in Zellkulturschalen nach der Isolation
- Abbildung 5 Gesamtwegstrecke und Translokation einer Sternzelle
- Abbildung 6 Schematischer Aufbau der 3D-Zellkultur
- Abbildung 7 Die Berechnung von des Calcium-Einstroms als  $\Delta m(F_{365}/t)$
- Abbildung 8 Die zurückgelegte Wegstrecke pankreatischer Sternzellen unter Piezo1-Stimulation
- Abbildung 9 Trajektorien der Piezo1-abhängigen Zellmigration pankreatischer Sternzellen
- Abbildung 10 Piezo1-abhängige Veränderungen der Migrationsparameter pankreatischer Sternzellen
- Abbildung 11 Veränderung der Zellmorphologie von PSCs bei Stimulation mit 50  $\mu$ M Yoda1
- Abbildung 12 TRPV4-abhängige Migrationsparameter pankreatischer Sternzellen
- Abbildung 13 Zeitabhängige Geschwindigkeit und Translokation von PSCs bei TRPV4-Modulation
- Abbildung 14 Einfluss der TRPV4-Modulation auf die projizierte Fläche und den Strukturindex der Sternzellen
- Abbildung 15 Exemplarisches Auswandern von Sternzellen aus Sphäroiden bei Stimulation mit Yoda1
- Abbildung 16 Piezo1-abhängige Invasionszonen von PSC-Sphäroiden
- Abbildung 17 Piezo1-abhängige Anzahl der „*detached cells*“
- Abbildung 18 Piezo1-abhängige *Microbeads*-Bewegung im Umfeld von PSC-Sphäroiden
- Abbildung 19 Piezo1- und TRPV4-abhängiger Calcium-Einstrom in pankreatische Sternzellen



Abbildung 20 Blebbistatin-Scoring-System pankreatischer Sternzellen

Abbildung 21 Blebbistatin-abhängige Veränderungen des Zytoskeletts pankreatischer Sternzellen

Abbildung 22 PMYL9-Immunfluoreszenzaufnahmen pankreatischer Sternzellen

Abbildung 23 Einfluss der Kanalmodulatoren auf die PMYL9-Phosphorylierung pankreatischer Sternzellen

Abbildung 24 Piezo1-Kanalfärbung einer pankreatischen Sternzelle

Abbildung 25 Piezo1-Kanaldichte in pankreatischen Sternzellen

Abbildung 26 Kreuzkorrelation zwischen dem Calcium-Einstrom und der PMYL9-Phosphorylierung in pankreatischen Sternzellen

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Medien
Tabelle 2	Verwendete Chemikalien
Tabelle 3	Verwendete Antikörper
Tabelle 4	Matrixzusammensetzung bei Zellmigrationsfilmen nach Nielsen <i>et al.</i> [114]
Tabelle 5	Verwendete Kanal-Aktivatoren und -Inhibitoren
Tabelle 6	Murine IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> -Werte der Inhibitoren und Aktivatoren
Tabelle 7	Matrixkomponenten zur Einbettung von vier Sphäroiden
Tabelle 8	Zusammensetzung von HEPES-gepufferter Ringerlösung (pH 7,4; bei 37 °C)
Tabelle 9	Eingesetzte Antikörper für Immunfärbungen

## IV Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BSA	Bovine serum albumin
CTR	Kontrolle, Kontrollversuch
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal calf serum
GBSS	Grey's balanced salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KO	Knock-out
MHC	Myosin heavy chain
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
MLCP	Myosin light chain phosphatase
nmMIIA	Non-muscle myosin IIA
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCC	Pancreatic cancer cell
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PMYL9	Phosphorylated myosin light chain 9
PSC	Pancreatic stellate cell
P/S	Penicillin/Streptomycin
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
SEM	Standard error of the mean
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TME	Tumor microenvironment
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRP	Transient receptor potential

WFI	Wasser für Injektionszwecke
WT	Wildtyp
ZNS	Ziegennormalserum
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth muscle actin

# 1 Einleitung

## 1.1 Das pankreatische duktale Adenokarzinom

Das pankreatische duktale Adenokarzinom (engl. *pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) ist der häufigste Tumor des exokrinen Pankreas. Es weist eine der schlechtesten Prognosen aller Tumoren auf und ist trotz vergleichsweise geringer Inzidenz weltweit die vierthäufigste tumorassoziierte Todesursache [1]. Diese hohe Mortalität ist zum einen auf die oft späte Diagnose bei fehlenden Frühsymptomen und -markern zurückzuführen. Zum anderen ist das PDAC durch ein aggressives Wachstum mit früher Infiltration von Nachbargeweben und einem hohen Metastasierungsrisiko charakterisiert. Somit kommt bei Diagnose eines PDACs nur für einen Bruchteil der Patienten eine operative Resektion in Betracht [2,3]. Palliative chemotherapeutische sowie radiotherapeutische Therapiekonzepte zeigen trotz immenser Forschungsbemühungen bis dato ein schlechtes Ansprechen auf das Fortschreiten des Tumors, so dass die Lebenserwartung nach PDAC-Diagnose mit einer Ein-Jahres-Überlebensrate von unter 20 % noch immer sehr gering ist [1,3].

Die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms geht mit einem ausgeprägten fibrotischen Umbauprozess einher, welcher als „Desmoplasie“ bezeichnet wird. Das hauptsächlich aus Kollagenen gebildete und die Tumorzellen umgebende Stroma kann mehr als 80 % der Tumormasse ausmachen [4,5]. Dabei kommt es zur Entstehung von sehr hohen Gewebedrücken im Pankreas, die letztlich zum Gefäßkollaps führen und sowohl die Entwicklung hypoxischer Areale als auch eine damit einhergehende Chemoresistenz bedingen [3,6,7]. Diese Problematik wird durch nicht-funktionale Blutgefäße, welche im Zuge der Angiogenese ausgebildet werden, weiter verschärft [8]. Häufig wird das desmoplastische Stroma in der Literatur als wesentliche Grundlage der Aggressivität des PDACs erachtet [3–5,8]. Allerdings erhoben sich in den letzten Jahren auch Gegenstimmen, welche den Prozess der Desmoplasie als reaktive Schutzfunktion des Pankreas auf die Tumorgenese beschreiben [9,10]. Bis heute ist die Funktion der Desmoplasie im PDAC umstritten. Es finden sich sowohl Beispiele für einen anti-tumorösen Effekt als auch für eine Förderung der Krebszellproliferation und -invasion, sodass aktuell eine bilaterale Funktion postuliert wird [11,12]. Dennoch wird das therapeutische Potenzial des desmoplastischen Gewebes und der Matrix-produzierenden Zellen als möglicher Ansatzpunkt zur Progressionshemmung des PDACs weiterhin als hoch eingestuft [1,12].

Als Hauptproduzenten des desmoplastischen Gewebes im PDAC haben sich aktivierte pankreatische Sternzellen (engl. *pancreatic stellate cells*, PSCs) herausgestellt [4,13]. Sie bilden mit weiteren Fibroblasten, Immunzellen und Makrophagen sowie der extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) das sogenannte „tumor microenvironment“ (TME),

welchem eine wichtige Rolle für die Tumorpheriferation und Entstehung von Metastasen zugeschrieben wird [14,15]. Pankreatische Sternzellen sind zusätzlich in der Lage, das Tumorzellwachstum auf parakrinem Wege zu stimulieren. Auf der anderen Seite dieser Interaktion führen pankreatische Tumorzellen durch Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie auch das *TME* durch hohe Gewebedrücke, hypoxische Areale und den ECM-Komponenten zu einer vermehrten Aktivierung pankreatischer Sternzellen [16–18]. Es entsteht somit eine pathogenetische Wechselwirkung zwischen pankreatischen Tumorzellen und pankreatischen Sternzellen. Dabei wird den PSCs eine wichtige Rolle in der Progression des PDACs zugeschrieben, sodass ihre Charakterisierung und Funktion im Folgenden näher beschrieben wird.

## 1.2 Pankreatische Sternzellen

### 1.2.1 Charakterisierung pankreatischer Sternzellen

Pankreatische Sternzellen (PSCs) wurden 1982 erstmals beschrieben. Sie machen etwa 4 % der Zellen des Pankreas aus und finden sich hauptsächlich periazinär im Pankreas [19]. Morphologisch wie auch genetisch weisen sie eine hohe Ähnlichkeit zu hepatischen Sternzellen (HSCs) auf, welche für fibrotische Umbauprozesse in der Leber verantwortlich gemacht werden. Beiden Sternzell-Arten wird heute ein mesodermaler Ursprung zugeschrieben [20,21]. Wie auch die hepatischen Sternzellen weisen PSCs zwei Zustände auf: einen ruhenden und einen aktivierten Zustand. Im ruhenden Zustand zeichnen sich pankreatische Sternzellen insbesondere durch ihre prominenten zytosolischen Vitamin A-Speicher aus [19]. Daneben exprimieren sie *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), Desmin, Nestin und Vimentin, wodurch sie sich klar von Fibroblasten abgrenzen [17]. Im ruhenden Zustand sind die PSCs an der Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix durch die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und MMP-Inhibitoren beteiligt [22]. Folglich sind sie im physiologischen Pankreas für die Wahrung einer Bindegewebs-Homöostase zuständig [17].

Eine Aktivierung pankreatischer Sternzellen erfolgt *in vivo* meist im Zuge einer Pankreatitis oder eines tumorösen Prozesses. Dabei trägt eine Vielzahl von Faktoren zum Aktivierungsprozess bei. Unter anderem werden oxidativer Stress, Druck, Schubkräfte, Ethanol, Angiotensin II und verschiedene Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$ ) sowie Wachstumsfaktoren (PDGF, VEGF und TGF $\beta$ ) zu den relevanten Stimuli gezählt [16,23] (siehe auch Abb. 1). Viele Botenstoffe werden durch Tumorzellen, aktivierte Makrophagen, Azinuszellen, Endothelzellen, Thrombozyten oder aktivierte pankreatische Sternzellen selbst

freigesetzt. So kann die Aktivierung von PSCs auf parakrinem oder autokrinem Wege erfolgen und letztlich zu einer Verselbstständigung der Aktivierungsschleife führen [17,23].

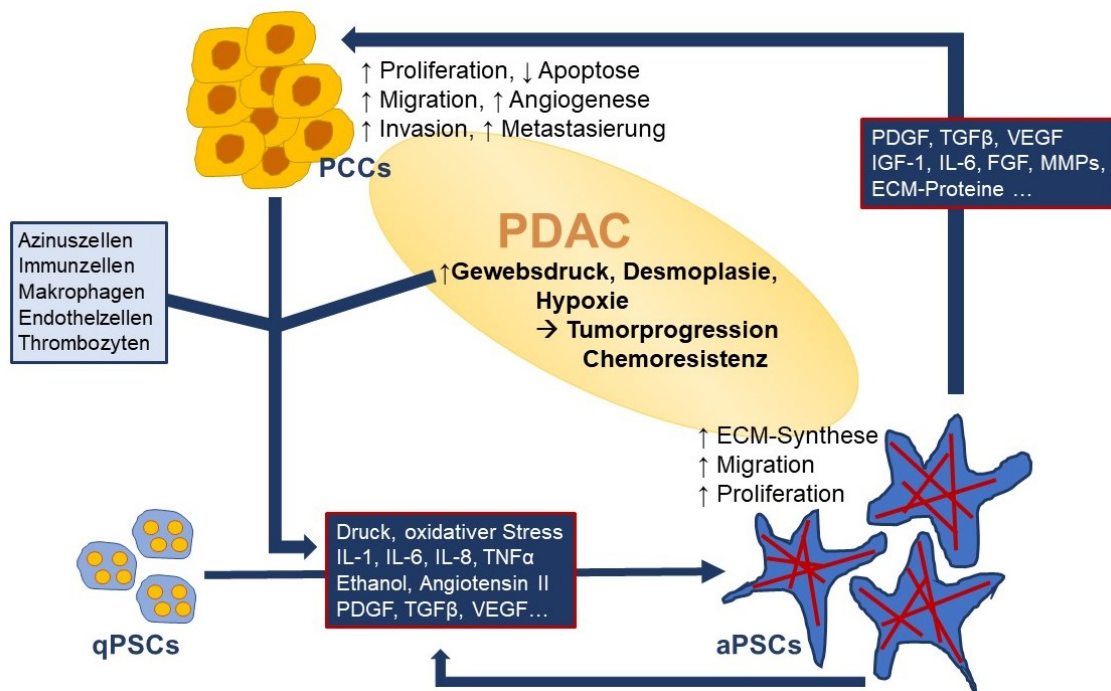
Die Aktivierung der PSCs geht mit einem myofibroblastischen Zellumbau einher. Nachweisbar ist ein Verlust der Vitamin A-Speicher, eine deutlich erhöhte Expression von *alpha-smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) sowie ein hypertrophiertes raues endoplasmatisches Retikulum [19]. Zudem kommt es zu einer Steigerung der Zellproliferation sowie zu einer vermehrten Migration und ECM-Umgestaltung [13]. Die ebenfalls erfolgende Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch aktivierte PSCs stimuliert umliegende Zellen, wie z.B. Fibroblasten und Tumorzellen, auf parakrinem Wege. Somit fördert die Aktivierung pankreatischer Sternzellen im Falle des PDACs letztlich das Tumorstadium und die Desmoplasie [23,24]. Auf diesen Zusammenhang soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### **1.2.2 Der Zusammenhang zwischen Sternzellen und PDAC**

In der Pathogenese des PDACs weisen pankreatische Sternzellen und pankreatische Tumorzellen (PCCs) eine enge bidirektionale Interaktion auf [24] (Abb. 1). Dabei wird von einer Rekrutierung der Sternzellen durch die Tumorzellen ausgegangen, welche darauffolgend zur Proliferation und Invasion des PDACs beitragen [25].

Auf der einen Seite führen PCCs durch die Stimulation pankreatischer Sternzellen mit TGF $\beta$ , PDGF und FGF zu einer Aktivierung von PSCs. Dieses resultiert insbesondere in einer erhöhten Proliferation und Migration der Sternzellen sowie in einer vermehrten Synthese von ECM-Komponenten wie Kollagen I und Fibronectin [16,25].

Auf der anderen Seite stimulieren die pankreatischen Sternzellen über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren die Proliferation von Tumorzellen und inhibieren ihre Apoptose [24] (vgl. Abb. 1). Darüber hinaus fördern PSCs die Epitheliale-Mesenchymale-Transition in PCCs. Dieses ist ein für die Metastasierung des PDACs wesentlicher Prozess, bei welchem es zu einer Herabregulation von epithelialen Markern wie E-Cadherin und zu einer erhöhten Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin in den Tumorzellen kommt [26].



**Abb. 1: Interaktion zwischen pankreatischen Sternzellen und pankreatischen Tumorzellen im PDAC.** Es sind ruhende PSCs (qPSCs) mit ihren charakteristischen Vitamin-A-Speichern (gelbe Punkte, unten links) und ihr Aktivierungsprozess durch verschiedene Stimuli zu aktivierten PSCs (aPSCs, unten rechts) dargestellt. Auch PCCs und andere Zellen sowie der hohe Gewebsdruck können die Aktivierung der Sternzellen hervorrufen. Dabei kommt es zu einer Formveränderung und Größenzunahme sowie zur Expression von Stressfasern in Sternzellen ( $\alpha$ -SMA, rot dargestellt). Die aktivierten Sternzellen stimulieren über verschiedene Faktoren die pankreatischen Tumorzellen (PCCs, gelb-orange dargestellt, oben links). Insgesamt beeinflussen die aufgezeigten Interaktionen die Progression des PDAC (mittig dargestellt) [17,25].

Neben diesen direkten Einflüssen pankreatischer Sternzellen auf die Tumorzellen bedingt auch die weitreichende Umstrukturierung des Tumorstromas durch PSCs das Verhalten der PCCs. So regulieren PSCs die Vaskularisation des PDACs über die Sekretion von proangiogenen Faktoren wie VEGF und PDGF, wohingegen das von ihnen produzierte desmoplastische Stroma aus Kollagen I und Fibronectin eine antiangiogene Wirkung hat [27]. Dabei entstehen durch den fibrotischen Gewebsumbau und die Ausbildung nicht-funktionaler Blutgefäße insbesondere im Zentrum des Tumors hypoxische Areale. Diese charakteristische Hypoxie des PDACs konnte in verschiedenen Versuchsmodellen mit einer erhöhten Strahlen- und Chemoresistenz sowie erhöhter Zellmigration und Metastasierung assoziiert werden [28–31]. Zudem fördern PSCs die Tumorzellmigration und -invasion durch die Reorganisation der Tumorumgebung [32,33]. PSCs bahnen über Kollagenmoleküle förmlich den Weg der Tumorzellen zur Metastasierung und werden sogar in Metastasen des PDAC nachgewiesen [34]. Folglich wird Kollagen heute als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und damit



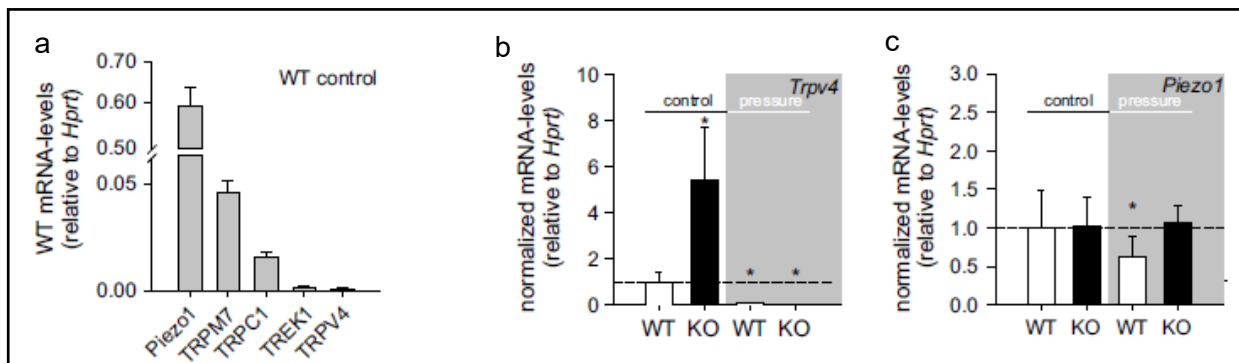
des Tumormikromilieus eine entscheidende Bedeutung für die Tumorprogression und Metastasierung zugesprochen [15,35].

Weiterhin konnte kürzlich eine enge Korrelation zwischen der Kollagenmenge im PDAC und dem totalen Gewebsdruck gezeigt werden [36]. Bis heute ist jedoch umstritten, ob die hohen Gewebsdrücke im PDAC im Vergleich zum gesunden Pankreas ursprünglich von einem interstitiell erhöhten Flüssigkeitsdruck oder von einem festen Druck durch proliferierende Zellen ausgelöst werden [37,38]. Klar ist dennoch, dass ein erhöhter Gewebsdruck in der Lage ist, pankreatische Sternzellen direkt zu aktivieren und somit ihre Proliferation, ECM-Produktion sowie Wachstumsfaktor-Sekretion zu steigern [18,39]. Die deutliche Matrixsteifigkeit ist somit ein wichtiger Bestandteil der engen Interaktion zwischen pankreatischen Sternzellen und pankreatischen Tumorzellen und stellt schlussendlich einen limitierenden Faktor für die therapeutischen Optionen des PDAC dar [1,8].

### **1.2.3 Bedeutung mechanosensitiver Kanäle für die Aktivierung von Sternzellen**

Zellen sind in der Lage, mechanische Änderungen ihrer Umgebung wahrzunehmen und auf diese mit Variationen in Wachstumsverhalten, Migration oder Differenzierung zu reagieren. Insbesondere eine veränderte mechanische Steifigkeit der extrazellulären Matrix kann zu einer Dysregulation des Zellverhaltens führen und den Beginn sowie die Progression verschiedener Erkrankungen bedingen [35,40]. So ist heute bekannt, dass eine Matrixversteifung nicht nur Resultat eines tumorösen Prozesses ist, sondern auch den Nährboden für die Entstehung von Fibrose und Tumoren darstellen kann [41]. Über Integrine ist das komplexe Netzwerk extrazellulärer Matrixproteine direkt mit dem Aktin-Zytoskelett von Zellen verbunden. Die Übersetzung von Zugkräften oder Druck auf die Komponenten des Zytoskeletts kann dabei zu einer schnellen Anpassung von Fokaladhäsionen und der Zellmigration über Aktin-Myosin-Interaktionen führen [42]. Zudem sind Zellen mit mechanosensitiven Ionenkanälen ausgestattet. Mechanosensitive Kanäle nehmen verschiedene Stimuli wie Zugkräfte oder Druck über Konformationsänderungen der Lipiddoppelschicht wahr und setzen diese in einen Ionenstrom um, welcher intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt. Viele dieser Kanäle sind Calcium-permeabel und können über die Veränderung des intrazellulären Calcium-Einstroms auf zytoskelettale Strukturen wie das Aktin-Zytoskelett einwirken [43]. Zum Teil liegt sogar eine direkte Assoziation mechanosensitiver Kanäle mit Komponenten des Zytoskeletts oder Integrinen vor [44]. Es wurden bereits verschiedene Kanäle aus der TRP-Familie als mechanosensitiv identifiziert [45,46]. Auch für andere Kanäle, wie den weit verbreiteten Piezo1-Kanal, wurden mechanosensitive Eigenschaften beschrieben [47].

Im pankreatischen duktaalen Adenokarzinom wird mechanosensitiven Kanälen eine wichtige Bedeutung in der Druck-vermittelten PSC-Aktivierung zugesprochen [18,39,48]. Fels *et al.* konnten bereits den drucksensitiven TRPC1-Kanal als Mediator der PSC-Aktivierung herausstellen [49]. Ebenso konnten sie unter anderem für den TRPV4- und den Piezo1-Kanal eine Expression in pankreatischen Sternzellen nachweisen [49]. Wie in der Abbildung 2 dargestellt, zeigt sich im Falle des TRPV4-Kanals zudem eine Hochregulation der mRNA-Expression in TRPC1-*Knock-out*-PSCs. Unter Druckeinfluss wird dagegen die *Trpv4*-mRNA-Expression reaktiv vermindert. Auch die Expression des Piezo1-Kanals ist nach Druckinkubation von WT-PSCs deutlich herabreguliert (Abb. 2), so dass für beide mechanosensitiven Kanäle eine negative Feedback-Regulation der mRNA-Expression bei Druckexposition besteht. Aus diesen Ergebnissen wurde für den TRPV4- und den Piezo1-Kanal eine mögliche Funktion in der Druck-getriggerten Aktivierung pankreatischer Sternzellen gefolgert [49].



**Abb. 2: mRNA-Expression des TRPV4- und des Piezo1-Kanals in PSCs (modifiziert nach [49])**

a) Die relative mRNA-Expression verschiedener mechanosensitiver Ionenkanäle ist angegeben. Die Expression der Kanal-mRNA ist auf diejenige des *Housekeeping*-Gens *Hprt* in WT-PSCs normiert. b) *Trpv4*-mRNA-Expression in TRPC1-KO-PSCs ohne und mit (grau hinterlegt) Druckinkubation. Die Angabe ist normiert auf die Expression in WT-Zellen ohne Druckinkubation. c) Es ist die gleiche Darstellung wie in b) für die *Piezo1*-mRNA-Expression gegeben. Mit Erlaubnis von *Springer Nature (European Biophysics Journal)*.

### 1.3 Der Piezo1-Kanal

Der seit 2010 bekannte Calcium-permeable mechanosensitive Piezo1-Kanal (auch Fam38a, Piezo: „πίεση“ (grch.) = Druck) ist in zahlreichen nicht-sensorischen Geweben von Vertebraten exprimiert [47]. Der verwandte Piezo2-Kanal ist dagegen hauptsächlich für die Schmerzwahrnehmung in Spinalganglien und die Druckwahrnehmung in Merkel-Zellen zuständig [47,50]. Eine besonders hohe Expression des Piezo1-Kanals liegt in der Lunge, der

Haut und im Urothel der Blase sowie in den roten Blutkörperchen, Endothelien und im proximalen Tubulus der Niere vor, wo der Piezo1-Kanal insbesondere auf Flüssigkeitsdrücke und Schubspannungen reagiert [50]. Ebenso wird dem Piezo1-Kanal eine embryogenetisch wichtige Funktion in der Bildung von Blutgefäßen zugeschrieben, wobei sich ein globaler Piezo1-*Knock-out* in Mäusen als letal erwiesen hat [51]. *Gain-of-Function*-Mutationen des Piezo1-Kanals führen zu einer hereditären Stomatozytose (DHS). Hier kommt es durch eine erhöhte Kationen-Permeabilität zu einer Dehydratation von Erythrozyten, die in einer hämolytischen Anämie resultiert. Eine *Loss-of-Function*-Mutation führt hingegen zu einer autosomal rezessiven kongenitalen lymphatischen Dysplasie [52].

Der Piezo1-Kanal zeichnet sich durch seine markante Größe aus. Das Protein enthält über 2000 Aminosäuren und 30-40 Transmembrandomänen [53]. 2015 wurde in Kryo-EM-Aufnahmen erstmals seine homotrimeren Organisation mit der Ausbildung einer zentralen Pore und drei drehsymmetrischen flügelartigen Untereinheiten, welche sich auf der Lipiddoppelschicht aufspannen, beschrieben [54]. Heute wird von den meisten Autoren die Annahme vertreten, dass der Piezo1-Kanal selbst aufgrund seiner Struktur in der Lage ist, mechanische Spannungsänderungen der peripheren Lipiddoppelschicht durch Konformationsänderungen der Flügel-Strukturen zu registrieren und diese in einen Ioneneinstrom umzusetzen [55]. Dabei besitzt der Kanal die Funktion eines Frequenzfilters, welcher ebenso die Dauer eines Stimulus in ein Signal übersetzt [56]. Bis dato wurden Reaktionen des Piezo1-Kanals auf zahlreiche mechanische Stimuli beschrieben, wie Membran-Dehnung, Schubspannung, Änderungen der ECM-Steifigkeit, Gewebe-Kompression und -Distension, Zugkräfte sowie osmotischer Stress [57]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl das Zytoskelett und membranassoziierte Strukturen wie Phosphatidylinositide und STOML3 (*stomatatin-like protein-3*) als auch Strukturen der extrazellulären Matrix wie Kollagen IV einen modulierenden Einfluss auf die Aktivierbarkeit und Sensitivität des Piezo1-Kanals haben [57–59].

Die Aktivierbarkeit von Piezo1 kann pharmakologisch durch das seit 2015 bekannte synthetische Molekül Yoda1 stimuliert werden. Dieses stabilisiert den geöffneten Kanal und ermöglicht durch Reduktion der mechanischen Reizschwelle abhängig von der extrazellulären Ionenkonzentration einen Calcium-Einstrom [60,61]. Ein spezifischer Antagonist am Piezo1-Kanal ist bis heute nicht bekannt. Der Piezo1-Kanal wird jedoch von GsMTx4 als Inhibitor mechanosensitiver Ionenkanäle beeinflusst, welcher mechanische Membranspannungen reduziert und somit die Aktivierbarkeit verschiedener Ionenkanäle herabsetzt [62].

In Epithelzellen ist Piezo1 ein wichtiger Regulator der Zelldichte, indem er Zellteilung, Apoptose und Zellextension stimuliert [63]. Dieses verdeutlicht den weitreichenden Einfluss

des mechanosensitiven Kanals auf essenzielle Zellfunktionen. Weiterhin moduliert der Piezo1-Kanal die Zellmigration von Melanomzellen, wobei ein Einfluss auf Myosin II über eine Calcium-abhängige Aktivierung der Phosphodiesterase 1 sowie Hemmung der Proteinkinase A gezeigt werden konnte [64]. Ebenso wird dem Piezo1-Kanal über Calpain und Talin eine Aktivierung von Integrinen zugesprochen [57]. Der Ionenkanal scheint also über mehrere Angriffspunkte die Migration verschiedener Zellen zu modulieren. Zudem ist der Piezo1-Kanal in zahlreichen Tumorzellen exprimiert [53]. Dabei zeigte sich eine Piezo1-abhängige Steigerung der Zellmigration in Brusttumoren und in gastrischen Krebszellen [65,66]. Dagegen wurde in Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms ein inverser Effekt beschrieben. Hier kam es zu einer Migrations- und Invasionssteigerung unter Piezo1-Depletion [67]. Insgesamt rückt der Piezo1-Kanal in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung, und es mehren sich Berichte über zahlreiche Zusammenhänge des Piezo1-Kanals mit vaskulären und tumorösen Pathologien.

Über die physiologischen und pathologischen Funktionen des Piezo1-Kanals in pankreatischen Zellen ist bis dato dagegen wenig bekannt. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Auslösung einer Pankreatitis aufgrund eines intraduktalen Druckanstiegs, z.B. durch Gallensteine oder iatrogene Manipulation, mit einer druckabhängigen Piezo1-Aktivierung einhergeht. Damit kann dem mechanosensitiven Kanal in pankreatischen Azinuszellen eine wichtige Rolle für die Zellhomöostase und Induktion einer Pankreatitis zugeschrieben werden [68]. Dennoch ist die Funktion des Piezo1-Kanals in pankreatischen Sternzellen weiterhin unklar, und insbesondere im Fall des PDACs finden sich bis heute keine Informationen über die Relevanz des Piezo1-Kanals im pathologischen Zusammenspiel von PCCs und PSCs.

## 1.4 Der TRPV4-Kanal

Ein weiterer nicht-selektiver Calcium-permeabler und mechanosensitiver Kanal ist der im Jahr 2000 entdeckte TRPV4-Kanal (TRPV = *transient receptor potential vanilloid*) [69]. Dieser liegt in der Zellmembran als Tetramer vor, wobei jedes Monomer sechs Transmembrandomänen aufweist und mit einer zentralen Porenregion ausgestattet ist. Zudem sind Komplexbildungen des Kanals mit anderen Ionenkanälen aus der TRP-Familie beschrieben, wie unter anderem TRPV4-TRPC1-Komplexe, welche zu einer Wirk-Potenzierung der Ionenkanäle führen [70,71]. Der genaue Mechanismus der Aktivierung des TRPV4-Kanals ist insbesondere für mechanische Stimuli bis dato unklar. Häufig wird eine sekundäre Aktivierung von TRPV4 über membranassoziierte oder zytoskelettale Proteine nach Deformierung der Lipiddoppelschicht durch einen mechanischen Trigger postuliert [72,73].

Der TRPV4-Kanal ist in zahlreichen Geweben zu finden. Dieses weist auf eine bedeutsame Rolle des Ionenkanals für verschiedene physiologische und pathologische Prozesse hin. Unter anderem wird der Kanal in Endothelien und Gefäßmuskelzellen sowie in Herz, Nieren, Lungen, Speicheldrüsen, Leber, Milz und in Nervenganglien exprimiert [71]. Die Aktivierung des Kanals erfolgt durch mechanische (u.a. Scherkräfte), thermische, chemische (u.a. Calmodulin, ATP, Arachidonsäure, pH-Änderungen) und osmotische Reize [46,71,74]. Wie bei dieser Vielfalt an Stimuli zu erwarten, besitzt der TRPV4-Kanal zahlreiche physiologische Funktionen, die hier nur beispielhaft angedeutet werden können. Unter anderem wird eine Funktion in der strömungsinduzierten Vasodilatation von kleinen Blutgefäßen [71] und ein regulatorischer Einfluss auf die Insulinsekretion im Pankreas [75] beschrieben. Weiterhin ist der TRPV4-Kanal in der Wahrnehmung von inflammatorischem und neuropathischem Schmerz involviert [76].

Dem TRPV4-Kanal wird zudem eine Rolle in der Pathogenese von Fibrosen zugesprochen, wobei dieser zur Entstehung der myokardialen Fibrose, zystischen Fibrose, hepatischen, pulmonalen, renalen und schlussendlich auch pankreatischen Fibrose beiträgt [70]. Ebenso ist der TRPV4-Kanal an der Entstehung von kardiovaskulären Pathologien wie pulmonaler Hypertension und kardialer Fibrose durch myofibroblastäre *Remodeling*-Prozesse beteiligt [71,77,78].

Letztlich wird die Bedeutsamkeit des TRPV4-Kanals durch folgenschwere Mutationen unterstrichen, welche zu skelettalen Dysplasien, Osteoarthritis und Neuropathien führen, wie der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 2C und der scapulooperonealen Spinalen Muskelatrophie [79,80]. Demgegenüber zeigte ein TRPV4-*Knock-out* in Mäusen lediglich milde Auswirkungen, wie eine veränderte osmotische Wahrnehmung, eine eingeschränkte endotheliale Funktion und eine gestörte Differenzierung von Osteoklasten, welche in einer Knochendichtezunahme resultiert. Zudem sind eine leicht geminderte Schmerz- und Hörwahrnehmung beschrieben [76,81].

Ein Zusammenhang zwischen dem TRPV4-Kanal und der Zellmigration wurde unter anderem in arteriellen Gefäßmuskelzellen postuliert. Hier erwies sich TRPV4 als migrationsfördernd durch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und der Mikrotubuli [82]. Die Arbeitsgruppe um Valverde konnte zudem zeigen, dass der TRPV4-Kanal in HEK293-Zellen für den Vorgang der Zell-Retraktion und der Regulation von Fokaladhäsionen am hinteren Zellpol essenziell ist [83]. Diese Ergebnisse geben Anhalt, dass der TRPV4-Kanal bei der großen Funktionsvielfalt auch in anderen Zellen einen physiologischen oder pathologischen Einfluss auf die Zellmigration haben könnte.

Trotz der zahlreichen beschriebenen Aufgaben des TRPV4-Kanals ist über seine Funktion in pankreatischen Sternzellen heute wenig bekannt. Bisher konnte gezeigt werden, dass der

TRPV4-Kanal in PSCs, die aus Ratten mit chronischer Pankreatitis isoliert wurden, deutlich überexprimiert ist. Dabei wurde eine Beteiligung bei Entzündung und Nozizeption postuliert [84]. Dieser Nachweis einer pathophysiologischen Bedeutsamkeit des TRPV4-Kanals bei Pankreatitis regt letztlich zur Untersuchung weiterer potenzieller Funktionen in PSCs an. Insbesondere finden sich bis dato keine Informationen über die pathophysiologische Rolle des TRPV4-Kanals für das pankreatische duktales Adenokarzinom.

## 1.5 Zellmigration und $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel

Migration beschreibt den aktiven Vorgang der Zell-Fortbewegung. Sie ist essenziell für viele zelluläre Vorgänge wie die Embryogenese, Wundheilung oder die Generation von Immunantworten [85–87]. Auch für die Entstehung zahlreicher Pathologien wie Gefäßerkrankungen, Osteoporose, Multipler Sklerose sowie Krebserkrankungen nimmt die Zellmigration eine zentrale Rolle ein [88]. Insbesondere die Metastasierung von Krebszellen erfolgt über eine chemotaktisch gerichtete Invasion in umliegendes Gewebe sowie in Blut- und Lymphgefäße. Folglich stellt die Migrationsbereitschaft von Krebszellen einen wichtigen Faktor für die Entstehung von Metastasen dar und besitzt prognostische Relevanz [89].

Die Zellmigration setzt eine koordinierte Abfolge von Schritten einer polarisierten Zelle voraus. Sie besteht aus der Protrusion des führenden Zellpols, der Ausbildung neuer Fokaladhäsionen, der Auflösung alter Fokaladhäsionen und schlussendlich der Retraktion des hinteren Zellpols. An dieser Abfolge ist insbesondere das Aktin-Zytoskelett beteiligt, welches sich durch die gesamte Zelle zieht, mittels Myosin die Zellkontraktion bewirkt und Fokaladhäsionen ausbildet [90,91]. Um eine koordinierte Abfolge der einzelnen Schritte zu erreichen, ist es für eine Zelle obligat, eine intrazelluläre Polarität zu etablieren und diese aufrechtzuerhalten [88]. Die Zellpolarität beeinflusst die Anordnung der Zellorganellen, sodass der Golgi-Apparat stets im vorderen Zellpol zu liegen kommt, während der Zellkern im hinteren Teil lokalisiert ist. Ein Gerüst aus Mikrotubuli, vom Mikrotubulus-organisierenden Zentrum (MTOC) im vorderen Zellpol ausgehend, koordiniert und stabilisiert die Lage der Zellorganellen und wird über verschiedene Mediatoren und Signalwege von intra- und extrazellulär reguliert [88,92]. Im Zuge der Protrusion kommt es am vorderen Zellpol durch Aktin-Polymerisation zur Entstehung von Pseudopodien; dies geschieht häufig in Form eines länglichen Lamellipodiums. Die Kontaktaufnahme zur extrazellulären Matrix erfolgt über die Aktivierung von Integrinen, welche die Ausbildung neuer Fokaladhäsionen einleiten [88,91]. Am hinteren Zellpol können nachfolgend alte Adhäsionen gelöst werden. Zuletzt wird ein Nachziehen des hinteren Zelleibs durch Zellkontraktion vollzogen. Dabei nimmt über einen Calcium-Einstrom

und Calpain sowie Calcineurin-abhängige Signalwege insbesondere Myosin II eine wichtige Rolle für die Retraktion in einer Aktin-Myosin-vermittelten Zellkontraktion ein [92,93].

In nicht-muskulären Zellen stellt Myosin II (NMII, *non-muscle myosin II*) das zentrale Motorprotein für Zellkontraktionen dar [94]. Myosin II ist in Filamenten organisiert. Ein einzelnes Myosin II Molekül setzt sich aus zwei schweren und vier leichten Ketten (MLC, *myosin light chain*) zusammen, darunter zwei essenzielle Leichtketten und zwei regulatorische Leichtketten [93]. Zellkontraktionen werden durch ein sich über die gesamte Zelle erstreckendes Aktin-NMII-Netzwerk ausgeführt. Dieses kann über Fokaladhäsionen Kraft auf die Zellmembran ausüben und besitzt Kontakte zur ECM [90,95]. Bei Inhibition der Myosin II-ATPase durch Blebbistatin [96] konnte gezeigt werden, dass neben dem Verlust von Stressfasern und Fokaladhäsionen ebenso die Ausbildung und Verankerung von Lamellipodien gestört wird [97]. Dieses veranschaulicht die große Bedeutung von Myosin II nicht nur für die Zellmigration, sondern auch für die Aufrechterhaltung des Zytoskeletts, der Zelladhäsion und der Zellmorphologie [95,98].

Die Kontraktion des Aktin-Myosin-Zytoskeletts in nicht-muskulären Zellen wird insbesondere über die reversible Phosphorylierung der Aminosäuren Ser-19 oder Thr-18 der regulatorischen Leichtketten von NMII (wie z.B. PMYL9, *phosphorylated myosin light chain 9*) vermittelt. Im Anschluss erfolgt eine Aktin-abhängige Aktivierung der Myosin II-ATPase, welche die Kontraktion des Zytoskeletts einleitet [99]. Dabei hängt die Phosphorylierung der regulatorischen MLC der gängigen Meinung nach vom Verhältnis der MLC-Kinase (MLCK) zur MLC-Phosphatase ab, wobei die MLCK über den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex bei Anstieg des intrazellulären Calcium-Einstroms aktiviert wird [100,101]. Somit wird die Aktivierung von Myosin II letztlich über die intrazelluläre Calcium-Konzentration gesteuert, wobei die Calcium-Sensitivität von Calmodulin und MLCK über verschiedene Prozesse moduliert werden kann [100]. Ebenso wird die Zellpolarität und damit die Direktionalität der Zellmigration über einen intrazellulären Calcium-Gradienten gesteuert. Die höchste Calcium-Konzentration liegt dabei meist am hinteren Zellpol vor [102], welches die Bedeutung von Calcium für die Zell-Retraktion unterstreicht. Zudem sind für die Protrusion pulsatile Calcium-Einströme am vorderen Zellpol essenziell. Diese leiten eine gerichtete Migrationsbewegung ein [103].

Calcium-Ionen nehmen für viele Signaltransduktionswege eine Schlüsselrolle im Organismus ein. Insbesondere für die Zellmigration ist eine genaue Regulation der intrazellulären Calcium-Konzentration nötig. Während die intrazelluläre Konzentration freier Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in den meisten Zellen bei etwa 100 nM im Ruhezustand liegt, ist die extrazelluläre Konzentration ungefähr um das zehntausendfache höher. Damit die niedrige intrazelluläre Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  aufrechterhalten werden kann, sind verschiedene Ionentransporter wie Calcium-ATPasen und

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher permanent aktiv [104]. In der Zellmembran vorkommende Calcium-permeable Ionenkanäle führen folglich durch ihr Öffnen zu einem Einstrom von Calcium in die Zelle, dem Gradienten folgend. Damit sind sie in der Lage, einen großen Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase zu nehmen und zahlreiche Prozesse, wie beispielsweise die Zellmigration, zu steuern. In pankreatischen Sternzellen sind verschiedene Calcium-permeable Ionenkanäle bekannt, dazu zählen TRPC1, TRPM7, TRPV4 und Piezo1 [49]. Zudem kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der PSCs über das Membranpotenzial reguliert werden, weshalb auch Calcium-sensitive Kalium-Kanäle, z.B. der  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanal, die Zellmigration beeinflussen [105].

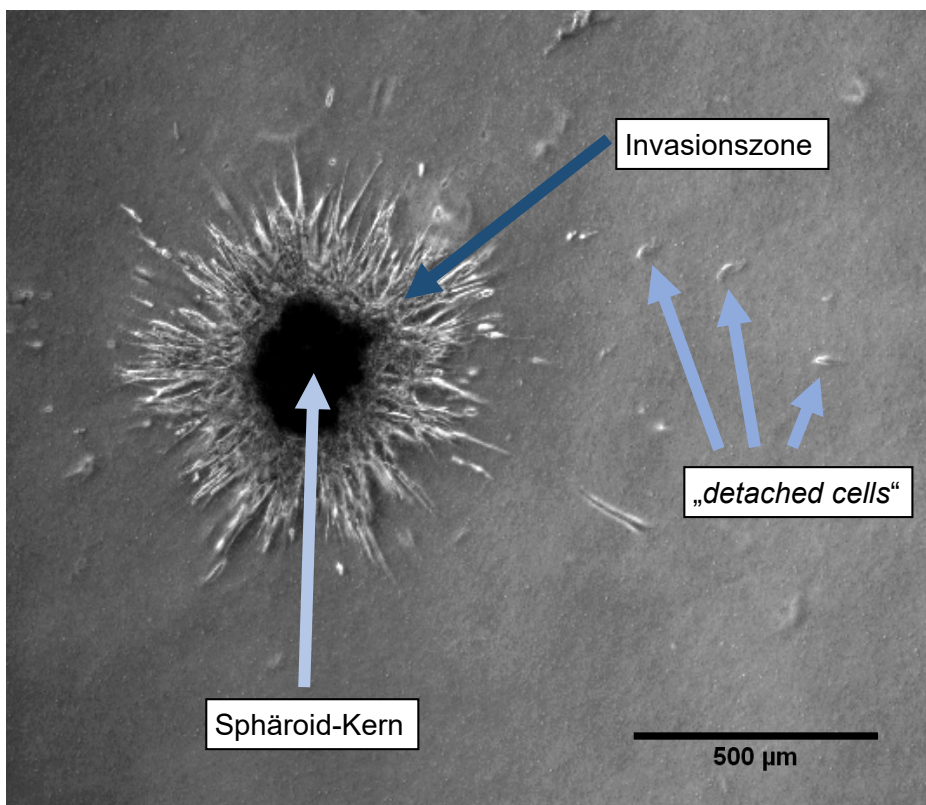
## 1.6 Dreidimensional-konfigurierte Zellkulturen: Sphäroide

In einer Zellkultur werden aus einem Gewebe entnommene Zellen in eine künstliche Umgebung überführt. Es handelt sich um ein häufig verwendetes Modell zur Untersuchung des physiologischen und pathologischen Verhaltens von Zellen. Konventionell werden Zellen dabei in einer zweidimensional ausgerichteten Kultur auf einem Plastik- oder Glassubstrat kultiviert, sodass ein einzelliger Rasen von proliferierenden Zellen entsteht. Diese Kultivierungsform von Zellen erwies sich jedoch als weit entfernt von den *in vivo*-Bedingungen in Geweben. In den letzten Jahren haben sich daher vermehrt dreidimensionale Ansätze der Zellkultur, z.B. durch Bildung von Zellsphäroiden, etabliert [106,107].

In Sphäroiden sind Zellen ähnlich der *in vivo*-Situation in der Lage, in allen Raumrichtungen mit anderen Zellen zu interagieren. Insbesondere komplex aufgebaute Zellen können vermehrt mit der extrazellulären Matrix und benachbarten Zellen interagieren und mit Veränderungen von Zellmorphologie und -polarität auf zahlreiche Einflüsse des Umfeldes reagieren. Durch die dreidimensionale, gewebeähnliche Konfiguration wird dabei ein physiologischer Gradient der Nährstoffe und Abbauprodukte über die Zellkultur aufgebaut [107,108]. Ebenso können pathologisch wichtige Faktoren wie ein interstitieller Druck oder eine steife extrazelluläre Matrix im Sphäroid-Modell simuliert werden [108]. 3D-Zellkulturen werden heute besonders als Tumor-Modelle bevorzugt, da sie die Dynamik von Tumorzellen mit der ECM sowie Invasionsprozesse abbilden können [89,109]. Zuletzt zeigt sich als positiver Effekt von 3D-Zellkulturen eine bessere Stabilität und ein längeres Überleben der Zellen [107]. Nachteile einer solchen Zellkultur sind jedoch die erschwerte Kontrolle der Kulturbedingungen, wie die Einstellung von Temperatur und pH-Wert, sowie die herausfordernde Reproduzierbarkeit gleicher Bedingungen. Zudem wird auch die bildliche Darstellung besonders durch große Strukturen mit geringer Transparenz erschwert [107].



Sphäroide können aus zweidimensionalen Zellkulturen erschaffen werden. Dazu eignen sich verschiedene Methoden wie die hier angewandte *Hanging-Drop-Methode* [110]. Werden die Sphäroide in eine extrazelluläre Matrix integriert, so kann das Invasionsverhalten der Zellen untersucht werden [108]. In vielen Modellen wird hierbei von der Ausbildung drei verschiedener Zellzonen berichtet [111] (exemplarische Darstellung in Abb. 3). Zum einen bleiben stationäre, nicht migrierende und tote Zellen im Sphäroid-Kern zurück. Daneben bildet sich eine Invasionszone aktiver Zellen aus, die in die umliegende Matrix eindringen und damit die Fläche des Sphäroids vergrößern. Zuletzt werden Zellen charakterisiert, die sich aus dem festen Zellverbund komplett herauslösen. Diese Zellen werden als sogenannte „*detached cells*“ bezeichnet und weisen folglich das invasivste Verhalten durch den vollständigen Verlust von Zell-Zell-Kontakten auf [111].



**Abb. 3: Exemplarische Aufnahme eines PSC-Sphäroids.** Die Aufnahme erfolgte nach 48 Stunden Inkubation des Sphäroids in der Kollagen-Matrix mit einem Phasenkontrast-Mikroskop bei fünffacher Vergrößerung. Es lassen sich drei verschiedene Sphäroid-Zonen (mit Pfeilen markiert) definieren: Der Sphäroid-Kern als Rest des eingebetteten Ursprungssphäroids; die Invasionszone als weißlich zur Darstellung kommender Bereich von invadierenden Sternzellen in die umliegende Matrix; die „*detached cells*“ als aus dem Zellverbund herausgelöste, einzelne Zellen.

## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, erstmals den Einfluss der mechanosensitiven Kanäle Piezo1 und TRPV4 auf die Migration pankreatischer Sternzellen im Kontext ihrer pathologischen Beteiligung an der Progression des pankreatischen duktales Adenokarzinoms zu evaluieren. Folgende Experimente werden zur Untersuchung der kanalabhängigen Zellmigration durchgeführt:

Unter Anwendung von Zellmigrationsanalysen in der zweidimensionalen Ebene soll zuerst der Einfluss von TRPV4-Aktivierung und -Inhibition sowie Piezo1-Aktivierung mittels pharmakologischer Kanalmodulatoren auf die Migrationsparameter pankreatischer Sternzellen untersucht werden. Die pankreatischen Sternzellen sollen dabei mit einer realitätsnahen zweidimensional konfigurierten Matrix als Untergrund interagieren. Der Fokus der lichtmikroskopischen Untersuchung soll auf der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen sowie auf der Direktionalität der Bewegung liegen. Ebenso kann ein Einfluss der Kanalmodulatoren auf die Zellmorphologie herausgestellt werden.

Zusätzlich soll der Einfluss des Piezo1-Kanals auf die PSC-Migration und -Invasion der Matrix in einer dreidimensionalen Zellkultur untersucht werden. Die bessere Vergleichbarkeit mit *in vivo*-Prozessen sowie die bereits etablierte Nutzung von 3D-Modellen insbesondere für Tumore, begründen den Vorteil einer Sphäroid-Migrationsanalyse auch für Sternzellen. PSC-Sphäroide sollen dabei durch die *Hanging-Drop*-Methode gewonnen und in einen umgebenden Tropfen aus extrazellulärer Matrix integriert werden. Anschließend soll das Invasionsverhalten pankreatischer Sternzellen durch eine mikroskopische Fotodokumentation erfasst werden. Dabei können die Zugkräfte der PSCs auf die extrazelluläre Matrix durch Integration von *Microbeads* in die Matrix dargestellt werden. Die Beobachtung in Migrationsfilmen ermöglicht die Quantifizierung dieser Bewegungen und die Untersuchung eines Einflusses der pharmakologischen Piezo1-Kanal-Aktivierung auf diesen Effekt.

Unter der Annahme, dass eine TRPV4- und Piezo1-Aktivierung in pankreatischen Sternzellen zu einer Veränderung der Zellmigration führt, sollen die zugrundeliegenden Signalwege dieses Effekts beleuchtet werden. So kann der Einfluss der mechanosensitiven Kanäle auf den Calcium-Einstrom in pankreatische Sternzellen einen Aufschluss über die funktionelle Rolle des Piezo1- und des TRPV4-Kanals in PSCs geben. Zuletzt kann die Korrelation eines Calcium-Einstroms in pankreatische Sternzellen durch mechanosensitive Kanäle mit dem Ausmaß der Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette (PMYL9) geprüft werden. Dabei stellt der Anteil an PMYL9 am gesamten Myosin II ein Maß für die Aktivität des Aktin-Myosin-Zytoskeletts in PSCs dar. Mithilfe dieser Methoden kann zuletzt der kanalabhängige Einfluss auf die Zellmigration auf molekularer Ebene erklärt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Medien

**Tabelle 1:** Verwendete Medien

Medium	Firma, Ort
DMEM/Ham-F12	Biochrom GmbH, Berlin
PBS w/o	Biochrom GmbH, Berlin
PBS +/+	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RPMI 1640 (mit 20 mM HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
GBSS	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach
FCS-Gold	GE Healthcare GmbH, Little Chalfont, GB
Penicillin/Streptomycin (1 %/1 % in WFI)	Biochrom GmbH, Berlin

#### 2.1.2 Chemikalien

**Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Firma, Ort
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Kollagen III, human	Corning Discovery Labware, Inc., Bedford, MA
Kollagen IV, murin	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Kollagen Typ I / Kollagen G (Rind)	Biochrom GmbH, Berlin (nun Merck)
Kollagenase P	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
DAKO Mounting Medium	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fibronectin-Pure, human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FluoSpheres® polystyrene 1.0 µm	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien
Forene® 100 % (Isofluran)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Fura-2-AM	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
GSK1016790A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

HC067047	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Immersol® (Immersionsoil)	Zeiss, Oberkochen
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Laminin #L2020	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PDGF (recombinant human PDGF-BB)	Biolegend®, San Diego
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kollagen I, hoch konzentriert (aus dem Rattenschwanz)	Corning Discovery Labware, Inc., Bedford, MA
Triton X - 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypsin/EDTA – Lösung (0,05 %/0,02 % in PBS)	Biochrom GmbH, Berlin
Yoda1	Tocris Bioscience™, Bristol, GB
Ziegennormalserum (Goat Serum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

**Tabelle 3:** Verwendete Antikörper

Antikörper (Herkunft)	Firma, Ort
Anti-nmMIIA (Kaninchen)	Novus Biologicals, Littleton, CO
Anti-Piezo1/Fam38A (Kaninchen)	Proteintech Group Inc., Rosemont, IL
Anti-PMYL9 (Kaninchen)	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien
Anti- $\alpha$ -SMA (Maus)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Maus-Alexa488 (Ziege)	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien
Anti-Kaninchen-Alexa488 (Ziege)	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien

### 2.1.3 Versuchstiere

Für die durchgeführten Organentnahmen zur Zellmigrationsanalyse und zur Mangan-Quench-Messung wurden Wildtyp- und *Knock-out*-Mäuse des TRPC1-Stammes (Dietrich *et al.* 2007) [112] verwendet. Für alle weiteren Experimente wurden Mäuse der C57BL/6J-Linie herangezogen. Der Umgang mit den 8-20 Wochen alten Mäusen erfolgte gemäß den zurzeit bestehenden Tierschutzrichtlinien. Die Versuche waren dem Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz angezeigt worden (Aktenzeichen: AZ84-02.05.50.15.010; 25.03.2015).

## 2.2 Methoden

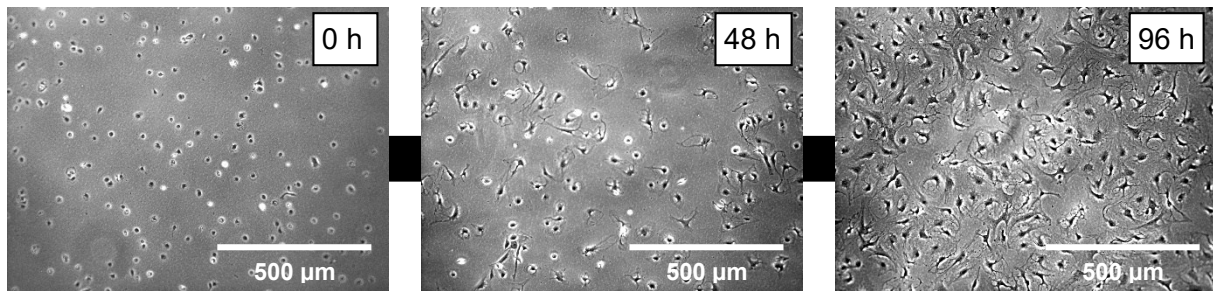
### 2.2.1 Isolation von murinen pankreatischen Sternzellen

Die Tötung und Sektion der Mäuse wurde auf Grundlage des etablierten Protokolls von Haanes *et al.* [113] mit geringen Modifikationen durchgeführt.

Zur Tötung der Mäuse wurde eine Isofluran-Überdosis verwendet. Bei Fehlen der Vitalitätszeichen erfolgte ein anschließender Genickbruch. Die Sektion begann nach Desinfektion des murinen Thorax und Abdomens mit 70 %-igem Ethanol. Es wurde eine quere Laparotomie mit Eröffnung des Peritoneums durchgeführt. Über die Verfolgung der Milzgefäße wurde das Pankreas aufgesucht und mithilfe von anatomischen Pinzetten vorsichtig reseziert.

Das isolierte Pankreas wurde mit 5 ml einer kalten *Grey's Balanced Salt Solution* (GBSS) gewaschen. Dabei wurden Fett- und Bindegewebsreste entfernt. Anschließend wurde die Bauchspeicheldrüse mit einer Schere grob zerkleinert und in ein 15 ml *Falcon*-Röhrchen mit 3 ml einer 0,1 % (w/v) Kollagenase P - Lösung in GBSS überführt. Der Gewebeerddau erfolgte bei halbstündiger 37 °C-Inkubation auf dem Schüttler. Nach Zugabe von weiteren auf 37 °C vorgewärmten 5 ml GBSS und vorsichtigem Mischen der Suspension, wurde diese bei 1040 \* g für 8 min zentrifugiert. Währenddessen wurde eine Zellkulturschale (100 x 20 mm) mit 1 ml FCS-Gold benetzt und für 10 min im Inkubator bei 37 °C belassen. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand über dem Zellpellet bis auf etwa 1 ml abgesaugt. Das Pellet wurde mit 10 ml vorgewärmten DMEM/Ham-F12 resuspendiert und die Kollagenase dadurch bis zur Unwirksamkeit verdünnt. Wenn nicht anders beschrieben, war das Kulturmedium DMEM/Ham-F12 in allen Verwendungen mit 10 % FCS-Gold und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (1% Penicillin, 1% Streptomycin in WFI) versetzt. Tropfenweise wurde die Zellsuspension nun in die mit FCS-Gold beschichtete Zellkulturschale überführt und für 105 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärennten Zellen durch intensives und mehrmaliges Waschen mit DMEM/Ham-F12 unter mikroskopischer Kontrolle entfernt. Dabei verblieben fast ausschließlich die bereits adhärennten pankreatischen Sternzellen in der Zellkulturschale (vgl. Abb. 4 links).

Für zwei Tage wurde das Kulturmedium täglich gewechselt. Die morphologische Veränderung durch den Aktivierungsprozess der pankreatischen Sternzellen in der Zellkultur innerhalb weniger Tage wurde dabei am Phasenkontrast-Mikroskop überprüft (Abb. 4). Am vierten bis fünften Tag nach Isolation erreichten die pankreatischen Sternzellen etwa 70 – 90 % Konfluenz und konnten 1:2 in die Passage 1 gesplittet werden.



**Abb. 4: Wachstum pankreatischer Sternzellen in Zellkulturschalen nach der Isolation.** Es wurde ein Zeiss Axiovert 25 Phasenkontrast-Mikroskop mit Zeiss Axiocam ICC1 verwendet. Die Aufnahmen erfolgten in 10-facher Vergrößerung am Tag der Isolation (0 h; links), zwei Tage nach Isolation (48 h; mittig) und vier Tage nach Isolation (96 h; rechts). Es ist die mit der Aktivierung der PSCs einhergehende morphologische Veränderung und Zell-Proliferation zu sehen.

### 2.2.2 Zellkultur, Passagieren und Zellzählung

Die murinen pankreatischen Sternzellen wurden in den Passagen 0 und 1 ausschließlich in 100 x 20 mm Zellkulturschalen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft in DMEM/Ham-F12 kultiviert. Zum Passagieren bei mindestens 70 % Konfluenz wurden die Zellen zuerst mit 10 ml vorgewärmtem sterilen PBS gewaschen. Sodann wurden die Sternzellen mit 1 ml einer Trypsin-Lösung (0,05 % in EDTA) für vier Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und der Verdau anschließend durch Zugabe von 10 ml vorgewärmtem DMEM/Ham-F12 gestoppt. Die Zellsuspension konnte nun je nach Zellkonfluenz und Versuchsaufbau auf zwei oder mehr neue Zellkulturschalen verteilt werden. Anschließend wurden je nach Größe der Zellkulturschale und nach Herstellervorgabe entsprechende Mengen Kulturmedium zur Zellsuspension ergänzt, so wurde z.B. bei 10 cm Durchmesser mit DMEM/Ham-F12 auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt.

Zur Zellzählung wurde die gesamte Zellsuspension in ein 15 ml-*Falcon*-Röhrchen überführt und bei 1040 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 0,5 – 1 ml entfernt und das Pellet sodann resuspendiert. Es wurden 10 µl der Zellsuspension in eine standardisierte Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop in vier vorgegebenen Quadranten (Q1 – Q4) ausgezählt.

Die Zelldichte der Suspension wurde unter Anwendung folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zelldichte [Zellen/}\mu\text{l]} = \frac{(Q1+Q2+Q3+Q4) \times 10}{4}$$

### 2.2.3 Migrationsanalyse pankreatischer Sternzellen

Zur Analyse der Zellmigration wurden pankreatische Sternzellen in Zellkulturflaschen T12,5 der Firma Corning (New York, USA) ausgesät, welche einen Tag zuvor mit einer der physiologischen Umgebung der Sternzellen angepassten Kollagen-Matrix nach Nielsen *et al.* [114] beschichtet wurden (siehe Tabelle 4). Nach der Matrix-Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht wurden je 27.000 Sternzellen pro Zellkulturflasche mit 2,5 ml DMEM/Ham-F12 zugegeben. Anschließend wurden die Flaschen mit leicht geöffnetem Deckel zum Gasaustausch erneut über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> belassen.

**Tabelle 4:** Matrixzusammensetzung bei Zellmigrationsfilmen nach Nielsen *et al.* [114]

Matrixkomponente	Stock-Konzentration	Volumen	Zielkonzentration
HEPES 10x	100 mmol/l	100 µl	10 mmol/l
RPMI 10x	104 g/l	100 µl	10,4 g/l
NaOH	1 M	4,8 µl	pH 7,4
ddH <sub>2</sub> O		497 µl	
Laminin	1 mg/ml	40 µl	40 µg/ml
Fibronektin	1 mg/ml	40 µl	40 µg/ml
Kollagen III	1 mg/ml	12 µl	12 µg/ml
Kollagen IV	0,9 mg/ml	6 µl	5,4 µg/ml
Kollagen I (G)	4 mg/ml	200 µl	800 µg/ml
Gesamtvolumen		1000 µl	

Am darauffolgenden Tag erfolgte eine sechsstündige Fotodokumentation der migrierenden Sternzellen unter dem Phasenkontrast-Mikroskop. Dazu wurden die Sternzellen mit dem TRPV4 – Inhibitor HC067047 (1 µM), dem TRPV4 – Aktivator GSK1016790A (10 nM) oder mit dem Piezo1-Agonist Yoda1 (5; 15 und 50 µM) über den Zeitraum der Messung behandelt (Tabelle 5 und 6) [60,82,115]. Als Negativkontrolle diente die Zugabe des jeweils äquivalenten Volumens an Lösungsmittel (DMSO; siehe Tabelle 5). Die Kulturflaschen wurden vor dem Start des Versuches fest verschlossen, um die korrekte CO<sub>2</sub>-Konzentration in ihrem Inneren aufrechtzuerhalten, da Bicarbonat-gepuffertes Medium verwendet wurde. Die Migrationsexperimente erfolgten in auf 37 °C vorgewärmten Wärmekammern zeitgleich an vier Messplätzen mit Zeiss Axiovert 25 Phasenkontrast-Mikroskopen und angeschlossenem Hamamatsu Kameramodul (Hersching, Deutschland). Die Software HiPiC 7.1.0 (*High performance image control system*, Hamamatsu) steuerte die Aufnahme von jeweils 73 Bildern in Fünf-Minuten-Intervallen.

**Tabelle 5:** Verwendete Kanal-Aktivatoren und -Inhibitoren

Wirkstoff	Wirkung	Eingesetzte Konzentration	% DMSO im Kulturmedium
HC067047	TRPV4-Inhibitor	1 $\mu$ M	0,1 %
GSK1016790A	TRPV4-Agonist	10 nM	0,1 %
Yoda1	Piezo1-Agonist	5; 15; 50 $\mu$ M	0,075 %; 0,075 %; 0,25 %

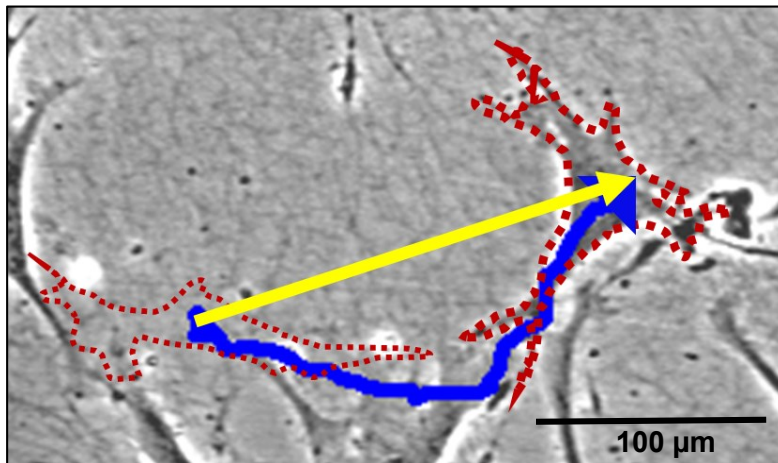
**Tabelle 6:** Murine IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-Werte der Inhibitoren und Aktivatoren

Wirkstoff	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> -Wert
HC067047	50-120 nM
GSK1016790A	18 nM
Yoda1	17,1 $\mu$ M

Die Auswertung der Migrationsfilme erfolgte mithilfe der Amira Imaging Software Version 2.2 (*Template Graphics Software, Mercury Communication Systems, Carlsbad, USA*). Hierbei wurden die migrierenden Sternzellen in jedem aufgenommenen Bild manuell umrandet, sodass ein Koordinatensatz (x(t) und y(t)) des aus der Umrandung ermittelten geometrischen Schwerpunkts jeder Zelle über den Zeitverlauf berechnet werden konnte. Die maßstabsgetreue Umrechnung von Zellzentrum und Zellfläche zu [ $\mu$ m]-Werten aus den Pixel-Angaben erfolgte durch das RLE-Reader-Plugin von ImageJ 1.51f (National Institutes of Health, USA).

Aus den so erhaltenen Messwerten können die Gesamtwegstrecke, Geschwindigkeit und Translokation der jeweiligen Sternzelle ermittelt werden. Der Unterschied zwischen Gesamtwegstrecke und Translokation wird in der Abbildung 5 verbildlicht. Zudem kann die Direktionalität einer Zelle als Maß der gezielten Bewegung aus dem Quotienten von Translokation und Gesamtwegstrecke berechnet werden. Dabei nimmt die Direktionalität einen Wert zwischen 0 und 1 an. Je näher sich dieser Wert an der 1 befindet, desto gerichteter ist die Bewegung einer Zelle. Zudem kann die projizierte Zellfläche der Sternzellen aus dem Datensatz ermittelt werden, wie auch der Strukturindex. Letzterer beschreibt die Gestalt einer Zelle mit einem Wert zwischen 0 und 1, wobei sich Werte gegen 1 einer Kreisform annähern. Folglich gilt, dass niedrige Werte auf eine verzweigte Zellform hinweisen.





**Abb. 5: Gesamtwegstrecke und Translokation einer Sternzelle.**

Es ist exemplarisch die Migration einer Sternzelle über den Zeitraum von sechs Stunden dargestellt. Die Start- und Endposition der Sternzelle sind rot umrandet, wobei die Zelle sich zum Zeitpunkt der Aufnahme in ihrer Endposition befindet. Der blaue Pfeil stellt die zurückgelegte Gesamtwegstrecke der Sternzelle über den Zeitraum dar. Der gelbe Pfeil verbindet die Start- und Endposition des Zellmittelpunktes. Die Länge dieses Vektors gibt die Translokation der Zelle an.

Gesamtwegstrecke der Sternzelle über den Zeitraum dar. Der gelbe Pfeil verbindet die Start- und Endposition des Zellmittelpunktes. Die Länge dieses Vektors gibt die Translokation der Zelle an.

#### 2.2.4 Migrationsexperimente mit Sternzell-Sphäroiden

Zur Untersuchung der dreidimensionalen Migration und Matrix-Interaktion von pankreatischen Sternzellen wurden Sphäroide hergestellt. Dazu wurde die *Hanging-drop*-Methode verwendet [110]. Es wurden pro Sphäroid 5000 pankreatische Sternzellen mit 32  $\mu\text{l}$  DMEM/Ham-F12 und 8  $\mu\text{l}$  1,2 % Methylzellulose versetzt. Die 40  $\mu\text{l}$  großen Sphäroid-haltigen Tropfen wurden in den Deckel einer 10 cm – Zellkulturschale pipettiert. Um eine feuchte Atmosphäre herzustellen und somit das Verdunsten der Sphäroid-Tropfen zu verhindern, wurden in die Zellkulturschale selbst 10 ml PBS -/- gegeben. Nach vorsichtigem Wenden und Aufsetzen des Deckels auf die Zellkulturschale wurde diese für 48 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> belassen. In diesem Zeitraum erfolgt ein Absinken der Zellen in den Tropfen. Durch die Methylzellulose wird dabei die Formation dreidimensionaler kompakter Zellkugeln gefördert [116].

Zur Einbettung der Sphäroide in eine komplexe 3D-Matrix wurden die zellhaltigen Tropfen nach 48 Stunden Inkubation vorsichtig mit einer 1 ml Eppendorf-Pipette aufgesogen und in ein *Falcon*-Röhrchen mit DMEM/Ham-F12 überführt. Bei vorsichtigem Vorgehen sind sodann kugelförmige Zellgebilde sichtbar. Je vier Sphäroide wurden anschließend mit 70  $\mu\text{l}$  Kulturmedium in eine 1000  $\mu\text{l}$  - Pipettenspitze aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß mit den Komponenten der komplexen Matrix überführt. Die Matrixzusammensetzung ist in Tabelle 7 einzusehen.

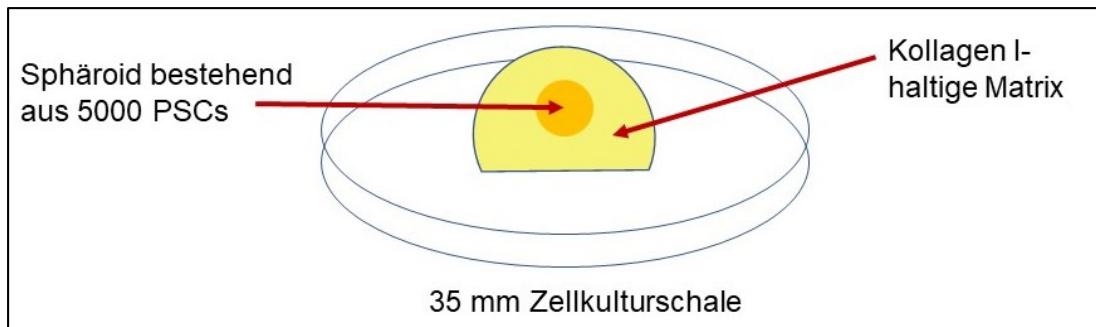
**Tabelle 7:** Matrixkomponenten zur Einbettung von vier Sphäroiden

Matrixkomponente	Stock-Konzentration	Volumen	Zielkonzentration
HEPES 10x	100 mmol/l	60 µl	14,9 mmol/l
RPMI 10x	104 g/l	30 µl	7,7 g/l
NaOH	1 M	5,95 µl	pH = 7,4
FluoSpheres® 1,0 µm	1x10 <sup>10</sup> beads/ml	1,6 µl	
Laminin	1 mg/ml	30 µl	74,4 µg/ml
Fibronektin	1 mg/ml	30 µl	74,4 µg/ml
Kollagen III	1 mg/ml	10,8 µl	26,8 µg/ml
Kollagen IV	0,9 mg/ml	5,4 µl	12,1 µg/ml
Kollagen I ( <i>rattail</i> )	10,97 mg/ml	159 µl	4328 µg/ml
mPSC in DMEM/Ham-F12	4 Sphäroide	70 µl	5000 Zellen/Sphäroid
Gesamtvolumen		403 µl	

Alle Komponenten wurden mit gekühlten Pipettenspitzen pipettiert und bis zur Einbettung des Sphäroids auf Eis gelagert. Nach vorsichtigem Durchmischen von Matrixkomponenten und Sphäroiden wurden je 80 µl Matrix mit je einem Sphäroid aus dem Eppendorf-Gefäß aufgenommen und in eine 35 mm Zellkulturschale zentral zu einem Tropfen pipettiert (schematische Darstellung in Abb. 6). Bei einigen Sphäroiden wurden den Matrixkomponenten zur Migrationsbeobachtung der Sternzellen in Zeitintervall-Filmen 1,6 µl lichtdichte *Microbeads* (FluoSpheres;  $c = 10^7$  beads/µl) mit einem Durchmesser von 1 µm zugesetzt (siehe Tabelle 7). Erst anschließend erfolgte ein Durchmischen der Matrixkomponenten sowie die Zugabe von Sternzellen, sodass eine gleichmäßige Verteilung der *Microbeads* gewährleistet wurde.

Zur Auspolymerisation der Matrix wurde der jeweilige Sphäroid sofort in einen 37 °C-Inkubator gestellt. Dem Absinken des Sphäroids auf den Grund des Matrixtropfens wurde durch zehnmaliges Wenden der Zellkulturschale nach je 60 s um 180° vorgebeugt. Dabei muss unter vorsichtigem Vorgehen ein Zerlaufen des Tropfens verhindert werden. Anschließend wurden die Sphäroide für weitere 15 Minuten auf dem Kulturschalen-Deckel (um 180° gewendet) inkubiert, um das Risiko eines nachträglichen Absinkens zu minimieren.

Nachfolgend härtete die Matrix für weitere zwei Stunden bei 37 °C aus. Dann wurden die Sphäroide mit 2,5 ml HEPES-gepuffertem RPMI-Medium (mit 10 % FCS-Gold und 1 % P/S) überschichtet und erneut für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Stimulation der Migration wurde 50 ng/ml PDGF (*platelet derived growth factor*) hinzugefügt, welcher sich als wichtiger Chemotaxis-Faktor für pankreatische Sternzellen erwiesen hat [117].



**Abb. 6: Schematischer Aufbau der 3D-Zellkultur.** Es ist ein aus 5000 PSCs bestehender Sphäroid (in gelb-orange abgebildet) in einem Kollagen I-haltigen Matrixtropfen (beige) dargestellt. Als Grundlage dient eine 35 mm Zellkulturschale. Der Sphäroid berührt dabei weder den Rand des Matrixtropfens, noch den Boden der Zellkulturschale.

#### Aufnahme von Migrationsfilmen

Zur quantitativen Analyse des Zugs der PSCs an der extrazellulären Matrix wurden während der Sphäroid-Einbettung lichtdichte *Microbeads* von 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser in die Matrix inkludiert. Die Sphäroide wurden unmittelbar vor Messbeginn mit 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 oder zur Kontrolle mit 0,1 % des Lösungsmittels DMSO stimuliert. Zur Verhinderung der Verdunstung des Kulturmediums wurden die Zellkulturschalen mit Parafilm verschlossen. Bei zehnfacher Vergrößerung unter einem Phasenkontrast-Mikroskop der Migrationsmessplätze (siehe Kapitel 2.2.3) wurde je ein Sphäroid in einer 37 °C Wärmekammer platziert. Dieser wurde in einer Ecke des mikroskopischen Gesichtsfeldes eingestellt, sodass neben der Auswanderung der Sternzellen der Zug des Sphäroids an der ECM und die darin eingebetteten *Microbeads* dargestellt werden konnten (vgl. Abb. 18 A in Kapitel 3.3). Es wurden für 48 Stunden in zehnminütigen Intervallen Bilder der migrierenden Sternzellen in den Sphäroiden und aus diesen heraus aufgenommen. Durch die Technik der Zeitraffer-Videomikroskopie ist es möglich, die Bewegung der *Microbeads* in der ECM zu visualisieren. Die Auswertung mit dem *Manual Tracking-Plugin* von ImageJ erlaubt eine Verfolgung einzelner *Microbeads* über den Zeitraum maximaler ECM-Kontraktion. Dieser liegt durchschnittlich zwischen 18 und 30 Stunden nach Messbeginn. Je Sphäroid wurde die Bewegung von 10 *Microbeads* über einen Zeitraum von ca. 12 Stunden erfasst und deren Geschwindigkeit in  $\mu\text{m}/\text{h}$  berechnet.

#### Sphäroid Migration-Endpunktmessungen

Ebenso wurden parallel weitere Sphäroide mit 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 oder 0,1 % des Lösungsmittels DMSO behandelt und für 48 Stunden bei 37 °C in einer Feuchtkammer kultiviert. Zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden wurden bei fünffacher Vergrößerung (Zeiss Axiovert 25 –

Phasenkontrast-Mikroskop mit Zeiss Axiocam ICC1-Kamera) Bilder der Sphäroide aufgenommen. Anschließend wurde mithilfe von ImageJ die Fläche der Kernzone und der Invasionszone der Sphäroide durch manuelles Umranden ermittelt. Dabei wurde die bestimmte Invasionsfläche relativ zur Fläche der Kernzone (zum Zeitpunkt  $t = 0$ ) angegeben, um eventuelle Größenunterschiede der Sphäroide als Störeinfluss zu vermeiden. Weiterhin wurden die „*detached cells*“ der aufgenommenen Sphäroide, also die aus dem Verbund des Sphäroids ausgetretenen Sternzellen, nach 24 und 48 Stunden manuell ausgezählt.

Aus den Messungen ausgeschlossen wurden Sphäroide, welche ein zweidimensionales Wachstum am Grund der Zellkulturschale aufwiesen. In diesem Fall lassen sich die Sternzellen in ihrer typischen flächigen Morphologie, wie aus den zweidimensionalen Migrationsanalysen bekannt, am Boden der Zellkulturschale mit dem Mikroskop scharf einstellen.

### **2.2.5 Die Mangan-Quench Technik**

Die Dynamik des Calcium-Einstroms in pankreatischen Sternzellen wurde mithilfe der Mangan-Quench-Technik unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Fura2-AM (Invitrogen) dargestellt. Fura2-AM (Fura-2-Acetoxy-Methylester) ist ein membrangängiger Farbstoff, welcher intrazellulär über eine Esterabspaltung zelleigener Esterasen angereichert wird. Fura2 ist in der Lage, mit seinen negativ geladenen Carboxylgruppen ein Calcium-Ion zu binden. Bei Anregung mit Licht im Bereich von 340 – 380 nm Wellenlänge wird ein Fluoreszenzsignal von 510 nm Wellenlänge emittiert. Dieses ist bei Anregung mit 340 nm umso größer, jedoch bei 380 nm umso niedriger, je höher die Calciumkonzentration ist. Durch eine Anregung mit Licht von 365 nm Wellenlänge kann eine von Änderungen der Calcium-Konzentration unabhängige Emission erreicht werden [118,119].

Die Mangan-Quench-Technik wird als indirekte Messmethode zur Bestimmung des Calcium-Einstroms in Zellen verwendet [120,121]. Diese basiert darauf, dass Mangan-Ionen mit einer höheren Affinität als Calcium-Ionen an Fura2 binden und indes zu einer Extinktion des Fluoreszenzsignals führen. Mangan-Ionen können die Zellmembran über Calcium-permeable Kanäle passieren. Bei Durchführung der Mangan-Quench-Methode erfolgt die Anregung von Fura2 bei der isosbestischen Wellenlänge von 365 nm, wobei unbeeinflusst von Änderungen der Calcium-Konzentration eine Fluoreszenz von 510 nm Wellenlänge entsteht [119,121]. Die gemessene Abnahme der Fluoreszenzintensität ist folglich abhängig vom Manganeinstrom in die Zelle. Je höher die Permeabilität der Zellmembran für Mangan-Ionen ist, desto steiler (bei negativer Steigung) stellt sich die ermittelte Kurve der Intensitätsabnahme dar. Schlussendlich

kann auf diesem Wege über den Manganeinstrom auf die Aktivität von Calcium-permeablen Membrankanälen rückgeschlossen werden.

Die pankreatischen Sternzellen wurden zwei Tage vor der Messung in 35 mm Zellkulturschalen mit Glasboden (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) ausgesät. Die Glasbodenschalen wurden dazu für 15 Minuten mit 500 µl 0,1 % Poly-L-Lysin bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Kulturschalen für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen, um die Polymerisation des Poly-L-Lysins am Glasboden zu ermöglichen. Nachfolgend wurde eine Sternzellsuspension in DMEM/Ham-F12 in die beschichteten Glasbodenschalen überführt.

Am Tag der Messung wurde das Kulturmedium der Glasbodenschalen abgesaugt und die Sternzellen für 30 Minuten mit 1 ml 6 µM Fura2-AM (in HEPES-gepufferter Ringerlösung) (Tabelle 8) bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Fura2 lag dabei in wasserfreiem DMSO gelöst vor. Anschließend wurde überschüssiges Fura2 durch Waschen mit 1 ml HEPES-gepufferter Ringerlösung entfernt und 1 ml selbiger Lösung in die Zellkulturschale pipettiert.

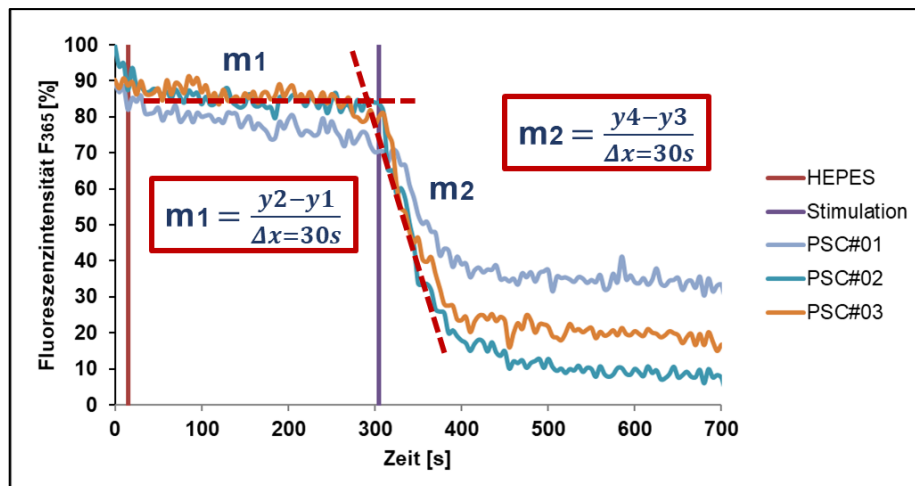
**Tabelle 8:** Zusammensetzung von HEPES-gepufferter Ringerlösung (pH 7,4; bei 37 °C)

Chemikalie	Konzentration
NaCl	122,5 mM
KCl	5,4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,8 mM
D-Glucose	5,5 mM
HEPES	10 mM

Zur Messung des Fluoreszenzsignals wurde ein inverses Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit einem 40-fach Ölimmersionsobjektiv verwendet. Die Kamera und der Polychromator stammten von VisiChrome (Visitron Systems, Puchheim, Germany). Über den Polychromator kann die Wellenlänge zur Anregung der Zellen ausgewählt werden, z.B. 365 nm, wie hier angewandt. Zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Temperatur von 37 °C wurde eine Wärmekammer für Zellkulturschalen auf dem Objektisch installiert. Die Aufnahmen, gesteuert durch die VisiVIEW Imaging Software, erfolgten mit einer Belichtungszeit von 200 ms, Binning = 2, und in 5 s Intervallen. Die Sternzellen wurden mit Licht der Wellenlänge von 365 nm angeregt. Die Emission lag um 510 nm. Nach einer Stabilisierungszeit von 300 s wurde 1 ml einer vorgewärmten 800 µM Manganchlorid-Lösung in HEPES-gepufferter Ringerlösung zum Kulturmedium der Sternzellen zugegeben. Die Zielkonzentration des Manganchlorids im Kulturmedium betrug somit 400 µM. Ebenso wurden

die PSCs im gleichen Schritt mit dem TRPV4-Agonisten (GSK1016790A, Zielkonzentrationen: 10; 20; 100 nM), dem TRPV4-Inhibitor (HC067047, Zielkonzentration: 2 µM), dem Piezo1-Agonisten (Yoda1, Zielkonzentration: 20 µM) oder mit 0,2 % des Lösungsmittels DMSO (als Negativkontrolle) behandelt. Die Extinktion des Fluoreszenzsignals bei Mangan-Zugabe wurde für weitere 400 s aufgezeichnet und variierte mit dem jeweils eingesetzten Kanalmodulator.

Zur Berechnung der Fluoreszenzintensitätsabnahme einer pankreatischen Sternzelle über den Versuchsverlauf wurde zunächst mithilfe der Software VisiVIEW eine perinukleäre Region zur Intensitätsmessung ausgewählt. Von den Intensitätswerten über die Messdauer ist zu jedem Zeitpunkt eine Hintergrundintensität abzuziehen. Anschließend kann die zeitabhängige Fluoreszenzintensität für jede Sternzelle eines Gesichtsfelds des Mikroskops, wie in der Abbildung 7 exemplarisch für drei Zellen erfolgt, dargestellt werden.



**Abb. 7: Die Berechnung des Calcium-Einstroms als  $\Delta m(F_{365}/t)$ .** Im Diagramm ist auf der y-Achse die relative Fluoreszenzintensität der perinukleären Zellregionen von drei exemplarischen PSCs (PSC#01 – PSC#03) aufgetragen, die Hintergrundintensität wurde zuvor subtrahiert. Mit „HEPES“ ist der Beginn der Messung markiert, am Zeitpunkt „Stimulation“, etwa 300 s nach Messbeginn, erfolgte die Zugabe von manganhaltiger HEPES-gepufferter Ringerlösung (Zielkonzentration: 400 µM  $Mn^{2+}$ ) und ebenso eines Kanalmodulators bzw. äquivalenter Mengen des Lösungsmittels DMSO (CTR). Für die Berechnung werden zwei Regressionsgeraden über je ein Messintervall von 30 s, eine vor ( $m_1$ ) und eine nach der Stimulation ( $m_2$ ) pro Zelle ermittelt, wie hier für die Sternzelle 03 dargestellt. Die Berechnung von  $\Delta m(F_{365}/t)$  erfolgt durch Subtraktion  $m_2 - m_1$ .

Auf den Calcium-Einstrom wird aus der Fluoreszenzabnahme  $\Delta m(F_{365}/t)$  geschlossen. Dazu wird ein Intervall für  $m_1$  von 30 s kurz vor der Stimulation und ein Intervall für  $m_2$  von 30 s nach der Stimulation im Bereich des maximalen Effekts festgelegt. Für beide Intervalle wird die

Steigung ermittelt. Für  $m_1$  liegen häufig negative Werte vor, da die Fluoreszenzemission von Fura2 über die Zeit geringfügig absinkt. Um einen Vergleich der Messungen zu gewährleisten, wurde mit konstanter Belichtungszeit gearbeitet und der Zeitpunkt der Stimulation auf  $t = 300$  s festgelegt. Zur Ermittlung der Steigungsdifferenz nach Stimulation als Parameter für die Dynamik des Calcium-Einstroms wird  $\Delta m(F_{365}/t) = m_2 - m_1$  berechnet. Führt die Stimulation zu einem Mangan-Einstrom in die Zelle, so sollte die Fluoreszenzemission nach Mangan-Zugabe schneller abfallen und damit  $m_2 < m_1$  gelten, wobei  $m_2 < 0$  ist. Dadurch nimmt  $\Delta m(F_{365}/t)$  in den Mangan-Quench-Messungen in der Regel negative Werte an.

### Verwendung von Blebbistatin

In einigen Experimenten wurden die pankreatischen Sternzellen vor der Mangan-Quench-Messung mit  $5 \mu\text{M}$  des Myosin II-ATPase-Inhibitors (Blebbistatin) vorbehandelt [96]. Dazu wurden die Zellen nach der halbstündigen Inkubation mit Fura2 mit  $1 \text{ ml } 5 \mu\text{M}$  Blebbistatin (in HEPES-gepufferter Ringerlösung) behandelt und für weitere 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Auch die während der Messung zugegebene manganhaltige Ringerlösung enthielt in diesem Fall  $5 \mu\text{M}$  Blebbistatin. Zur Vermeidung von beschriebenen fototoxischen Effekten durch Blebbistatin [122] wurde die Stabilisierungszeit unter  $365 \text{ nm}$  – Belichtung vor Mangan-Zugabe von  $300 \text{ s}$  auf  $200 \text{ s}$  gesenkt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

### 2.2.6 Immunfärbungen pankreatischer Sternzellen

Für die Immunfärbungen wurden je  $30.000 - 40.000$  pankreatische Sternzellen auf  $20 \text{ mm}$ -Deckgläschen in einer *12-Well*-Platte ausgesät. Die Deckgläschen wurden am Vortag mit einer Kollagen-Matrix (siehe Tabelle 4), welche  $1:10$  in Aqua dest. verdünnt wurde, beschichtet und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator belassen. Der Überstand der Matrix-Lösung wurde vor der Überführung der PSCs am Folgetag abgenommen.

Nach 48 Stunden Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  wurden die Sternzellen für eine Stunde mit  $5 \mu\text{M}$  Yoda1, mit  $20 \text{ nM}$  des TRPV4-Agonisten oder mit  $2 \mu\text{M}$  des TRPV4-Inhibitors behandelt. Die Kontrollgruppe wurde mit einem äquivalenten Volumen des Lösungsmittels DMSO ( $0,2\%$ ) behandelt. Zur Bestimmung der Auswirkung von Blebbistatin auf das Zytoskelett mithilfe einer  $\alpha\text{-SMA}$ -Immunfärbung wurden weitere Sternzellen für 15 Minuten mit  $5 \mu\text{M}$  Blebbistatin inkubiert. Auch hier wurden den Kontrollen äquivalente Mengen des Lösungsmittels DMSO zugesetzt.

Die Fixation erfolgte auf Eis mit 500 µL 3,5 % PFA pro *Well* für eine Stunde. Anschließend wurden überschüssige Aldehyde mit 500 µl einer 100 mM Glycin-Lösung in PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur abgefangen. Das Glycin wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS +/- entfernt. Die fixierten Sternzellen wurden sodann in 2 ml PBS +/- pro *Well* bei 4 °C bis zum Folgetag gelagert. Um Verdunstung zu vermeiden, wurden die *Well*-Platten mit Parafilm verschlossen.

Erneut wurden die *Wells* am Folgetag zweimal mit PBS +/- gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die fixierten Zellen mit 500 µl 0,25 % Triton X – 100 in PBS pro *Well* bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS +/- wurden die Deckgläschen mit je 25 µl 10 % Ziegennormalserum (ZNS) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Dazu wurden diese um 180° gewendet auf einen Parafilmstreifen übertragen, sodass die zellhaltige Seite sich mit der ZNS-Lösung am Parafilmstreifen befand, und in eine Feuchtkammer überführt.

Zur Erstantikörperinkubation wurden die Deckgläschen aus der Feuchtkammer entnommen und je fünfmal in PBS +/- gewaschen. Anschließend wurden diese mit 25 µl Erstantikörper gelöst in 10 % ZNS (Tabelle 9) behandelt. Dazu wurden die Deckgläschen nach dem gleichen Prinzip auf einen Parafilmstreifen überführt, sodass die zellhaltige Seite erneut dem Parafilmstreifen anlag. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

Als Zweitantikörper wurden Ziege-anti-Kaninchen- oder Ziege-anti-Maus-Antikörper, markiert mit Alexa488, in einer 1:500 – Verdünnung in 10 % ZNS, verwendet (Tabelle 9). Auch hier wurden die Deckgläschen mit der sternzellhaltigen Seite nach unten in 25 µl einer Zweitantikörper-Lösung auf einem Parafilmstreifen für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Zuletzt wurden die Deckgläschen mit 15 µl 0,1 % DAPI in DAKO-*Mounting*-Medium auf Objektträgern fixiert. Die mindestens zweistündige Aushärtung des *Mounting*-Mediums sowie die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4 °C lichtgeschützt.

**Tabelle 9:** Eingesetzte Antikörper für Immunfärbungen

Antikörper	Eingesetzte Verdünnung in 10 % ZNS
Anti-α-SMA (Maus)	1:200
Anti-PMYL9 (Kaninchen)	1:100
Anti-nmMIIA (Kaninchen)	1:100
Anti-Maus-Alexa488 (Ziege)	1:500
Anti-Kaninchen-Alexa488 (Ziege)	1:500



Die Immunfluoreszenz der Antikörper-gefärbten Sternzellen wurde mit einem inversen Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit einem 40-fachen Ölimmersionsobjektiv sowie Kamera und Shutter von Visitron Systems (Puchheim, Germany) dokumentiert. Dabei wurde je eine Sternzelle zentral im Gesichtsfeld eingestellt. Die Bilder wurden mit der Software MetaVue 6.3r6 unter dem Fluoreszenzfilter Carl Zeiss Filter Set 10 (Emission: 515-565 nm; grün) aufgenommen. Zur Kontrolle erfolgten weitere Aufnahmen mit dem Filterset 15 (Emission: 590 nm; rot), um Artefakt-Färbungen im grünen Filter auszuschließen, und dem Filterset 49 (Emission 445 – 450 nm; blau) für die DAPI-Zellkern-Färbung.

Zur Auswertung der Immunfärbungen mit dem PMYL9- und dem nmMIIA-Antikörper wurden je verwendeter Maus (N = 3) und je Bedingung ([PMYL9 oder nmMIIA] und [5  $\mu$ M Yoda1 oder 20 nM des TRPV4-Agonisten oder 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors oder 0,2 % DMSO]) 30 gleichmäßig gefärbte und belichtete Sternzellen verwendet. Da die primären Antikörper für PMYL9 und nmMIIA aus der gleichen Spezies (Kaninchen) stammen, wurden die Experimente ungepaart durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität einer angefärbten Sternzelle, welche in 40-facher Vergrößerung im Gesichtsfeld jeweils zentral eingestellt wurde, wurde mit ImageJ 1.51f berechnet. Es wurde die Intensität der kompletten aufgenommenen Bildausschnitte bestimmt, wobei Artefakte über festgelegte Intensitätsgrenzen aus der Messung ausgeschlossen wurden. Dabei wurde je eingesetztem Kanalmodulator ein Quotient aus dem Fluoreszenzwert von PMYL9 und nmMIIA gebildet, sodass die Menge an phosphorylierter Myosin-Leichtkette 9 (PMYL9) jeweils auf die insgesamt vorliegende Menge an Myosin (nmMIIA, färbt die schwere Kette des nichtmuskulären Myosins II an) normiert wurde.

Die Auswertung der Immunfärbungen mit dem  $\alpha$ -SMA-Antikörper erfolgte durch ein Scoring-System, in welchem die Score-Werte 1; 2 oder 3 für die Ausprägung von „Kurvaturen“ in der Zellmembran, Stressfasern und Dendriten-ähnlichen Fortsätzen vergeben wurden. Beispielhafte Immunfluoreszenzbilder für jeden Score-Wert sind im Ergebnisteil in der Abbildung 20 einzusehen. Die Zuteilung von Score-Punkten zu den aufgenommenen Immunfluoreszenzbildern erfolgte unter einer Verblindung. Dabei wurden die Aufnahmen mit nicht zu einer Gruppe zuordbaren Zahlencodes ausgestattet und in ihrer Reihenfolge zufällig aufgerufen.

### 2.2.7 Piezo1-Kanalfärbungen lebender Sternzellen

Zur Immunfluoreszenz-Darstellung des Piezo1-Kanals der pankreatischen Sternzellen wurde ein Lebendfärbeprotokoll nach Waschk *et al.* [123] verwendet. Da der verwendete Piezo1-Antikörper an ein extrazelluläres Epitop des Piezo1-Proteins bindet, kann eine ausschließliche Darstellung des in die Zellmembran eingebauten Piezo1-Kanals sichergestellt werden.

Die PSCs auf mit Kollagen-Matrix beschichteten Deckgläschen der Passage 2 (wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben) wurden zunächst in ein HEPES-gepuffertes RPMI-Medium überführt. Dazu wurden die Deckgläschen mit den anhaftenden Sternzellen vorsichtig aus den *Wells* herausgehoben und in 35 mm Zellkulturschalen gegeben. Nach Zugabe von 2 ml HEPES-gepuffertem RPMI-Medium inkubierten die Sternzellen für zwei Stunden bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub>-Zugabe. Anschließend erfolgte analog zu den anderen Färbungsversuchen eine einstündige Stimulation der Sternzellen mit 5 µM Yoda1 bzw. 0,2 % des Lösungsmittels DMSO als Kontrolle. Ebenso wurde eine 15-minütige Inkubation mit 5 µM Blebbistatin bzw. mit 0,2 % des Lösungsmittels DMSO als Kontrolle durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen auf Eis überführt, um Exo- und Endozytoseprozesse der Zellmembran zu unterbinden. Zuerst erfolgte das Blockieren mit 1 %-iger BSA/Ringer-Lösung (= *Blocking*-Lösung) für eine Stunde bei 4 °C. Sodann wurden die Deckgläschen auf einen Parafilmstreifen in einer Feuchtkammer überführt und mit je 100 µl Kaninchen-Piezo1-Antikörper, 1:200 gelöst in *Blocking*-Lösung, benetzt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper fand für zwei Stunden bei 4 °C statt. Daraufhin wurden die pankreatischen Sternzellen zuerst zweimal mit *Blocking*-Lösung, dann dreimal mit Ringer-Lösung gewaschen, zuletzt in 35 mm Zellkulturschalen überführt und mit 3,5 % Paraformaldehyd für 20 Minuten bei 4 °C fixiert. Nach Entfernung der Aldehyd-Reste durch Waschen mit PBS +/- wurden die Deckgläschen mit dem Zweitantikörper Ziege-anti-Kaninchen Alexa488 (1:500 in *Blocking*-Lösung) inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei Dunkelheit für eine Stunde bei Raumtemperatur. Diese fand in einer feuchten Kammer auf einem Parafilmstreifen mit der sternzellhaltigen Seite des Deckgläschens nach unten und mit 25 µl Antikörpersuspension statt. Schließlich wurden die Deckgläschen nach erneutem Waschen in PBS +/- auf Objektträger überführt. Als Eindeckmedium dienten jeweils 15 µl *Dako-Mounting*-Medium, welches 0,1 % DAPI zur Färbung der Zellkerne enthielt. Die Dokumentation erfolgte, wie für die anderen Immunfärbungen beschrieben, an einem inversen Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung mit einer Kameraausstattung von Visitron Systems und der Software MetaVue 6.3r6. Dabei wurde je eine Sternzelle zentral im Gesichtsfeld eingestellt.

Die Auswertung erfolgte durch manuelles Auszählen der angefärbten Piezo1-Kanäle. Dazu wurden je Sternzelle mithilfe von ImageJ 10 quadratische Regionen von je 50 x 50 Pixeln Größe (entspricht 7,6 x 7,6 µm) eingezeichnet und die Anzahl der Kanäle jeweils ausgezählt.

Weitere 10 Quadrate gleicher Größe wurden im Bereich außerhalb der Zellgrenzen eingezeichnet und auch hier wurden alle aufleuchtenden Intensitätspunkte ausgezählt, um die Hintergrundintensität abzuziehen. Im Anschluss konnte die mittlere Kanaldichte durch Mittelwertbildung für die verschiedenen Bedingungen berechnet werden.

## 2.3 Statistische Analysen

Die Auswertung und graphische Darstellung der Messergebnisse erfolgten mittels Excel 2016. Statistische Tests wurden mit Origin Pro 8 durchgeführt. Mit „N“ wird im Folgenden die Anzahl an Experimenten und damit die Anzahl an berücksichtigten Tierindividuen bezeichnet. N ist für alle aufgeführten Experimente größer oder gleich drei. Weiterhin gibt „n“ die Anzahl an Datenpunkten, somit die Gesamtzahl der beobachteten Zellen für die jeweiligen Variablen an.

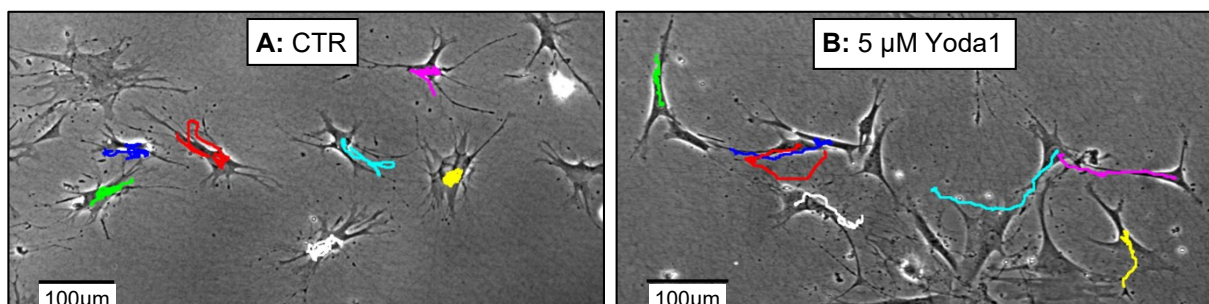
Die erhobenen Messdaten wurden auf eine Normalverteilung hin überprüft. Lag diese vor, wurde zur statistischen Evaluation eine *One-Way-ANOVA* herangezogen und bei Mehrfachvergleichen zur alpha-Adjustierung die Bonferroni-Methode angewandt. Das Signifikanzniveau beträgt  $p < 0,05$ . Zur graphischen Darstellung wurde der Mittelwert verwandt. Dieser ist jeweils mit dem zugehörigen Standardfehler (SEM) als Abweichungsmaß angegeben. Eine weitere Aufgliederung der Signifikanzwerte ist in den einzelnen Graphen wie folgt angegeben: \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$ . Bei fehlender Normalverteilung wurde die Kruskal-Wallis-ANOVA herangezogen ( $p < 0,05$ ) und bei Mehrfachvergleichen mit dem *Dunn's-Test* adjustiert. Die Darstellung erfolgt hier über den Median in einem Box Plot, wobei die Whisker das Minimum und Maximum der Datenwerte kennzeichnen. Im Falle der Zellmigrationsanalyse wurde zum Teil trotz fehlender Normalverteilung zur besseren Übersichtlichkeit die Darstellung der Mittelwerte mit SEM in Balkendiagrammen verwendet. In diesem Fall wird auf die Verteilung der Daten in der Legende gesondert hingewiesen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Migrationsanalyse pankreatischer Sternzellen

#### 3.1.1 Piezo1-abhängige Migration

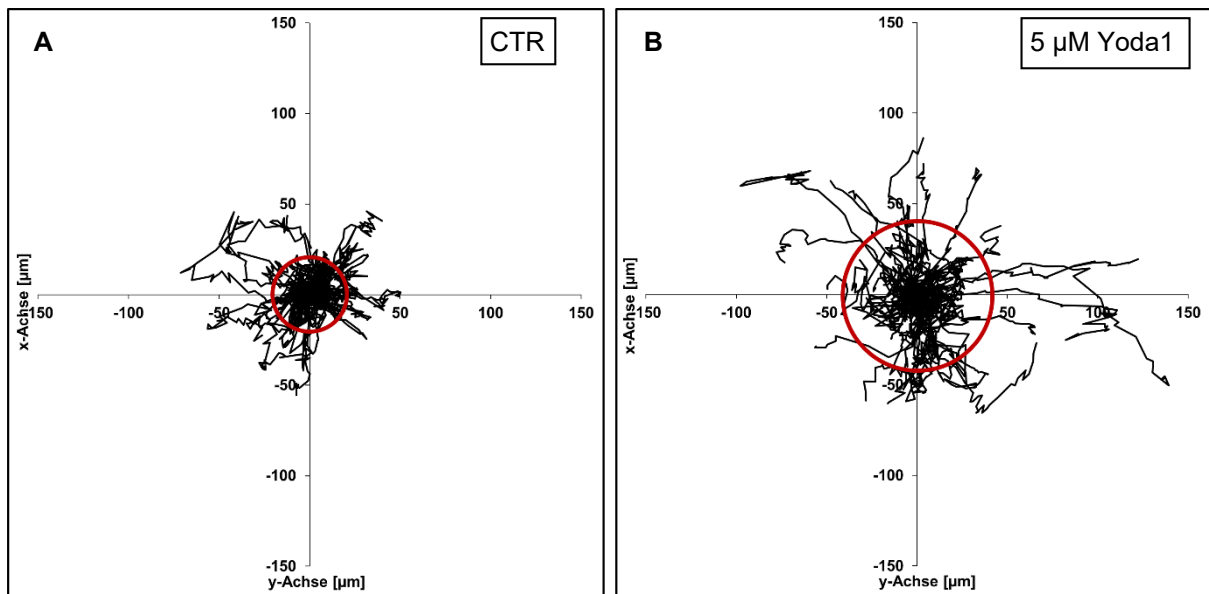
Unter der Hypothese, dass mechanosensitive Ionenkanäle einen Einfluss auf die Aktivierung und damit auf die Migration pankreatischer Sternzellen haben, wurde die ungerichtete Spontanbewegung von PSCs in zweidimensionaler Ebene auf einer Matrix analysiert. Das Piezo1-abhängige Migrationsverhalten pankreatischer Sternzellen wurde unter Verwendung des Aktivators Yoda1 erfasst. Dabei wurde direkt vor Start des sechsständigen Experiments der Wirkstoff in jeweils verschiedenen Dosierungen (Zielkonzentrationen: 5  $\mu\text{M}$ ; 15  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Yoda1) in das Kulturmedium der Sternzellen pipettiert. Für den Piezo1-Kanal ist bis dato noch kein spezifischer Inhibitor bekannt [124]. Kontrollmessungen wurden mit äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO (0,075 %) und bei Einsatz von 50  $\mu\text{M}$  Yoda1 entsprechend mit 0,25 % DMSO durchgeführt. Es zeigten sich insbesondere bei Inkubation mit geringen Konzentrationen von Yoda1 eine erhöhte Translokation, Direktionalität und auch Geschwindigkeit der pankreatischen Sternzellen (Abb. 8 und Abb. 9).



**Abb. 8: Die zurückgelegte Wegstrecke pankreatischer Sternzellen unter Piezo1-Stimulation.**

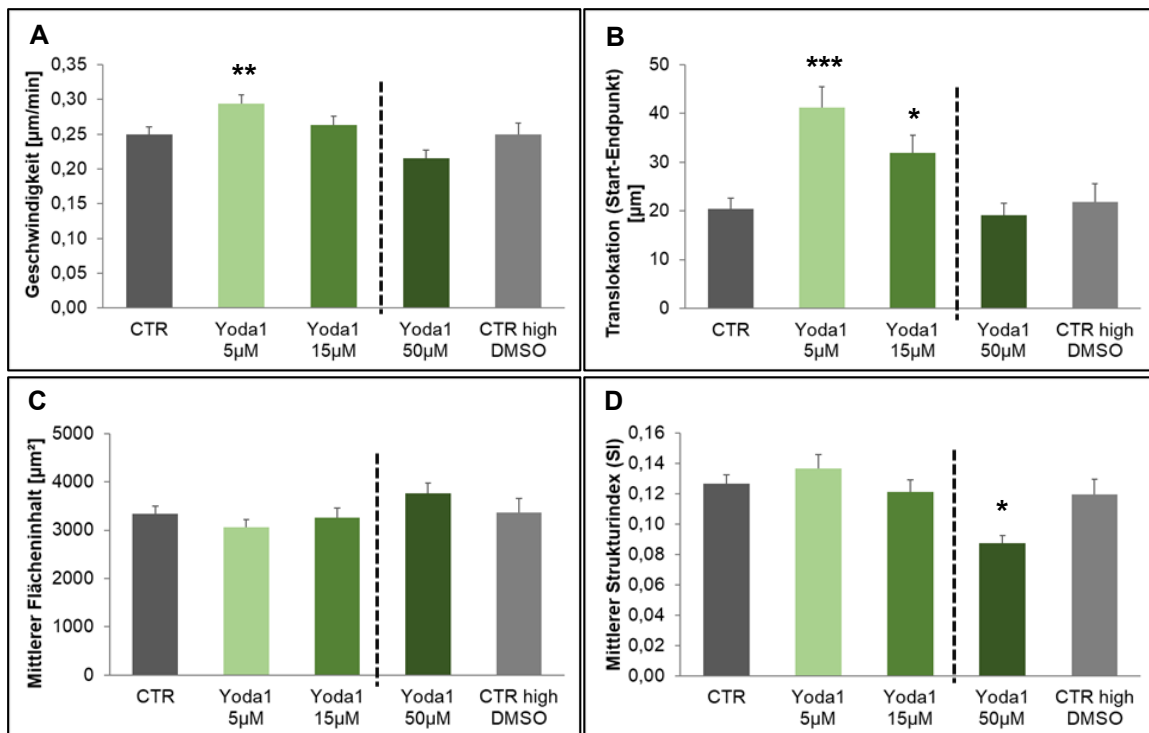
Für je sieben PSCs wurde pro Ausschnitt exemplarisch die Bewegung des Zellmittelpunktes über den Zeitraum von sechs Stunden dargestellt. Die vorliegenden Graphiken zeigen den Endpunkt nach sechs Stunden Spontanmigration und wurden mithilfe von ImageJ und dem *Manual-Tracking-Plugin* erstellt. In **A** ist das Kontrollexperiment dargestellt (CTR; 0,075% DMSO), in **B** erfolgte eine Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Yoda1. Im Vergleich ist die deutlich erhöhte Gesamtwegstrecke nach Piezo1-Aktivierung ersichtlich.

In der Abbildung 8 ist exemplarisch die Wegstrecke der Sternzellen bei Spontanmigration über den sechsständigen Zeitraum als Projektion auf die letzte Bildaufnahme der Migrationsdokumentation dargestellt. Hier ist eine längere und insbesondere gerichteter erscheinende Wegstrecke der mit 5  $\mu\text{M}$  Yoda1 behandelten Sternzellen erkennbar. Die PSCs unter Kontrollbedingungen zeichnen sich dagegen durch geringere Bewegungen in verschiedene Raumrichtungen aus, welche ungerichteter erscheinen (vgl. Abb. 8).



**Abb. 9: Trajektorien der Piezo1-abhängigen Zellmigration pankreatischer Sternzellen.** Es wird die Bewegung jeder untersuchten Zelle von einem gemeinsamen Startpunkt (Ursprung des Koordinatensystems) aus in die jeweilige zweidimensionale Raumrichtung dargestellt. Die Migration wurde über einen Zeitraum von sechs Stunden aufgezeichnet. Die Koordinaten des Endpunktes geben somit die Vektorkoordinaten der Translokation der jeweiligen Zelle an. Es ist die erhöhte Translokation der PSCs bei Behandlung mit 5 µM Yoda1 (B) im Vergleich zur Kontrolle (A: CTR, Behandlung mit einem äquivalenten Volumen des Lösungsmittels DMSO) ersichtlich. Mit roten Kreisen ist jeweils die mittlere Translokation für beide Gruppen eingezeichnet (mittlere Translokation unter Kontrollbedingungen:  $20,4 \pm 2,2 \mu\text{m}$  und nach Stimulation mit 5 µM Yoda1:  $41,2 \pm 4,3 \mu\text{m}$ ). N = 3; n = 50.

In der Abbildung 9 wurden mithilfe von Amira gewonnenen zeitabhängigen Koordinaten des Zellmittelpunktes Trajektorien erstellt. Diese sind auf den gemeinsamen Startpunkt U[0/0] normiert. So kann die Translokation über den gesamten Messzeitraum in zehnminütigen Intervallen für je 50 Zellen einzeln verfolgt werden. Hier zeigt sich eine deutlich größere räumliche Entfernung der PSCs vom Ursprung U bei Stimulation mit 5 µM Yoda1 im Vergleich zur Kontrollgruppe (N = 3, n = 50). Folglich ist die Translokation Piezo1-aktivierter Sternzellen erhöht. Zur übersichtlicheren Gesamtbeurteilung der Migrationsparameter sind die Mittelwerte für die verschiedenen Gruppen im Folgenden in Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 10).



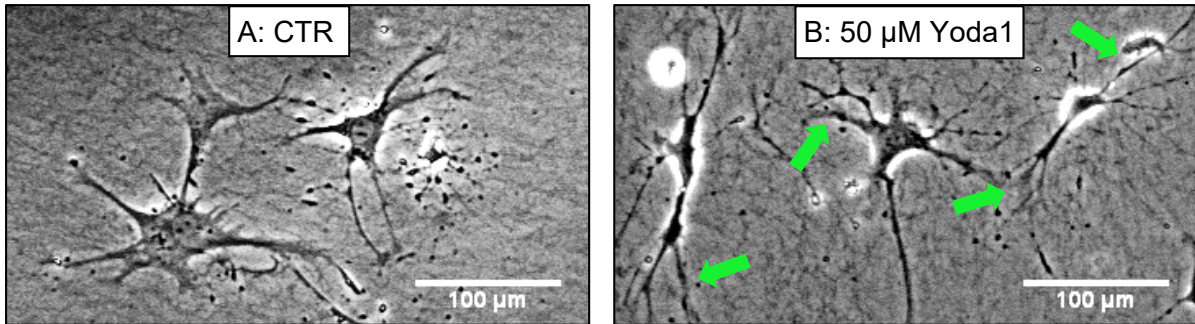
**Abb. 10: Piezo1-abhängige Veränderungen der Migrationsparameter pankreatischer Sternzellen.**

Die Auswertung erfolgte über einen Messzeitraum von sechs Stunden. Es sind jeweils Kontrolleexperimente unter Zugabe von 0,075 % des Lösungsmittels DMSO (CTR), Werte für die Stimulation mit 5 µM, 15 µM und 50 µM Yoda1 sowie ein „CTR high DMSO“- Kontrollwert dargestellt. Letzterer ist als Vergleichsparameter zur Stimulation mit 50 µM Yoda1 anzusehen, da hier eine Volumen-äquivalente Zugabe von 0,25 % des Lösungsmittels DMSO erfolgte. Zwischen den beiden Kontrollwerten zeigen sich nur geringfügige Differenzen. Die Angabe von Mittelwert und Standardfehler wurde trotz zum Teil fehlender Normalverteilung zur übersichtlicheren Darstellung gewählt. **A:** Eine Stimulation mit 5 µM Yoda1 erhöht die Migrationsgeschwindigkeit auf  $0,29 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$  (Kontrollwert:  $0,25 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Diese verringert sich tendenziell für den Einsatz von 15 µM Yoda1 und unterschreitet bei 50 µM Yoda1 diejenige der Kontrollbedingungen. **B:** Die Translokation ist bei Stimulation mit 5 µM Yoda1 ( $41,2 \pm 4,3 \mu\text{m}$ ) und 15 µM Yoda1 ( $31,9 \pm 3,6 \mu\text{m}$ ) signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle ( $20,4 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ). Bei Inkubation mit 50 µM Yoda1 ist auch diese tendenziell leicht vermindert zur Kontrolle. **C:** Die mittlere projizierte Fläche ist für alle Bedingungen von annähernd gleicher Größe wie der Kontrollwert  $3334,6 \pm 166,1 \mu\text{m}^2$ , bei Stimulation mit 50 µM Yoda1 zeigt sich diese tendenziell leicht erhöht ( $3768,2 \pm 210,1 \mu\text{m}^2$ ). **D:** Der mittlere Strukturindex sinkt mit steigender Yoda1-Konzentration und liegt für die Stimulation mit 50 µM Yoda1 bei  $0,09 \pm 0,01$  (Kontrollwert:  $0,12 \pm 0,01$ ). N = 3; n = 46 (CTR); 52 (5µM Yoda1); 47 (15µM Yoda1); 46 (50µM Yoda1); 37 (CTR high DMSO); SEM; \* p < 0,05 vs. CTR/CTR high DMSO; \*\* p < 0,01 vs. CTR; \*\*\* p < 0,001 vs. CTR.

Insgesamt zeigt sich ein zunächst unerwarteter dosisabhängiger Effekt von Yoda1 auf die Sternzellmigration. Besonders geringe Konzentrationen von Yoda1 (hier: 5 µM) führen dabei

zu einer gesteigerten Migration der Sternzellen (N = 3; n = 46; 52; 47; 46; 37). In diesem Falle ist die Migrationsgeschwindigkeit bei Stimulation mit 5  $\mu$ M Yoda1 um  $17,6 \pm 5,0$  % erhöht. Bei Einsatz von 15  $\mu$ M Yoda1 zeigt sich eine nur tendenzielle, nicht signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abb. 10 A). Dahingegen sinkt die Migrationsgeschwindigkeit bei Stimulation mit 50  $\mu$ M Yoda1 um  $13,6 \pm 4,8$  % unter den Kontrollwert (nicht signifikant). Für die Messergebnisse der Piezo1-abhängigen Translokation ergibt sich ein in die gleiche Richtung zielender und noch stärkerer Effekt. Während bei Behandlung mit 5  $\mu$ M Yoda1 die Translokation im Vergleich zur Kontrolle um  $102,0 \pm 21,2$  % erhöht ist, erreicht eine 15  $\mu$ M Yoda1-Inkubation noch eine Erhöhung um  $56,5 \pm 17,6$  %. Unter Einsatz von 50  $\mu$ M Yoda1 zeigt sich kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle, bei leichter Tendenz zur Unterschreitung der Translokationswerte unter die Kontrollwerte (vgl. Abb. 10 B). Die simultanen Effekte von Yoda1 auf die Geschwindigkeit und die Translokation der PSCs führen zu einem ähnlichen Ergebnis bei Betrachtung der Direktionalität der Sternzellen. Es zeigt sich also ebenfalls eine besonders große Steigerung der Direktionalität bei Stimulation mit geringeren Yoda1-Konzentrationen (Graphik nicht dargestellt). Insgesamt weisen PSCs bei Yoda1-Stimulation ein sowohl in der Geschwindigkeit als auch in der Direktionalität und Translokation gesteigertes Migrationsverhalten auf, welches sich bei steigender Dosis wieder vermindert.

Weiterhin wurden Zellgröße und Zellmorphologie mithilfe der Amira-Software 2.2 ermittelt. Neben der projizierten Fläche der Sternzellen wurde dazu der mittlere Strukturindex herangezogen. Dieser kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Je näher der Wert an die Zahl 1 heranrückt, desto mehr gleicht die Zellform einer kreisrunden Gestalt. Bei Betrachtung der projizierten Zellfläche ist kein Effekt der Piezo1-Aktivierung auf die PSCs ersichtlich (Abb. 10 C). Lediglich eine leichte Erhöhung dieser Fläche kann bei Stimulation mit hohen Yoda1-Konzentrationen vermutet werden. In Anwesenheit von 50  $\mu$ M Yoda1 kommt es dagegen zu einer Abnahme des mittleren Strukturindex der PSCs um  $26,5 \pm 4,4$  % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10 D). Da hohe Werte des Strukturindex für eine kreisähnliche Zellmorphologie sprechen, führt Yoda1 folglich zu einer stärker verästelten („dendritischen“) Zellform unter Ausbildung längerer dünner Zellfortsätze. Diese Beobachtung kann durch eine optische Analyse der migrierenden Zellen in den aufgenommenen Migrationsfilmen bestätigt werden (exemplarische Darstellung in Abb. 11). Hier zeichnen sich die PSCs bei Behandlung mit hohen Yoda1-Konzentrationen durch besonders lange und dünne Zellfortsätze aus, welche bei der Migration teilweise nicht retrahieren, wohingegen im Zelleib vermehrte Kontraktionen sichtbar werden.



**Abb. 11: Veränderung der Zellmorphologie von PSCs bei Stimulation mit 50 µM Yoda1.** Es sind beispielhaft zwei Bildausschnitte aus der Zellmigrationsanalyse dargestellt. **A:** Es handelt sich um eine Aufnahme der PSCs unter Kontrollbedingungen mit Zugabe von 0,25 % des Lösungsmittels DMSO. **B:** Bei Inkubation mit 50 µM Yoda1 zeigen die Zellen eine dendritische Morphologie mit einer starken Verästelung von dünnen Zellfortsätzen (siehe grüne Pfeile) und kontrahierten Zellsomata.

Zusammenfassend zeigt sich ein deutlicher Effekt des Piezo1-Kanals auf die Migration pankreatischer Sternzellen. Insbesondere die Stimulation mit geringen Konzentrationen des Piezo1-Agonisten Yoda1 führen zu einer erhöhten Geschwindigkeit, Translokation und Direktionalität der PSCs.

### 3.1.2 TRPV4-abhängige Migration

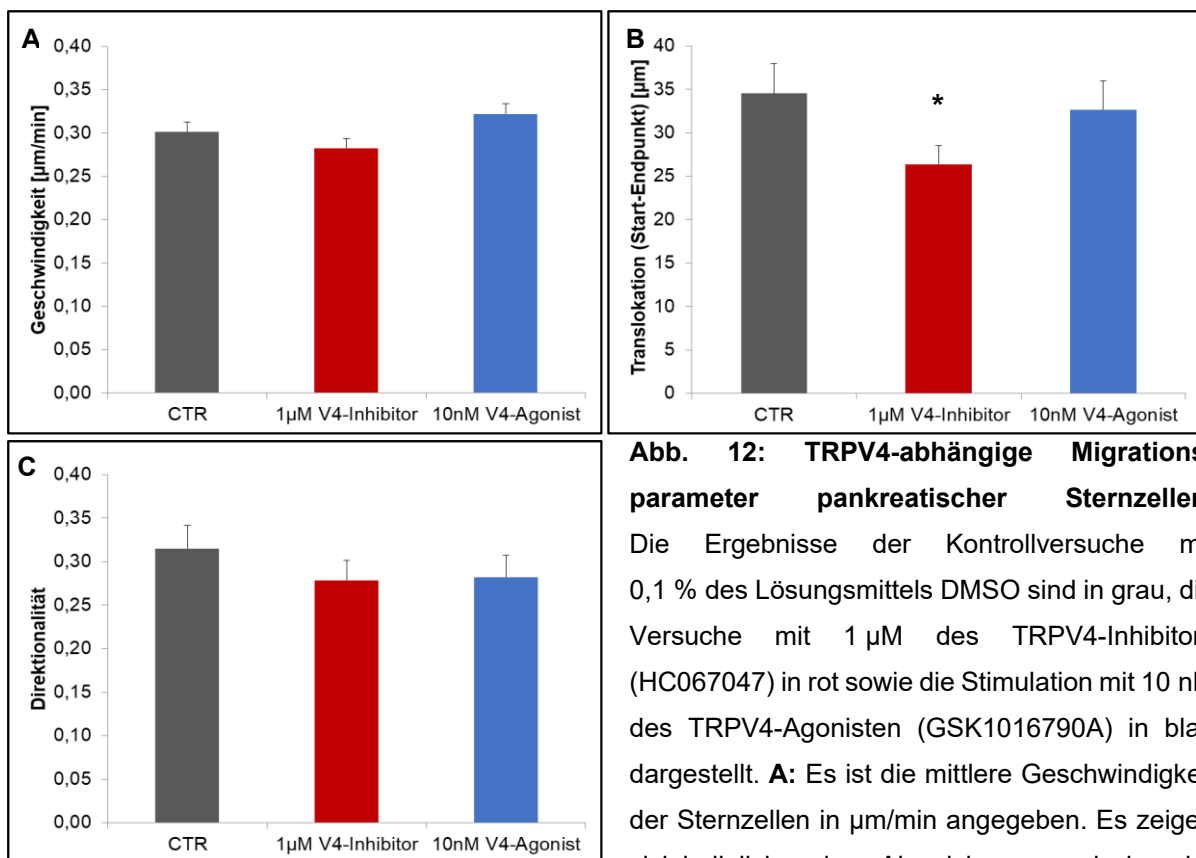
Unter den gleichen experimentellen Bedingungen wurde in weiteren Versuchsserien der Einfluss des TRPV4-Kanals auf die Migration pankreatischer Sternzellen untersucht. Es erfolgte eine Behandlung mit 10 nM des TRPV4-Agonisten (GSK1016790A) oder mit 1 µM des TRPV4-Inhibitors (HC067047). Dazu wurde die entsprechende Menge des Wirkstoffes unmittelbar vor Start des sechsständigen Experimentes in das Kulturmedium gegeben. Kontrollmessungen ohne Wirkstoff wurden mit äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO (0,1 %) durchgeführt.

#### TRPV4-abhängige Veränderung von Migrationsparametern

Zuerst werden die Geschwindigkeit, Translokation und Direktionalität von PSCs über den gesamten Verlauf von sechs Stunden dargestellt (Abb. 12). Insgesamt führt die Behandlung des TRPV4-Kanals mit 10 nM des TRPV4-Agonisten oder mit 1 µM des TRPV4-Inhibitors nur teilweise zu einem Effekt auf die betrachteten Zellmigrations-Parameter (N = 5, n = 60). Die



mittlere Geschwindigkeit der Sternzellen hat für alle Bedingungen vergleichbare Werte und zeigt damit keinen sichtbaren Einfluss des TRPV4-Kanals auf die Geschwindigkeit der migrierenden Zellen (vgl. Abb. 12 A). Dahingegen ist die Translokation bei TRPV4-Inhibition um  $23,6 \pm 6,3 \%$  vermindert ( $26,4 \pm 2,2 \mu\text{m}$  versus  $34,5 \pm 3,4 \mu\text{m}$  unter Kontrollbedingungen; vgl. Abb. 12 B). Die Sternzellen zeigen damit einen geringeren Abstand zwischen Start- und Endpunkt ihrer Bewegung innerhalb des beobachteten Zeitraums. Eine ähnliche Tendenz zeigt sich für die Direktionalität der PSCs, welche unter Hemmung des TRPV4-Kanals tendenziell leicht vermindert ist (vgl. Abb. 12 C). Die Stimulation der PSCs mit 10 nM des TRPV4-Agonisten führt zu keinen signifikanten Effekten bei tendenziell verringerter Translokation und Direktionalität im Vergleich zum Kontrollwert.

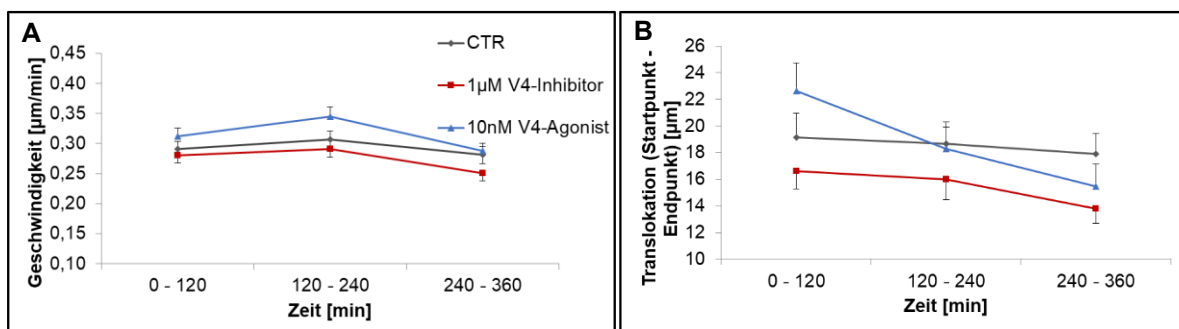


**Abb. 12: TRPV4-abhängige Migrationsparameter pankreatischer Sternzellen.**

Die Ergebnisse der Kontrollversuche mit 0,1 % des Lösungsmittels DMSO sind in grau, die Versuche mit 1 µM des TRPV4-Inhibitors (HC067047) in rot sowie die Stimulation mit 10 nM des TRPV4-Agonisten (GSK1016790A) in blau dargestellt. **A:** Es ist die mittlere Geschwindigkeit der Sternzellen in µm/min angegeben. Es zeigen sich lediglich geringe Abweichungen zwischen der

Kontrollmessung ( $0,30 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ ) und dem Einsatz des TRPV4-Inhibitors ( $0,28 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ ) sowie des TRPV4-Agonisten ( $0,32 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Zur besseren Übersicht erfolgt die Darstellung hier trotz z.T. fehlender Normalverteilung über den Mittelwert und Angabe des Standardfehlers. **B:** Die Translokation als Vektor zwischen Start- und Endpunkt der Migration ist in µm angegeben. Hier zeigt sich eine verminderte Translokation nach Behandlung mit dem TRPV4-Inhibitor. **C:** Die Direktionalität als Quotient aus Translokation und Gesamtwegstrecke ist dargestellt. Diese zeigt sich unter den Kontrollbedingungen am höchsten bei  $0,31 \pm 0,03$ . Nach TRPV4-Inhibition bzw. TRPV4-Aktivierung ist diese nicht signifikant vermindert. N = 5, n = 60; SEM; \* p < 0,05 vs. CTR.

Aufgrund des langen Beobachtungszeitraums von sechs Stunden erfolgte eine präzisere Betrachtung der Dynamik der erhobenen Migrationsparameter mithilfe kleinerer Zeitintervalle. Dazu wurden aus den Datensätzen die entsprechenden Mittelwerte von Geschwindigkeit und Translokation für je drei zweistündige Zeiträume berechnet (Abb. 13). Die ermittelten Werte der Migrationsgeschwindigkeit können für jede der drei Bedingungen als über den Zeitraum konstant angesehen werden. Denn auch in den zweistündigen Intervallen zeigen sich keine signifikanten zeitabhängigen Differenzen der Werte einer jeden Gruppe. Im Vergleich der verschiedenen Gruppen können weiterhin nur geringfügige, nicht signifikante Unterschiede verzeichnet werden. Dabei zeigt sich unter Einsatz des TRPV4-Agonisten eine tendenziell leicht erhöhte Geschwindigkeit, wohingegen die Inhibition des TRPV4-Kanals zu einer sehr geringen Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit der Sternzellen über den gesamten Zeitverlauf führt (N = 5; n = 60; vgl. Abb. 13 A).



**Abb. 13: Zeitabhängige Geschwindigkeit und Translokation von PSCs bei TRPV4-Modulation.**

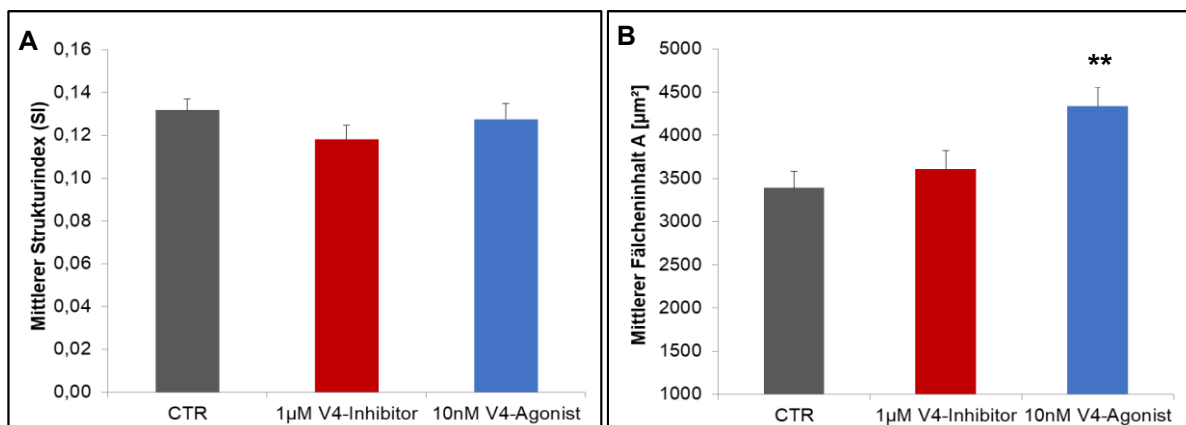
Die Werte sind für drei zweistündige Messintervalle aufgetragen. Messergebnisse unter Kontrollbedingungen (0,1 % des Lösungsmittels DMSO) sind in grau, unter Behandlung mit 1 µM des TRPV4-Inhibitors (HC067047) in rot und bei Stimulation mit 10 nM des TRPV4-Agonisten (GSK1016790A) in blau dargestellt. Es sind Mittelwerte mit Standardfehler zur besseren Übersichtlichkeit trotz z.T. fehlender Normalverteilung angegeben. **A:** Es zeigen sich für die Migrationsgeschwindigkeit nur sehr geringe Differenzen zwischen den verschiedenen Bedingungen bei über den Gesamtzeitraum jeweils relativ konstanter Geschwindigkeit. **B:** Unter Kontrollbedingungen ist die Translokation etwa gleichbleibend über alle Intervalle:  $19,1 \pm 1,8 \mu\text{m}$  bis  $17,9 \pm 1,5 \mu\text{m}$  je Intervall. Dahingegen nimmt die Translokation in Anwesenheit des TRPV4-Agonisten von anfänglich  $22,6 \pm 2,1 \mu\text{m}$  im ersten Intervall bis auf  $15,5 \pm 1,7 \mu\text{m}$  im letzten Intervall ab. Unter Behandlung mit dem TRPV4-Inhibitor ergibt sich eine verringerte Translokation, welche im Verlauf von  $16,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$  auf zuletzt  $13,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$  abfällt. Es konnten in den Zeitintervallen jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. N = 5, n = 60; SEM.

Bei Analyse der Translokation lassen sich deutlichere zeitabhängige Unterschiede eruieren, welche jedoch aufgrund der fehlenden Signifikanz bei hohen Standardfehlern nur als Tendenzen angegeben werden können. Insbesondere unter Aktivierung des TRPV4-Kanals ist die Translokation im ersten Zweistunden-Intervall im Vergleich zur Kontrolle tendenziell erhöht (vgl. Abb. 13 B). Im zweiten und dritten Intervall sinkt diese auf Werte unterhalb des Kontrollniveaus ab. Unter Einsatz des TRPV4-Inhibitors ergibt sich in allen Intervallen eine verminderte Translokation im Vergleich zur Kontrolle. Insbesondere zum letzten Intervall hin reduziert sich die Translokation verstärkt.

Insgesamt zeigt sich eine verminderte Translokation unter TRPV4-Inhibition bei ansonsten eher geringem Effekt der pharmakologischen Modulation des TRPV4-Kanals in PSCs auf die Zellmigration. Die Translokation unter TRPV4-Aktivierung scheint tendenziell nur innerhalb der ersten zwei Stunden des Versuches erhöht und sinkt danach unter das Kontrollniveau. Auch bei Betrachtung der kumulativen Translokationen (hier nicht gezeigt) können bei Verwendung von 10 nM des TRPV4-Agonisten keine signifikanten Effekte über den Zeitverlauf beschrieben werden.

#### TRPV4-abhängige Veränderungen von Zellgröße und Zellmorphologie

Wie in der Abbildung 14 A ersichtlich, ist der Strukturindex unter allen drei Bedingungen weitestgehend konstant. Damit ist die Zellmorphologie in der orientierenden Betrachtung unter TRPV4-Modulation keinen deutlichen Änderungen unterlegen. Dagegen zeigen sich TRPV4-abhängige Veränderungen in der mittleren projizierten Zellfläche (Abb. 14 B). Die Aktivierung des TRPV4-Kanals mit 10 nM GSK1016790A führt zu einer Zunahme der projizierten Fläche pankreatischer Sternzellen um etwa  $28,0 \pm 6,5$  % im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Weitere Analysen erbrachten zudem, dass die projizierte Fläche über den gesamten Messzeitraum relativ konstant erhöht ist (Graphik nicht dargestellt). Unter Hemmung des TRPV4-Kanals mit 1  $\mu$ M HC067047 ist ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg der projizierten Zellfläche um  $6,5 \pm 6,3$  % zu verzeichnen. Dieser Wert zeigte sich ebenfalls von Messbeginn an und konstant erhöht über den gesamten Messzeitraum (Graphik nicht dargestellt). Insgesamt zeigt sich durch die Aktivierung des TRPV4-Kanals eine vergrößerte projizierte Fläche pankreatischer Sternzellen bei orientierend gleichbleibender Zellmorphologie. Auch visuell ergibt sich in den Migrationsfilmen kein Anhalt für eine veränderte Zellmorphologie TRPV4-modulierter PSCs.



**Abb. 14: Einfluss der TRPV4-Modulation auf die projizierte Fläche und den Strukturindex der Sternzellen.** Die Messwerte sind unter Kontrollbedingungen (mit 0,1 % des Lösungsmittels DMSO) in grau, unter Behandlung mit 1 µM des TRPV4-Inhibitors (HC067047) in rot sowie unter Stimulation mit 10 nM des TRPV4-Agonisten (GSK1016790A) in blau dargestellt. Die graphische Abbildung erfolgt aus Gründen der Übersichtlichkeit mit Angabe von Mittelwert und Standardfehler, obwohl z.T. keine Normalverteilung vorliegt. **A:** Die mittlere projizierte Fläche ist unter TRPV4-Aktivierung erhöht ( $4341,0 \pm 221,4 \mu\text{m}^2$ , vgl. Kontrollwert:  $3390,4 \pm 193,9 \mu\text{m}^2$ ). Unter TRPV4-Blockade ergibt sich eine mittlere projizierte Fläche von  $3610,0 \pm 212,2 \mu\text{m}^2$ . **B:** Der mittlere Strukturindex ist für die drei Bedingungen angegeben. In der Kontrollgruppe und unter Einsatz des TRPV4-Agonisten ergibt sich ein Wert von  $0,13 \pm 0,01$ . Unter Behandlung mit TRPV4-Inhibitor beträgt dieser  $0,12 \pm 0,01$ . N = 5, n = 60; SEM; \*\* p < 0,01 vs. CTR.

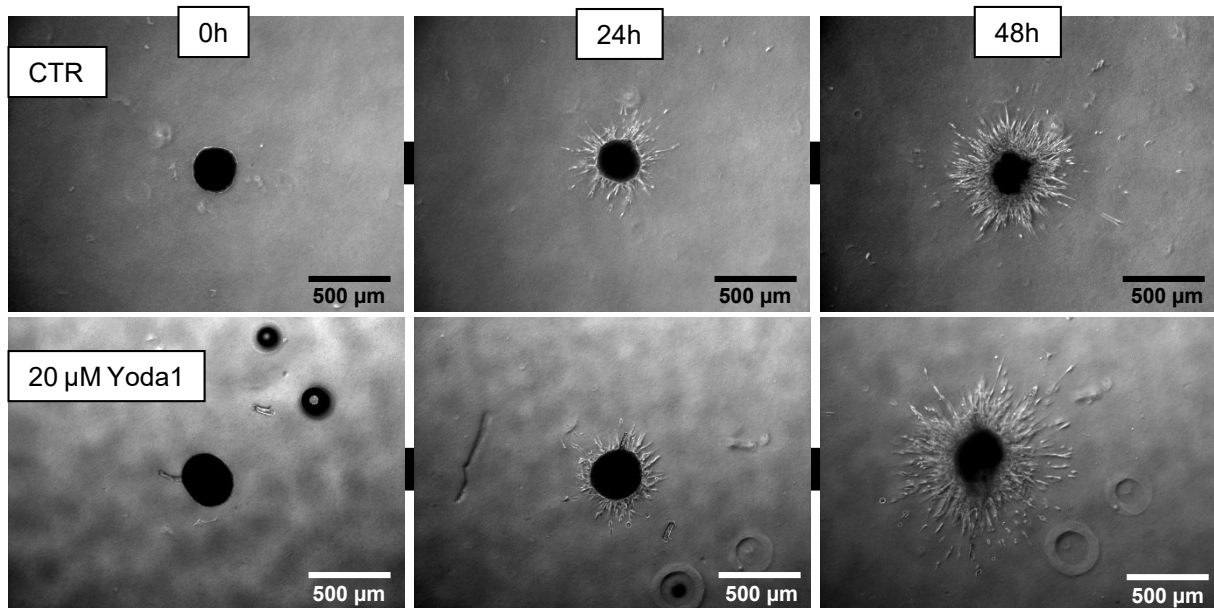
### 3.2 Piezo1-abhängige Zellmigration in Sphäroiden

Die Beurteilung der Zellmigration in dreidimensionalen Zellgebilden bietet einige Vorteile gegenüber der durchgeführten Aufnahme von Migrationsfilmen mit pankreatischen Zellen in einer Ebene. Da die Sternzellen auch *in vivo* dreidimensional migrieren und mit ihrem Umfeld interagieren, kann eine dreidimensional konfigurierte Zellkultur physiologische und pathologische Prozesse ähnlicher der *in vivo*-Situation abbilden [109].

Die Analyse der Migration pankreatischer Sternzellen in Zellkulturflaschen zeigte einen deutlichen Einfluss des Piezo1-Kanals auf die Migrationsgeschwindigkeit und Direktionalität der PSCs. Um das Piezo1-abhängige Migrationsverhalten der Sternzellen auch dreidimensional untersuchen zu können, wurden Sphäroide aus pankreatischen Sternzellen mithilfe der *Hanging-Drop*-Methode geformt und in einen Tropfen aus extrazellulärer Matrix integriert. Im Anschluss erfolgte die Migrationsanalyse der PSCs mittels Endpunktmessungen in einer Fotodokumentation sowie unter Anfertigung von Migrationsfilmen.

### 3.2.1 Endpunktmessungen migrierter Sternzellen aus Sphäroiden heraus

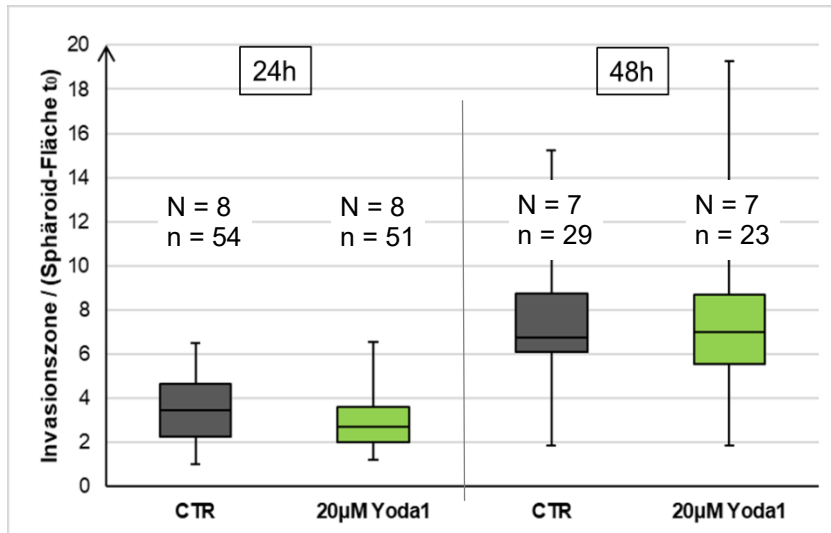
Die Sphäroide aus pankreatischen Sternzellen wurden über 48 Stunden mit 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 bzw. in Kontrollexperimenten mit äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO (0,1 %) inkubiert. Eine Fotodokumentation des Migrationsverhaltens erfolgte nach 0; 24 und 48 Stunden mit einem Phasenkontrast-Mikroskop in fünffacher Vergrößerung. In der Abbildung 15 ist exemplarisch das Auswandern der Sternzellen in die umliegende Matrix dargestellt.



**Abb. 15: Auswandern von Sternzellen aus Sphäroiden bei Stimulation mit Yoda1.** Die exemplarischen Aufnahmen wurden bei 5x-Vergrößerung unter dem Phasenkontrast-Mikroskop in einem Zeitraum von 48 Stunden erstellt. Es ist je ein in einer Kollagen-haltigen Matrix eingebetteter Sphäroid bestehend aus 5000 pankreatischen Sternzellen zu sehen. Die Zellinvasion in die umliegende Matrix wurde unter Kontrollbedingungen mit 0,1 % des Lösungsmittels DMSO (obere Reihe) und in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 (untere Reihe) nach 0; 24 und 48 Stunden dokumentiert. Die Aufnahmen zeigen eine typische Schrumpfung des Sphäroid-Kerns und eine Zunahme der Invasionszone im zeitlichen Verlauf. Einzelne aus dem Zellverbund herausmigrierte Zellen (sogenannte „*detached cells*“) sind in der umliegenden Matrix erkennbar.

Zur Analyse des dreidimensionalen Migrationsverhaltens pankreatischer Sternzellen wurden die Invasionszonen der Sphäroide auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen manuell umrandet und somit der Flächeninhalt der Invasionszone mitsamt dem Sphäroid bestimmt. Dieser Wert wurde durch den projizierten Flächeninhalt des Sphäroids zum Zeitpunkt  $t = 0$  [Stunden] dividiert. Die Abbildung 16 zeigt die relativen Größen der Invasionszonen der Sphäroide nach 24 und 48 Stunden. Hier ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Piezo1-stimulierten und Kontroll-Sphäroiden. In beiden Gruppen findet sich jedoch

eine deutliche Streuung der gemessenen Werte, sodass sich die Methodik letztlich als zu ungenau erweist, um einen Effekt herauszustellen.

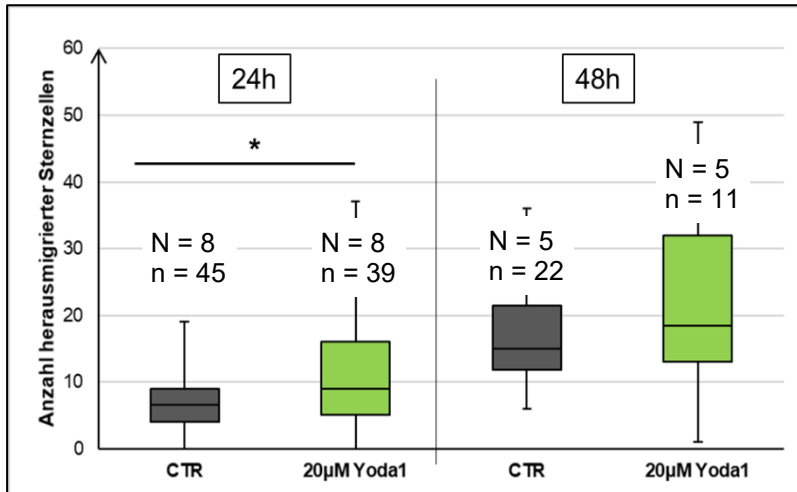


**Abb. 16: Piezo1-abhängige Invasionszonen von PSC-Sphäroiden.** Es ist die Sphäroid-Invasionszone nach 24 und 48 Stunden normiert auf die Sphäroid-Fläche zum Zeitpunkt  $t = 0$  angegeben. Dabei sind je Kontrollmessungen (CTR, grau) und Messungen nach Stimulation mit  $20 \mu\text{M}$  Yoda1 (grün) dargestellt. Zwischen

den Gruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei großer Spannweite der Whisker durch eine große Streuung der Werte. Die jeweiligen Werte für „N“ und „n“ sind über den Boxplots angegeben. Bei beginnender Migration der Sternzellen am Boden der Zellkulturschale konnten insbesondere nach 48 Stunden einige Sphäroide nicht mehr in der Auswertung berücksichtigt werden.

#### Auswertung der „detached cells“

Weiterhin wurde anhand der Fotodokumentation von PSC-Sphäroiden eine Auszählung der aus dem Zellverbund herausmigrierten Zellen, der sogenannten „detached cells“, vorgenommen. Wie in der Abbildung 17 ersichtlich, zeigt sich unter Yoda1-Stimulation nach 24 Stunden eine Zunahme der Migration von Sternzellen aus dem Sphäroid heraus ( $N = 8$ ;  $n = 45$ ; 39). Bei den Kontroll-Sphäroiden sind zu diesem Zeitpunkt im Median  $6,5 \pm 5,0$  PSCs (Interquartilsabstand als Streuungsmaß) aus dem Zellverbund ausgetreten, während diese Zahl bei Stimulation mit  $20 \mu\text{M}$  Yoda1 im Median  $9,0 \pm 11,0$  PSCs beträgt. Auch diese Werte sind, wie an den Boxplots ersichtlich, einer großen Streuung unterlegen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Endpunktmessungen migrierter Sternzellen in Sphäroiden eine große Streubreite. Eine Aktivierung des Piezo1-Kanals mit Yoda1 führt jedoch nach 24 Stunden zu einem häufigeren Herauslösen einzelner Sternzellen aus dem Zellverbund.



**Abb. 17: Piezo1-abhängige Anzahl der „detached cells“.**

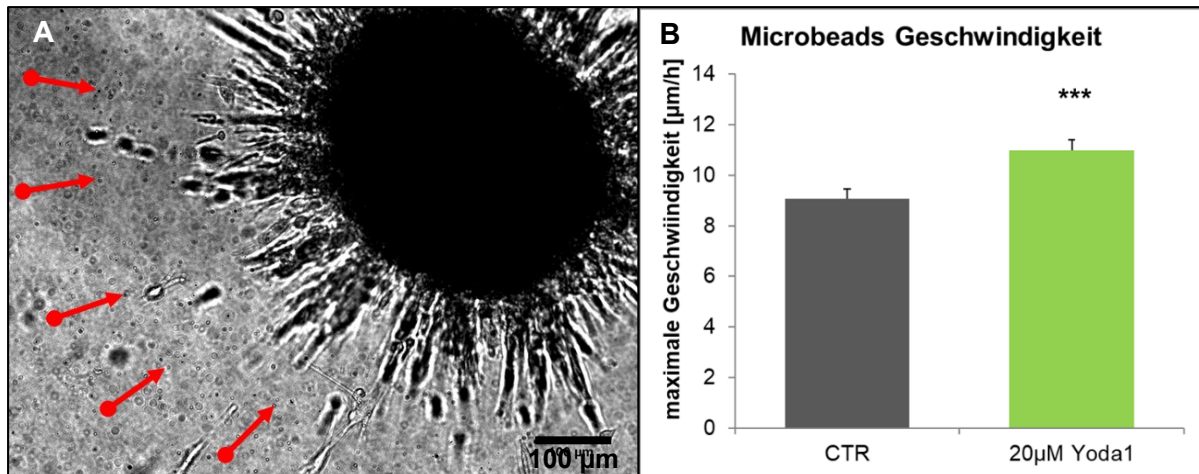
Es sind Boxplots für die Kontrollgruppe (CTR, grau) und für die Gruppe der mit 20 µM Yoda1 stimulierten PSCs (grün) je nach 24 und 48 Stunden dargestellt. Dabei wird eine Zunahme der Anzahl aus dem Sphäroid herausmigrierter Sternzellen unter Stimulation

mit 20 µM Yoda1 nach 24 Stunden ersichtlich. Die langen Whisker weisen auf eine große Streuung der Werte hin. Die Werte für „N“ und „n“ sind jeweils über den Boxplots angegeben. \*  $p < 0,05$  vs. CTR. Es wurden diejenigen Experimente nicht bei der Auswertung berücksichtigt, in welchen die PSCs auf dem Schalenboden migrierten bzw. in welchen ein unscharfer Randbereich der Aufnahmen eine Auszählung der „detached cells“ unmöglich machte.

### 3.2.2 Microbeads und Matrixinteraktion der PSCs

Das veränderte Migrationsverhalten pankreatischer Sternzellen bei Aktivierung des Piezo1-Kanals wurde schließlich im Hinblick auf die Interaktion mit der extrazellulären Matrix betrachtet. Bereits 2016 wurde von einer Umstrukturierung der ECM durch die kontraktile Fähigkeit von PSCs in einer 3D-Zellkultur berichtet [125]. Auch in meinen Experimenten zeigte sich ein konzentrischer Zug der PSC-Sphäroide an der extrazellulären Matrix während des Invasionsprozesses.

Mithilfe der Zeitraffer-Videomikroskopie konnte die Bewegung der *Microbeads* in der extrazellulären Matrix (auf den jeweiligen Sphäroid zu) verfolgt werden (Abb. 18 A). Dabei wurde der Zeitraum maximaler ECM-Kontraktion berücksichtigt, welcher durchschnittlich zwischen 18 und 30 Stunden nach Messbeginn lag. Je Sphäroid wurde die Bewegung von 10 *Microbeads* über einen Zeitraum von ca. 12 Stunden erfasst und deren Geschwindigkeit bestimmt (Abb. 18 B). Dabei zeigen mit 20 µM Yoda1 inkubierte Sphäroide eine erhöhte Geschwindigkeit der *Microbeads*-Bewegung von  $11,0 \pm 0,4$  µm/h im Vergleich zur Kontrolle (CTR:  $9,1 \pm 0,4$  µm/h) (N = 7; n = 90). Damit ziehen diese im beobachteten Zeitintervall stärker an der extrazellulären Matrix.



**Abb. 18: Piezo1-abhängige *Microbeads*-Bewegung im Umfeld von PSC-Sphäroiden.**

**A:** Es wird die *Microbeads*-Bewegung während der Auswanderung von Sternzellen aus dem Sphäroid in die umliegende Matrix exemplarisch veranschaulicht. Das Bild wurde etwa 24 Stunden nach Messbeginn mit einem Phasenkontrast-Mikroskop aufgenommen. Die Sternzellen wandern konzentrisch in die umliegende extrazelluläre Matrix aus, wenn sie mit 50 ng/ml PDGF stimuliert werden. Die roten Pfeile verdeutlichen die Bewegung einzelner *Microbeads* auf den Sphäroiden zu. Die Länge der Pfeile entspricht der durchschnittlichen Translokation im Messzeitraum von 700 Minuten (ca. 12 Stunden). **B:** Es ist die *Microbeads*-Geschwindigkeit im Kontrollexperiment mit äquivalenter Menge des Lösungsmittels DMSO (grau) sowie bei Stimulation mit 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 (grün) dargestellt. Mithilfe des manuellen *Trackings* von zehn *Microbeads* je Sphäroid über den Messzeitraum von 700 Minuten wurde die Geschwindigkeit der *Microbeads* in  $\mu\text{m/h}$  bestimmt. Dabei zeigt sich bei Stimulation mit 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 eine erhöhte Geschwindigkeit der *Microbeads*. N = 7, n = 90; SEM; \*\*\* p < 0,001 vs. CTR.

Zusammenfassend zeigt sich in den Migrationsbeobachtungen der PSC-Sphäroide, dass die Piezo1-Aktivierung durch Yoda1 eine verstärkte Emigration pankreatischer Sternzellen aus dem Sphäroid heraus innerhalb der ersten 24 Stunden bewirkt. Die Zahl der „*detached cells*“ nimmt also zu. Im selben Messzeitraum kommt es zudem zu einem erhöhten konzentrischen Zug der PSCs an der extrazellulären Matrix.



### 3.3 Piezo1- und TRPV4-abhängiger Calcium-Einstrom

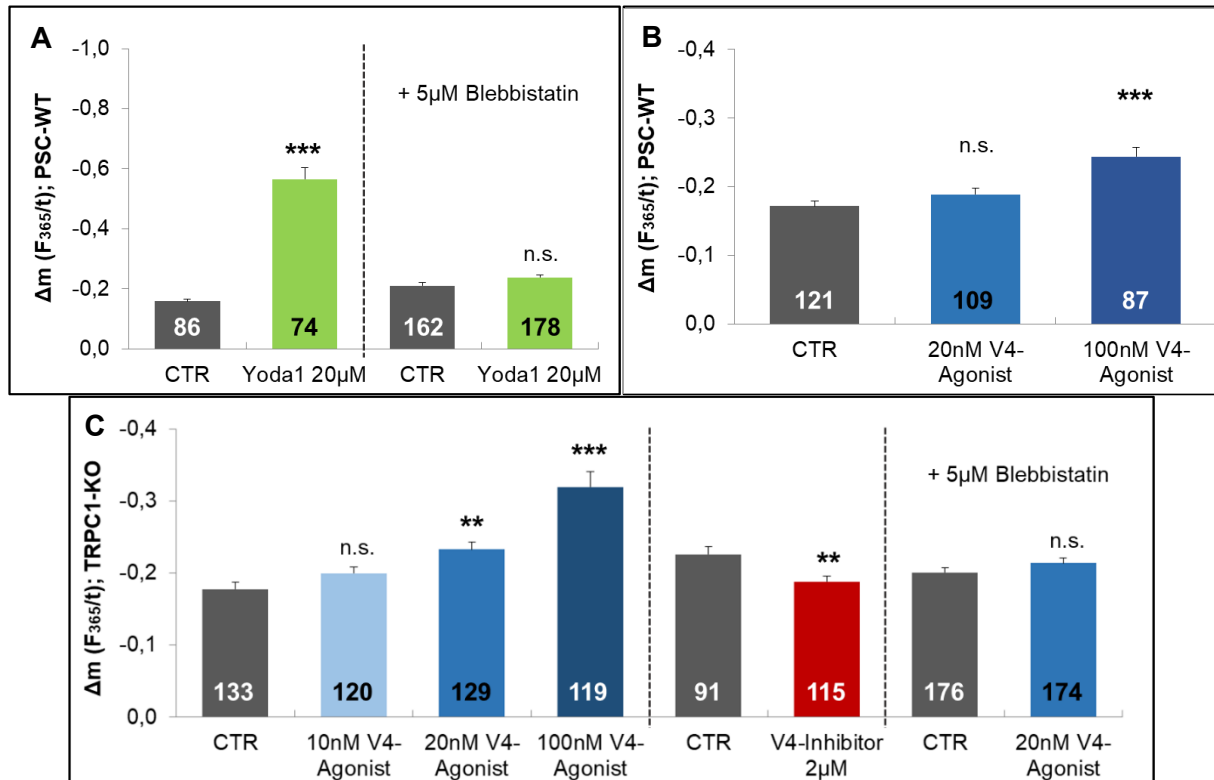
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die pharmakologische Aktivierung bzw. Inhibition des TRPV4- und besonders des Piezo1-Kanals einen Einfluss auf das Migrationsverhalten pankreatischer Sternzellen hat, wird im Folgenden die Aktivität der mechanosensitiven Calcium-permeablen Kanäle näher untersucht. Zur indirekten Quantifizierung des Calcium-Einstroms in PSCs wurde die Mangan-Quench-Methode verwendet. Hierbei wird über den Einstrom von Mangan-Ionen in die Zelle durch Calcium-permeable Kanäle ein Absinken der Fura2-Fluoreszenzemission bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 365 nm erzielt. Es kann somit indirekt auf den Calcium-Einstrom in eine Zelle und folglich auf die Aktivität geöffneter Calcium-Kanäle rückgeschlossen werden. Die Auswertung erfolgte, indem die Steigung der Fluoreszenzmissionsgraphen einer jeden Zelle berechnet wurde (vgl. auch Abb. 7). Insgesamt gilt, je niedriger der Wert für  $\Delta m(F_{365}/t) = m_2 - m_1$  ist, desto größer ist der Mangan-Einstrom in die Zelle nach Stimulation und desto höher ist folglich die Offenwahrscheinlichkeit für Calcium-permeable Membrankanäle.

#### 3.3.1 Ergebnisse der Mangan-Quench-Messungen

Zur Beurteilung der Aktivitätsänderung des TRPV4- und des Piezo1-Kanals bei pharmakologischer Kanalmodulation wurden den pankreatischen Sternzellen zum Zeitpunkt „Stimulation“ mit den Mangan-Ionen entsprechende Agonisten und Antagonisten zugesetzt. Die Stimulation von C57BL/6J-Sternzellen mit 20  $\mu$ M Yoda1 im Mangan-Quench-Experiment ergibt einen mehr als verdreifachten Calcium-Einstrom in die pankreatischen Sternzellen (Abb. 19 A) (N = 3; n = 86; 74). Die Aktivierung des Piezo1-Kanals führte im Experiment über den Beobachtungszeitraum von 400 s nach Stimulation nicht selten zu einem fast vollständigen Auslöschen der Fura2-Fluoreszenzemission. Die 15-minütige Vorinkubation der pankreatischen Sternzellen mit 5  $\mu$ M des Myosin II-ATPase-Inhibitors Blebbistatin vermindert den Calcium-Einstrom durch Stimulation mit 20  $\mu$ M Yoda1. In diesem Fall steigerte sich  $|\Delta m(F_{365}/t)|$  um lediglich  $12,7 \pm 4,3$  % im Vergleich zur Kontrolle und blieb damit in einem nicht signifikanten Messbereich (N = 3; n = 162; 178).

Wie in der Abbildung 19 B ersichtlich, führt die Stimulation von Wildtyp-Sternzellen mit 20 nM des TRPV4-Agonisten zu keiner signifikanten Erhöhung des Calcium-Einstroms ( $+ 10,1 \pm 5,1$  % im Vergleich zum Kontrollwert, N = 3; n = 121; 109). Erst der Einsatz von 100 nM des TRPV4-Agonisten erhöhte den Einstrom um  $42,1 \pm 7,6$  % im Vergleich zur

Kontrolle (N = 3; n = 121; 87). Folglich ist für TRPC1-Wildtyp-PSCs ein eher geringer, jedoch konzentrationsabhängiger Calcium-Einstrom bei TRPV4-Aktivierung festzustellen.



**Abb. 19: Piezo1- und TRPV4-abhängiger Calcium-Einstrom in pankreatische Sternzellen.**

Die Fluoreszenzemissions-Steigungen  $\Delta m(F_{365}/t)$  sind für die Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 (grün), mit dem TRPV4-Agonisten (GSK1016790A) in verschiedenen Konzentrationen (Blautöne) und mit 2  $\mu\text{M}$  des TRPV4-Inhibitors (HC067047, rot) dargestellt. Entsprechende Kontrollen (grau) enthielten die äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO (0,2 %). Die Anzahl der verwendeten Sternzellen (n) ist in den Säulen der Balkendiagramme angegeben. Wenn gekennzeichnet, erfolgte vor Messbeginn eine 15-minütige Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Blebbistatin. **A:** Die Messungen wurden mit C57BL/6J-Sternzellen durchgeführt. Es wurde der Effekt einer Stimulation mit 20  $\mu\text{M}$  Yoda1 auf den Calcium-Einstrom betrachtet. Cave: hier liegt eine andere Größendimension der Y-Achse im Vergleich zu den beiden anderen aufgeführten Graphen vor. N = 3; n = 86; 74; 162; 178. **B:** Für die Messungen wurden TRPC1-WT-Sternzellen bei Stimulation mit dem TRPV4-Agonisten verwendet. N = 3, n = 121; 109; 87. **C:** Es wurden TRPC1-KO-Sternzellen aufgrund erwarteter größerer Effekte durch Hochregulation der TRPV4-Kanal-mRNA [49] für die Messungen eingesetzt. N = 3; n = 133; 120; 129; 119; 91; 115; 176; 174. Angegeben sind Mittelwerte mit SEM; \* p < 0,05 vs. CTR; \*\* p < 0,01 vs. CTR; \*\*\* p < 0,001 vs. CTR; n.s. = nicht signifikant.

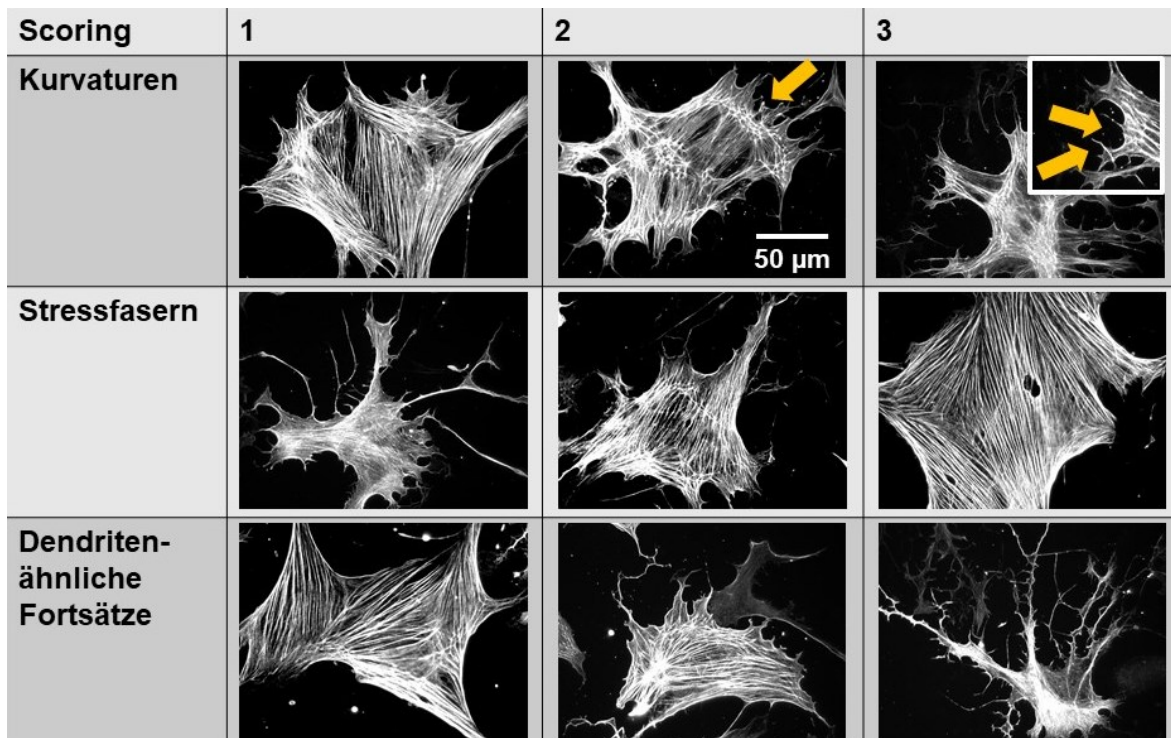
In der Abbildung 19 C werden die Messergebnisse für die Verwendung von TRPC1-KO-Zellen gezeigt. Der Einsatz von TRPC1-KO-PSCs erfolgte unter der Annahme, dass die Hochregulation der TRPV4-mRNA-Expression in diesen Zellen [49] zu einem erhöhten Einbau

des TRPV4-Kanals in die Zellmembran führt und folglich der Effekt des TRPV4-Aktivators und -Inhibitors gesteigert wird. Diese Zellen eignen sich trotz des veränderten Phänotyps modellhaft zur besseren Darstellung der Funktion des TRPV4-Kanals. In den Messungen zeigt sich ein erhöhter Calcium-Einstrom in die Sternzellen bei Stimulation mit 20 nM des TRPV4-Agonisten um  $30,1 \pm 6,0$  % und mit 100 nM des TRPV4-Agonisten um  $80,0 \pm 12,2$  % im Vergleich zur Kontrolle (N = 3; n = 133; 129; 119). Die Stimulation mit 10 nM des TRPV4-Agonisten, wie in den Migrationsexperimenten verwendet, führt zu keiner signifikanten Erhöhung des Calcium-Einstroms (N = 3; n = 133; 120). Die Zugabe von 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors induziert jedoch eine Verminderung des Calcium-Einstroms um  $16,7 \pm 3,5$  % im Vergleich zur Kontrolle (N = 3; n = 91; 115). Unter 15-minütiger Inkubation der pankreatischen Sternzellen mit 5  $\mu$ M Blebbistatin erfolgte erneut eine Stimulation mit 20 nM des TRPV4-Agonisten im Mangan-Quench-Versuch. Diese führt zu keinem signifikanten Anstieg des Calcium-Einstroms im Vergleich zur Kontrolle (N = 3; n = 176; 174).

Insgesamt bewirkt eine Aktivierung des TRPV4-Kanals durch GSK1016790A eine konzentrationsabhängige Zunahme des Calcium-Einstroms in TRPC1-KO- und TRPC1-WT-Sternzellen. Dieser Effekt ist für TRPC1-KO-PSCs größer als für Wildtyp-Zellen. Zudem verursacht Blebbistatin einen verminderten Effekt der TRPV4-Aktivierung auf den Calcium-Einstrom in TRPC1-KO-Zellen. Eine Inhibition von TRPV4 durch HC067047 führt zu einem Absinken des Calcium-Einstroms in TRPC1-KO-PSCs.

### **3.3.2 Veränderungen des Zytoskeletts durch Blebbistatin**

In den vorangegangenen Experimenten zeigte Blebbistatin einen großen Einfluss auf die pharmakologische Aktivierbarkeit des TRPV4- und des Piezo1-Kanals. Deshalb soll der Fokus nun auf der Untersuchung des Zytoskeletts pankreatischer Sternzellen liegen. Dazu wurden diese auf eine Kollagen-Matrix ausgesät und mit  $\alpha$ -SMA-Antikörpern angefärbt. Analog zu den Calcium-Messungen wurden PSCs vor der Fixierung mit PFA für 15 Minuten mit 5  $\mu$ M Blebbistatin vorbehandelt. Zur Auswertung der morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts wurde ein Score mit den Kategorien „Kurvaturen“, „Stressfasern“ und „Dendriten-ähnliche Fortsätze“ und den Punktwerten 1; 2; 3 etabliert. Beispielaufnahmen für die einzelnen Score-Werte sind in der Abbildung 20 aufgeführt.



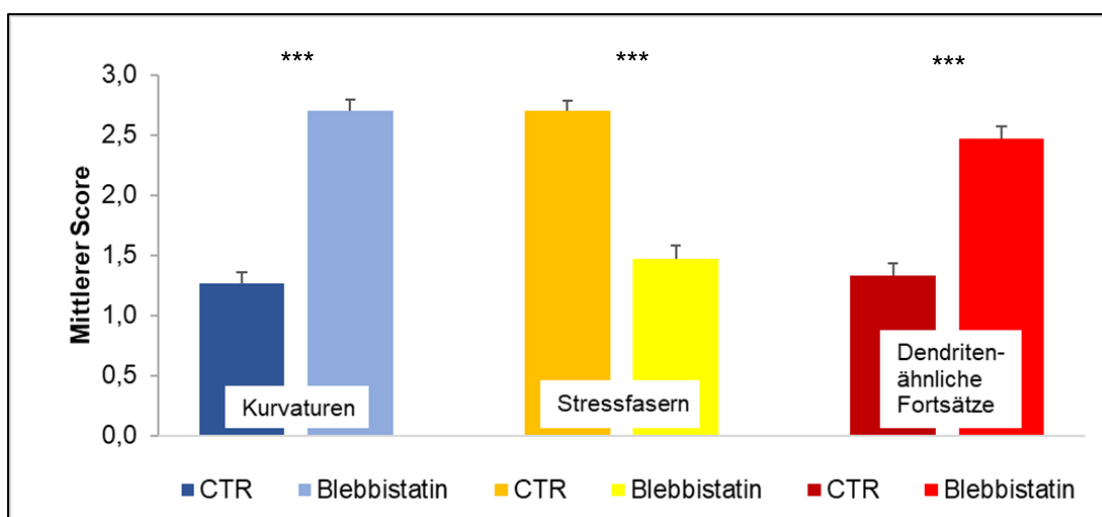
**Abb. 20: Blebbistatin-Scoring-System pankreatischer Sternzellen.** Es sind links die drei beurteilten Kategorien („Kurvaturen“, „Stressfasern“ und „Dendriten-ähnliche Fortsätze“) und oben die Scoring-Punktwerte 1; 2; 3 aufgeführt. In neun Feldern finden sich für jeden Punktwert jeder Kategorie beispielhafte Bilder pankreatischer Sternzellen mit  $\alpha$ -SMA-Immunfärbung. Die Aufnahmen erfolgten unter 40-facher Vergrößerung an einem inversen Fluoreszenzmikroskop. Die „Kurvaturen“ sind für die Score-Werte 2 und 3 beispielhaft mit orangen Pfeilen gekennzeichnet, im Falle des Score-Wertes 3 wurde zur detaillierteren Darstellung der „Kurvaturen“ eine Ausschnitts-Vergrößerung eingefügt.

Die „Kurvaturen“ beschreiben in diesem Zusammenhang fehlende Fixationspunkte der Zellmembran an der extrazellulären Matrix, welche an den entsprechenden Stellen ein Einwärts-Wölben der Membran bewirken. Diese sind insbesondere unter den Score-Werten 2 und 3 zu finden und in den entsprechenden Bildern zur Veranschaulichung mit orangen Pfeilen gekennzeichnet (Abb. 20). „Stressfasern“ bezeichnen das Vorliegen eines strukturierten und intakten Gerüsts aus  $\alpha$ -SMA-Fasern. Unter „Dendriten-ähnliche Fortsätze“ ist das Vorhandensein langer Zellausläufer bei fehlender Retraktionsmöglichkeit durch ein zerstörtes Zytoskelett zu verstehen.

In der Abbildung 21 sind die mittleren Score-Werte für Blebbistatin-behandelte PSCs und Kontroll-PSCs (Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO) dargestellt ( $N = 3$ ;  $n = 30$ ). Durch die Inkubation mit Blebbistatin ergibt sich eine Auswirkung auf alle drei erhobenen Parameter. Es kommt zu einer Zunahme der Kurvaturen von einem Punktwert von  $1,3 \pm 0,1$  auf einen Punktwert von  $2,7 \pm 0,1$ . Somit führt Blebbistatin zu einer geringeren Haftung der Zellmembran pankreatischer Sternzellen an der extrazellulären Matrix. Zudem fällt der Score-Wert der

Stressfasern pankreatischer Sternzellen im Vergleich zur Kontrolle um  $1,3 \pm 0,1$  Score-Punkte ab. Die  $\alpha$ -SMA-Fasern sind nach Blebbistatin-Inkubation gelichtet und deutlich desorganisiert. Schließlich weisen mit Blebbistatin behandelte PSCs eine erhöhte Ausprägung Dendriten-ähnlicher Fortsätze auf. Der mittlere Score-Wert steigt in diesem Fall von  $1,3 \pm 0,1$  auf  $2,5 \pm 0,1$  Punkte.

Die Inhibition der Myosin II-ATPase bewirkt damit eine deutliche Störung des Zellmigrationsablaufs und der Zellpolarität pankreatischer Sternzellen, sodass es zur Akkumulation und Extension von Zellfortsätzen in verschiedene Richtungen kommt. Insgesamt ruft bereits eine 15-minütige Inkubation mit  $5 \mu\text{M}$  Blebbistatin eine deutliche morphologische Änderung des Zytoskeletts hervor, welche sich sowohl auf die Ausbildung von Stressfasern und Zellfortsätzen als auch auf die Fixation der pankreatischen Sternzellen an der extrazellulären Matrix auswirkt.



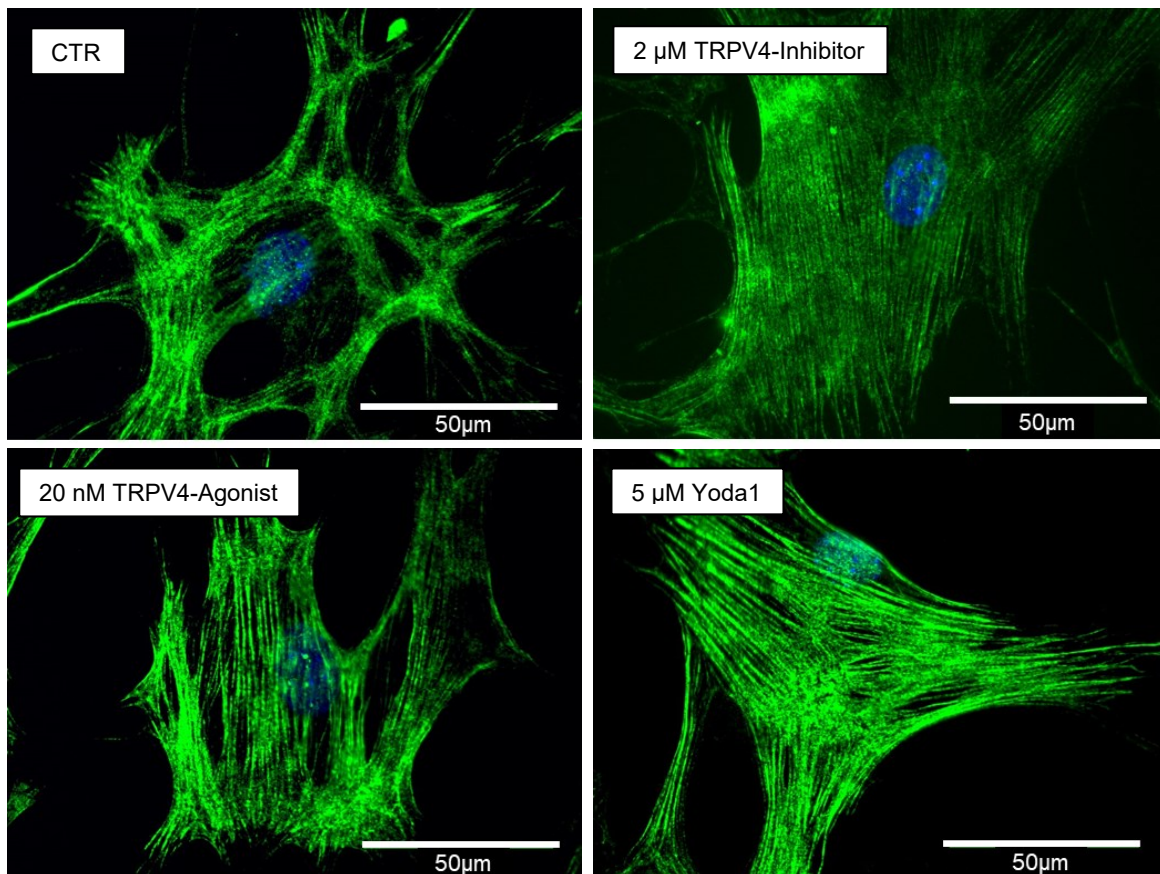
**Abb. 21: Blebbistatin-abhängige Veränderungen des Zytoskeletts pankreatischer Sternzellen.**

Aus den mithilfe der Scoring-Matrix ermittelten Punktwerten der einzelnen  $\alpha$ -SMA-Fluoreszenzaufnahmen pankreatischer Sternzellen wurden die Mittelwerte für die jeweiligen Kategorien errechnet. Es sind die drei Kategorien „Kurvaturen“ (blau), „Stressfasern“ (gelb) und „Dendriten-ähnliche Fortsätze“ (rot) dargestellt. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe (Unter Verwendung des Lösungsmittels DMSO) sind in der dunkleren Farbabstufung angegeben, die Blebbistatin-inkubierten PSCs in der helleren Farbabstufung.  $N = 3$ ,  $n = 30$ ; SEM; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. CTR. Nach Behandlung mit Blebbistatin zeigen pankreatische Sternzellen deutlich mehr Kurvaturen und Dendriten-ähnliche Fortsätze. Zudem kommt es zur Lichtung und Desorganisation der Stressfasern.

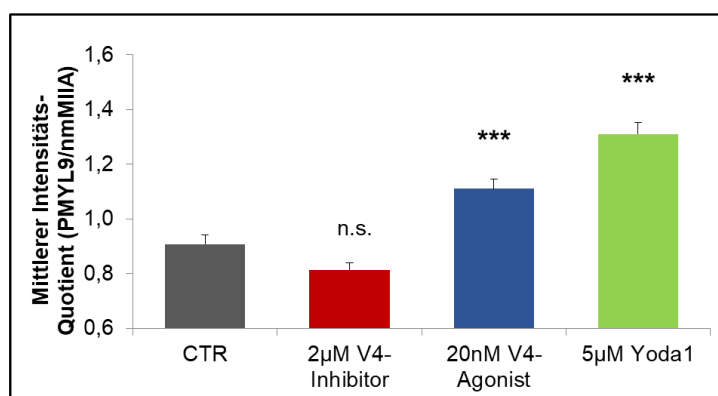
### 3.4 Kanal-abhängige Veränderungen der MLC-Phosphorylierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des TRPV4- und des Piezo1-Kanals zu einem gesteigerten Calcium-Einstrom in pankreatischen Sternzellen führt, soll die Auswirkung der Kanalaktivierung auf den Phosphorylierungsgrad der regulatorischen Myosin-Leichtkette untersucht werden. Dazu wurden Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte regulatorische Leichtkette (PMYL9) des nicht-muskulären Myosins II durchgeführt. Pankreatische Sternzellen wurden auf eine Kollagen-Matrix ausgesät und am Folgetag für je eine Stunde mit 20 nM des TRPV4-Agonisten, 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors, 5  $\mu$ M Yoda1 oder entsprechenden äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO (Kontrollwert) behandelt. Anschließend wurden die PSCs mit 3,5 % PFA auf Eis fixiert. Die Immunfärbung erfolgte mit dem PMYL9-Antikörper. Eine ungepaarte Gegenfärbung wurde mit dem Antikörper nmMIIA (*non-muscle myosin* IIA) durchgeführt, welcher die schweren Ketten des nicht-muskulären Myosins II unabhängig vom Phosphorylierungsgrad anfärbt. In einem nicht-muskulären Myosin II-Molekül liegen dabei stets zwei schwere und vier leichte Myosin-Ketten vor [93]. Der Quotient der Intensitätsmesswerte (PMYL9/nmMIIA) ist folglich ein Maß für den phosphorylierten Anteil der regulatorischen Leichtkette 9 an der gesamten Myosin-Menge der Zelle. Zufällige Fehler durch eine ungleiche Menge an Myosin zwischen verschiedenen Zellen, welche die absolute Menge an phosphorylierter MLC beeinflussen würden, können somit vermieden werden. In der Abbildung 22 werden beispielhaft PMYL9-Immunfluoreszenzfärbungen für die beobachteten Merkmale gezeigt.

Wie aus der Abbildung 23 hervorgehend, führt sowohl die Aktivierung des TRPV4-Kanals mit 20 nM GSK1016790A als auch die Aktivierung des Piezo1-Kanals mit 5  $\mu$ M Yoda1 zu einem vermehrten Anteil der phosphorylierten regulatorischen Myosin-Leichtkette 9. Bei Inkubation der PSCs mit 20 nM des TRPV4-Agonisten zeigt sich eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um  $22,3 \pm 3,8$  % im Vergleich zum Kontrollwert. Die Behandlung mit 5  $\mu$ M Yoda1 bewirkt eine noch deutlichere Steigerung um  $44,4 \pm 4,2$  %. Nach Behandlung mit 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors ist eine tendenziell leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität um  $10,5 \pm 3,0$  % zu beobachten (N = 3, n = 90 für alle erhobenen Werte). Insgesamt führen also sowohl eine TRPV4- als auch eine Piezo1-Aktivierung zu einer vermehrten Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette 9.



**Abb. 22: PMYL9-Immunfluoreszenzaufnahmen pankreatischer Sternzellen.** Exemplarische Darstellung je einer Sternzelle pro Bedingung in 40-facher Vergrößerung. Es sind die Alexa488-markierten PMYL9-Strukturen in grün dargestellt. In blauer Farbe sind die mit DAPI-gefärbten Zellkerne der PSCs zu erkennen. Die Antikörper-Färbung erfolgte nach vorheriger Inkubation mit äquivalenter Menge des Lösungsmittels DMSO (CTR), 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors (HC067047), 20 nM des TRPV4-Agonisten (GSK1016790A) oder 5  $\mu$ M Yoda1 für je eine Stunde.



**Abb. 23: Einfluss der Kanalmodulatoren auf die PMYL9-Phosphorylierung pankreatischer Sternzellen.** Es werden die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitätsquotienten (PMYL9/nmMIIA) bei Stimulation mit 0,2 % des Lösungsmittels DMSO (Kontrolle; grau), 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors (HC067047, rot), 20 nM des TRPV4-Agonisten (GSK1016790A, blau) und 5  $\mu$ M Yoda1 (grün) dargestellt. Eine Stimulation mit 20 nM des TRPV4-Agonisten oder mit 5  $\mu$ M Yoda1 führen zu einer Zunahme des Anteils von phosphorylierter regulatorischer Leichtkette 9 am gesamten nicht-muskulären Myosin IIA (PMYL9/nmMIIA). Eine Inkubation mit 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors führt zu keinem signifikanten Effekt bei tendenziell leichter Abnahme des Intensitätsquotienten. N = 3; n = 90; SEM; \*\*\* p < 0,001 vs. CTR; n.s. = nicht signifikant.

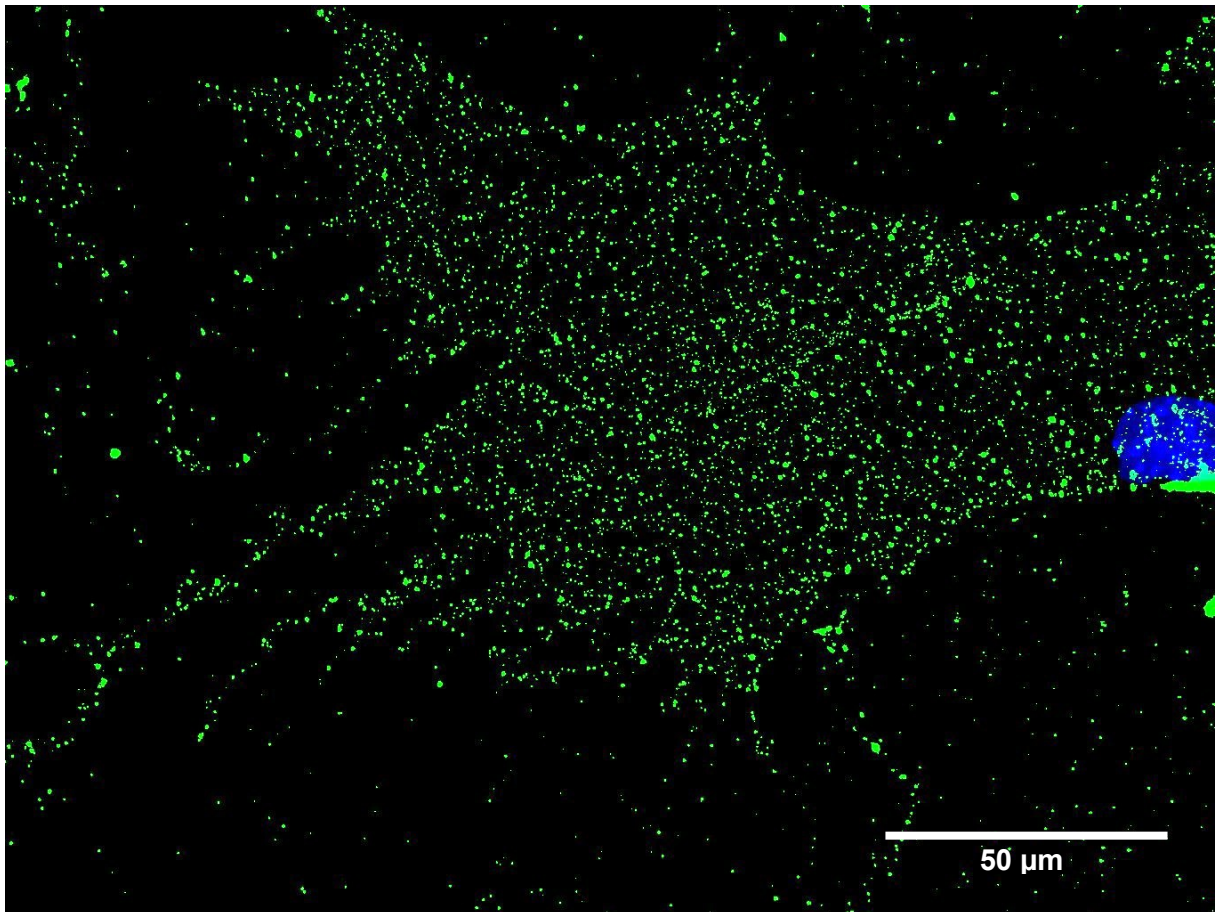
blau) und 5  $\mu$ M Yoda1 (grün) dargestellt. Eine Stimulation mit 20 nM des TRPV4-Agonisten oder mit 5  $\mu$ M Yoda1 führen zu einer Zunahme des Anteils von phosphorylierter regulatorischer Leichtkette 9 am gesamten nicht-muskulären Myosin IIA (PMYL9/nmMIIA). Eine Inkubation mit 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors führt zu keinem signifikanten Effekt bei tendenziell leichter Abnahme des Intensitätsquotienten. N = 3; n = 90; SEM; \*\*\* p < 0,001 vs. CTR; n.s. = nicht signifikant.

### 3.5 Kanaldichtemessungen des Piezo1-Kanals

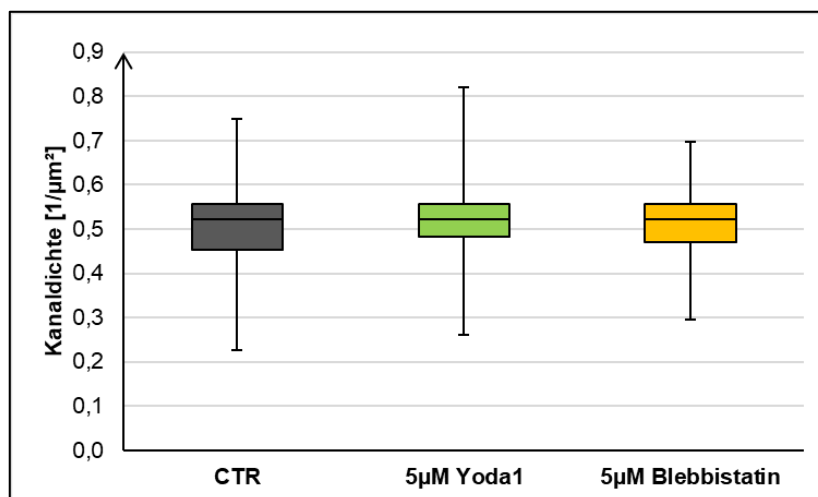
Yoda1 als Aktivator des Piezo1-Kanals zeigte bisher deutliche Effekte auf den Calcium-Einstrom, den Phosphorylierungsgrad von PMYL9 sowie auf das Migrationsverhalten pankreatischer Sternzellen. Dabei konnte der Effekt von Yoda1 auf den Calcium-Einstrom in PSCs durch Blebbistatin vermindert werden. Im Folgenden soll geprüft werden, ob Yoda1 oder Blebbistatin einen Einfluss auf die Piezo1-Kanaldichte in der Zellmembran haben.

Zur Färbung von Sternzellen mit einem Piezo1-Antikörper wurde ein modifiziertes Färbeprotokoll verwendet, bei welchem die Fixation erst nach der Färbung erfolgte (siehe Kapitel 2.2.7). Durch diese Methode können intrazelluläre Bindungen des Antikörpers vermieden werden und nur in der Zellmembran integrierte Kanäle an einem extrazellulären Epitop angefärbt werden. Die Funktion des in der Zellmembran eingebauten Piezo1-Kanals konnte zuvor mithilfe der Mangan-Quench-Methode nachgewiesen werden. Vor der Färbung und Fixation auf Eis wurden die pankreatischen Sternzellen für eine Stunde mit 5  $\mu\text{M}$  Yoda1 oder für 15 Minuten mit 5  $\mu\text{M}$  Blebbistatin inkubiert. In den jeweiligen Kontrollexperimenten wurden die Sternzellen mit äquivalenten Mengen des Lösungsmittels DMSO behandelt. Die Abbildung 24 zeigt exemplarisch die mikroskopische Aufnahme einer Sternzelle nach Piezo1-Immunfärbung. Es liegt eine gleichmäßige Verteilung der Piezo1-Kanäle in der Zellmembran vor. Des Weiteren wurde die Kanaldichte mittels ImageJ für jede Sternzelle bestimmt. Die mittlere Kanaldichte beträgt 0,52 Piezo1-Kanäle/ $\mu\text{m}^2$ . Wie in den Boxplots der Abbildung 25 ersichtlich, differieren die Werte der Kanaldichte bei Behandlung mit Blebbistatin oder Yoda1 nicht von dem Kontrollwert ( $N = 3$ ;  $n = 30$ ). Sowohl unter Yoda1- als auch unter Blebbistatin-Inkubation, zeigt sich folglich keine Auswirkung auf die Piezo1-Kanaldichte.





**Abb. 24: Piezo1-Kanalfärbung einer pankreatischen Sternzelle.** Die Immunfärbung wurde mit Alexa488-markierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Zusätzlich wurde der Zellkern mit DAPI gefärbt und ist hier blau dargestellt. Die Aufnahme erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung und stellt ein exemplarisches Gesichtsfeld dar.



**Abb. 25: Piezo1-Kanaldichte in pankreatischen Sternzellen.** Es ist die mittlere Kanaldichte nach Behandlung mit 5 μM Yoda1- oder 5 μM Blebbistatin oder der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO (CTR) angegeben. Diese Behandlungen haben keinen Einfluss auf die Piezo1-Kanaldichte. N = 3, n = 30. Die Whisker kennzeichnen minimale und maximale Datenwerte.

## 4 Diskussion

Pankreatische Sternzellen sind aufgrund ihrer zahlreichen Interaktionen mit pankreatischen Tumorzellen ein wesentlicher Bestandteil des sogenannten Tumormikromilieus des PDACs. Schon im ruhenden Zustand bilden sie ein dreidimensionales Netzwerk in der Bauchspeicheldrüse [23] und sind bei Aktivierung durch Tumorzellen in der Lage, Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrix zu produzieren. Zudem steigern aktivierte PSCs ihre Zellmigration und Interaktion mit anderen Zellen bis zu dem Punkt, dass sie sogar an dem invasiven Wachstum und der Metastasierung des PDACs beteiligt sind. Der ansteigende interstitielle Druck im fibrotischen Tumorareal durch Zellproliferation und ECM-Produktion fördert die Entstehung hypoxischer Areale und schottet das PDAC von i. v. verabreichten Chemotherapeutika ab. Aus diesen Gründen rücken die Bestandteile des Tumormikromilieus wie die pankreatischen Sternzellen heute mehr und mehr in den Fokus der Forschung und geben Anlass zur Hoffnung auf zielgerichtete Therapiemöglichkeiten des PDACs [1].

Ziel dieser Arbeit ist es, das Augenmerk auf mechanosensitive Kanäle zu legen, welchen eine Bedeutung in der pathologischen druckabhängigen Aktivierung pankreatischer Sternzellen im PDAC zugeschrieben wird. Als Korrelat einer PSC-Aktivierung ist hier insbesondere eine Migrationssteigerung der Zellen zu werten.

Insbesondere für den Piezo1-Kanal konnte gezeigt werden, dass dieser einen Einfluss auf die Aktivierung und Migration pankreatischer Sternzellen nimmt:

- Der Piezo1-Kanal zeigt eine gleichmäßige Verteilung über die komplette Zellmembran pankreatischer Sternzellen.
- Bei Aktivierung des Piezo1-Kanals kommt es zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle. Dieser Effekt kann durch Blebbistatin deutlich gedrosselt werden.
- Eine Aktivierung des Piezo1-Kanals führt weiterhin zu einer Zunahme der MLC-Phosphorylierung.
- Ebenso bewirkt eine Aktivierung des Piezo1-Kanals eine Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit, Translokation und Direktionalität pankreatischer Sternzellen, wenn diese auf einer zweidimensionalen Matrix migrieren.
- Zuletzt führt eine Aktivierung des Piezo1-Kanals in der Sphäroid-Kultur zu einem erhöhten Zug von Sternzellen an der extrazellulären Matrix und einem vermehrten Herauslösen einzelner Sternzellen aus dem Sphäroid.

Im Falle des TRPV4-Kanals konnte ebenfalls ein Einfluss auf das Verhalten der PSCs nachgewiesen werden:

- Die Aktivierung des TRPV4-Kanals führt zu einem erhöhten Calcium-Einstrom in pankreatische Sternzellen.
- Der Calcium-Einstrom ist in TRPC1-KO-Zellen, welche mehr *Trpv4*-mRNA exprimieren, größer als in TRPC1-WT-Zellen und kann durch Blebbistatin vermindert werden.
- Die Inhibition des TRPV4-Kanals resultiert in einem verminderten Calcium-Einstrom in TRPC1-KO-Sternzellen.
- Die Aktivierung des TRPV4-Kanals bewirkt eine vermehrte Phosphorylierung von MLC.
- Die Inhibition des TRPV4-Kanals führt zu einer verminderten Translokation pankreatischer Sternzellen, während die Aktivierung des TRPV4-Kanals in einer Zunahme der projizierten Zellfläche der PSCs resultiert.

#### **4.1 Calcium-Einstrom und Aktin-Myosin-Interaktion in PSCs**

Mithilfe der Mangan-Quench-Methode konnte gezeigt werden, dass es sowohl durch die Aktivierung des TRPV4- als auch des Piezo1-Kanals zu einem vermehrten Calcium-Einstrom in die pankreatischen Sternzellen kommt. Wird die Spezifität der eingesetzten Kanalmodulatoren GSK1016790A bzw. Yoda1 für den TRPV4- bzw. den Piezo1-Kanal vorausgesetzt [60,115], so zeigen diese Befunde die funktionelle Expression der beiden mechanosensitiven Kanäle in der Zellmembran der PSCs an.

Die Stimulation pankreatischer Sternzellen mit Yoda1 führt zu einer direkten und sehr schnellen Extinktion der Fura2-Fluoreszenzemission. Teilweise kam es bei der Durchführung zu einem fast vollständigen Verblässen der perinukleären Regionen innerhalb der Versuchszeit von 400 Sekunden nach Yoda1-Zugabe. Es lässt sich annehmen, dass die pharmakologische Aktivierung des Piezo1-Kanals einen großen Einfluss auf die Calcium-Homöostase pankreatischer Sternzellen nehmen kann. Dieses wird durch die beschriebene hohe Expressionsrate des Piezo1-Kanals im Vergleich zu anderen mechanosensitiven Kanälen in pankreatischen Sternzellen gestützt [49]. Folglich könnte bei mechanischer Aktivierung des Piezo1-Kanals *in vivo* ein ebenso deutlicher Effekt auf die Calcium-Homöostase pankreatischer Sternzellen zustande kommen.

Auch in anderen Zellen nimmt der Piezo1-Kanal eine tragende Rolle für die Calcium-Homöostase ein. So bewirkt dieser in Urothelzellen eine dehnungsabhängige ATP-

Freisetzung [126]. In Epithelzellen führen Dehnung und Druck zu einem Piezo1-abhängigen Calcium-Einstrom, welcher die Zelldichte über Mitose und Apoptose reguliert [63]. Zudem bewirkt ein Piezo1-abhängiger Calcium-Einstrom in Azinuszellen des Pankreas, ausgelöst durch einen erhöhten intraduktalen Druck, eine vermehrte Apoptose und daraus hervorgehend die Entstehung einer Pankreatitis [68]. Diese zahlreichen Funktionen des Piezo1-Kanals in verschiedenen Geweben geben Anhalt dafür, dass auch das Verhalten der pankreatischen Sternzellen durch den Piezo1-Kanal vermittelt werden könnte. Diese Annahme wird durch meine Befunde unterstrichen.

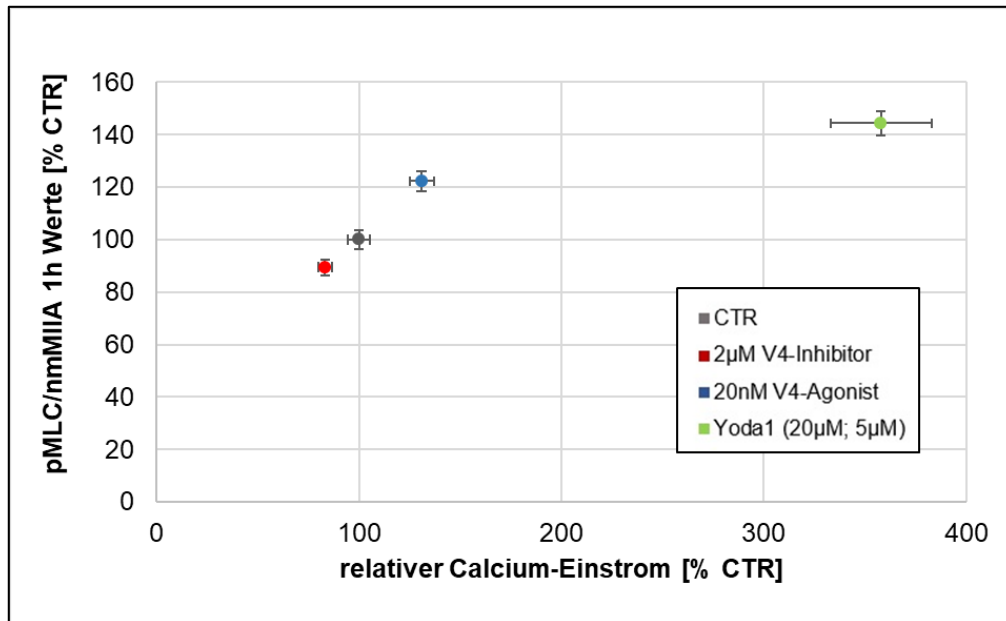
Die Untersuchung des Calcium-Einstroms bei Stimulation mit GSK1016790A erbrachte eine konzentrationsabhängige Aktivierung des TRPV4-Kanals. Für TRPC1-KO-PSCs kommt es bei Verwendung von 20 nM des TRPV4-Agonisten bereits zu einem signifikant erhöhten Calcium-Einstrom in die Sternzellen. Bei Einsatz von TRPC1-WT-PSCs wird erst bei Stimulation mit 100 nM des TRPV4-Agonisten ein signifikanter Wert erreicht. Angesichts der geringen TRPV4-Expression in den Sternzellen [49] ist das durchaus konsistent mit den dynamischen Calcium-Messungen am murinen TRPV4-Kanal, bei denen ein  $EC_{50}$ -Wert von 18 nM für den Kanalaktivator GSK1016790A ermittelt wurde [115]. Doch auch bei postulierter hoher Spezifität von GSK1016790A muss kritisch hinterfragt werden, ob die Spezifität in dem verwendeten Konzentrationsbereich noch vorausgesetzt werden kann.

Der stärker induzierbare Calcium-Einstrom bei Verwendung von TRPC1-KO-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-PSCs stützt das Ergebnis der Studie, welche die Hochregulation der TRPV4-mRNA in TRPC1-KO-Sternzellen zeigt [49]. Da der TRPV4- und der TRPC1-Kanal sogar Komplexe bilden, welche die Wirkung beider Kanäle potenzieren [71], stellt im Falle eines *Knock-outs* des TRPC1-Gens eine Hochregulation von TRPV4 einen plausiblen Kompensationsmechanismus in PSCs dar. Hier zeigt sich folglich eine Dosisabhängigkeit des gemessenen Calcium-Einstroms von der Expressionsrate des TRPV4-Kanals.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von HC067047 zu einer Verringerung des Calcium-Einstroms in TRPC1-KO-Zellen führt. Unter der Voraussetzung der Spezifität des Kanaleffektors [82] weist die Senkung des Calcium-Einstroms bei Inhibition von TRPV4 auf eine basale Grundaktivität Kanals in den vorliegenden aktivierten TRPC1-KO-Sternzellen hin. Diese Hypothese stützend kann auf eine Untersuchung aus dem Jahre 2000 verwiesen werden, in welcher der TRPV4-Kanal bereits als Stimulus-unabhängig in geringem Maße konstant aktiv beschrieben wird [127].

Folglich können sowohl der Piezo1- als auch der TRPV4-Kanal den Calcium-Einstrom in pankreatische Sternzellen modulieren. Welche Bedeutung dieses auf zytoskelettaler Ebene hat, wurde über Immunfluoreszenzfärbung von PMYL9 näher untersucht. Dabei konnte herausgestellt werden, dass eine Aktivierung des Piezo1- und des TRPV4-Kanals ebenso die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette 9 erhöht. Auch hier ist der Effekt des Piezo1-Kanals größer als der des TRPV4-Kanals. Der induzierte Calcium-Einstrom durch die mechanosensitiven Kanäle scheint also zu einer höheren Aktivität der MLCK zu führen. Dieses Enzym phosphoryliert Myosin-Leichtketten wie MLC9 und steigert damit die Kontraktion des Akin-Myosin-Zytoskeletts und folglich die Zellmotilität [100]. Zusammenfassend stützen diese Ergebnisse auf molekularer Ebene die Hypothese, dass die Piezo1- und die TRPV4-Aktivierung einen fördernden Einfluss auf die Migration pankreatischer Sternzellen haben.

Die enge Verzahnung des Calcium-Einstroms in eine Zelle mit den Signalwegen der MLC-Phosphorylierung über Calmodulin und MLCK macht eine nähere Betrachtung der Messergebnisse interessant. Im Folgenden wird eine Korrelation der normalisierten Messwerte des Calcium-Einstroms mit den PMYL9-Fluoreszenzintensitäten für die Messungen des TRPV4- und des Piezo1-Kanals dargestellt (Abb. 26). Im Falle des TRPV4-Kanals zeigt sich bei Auftragung der Messpunkte ein angedeuteter linearer Zusammenhang zwischen dem gemessenen Calcium-Einstrom und der PMYL9-Phosphorylierung. Ein solcher wäre über die Kopplung von Calcium-Einstrom mit der Folge der dosisabhängigen Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase über Calcium/Calmodulin-Komplexe plausibel zu erklären und würde die wichtige Funktion mechanosensitiver Kanäle für die Modulation der Zellmigration unterstreichen. Zur Bestätigung einer Linearität der Korrelation ist jedoch eine Erhebung weiterer Messpunkte zwischen TRPV4-abhängigem Calcium-Einstrom und -MLC-Phosphorylierung erforderlich. Ein ähnlicher linearer Zusammenhang könnte ebenfalls für den Piezo1-Kanal bestehen. Andererseits könnte es durch den starken Calcium-Einstrom bei Piezo1-Kanal-Aktivierung zu einer Sättigung der MLCK kommen. Damit würde die Kurve für höhere Calcium-Werte die Form einer Sättigungskurve annehmen. Diese Vermutungen müssten ebenfalls in genaueren Messungen untersucht werden, sodass auch hier eine eingehendere konzentrationsabhängige Untersuchung beider Parameter interessant erscheint.



**Abb. 26: Kreuzkorrelation zwischen dem Calcium-Einstrom und der PMYL9-Phosphorylierung in pankreatischen Sternzellen.** Auf der X-Achse sind die Werte des prozentualen Calcium-Einstroms (Kontrolle  $\pm$  100 %) für die Behandlung mit 2  $\mu$ M des TRPV4-Inhibitors (HC067047, rot), 20 nM des TRPV4-Agonisten (GSK1016790A, blau) und 20  $\mu$ M Yoda1 (grün) mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) aufgetragen. Die Y-Achse gibt die prozentuale PMYL9-Fluoreszenzintensität (Kontrolle  $\pm$  100 %) mit Standardfehler bei Behandlung mit den Kanalmodulatoren an. Für den TRPV4-Kanal stellt sich ein andeudeter linearer Zusammenhang heraus. Zu beachten ist für den Piezo1-Kanal, dass in beiden korrelierten Experimenten unterschiedliche Konzentrationen von Yoda1 verwendet wurden. Während in den Mangan-Quench-Experimenten eine Stimulation mit 20  $\mu$ M Yoda1 erfolgte, wurden die PSCs vor der Immunfärbung mit 5  $\mu$ M Yoda1 inkubiert. Damit kann der Korrelationspunkt (grün) bei der Frage nach einer linearen Korrelationsform zwischen Calcium-Einstrom und PMYL9-Phosphorylierung in PSCs nicht berücksichtigt werden.

## 4.2 Der Einfluss des Zytoskeletts auf die Piezo1- und TRPV4-Kanalaktivität

Der Myosin II-ATPase-Inhibitor Blebbistatin induziert in pankreatischen Sternzellen bereits innerhalb von 15 Minuten deutliche morphologische Veränderungen des Zytoskeletts. In  $\alpha$ -SMA-Immunfärbungen werden dabei vermehrt Membrankurvaturen sichtbar. Die Zellmembran scheint weniger gespannt und in geringerem Maße an der extrazellulären Matrix fixiert. Weiterhin zeigt sich eine deutliche Abnahme und verringerte Ordnung der intrazellulären Stressfasern. Zuletzt weisen viele Sternzellen nach Blebbistatin-Behandlung eine Dendriten-ähnliche Morphologie auf. Ähnliche Beobachtungen wurden 2010 bereits für

hepatische Sternzellen von Liu *et al.* beschrieben [128]. Sie konnten zudem zeigen, dass Blebbistatin in murinen hepatischen Sternzellen innerhalb von zwei Stunden neben einer Abnahme von Stressfasern und Fokaladhäsionen auch eine erhöhte Migration bei verminderter Zellkontraktion induziert. Im Falle der pankreatischen Sternzellen stellte sich jedoch heraus, dass eine Inkubation mit Blebbistatin über mehr als eine Stunde bereits zum Tod zahlreicher PSCs führt, weshalb hier eine nur 15-minütige Inkubationszeit mit 5  $\mu$ M Blebbistatin gewählt wurde. Dieses deutet bereits auf die essenzielle Funktion des Aktin-Myosin-Zytoskeletts für die in Migration und Zellmetabolismus gesteigerten aktivierten pankreatischen Sternzellen hin.

Längst ist bekannt, dass Myosin II den wichtigsten Motor für Zellkontraktionen in nicht-muskulären Zellen darstellt [94]. Durch die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett ist Myosin II mit der Ausbildung von ECM-Kontakten wie Fokaladhäsionen verknüpft und nimmt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie ein [97]. In der Zellmigration führt die Aktivierung der Myosin II-ATPase über das Aktin-Myosin-Zytoskelett zur Kontraktion der Zelle und ist damit essenziell für die Retraktion des hinteren Teils der Zelle. Darüber hinaus steuert Myosin II auch die Protrusion des Vorderendes und die Polarität der Zelle [93,98]. Blebbistatin ist folglich als Hemmer nicht-muskulären Myosins II [96] in der Lage, in die Zellmigration, ECM-Interaktion und Zellmorphologie einzugreifen [95,97]. Dieses erklärt die beobachteten morphologischen Veränderungen von pankreatischen Sternzellen nach Behandlung mit Blebbistatin.

Daneben konnte gezeigt werden, dass Blebbistatin zu einer Hemmung der Piezo1- und TRPV4-Aktivierbarkeit durch Yoda1 bzw. GSK1016790A führt. Da Blebbistatin eine Störung des Aktin-Myosin-Zytoskeletts bewirkt [96], kann eine herabgesetzte Kanalaktivierung nach Blebbistatin-Behandlung auf die modulierende Bedeutung des Zytoskeletts für die Kanalaktivität hinweisen.

Für den Piezo1-Kanal finden sich in der Literatur verschiedene Theorien über die Mechanik der Kanalaktivierung [57,73,129]. Das „*force through lipid*“ - Modell beschreibt mechanosensitive Ionenkanäle, welche allein durch Änderungen der mechanischen Spannungsverhältnisse in der umgebenen Lipiddoppelschicht geöffnet werden können, ohne dass dazu weitere Hilfsproteine notwendig sind [130]. Dagegen werden im „*force through filament*“ - bzw. „*tether*“-Modell Hilfsproteine benötigt, welche Druckänderungen im Bereich der Zellmembran auf mechanosensitive Kanäle überleiten [131]. Jingpeng Ge *et al.* postulierten 2015 mit den ersten KryoEM-Aufnahmen des Piezo1-Kanals, dass durch die homotrimere Architektur des Kanals mit der Ausbildung von drei extrazellulären peripheren Flügeln eine Aktivierung durch Membran-Konformationsänderungen wahrscheinlich ist [54]. Weitere

Studien stützen die Hypothese, dass der Piezo1-Kanal allein durch Änderungen in der Membranspannung aktivierbar ist [129,132,133]. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass der Piezo1-Kanal isoliert von Hilfsproteinen und dem Zytoskelett in *Patch-Clamp*-Versuchen [133] sowie bei Integration in Membranvesikel [132] eine konservierte hohe Aktivität bei Zug- oder Druckausübung auf die periphere Lipiddoppelschicht aufweist. Im Zusammenhang mit dem „*force through lipid*“-Modell wird auch von einer intrinsischen Mechanosensitivität des Piezo1-Kanals gesprochen [58]. Einzelne Reviews und Studien verweisen dagegen auf potenzielle Hilfsproteine als Modulatoren der Piezo1-Aktivität, wobei insbesondere der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle zugeschrieben wird [53,58]. Gaub *et al.* zeigten 2017, dass der Piezo1-Kanal in Abwesenheit von extrazellulären Proteinen, wie z.B. Laminin und Kollagenen, eine deutlich herabgesetzte Sensitivität für Änderungen der Membranspannung besitzt. Dabei konnte die Arbeitsgruppe Kollagen IV als entscheidende Komponente für die Aktivierung des Piezo1-Kanals auf Zugkräfte an der Lipiddoppelschicht identifizieren [58].

Insgesamt befürwortet die Mehrheit der Autoren heute das „*force through lipid*“-Modell der Piezo1-Aktivierung bei möglicher Modifikation der Kanalaktivität insbesondere durch das Zytoskelett [57,59,73,126]. In *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Zerstörung von Aktin-Filamenten durch Cytochalasin D die Piezo1-Spontanaktivität und die Aktivität auf äußere Reize deutlich reduziert [59]. Ebenso kann eine Inhibition von Myosin II durch Blebbistatin in humanen neuronalen Stammzellen die Spontanaktivität des Piezo1-Kanals reversibel vermindern [134]. Nourse *et al.* schrieben dabei einer von intrazellulär nach extrazellulär gerichteten Mechanotransduktion durch den Piezo1-Kanal eine wichtige Rolle zu [57]. Daran anknüpfend postulieren sie eine mögliche intrazelluläre Aktivierung des Piezo1-Kanals, ausgelöst durch die Registrierung von Zugkräften des Zytoskeletts.

Dass Blebbistatin in den hier dargestellten Experimenten die Piezo1-Aktivierung in PSCs inhibieren kann, spricht ebenso für die Bedeutung des Zytoskeletts für den Piezo1-Kanal. Die fast vollständige Auslöschung der Yoda1-abhängigen Piezo1-Aktivierung nach Vorbehandlung mit Blebbistatin verleitet zu der Annahme eines „*force through filament*“-Modells für die Kanalaktivierung. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass Blebbistatin ebenso zu einer Abnahme von Fokaladhäsionen und bei Einwirkung auf das Zytoskelett zu einer deutlichen Störung der Membrankonformation mit veränderten Membranspannungen führt [95,97]. So zeigen meine Experimente, dass Blebbistatin die Zellmorphologie pankreatischer Sternzellen sehr stark verändern kann. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die Zunahme der Membrankurvaturen und dendritischen Verästelungen in PSCs zu einer veränderten Grundspannung der Zellmembran führt, welche die Funktion des



flügelartig konfigurierten Piezo1-Kanals einschränkt. Folglich könnte die reduzierte Funktionalität des Piezo1-Kanals ebenfalls die Abnahme des Yoda1-getriggerten Calcium-Einstroms erklären.

Der Einwand, dass Blebbistatin den Ausbau des Piezo1-Kanals aus der Zellmembran bewirken und über diesen Weg zu einer Verringerung des Piezo1-Ansprechens auf Yoda1 führen könnte, kann durch die Piezo1-Kanaldichtemessungen entkräftigt werden. Eine 15-minütige Behandlung mit 5  $\mu$ M Blebbistatin ändert die Piezo1-Kanaldichte nicht (vgl. Abb. 25; Kapitel 3.5). Trotzdem ist die Aktivierbarkeit des Piezo1-Kanals durch Blebbistatin deutlich reduziert. Dieses stützt die Vermutung, dass die Aktivität des Piezo1-Kanals in PSCs durch das Zytoskelett sowie durch Änderungen der Membranspannung modifiziert wird.

Analog konnte für den TRPV4-Kanal ermittelt werden, dass Blebbistatin zu einer verringerten Aktivierbarkeit durch GSK1016790A führt. Auch dies spricht für die Modulation der TRPV4-Kanalaktivität durch das Zytoskelett. Aufgrund zahlreicher bekannter Interaktionen des TRPV4-Kanals mit dem Zytoskelett wird seine Aktivierung vermehrt dem „*force through filament*“-Modell zugeordnet. So werden verschiedene Hilfsproteine beschrieben, welche mechanische oder chemische Stimuli registrieren und über verschiedene Signalkaskaden zu einer Aktivierung des TRPV4-Kanals führen. Insbesondere für Aktin-Filamente, Integrine und Mikrotubuli sind regulierende Funktionen der TRPV4-Kanalaktivität beschrieben [72,73,135]. Andererseits wird in einzelnen Quellen von einer möglichen direkten Aktivierung des TRPV4-Kanals berichtet [46,136]. Die Störung des Aktin-Myosin-Zytosketts durch Blebbistatin und die daraufhin abgeschwächte Aktivierbarkeit von TRPV4 durch GSK1016790A lässt sich der Argumentation einer regulatorischen Bedeutsamkeit des Zytosketts für die TRPV4-Kanalaktivität plausibel anfügen. Meine Ergebnisse sind somit gut mit der verbreiteten Zuordnung des TRPV4-Kanals zum „*force through filament*“-Modell vereinbar.

### 4.3 Einfluss des TRPV4-Kanals auf die Zellmigration

Wird nun der Effekt des TRPV4-Kanals auf die Bewegung von Zellen betrachtet, so lassen sich in der Literatur migrationsfördernde Funktionen des TRPV4-Kanals finden [82]. Andererseits wird dem TRPV4-Kanal eine Funktion in der Retraktion des hinteren Zelleibs in HEK-Zellen zugeschrieben [83]. In meinen Experimenten konnten für die meisten betrachteten Zellmigrations-Parameter eher geringe Effekte des TRPV4-Kanals herausgestellt werden. Zum einen könnte dieses auf die niedrig gewählten Konzentrationen der Kanalmodulatoren zurückzuführen sein. Der TRPV4-Agonist GSK1016790A wurde in einer Konzentration von 10 nM bei der Migrations-Beobachtung von WT-PSCs eingesetzt. Jedoch ergab sich nachfolgend in den Calcium-Messungen selbst bei Stimulation mit 20 nM GSK1016790A noch kein signifikant erhöhter Calcium-Einstrom in WT-PSCs. Zum anderen ist die Kanalexpression von TRPV4 in pankreatischen Sternzellen im Vergleich zu anderen mechanosensitiven Kanälen eher gering [49]. Beides zusammen, die geringe Konzentration der Kanalmodulatoren und die geringe Expression, könnten die Ursache für die schwach ausgeprägten Effekte auf die Migration der Sternzellen sein. In diesem Fall könnte der Einsatz von höheren Konzentrationen der Kanalmodulatoren in den Migrationsexperimenten größere Effekte bewirken. Es sollte jedoch hinterfragt werden, ob mit einer so hochdosierten pharmakologischen Modulation des TRPV4-Kanals ein Rückschluss auf die Kanalfunktion *in vivo* gestattet wäre und ob weiterhin eine Selektivität der Wirkstoffe angenommen werden könnte. Eine alternative Möglichkeit zum Nachweis der Funktion des TRPV4-Kanals auf die Migration pankreatischer Sternzellen stellt aufgrund der höheren Expressionsraten von TRPV4 modellhaft die Verwendung von TRPC1-KO-PSCs dar. Für diese Zellen wird ein signifikant veränderter Calcium-Einstrom bereits bei Behandlung mit 20 nM GSK1016790A oder mit 2  $\mu$ M HC067047 erzielt.

Im Folgenden sollen die bereits bei den niedrigen Konzentrationen der Kanalmodulatoren sichtbaren Ergebnisse diskutiert werden. Für die Betrachtung der Translokation ergibt sich ein dosisabhängiger Effekt der TRPV4-Kanalmodulation. Schon bei Behandlung mit 1  $\mu$ M HC067047 kommt es in PSCs zu einer Abnahme der Translokation. Die Migrationsgeschwindigkeit pankreatischer Sternzellen bleibt dabei nahezu unverändert. Folglich scheint insbesondere die gerichtete Zellbewegung von PSCs unter TRPV4-Inhibitor verringert. Unter Einsatz des TRPV4-Agonisten konnte dagegen keine signifikante Erhöhung der Translokation nachgewiesen werden. Genauere Analysen der Migrationsbeobachtungen ergeben hier eine tendenzielle, aber nicht signifikant erhöhte Translokation für die ersten zwei Stunden der Messung, woraufhin diese anschließend unter den Wert des Kontrollniveaus sinkt. Dieses könnte auf einen Wirkverlust von GSK1016790A nach kurzer Zeit hinweisen und

folglich den Verdacht auf eine dosisabhängige Translokationszunahme durch TRPV4-Aktivierung erhärten.

Die hier gezeigte verminderte Translokation von PSCs unter Einsatz des TRPV4-Inhibitors HC067047 widerspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Valverde [83]. Hier konnte für HEK293-Zellen unter Verwendung eines mutierten TRPV4-AAWAA-Kanals mit verringerter Aktivierbarkeit herausgestellt werden, dass TRPV4 eine für die Zellretraktion essenzielle Funktion besitzt. Sie führten ihre Beobachtungen auf eine verringerte Calpain-Aktivität zurück, welches für die Auflösung von Fokaladhäsionen am hinteren Zellpol maßgeblich ist [83]. Somit wird dem TRPV4-Kanal die Rolle einer Calcium-abhängigen Auflösung von Fokalkontakten zugeschrieben, welche letztlich in einer Verringerung der Direktionalität der Zellbewegung resultiert. Für diese Auswirkung von TRPV4 auf die Zellmigration würde sprechen, dass auch Myosin II eine wichtige Bedeutung für die Zellretraktion hat. Die in meinen Experimenten gezeigte Korrelation der TRPV4-Aktivität mit dem Calcium-Einstrom und der MLC-Phosphorylierung in PSCs könnte daher eine Auswirkung auf die Zellretraktion und die Lösung von Fokalkontakten erklären. Nichtsdestotrotz zeigen meine Experimente ebenso eine verminderte Translokation bei TRPV4-Inhibition. Dieser Effekt kann über die Bedeutung des konstant aktiven TRPV4-Kanals in pankreatischen Sternzellen für die Aufrechterhaltung einer Calcium-Homöostase erklärt werden. Es ist bekannt, dass ein intrazellulärer Calcium-Gradient mit der niedrigsten Konzentration am vorderen Zellpol essenziell ist für die Etablierung einer Zellpolarität [103]. Pulsatile Calcium-Einströme am vorderen Zellpol, wie sie beispielsweise für den TRPM7-Kanal gezeigt werden konnten, sorgen dabei für die Initiierung einer gerichteten Zellmigration [137]. Die Funktion des konstant aktiven TRPV4-Kanals für die Aufrechterhaltung einer Zellpolarität in PSCs könnte folglich die Translokationsverminderung bei Kanal-Inhibition begründen.

Zusätzlich führt eine Aktivierung des TRPV4-Kanals mit GSK1016790A zu einer deutlichen Zunahme der projizierten Zellfläche. Bisher findet sich in der Literatur nur ein Anhalt für volumenmindernde Effekte der TRPV4-Aktivierung. So wurde 2005 beschrieben, dass der TRPV4-Kanal bei hypotoner Zellumgebung und der daraufhin ausgelösten osmotischen Zellschwellung aktiviert wird [138]. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Calcium-Einstrom durch den TRPV4-Kanal indirekt zu einer regulatorischen Volumenabnahme führt. Gleichwohl zeigen die hier durchgeführten Experimente eine bisher nicht erklärbare Flächenzunahme pankreatischer Sternzellen unter TRPV4-Aktivierung. Zur weiteren Untersuchung dieses Effekts müssten genauere Messungen des Zellvolumens unter TRPV4-Stimulation in Sternzellen vorgenommen werden.

## 4.4 Einfluss des Piezo1-Kanals auf die Zellmigration

Für den Piezo1-Kanal sind in der Literatur zahlreiche Einflüsse auf die Migration verschiedener Zellen beschrieben [64–67]. Im Falle pankreatischer Sternzellen konnte ich zeigen, dass eine Aktivierung von Piezo1 in einer erhöhten Migrationsgeschwindigkeit, Translokation und Direktionalität der PSCs resultiert. Dieses korreliert mit den Ergebnissen vieler anderer Studien. So wird berichtet, dass eine hohe Piezo1-Expression mit einer erhöhten Zellmigration, Invasion und Metastasierungstendenz in Melanomzellen, Mammakarzinom-Zellen sowie gastralen Krebszellen einhergeht [64–66]. Bei Diagnose eines Mamma-Karzinoms hat die Piezo1-Expression außerdem eine prognostische Relevanz für die Überlebenszeit, welches den Piezo1-Kanal als mögliches therapeutisches Target in den Fokus der Tumorthherapie rückt [65]. Dagegen führt ein Piezo1-Expressionsverlust in kleinzelligen Lungenkarzinom-Zellen zu einer erhöhten Zellmotilität und vermehrter Metastasierung [67]. Dieser Prozess wird von den Autoren McHugh *et al.* auf eine geringere Integrin-Aktivierung durch die verminderte Piezo1-Expression zurückgeführt, welches letztlich in der Änderung der Zellmigration zu einer amöboiden Fortbewegung resultiert.

Die von mir durchgeführte Zellmigrationsanalyse pankreatischer Sternzellen zeigt, dass die Migrationsgeschwindigkeit und Direktionalität unter Piezo1-Aktivierung mit Yoda1 insbesondere für niedrige Konzentrationen von Yoda1 erhöht wird. So wird der größte Effekt von Yoda1 auf die Zellmigration bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  erzielt. Diese Konzentration liegt deutlich unter dem publizierten  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 17,1  $\mu\text{M}$ . Dieser wurde für den murinen Piezo1-Kanal aus zytosolischen Calcium-Konzentrations-Messungen gewonnen [60]. Schon bei einer Stimulation mit 15  $\mu\text{M}$  Yoda1 sind nur noch deutlich geringere Effekte auf die Zellmotilität ersichtlich. Für 50  $\mu\text{M}$  Yoda1 zeigen sich sogar gegenteilige Tendenzen.

Da Yoda1 zu einem Anstieg des Calcium-Einstroms über den Piezo1-Kanal führt, ist die Steigerung der Zellmigration über die vermehrte Phosphorylierung von MLC und die damit verstärkte Aktivität von Myosin II erklärbar. Die Kontraktion des Aktin-Myosin-Zytoskeletts in nicht muskulären Zellen stellt eine wichtige Voraussetzung für die Zellmigration dar [98]. Ein intrazellulärer Calcium-Gradient zwischen den beiden Zellpolen korreliert mit der Zellpolarität, und ihre Aufrechterhaltung determiniert letztlich die Direktionalität in der Zellmigration [103]. Somit kann die gesteigerte Migrationsgeschwindigkeit und Direktionalität auf den vermehrten Calcium-Einstrom bei Piezo1-Aktivierung und der daraus resultierenden Aktivierung von Myosin zurückgeführt werden.

Umgekehrt können die tendenziell hemmenden Effekte bei erhöhter Yoda1-Konzentration auf einen zu hohen Calcium-Einstrom in die pankreatischen Sternzellen hinweisen, welcher die Aufrechterhaltung eines intrazellulären Calcium-Gradienten stört und dadurch die

Zellmigration beeinträchtigt. Tsai *et al.* konnten an Endothelzellen zeigen, dass die intrazelluläre Calcium-Konzentration in gewissen Konzentrationsbereichen invers mit dem Ausmaß der Zellmigration korreliert. Sie begründeten dieses insbesondere mit der für den vorderen Zellpol notwendigen pulsatile Änderung der Calcium-Konzentration als Grundlage einer regulierbaren MLCK-Aktivität [103]. Diese Argumentation scheint auch im Hinblick auf die Piezo1-abhängige Zellmigration plausibel. Wie nachgewiesen wurde, liegt der Piezo1-Kanal ubiquitär in der Zellmembran muriner Sternzellen vor. Eine Aktivierung des Kanals führt damit zu einem intrazellulären Calcium-Anstieg überall in der Zelle. Während bei einer geringen Kanalaktivierung durch niedrige Konzentrationen von Yoda1 noch eine pulsatile Änderung der Calcium-Konzentration möglich ist, werden die Sternzellen bei hohen Yoda1-Konzentrationen ihrer Regulationsmöglichkeiten beraubt. Insbesondere die Aufrechterhaltung einer niedrigeren Calcium-Konzentration im vorderen Zellpol könnte folglich bei hohen Yoda1-Konzentrationen erschwert werden und damit zu einer Dysregulation der MLCK-Aktivität und der Zellpolarität führen.

Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung von Kontraktionen der gesamten Zellsomata bei Stimulation mit 50  $\mu$ M Yoda1 in den Migrationsfilmen (vgl. Abb. 11; Kapitel 3.1.1). Die Kontraktionen könnten als Zeichen einer Dysregulation der gerichteten Zellmigration gewertet werden. Ebenso weisen PSCs bei Behandlung mit 50  $\mu$ M Yoda1 sehr lange und dünne Zellausläufer auf, welches mit dem verminderten Strukturindex dieser Zellen korreliert. Dieses könnte genauso auf eine Fehlregulation der Zellpolarität hinweisen, welche folglich mit einer Störung der Zellprotrusion und -retraktion einhergeht. Es bleibt zu mutmaßen, welcher zelluläre Effekt der gestörten Migrationsgeschwindigkeit und Translokation im Falle einer hochdosierten pharmakologischen Piezo1-Aktivierung zugrunde liegt. Zur weiteren Evaluation des Effekts wäre eine eingehendere Untersuchung der Zellmigration und eine Messung der konzentrationsabhängigen Calcium-Dynamik sicherlich zielführend.

Schließlich kann der Einwand, eine Stimulation von PSCs mit Yoda1 könne zu einer Änderung der Piezo1-Kanaldichte führen, in den Kanaldichtemessungen entkräftet werden. Hier zeigt sich für die Inkubation der Zellen mit 5  $\mu$ M Yoda1 keine Änderung der Kanaldichte im Vergleich zur Kontrolle. Für höhere Konzentrationen von Yoda1 bleibt ein solcher gegenregulatorischer Effekt jedoch nicht ausgeschlossen.

## 4.5 Piezo1-abhängige Zellmigration im 3D-Zellmodell

Piezo1-abhängige Effekte auf die PSC-Migration und -Matrixinteraktion lassen sich ebenso in dem dreidimensionalen Sphäroid-Modell nachweisen. Unter Yoda1-Stimulation wird dabei ein gesteigertes Ablösen von pankreatischen Sternzellen aus dem Sphäroid-Zellverbund und weiterhin eine erhöhte Zugkraft der PSCs auf die extrazelluläre Matrix beobachtet.

In den letzten Jahren ist in der Krebsforschung die Rolle des Tumormikromilieus (*TME*) für die Tumorprogression und die Metastasierung vermehrt ins Blickfeld gerückt [15]. So wird der Interaktion der Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten mit der extrazellulären Matrix heute eine große Bedeutung beigemessen. Besonders einer veränderten ECM-Regulation mit Erhöhung der Matrix-Steifigkeit und Linearisierung von Kollagen-Bündeln wird ein fördernder Effekt auf die Krebszellmigration und Tumorprogression zugeschrieben [35]. Die Wechselwirkung zwischen Zellen und ihrer extrazellulären Matrix kann modellhaft über die Etablierung von 3D-Zellkulturen untersucht werden [109]. Der hier gewählte Ansatz zeigt einen Zusammenhang zwischen der Piezo1-Aktivierung und der Sternzell-Interaktion mit der ECM.

Bei Stimulation mit Yoda1 zeigen pankreatische Sternzellen nach 24 Stunden Wachstum in einem Sphäroid in Kollagen I-reicher Umgebung ein vermehrtes Auswandern von vereinzelt Sternzellen aus dem Zellverbund. Diese Zellen habe ich in den Auswertungen meiner Ergebnisse als „*detached cells*“ bezeichnet. Ein solcher Invasionsprozess geht zum einen mit der Ausbildung von Zellmigrations-typischen Protrusionen und neuen Fokalkontakten zur ECM einher [89]. Somit unterstreichen diese Ergebnisse den Effekt der gesteigerten Migration pankreatischer Sternzellen nach Piezo1-Aktivierung. Zum anderen führt die Ablösung einzelner PSCs aus dem Zellverbund zu einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten. Diese Invasionsbereitschaft kann mit der Metastasierung von Tumorzellen verglichen werden. Dass pankreatische Sternzellen ein tumorähnliches Verhalten darbieten, zeigt bereits ihr Durchlaufen einer Art Epithelialer-Mesenchymaler Transition (EMT) im Zuge des pathologischen Aktivierungsprozesses [139]. Die Aktivierung der Sternzellen korreliert mit Veränderungen der Cadherin-Expression und weiterer Marker sowie mit einer gesteigerten Zellmigration *in vitro* [139]. Die Erhöhung der Invasionsbereitschaft von PSCs unter Yoda1-Stimulation kann folglich durch eine vermehrte Aktivierung pankreatischer Sternzellen erklärt werden. Dieses spricht für eine regulatorische Funktion des Piezo1-Kanals im Hinblick auf die PSC-Aktivierung und Migration.

Um den Einfluss von PSCs auf die umgebende Matrix zu untersuchen, wandten Robinson *et al.* bereits 2016 ein 3D-Zellkulturmodell für pankreatische Sternzellen an. Sie konnten eine aktive ECM-Umstrukturierung durch kontraktiles Verhalten der PSCs nachweisen und zeigten dabei eine Verknüpfung zwischen dem Aktin-Myosin-Zytoskelett und der ECM über  $\beta$ 1-

Integrine [125]. Von diesen Beobachtungen schlossen sie auf eine Rolle für die Sternzell-vermittelte Matrixumstrukturierung während der Progression des PDACs.

Auch in dem hier verwendeten Sphäroid-Modell erweisen sich mit PDGF stimulierte PSCs als in konzentrischer Form an der ECM ziehend und diese somit umstrukturierend, wobei in gleichem radiärem Muster eine Invasionszone ausgebildet wird. Dieses annähernd symmetrische Verhalten macht es möglich, sich in der Auswertung vereinfachend auf eine zweidimensionale Darstellung in Migrationsfilmen zu beschränken. Die Auszählung von „*detached cells*“ sowie die Geschwindigkeitsmessung der *Microbeads* können somit innerhalb einer gewählten Ebene des Sphäroid-Modells erfolgen. Durch die Inklusion der *Microbeads* in eine dichte Kollagen I-haltige Matrix werden bei Bewegung der *Microbeads* in gleichem Maße die umliegenden Kollagenfasern bewegt. Die Messung der Geschwindigkeit der *Microbeads* lässt folglich auf die Zugkräfte der Sternzellen an der extrazellulären Matrix schließen. Im Gesamtbild des konzentrischen Zuges im Sphäroid wird eine Matrix-Kontraktion und Matrix-Umstrukturierung erreicht. Bei Piezo1-Aktivierung nehmen diese Sternzell-Matrix-Interaktionen zu, da im selben Zeitraum unter Yoda1-Stimulation eine größere *Microbeads*-Geschwindigkeit und damit auch *Microbeads*-Translokation (graphisch nicht dargestellt) beobachtet wird. Dabei liegt die Direktionalität der *Microbeads*-Bewegung durch den konzentrischen Zug des Sternzell-Sphäroids nahe 1. Insgesamt zeigen meine Experimente hier, dass der Piezo1-Kanal einen bedeutenden Einfluss auf die ECM-Interaktion und Migration von Sternzellen hat.

Diese Beobachtungen stützend, wurde 2017 in einer 3D-Mischkultur von Sternzellen und PDAC-Tumorzellen gezeigt, dass PSCs die Invasion der Tumorzellen fördern. Pankreatische Sternzellen werden indes für die ECM-Umstrukturierung durch Änderung der Kollagen I-Konformation verantwortlich gemacht, welches zur Bahnung der Invasion von Tumorzellen führt [32,33]. Dabei folgen die Tumorzellen den Sternzellen bei der Migration in das umliegende Gewebe [33]. Wie heute bereits bekannt, lassen sich PSCs auch in peripheren Metastasen des PDACs finden. *In vivo*-Untersuchungen der Interaktion zwischen PCCs und PSCs bei Ko-Injektion in die Milz wiesen die essenzielle Rolle der PSCs für die Metastasierung von Tumorzellen nach, wobei Sternzellen in jeglichen PDAC-Metastasen identifiziert wurden [34].

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wird die Bedeutung der Matrixinteraktion pankreatischer Sternzellen für die Invasion und Metastasierung von Krebszellen ersichtlich. Die hohe Mortalität des pankreatischen duktales Adenokarzinoms ist insbesondere auf die frühe Infiltration des Tumors in das umliegende Gewebe und in Blutgefäße sowie Nerven zurückzuführen. Die Schlüsselrolle pankreatischer Sternzellen und des Tumormikromilieus für

diese Prozesse kann als ein Ansatzpunkt für neue Konzepte der Tumorthherapie gesehen werden [1]. Der Piezo1-Kanal scheint dabei einen Migrations-, Matrixinteraktions- wie Invasions-fördernden Einfluss auf pankreatische Sternzellen zu haben.

Ob sich zudem ein Einfluss des Piezo1-Kanals auf die Ausbildung und Architektur der Invasionszone zeigt, kann durch die Endstrecken-Fotodokumentation nicht herausgestellt werden. Hier bietet sich eine genauere Analyse der Sphäroide etwa durch konfokale Mikroskopie oder gar Elektronenmikroskopie von PSC-Zellausläufern und der umstrukturierten ECM an. Auch über herausmigrierte Sternzellen könnten auf diesem Wege genauere Informationen über Zell-Konformationsänderungen und Matrix-Interaktion bei Invasion gewonnen werden. Weiterhin könnte zur besseren Darstellung der *in vivo*-Situation im PDAC eine Integration von pankreatischen Tumorzellen in die Sphäroide zielführend sein, um den Effekt des Piezo1-Kanals auf die Tumorzell- und Matrixinteraktion zu untersuchen.

#### **4.6 Die Ergebnisse im Kontext der Pathophysiologie des PDACs**

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass insbesondere der Piezo1-Kanal *in vitro* das migratorische Verhalten pankreatischer Sternzellen beeinflusst. Neben einem Einfluss auf die Calcium-Homöostase der PSCs wird zudem ein Effekt auf die Myosin-II-Phosphorylierung ersichtlich. Diese molekularen Mechanismen lassen sich mit der gesteigerten Zellmigration vereinbaren. Dabei führt die Aktivierung des Piezo1-Kanals sowohl zu einer schnelleren und gerichteteren Zellmigration als auch zu einer erhöhten Invasion und ECM-Umstrukturierung der PSCs.

Im pankreatischen duktalem Adenokarzinom wird von einer Aktivierung der mechanosensitiven Kanäle durch eine veränderte Matrixsteifigkeit und durch den deutlich erhöhten Gewebedruck ausgegangen. Der Piezo1-Kanal wurde in vielen anderen Geweben bereits als Drucksensor identifiziert, unter anderem konnte dieses auch für pankreatische Azinuszellen gezeigt werden [68]. Unterstützend weist die auf Druckinkubation reaktive Senkung der *Piezo1*-mRNA-Expression in WT-PSCs auf eine Sensitivität von PSCs gegenüber dem Umgebungsdruck hin [49]. Im Rückschluss vermute ich im PDAC ebenfalls eine druckabhängige Aktivierung des Piezo1-Kanals.

Da der pathologisch erhöhte Druck im pankreatischen duktalem Adenokarzinom zu einer vermehrten Aktivierung von pankreatischen Sternzellen führt [18], besitzt dieser eine Bedeutung für die Wachstums- und Invasionsförderung der Tumorzellen durch PSCs. Ebenso wird durch die aktivierten PSCs als Hauptakteure des fibrotischen Gewebeumbaus eine immer



stärkere Desmoplasie erwirkt. Diese führt neben veränderten mechanischen Eigenschaften des Tumors zu dessen Hypoxie und Chemoresistenz. Auch wenn die genaue Funktion der Desmoplasie heute noch unklar ist, so ist dennoch erwiesen, dass die Zellproliferation und der Umbau des *TMEs* den Gewebedruck im PDAC massiv steigern. Die druckabhängige Aktivierung von PSCs kann somit als ein wichtiger Zündstoff für die unterstützende Rolle pankreatischer Sternzellen in der Progression des PDACs gesehen werden. Somit scheint es interessant, die Bedeutsamkeit des mechanosensitiven Piezo1-Kanals als therapeutisches und prognostisches Target des PDACs zu eruieren.

Das pankreatische duktales Adenokarzinom ist eine in den meisten Fällen unheilbare Erkrankung mit einem schnell eintretenden Tod. Die geringe Überlebensrate der Erkrankung und damit die verheerenden Folgen der Diagnose für Patienten und Angehörige haben sich bis heute trotz intensiver Forschungsbemühungen kaum verändert. Sie weisen auf die Notwendigkeit weiterer medizinischer Forschung zur Identifizierung von Target-spezifischen Therapien und Frühmarkern hin. Dabei rückt das Interesse heute von standardisierten Chemotherapie-Zyklen ab, und wendet sich zielgerichteten und teilweise individualisierten, mutationsspezifischen Eingriffen in tumoröse Stoffwechselwege sowie Immunzell- oder Stroma-Interaktionen zu. Pankreatische Sternzellen stehen durch ihre Interaktion mit den Tumorzellen und als Produzenten des desmoplastischen Stromas im Fokus einer gegen das Tumormikromilieu gerichteten Therapie. Hier wird ein Grundstein für die Erforschung mechanosensitiver Kanäle in pankreatischen Sternzellen unter Berücksichtigung des drucksensitiven Piezo1- und TRPV4-Kanals gelegt, welcher deren Rolle für die Aktivierung und Migration pankreatischer Sternzellen *in vitro* verdeutlicht.

## 5 Ausblick

Die hier durchgeführten Experimente unterstreichen die Bedeutung des Piezo1-Kanals für die pathologische Aktivierung muriner pankreatischer Sternzellen *in vitro*. Damit lässt sich auch eine Funktion des Piezo1-Kanals bei der pathologischen Druck-getriggerten Aktivierung von PSCs im pankreatischen duktalem Adenokarzinom vermuten. Um die Reichweite des Piezo1-Kanals als möglichen therapeutischen Ansatzpunkt des PDACs eingrenzen zu können, sind jedoch weitere Experimente vonnöten.

So scheint es zuerst interessant, den Einfluss einer Piezo1-Aktivierung auf pankreatische Sternzellen noch näher zu untersuchen. Die Anfärbung der Zellsphäroide und insbesondere des Kollagen I könnte hier einen Aufschluss über die exakte Matrixumstrukturierung durch PSCs gewähren. Weiterhin könnten EM-Aufnahmen pankreatischer Sternzellen strukturelle Unterschiede von Zellorganellen nach Piezo1-Aktivierung hervorbringen. So könnte durch die Aktivierung mehr raues ER vorliegen oder durch eine vermehrte Sekretion von Kollagen I, MMPs und TIMPs vermehrt Vesikel an der zur ECM gerichteten Zellmembran sichtbar sein. Auch funktionelle Untersuchungen der Kollagen I- oder MMP-Sekretion könnten weitere Informationen über die veränderte Syntheseleistung pankreatischer Sternzellen herausstellen.

Zudem liegt bisher für den Piezo1-Kanal kein spezifischer Inhibitor vor. Die Entwicklung eines solchen könnte jedoch wichtige Erkenntnisse über die Funktion des Piezo1-Kanals in Sternzellen liefern. In den von mir durchgeführten Experimenten stellte sich ein *Knock-down* des Piezo1-Kanals durch eine siRNA in den primär-kultivierten pankreatischen Sternzellen als nicht durchführbar heraus. Ein spezifischer pharmakologischer Kanalinhibitor könnte demgegenüber viele *in vitro*-Experimente vereinfachen und auch *in vivo* eingesetzt werden.

Weiterhin sollte ebenfalls die Expression von Piezo1 in pankreatischen Tumorzellen überprüft werden. Wie beispielsweise für Brusttumore, Magenkarzinome und kleinzellige Lungenkarzinome gezeigt werden konnte, kann die Piezo1-Expression auch das Tumorzellverhalten beeinflussen und prognostisch relevant sein. Eventuell könnte auch in PCCs eine erhöhte Piezo1-Expression oder -Aktivierung migrationssteigernd wirken. Jedoch scheint es auch im Hinblick auf die Sternzellen sinnvoll, die Interaktion von PSCs mit PCCs unter Piezo1-Stimulation zu eruieren. Hier könnte die Untersuchung von Mischsphäroiden aus beiden Zellen einen Informationsgewinn liefern. *In vivo*-Versuche könnten anschließend eine mögliche veränderte Gesamt-Mechanik des Tumors durch die vermehrte PSC-Aktivierung unter Piezo1-Stimulation herausstellen.

Zuletzt zeigen einige Versuche, dass es durchaus Unterschiede im Verhalten von PSCs und PCCs *in vitro* und *in vivo* geben kann. So deuten manche Autoren auf einen *in vivo* schützenden Effekt des desmoplastischen Gewebes hin, entkräftigen damit die pathologische

Bedeutsamkeit pankreatischer Sternzellen als Unterstützer der Tumorzellen und warnen vor dem Einsatz einer anti-stromalen Therapie, welche die Dissemination von Tumorzellen fördern könnte [11]. Die „wahre“ Rolle der Desmoplasie im PDAC ist bis dato also unklar, vieles deutet jedoch auf insgesamt bilaterale Effekte hin. Eine protumoröse Wirkung der Desmoplasie, welche in der Mehrheit der Studien postuliert wird, ist dabei nicht zu leugnen. Das Interesse an einer möglichen anti-stromalen Tumorthherapie wird zudem durch erste Erfolge wie einem möglichen Ansprechen von PDAC auf ATII-Rezeptor-Blocker oder Hyaluronasen weiter verstärkt [1]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie am Mausmodell weist ebenso auf einen Rückgang der Fibrose und Chemoresistenz im PDAC bei chemischer Hemmung aktivierter PSCs hin [140]. Weitere Experimente zur Beteiligung von Sternzellen und Fibroblasten sowie zur genauen Entschlüsselung von Signalwegen, welche fördernd oder hemmend auf das PDAC wirken, könnten in Zukunft Aufschluss über zusätzliche therapeutische Targets liefern. Die „Desmoplasie-Debatte“ verdeutlicht zudem, dass die Untersuchung von *in vitro*-Modellen nicht immer mit den *in vivo*-Verhältnissen gleichzusetzen ist und Ergebnisse im Hinblick auf die Deutung von Funktionen an Lebewesen stets mit Vorsicht zu genießen sind. Schließlich ist es auch für die Bedeutung mechanosensitiver Kanäle im menschlichen PDAC von großem Interesse, *in vivo*-Versuche vorweisen zu können, um die bereits gewonnenen Hypothesen zu unterstützen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Current and evolving therapies. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 1338. doi: 10.3390/ijms18071338.
2. Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 11182–11198. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11182.
3. Schober M, Jesenofsky R, Faissner R, Weidenauer C, Hagmann W, Michl P, Heuchel RL, Haas SL, Löhr J-M. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancers.* 2014; 6: 2137–2154. doi: 10.3390/cancers6042137.
4. 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. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: Role of pancreatic stellate cells. *Pancreas.* 2004; 29: 179–187.
5. Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kong B, Esposito I, Friess H, Kleeff J. The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med.* 2012; 12: 288–303. doi: 10.2174/156652412799218921
6. Provenzano PP, Hingorani SR. Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer. *Br J Cancer.* 2013; 108: 1–8. doi: 10.1038/bjc.2012.569.
7. Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM, Bastidas AJ, Vierra M. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 48: 919–922.
8. Longo V, Brunetti O, Gnoni A, Cascinu S, Gasparini G, Lorusso V, Ribatti D, Silvestris N. Angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma: A controversial issue. *Oncotarget.* 2016; 7: 58649–58658. doi: 10.18632/oncotarget.10765.
9. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell.* 2014; 25: 719–734. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.005.
10. 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. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2014; 25: 735–747. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.021.

11. Gore J, Korc M. Pancreatic cancer stroma: Friend or foe? *Cancer Cell*. 2014; 25: 711–712. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.026.
12. Cannon A, Thompson C, Hall BR, Jain M, Kumar S, Batra SK. Desmoplasia in pancreatic ductal adenocarcinoma: Insight into pathological function and therapeutic potential. *Genes Cancer*. 2018; 9: 78–86. doi: 10.18632/genesandcancer.171.
13. Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: An unholy alliance. *Cancer Res*. 2008; 68: 7707–7710. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1132.
14. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 239–252. doi: 10.1038/nrc2618.
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011; 144: 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
16. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: A star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 2007; 117: 50–59. doi: 10.1172/JCI30082.
17. Bynigeri RR, Jakkampudi A, Jangala R, Subramanyam C, Sasikala M, Rao GV, Reddy DN, Talukdar R. Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J Gastroenterol*. 2017; 23: 382–405. doi: 10.3748/wjg.v23.i3.382.
18. Watanabe S, Nagashio Y, Asaumi H, Nomiya Y, Taguchi M, Tashiro M, Kihara Y, Nakamura H, Otsuki M. Pressure activates rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 287: G1175-G1181. doi: 10.1152/ajpgi.00339.2004.
19. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: Identification, isolation, and culture. *Gut*. 1998; 43: 128–133.
20. Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K, Ellenrieder V, Schneiderhan W, Siech M, Adler G, Bachem MG, Gress TM. Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: Organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med*. 2005; 83: 795–805. doi: 10.1007/s00109-005-0680-2.
21. Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus. *Biol Chem*. 2009; 390: 1003–1012. doi: 10.1515/BC.2009.121.
22. Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu M-J, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: Implications for extracellular matrix turnover. *Gut*. 2003a; 52: 275–282.
23. Ferdek PE, Jakubowska MA. Biology of pancreatic stellate cells-more than just pancreatic cancer. *Pflugers Arch*. 2017; 469: 1039-1050. doi: 10.1007/s00424-017-1968-0.

24. Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV. Pancreatic stellate cells: Partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2008; 68: 2085–2093. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2477.
25. Apte MV, Wilson JS, Lugea A, Pandol SJ. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology.* 2013; 144: 1210–1219. doi: 10.1053/j.gastro.2012.11.037.
26. Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 403: 380–384. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.040.
27. Di Maggio F, Arumugam P, Delvecchio FR, Batista S, Lechertier T, Hodivala-Dilke K, Kocher HM. Pancreatic stellate cells regulate blood vessel density in the stroma of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology.* 2016; 16: 995–1004. doi: 10.1016/j.pan.2016.05.393.
28. Büchler P, Reber HA, Lavey RS, Tomlinson J, Büchler MW, Friess H, Hines OJ. Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. *J Surg Res.* 2004; 120: 295–303. doi: 10.1016/j.jss.2004.02.014.
29. Niizeki H, Kobayashi M, Horiuchi I, Akakura N, Chen J, Wang J, Hamada J-i, Seth P, Katoh H, Watanabe H, Raz A, Hosokawa M. Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer.* 2002; 86: 1914–1919. doi: 10.1038/sj.bjc.6600331.
30. Sada M, Ohuchida K, Horioka K, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility. *Cancer Lett.* 2016; 372: 210–218. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.016.
31. Yokoi K, Fidler IJ. Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 2299–2306. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0488
32. Lu J, Zhou S, Siech M, Habisch H, Seufferlein T, Bachem MG. Pancreatic stellate cells promote haptotaxis of cancer cells through collagen I-mediated signalling pathway. *Br J Cancer.* 2014; 110: 409–420. doi: 10.1038/bjc.2013.706.
33. Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S et al. Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180. *Cancer Lett.* 2018; 412: 143–154. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.010.
34. Suetsugu A, Snyder CS, Moriwaki H, Saji S, Bouvet M, Hoffman RM. Imaging the interaction of pancreatic cancer and stellate cells in the tumor microenvironment during metastasis. *Anticancer Res.* 2015; 35: 2545–2551.

35. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012; 196: 395–406. doi: 10.1083/jcb.201102147.
36. Nieskoski MD, Marra K, Gunn JR, Hoopes PJ, Doyley MM, Hasan T, Tremblay BS, Pogue BW. Collagen complexity spatially defines microregions of total tissue pressure in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2017; 7: 10093. doi: 10.1038/s41598-017-10671-w.
37. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Hoff DD von, Hingorani SR. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2012; 21: 418–429. doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.007.
38. Chauhan VP, Boucher Y, Ferrone CR, Roberge S, Martin JD, Stylianopoulos T, Bardeesy N, DePinho RA, Padera TP, Munn LL, Jain RK. Compression of pancreatic tumor blood vessels by hyaluronan is caused by solid stress and not interstitial fluid pressure. *Cancer Cell.* 2014; 26: 14–15. doi: 10.1016/j.ccr.2014.06.003.
39. Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Externally applied pressure activates pancreatic stellate cells through the generation of intracellular reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293: G972-G978. doi: 10.1152/ajpgi.00018.2007.
40. Jansen KA, Donato DM, Balcioglu HE, Schmidt T, Danen EHJ, Koenderink GH. A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1853: 3043–3052. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.007.
41. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SFT, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell.* 2009; 139: 891–906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027.
42. Hytönen VP, Wehrle-Haller B. Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals. *Exp Cell Res.* 2016; 343: 35–41. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.027.
43. Kobayashi T, Sokabe M. Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22: 669–676. doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.023.
44. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels. *J Cell Sci.* 2008; 121: 496–503. doi: 10.1242/jcs.022053.
45. Tobin DM, Madsen DM, Kahn-Kirby A, Peckol EL, Moulder G, Barstead R, Maricq AV, Bargmann CI. Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron.* 2002; 35: 307–318.

46. Christensen AP, Corey DP. TRP channels in mechanosensation: Direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8: 510–521. doi: 10.1038/nrn2149.
47. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science.* 2010; 330: 55–60. doi: 10.1126/science.1193270.
48. Fels B, Bulk E, Pethő Z, Schwab A. The role of TRP channels in the metastatic cascade. *Pharmaceuticals.* 2018; 11: 48. doi: 10.3390/ph11020048.
49. Fels B, Nielsen N, Schwab A. Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of murine pancreatic stellate cells. *Eur Biophys J.* 2016; 45: 657–670. doi: 10.1007/s00249-016-1176-4.
50. Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, tension, and transduction - The function and regulation of Piezo ion channels. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42: 57–71. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.004.
51. Ranade SS, Qiu Z, Woo S-H, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM, Xu J, Mathur J, Bandell M, Coste B, Li Y-SJ, Chien S, Patapoutian A. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: 10347–10352. doi: 10.1073/pnas.1409233111.
52. Alper SL. Genetic diseases of Piezo1 and Piezo2 dysfunction. *Curr Top Membr.* 2017; 79: 97–134. doi: 10.1016/bs.ctm.2017.01.001.
53. Volkers L, Mechioukhi Y, Coste B. Piezo channels: from structure to function. *Pflugers Arch.* 2015; 467: 95–99. doi: 10.1007/s00424-014-1578-z.
54. Ge J, Li W, Zhao Q, Li N, Chen M, Zhi P, Li R, Gao N, Xiao B, Yang M. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature.* 2015; 527: 64–69. doi: 10.1038/nature15247.
55. Zhao Q, Zhou H, Chi S, Wang Y, Wang J, Geng J, Wu K, Liu W, Zhang T, Dong M-Q, Wang J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel. *Nature.* 2018; 554: 487–492. doi: 10.1038/nature25743.
56. Lewis AH, Cui AF, McDonald MF, Grandl J. Transduction of repetitive mechanical stimuli by Piezo1 and Piezo2 ion channels. *Cell Rep.* 2017; 19: 2572–2585. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.079.
57. Nourse JL, Pathak MM. How cells channel their stress: Interplay between Piezo1 and the cytoskeleton. *Semin Cell Dev Biol.* 2017; 71: 3-12. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.06.018.
58. Gaub BM, Müller DJ. Mechanical stimulation of Piezo1 receptors depends on extracellular matrix proteins and directionality of force. *Nano Lett.* 2017; 17: 2064–2072. doi: 10.1021/acs.nanolett.7b00177.



59. Gottlieb PA, Bae C, Sachs F. Gating the mechanical channel Piezo1: A comparison between whole-cell and patch recording. *Channels*. 2012; 6: 282–289. doi: 10.4161/chan.21064.
60. Syeda R, Xu J, Dubin AE, Coste B, Mathur J, Huynh T, Matzen J, Lao J, Tully DC, Engels IH, Petrassi HM, Schumacher AM, Montal M, Bandell M, Patapoutian A. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife*. 2015; 4: e08659. doi: 10.7554/eLife.07369.
61. Lacroix JJ, Botello-Smith WM, Luo Y. Probing the gating mechanism of the mechanosensitive channel Piezo1 with the small molecule Yoda1. *Nat Commun*. 2018; 9: 2029. doi: 10.1038/s41467-018-04405-3.
62. Gnanasambandam R, Ghatak C, Yasmann A, Nishizawa K, Sachs F, Ladokhin AS, Sukharev SI, Suchyna TM. GsMTx4: Mechanism of inhibiting mechanosensitive ion channels. *Biophys J*. 2017; 112: 31–45. doi: 10.1016/j.bpj.2016.11.013.
63. Gudipaty SA, Lindblom J, Loftus PD, Redd MJ, Edes K, Davey CF, Krishnegowda V, Rosenblatt J. Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1. *Nature*. 2017; 543: 118–121. doi: 10.1038/nature21407.
64. Hung W-C, Yang JR, Yankaskas CL, Wong BS, Wu P-H, Pardo-Pastor C, Serra SA, Chiang M-J, Gu Z, Wirtz D, Valverde MA, Yang JT, Zhang J, Konstantopoulos K. Confinement sensing and signal optimization via Piezo1/PKA and myosin II pathways. *Cell Rep*. 2016; 15: 1430–1441. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.035.
65. Li C, Rezanian S, Kammerer S, Sokolowski A, Devaney T, Gorischek A, Jahn S, Hackl H, Groschner K, Windpassinger C, Malle E, Bauernhofer T, Schreiber W. Piezo1 forms mechanosensitive ion channels in the human MCF-7 breast cancer cell line. *Sci Rep*. 2015; 5: 8364. doi: 10.1038/srep08364.
66. Yang X-N, Lu Y-P, Liu J-J, Huang J-K, Liu Y-P, Xiao C-X, Jazag A, Ren J-L, Guleng B. Piezo1 is as a novel trefoil factor family 1 binding protein that promotes gastric cancer cell mobility in vitro. *Dig Dis Sci*. 2014; 59: 1428–1435. doi: 10.1007/s10620-014-3044-3.
67. McHugh BJ, Murdoch A, Haslett C, Sethi T. Loss of the integrin-activating transmembrane protein Fam38A (Piezo1) promotes a switch to a reduced integrin-dependent mode of cell migration. *PLoS ONE*. 2012; 7: e40346. doi: 10.1371/journal.pone.0040346.
68. Romac JM-J, Shahid RA, Swain SM, Vigna SR, Liddle RA. Piezo1 is a mechanically activated ion channel and mediates pressure induced pancreatitis. *Nat Commun*. 2018; 9: 1715. doi: 10.1038/s41467-018-04194-9.

69. Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*. 2000; 103: 525–535.
70. Zhan L, Li J. The role of TRPV4 in fibrosis. *Gene*. 2018; 642: 1–8.  
doi: 10.1016/j.gene.2017.10.067.
71. Randhawa PK, Jaggi AS. TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system. *Basic Res Cardiol*. 2015; 110: 54. doi: 10.1007/s00395-015-0512-7.
72. Matthews BD, Thodeti CK, Tytell JD, Mammoto A, Overby DR, Ingber DE. Ultra-rapid activation of TRPV4 ion channels by mechanical forces applied to cell surface beta1 integrins. *Integr Biol*. 2010; 2: 435–442. doi: 10.1039/c0ib00034e.
73. Martinac B, Poole K. Mechanically activated ion channels. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018; 97: 104–107. doi: 10.1016/j.biocel.2018.02.011.
74. Liedtke W, Tobin DM, Bargmann CI, Friedman JM. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 Suppl 2: 14531–14536.  
doi: 10.1073/pnas.2235619100.
75. Skrzypski M, Kakkassery M, Mergler S, Grötzinger C, Khajavi N, Sassek M, Szczepankiewicz D, Wiedenmann B, Nowak KW, Strowski MZ. Activation of TRPV4 channel in pancreatic INS-1E beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion via calcium-dependent mechanisms. *FEBS Lett*. 2013; 587: 3281–3287.  
doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.025.
76. Grace MS, Bonvini SJ, Belvisi MG, McIntyre P. Modulation of the TRPV4 ion channel as a therapeutic target for disease. *Pharmacol Ther*. 2017; 177: 9–22.  
doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.019.
77. Thorneloe KS, Cheung M, Bao W et al. An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. *Sci Transl Med*. 2012; 4: 159ra148. doi: 10.1126/scitranslmed.3004276.
78. Adapala RK, Thoppil RJ, Luther DJ, Paruchuri S, Meszaros JG, Chilian WM, Thodeti CK. TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 54: 45–52.  
doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.10.016.
79. Landouré G, Zdebik AA, Martinez TL, Burnett BG, Stanescu HC, Inada H, Shi Y, Taye AA, Kong L, Munns CH, Choo SS, Phelps CB, Paudel R, Houlden H, Ludlow CL, Caterina MJ, Gaudet R, Kleta R, Fischbeck KH, Sumner CJ. Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nat Genet*. 2010; 42: 170–174.  
doi: 10.1038/ng.512.

80. Deng H-X, Klein CJ, Yan J, Shi Y, Wu Y, Fecto F, Yau H-J, Yang Y, Zhai H, Siddique N, Hedley-Whyte ET, DeLong R, Martina M, Dyck PJ, Siddique T. Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4. *Nat Genet.* 2010; 42: 165–169. doi: 10.1038/ng.509.
81. Liedtke W, Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 13698–13703. doi: 10.1073/pnas.1735416100.
82. Martin E, Dahan D, Cardouat G, Gillibert-Duplantier J, Marthan R, Savineau J-P, Ducret T. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 2012; 464: 261–272. doi: 10.1007/s00424-012-1136-5.
83. Mrkonjić S, Garcia-Elias A, Pardo-Pastor C, Bazellières E, Trepât X, Vriens J, Ghosh D, Voets T, Vicente R, Valverde MA. TRPV4 participates in the establishment of trailing adhesions and directional persistence of migrating cells. *Pflugers Arch.* 2015; 467: 2107–2119. doi: 10.1007/s00424-014-1679-8.
84. Zhang LP, Kline RH, Deevska G, Ma F, Nikolova-Karakashian M, Westlund KN. Alcohol and high fat induced chronic pancreatitis: TRPV4 antagonist reduces hypersensitivity. *Neuroscience.* 2015; 311: 166–179. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.028.
85. Kurosaka S, Kashina A. Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2008; 84: 102–122. doi: 10.1002/bdrc.20125.
86. Kirfel G, Herzog V. Migration of epidermal keratinocytes: Mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma.* 2004; 223: 67–78. doi: 10.1007/s00709-003-0031-5.
87. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 2005; 15: 599–607. doi: 10.1016/j.tcb.2005.09.002.
88. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science.* 2003; 302: 1704–1709. doi: 10.1126/science.1092053.
89. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 2005; 17: 559–564. doi: 10.1016/j.ceb.2005.08.002.
90. Yumura S, Kitanishi-Yumura T. Fluorescence-mediated visualization of actin and myosin filaments in the contractile membrane-cytoskeleton complex of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Struct Funct.* 1990; 15: 355–364.
91. Yumura S, Itoh G, Kikuta Y, Kikuchi T, Kitanishi-Yumura T, Tsujioka M. Cell-scale dynamic recycling and cortical flow of the actin-myosin cytoskeleton for rapid cell migration. *Biol Open.* 2013; 2: 200–209. doi: 10.1242/bio.20122899.
92. Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance. *J Cell Sci.* 2005; 118: 4917–4919. doi: 10.1242/jcs.02662.

93. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 778–790. doi: 10.1038/nrm2786.
94. Fenix AM, Burnette DT. Assembly of myosin II filament arrays: Network contraction vs. expansion. *Cytoskeleton.* 2018; 75: 545-549 doi: 10.1002/cm.21487.
95. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11: 633–643. doi: 10.1038/nrm2957.
96. Allingham JS, Smith R, Rayment I. The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol.* 2005; 12: 378–379. doi: 10.1038/nsmb908.
97. Shutova M, Yang C, Vasiliev JM, Svitkina T. Functions of nonmuscle myosin II in assembly of the cellular contractile system. *PLoS ONE.* 2012; 7: e40814. doi: 10.1371/journal.pone.0040814.
98. Clark K, Langeslag M, Figdor CG, van Leeuwen FN. Myosin II and mechanotransduction: A balancing act. *Trends Cell Biol.* 2007; 17: 178–186. doi: 10.1016/j.tcb.2007.02.002.
99. Pfitzer G. Invited review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol.* 2001; 91: 497–503. doi: 10.1152/jappl.2001.91.1.497.
100. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1325–1358. doi: 10.1152/physrev.00023.2003.
101. Yuen SL, Ogut O, Brozovich FV. Nonmuscle myosin is regulated during smooth muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H191-H199. doi: 10.1152/ajpheart.00132.2009.
102. Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA, Fay FS. Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science.* 1991; 254: 703–706.
103. Tsai F-C, Seki A, Yang HW, Hayer A, Carrasco S, Malmersjö S, Meyer T. A polarized Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol.* 2014; 16: 133–144. doi: 10.1038/ncb2906.
104. Bronner F. Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal.* 2001; 1: 919–925. doi: 10.1100/tsw.2001.489.
105. Storck H, Hild B, Schimmelpfennig S, Sargin S, Nielsen N, Zaccagnino A, Budde T, Novak I, Kalthoff H, Schwab A. Ion channels in control of pancreatic stellate cell migration. *Oncotarget.* 2017; 8: 769–784. doi: 10.18632/oncotarget.13647.
106. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. *Science.* 1988; 240: 177–184.
107. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci.* 2015; 16: 5517–5527. doi: 10.3390/ijms16035517.

108. Keely P, Nain A. Capturing relevant extracellular matrices for investigating cell migration. *F1000Res*. 2015; 4: 1408. doi: 10.12688/f1000research.6623.1.
109. Fong ELS, Harrington DA, Farach-Carson MC, Yu H. Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. *Biomaterials*. 2016; 108: 197–213. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.052.
110. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*. 2011; 51: 2720. doi: 10.3791/2720.
111. Blacher S, Erpicum C, Lenoir B, Paupert J, Moraes G, Ormenese S, Bullinger E, Noel A. Cell invasion in the spheroid sprouting assay: A spatial organisation analysis adaptable to cell behaviour. *PLoS ONE*. 2014; 9: e97019. doi: 10.1371/journal.pone.0097019.
112. Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T. Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch*. 2007; 455: 465–477. doi: 10.1007/s00424-007-0314-3.
113. Haanes KA, Schwab A, Novak I. The P2X7 receptor supports both life and death in fibrogenic pancreatic stellate cells. *PLoS ONE*. 2012; 7: e51164. doi: 10.1371/journal.pone.0051164.
114. 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. TRPC6 channels modulate the response of pancreatic stellate cells to hypoxia. *Pflugers Arch*. 2017; 469: 1567–1577. doi: 10.1007/s00424-017-2057-0.
115. Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z et al. N-((1S)-1-(4-((2S)-2-((2,4-dichlorophenyl)sulfonylamino)-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinylcarbonyl)-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 326: 432–442. doi: 10.1124/jpet.108.139295.
116. Longati P, Jia X, Eimer J, Wagman A, Witt M-R, Rehnmark S, Verbeke C, Toftgård R, Löhr M, Heuchel RL. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer*. 2013; 13: 95. doi: 10.1186/1471-2407-13-95.
117. Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, Doherty E, McCarroll JA, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Cell migration: A novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut*. 2003b; 52: 677–682.
118. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985; 260: 3440–3450.

119. Kwakye GF, Li D, Kabobel OA, Bowman AB. Cellular fura-2 manganese extraction assay (CFMEA). *Curr Protoc Toxicol.* 2011; Chapter 12: Unit12.18.  
doi: 10.1002/0471140856.tx1218s48.
120. Fabian A, Fortmann T, Bulk E, Bomben VC, Sontheimer H, Schwab A. Chemotaxis of MDCK-F cells toward fibroblast growth factor-2 depends on transient receptor potential canonical channel 1. *Pflugers Arch.* 2011; 461: 295–306. doi: 10.1007/s00424-010-0901-6.
121. Merritt JE, Jacob R, Hallam TJ. Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils. *J Biol Chem.* 1989; 264: 1522–1527.
122. Sakamoto T, Limouze J, Combs CA, Straight AF, Sellers JR. Blebbistatin, a myosin II inhibitor, is photoinactivated by blue light. *Biochemistry.* 2005; 44: 584–588.  
doi: 10.1021/bi0483357.
123. Wasch DEJ, Fabian A, Budde T, Schwab A. Dual-color quantum dot detection of a heterotetrameric potassium channel (hK<sub>Ca</sub>3.1). *Am J Physiol, Cell Physiol.* 2011; 300: C843-C849. doi: 10.1152/ajpcell.00053.2010.
124. Evans EL, Cuthbertson K, Endesh N, Rode B, Blythe NM, Hyman AJ, Hall SJ, Gaunt HJ, Ludlow MJ, Foster R, Beech DJ. Yoda1 analogue (Dooku1) which antagonizes Yoda1-evoked activation of Piezo1 and aortic relaxation. *Br J Pharmacol.* 2018; 175: 1744–1759. doi: 10.1111/bph.14188.
125. Robinson BK, Cortes E, Rice AJ, Sarper M, Del Río Hernández A. Quantitative analysis of 3D extracellular matrix remodelling by pancreatic stellate cells. *Biol Open.* 2016; 5: 875–882. doi: 10.1242/bio.017632.
126. Miyamoto T, Mochizuki T, Nakagomi H, Kira S, Watanabe M, Takayama Y, Suzuki Y, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M. Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release in urothelial cell cultures. *J Biol Chem.* 2014; 289: 16565–16575.  
doi: 10.1074/jbc.M113.528638.
127. Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 695–702. doi: 10.1038/35036318.
128. Liu Z, van Grunsven LA, van Rossen E, Schroyen B, Timmermans J-P, Geerts A, Reynaert H. Blebbistatin inhibits contraction and accelerates migration in mouse hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol.* 2010; 159: 304–315. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00477.x.
129. Liang X, Howard J. Structural biology: Piezo senses tension through curvature. *Curr Biol.* 2018; 28: R357-R359. doi: 10.1016/j.cub.2018.02.078.

130. Teng J, Loukin S, Anishkin A, Kung C. The force-from-lipid (FFL) principle of mechanosensitivity, at large and in elements. *Pflugers Arch.* 2015; 467: 27–37. doi: 10.1007/s00424-014-1530-2.
131. Chalfie M. Neurosensory mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 44–52. doi: 10.1038/nrm2595.
132. Cox CD, Bae C, Ziegler L, Hartley S, Nikolova-Krstevski V, Rohde PR, Ng C-A, Sachs F, Gottlieb PA, Martinac B. Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals Piezo1 is gated by bilayer tension. *Nat Commun.* 2016; 7: 10366. doi: 10.1038/ncomms10366.
133. Lewis AH, Grandl J. Mechanical sensitivity of Piezo1 ion channels can be tuned by cellular membrane tension. *Elife.* 2015; 4: e12088. doi: 10.7554/eLife.12088.
134. Pathak MM, Nourse JL, Tran T, Hwe J, Arulmoli J, Le DTT, Bernardis E, Flanagan LA, Tombola F. Stretch-activated ion channel Piezo1 directs lineage choice in human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: 16148–16153. doi: 10.1073/pnas.1409802111.
135. Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T. Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS ONE.* 2010; 5: e11654. doi: 10.1371/journal.pone.0011654.
136. Liu C, Montell C. Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 460: 22–25. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.067.
137. Wei C, Wang X, Zheng M, Cheng H. Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2012; 24: 254–261. doi: 10.1016/j.ceb.2011.12.002.
138. Becker D, Blase C, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J Cell Sci.* 2005; 118: 2435–2440. doi: 10.1242/jcs.02372.
139. Tian L, Lu Z-P, Cai B-B, Zhao L-T, Qian D, Xu Q-C, Wu P-F, Zhu Y, Zhang J-J, Du Q, Miao Y, Jiang K-R. Activation of pancreatic stellate cells involves an EMT-like process. *Int J Oncol.* 2016; 48: 783–792. doi: 10.3892/ijo.2015.3282.
140. Han X, Li Y, Xu Y, Zhao X, Zhang Y, Yang X, Wang Y, Zhao R, Anderson GJ, Zhao Y, Nie G. Reversal of pancreatic desmoplasia by re-educating stellate cells with a tumour microenvironment-activated nanosystem. *Nat Commun.* 2018; 9: 3390. doi: 10.1038/s41467-018-05906-x.

## 7 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Benedikt Fels für die intensive Einarbeitung und Unterstützung im Rahmen meiner Doktorarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schwab für die Begleitung, für die freundliche Hilfe sowie für die wissenschaftliche Beratung, welche stets zur kritischen Auseinandersetzung mit der Thematik motivierte.

Zudem richtet sich mein Dank an Sandra Schimmelpfennig, Sarah Sargin, Karolina Najder, Dr. Zoltán Pethö, Dr. Etmar Bulk und allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie II, die mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Des Weiteren danke ich dem Medizinerkolleg Münster für die ideelle und finanzielle Förderung.

Danken möchte ich außerdem meinen Freunden und meiner Familie, die mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.



## 8 Lebenslauf

