

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

**Migration und Chemotaxis
von pankreatischen Sternzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von
Hild, Benedikt
aus Remscheid
2015

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

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

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Haier

Tag der mündlichen Prüfung: 14.08.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie II

Direktor: Univ. – Prof. Dr. med. H. Oberleithner

Referent: Univ. – Prof. Dr. med. A. Schwab

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Haier

Zusammenfassung

Migration und Chemotaxis von pankreatischen Sternzellen

Benedikt Hild

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) gehört immer noch zu den tödlichsten Tumorarten überhaupt. Die Gründe für die ungünstige Prognose des PDAC sind vielfältig und zum Teil durch die exzessive Bindegewebsproduktion dieses Tumors zu erklären. Für die Produktion der extrazellulären Matrix sind die pankreatischen Sternzellen verantwortlich. Diese Zellart beeinflusst wesentlich die Progression des PDAC. Daher ist es wichtig für das Verständnis des duktales Adenokarzinoms des Pankreas und auch für die Entwicklung potenzieller Therapien, die pankreatischen Sternzellen genauer zu erforschen. Da die Aktivierung der Sternzellen durch bestimmte von den malignen Zellen des Tumors sezernierten Faktoren eine wichtige Rolle spielt, werden diese Einflüsse im Rahmen dieser Doktorarbeit überprüft und anhand des Migrationsverhaltens der Sternzellen weiter charakterisiert.

Es wurde nachgewiesen, dass der epidermal growth factor (EGF) und der platelet derived growth factor (PDGF) die Sternzellen sowohl bei homogener Konzentration der Stimulanzen als auch bei Experimenten mit Konzentrations-Gradienten schneller migrieren lassen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EGF und insbesondere PDGF in der Lage sind, Chemotaxis in murinen Sternzellen zu induzieren. Die Stimulierung durch EGF und PDGF konnte durch die Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals verhindert werden. Weiterhin war die Chemotaxis-Induktion durch PDGF bei nicht-funktionalem $K_{Ca}3.1$ -Kanal zeitlich deutlich verzögert und abgeschwächt.

Diese Arbeit liefert wichtige Ergebnisse zur Charakterisierung der pankreatischen Sternzellen. Insbesondere die Beobachtungen der Chemotaxis-Induktion und deren Beeinflussung durch Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals offenbaren mögliche Ansätze für Therapien gegen die desmoplastische Reaktion in PDAC.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.08.2015

ERKLÄRUNG

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

Migration und Chemotaxis von pankreatischen Sternzellen

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

Institut für Physiologie II

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. A. Schwab

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

Münster, 8.12.2014

Ort, Datum

Benedikt Hild

Name/ Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Duktales Adenokarzinom des Pankreas	1
1.2 Desmoplasie	1
1.3 Pankreatische Sternzellen.....	2
1.4 Aktivierung der PSCs	3
1.4.1 Platelet-derived growth factor	3
1.4.2 Epidermal growth factor	4
1.5 Migration	4
1.6 Chemotaxis	5
1.6.1 K _{Ca} 3.1-Kanal-Kanal	6
1.7 Ziel dieser Arbeit	6
2 Methoden	8
2.1 Zellkultur	8
2.2 Tiere.....	8
2.3 Isolierung von murinen pankreatischen Sternzellen	8
2.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	9
2.5 Migration	10
2.5.1 Chemokinese	10
2.5.2 Chemotaxis	12
2.6 Western Blot	14
2.7 Statistik	16

3	Ergebnisse.....	17
3.1	Identifizierung der pankreatischen Sternzellen	17
3.2	Chemokinese	21
3.2.1	Chemokinese mit Stimulierung durch PDGF, EGF und Überstand von BxPc3-Zellen.....	22
3.2.2	Welchen Einfluss hat der $K_{Ca}3.1$ -Kanal auf die Migration?	25
3.2.3	Chemotaxis	29
3.2.4	Chemotaxis mit PDGF, EGF und TGF- β	29
3.2.5	Welchen Effekt hat die $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung auf die Chemotaxis?	34
4	Diskussion.....	40
4.1	Kontrollexperimente	41
4.2	Überstand von BxPC3 Pankreaskarzinomzellen aktiviert PSCs	42
4.3	EGF lässt PSCs schneller migrieren	42
4.4	PDGF induziert Chemotaxis bei PSCs	44
5	Ausblick.....	49
6	Zusammenfassung	51
7	Lebenslauf.....	52
8	Materialien	54
9	Literaturverzeichnis	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemotaxis-Kammer Ibidi® μ -Slides	13
Abbildung 2: Chemotaxis-Index.....	14
Abbildung 3: Nachweis von Vitamin A und α -SMA in Pankreas-Sternzellen	18
Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung von murinen PSCs.....	19
Abbildung 5: Morphologische Veränderungen der PSCs in Kultur	20
Abbildung 6: A, B: Beispielhafte Darstellung der Trajektorien von migrierenden Zellen eines Chemokinese-Experimentes (A) und eines Chemotaxis-Experimentes (B).....	21
Abbildung 7: Chemokinese mit Stimulierung durch PDGF, EGF und dem Überstand von BxPc3-Zellen	22
Abbildung 8: Zusammenfassung der Experimente mit Stimulierung durch PDGF, EGF und dem Überstand von BxPc3-Zellen	23
Abbildung 9: Geschwindigkeitsverlauf während der Chemokinese-Experimente.....	24
Abbildung 10: Trajektorien der Chemokinese unter KCa3.1-Kanal-Inhibition und PDGF-Stimulierung.....	25
Abbildung 11: Statistische Auswertung der Chemokinese-Experimente mit Stimulierung durch PDGF und Inhibition des KCa3.1-Kanals.....	26
Abbildung 12: Trajektorien der Sternzell-Migration unter EGF-Stimulierung und gleichzeitiger KCa3.1-Kanal-Inhibierung	27
Abbildung 13: Statistische Zusammenfassung der Chemokinese-Experimente mit Stimulierung durch EGF und Inhibition des KCa3.1-Kanals	27
Abbildung 14: Chemotaxis mit Gradienten von PDGF, EGF und TGF- β	30
Abbildung 15: Statistische Auswertung der Chemotaxis-Experimente.....	31
Abbildung 16: Kumulative Translokation in Richtung der X- und der Y-Achse.....	32
Abbildung 17: Geschwindigkeitsverlauf Chemotaxis, PDGF wirkt verzögert.....	33
Abbildung 18: Trajektorien der Chemotaxis mit PDGF und Inhibierung des KCa3.1-Kanals.	34
Abbildung 19: Chemotaxis mit PDGF und der Inhibierung des K _{Ca} 3.1-Kanals.....	35
Abbildung 20: Chemotaxis der PSCs in einem EGF-Gradienten mit KCa3.1-Kanal-Inhibierung.....	36
Abbildung 21: Chemotaxis mit EGF und der Inhibierung des KCa3.1-Kanals.....	37
Abbildung 22: Achsenabweichung der PSCs während der Chemotaxis unter K _{Ca} 3.1-Inhibierung.....	38

Abbildung 23: Kontrollexperimente zum Ausschluss einer Beeinflussung durch DMSO.....	39
Abbildung 24: Vergleich der relativen Geschwindigkeits- und Translokationserhöhung durch EGF und PDGF.....	45
Abbildung 25: Vergleich Achsenabweichung PDGF und PDGF mit $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung.....	46
Abbildung 26: Einfluss der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle auf die Chemotaxis im PDGF-Gradienten.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erstantikörper Immunfluoreszenz.....	9
Tabelle 2: Zweitantikörper Immunfluoreszenz.....	9
Tabelle 3: Wellenlänge der Filter für die Immunfluoreszenz.....	10
Tabelle 4: Zusammensetzung Matrix Chemokinese	11
Tabelle 5: Stimulantien Chemokinese.....	11
Tabelle 6: Stimulantien Chemotaxis.....	13
Tabelle 7: Erstantikörper Western Blot	15
Tabelle 8: Zweitantikörper Western Blot	15
Tabelle 9: Zusammensetzung SDS Gel.....	15
Tabelle 10: Puffer Western Blot.....	16
Tabelle 11: Benutzte Materialien	54

Abkürzungsverzeichnis

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FKS	fötales Kälberserum
GBSS	Grey's balanced salt solution
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositoltrisphosphat
MAPK	mitogenaktivierte-Proteinkinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEGPG20	pegylated recombinant human hyaluronidase 20
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PDGF	Platlet derived growth factor
PDGF-R	Platlet derived growth factor receptor
PLC	Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5) Trisphosphat
POD	Peroxidase
PSC	Pancreatic stellate cell
RAC	Ras-related C3 botulinum toxin
Ras	Rat sarcoma
RIPA	Radio-Immunopräzipitations Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-associated Kinase
rpm	Rounds Per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SEM	Standard Error Of The Mean
SMA	Smooth muscle actin
SI	Strukturindex
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAM 34	1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole
TRP	Transient Receptor Potential
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Eine maligne Neoplasie besitzt seit jeher ein besonders bedrohliches Potenzial in den Augen der Betroffenen. Auch wenn es viele Krankheiten gibt, die eine höhere Mortalität aufweisen als ein Tumor (81) und auch Krankheiten, die global ein bedeutenderes medizinisches Problem darstellen, haftet der uneinheitlichen Krankheit Krebs ein größerer Schrecken an. Unter den Krebsarten ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas eine besonders bedrohliche Krankheit.

1.1 Duktales Adenokarzinom des Pankreas

Dieser Tumor ist mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren für Männer und 78 Jahren für Frauen eine Erkrankung, die vor allem den älteren Teil der Bevölkerung betrifft. Aufgrund des demographischen Wandels jedoch sind die absoluten Zahlen für die Inzidenzraten in den letzten Jahren gestiegen, so dass bei ungefähr 15.000 Menschen in Deutschland pro Jahr ein Pankreastumor neu diagnostiziert wird (64). Ein Adenokarzinom des Pankreas ist in Deutschland mit einer Inzidenz von 18 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr die 7. häufigste Krebsart. Jedoch ist der Pankreastumor am 4. häufigsten verantwortlich für den Tod durch eine maligne Neoplasie (65). Bereits daraus lässt sich ableiten, dass diese Tumorentität für Betroffene besonders bedrohlich ist. Die Überlebensrate für diese Erkrankung ist mit 8 % für Männer und 7 % für Frauen 5 Jahre nach Diagnosestellung als sehr ungünstig einzuschätzen (65). Sie liegt damit niedriger als die 5-Jahres-Überlebensraten der meisten anderen Tumorarten.

1.2 Desmoplasie

Das duktales Adenokarzinom ist also von großer Bedeutung und im Gegensatz zur verbesserten Therapie anderer Tumorarten (65) fehlt bei der Behandlung des Pankreastumors eine deutliche Verbesserung des Behandlungserfolges (23; 54). Die Ursachen für diesen Umstand sind vielfältig. So verhindert unter anderem die retroperitoneale Lage des Pankreas frühzeitige Symptome. Dies führt dazu, dass meistens Tumore erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden, für die die derzeitigen Therapiemöglichkeiten sehr eingeschränkt sind. Weiterhin findet man bei dem duktalem

Adenokarzinomen des Pankreas eine ausgeprägte Produktion von Extrazellulärmatrix, was als *Desmoplasie* bezeichnet wird. Diese Desmoplasie verringert die Durchblutung im Bereich des Tumors, wodurch die Behandlung auf zwei Weisen erschwert wird: Zum einen werden die erforderlichen Konzentrationen der Chemotherapeutika im Tumorgewebe nicht erreicht (54), zum anderen sind hypoxische Tumorzellen besser vor Bestrahlung geschützt (47; 55). Die Desmoplasie bestimmt also zu einem großen Anteil die Progression des Tumors und den Behandlungserfolg. Die exzessive Produktion von Extrazellulärmatrix beeinflusst die Tumorzellen zudem direkt. So konnte gezeigt werden, dass ohne das Zusammenspiel von Tumorzellen mit den umliegenden Stromazellen das Tumorwachstum bedeutend langsamer voranschreitet (88). In neueren Experimenten konnten diese Beobachtungen jedoch nicht gänzlich bestätigt werden. Das nahezu vollständige Fehlen der Stroma-produzierenden Zellen hatte in diesen Versuchen eine negative Auswirkung auf die Überlebenszeit der Versuchstiere (56). Diese Ergebnisse konnten jedoch bisher nicht bestätigt werden. Ferner kommt es zu einer Degradation der den Tumor umgebenden Basalmembran, sodass die Metastasierung des Tumors erleichtert wird. Verantwortlich hierfür sind wiederum dieselben Zellen, die auch die massive Desmoplasie verursachen: *Pankreatische Sternzellen*.

1.3 Pankreatische Sternzellen

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bei Desmoplasie ist sowohl bei alkoholinduzierter chronischer Pankreatitis, tumorassoziierter chronischer Pankreatitis und bei einer Neoplasie sehr ähnlich (98). Dies war Grund zur Annahme, dass die desmoplastische Reaktion des Tumors nicht alleine durch Karzinomzellen verursacht wird. Ebenso ist bekannt, dass hepatische Sternzellen für die Bindegewebsproduktion in der Leber bei einer Fibrose und im weiteren Verlauf einer Zirrhose verantwortlich sind. Weiterhin fand man eine große Ähnlichkeit zwischen pankreatischen und hepatischen Sternzellen (19; 98), so dass sich herausstellte, dass die desmoplastische Reaktion maßgeblich durch **pankreatischen Sternzellen** (PSCs) verursacht wird (52). Obwohl diese Zellen selber nicht maligne entartet sind, werden sie durch die umliegenden Tumorzellen aktiviert, sodass sie große Mengen extrazellulärer Matrixproteine sezernieren (5). Dies führt zu den bereits beschriebenen Schwierigkeiten in der Behandlung und zur schnellen Progression der Erkrankung. Obwohl diese Zellart bereits 1982 (91) beschrieben worden war, gelang es erst 1998, pankreatische Sternzellen zu isolieren (2; 52). Die Zahl der PSCs wird im gesunden Pankreas auf 4-7% der Gesamtzellzahl geschätzt (4). Dort sind sie vor allem periazinär lokalisiert (52) und umfassen mit ihren Ausläufern sternartig die umliegenden Zellen. Die Funktion der Sternzellen ist im gesunden Gewebe allerdings noch nicht gänzlich geklärt. Bisherige Experimente, die die Funktion der ruhenden Sternzellen untersuchen, legen die Vermutung nahe, dass Sternzellen als Vorläufer-Zellen für unter anderem Insulin-produzierende Zellen fungieren könnten (49). Weiterhin werden eine immunologische Funktion (79) und auch eine CCK (Cholecystokin)-abhängige Beeinflussung der Enzym-Sekretion der Azinus-

Zellen postuliert (59). Im ruhenden Zustand sind Sternzellen charakterisiert durch Vitamin A-Einschlüsse und durch die Expression von bestimmten Markerproteinen wie dem glial fibrillary acidic protein (GFAP). Bei Aktivierung exprimieren PSCs vermehrt α -smooth muscle actin (α -SMA), verlieren ihre Vitamin A-Einschlüsse und proliferieren schneller (8).

1.4 Aktivierung der PSCs

Die Aktivierung der PSCs erfolgt durch mehrere proinflammatorische Proteine und durch Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel dem platelet derived growth factor (PDGF) (6) und dem epidermal growth factor (EGF). Erst nach Aktivierung beginnen die PSCs exzessiv viel Extrazellulärmatrix, vor allem Kollagen I und III sowie Fibronectin, zu produzieren (7; 72). Somit spielt die Aktivierung der Sternzellen für die Entstehung des charakteristischen Tumormilieus eine wichtige Rolle. Da die Tumorzellen offensichtlich von umliegenden Sternzellen profitieren, ist es neben der Aktivierung der Sternzellen wichtig zu verstehen, wie die erhöhte Anzahl an PSCs in fibrosierten und tumorösen Arealen zu erklären ist (4; 51). Diese Frage lässt sich zum Teil durch eine gesteigerte Proliferation der Sternzellen erklären. Verantwortlich für die erhöhte Proliferation sind dabei die von den Tumorzellen sezernierten Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel PDGF und TGF- β (5). Eine weitere Erklärung für die erhöhte Anzahl der Sternzellen im Tumorgewebe ist eine gerichtete Migration, Chemotaxis, in Richtung der Tumorzellen. Die mögliche Chemotaxis der Sternzellen könnte demnach durch die von den Tumorzellen sezernierten Wachstumsfaktoren induziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass in Metastasen des PDAC neben den Tumorzellen auch Sternzellen zu finden sind (95). Die Aktivierung und die damit einhergehende gesteigerte migratorische Potenz der Sternzellen spielt also neben der Beeinflussung des Primär-Tumors auch eine Rolle bei der Metastasierung.

1.4.1 Platelet-derived growth factor

Der platelet-derived growth factor (PDGF) ist ein Dimer aus zwei glykosilierten Proteinen, wobei die beiden Isoformen der Dimere A und B in den Kombinationen AA, BB oder AB vorliegen können. PDGF bindet an den PDGF-Rezeptor, welcher wiederum in zwei Isoformen vorliegt: PDGFR- α und PDGFR- β . Der PDGF-Rezeptor ist ein Dimer, so dass sich bei Bindung von PDGF die beiden Dimere anlagern, sich daraufhin autophosphorylieren und Kinasen aktivieren (22; 30). Als Folge dessen werden unter anderem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Phospholipase C- γ (PLC- γ) aktiviert.

PI3K als Hauptweg des PDGF-vermittelten Signals aktiviert weiterhin den Mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK-)Weg (22; 90). Der MAPK-Weg verändert die Transkription bestimmter Proteine und den Calcium-Haushalt der Zelle durch PI3K, so dass sowohl längerfristige als auch mittelbare Effekte nachzuweisen sind.

1.4.2 Epidermal growth factor

Der epidermal growth factor (EGF) ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der aus 53 Aminosäuren aufgebaut ist. Er bindet an den EGF-Rezeptor, der ein transmembranöses Glykoprotein mit intrazellulärer Tyrosin-Kinase-Aktivität ist (31). Nachdem EGF an den Rezeptor gebunden hat, entsteht ein aktiver Homodimer. Dessen Tyrosin-Kinase-Aktivität regt im weiteren Verlauf sowohl den Ras-Raf-MAPK-Weg an als auch den PI3K-Weg (31). Diese Signalkaskaden beeinflussen die Migration einer Zelle und deren Direktionalität (32).

1.5 Migration

Die Migration bezeichnet das aktive Fortbewegen einer Zelle. Dies ist sowohl im gesunden als auch im geschädigten Organismus von großer Bedeutung. Bereits während der Embryonalzeit bewegen sich Zellen für unterschiedliche Funktionen in die dafür nötigen Bereiche. So migrieren und proliferieren Zellen, um das Neuralrohr, eine frühe Entwicklungsstufe des Nervensystems, zu verschließen. Ohne Migration ist also eine geregelte Entwicklung nicht möglich (86). Im adulten Organismus findet ebenfalls beständig Migration statt. So könnte das menschliche Immunsystem ohne sich fortbewegende Zellen nicht adäquat funktionieren. Ein Wundverschluss zum Beispiel wäre ohne auf sich zuwandernde Zellen nicht vorstellbar.

Jedoch findet Migration nicht nur physiologischerweise statt. Dieser Vorgang ist auch Voraussetzung für die Metastasierung von Karzinomen (96). Die Metastasierung von Tumoren stellt üblicherweise das größte Problem bei der Behandlung von malignen Erkrankungen dar, da es sehr schwer ist, alle veränderten Zellen mitzubehandeln, wenn sich diese Zellen nahezu überall im Körper befinden können. Das Verständnis von Migration ist demnach nicht nur für grundlegende physiologische Abläufe wichtig, auch die Erforschung von bestimmten Erkrankungen ist auf Erkenntnisse über die Mechanismen der Migration angewiesen.

Im Gegensatz zu multizellulären Organismen sind Einzeller teilweise in der Lage, sich mithilfe eigens dafür vorhandener Zellanteile fortzubewegen, wie zum Beispiel die Geißeln beim Bakterium *Proteus mirabilis* (29). Beim Menschen hingegen besitzen mit Ausnahme der Spermien keine Zellen Geißel-ähnliche Zellanteile, so dass die Bewegung der Zelle andersartig entstehen muss. Die Bewegung entsteht über ein komple-

xes Zusammenspiel zwischen der Umgebung der Zelle, der Zellmembran und dem Cytoskelett der Zelle. Für die Migration muss die Zelle zuallererst Kontakt zur ihrer Umgebung herstellen können. Diese Verbindung von Zelle zur Umgebung wird unter anderem durch Integrine ermöglicht. Für die Migration ist es weiter wichtig, dass die Zelle eine Polarisation ausbildet. Diese Polarisation kennzeichnet die Richtung der Migration und initiiert das Lösen der fokalen Kontakte am hinteren Ende der Zelle. Die Fortbewegung der Zelle wiederum wird durch den dynamischen Umbau des Aktin-Gerüsts erreicht (41; 53; 86). Man kann die Migration einer Zelle also als ein kontinuierliches Lösen und Anheften von Extrazellulärverbindungen beschreiben, wobei sich die Zelle selber durch den Umbau von Aktin fortbewegt. Auf diesen äußerst komplizierten Vorgang haben viele Faktoren von außerhalb der Zelle Einfluss. So beeinflussen beispielsweise sowohl PDGF als auch EGF den PI3K-Signalweg, welcher über die Produktion von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphate die Polarisierung der Zelle mitbestimmt (12; 14; 50; 93). Ionentransporter sind bereits für viele Zellen als wichtiger Teil des migratorischen Zellapparats identifiziert worden. So beeinflusst die unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der Zelle das Lösen von fokalen Kontakten und ermöglicht somit unter anderem eine effektive Chemotaxis (39). Die Ca^{2+} -Konzentration wiederum wird zum Teil durch das Membran-Potential kontrolliert und kann so von Ca^{2+} -empfindlichen K^+ -Kanälen verändert werden (25). Zusätzlich verursachen die Ca^{2+} -empfindlichen K^+ -Kanäle (z.B. der $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanal) lokal Veränderungen des Zell-Volumens (73), was ein wichtiger Aspekt der Zellmigration ist (77).

1.6 Chemotaxis

In diesem Zusammenhang spielt auch die Chemotaxis eine wichtige Rolle. Sie beschreibt die gerichtete Migration entlang eines chemischen Gradienten in Richtung der höchsten Konzentration eines bestimmten Lockstoffes, dem Chemoattraktanz. Dabei können unterschiedliche Moleküle als Lockstoff dienen. So sind Bestandteile der Bakterienwand aber auch vom Körper produzierte Polypeptide in der Lage Zellen anzulocken (61; 68). Chemotaxis findet sich also sowohl bei bakteriellen Infektionen als auch bei der Embryogenese, während derer viele unterschiedliche Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden. Die Progression von malignen Tumoren kann ebenfalls von Chemotaxis beeinflusst werden (66). So können entartete Zellen Chemokine sezernieren, die solche Zellen anlocken, die für das Wachstum des Tumors förderlich sind. So fördern die von Tumorzellen sezernierten Substanzen die Einsprossung neuer den Tumor versorgende Gefäße (48). Hierfür nötig sind wiederum Endothelzellen, die zur Chemotaxis befähigt sind.

Für eine funktionierende Chemotaxis müssen mehrere Voraussetzungen seitens der Zelle erfüllt sein. Die Zelle muss in der Lage sein, einen Gradienten aus Chemoattraktanzien wahrzunehmen, wofür geeignete Rezeptoren exprimiert werden müssen. Wei-

terhin muss die daraus resultierende Signalkaskade unterschiedlich stark in der Zelle ausgeprägt sein, damit dem Ort der höheren Konzentration eine Richtung zugewiesen werden kann. Die Zelle muss also in der Lage sein, sich im chemischen Gradienten auszurichten (53; 82). Dieser Vorgang ist meist mit einer Aktivierung von entweder Cofilin oder RAC (Ras-related C3 botulinum toxin substrate) an einem Ende der Zelle verbunden, wodurch eine lokale Aktin-Polymerisation induziert wird (63; 66). Nachdem also die Richtung der Zellbewegung festgelegt wurde, muss die Zelle in den folgenden Schritten durch Auf- und Abbau des Aktingerüsts und durch wiederholte Verankerung und Lösung der äußeren Zelladhäsionen migrieren (43; 97). Die Mechanismen der Migration sind hierbei äußerst komplex und unterliegen vielen verschiedenen Einflüssen. Die Dynamik der Aktin-Polymerisation wird unter anderem durch den Kanal $K_{Ca3.1}$ -Kanal beeinflusst, indem dieser Einfluss auf das Zellvolumen nimmt (71; 75).

1.6.1 $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Kanal

Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal ist ein Calcium-empfindlicher Kalium-Kanal mit intermediärer Leitfähigkeit (9), der unter anderem für die Zellmigration von Bedeutung ist. Er gehört zu einer Klasse von Calcium-empfindlichen Kalium-Kanälen, zu denen außerdem die großen Calcium-empfindlichen Kalium-Kanäle (large conductance calcium-activated K^+ -channel, $K_{Ca1.1}$) und die kleinen Calcium-empfindlichen Kalium-Kanäle (small conductance calcium-activated K^+ -channel, K_{Ca2}) zählen. Dabei wird die Unterscheidung in groß, intermediär und klein anhand der Leitfähigkeit getroffen, welche bei den $K_{Ca3.1}$ -Kanälen bei 20-85 pS liegt (34). Für die Migration ist dieser Kanal von großer Bedeutung. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals bei humanen Fibroblasten die Migration stark verringert. Aufgrund der Ähnlichkeit der PSCs zu Fibroblasten soll in dieser Arbeit der Einfluss des $K_{Ca3.1}$ -Kanal auf die Migration der PSCs untersucht werden, wozu unter anderem der spezifische $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Blocker TRAM 34 eingesetzt wird (94).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Die Behandlung von Tumoren hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht und hat dazu beigetragen, dass bei vielen malignen Erkrankungen die Überlebenszeiten nach Diagnosestellung deutlich erhöht werden konnten. Die für den Pankreastumor charakteristische Desmoplasie stellt sich jedoch als ein Hindernis in der Behandlung dieser Erkrankung dar und trägt wesentlich dazu bei, dass sich die Überlebenszeiten für die Betroffenen in den letzten 30 Jahren nicht wesentlich verlängert haben (65).

Ziel dieser Arbeit ist es, einen kleinen Teil zum besseren Verständnis der pankreatischen Sternzellen beizutragen. Sternzellen sind als maßgebliche Produzenten der Extrazellulärmatrix im tumorösen Gewebe von großer Bedeutung für die Behandlung und Prognose des duktales Adenokarzinoms des Pankreas. Um möglichst physiologische Bedingungen für die hier beschriebenen Experimente zu schaffen, werden die Sternzellen aus Mäusen isoliert und als Primärkultur verwendet. Zur Verifizierung der Sternzellen werden hierfür bekannte Marker wie α -smooth muscle actin und glial fibrillary acidic protein (2; 52) benutzt. Da die Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix bei erhöhter Aktivierung der Sternzellen entsprechend ansteigt, ist es wichtig nachzuvollziehen, wodurch Sternzellen aktiviert werden. Mithilfe der Quantifizierung der Migration wird geprüft, ob PDGF, EGF und konditioniertes Medium aus einer Pankreastumorzelllinie Einfluss auf die Sternzellen haben. Außerdem wird geprüft, inwieweit die obigen Substanzen und zusätzlich TGF- β in der Lage sind, Chemotaxis bei Sternzellen zu induzieren. Diese Experimente werden zusätzlich mit Inhibierung des $K_{Ca3.1}$ -Kanals wiederholt, um dessen Einfluss bei der Migration der Sternzellen genauer bestimmen zu können.

Das Ziel dieser Arbeit ist es also, das Migrationsverhalten der primär-kultivierten pankreatischen Sternzellen der Maus genauer zu beschreiben und die Rolle der $K_{Ca3.1}$ -Kanäle dabei zu bestimmen.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Die pankreatischen Sternzellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 (DMEM/F-12) mit 10 %igem Zusatz von fetalem Kälber-Serum (FKS) und 1 %igem Zusatz von Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die PSCs wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 95 % kultiviert und anschließend im Verhältnis 1:10 gesplittet. Zum Ablösen der Zellen wurden 1 ml einer 0,25 %igen Trypsin/PBS-Lösung ohne Calcium und Magnesium benutzt. Die Sternzellen wurden bis zu fünf mal passagiert und anschließend verworfen. Die pankreatischen Tumorzellen der Zelllinie BxPC3 wurden in RPMI-Medium mit 10 % FKS kultiviert und ebenso wie die Sternzellen gesplittet.

2.2 Tiere

Es wurden ausschließlich Wildtyp-Mäuse aus dem Stamm C57BL/6 für die hier aufgeführten Experimente verwendet. Alle Versuche waren dem Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen angezeigt (Aktenzeichen: 48-02.05.20.12.123) und wurden nach aktuellen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

2.3 Isolierung von murinen pankreatischen Sternzellen

Diese Methode der Isolierung richtet sich nach der von Kristian Haanes etablierten Isolierung und wurde den Gegebenheiten des Labors angepasst (26). Zunächst wurden die Versuchstiere mittels einer Isofluran-Überdosis und anschließendem Genickbruch getötet. Das Abdomen der Mäuse wurde mittels eines T-Schnittes eröffnet und das Pankreas freigelegt. Daraufhin wurde das aus dem Tier entnommene Pankreas grob zerkleinert in eine Collagenase-haltige Lösung gegeben, die sich aus 3 ml Grey's Balanced Salt Solution (GBSS) und 2,5 mg Collagenase P zusammensetzt. Nach halbstündiger Inkubation bei 38° C im Schüttler wurde die Enzym-Lösung zunächst mit 7 ml GBSS weiter verdünnt. Durch anschließende Zentrifugation, Absaugen des Überstandes und Resuspension des Pankreas in Zellkulturmedium wurde die Collagenase weitestgehend entfernt. Nun wurde das Gewebe auf eine Zellkulturschale, die zuvor mit 1 ml Serum bestrichen wurde, gegeben und für 2 Stunden im Inkubator bei 37° C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 95 % O₂

und 5 %CO₂ belassen. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und die Zellkulturschalen wurden mehrmals vorsichtig mit Medium gewaschen, um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Diese Art der Zellisolierung macht sich die unterschiedlichen Adhäsionszeiten der verschiedenen Zelltypen zu Nutze. Die pankreatischen Sternzellen adhären in diesem Fall am frühesten, was die Differenzierung zu anderen Zellen des Pankreas ermöglicht.

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Bilder wurden zum einen mit dem Zeiss Axio Observer D1 und zum anderen mit dem Zeiss Axiovert 200 durchgeführt. Für die Experimente wurden sowohl PSCs direkt nach der Isolierung benutzt als auch PSCs, die zuvor einige Tage in Kultur waren.

Die Zellen wurden auf zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern ausgesät und nach 3 Stunden mit 3,5 %iger PFA-Lösung für eine Stunde fixiert. Nach 10-minütiger Inkubation mit einer 100 mmol/L-Glycin-PBS-Lösung erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit einer 0,5 %igen Triton/1%SDS/PBS-Lösung für 10 Minuten. Zum Blockieren wurden die PSCs mit 10 %igem Ziegen-Normal-Serum für 30 Minuten inkubiert. Zwischen den hier beschriebenen Schritten, wurden die Objektträger jeweils vorsichtig 3 Mal mit PBS-Lösung gewaschen. Die für die Immunfluoreszenz benutzten Antikörper sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

Tabelle 1: Erstantikörper Immunfluoreszenz

Antikörper	Wirtstier	Verdünnung
Anti-GFAP (Cell Signaling)	Maus	1:200
Anti- α -SMA (Dako)	Maus	1:100

Tabelle 2: Zweitantikörper Immunfluoreszenz

Antikörper	Wirtstier	Verdünnung
Alexa-488 markiert anti-Maus	Kaninchen	1:500
Alexa-488 markiert anti-Maus	Kaninchen	1:200

Die Inkubation des Erst- und des Zweitantikörpers erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° Celsius. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit dem Erst- und Zweitantikörper fünf mal in PBS-Lösung gewaschen. Die Färbung des Nukleus erfolgte mit DAPI. Dieses war zuvor in einer 1:1000-Verdünnung

im Dako Fluorescent Mounting Medium gelöst, welches auch als Einbett-Medium genutzt wurde.

Um die Vitamin A-Einschlüsse anzufärben, wurden die PSCs mit Nile Red angefärbt. Nile Red ist ein lipophiler Farbstoff, der Fette selektiv anfärbt und bei einer bestimmten Wellenlänge (Tabelle 3) hauptsächlich bei Vorhandensein von Vitamin A fluoresziert. Die PSCs wurden zunächst auf mit Poyl-L-Lysin beschichteten Objektträgern ausgesät und dort genauso vorbereitet, wie die Zellen für die Immunfluoreszenz. Nach der Fixierung mit der PFA-Lösung wurde Nile Red auf die Zellen gegeben. Nile Red wurde zuvor zu 0,5 mg/ml in Aceton gelöst. Von dieser Lösung wurden 16 µl in 0,75 ml Glycerol und 0,25 ml Wasser gelöst, und daraufhin etwa 200 µl für 15 Minuten auf den Zellen belassen. Anschließend wurde kurz mit PBS-Lösung gespült und dann gemäß der obigen Beschreibung die Zellen mit Einbett- Medium auf Glaspättchen aufgetragen. Die Wellenlängen der Filter für den jeweiligen Farbstoff sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. Der Anteil an Vitamin A-positiven Zellen wurde ermittelt, indem in 20 zufällig unter dem Mikroskop bestimmten Arealen der Anteil der Vitamin A-positiven Zellen im Verhältnis zu den Vitamin A-negativen Zellen gezählt wurde. Dies wurde für jeden Versuch in gleicher Weise wiederholt. Diese Methode wurde in gleicher Weise für die Ermittlung des Anteils an α -SMA-positiven Zellen angewandt.

Die Belichtungsdauer der verschiedenen Bilder variiert von 1/200s bis zu mehreren Sekunden, so dass hier nicht alle einzelnen Belichtungszeiten aufgeführt werden können.

Tabelle 3: Wellenlänge der Filter für die Immunfluoreszenz

Farbstoff	Exzitation [nm]	Emission [nm]
Alexa-488	493	520
Nile Red	559	637
DAPI	359	461

2.5 Migration

Für die Migrations-Experimente wurden ausschließlich PSCs in den Passagen 1 bis 4 benutzt. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente waren die jeweiligen Zellkulturschalen bei 95-100%iger Konfluenz.

2.5.1 Chemokinese

Um die Bedingungen der Migration möglichst physiologisch zu halten, wurden die verwendeten 25 ml-Zellkulturflaschen zuvor mit einer auf Kollagen-IV basierenden Matrix beschichtet. Kollagen IV ist ein wesentlicher Bestandteil von Basalmembranen und macht auch im Pankreas den größten Anteil der verschiedenen Kollagene der dortigen Basalmembran aus (38). Bestandteile der Matrix sind Tabelle 4 zu entnehmen:

Tabelle 4: Zusammensetzung Matrix Chemokinese

Substanz	Volumen	Konzentration	Endkonzentration
Kollagen IV	320 µl	0,45 mg/ml	0,18 mg/ml
5xRPMI	208 µl	52 g/L	13,5 g/L
5xHEPES	208 µl	50 mmol/L	13 mmol/L
NaOH	15 µl	1 mol/L	0,018 mol/L
Fibronectin	25 µl	1 mg/ml	0,03 mg/ml
Laminin	25 µl	1 mg/ml	0,03 mg/ml

Nach dem Auftragen der Matrix-Komponenten wurden die Chemokinese-Kammern über Nacht im Inkubator bei 37° Celsius, 95 % O₂ und 5 % CO₂ belassen, um eine ausreichende Polymerisierung der Matrix zu gewährleisten. Am folgenden Tag wurden die Zellen in der benötigten Dichte in die Chemokinese-Kammern ausgesät. Darin wurden sie für drei Stunden im Brutschrank belassen, um allen Zellen eine vollständige Adhäsion zu ermöglichen. Nun wurde das Medium in den Flaschen gegen das Serumfreie Medium ausgetauscht, welches für die Chemokinese vorgesehen war. Dieses Medium ist ein auf RPMI basierendes Medium mit einer Konzentration von 10,4 g/L RPMI. Die Substanzen, die zur Stimulierung der PSCs genutzt wurden, können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 5: Stimulantien Chemokinese

PDGF-BB	20 ng/ml
EGF	100 ng/ml
Konditioniertes Medium von BxPC-3-Zellen	

Bei Bedarf wurde der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blocker TRAM 34 in einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/L}$ eingesetzt. TRAM 34 wurde zuvor in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und diese Lösung in einer 1:2000-Verdünnung dem Migrationsmedium hinzugefügt. Nachdem der Deckel der Flaschen möglichst dicht verschlossen war, um etwaigen CO_2 -Verlust so gering wie möglich zu halten, wurden die Experimente videomikroskopisch in Intervallen von 4 Minuten für eine Dauer von 2 Stunden aufgezeichnet. Die Programme Hipic und Wasabi dienten dabei der Bildaquirierung und gewährten Kontrolle über die benutzten Kameras. Die Programme Amira und ImageJ wurden benutzt, um die Bilddateien hinsichtlich der Größe und des Strukturindex der Zellen, der Geschwindigkeit der Migration und der Distanz der Migration auszuwerten. Hierfür wurde für die Chemokinese-Experimente jede Zelle einzeln „ummalt“. Aus den daraus resultierenden Kontur-Daten wurden daraufhin mithilfe des Programmes ImageJ die bereits angesprochenen Parameter berechnet (17). Um die Distanz und die Geschwindigkeit ermitteln zu können, wurde durch das Programm ImageJ für jede Zelle zunächst der Schwerpunkt der Zelle bestimmt. Bei der Berechnung des Schwerpunktes der Zelle wird, im Gegensatz zur Berechnung des Mittelpunkts, auch die Fläche miteinbezogen, denn sehr schmale Ausläufer der Zelle verändern den Schwerpunkt der Zelle im Gegensatz zum Mittelpunkt nicht wesentlich. Damit lässt sich ein genauerer Wert für die Distanz und für die Geschwindigkeit ermitteln. Ohne dies zu beachten, könnte eine erhöhte Geschwindigkeit beispielsweise durch ein sich schnell bildendes Lamellipodium vorgetäuscht werden. Der Wert für die Translokation ergibt sich aus der Distanz zwischen dem „Startpunkt“ und dem „Endpunkt“ der Migration in dem jeweiligen Experiment.

2.5.2 Chemotaxis

Für die Chemotaxis-Experimente wurden Ibidi μ -Slides genutzt, die es erlauben, einen chemischen Gradienten aufzubauen. Auch hier wurde die oben erwähnte auf Kollagen-IV basierende Matrix benutzt, wie sie in den Chemokinese-Experimenten verwendet wurde. Jedoch wurde die Matrix lediglich für 1 Stunde in den Slides belassen, da ansonsten durch die Polymerisierung der Matrix der sehr dünne Migrations-Kanal der Slides für Zellen nicht mehr passierbar gewesen wäre. Die μ -Slides wurden befüllt, indem langsam durch eine Öffnung des Kanals (Abbildung 1, Öffnung 2 oder 4) das Medium pipettiert wurde. Nachdem die Reservoirs der μ -Slides mit HEPES-gepuffertem RPMI befüllt waren, wurden die Zellen in den Kanal in einer Dichte von $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Um eine möglichst hohe Zellzahl im Kanal zu gewährleisten, hatte es sich zum einen bewährt, sehr langsam zu pipettieren. Zum anderen war es nötig, einen $10 \mu\text{l}$ -Tropfen der Zellsuspension auf eine Kanalöffnung zu geben (Abbildung 1, Öffnung 2 oder 4) und das gleiche Volumen an der anderen Öffnung (2 oder 4) des Kanals wieder herauszusaugen, so dass die Zellsuspension nicht direkt in den Kanal hinein pipettiert wurde. Die Ibidi μ -Slides wurden daraufhin für mindestens 3 Stunden

im Inkubator bei 37° C belassen, um eine ausreichende Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Im Anschluss wurde das Medium aus den Ibidi-Slides entfernt und durch frisches Hepes-gepuffertes RPMI ersetzt, um das verbliebene Serum, welches in den 10 µl Zellsuspension noch erhalten war, zu entfernen. Das Medium zur Adhäsion wurde schrittweise entfernt, indem auf einer der Öffnungen des Reservoirs (1 oder 3) 15 µl des Migrationsmediums gegeben wurde und direkt danach die gleich Menge des auszutauschenden Mediums aus der gegenüberliegenden Öffnung des Reservoirs (1 oder 3) herauspipettiert wurde. Dies wurde so oft wiederholt, bis das gesamte Medium in den Kammern ausgetauscht war. Bei den Experimenten mit Blockade des $K_{Ca}3.1$ -Kanals wurde genauso verfahren, lediglich mit dem Unterschied, dass das Migrationsmedium in gleicher Konzentration wie in den Chemokinese-Experimenten mit TRAM 34 versetzt wurde. Die zum Aufbau eines chemischen Gradienten benutzten Substanzen finden sich in folgender Tabelle.

Tabelle 6: Stimulantien Chemotaxis

PDGF	400 ng/ml
EGF	2000 ng/ml
TGF- β	50 ng/ml

Der Gradient des Stimulanz wurde anhand der durch Ibidi gegebenen Anleitung aufgebaut. Zunächst wurden Stöpsel auf die Öffnung des unteren Reservoirs (3) und auf der linken Seite des Kanals (4) angebracht. Anschließend wurden 17 µl des Mediums mit der jeweils stimulierenden Substanz versetzt und auf die oberste Öffnung (1) des Reservoirs gegeben, so dass sich ein Tropfen auf der Öffnung bildet. Nun

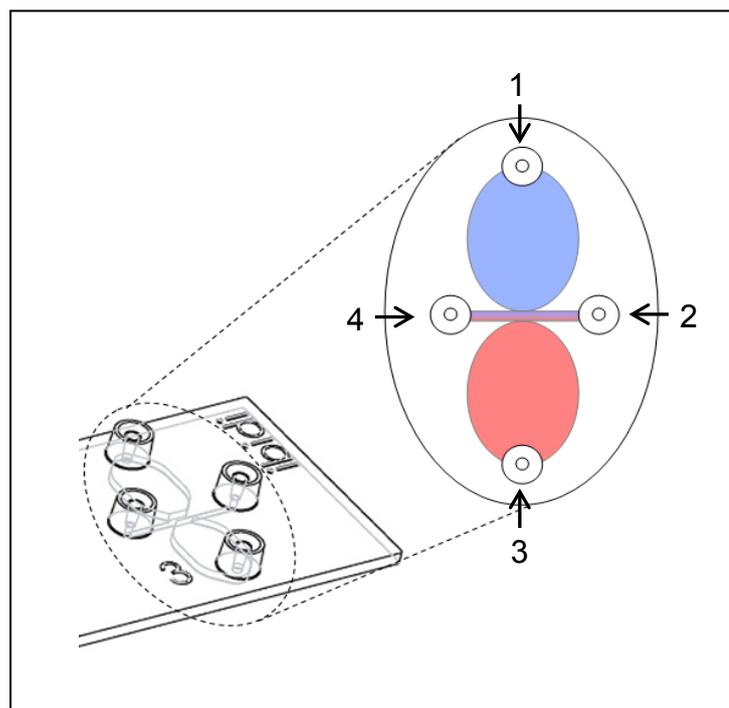


Abbildung 1: Chemotaxis-Kammer Ibidi® µ-Slides

konnten über die verbliebene Öffnung (2) des Kanals entsprechend 17 µl aus den Slides abpipettiert werden, so dass die zuvor oben (1) angebrachten 17 µl in das obere Reservoir hineingesaugt wurden.

Die Aufnahme der Bilddateien der Migration erfolgte in 8 Minuten-Intervallen für eine Dauer von 15,7 Stunden. Auch hier wurden für die Aquisition und Auswertung der Bilddateien die Programme HiPic, Wasabi und Amira benutzt. Die Auswertung erfolgte wie bereits oben beschrieben. Bei den Chemotaxis-Experimenten wurde jedoch lediglich der Kern der Zelle markiert und nicht die Zelle als Ganzes, was durch die große Datenmenge nicht anderweitig zu realisieren war. Um die Daten aus den Chemotaxis-Experimenten anschaulich darzustellen, wurde der Chemotaxis-Index für jede Zelle berechnet. Hierbei wird ermittelt, in welchem Verhältnis die in Richtung des Gradienten zurückgelegte Strecke zur insgesamt migrierten Distanz steht (siehe folgende Abbildung).

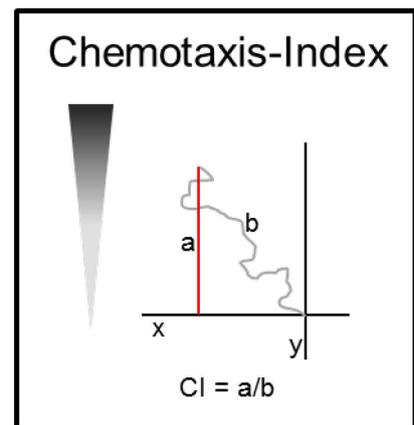


Abbildung 2: Chemotaxis-Index

2.6 Western Blot

Die für den Western Blot benutzten Zellen waren ausschließlich PSCs aus BL6-Wildtyp-Mäusen. Die Zellen befanden sich entweder in der 3.-4. Passage oder waren nach der Isolierung noch nicht passagiert.

Die Zellen wurden mit RIPA-(Radio-Immunopräzipitations Assay) Lysispuffer versetzt und anschließend mit einem Zellschaber abgelöst. Nach Homogenisierung der Zellen wurden die Proben für 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Die nicht vollständig gelösten Zellanteile wurden im Anschluss bei 13.000 rpm und 4° C von den restlichen Bestandteilen getrennt. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden daraufhin photometrisch bestimmt (mit dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“). Entweder wurden die Proben direkt benutzt oder bei -80° C gelagert. Im nächsten Schritt wurde die benötigte Proteinmenge bei 95° C für 5 Minuten denaturiert und anschließend nach ihrem Gewicht aufgetrennt. Dies erfolgte mithilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Tabelle 9) und wurde bei einer Spannung von 80 V vollzogen. Nachdem die Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt waren, konnten sie vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Dies erfolgte mithilfe des *Tank* Blot Systems über Nacht bei 4° C und 20 mA.

Nach Übertragung auf die Nitrozellulose-Membran wurde diese zunächst mit der Blocking Solution für eine Stunde inkubiert. Die Blocking Solution bestand aus BSA in TBST gelöst (Tabelle 10). Der Erstantikörper (Tabelle 7) wurden in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt und bei 4° C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach kurzem Waschen wurde der Zweitantikörper (Tabelle 8) für eine Stunde bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Membran erfolgte der Nachweis des Zweitantikörpers mithilfe des *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kits* (Thermo Scientific). Die dabei entstehende Lichtreaktion wurde mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) aufgezeichnet.

Tabelle 7: Erstantikörper Western Blot

Antikörper	Wirtstier	Verdünnung
Anti-GFAP (Cell Signaling)	Maus	1:500
Anti- α -SMA (Dako)	Maus	1:500

Tabelle 8: Zweitantikörper Western Blot

Antikörper	Wirtstier	Verdünnung
Anti-Maus POD (für GFAP)	Ziege	1:10.000
Anti-Maus POD (für α -SMA)	Ziege	1:50.000

Tabelle 9: Zusammensetzung SDS Gel

5% Sammelgel		7,5% Trenngel	
Aqua bidest.	1,3 ml	Aqua bidest.	1,822 ml
Rotiphorese® Gel A	357 μ l	Rotiphorese® Gel A	1,215 μ l
Rotiphorese® Gel B	150 μ l	Rotiphorese® Gel B	503 μ l
0,5 M Tris/SDS	500 μ l	1,5 M Tris/SDS	1,3 ml
10% APS	25 μ l	10% APS	25 μ l
Temed	2,5 μ l	Temed	7,5 μ l
1,5 M Tris/SDS pH 8,8		0,5 M Tris/SDS pH 6,8	
Tris	1,5 M	Tris	0,5 M
SDS	0,5%	SDS	0,5%

Tabelle 10: Puffer Western Blot

Laufpuffer		Transferpuffer	
SDS	1%	Tris	10 mM
Glycin	200 mM	Glycin	100 mM
Tris	4 mM	Methanol	10 %

PBST		TBST	
NaCl	136 mM	NaCl	1,37 M
KCl	2,7 mM	Tris	200 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4,3 mM	TWEEN 20	0,1 %
KH ₂ PO ₄	1,5 mM		
TWEEN 20	0,05 %		

2.7 Statistik

Für die Statistik wurden die Daten zunächst auf ihre Normalverteilung geprüft. Bei normalverteilten Daten wurde der Anova-Test genutzt, bei nicht normalverteilten Daten wurde der Man-Whitney-Test genutzt. Der P-Wert wurde auf 0,05 festgesetzt. Bei Normalverteilung der Daten beschreiben die Graphen den Mittelwert mit dem Standardfehler als Maß der Abweichung. Jene Daten, die nicht normalverteilt waren, wurden mit Box Plots abgebildet, die anstelle des Mittelwertes, den Median darstellen. Dabei zeigen die Ausläufer (Whiskers) des Box Plots maximal den anderthalbfachen Interquartilenabstand an. Falls die Datenpunkte innerhalb dieser Grenze liegen, zeigt der Whisker lediglich bis zu dem am weitesten abweichenden Datenpunkt. Im Folgenden ist mit „N“ die Zahl der einzelnen Experimenten beschrieben und mit „n“ die Anzahl der Datenpunkten aus allen „N“.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zunächst eine Primärkultur von murinen pankreatischen Sternzellen etabliert. Daraufhin wurde untersucht, inwiefern murine pankreatische Sternzellen durch PDGF, EGF und ein konditioniertes Medium von PDAC-Zellen aktiviert werden. Hierzu wurde die Migration als Maß der Aktivierung herangezogen. Die stimulierende Wirkung dieser Substanzen wurde zum Teil bereits nachgewiesen (3; 6; 69; 88), jedoch blieb deren Einfluss auf die Migration weitestgehend unklar. Zusätzlich wurde überprüft, ob PDGF, EGF und TGF- β in der Lage sind, als Chemokin zu wirken. Ferner wurde sowohl in den Chemokinese- als auch in den Chemotaxis-Experimenten der Einfluss des Kalium-Kanals $K_{Ca3.1}$ -Kanal auf die Migration der Sternzellen untersucht.

3.1 Identifizierung der pankreatischen Sternzellen

Die Identifizierung der PSCs konnte durch den Nachweis mehrerer für diese Zellart typische Proteine und Eigenschaften erbracht werden. Die Identifizierung umfasste dabei folgendes:

- Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Vitamin A-Einschlüssen bei frisch isolierten Sternzellen und die Abnahme der Vitamin A-Einschlüsse nach 2 und 5 Tagen in Kultur (Abbildung 3)
- Nachweis von α -SMA mithilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen in bereits passagierten PSCs und das Fehlen von α -SMA bei frisch isolierten PSCs in der gleichen Färbung (Abbildung 3)
- Nachweis von α -SMA im Western Blot (Abbildung 4)
- Nachweis des glial fibrillary acidic protein (GFAP) mithilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen (Abbildung 4)
- Veränderte Morphologie der PSCs mit einer Zunahme der Größe und einer steigenden Anzahl an Ausläufern (Abbildung 5)

Die Vitamin A-Einschlüsse der noch ruhenden, frisch isolierten Sternzellen konnten mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 3). Diese Einschlüsse waren nach einigen Tagen in Kultur weniger häufig nachzuweisen. So betrug die Häufigkeit von Vitamin A-Einschlüssen direkt nach Isolierung noch 40 % und verringerte sich am fünften Tag nach Isolierung auf 7 %. Nach der ersten Passagierung konnten keine Vitamin A-Einschlüsse mehr gefunden werden. Gegenätzlich dazu konnte in den unmittelbar nach der Isolierung fixierten Sternzellen kein α -SMA nach-

gewiesen werden. Am zweiten Tag nach Isolierung jedoch war dieses Protein bereits bei 40 % der Zellen nachweisbar, am fünften Tag sogar bei 74 % (n = 130-210 Zellen, N = 7).

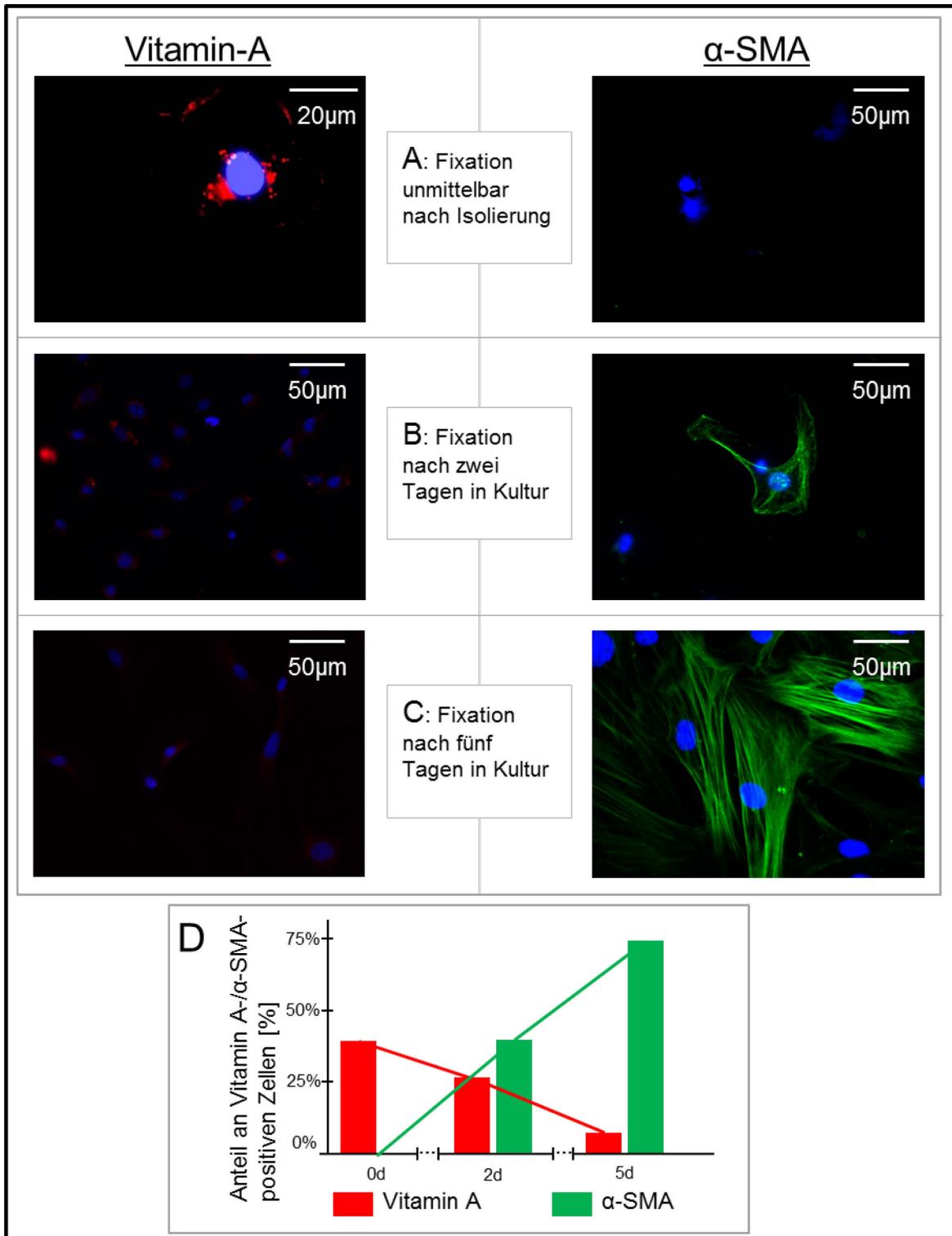


Abbildung 3: Nachweis von Vitamin A und α-SMA in Pankreas-Sternzellen

Die Sternzellmarker Vitamin A (rot) und α-SMA (grün) wurden in Zellen dargestellt, die nach unterschiedlicher Kulturdauer (A: 0 d, B: 2d, C: 5 d) fixiert worden waren. Die Zellkerne wurden mithilfe von DAPI blau eingefärbt.

Das Vorhandensein der PSC-Marker Vitamin A und α-SMA wurde fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und anhand dieser Bilder quantifiziert (D). Pro Versuchstag und Experiment wurden jeweils 20 Bilder aus zufälligen Bereichen ausgewählt und der Anteil der jeweils Vitamin A- oder α-SMA –positiven Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt.

N=7 (Isolierung aus 7 Tieren), n=130-200

Nach einigen Tagen in Kultur und nach Passagierung war α -SMA bei nahezu allen Zellen nachweisbar. Der Sternzell-Marker α -SMA konnte zudem im Western Blot von bereits passagierten Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis von GFAP gelang ebenso mithilfe der Immunfluoreszenz bei PSCs, die sich zuvor für sieben Tage in Kultur befanden. Bei frisch isolierten PSCs war GFAP nicht nachweisbar.

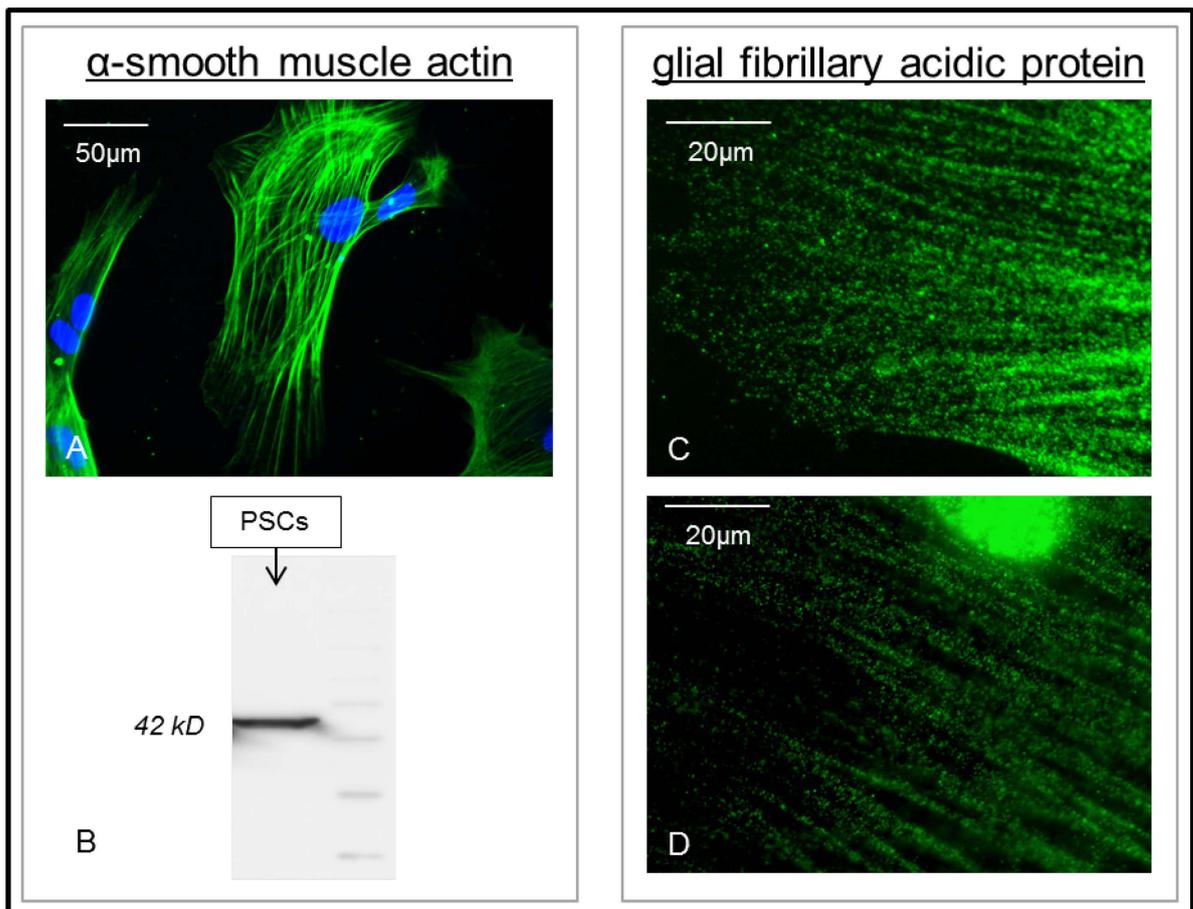


Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung von murinen PSCs

A, C, D: Alle Bilder zeigen pankreatische Sternzellen (Passage 2), die sich jeweils für 7-10 Tage in Kultur befanden. A: α -SMA-Färbung; C,D: GFAP-Färbung
B: Western Blot von 10 Tage alten Sternzellen. α -SMA spezifisches Gewicht: 42kD

Die folgende Abbildung zeigt die morphologischen Veränderungen der Sternzellen in Kultur. Dabei sind sowohl die Größenzunahme der Sternzellen als auch die vermehrte Bildung von Zellausläufern typisch und ein Maß für die Aktivierung dieses Zelltyps in Kultur (52).

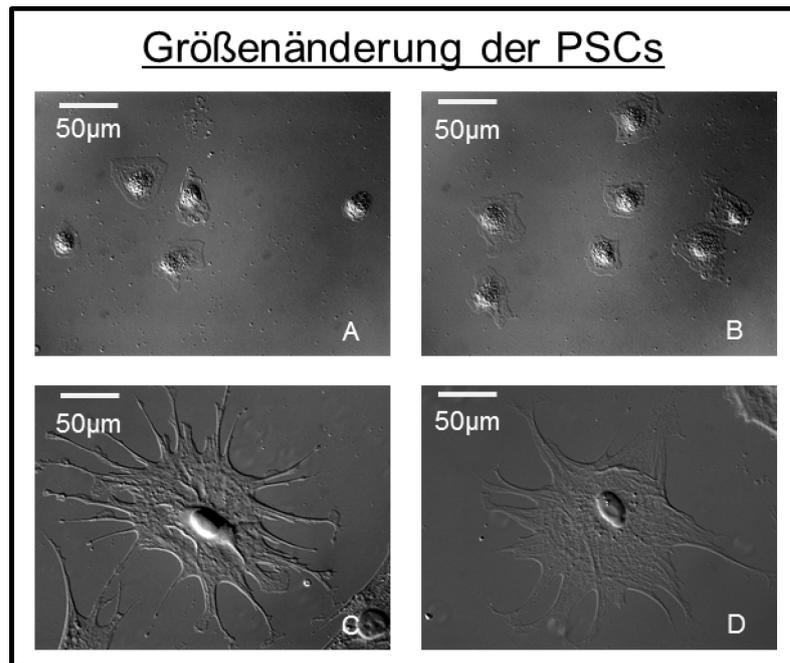


Abbildung 5: Morphologische Veränderungen der PSCs in Kultur

A, B: Die Bilder zeigen die Größe von PSCs unmittelbar im Anschluss an die Isolierung aus dem Pankreas von Mäusen.

C, D: Hier hingegen sieht man zwei unterschiedliche Sternzellen, nachdem sie passagiert wurden und sich für jeweils 3 Tage in Kultur befanden. Die Zunahme der Größe ist ebenso offensichtlich wie die größere Zahl an Zellausläufern.

Im Anschluss an die erfolgreiche Etablierung der Kultivierung von Sternzellen aus dem murinen Pankreas konnte mit den Migrationsexperimenten begonnen werden. Im Folgenden werden zunächst die Chemokinese- und daraufhin die Chemotaxis-Experimente präsentiert.

3.2 Chemokinese

Die Ergebnisse der Migrations-Experimente lassen sich in zwei Bereiche unterteilen:

- a) Chemokinese
- b) Chemotaxis

Für die Chemokinese wurde der Einfluss von PDGF, EGF und dem Überstand der PDAC-Zelllinie BxPc3 auf das Migrationsverhalten der Sternzellen untersucht. Zusätzlich wurde geprüft, inwieweit sich die Migration der PSC bei Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals verändert.

In den Chemotaxis-Experimenten wurde wiederum der Einfluss von PDGF und EGF analysiert und zusätzlich die Wirkung, die TGF- β auf die Sternzellen ausübt. Auch hier wurde der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blocker TRAM 34 genutzt, um einen Einfluss des $K_{Ca}3.1$ -Kanal auf die gerichtete Migration der Sternzellen zu prüfen.

Die Analyse der Migrationsexperimente beginnt mit der Darstellung der Trajektorien aller Zellen. Zur übersichtlichen Darstellung werden alle Trajektorien auf einen gemeinsamen Startpunkt gesetzt und in ein Koordinatensystem übertragen (Abbildung 6).

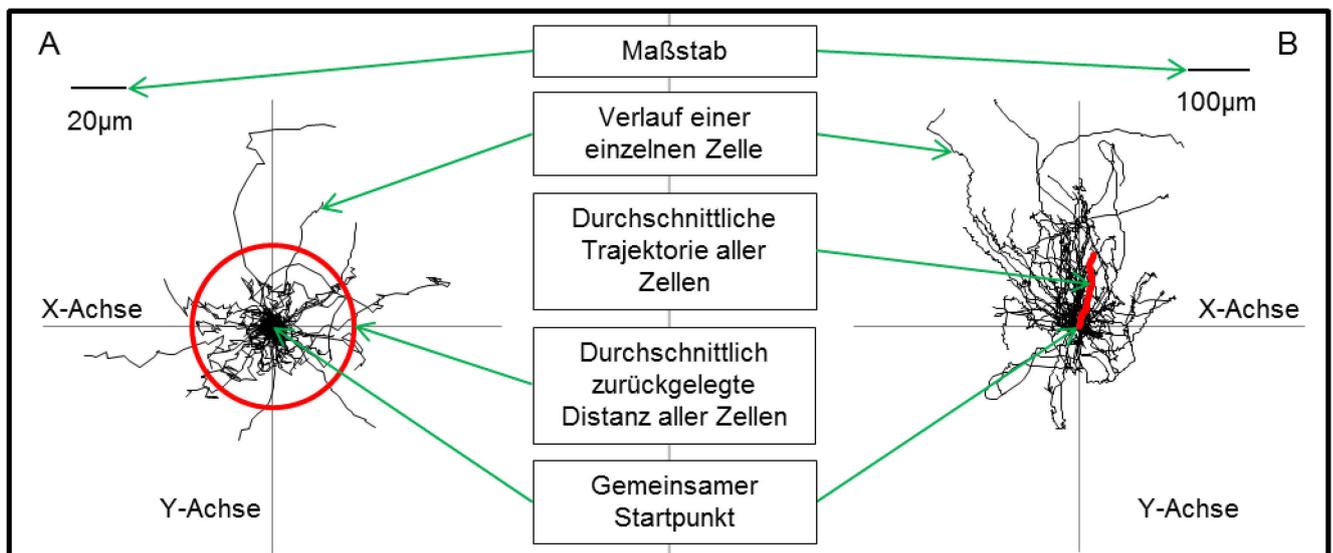


Abbildung 6: A, B: Beispielhafte Darstellung der Trajektorien von migrierenden Zellen eines Chemokinese-Experimentes (A) und eines Chemotaxis-Experimentes (B)

Weiterhin werden folgende Parameter der Migration quantitativ miteinander verglichen: die Geschwindigkeit, die Translokation („Netto-Distanz“), der Strukturindex und die Fläche der Zellen. Für die Quantifizierung der Migration sind vor allem die Geschwindigkeit und die Translokation aussagekräftig.

3.2.1 Chemokinese mit Stimulierung durch PDGF, EGF und Überstand von BxPc3-Zellen

Zuerst werden die Experimente beschrieben, in denen der Effekt von PDGF, EGF und dem Karzinomzellüberstand auf die Sternzellen untersucht wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl EGF als auch PDGF einen stimulierenden Effekt auf die Migration der Sternzellen haben.

Die Trajektorien der Sternzellen sind in Abbildung 7 dargestellt. An deren Länge lässt sich leicht der stimulierende Effekt von PDGF, EGF und dem Karzinomüberstand ablesen. Hier vermochten PDGF ($14,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$) und EGF ($13,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$) die Translokation zu erhöhen (Kontrolle: $8,2 \pm 1,2 \mu\text{m}$). Dieser Effekt konnte ebenso bei der Stimulierung mit dem Überstand der BxPC3-Zellen ($9,8 \pm 1,8 \mu\text{m}$) beobachtet werden (Kontrolle: $5,6 \pm 1,7 \mu\text{m}$).

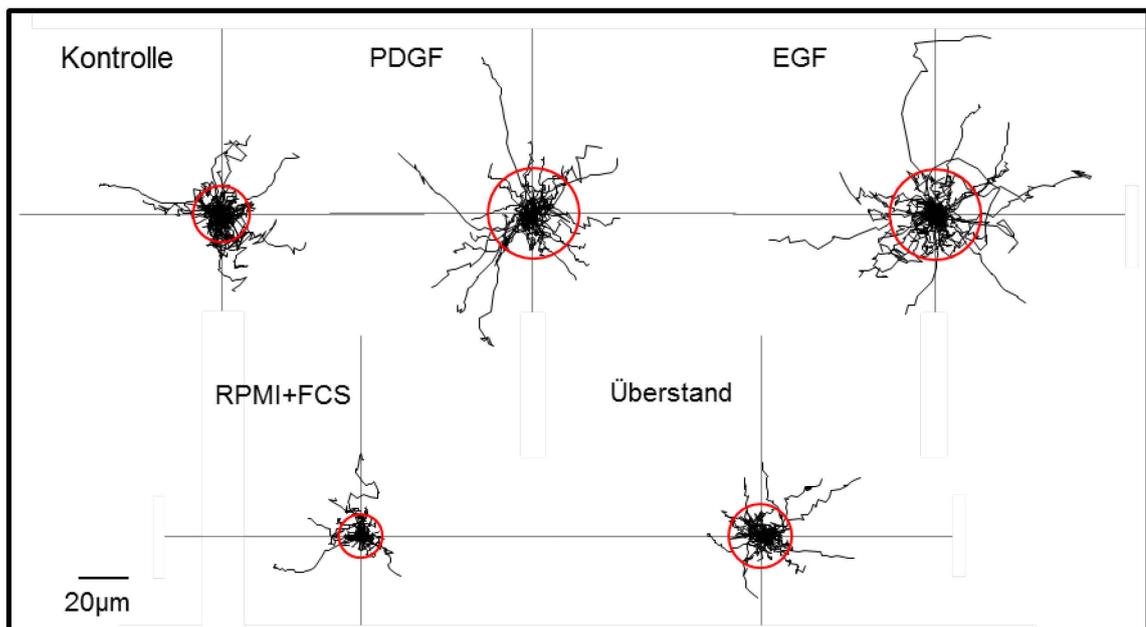


Abbildung 7: Chemokinese mit Stimulierung durch PDGF, EGF und dem Überstand von BxPc3-Zellen

Sowohl nach Stimulierung mit PDGF als auch mit EGF waren die Translokation und die Geschwindigkeit erhöht. Es ist gut zu erkennen, dass die Trajektorien unter PDGF- und EGF-Stimulierung deutlich weiter vom gemeinsamen Startpunkt abweichen. Die roten Kreise stellen hierbei die durchschnittliche Translokation dar, wobei die Durchmesser bei PDGF und EGF entsprechend größer ausfallen.

Die Geschwindigkeit der migrierenden Zellen wurde ebenfalls durch die oben benannten Substanzen beeinflusst. Abbildung 8 beschreibt die statistische Zusammenfassung

der Daten. Die PSCs migrierten sowohl unter dem Einfluss von PDGF ($0,25 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$) als auch unter EGF-Stimulierung ($0,27 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$) schneller (Kontrolle: $0,23 \pm 0,20 \mu\text{m}/\text{min}$). Ähnlich den Ergebnissen hinsichtlich der Translokation konnte das konditionierte Medium ($0,23 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$) auch die Geschwindigkeit der PSCs erhöhen (Kontrolle: $0,13 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$).

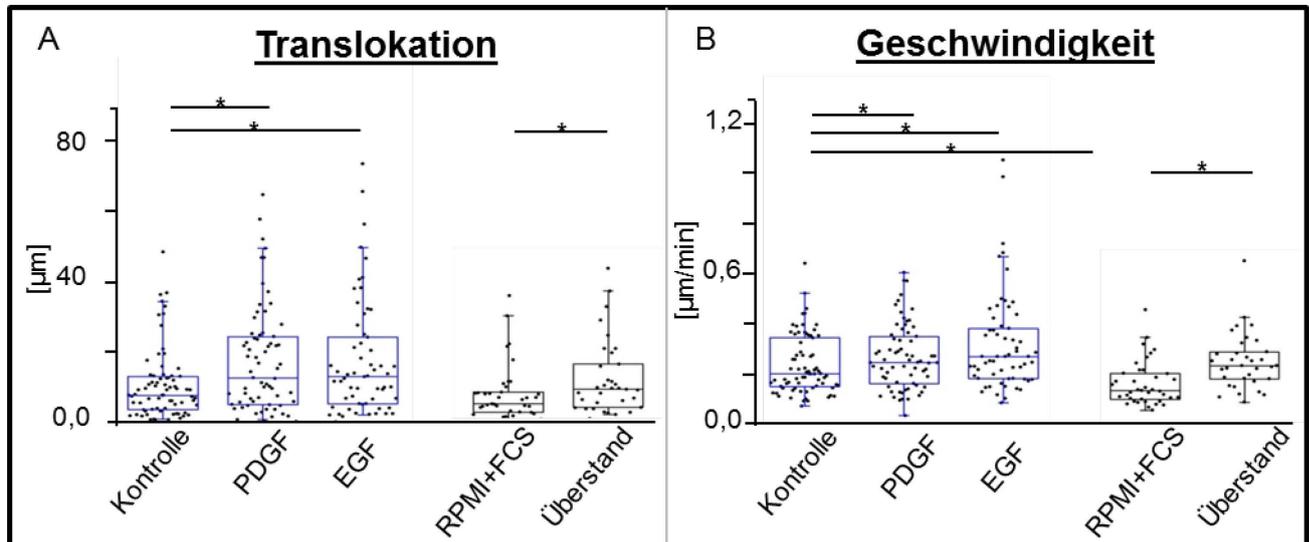


Abbildung 8: Zusammenfassung der Experimente mit Stimulierung durch PDGF, EGF und dem Überstand von BxPc3-Zellen

A: Statistische Auswertung der Translokation. Die Translokation der Sternzellen wird sowohl durch PDGF als auch durch EGF gesteigert. Hierbei ähnelt sich das Ausmaß der Steigerung. Außerdem vermag der Überstand der BxPc3-Zellen, die zurückgelegte Distanz der PSCs zu erhöhen.

B: Statistische Auswertung der Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit der migrierenden PSCs wurde ebenfalls durch PDGF und EGF erhöht. Hierbei ist zu vermerken, dass die Steigerung der Geschwindigkeit durch EGF leicht höher war als jene durch PDGF. Der Überstand der BxPc3-Zellen vermochte ebenfalls, die Geschwindigkeit zu erhöhen.

In Abbildung 9 wird der zeitliche Verlauf der Migration unter Einfluss von EGF und PDGF mit der Kontrollbedingung verglichen. Hier sieht man, dass EGF von Beginn an die Migrationsgeschwindigkeit der PSCs erhöht und PDGF zunächst keinen sichtbaren Einfluss ausübt. Ab der zweiten Hälfte des Experiments, also nach ungefähr einer Stunde, liegt die Geschwindigkeit der mit PDGF stimulierten Zellen jedoch ebenfalls über dem Niveau der Kontrolle, ohne dabei so hoch zu sein wie bei den mit EGF stimulierten Sternzellen.

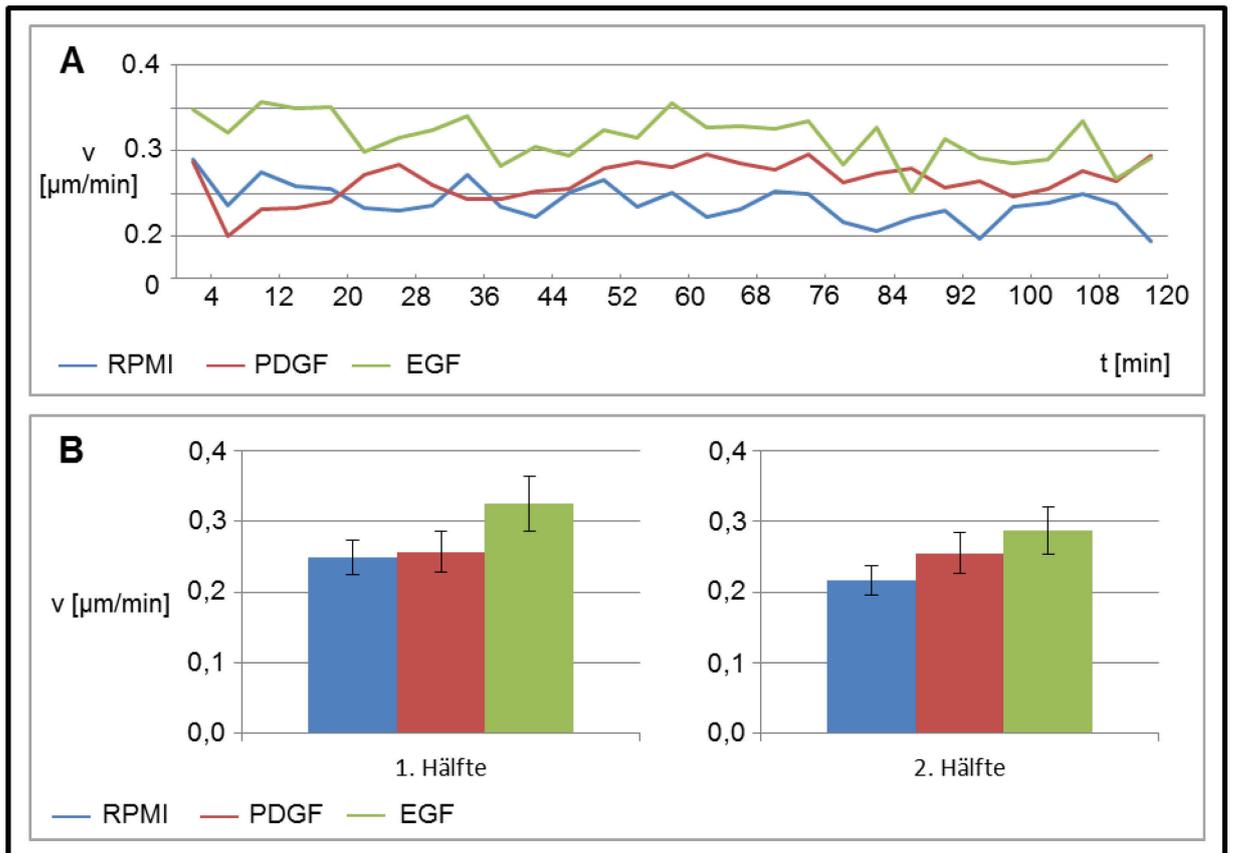


Abbildung 9: Geschwindigkeitsverlauf während der Chemokinese-Experimente

A: Entwicklung der Geschwindigkeit der PSCs während der Migration. Der Abstand zwischen den Datenpunkten beträgt vier Minuten, die Gesamtdauer 120 Minuten.

B: Durchschnittliche Geschwindigkeiten, die in der ersten und in der zweiten Hälfte des Experiments erreicht werden.

Die mit EGF stimulierten Zellen sind über die meiste Zeit schneller, wohingegen die Kontrolle und die mit PDGF stimulierten Zellen anfangs ähnlich schnell sind. Erst ab der zweiten Hälfte des Experiments sind die mit PDGF stimulierten PSCs schneller.

Die Morphologie der PSCs war unter den jeweiligen Bedingungen nahezu unverändert, sodass hieraus sich kein Einfluss auf die Migration ergeben hat.

3.2.2 Welchen Einfluss hat der $K_{Ca}3.1$ -Kanal auf die Migration?

Die folgend aufgeführten Ergebnisse beschreiben die Experimente, in denen der Effekt des $K_{Ca}3.1$ -Kanal auf die Migration untersucht wurde. Hierzu wurden die Experimente aus 3.2.1 in Anwesenheit des $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blockers TRAM 34 wiederholt. Die Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals verhindert dabei sowohl die Stimulierung durch PDGF als auch durch EGF.

Zunächst werden die Ergebnisse beschrieben, in denen der Effekt der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibition unter PDGF-Stimulation untersucht wurde. Abbildung 10 zeigt die Trajektorien der Sternzellen, anhand derer die Migration dargestellt wird. So ist die Translokation im Durchschnitt bei Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals ($11,3 \pm 1,8 \mu\text{m}$) auf ähnlichem Niveau wie das der Kontrolle ($11,2 \pm 1,8 \mu\text{m}$). Unter PDGF-Stimulation ist die Translokation deutlich höher ($19,7 \pm 3,9 \mu\text{m}$).

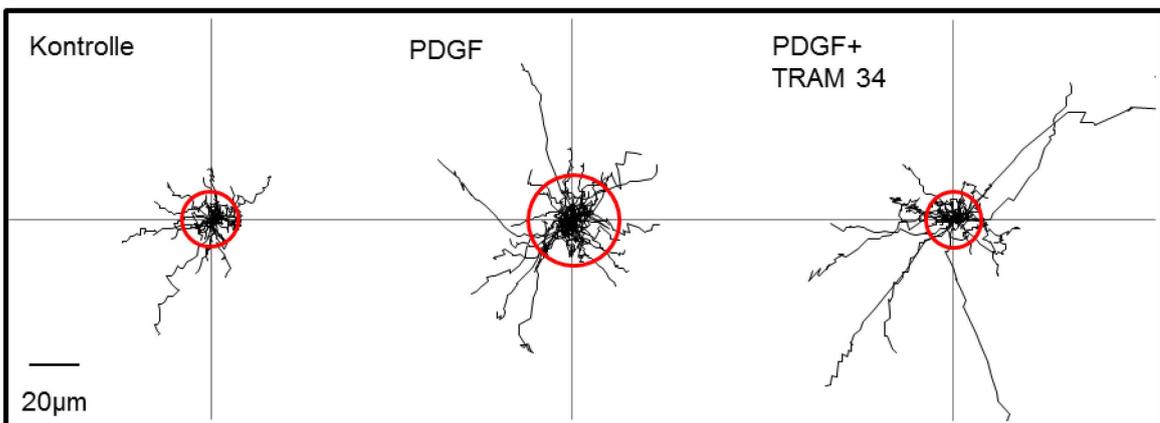


Abbildung 10: Trajektorien der Chemokinese unter $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibition und PDGF-Stimulation

Anhand der durchschnittlichen Translokation der Sternzellen, vereinfacht durch den roten Kreis dargestellt, lässt sich ablesen, dass die Stimulierung durch PDGF bei gleichzeitiger Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals ausbleibt. Als spezifischer $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blocker wurde hier TRAM 34 benutzt.

Die Geschwindigkeit der Migration wurde, wie in 3.2.1 gezeigt, durch PDGF-Stimulation erhöht. Dieser Effekt konnte durch den $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blocker TRAM 34 verhindert werden, was in Abbildung 11 deutlich wird. Hier ist zu sehen, dass bei Zusatz von TRAM 34 die Sternzellen langsamer ($0,23 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$) migrieren als jene, die ohne $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Beeinflussung stimuliert wurden ($0,27 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$).

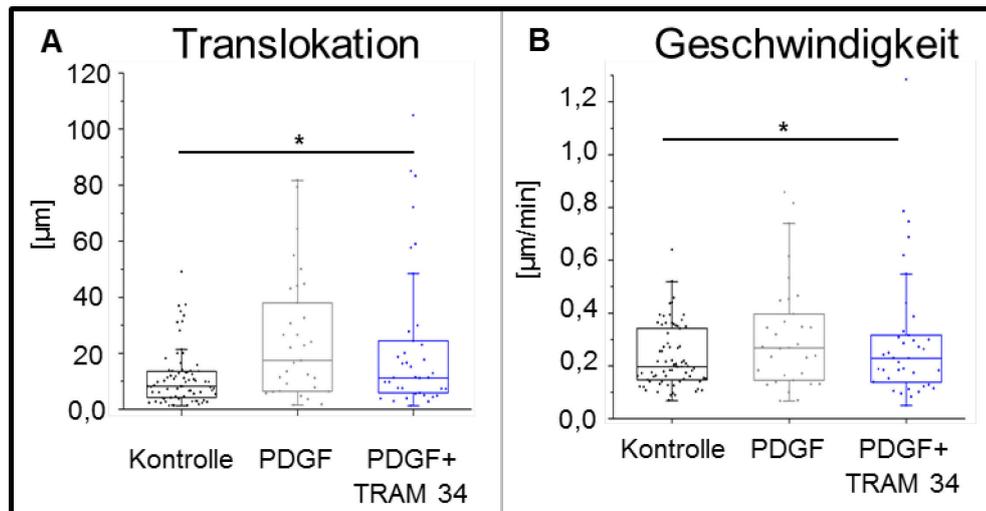


Abbildung 11: Statistische Auswertung der Chemokinese-Experimente mit Stimulierung durch PDGF und Inhibition des $\text{KCa}3.1$ -Kanals

A: Die Inhibition des $\text{KCa}3.1$ -Kanals verhindert die Stimulierung der PSCs durch PDGF, was durch den fehlenden Anstieg der Translokation ersichtlich wird. Bei Stimulierung durch PDGF migrieren die PSCs deutlich weiter.

B: Bezüglich der Geschwindigkeit der Sternzellen kann auch hier die Inhibition des $\text{KCa}3.1$ -Kanals die vorher beobachtete Steigerung durch PDGF verhindern, so dass die Sternzellen auf dem Niveau der Kontrollbedingung bleiben.

Im Folgenden werden die Experimente präsentiert, in denen der $\text{KCa}3.1$ -Kanal bei Stimulierung mit EGF inhibiert wurde. Abbildung 12 stellt die Trajektorien der Sternzellen dar und lässt anhand der roten Kreise auf die durchschnittliche Translokation schließen. Es ist zu erkennen, dass die Sternzellen unter EGF-Stimulierung am weitesten ($13,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$) migrieren, wohingegen bei Inhibition des $\text{KCa}3.1$ -Kanals dieser Effekt nicht so stark wahrgenommen wird (Kontrolle: $8,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$).

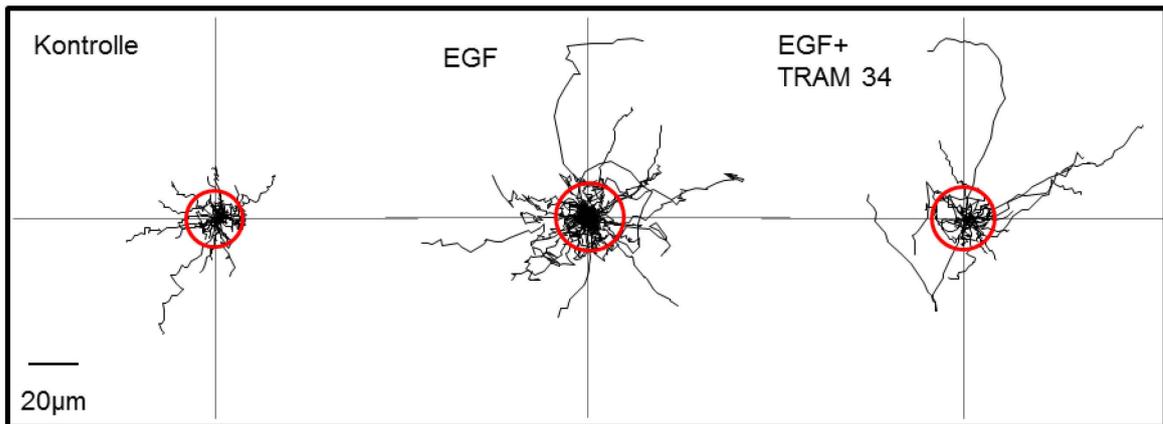


Abbildung 12: Trajektorien der Sternzell-Migration unter EGF-Stimulierung und gleichzeitiger KCa3.1-Kanal-Inhibition

Trajektorien der Chemokinese bei Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals und Stimulierung mit EGF
Die Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals kann die erhöhte Translokation der Sternzellen unter EGF-Stimulierung nicht verhindern. So liegt die Translokation auf einem nahezu gleichem Niveau verglichen mit der Migration der PSCs bei funktionierendem $K_{Ca}3.1$ -Kanal.

In Abbildung 13 wird die statistische Zusammenfassung der Daten präsentiert. Bezüglich der Geschwindigkeit zeigt die Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals ein ähnliches Bild wie zuvor bei der Beeinflussung der Translokation. Auch hier migrieren die Sternzellen unter EGF-Stimulierung am schnellsten ($0,27 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,03 \mu\text{m}/\text{min}$). Dieser Effekt konnte durch den Zusatz des $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blockers TRAM 34 verhindert werden ($0,19 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$), so dass diese Zellen ähnlich schnell migrierten wie jene Zellen unter Kontrollbedingungen ($0,20 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$).

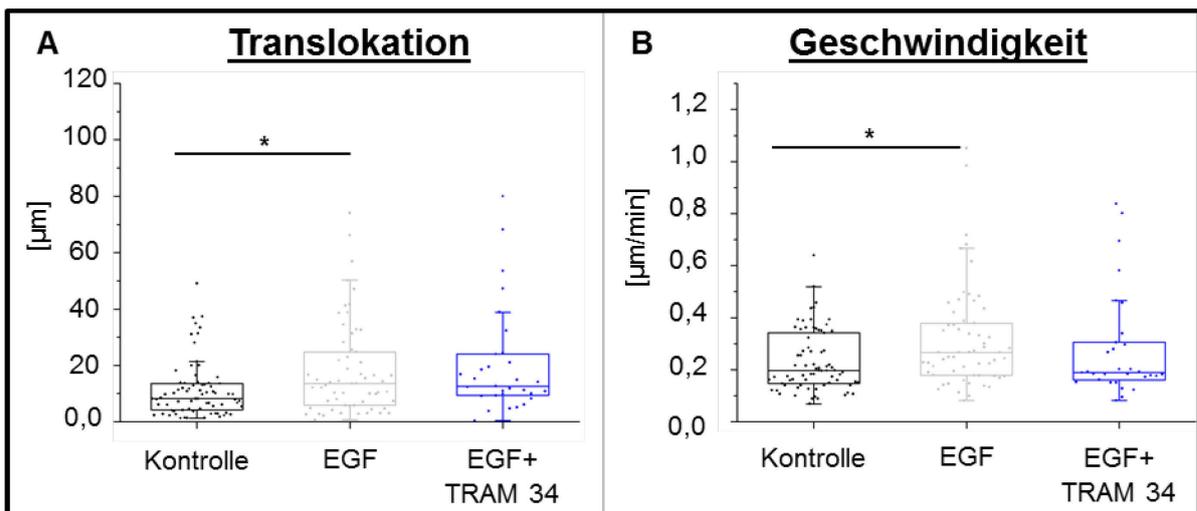


Abbildung 13: Statistische Zusammenfassung der Chemokinese-Experimente mit Stimulierung durch EGF und Inhibition des KCa3.1-Kanals

A: Die Translokation der Sternzellen wird durch EGF gesteigert. Bei Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals jedoch bleibt diese Stimulierung aus.

B: Die Stimulierung der pankreatischen Sternzellen durch EGF hinsichtlich der gesteigerten Geschwindigkeit konnte ebenfalls durch Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals verhindert werden.

Um einen Einfluss von Dimethylsulfoxid (DMSO), dem lipophilen Lösungsmittel für TRAM 34, auszuschließen, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Hier zeigte sich, dass lediglich der Strukturindex verändert wurde, von $0,36 \pm 0,02$ bei der Kontrollbedingung ohne DMSO zu $0,45 \pm 0,02$ mit DMSO. Geschwindigkeit, Translokation und Fläche der Zellen wurden durch das Lösungsmittel nicht verändert.

3.2.3 Chemotaxis

Nachdem der chemokinetische Effekt von PDGF und EGF und dessen Abhängigkeit von der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Aktivität gezeigt werden konnte, war im nächsten Schritt die gerichtete Migration genauer zu untersuchen. Die Erhöhung der PSC-Anzahl im PDAC könnte unter anderem durch gerichtete Migration der PSCs in Richtung des Tumors entstehen. Da PDGF und EGF einen förderlichen Effekt auf die Migration der PSCs bereits gezeigt haben, lag der Schluss nahe, dass diese Substanzen die Sternzellen locken können.

3.2.4 Chemotaxis mit PDGF, EGF und TGF- β

Gemäß der Vorgehensweise in den Chemokinese-Experimenten wurden auch hier wieder PDGF und EGF als Aktivatoren verwendet. Anstelle des Überstands von Karzinomzellen wurde jedoch TGF- β benutzt. Da TGF- β bereits als stimulierendes Agens nachgewiesen werden konnte (6), testeten wir die Annahme, dass TGF- β auch als Chemoattraktanz wirkt.

Es zeigte sich, dass sowohl PDGF und EGF in der Lage waren, Chemotaxis zu induzieren. In den Experimenten mit TGF- β als mögliches Chemoattraktanz konnte keinerlei Chemotaxis gemessen werden. Erwartungsgemäß zeigte sich in den Kontrolleexperimenten keine gerichtete Migration der Sternzellen in eine bestimmte Richtung.

Analog zu den Chemokinese-Experimenten waren bei den einem EGF- und einem PDGF-Gradienten ausgesetzten Zellen die Geschwindigkeit und auch die Translokation erhöht. TGF- β hatte hinsichtlich der Translokation und der Geschwindigkeit der Zellen keinen Effekt, es war lediglich ein Trend feststellbar. Demnach verringerte TGF- β sowohl die Translokation als auch die Geschwindigkeit der PSCs geringfügig. Diese Effekte lassen sich gut anhand der in Abbildung 14 dargestellten Trajektorien nachvollziehen. Gut zu erkennen ist, dass sich die PSCs in einem PDGF- bzw. EGF-Gradienten weiter vom gemeinsamen Startpunkt entfernen.

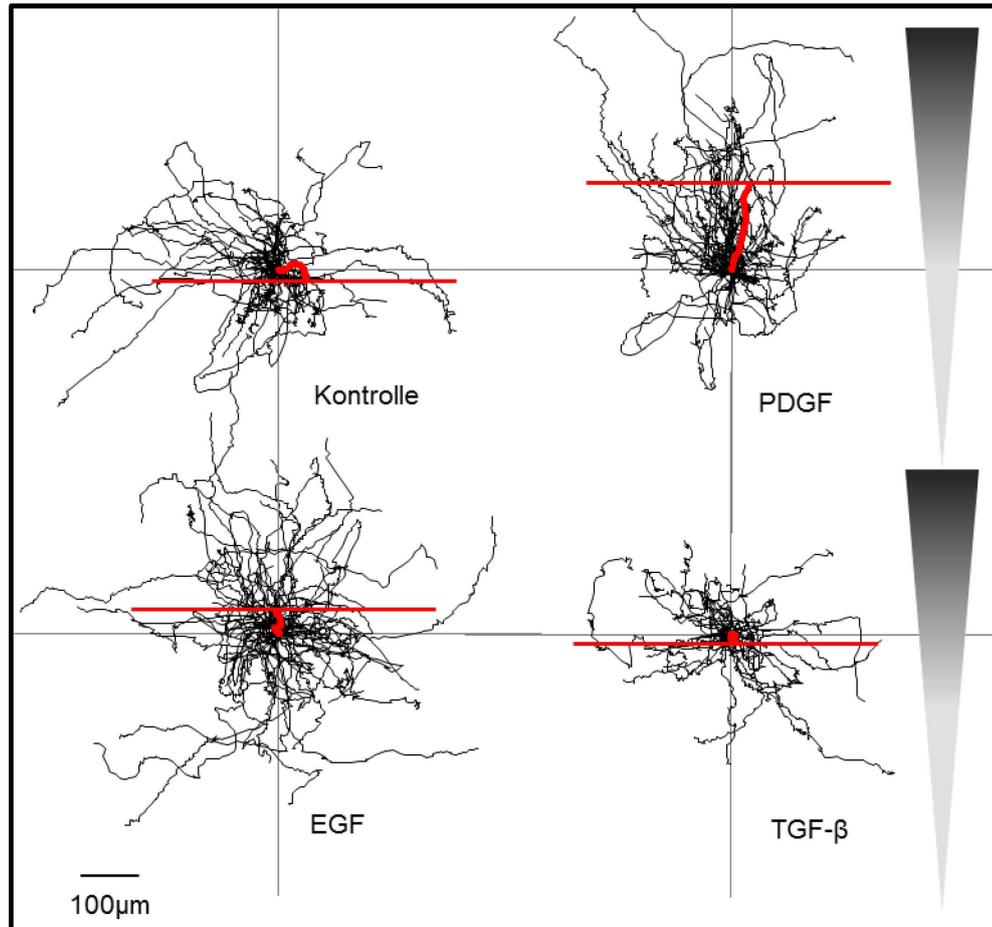


Abbildung 14: Chemotaxis mit Gradienten von PDGF, EGF und TGF-β

Die PSCs in einem Gradienten aus PDGF und EGF migrieren in Richtung der höheren Konzentration dieser Substanzen. Hierbei ist die durchschnittliche Migration in Richtung des Gradienten bei Stimulierung mit PDGF höher im Vergleich zu EGF. In einem Gradienten mit TGF-β lässt sich bei den Sternzellen hingegen keine gerichtete Migration feststellen. Wie zu erwarten, zeigen die PSCs unter Kontrollbedingungen keine gerichtete Migration. (n= 50-60 Zellen, N=5)

Für die Beurteilung der Stärke der Chemotaxis-Induktion ist vor allem der Chemotaxis-Index hilfreich. Dieser ist in Abbildung 15 dargestellt und ermöglicht eine gute Einschätzung der Chemotaxis-Induktion. Der Chemotaxis-Index (CI) der Sternzellen in einem PDGF-Gradienten war demnach deutlich höher ($0,36 \pm 0,04$) als der CI der PSCs in einem EGF-Gradienten ($0,10 \pm 0,05$). In einem TGF-β-Gradienten zeigten die Sternzellen keinerlei gerichtete Migration (CI: $-0,02 \pm 0,05$), was vergleichbar mit der Kontrollbedingung (CI: $-0,04 \pm 0,04$) ist.

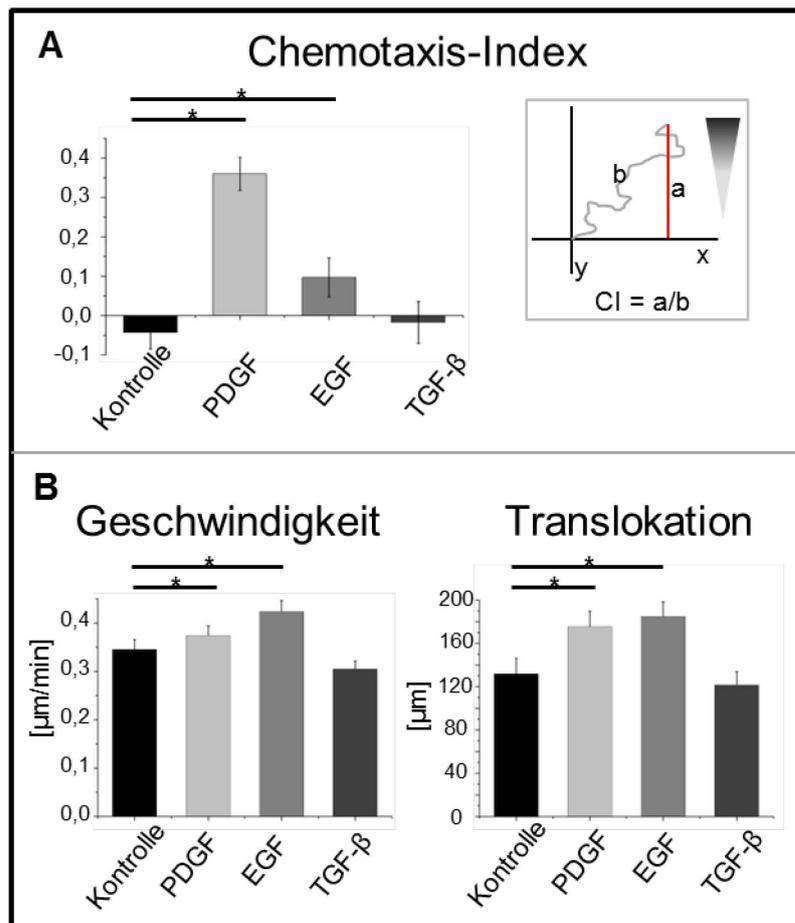


Abbildung 15: Statistische Auswertung der Chemotaxis-Experimente

Statistische Auswertung zur Chemotaxis der PSCs mit PDGF, EGF und TGF- β .

A: Der Chemotaxis-Index zeigt, dass PDGF und EGF als Induktoren von Chemotaxis bei den PSCs fungieren. Dabei ist PDGF das potentere Chemoattraktanz. TGF- β hingegen übt keinerlei Effekt auf die gerichtete Migration der PSCs aus.

B: Wie in den Chemokinese-Experimenten erhöhen sowohl PDGF als auch EGF die Geschwindigkeit und die Translokation der PSCs.

(n= 50-60 Zellen, N=5)

In der folgenden Grafik (Abbildung 16) wird die Chemotaxis der Zellen genauer betrachtet. Die Richtung der Zellbewegung ist in einem gedachten Koordinatensystem aufgetragen und wird in Bewegung entlang der X-Achse und der Y-Achse getrennt. Die Bewegung entlang der Y-Achse beschreibt demnach die Bewegung entlang des chemischen Gradienten der Chemoattraktanzien, positive Werte stellen hierbei eine Bewegung in Richtung der höheren Konzentration dar. Bewegungen entlang der X-Achse verlaufen senkrecht zum jeweiligen chemischen Gradienten. Die Werte für die Migration entlang der X-Achse sollten sich über den Zeitraum des Experiments also weitestgehend ausgleichen, da aufgrund des fehlenden Gradienten die Migration hier weitestgehend zufällig ist.

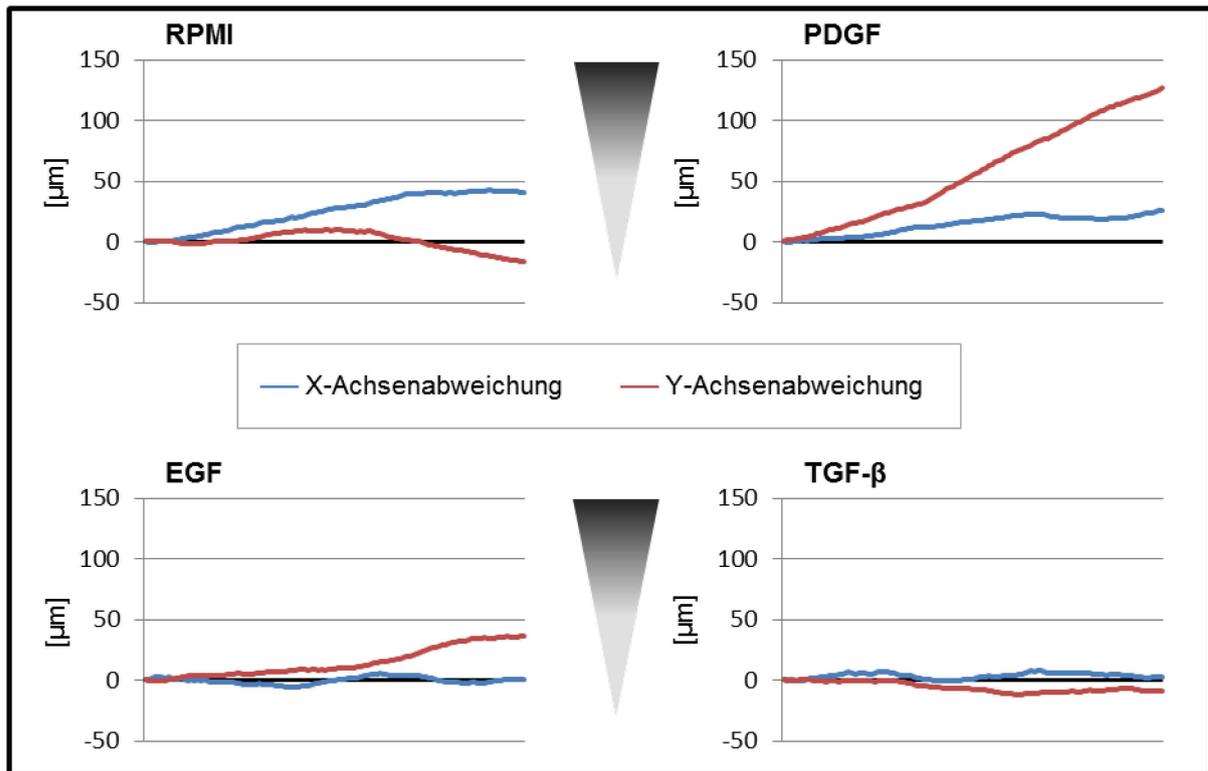


Abbildung 16: Kumulative Translokation in Richtung der X- und der Y-Achse

Mit PDGF als Chemoattraktanz verläuft die Y-Achsen-Abweichung unverkennbar in Richtung des aufgebauten Gradienten. Bei einem Gradienten mit EGF wird die Y-Abweichung erst im letzten Drittel des Experiments ersichtlich. Unter Kontroll-Bedingungen und in einem TGF- β -Gradienten zeigen die PSCs keinerlei Auslenkung. Entlang der X-Achse waren die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen konstant, wohingegen entlang der Y-Achse ein Konzentrations-Gradient aufgebaut wurde.

Es ist zu erkennen, dass bei allen Bedingungen die mittlere Translokation in Richtung der X-Achse minimal ist. Bei der Translokation in Richtung der Y-Achse werden jedoch Unterschiede leicht zu erkennen. Zu Beginn lässt sich festhalten, dass die Sternzellen in der Kontrollbedingung keine gerichtete Migration entlang der Y-Achse zeigen. In einem Gradienten mit PDGF migrieren die PSCs jedoch deutlich ersichtlich zur höheren PDGF-Konzentration. Die Chemotaxis der Zellen ist über den Zeitraum des Experiments weitgehend stabil, was an der sich kaum veränderten Steigung der die Y-Achsenabweichung beschreibenden Geraden ablesbar ist. Bei den PSCs im Gradienten mit EGF ist erst im letzten Drittel eine gerichtete Migration hin zum Gradienten erkennbar. In einem Gradienten mit TGF- β zeigen die Sternzellen eine ähnlich geringe Migration entlang der Y-Achse wie die Zellen unter Kontrollbedingungen.

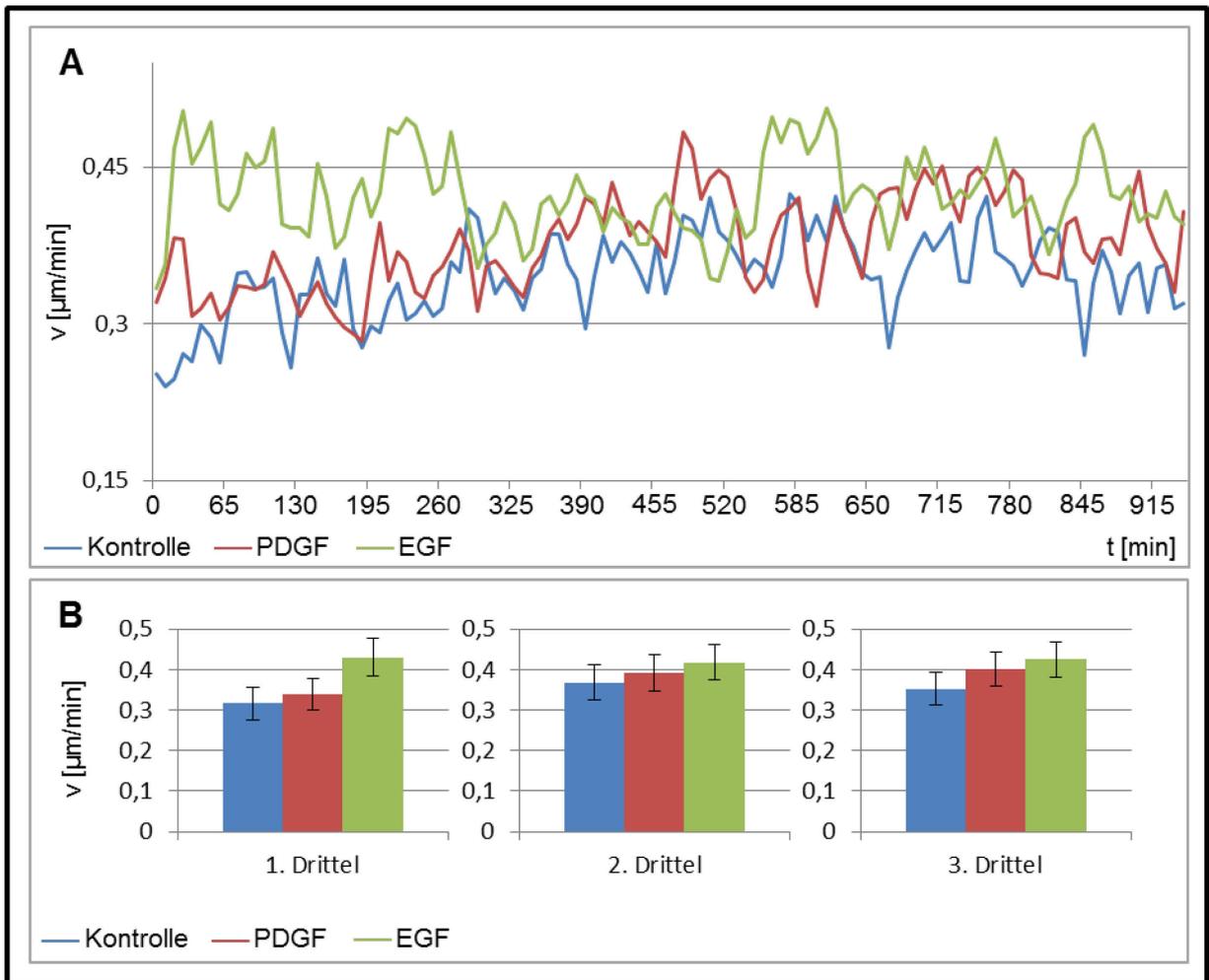


Abbildung 17: Geschwindigkeitsverlauf Chemotaxis, PDGF wirkt verzögert

A Entwicklung der Geschwindigkeit der PSCs während der chemotaktischen Migration. Der zeitliche Abstand zwischen den Datenpunkten beträgt acht Minuten, die Gesamtdauer 932 Minuten.

B Durchschnittliche Geschwindigkeiten in drei zeitliche Abschnitte unterteilt.

Die mit EGF stimulierten Zellen sind im ersten Drittel schneller, wohingegen die Kontrolle und die mit PDGF stimulierten Zellen ähnlich schnell sind. In den nächsten beiden Abschnitten nähern sich die Geschwindigkeiten der unterschiedlichen Bedingungen wieder an. Die mit EGF stimulierten Zellen migrieren jedoch über die gesamte Dauer des Experimentes am schnellsten.

Nun soll der Verlauf der Geschwindigkeit der Sternzellen während der chemotaktischen Migration genauer aufgeschlüsselt werden. Dazu wird die Geschwindigkeit als Funktion der Zeit dargestellt. Hieran kann man ablesen, dass EGF in der Lage ist, die Geschwindigkeit der Sternzellen von Beginn des Experimentes an zu steigern. Bei PDGF hingegen lässt sich in den ersten zwei Dritteln des Experiments keine deutlich erhöhte Geschwindigkeit der PSCs feststellen. Dies ändert sich nach den ersten zwei Dritteln des Experimentes, in welcher nun auch die mit PDGF stimulierten PSCs schneller migrieren.

3.2.5 Welchen Effekt hat die $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung auf die Chemotaxis?

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse präsentiert, die in den Chemotaxis-Experimenten mit Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals erreicht wurden. Hier wurde der chemische Gradient mit den Chemoattraktanzien PDGF und EGF angelegt. Zusätzlich wurde jeweils noch TRAM 34 zum Medium hinzugefügt, um die Funktion des $K_{Ca}3.1$ -Kanals zu blockieren. In Kontroll-Experimenten wurde geprüft, ob das Lösungsmittel für TRAM 34, DMSO, einen Effekt auf die Chemotaxis der Sternzellen hat. Das weitere Vorgehen ist identisch zu den vorigen Chemotaxis-Experimenten.

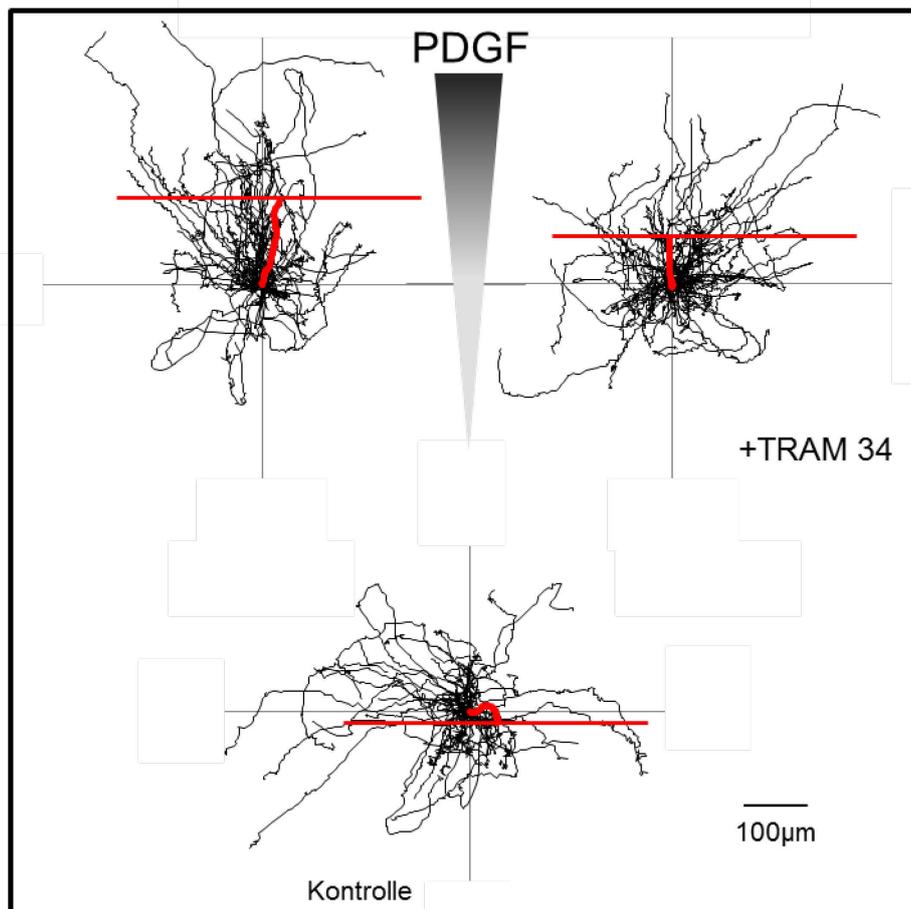


Abbildung 18: Trajektorien der Chemotaxis mit PDGF und Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals.

Der Gradient für PDGF besitzt am oberen Bildrand die größte Konzentration, auf der rechten Seite sind die Trajektorien der PSCs mit $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung dargestellt.

Die Sternzellen migrieren in einem Gradienten mit PDGF in Richtung der höheren Konzentration des Chemoattraktanz. Dies ist auch der Fall, wenn der $K_{Ca}3.1$ -Kanal der Sternzellen mittels TRAM 34 blockiert wird. Allerdings ist dies weniger stark ausgeprägt. (n= 50-60 Zellen aus 5 unabhängigen Experimenten)

Zunächst werden die Experimente angeführt, in denen PDGF als Chemoattraktanz benutzt wurde. Die Chemotaxis-Induktion durch PDGF konnte durch die Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals herabgesetzt werden. So betrug der Chemotaxis-Index (CI) bei Zusatz von TRAM 34 nur noch $0,27 \pm 0,04$ im Gegensatz zu dem CI von $0,36 \pm 0,04$ ohne Beeinflussung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals. Dies wird mittels Abbildung 18 anschaulich verdeutlicht.

Wie zu erwarten konnte der stimulatorische Effekt von PDGF hinsichtlich Translokation und Geschwindigkeit durch die Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals verhindert werden. Diese Effekte sind anhand der Abbildung 19 gut nachzuvollziehen.

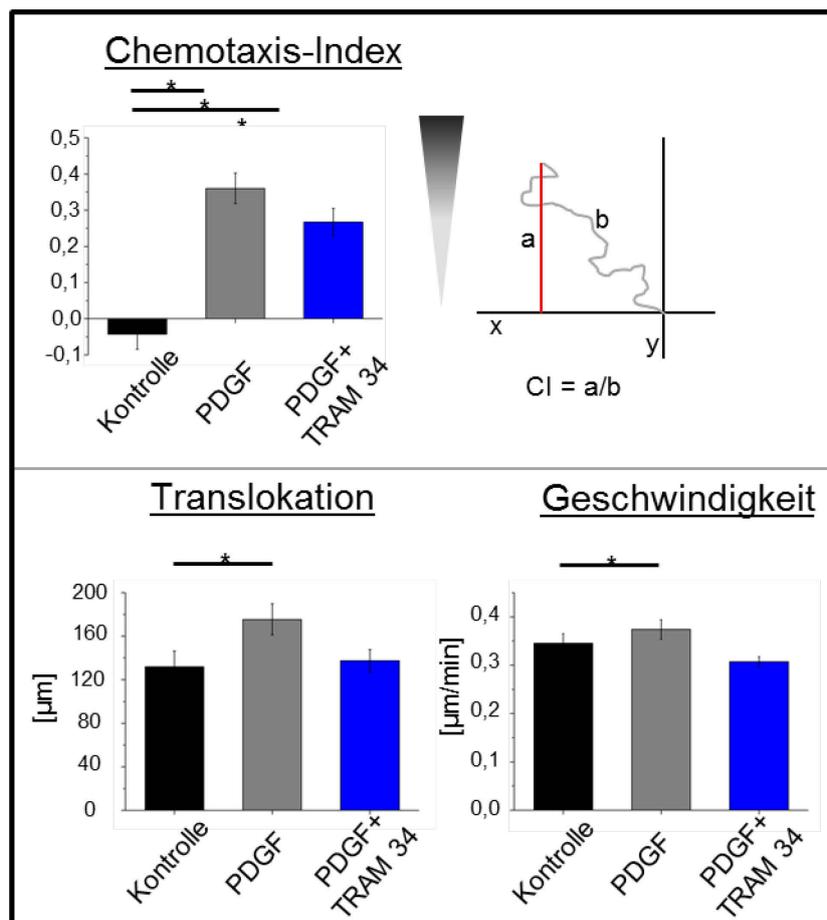


Abbildung 19: Chemotaxis mit PDGF und der Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals

Die Sternzellen zeigten in einem Gradienten mit PDGF eine ausgeprägte Chemotaxis. Dieser Effekt konnte bei Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals deutlich verringert werden. So betrug der Chemotaxis-Index (CI) $0,27 \pm 0,04$ bei Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals und $0,36 \pm 0,04$ ohne Beeinflussung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals.

Weiterhin konnte bei Stimulierung der PSCs mit PDGF sowohl eine erhöhte Translokation als auch eine erhöhte Geschwindigkeit festgestellt werden. Ähnlich zu den Chemokinese-Experimenten konnte durch die Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals dieser Effekt rückgängig gemacht werden.

(n= 50-60 Zellen, N=5)

Folgend werden die Ergebnisse präsentiert, die mit EGF-Stimulierung und $K_{Ca}3.1$ -Inhibierung erzielt wurden. Im Gegensatz zur $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung bei Sternzellen im PDGF-Gradienten konnte hier die Chemotaxis-Induktion nicht herabgesetzt werden. Der Chemotaxis-Index war bei Zusatz von TRAM 34 sogar noch erhöht ($0,22 \pm 0,05$) im Gegensatz zum Chemotaxis der PSC im EGF-Gradienten ohne $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung ($0,10 \pm 0,05$). Die Pfade der einzelnen Zellen können anhand Abbildung 20 nachvollzogen werden.

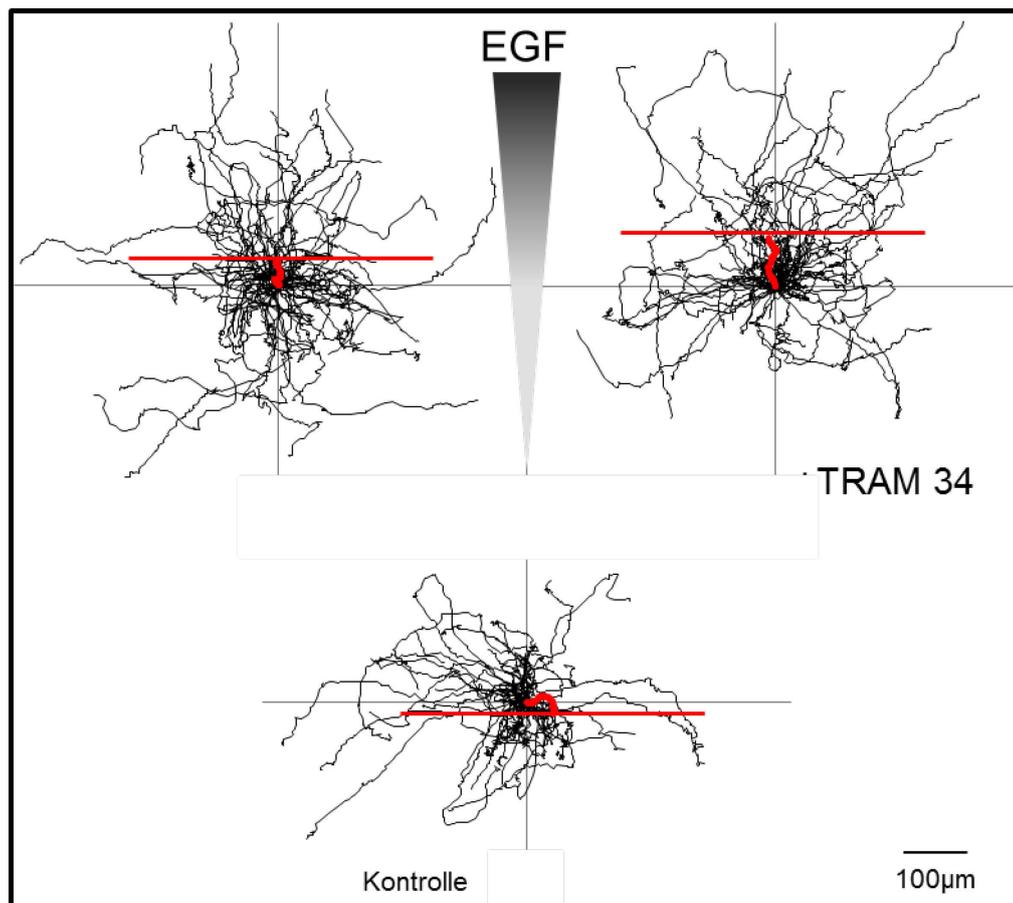


Abbildung 20: Chemotaxis der PSCs in einem EGF-Gradienten mit $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung

In einem Gradienten mit EGF migrieren die Sternzellen in Richtung der höheren Konzentration des Chemokins. Dieser Effekt wird durch die Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals nicht gemindert. Der Chemotaxis-Index der Sternzellen ist bei Zusatz von TRAM 34 sogar leicht auf $0,22 \pm 0,05$ von $0,10 \pm 0,05$ ohne TRAM 34 erhöht.

Die zuvor beschriebene Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit durch Zugabe von EGF konnte durch die Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals verhindert werden. Ebenso konnte die Steigerung der Translokation der Sternzellen durch die $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blockade verhindert werden.

(n= 50-60 Zellen, N=5)

Zur vereinfachten Darstellung der Ergebnisse gibt Abbildung 21 einen Überblick über die statistische Auswertung der Chemotaxis-Versuche.

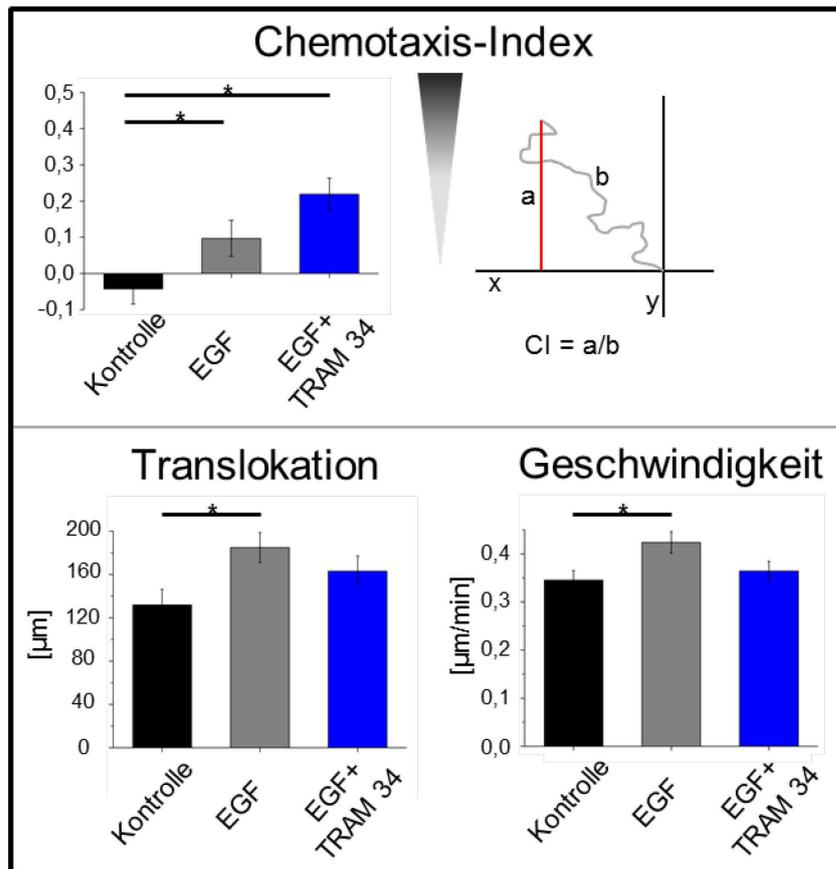


Abbildung 21: Chemotaxis mit EGF und der Inhibierung des KCa3.1-Kanals

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Auswertung der Chemotaxis der Sternzellen, wobei hier wieder der Chemotaxis-Index als Maß zur Quantifizierung genutzt wurde. Im Gegensatz zu dem Effekt der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung bei Stimulierung mit PDGF konnte hier die Induktion der Chemotaxis nicht verhindert werden.

Die Stimulierung der Sternzellen hinsichtlich Geschwindigkeit und Translokation konnte jedoch durch TRAM 34, analog zu den Chemokinese-Experimenten, verhindert werden. (n= 50-60 Zellen aus 5 unabhängigen Experimenten)

In Abbildung 22 wird analog zur Abbildung 16 die X- und Y-Translokation entlang der Achsen dargestellt. Ohne Chemoattraktanz ist keine Abweichung in X- oder in Y-Achsenrichtung feststellbar. Bei Blockade der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle setzte die Chemotaxis im PDGF-Gradienten deutlich verzögert ein, so dass die Translokation in Y-Richtung einen markant kleineren Endwert erreicht ($70 \pm 10 \mu\text{m}$) im Vergleich zur Stimulierung mit PDGF allein ($126 \pm 11 \mu\text{m}$).

Die Sternzellen, die im Gradienten mit EGF und TRAM 34-Zusatz im Medium ($74 \pm 11 \mu\text{m}$) migriert sind, erreichten ähnliche Werte wie jene mit PDGF und $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung. Jedoch ist hier eine stetige Richtung hin zur höheren Konzentration

des Chemokins erkennbar. Bei allen Bedingungen war die Migration entlang der X-Achse nicht bedeutend.

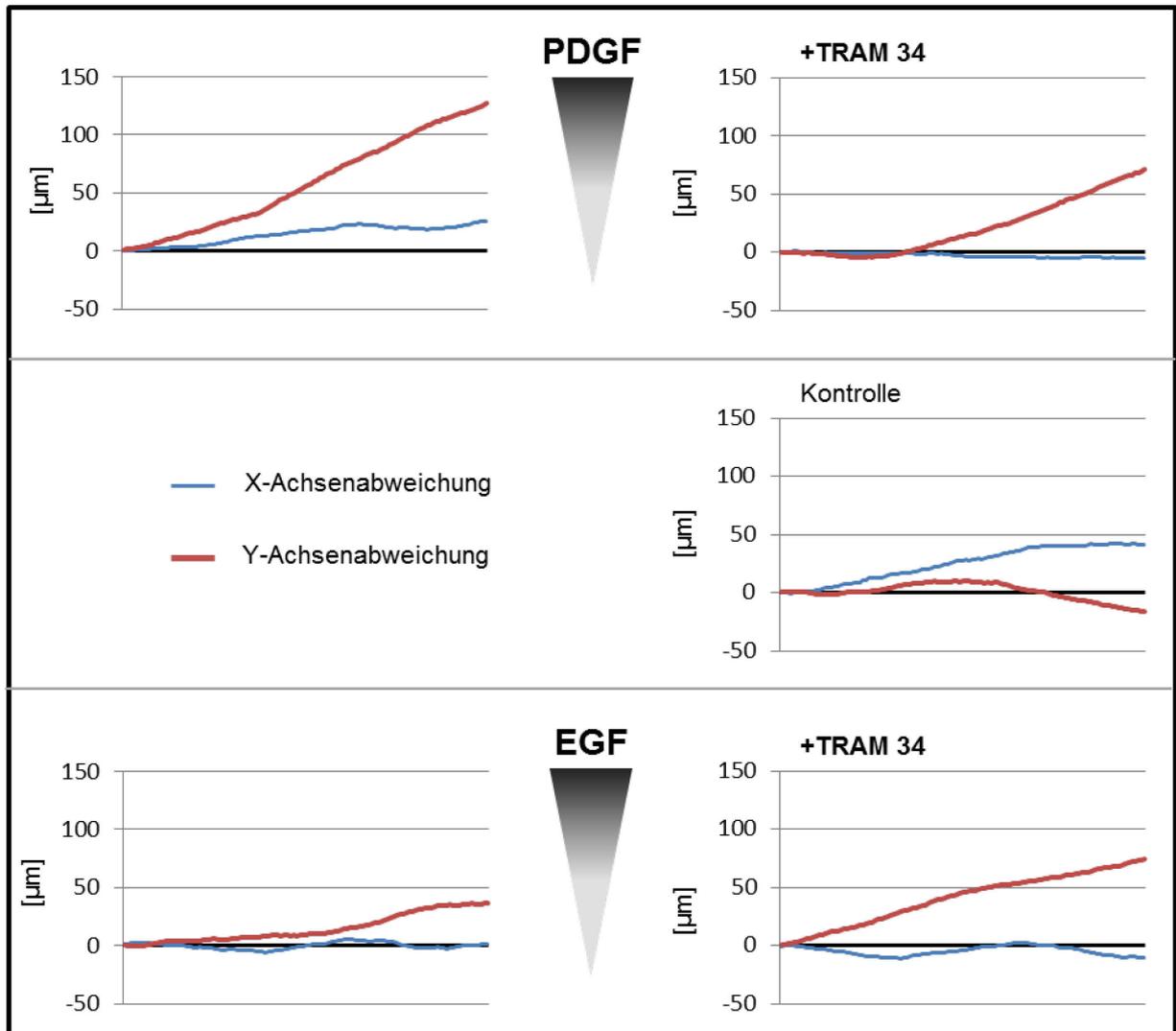


Abbildung 22: Achsenabweichung der PSCs während der Chemotaxis unter $K_{Ca3.1}$ -Inhibierung

Mit PDGF als Chemoattraktanz verläuft die Y-Achsen-Abweichung unverkennbar in Richtung des aufgebauten Gradienten. Bei einem Gradienten mit PDGF und $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Inhibierung als ist die Y-Abweichung weniger stark ausgeprägt, was vor allem an dem späteren Beginn der Migration in Richtung der höheren Konzentration von PDGF liegt.

Die $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Inhibierung hatte bei Migration der Sternzellen in einem Gradienten mit EGF nicht den gleichen Effekt wie bei Migration in einem PDGF-Gradienten. Hier verlief die Chemotaxis scheinbar unbeeinflusst und erreicht sogar größere Endwerte bei $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Inhibierung.

Die Kontroll-Bedingung zeigt keinerlei Abweichung in eine Achsenrichtung.

Das Lösungsmittel DMSO hatte keinerlei Einfluss auf die Chemotaxis. Die mit DMSO inkubierten Zellen verhielten sich im PDGF-Gradienten wie jene Zellen, die ohne DMSO im Medium migriert sind. Die Translokation in Y-Richtung beträgt $123 \pm 10 \mu\text{m}$ mit DMSO und $127 \pm 14 \mu\text{m}$ ohne DMSO.

Analog zu den Chemokinese-Experimenten wurde, um einen Einfluss des Lösungsmittels DMSO (Dimethylsulfoxid) auszuschließen, ein Kontrollexperiment mit RPMI und DMSO durchgeführt. Hierbei war die Konzentration von DMSO die gleiche, wie in den Experimenten, für die DMSO als Lösungsmittel für TRAM 34 benutzt wurden war. Hier zeigte sich wie bereits in den Chemokinese-Experimenten, dass DMSO bis auf eine Ausnahme keinen Einfluss hat. So sind sowohl der Chemotaxis-Index als auch die Translokation im Vergleich zur Kontrollbedingung ohne DMSO nicht verändert. Lediglich die Geschwindigkeit der Sternzellen ist reduziert.

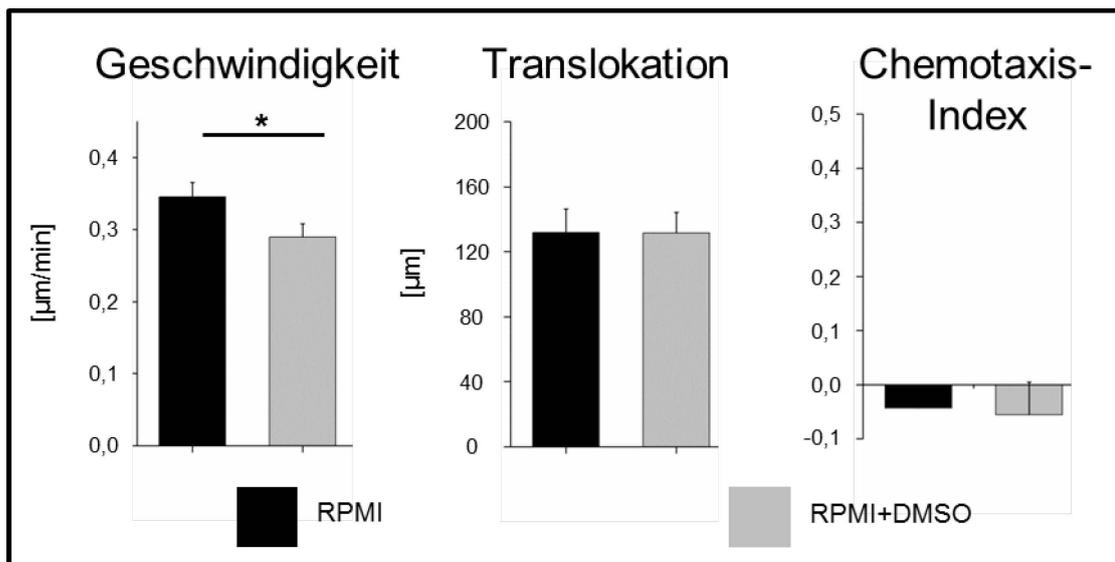


Abbildung 23: Kontrollexperimente zum Ausschluss einer Beeinflussung durch DMSO

Um einen Einfluss des Lösungsmittels, DMSO, auszuschließen, wurden Kontrollexperimente angefertigt. Diese zeigen, dass lediglich die Geschwindigkeit der migrierenden Zellen leicht beeinflusst wird. Der Chemotaxis-Index hingegen zeigt keinerlei Auffälligkeiten.

4 Diskussion

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt noch immer eine sehr bedrohliche Neoplasie dar. So ist es nachvollziehbar, dass in den letzten Jahren dieser Tumor intensiv beforscht wurde und viele wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden konnten. Nichtsdestotrotz konnten bisherige Forschungsergebnisse die Behandlung des Pankreaskarzinoms nicht wesentlich verbessern. Trotzdem ist jede neue Erkenntnis über die Physiologie und die Pathophysiologie dieser Erkrankung ein weiterer Schritt zum besseren Verständnis und ermöglicht potenziell die Entwicklung neuer Therapiekonzepte.

Es lässt sich anhand der präsentierten Ergebnisse festhalten, dass murine pankreatische Sternzellen durch PDGF und EGF stimuliert werden. Diese Stimulierung lässt sich vor allem an der gesteigerten Translokation und Geschwindigkeit der migrierenden Sternzellen festmachen. Neben der Stimulierung der PSCs konnte zudem festgestellt werden, dass EGF und vor allem PDGF in der Lage sind, Chemotaxis bei pankreatischen Sternzellen zu induzieren. Diese Effekte konnten zum Teil gemindert werden, indem der $K_{Ca}3.1$ -Kanal der Sternzellen mithilfe von TRAM 34 inhibiert wurde.

Zu Beginn waren vor allem die Isolierung der pankreatischen Sternzellen und deren anschließende Identifizierung von großer Wichtigkeit. Die Methode der Isolierung entspricht jener, die auch bereits von Haanes et al. verwendet wurde (26). Es wurden lediglich kleine Modifikationen vorgenommen, um die Methode an die Verhältnisse im hiesigen Labor zu adaptieren. Ebenso wie bei Haanes et al. konnten mehrere für PSCs typische Marker, wie Vitamin A, α -SMA und GFAP, nachgewiesen werden. Da sowohl die Methode beider Arbeiten einander entspricht und auch die Identifizierung der PSCs in beiden Arbeiten den bisherigen Konsens widerspiegelt, kann sicher davon ausgegangen werden, dass es sich bei den isolierten Zellen um pankreatische Sternzellen handelt (2; 52).

Im Weiteren wurde die Migration der Sternzellen bei unterschiedlichen Stimulierungen untersucht. Die Migration von Zellen hat bei Tumoren wesentlichen Einfluss auf das Überleben von Patienten. Die Migration von Tumorzellen ist unabdingbar für die Metastasierung und bestimmt dadurch zum großen Anteil die Therapie und die Überlebenszeit der Patienten. Die Desmoplasie im PDAC ist ein weiterer Faktor, aufgrund dessen die Migration von Zellen untersucht wird. In desmoplastischen Arealen übersteigt der Anteil der PSC den ansonsten üblichen Anteil dieser Zellen im gesunden Gewebe deutlich (27; 51; 69), was durch gezielte Migration hin zu diesen Arealen zu erklären wäre. Es ist darüberhinaus anzunehmen, dass die verstärkte Proliferation der PSCs

durch die Interaktion mit den maligne entarteten Zellen ebenso für die gestiegene Zellzahl verantwortlich ist (2; 6). Für Sternzellen aus der Leber wurde die Fähigkeit zur Chemotaxis bereits nachgewiesen (33). So war die Annahme gerechtfertigt, dass Sternzell-stimulierende Faktoren wie PDGF und EGF das Migrationspotential und auch die Chemotaxis-Fähigkeit der PSCs beeinflussen.

4.1 Kontrollexperimente

Um eine sachgemäße Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten, gilt es zunächst, die Kontrollbedingungen zu bewerten. Hier ist vor allem wichtig zu prüfen, inwiefern das Lösungsmittel DMSO, in dem der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blocker TRAM 34 gelöst wurde, die Migration beeinflusst. Dies ist nötig, um ausschließen zu können, dass die entstandenen Unterschiede durch das Lösungsmittel selbst und nicht etwa durch die eingesetzten Substanzen verursacht wurden. So zeigten sich bei den Chemokinese-Experimenten Unterschiede in dem Strukturindex der Zellen. Hierbei war der Wert für die Zellen größer, in deren Medium DMSO zugesetzt war. Der Strukturindex der Sternzellen betrug $0,36 \pm 0,02$ ohne DMSO und $0,45 \pm 0,02$ mit DMSO im Medium. Da dieser Unterschied allerdings in keinem anderen Experiment (bspw. Chemotaxis-Experimente) beobachtet wurde, in dem DMSO benutzt worden war, ist der Unterschied des Strukturindexes sehr wahrscheinlich nicht auf DMSO zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung ist die zu dem Zeitpunkt der Experimente mit $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibition der Sternzellen sicherere Routine bei der Isolierung der PSCs, deren anschließende Kultur und bei der Durchführung der Experimente selber. Vor allem bei der Kultur der Zellen ist es wichtig, dass die Sternzellen in der richtigen Konzentration ausgesät werden, da ansonsten durch fehlende Nähe zueinander die Zellen deutlich an Größe zunehmen und ihre typische Morphologie verlieren. Eine geringere Zelldichte in Kultur könnte vor allem zu Beginn der Versuchsreihe der Chemokinese-Experimente entstanden sein. Dies ist dadurch zu erklären, dass zu diesem Zeitpunkt die Isolierung nicht so effektiv wie war im weiteren Verlauf. Somit konnten jene Sternzellen, die zu einem früheren Zeitpunkt isoliert wurden, durch den fehlenden Kontakt zu benachbarten Zellen eine größere Fläche einnehmen. Die Sternzellen, auf die dieser Umstand zutrifft, könnten also für den veränderten Strukturindex verantwortlich sein.

Da bei den Experimenten mit dem Überstand der Pankreaskarzinomzellen BxPC3 serumhaltiges Medium benutzt wurde, musste ebenso ein Effekt des Serums auf die Migration ausgeschlossen werden. Hierzu wurde das Kontrollmedium RPMI mit Serum versetzt und die entsprechenden Experimente ausgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Fläche bei Zusatz von Serum von $7142 \pm 800 \mu\text{m}^2$ auf $5696 \pm 691 \mu\text{m}^2$ erniedrigt wurde. Die gleiche Tendenz traf auch auf die durchschnittlich erreichte Geschwindigkeit zu, die bei der Kontrollbedingung ohne Serum bei $0,23 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ lag und bei Zusatz von Serum auf $0,16 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ sank. Eine mögliche Erklärung wird folgend erläutert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass hypoxische Bedingungen Sternzellen aktivieren (18; 62). Im Tumormilieu ist zusätzlich die Versorgung mit weiteren Nährstoffen neben Sauerstoff sehr knapp. Es könnte also sein, dass die Unterver-

sorgung zu einer Aktivierung führt und nicht alleine der Sauerstoffmangel hierfür verantwortlich ist. Dieser Zustand wird hier durch das Fehlen von Serum nachempfunden, sodass jene Zellen ohne Serum aktiver sind und entsprechend schneller migrieren. Die geringere Fläche der Zellen mit Serum unterstützt diese Annahme weiter, da aktivierte Sternzellen größer werden, indem sie mehr Zellausläufer bilden (52).

4.2 Überstand von BxPC3 Pankreaskarzinomzellen aktiviert PSCs

Pankreastumorzellen haben einen wachstumsfördernden Einfluss auf PSCs (3; 20; 37; 51). Der Umstand, dass mit Tumorzellen in Cokulturen wachsende PSCs stärker proliferieren und mehr Extrazellulärmatrix produzieren, gab Anlass, einen migrationsfördernden Einfluss der Tumorzellen auf PSCs zu vermuten. So wurde im Rahmen dieser Arbeit der Überstand von Tumorzellen der Linie BxPC3 genutzt, um pankreatische Sternzellen zu stimulieren.

Der Einfluss des Überstands resultiert in einer erhöhten Translokation der Sternzellen und in einer erhöhten Geschwindigkeit. Weiterhin ist die Fläche der Zellen, die mit dem Überstand von BxPC3-Zellen stimuliert worden ist, größer als bei den dazugehörigen Kontrollexperimenten. Dies geht mit einer erhöhten Aktivierung einher, was durch die erhöhte Translokation und Geschwindigkeit deutlich wird. Dies bestätigt bisher erbrachte Ergebnisse, dass pankreatische Sternzellen in Cokultur mit pankreatischen Tumorzellen verstärkt aktiv sind (6) und kann als weiterer Beleg für die Qualität der primärkultivierten PSCs gewertet werden.

4.3 EGF lässt PSCs schneller migrieren

Im nächsten Abschnitt sollen die migrationsfördernden Einflüsse von EGF und PDGF auf die Sternzellen diskutiert werden. Außerdem wird der Effekt der Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanal thematisiert. Bisher konnte ein stimulierender Effekt sowohl von EGF und PDGF als auch von TGF- β auf die pankreatischen Sternzellen nachgewiesen werden (36; 88). Analog dazu konnte EGF in unseren Experimenten sowohl die Geschwindigkeit als auch die Translokation der Sternzellen erhöhen. Dies trifft auf die Chemokinese- und die Chemotaxis-Experimente zu. Die Geschwindigkeit war hierbei über den Zeitraum des Experiments konstant erhöht. Dieser Effekt konnte allerdings teilweise durch den $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Kanalblocker TRAM 34 wieder rückgängig gemacht werden. Die Geschwindigkeit der Sternzellen war bei Stimulierung mit EGF und gleichzeitiger Inhibition des $K_{Ca}3.1$ -Kanals wieder auf gleichem Niveau wie in den Kontrollexperi-

menten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der die Migration betreffende Einfluss von EGF unter anderem durch $K_{Ca}3.1$ -Kanal-abhängige Prozesse ausgelöst wird.

Der den Calcium-Einstrom fördernde Einfluss von EGF konnte bereits gezeigt werden (21; 31; 89) und könnte ebenso wie die Aktivierung des PI3K-Signalwegs (78) Teil einer möglichen Erklärung für die gesteigerte Aktivität der PSCs sein. So erhöht EGF die Expression bzw. die Aktivität des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in die Plasmamembran von Glioblastomzellen und von Zellen der Gefäßwand (40; 78), was die Migration der Zellen steigern könnte. Bei Inhibierung des Kanals mit TRAM 34 würde dieser Effekt wieder rückgängig gemacht werden. Der inhibitorische Effekt von TRAM 34 konnte allerdings nur in den Chemotaxis-Experimenten nachgewiesen werden. Der Grund hierfür könnte die geringere Dauer der Chemokinese-Experimente darstellen. Die Migrationsgeschwindigkeit der PSCs ist absolut betrachtet nicht sonderlich schnell. So sind zum Beispiel Neutrophile ($10 \mu\text{m}/\text{min}$) bis zu 50-mal so schnell wie PSCs (45; 67). So ist es möglich, dass die Geschwindigkeit der Sternzellen bei zu geringer Beobachtungsdauer nicht adäquat abgebildet werden konnte. Eine weitere Erklärung für den geringen Effekt von TRAM 34 könnte die bei dieser Art von Chemotaxis-Experimenten beobachtete Hypoxie der Zellen sein. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoxie in der Lage ist, den $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Einfluss zu erhöhen (84). Durch die in den Chemotaxis-Experimenten ausgelöste Hypoxie wäre also eine erhöhte Aktivität von $K_{Ca}3.1$ -Kanälen denkbar, die die Zellen für die Inhibition dieses Kanals anfälliger macht. Somit ließe sich ein Effekt durch TRAM 34 erklären, der ohne vorherige Hypoxie und damit erhöhter $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Aktivität nicht auftritt. Zudem wird die TRPC 6-Expression bei Glioblastomzellen durch Hypoxie erhöht, wodurch die Migration der Glioblastomzellen verstärkt wird (15). Der migrationsfördernde Effekt der TRP-Kanäle beruht wesentlich auf der Regulierung des Ca^{2+} -Stroms. Ein durch Hypoxie verursachter und durch TRP-Kanäle vermittelter, erhöhter Ca^{2+} -Strom könnte also die migrationsfördernden Eigenschaften der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle erhöhen. Bei Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals mittels TRAM 34 wird dieser Effekt verhindert.

Im nächsten Abschnitt wird auf die Chemotaxis-Induktion durch EGF näher eingegangen. Die die Migration fördernde Eigenschaft von EGF wurde bereits bei humanen Brustkrebszellen gezeigt, wobei in diesen Experimenten keine Chemotaxis induziert werden konnte (92). Im Gegensatz dazu war EGF in unseren Chemotaxis-Experimenten in der Lage, die Migration der pankreatischen Sternzellen in Richtung der höheren Konzentration von EGF zu fördern. Dies bestätigt die Resultate, die für PSCs in einem Aufbau mit Boyden-Kammern erreicht wurden (10) und fügt noch eine genauere Einstufung der chemotaktischen Eigenschaft von EGF hinzu. Mit den in unserem Labor produzierten Daten wird aufgezeigt, wie effektiv EGF Chemotaxis induziert und ermöglicht einen direkten Vergleich zu den Chemotaxis-induzierenden Eigenschaften von PDGF. Hierauf wird später nochmals eingegangen. Unerwartet in diesem Zusammenhang, und auch im Vergleich zu den Resultaten der Chemotaxis-

Experimente mit PDGF, ist die weniger effektive Chemotaxis bei funktionalem $K_{Ca}3.1$ -Kanal. Die Chemotaxis konnte bei Zellen, die sowohl mit EGF als auch mit TRAM 34 inkubiert wurden, gesteigert werden. Dieses Ergebnis spiegelt jedoch die Erkenntnis wider, die auch in Experimenten mit EGF-Stimulierung von Glioblastomzellen und gleichzeitiger $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung mittels TRAM 34 erreicht wurde. Hier konnte EGF Chemotaxis induzieren, was jedoch durch $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blockade nicht reversibel war (78).

4.4 PDGF induziert Chemotaxis bei PSCs

Nun soll der Einfluss des platelet-derived-growth-factors (PDGF) auf die Migration der Sternzellen diskutiert werden. Ähnlich den Resultaten, die mit EGF erzielt wurden, konnte PDGF sowohl die Geschwindigkeit als auch die Translokation der Migration erhöhen. Dies ist bei den Chemokinese-Experimenten der Fall und ebenso bei den Chemotaxis-Experimenten.

Der stimulierende Effekt von PDGF konnte bereits (3) ebenso wie der PDGF-Rezeptor auf Zellmembranen der PSCs nachgewiesen werden (69). Diese Resultate zusammen mit dem erbrachten Nachweis, dass PDGF als Chemoattraktanz fungiert (1; 70), legten demnach also den Schluss nahe, dass PDGF verstärkenden Einfluss auf die Migration der PSCs nimmt. In der Tat war bekannt, dass PDGF Chemotaxis bei PSCs induziert und deren Migrationsvermögen erhöht (58). Dies unterstreicht die Relevanz der Beobachtung, dass PDGF-Rezeptoren in der Nähe von fibrotischen Arealen im Pankreas vermehrt zu finden sind (13; 27). Es ist also plausibel anzunehmen, dass sich die erhöhte Anzahl an PSCs in tumorösen oder fibrotischen Arealen des Pankreas auf deren Fähigkeit zur gerichteten Migration in einem PDGF-Gradienten zurückführen lässt.

Zwar konnte PDGF die Geschwindigkeit in den hier durchgeführten Experimenten erhöhen, allerdings war dieser Effekt verglichen mit EGF weniger stark ausgeprägt. Im Gegensatz dazu lag die Steigerung der Translokation auf ähnlichem Niveau. Dieser Effekt trat auch bei den Chemotaxis-Experimenten auf, in denen PDGF die Geschwindigkeit weniger stark steigern konnte als die Translokation verglichen mit EGF. So konnte die Geschwindigkeit bei den Chemokinese-Experimenten durch EGF um 36,9 % gesteigert werden, durch PDGF hingegen nur um 14,6 %. Ähnlich verhielt es sich in den Chemotaxis-Experimenten, in welchen die mit EGF stimulierten Zellen um 22,9 % schneller migrierten, die mit PDGF stimulierten jedoch nur um 8,4 %. Die Translokation jedoch wurde durch beide Substanzen ähnlich stark gesteigert: um 63,8 % durch EGF und um 61,9 % durch PDGF in den Chemokinese-Experimenten. In den Chemotaxis-Experimenten lag die Steigerung der Translokation ebenso eng beieinander mit 40,2 % durch EGF und 33 % durch PDGF.

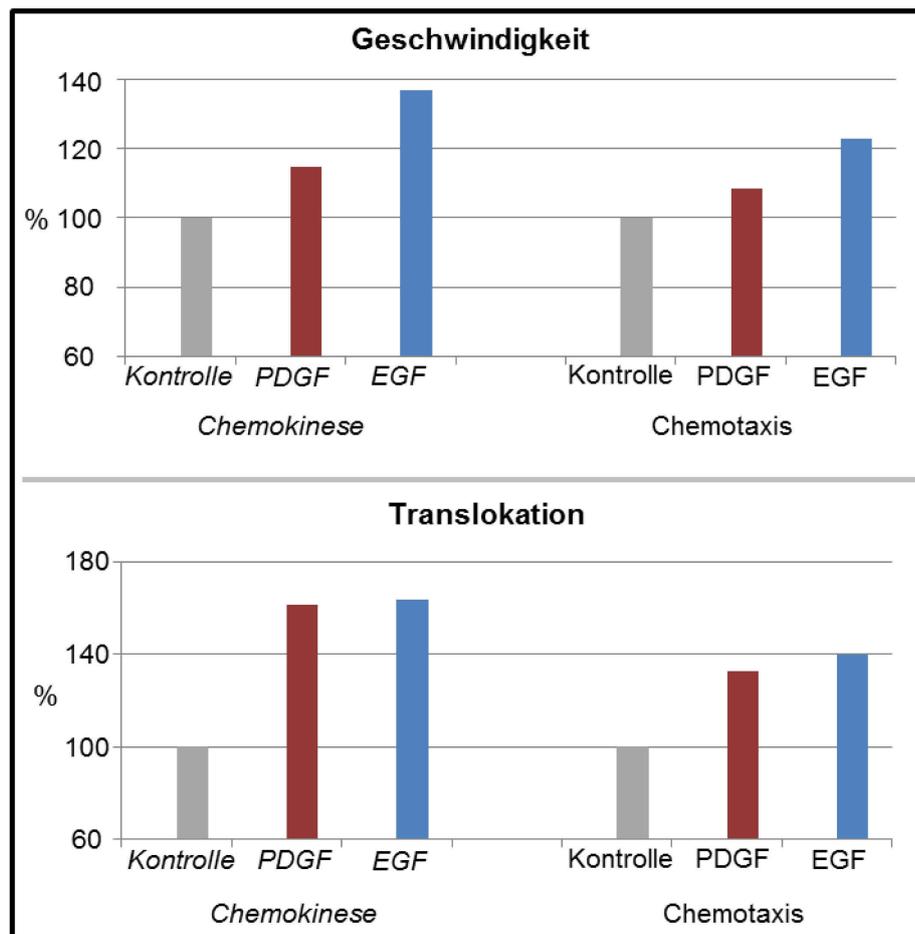


Abbildung 24: Vergleich der relativen Geschwindigkeits- und Translokationserhöhung durch EGF und PDGF

Die Translokation der Sternzellen durch beide Stimulanzien liegt auf einem ähnlichen Niveau. Die Geschwindigkeit der PSCs hingegen wird durch EGF deutlich stärker erhöht als durch PDGF.

Bei den Chemotaxis-Experimenten könnte dieses Resultat durch die potentere chemotaktische Wirkung von PDGF zum Teil erklärt werden. So kann angenommen werden, dass die gerichtete Migration unter PDGF die Translokation („Netto-Distanz“) stärker erhöht als die Geschwindigkeit. Da dieser Effekt jedoch auch bei der ungerichteten Migration auftrat, muss es noch eine weitere Erklärung hierfür geben.

Eine weitere Erklärung ist die Aktivierung und Expression von $K_{Ca}3.1$ -Kanälen unter PDGF-Stimulierung (80; 85). Die $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Aktivierung hyperpolarisiert das Membranpotenzial und erhöht auf diese Weise die Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom und begünstigt damit die Migration (77). Weiterhin kann vermutet werden, dass der $K_{Ca}3.1$ -Kanal mit dem TRPC3 kooperiert und dadurch den Ca^{2+} -Einstrom stärker beeinflusst. (83). So konnte der Zusatz von TRAM 34 die Translokation unter PDGF um 22 % reduzieren, unter EGF-Stimulierung nur um 12 %. Diese erhöhte Anfälligkeit könnte einer

höheren Zahl an Kanälen geschuldet sein, jedoch reichen die hier präsentierten Resultate nicht aus, um diesen Schluss sicher ziehen zu können.

In diesem Abschnitt wird nun die Chemotaxis-induzierende Eigenschaft von PDGF näher betrachtet. Es konnte in einem Aufbau mit Boyden-Kammern bereits nachgewiesen werden, dass PDGF Chemotaxis bei pankreatischen Sternzellen induziert (58). Dieses Ergebnis konnte bestätigt und um den Einfluss von TRAM 34 auf die Chemotaxis der PSCs erweitert werden. Durch den Chemotaxis-Index von $0,36 \pm 0,04$ wird deutlich, dass PDGF ein potentes Chemokin für PSCs ist. Die Hemmung der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle vermochte die Chemotaxis-Induktion deutlich herabzusetzen, aber nicht komplett zu verhindern. Der Chemotaxis-reduzierende Effekt der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibition konnte des Weiteren bereits bei Glioblastomzellen gezeigt werden (16; 78).

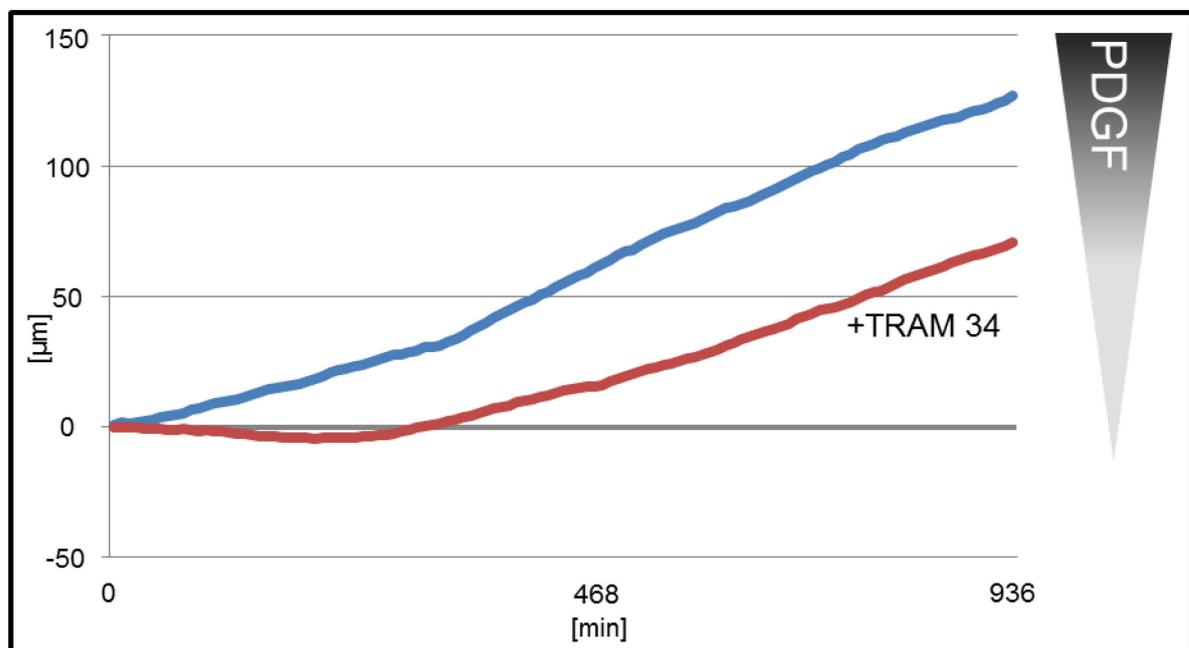


Abbildung 25: Vergleich Achsenabweichung PDGF und PDGF mit $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung

Durch die Blockade des $K_{Ca}3.1$ kommt es offensichtlich zu einem späteren Beginn der Chemotaxis. Die Sternzellen in einem Gradienten mit PDGF und unter gleichzeitigem TRAM 34-Einfluss zeigen bis zur 336. Minute nahezu keinerlei Y-Achsenabweichung. Das heißt, dass die Bewegung der Zellen bis zu diesem Zeitpunkt nicht gerichtet entlang des Gradienten von PDGF verläuft. Ab der 336. Minute jedoch beginnen die Sternzellen gezielt in Richtung der höheren Konzentration von PDGF zu migrieren. Die Y-Achsenabweichung erreicht jedoch absolut nicht so hohe Werte wie die Sternzellen ohne $K_{Ca}3.1$ -Blockade. Außerdem ist die Steigung der Kurve ein Maß für die Effizienz der Chemotaxis, die bei $K_{Ca}3.1$ -Blockade deutlich geringer ist (vgl. Abbildung 26)

Auffällig ist bei diesen Experimenten der Verlauf der Chemotaxis in einem PDGF-Gradienten. Die obige Abbildung zeigt die durchschnittliche Bewegung in Richtung der Y-Achse. Es ist ersichtlich, dass PDGF eine mehr oder weniger konstante Bewegung der PSCs in Richtung der höheren Konzentration erzeugt. Die Steigung der roten Kurve ist nahezu linear. Dagegen findet unter PDGF mit TRAM 34 im ersten Drittel eine Y-Achsenabweichung, also Chemotaxis, noch nicht statt.

Wenn man eine Ausgleichsgerade für die Y-Achsenabweichung unter PDGF-Stimulierung berechnet, so hat diese Gerade eine Steigung von 1,17. Jene für PDGF mit TRAM 34 allerdings nur 0,67. Falls man nun aber die Y-Achsenabweichung für PDGF mit $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung in zwei Abschnitte unterteilt, wird ersichtlich, dass die Gerade von Beginn des Experiments bis Minute 336 eine Steigung von 0,0482 hat. Die Steigung der Geraden von Minute 336 bis zum Ende des Experiments hingegen hat eine Steigung von 0,95 und ist damit immer noch flacher als die Gerade für die Experimente mit PDGF allein. Abbildung 26 zeigt die angesprochenen Geraden nochmals im Vergleich zueinander. Unter B wurde die Gerade der Y-Achsenabweichung unter PDGF mit jener Geraden übereinandergelegt, die die Y-Achsenabweichung ab Minute 336 für die Stimulierung mit PDGF und $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung zeigt.

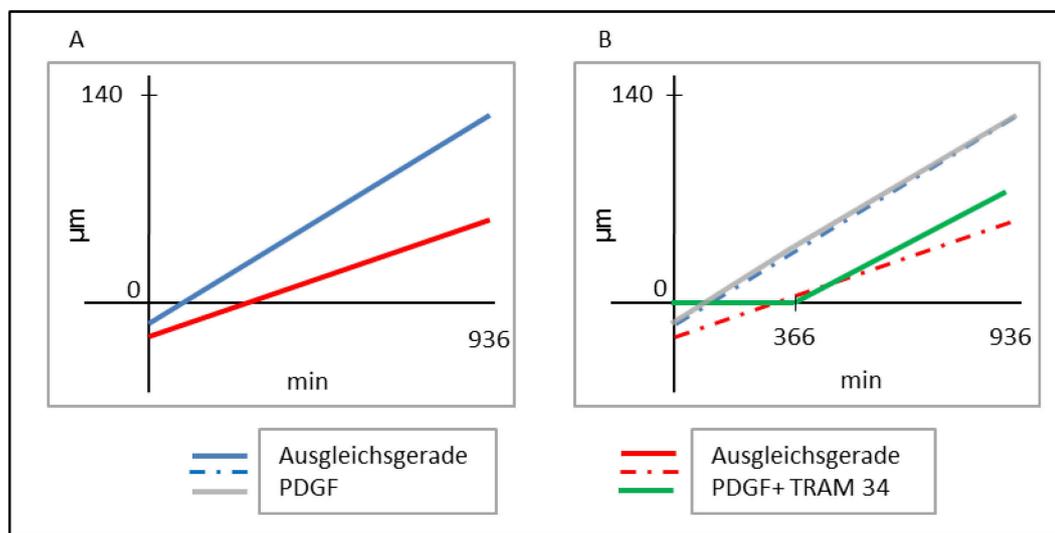


Abbildung 26: Einfluss der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle auf die Chemotaxis im PDGF-Gradienten

Die hier dargestellten Ausgleichsgeraden der Y-Achsenabweichung lassen erkennen, dass die Sternzellen in einem Gradienten mit PDGF und TRAM 34 verspätet zur Chemotaxis befähigt sind. Dabei ist im ersten Abschnitt des Experiments mit PDGF und TRAM 34 bis zur 336. Minute nahezu keine Y-Achsenabweichung feststellbar, was durch die geringe Steigung der Ausgleichsgeraden deutlich wird. Selbst wenn die Sternzellen mit blockiertem $K_{Ca}3.1$ -Kanal eine Chemotaxis zeigen, ist diese auf niedrigerem Niveau wie die Chemotaxis der Sternzellen ohne $K_{Ca}3.1$ -Blockade. Dies wird wiederum durch die nun nahezu identische Steigung der Ausgleichsgeraden deutlich.

Dies legt den Schluss nahe, dass TRAM 34 für die besagte Zeit wirkt und über die Inhibierung der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle die Chemotaxis verhindern kann. Allerdings ist dies auf ungefähr 330 Minuten beschränkt, wonach sich die hemmende Wirkung der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Blockade auf die Chemotaxis der PSCs abschwächt. Es wäre also sinnvoll zu prüfen, nach welchem Zeitraum die Wirkung von TRAM 34 sistiert. Eine mögliche Erklärung ist unter anderem die Internalisierung der Zielstruktur, also des $K_{Ca}3.1$ -Kanals, wobei sich dabei die Frage stellt, inwieweit dies vereinbar mit einer weiterhin funktionierenden Migration ist. Gegen die Internalisierung spricht auch, dass dieser Effekt nicht in den Experimenten mit EGF und TRAM 34 nachzuweisen war. Hier war der

Chemotaxis-Index mit Zusatz von TRAM 34 sogar erhöht. Zudem zeigt die Aufsummierung der Y-Achsenbewegung keine ähnliche Dynamik wie jene unter PDGF.

Im Folgenden wird diskutiert, auf welche Weise der $K_{Ca3.1}$ -Kanal und dessen Inhibierung die Migration der Sternzellen beeinflusst. Die migrationsfördernde Eigenschaft des $K_{Ca3.1}$ -Kanals konnte bereits vielfach belegt und zum Teil auch erklärt werden (16; 76-78). Diese Erkenntnisse erlauben es, die Mechanismen des migrationshemmenden Einfluss der $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Inhibierung zu diskutieren. Ein wichtiger Schritt bei der Migration ist die Polarisierung der Zelle, wofür ein Ca^{2+} -Einstrom unabdingbar ist (11; 74). Die Inhibierung des $K_{Ca3.1}$ -Kanals verhindert nun jedoch die Hyperpolarisation der Zellmembran, was wiederum den Einstrom von Ca^{2+} stark erschwert (42). Die somit erschwerte Polarisierung wäre eine Erklärung für die fehlende Stimulierung der Sternzellen durch PDGF und EGF bei Inhibierung des $K_{Ca3.1}$ -Kanals. Ein verminderter Ca^{2+} -Einstrom konnte bereits für die Sternzelllinie RLT-PSC bei Zugabe des spezifischen $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Blockers TRAM 34 gezeigt werden (83). Nun bleibt zu klären, wie der unterschiedliche Effekt der $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Inhibierung auf die durch EGF und PDGF induzierte Chemotaxis zustande kommt. Partida-Sánchez et al. konnten zeigen, dass bei Neutrophilen der Ca^{2+} -Einstrom für die fMLP-induzierte Chemotaxis notwendig ist, wohingegen bei Chemotaxis hin zu IL-8 kein Ca^{2+} -Einstrom nötig ist (57). Ähnlich könnte bei den pankreatischen Sternzellen die durch PDGF ausgelöste Chemotaxis auf Ca^{2+} -Einstrom beruhen. Die durch EGF induzierte Chemotaxis hingegen ist womöglich nicht auf Ca^{2+} -Einstrom angewiesen. So wären die Sternzellen hinsichtlich ihrer Chemotaxis-Befähigung in einem EGF-Gradienten nicht durch $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Inhibierung und daraus folgend verminderten Ca^{2+} -Einstrom beeinträchtigt. Bei Chemotaxis-Induktion durch PDGF jedoch hätte die verminderte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration einen hemmenden Effekt auf die Chemotaxis. Die Diskrepanz der Chemotaxis-Beeinträchtigung durch EGF und PDGF bei gleichem Effekt auf die ungerichtete Migration der Sternzellen, könnte so erläutert werden.

Diese Arbeit zeigt, wie stark bestimmte, in Pankreastumoren vorkommende Substanzen wie PDGF und EGF die Migrations-Leistung von pankreatischen Sternzellen erhöhen. Das Verständnis dieses Zelltyps ist für eine bessere Behandlung des Pankreastumors oder der Pankreasfibrose von großer Bedeutung. Die hier erzielten Erkenntnisse sind ein weiteres Puzzlestück auf dem Weg zu einem Verständnis dieses Zelltyps, das auch die Möglichkeit bietet, diese Zellen mit in der Therapie dieser Erkrankungen zu berücksichtigen. So werden diese Zellen bislang nicht routinemäßig gesondert behandelt, wodurch womöglich ein großes Potential bislang außer Acht gelassen wird (28; 46). Eine gezieltere und damit eventuell effektivere Therapie könnte also in einer Behandlung mit weniger Nebenwirkungen oder mit längerem Überleben resultieren.

5 Ausblick

60 % beträgt durchschnittlich die 5-Jahres-Überlebensrate aller Krebsarten. Dies ist eine hohe Zahl verglichen mit den mageren 8 % 5-Jahres-Überlebensrate des Bauchspeicheldrüsenkrebs. Es ist sicherlich utopisch zu hoffen, dass die Prognose des Pankreaskarzinoms in naher Zukunft ähnliche hohe Werte erreichen können wird. Allerdings wäre ein Fortschritt hin zu den Ergebnissen der Behandlung eines Leberkarzinoms durchaus denkbar. Hier liegen die 5-Jahres-Überlebensraten bereits bei 15 % (65).

Für die kurative Therapie des dukalen Adenokarzinoms des Pankreas ist die chirurgische Entfernung des Tumors der Goldstandard. Leider sind aber lediglich 20 % aller Patienten überhaupt für eine solche Therapie geeignet. Alle weiteren Patienten haben entweder einen lokal so weit fortgeschrittenen Befund, dass eine Operation nicht mehr durchführbar ist, oder aber es wurden bereits Metastasen entdeckt (44). Die Mehrheit der Betroffenen wird also mit einer intravenösen Chemotherapie behandelt, welche jedoch aufgrund der Eigenschaften des PDAC wenig effektiv ist. Bisher wurden die Desmoplasie und die Sternzellen in der Behandlung nicht routinemäßig berücksichtigt, wobei unstrittig ist, dass deren Einbeziehung ein großes Potential für die Therapie besitzt. Durch die exzessive Bindegewebsdeposition im tumorösen Gewebe wird eine gute Durchblutung und damit einhergehend eine ausreichende Verteilung des Chemotherapeutikums verhindert. Dieses Problem haben Von Hoff et al. zum Anlass genommen, einen Weg zu suchen, der auf eine bessere Verteilung des Chemotherapeutikums Gemcitabin abzielt. Es wurde nab-paclitaxel, ein an Albumin-Nanopartikel gebundenes Zellgift, zusätzlich zu Gemcitabin verabreicht. Daraus resultieren eine geringere Bindegewebsaktivität und somit eine 2,8-fach erhöhte Konzentration von Gemcitabin im tumöresen Gewebe. Dies war verbunden mit einer erhöhten Überlebensrate (87).

Weitere Experimente haben die pankreatischen Sternzellen näher untersucht, um eine effektivere Therapie zu gestalten. Froeling et al. haben Retinsäure (Vitamin A-Säure) genutzt, um bei Sternzellen einen ruhenden anstelle eines aktiven Phänotyps zu induzieren. Dadurch wurden die Proliferationsrate von Krebszellen gesenkt und deren Apoptoserate erhöht (24). Eine für die Therapie nutzbare Isoform der Retinsäure könnte demnach einen positiven Effekt auf die Behandlung haben. Die Gruppe um Provenzano et al. hat ebenso an dem Ansatz geforscht, die Desmoplasie mit in die Therapie einzubeziehen. Provenzano et al. haben gezeigt, dass vor allem Hyaluronsäure für einen hohen interstitiellen Druck sorgt, wodurch Gefäße kollabieren und somit die Blutversorgung des Tumors eingeschränkt ist. Durch intravenöse Applikation von PEGPH20 (pegylated recombinant human hyaluronidase) konnte eine Verminderung des interstitiellen Drucks auf das Niveau eines gesunden Pankreas erreicht werden. Verglichen mit Gemcitabin alleine wurde mit der Kombination von PEGPH20 und

Gemcitabin eine wesentlich höhere Ansprechrate des Tumors erreicht. Diese Therapie wurde bisher nur in einem Maus-Modell angewandt, aber hier zeigte sich bereits eine erhöhte Überlebensdauer (60).

Durch die Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in den pankreatischen Tumorzellen ergeben sich weitere therapeutische Optionen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in pankreatischen Tumorzellen, wie zum Beispiel BxPc3-Zellen, die Proliferation der Zellen stoppt (35). Da bei PSCs die Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals zusätzlich die Migration hemmt, würde der therapeutische Einsatz der $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Inhibierung zwei Effekte zugleich ausüben können: Hemmung der Tumorzellproliferation und durch die verringerte Aktivität der PSCs eine geringe Desmoplasie, womit ein erhöhtes Ansprechen der Therapie verbunden ist.

Diese Studien geben Anlass zur Hoffnung, dass in den nächsten Jahren die Überlebenszeit für Patienten mit PDAC verlängert werden kann. Obwohl manche dieser Therapien den Weg in die Klinik erst in einiger Zeit antreten können, zeigen sie dennoch die Richtung, in die die Therapie des Pankreastumors geht. Es ist offensichtlich, dass Behandlungen etabliert werden müssen, die nicht nur die malignen Zellen selber angreifen. Das Tumormilieu und die Zellen, die für dieses Milieu verantwortlich sind, stellen einen ebenso wichtigen Angriffspunkt dar. Dieser Ansatz wirkt vielversprechend und sollte noch weiter erforscht werden, um eine optimale Therapie zu gewährleisten.

6 Zusammenfassung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) gehört immer noch zu den tödlichsten Tumorarten überhaupt. Die Gründe für die ungünstige Prognose des PDAC sind vielfältig und lassen sich zu einem Teil durch die exzessive Bindegewebsproduktion dieses Tumors erklären. Diese Bindegewebsproduktion wird zwar durch die Tumorzellen induziert, für die Produktion der extrazellulären Matrix sind jedoch die pankreatischen Sternzellen verantwortlich. Diese Zellart beeinflusst wesentlich die Progression des PDAC, indem durch die exzessive Bindegewebsproduktion sowohl die Chemotherapie als auch die Radiotherapie erschwert werden. Daher ist es wichtig für das Verständnis des duktales Adenokarzinoms der Pankreas und auch für die Entwicklung potenzieller Therapien, die pankreatischen Sternzellen genauer zu erforschen. Da die Aktivierung der Sternzellen durch bestimmte von den malignen Zellen des Tumors sezernierten Faktoren eine wichtige Rolle spielt, werden diese Einflüsse im Rahmen dieser Doktorarbeit überprüft und anhand des Migrationsverhaltens der Sternzellen weiter charakterisiert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Primärkultur von murinen PSCs etabliert, wofür die Methode der Isolierung und der Verifizierung der Zellen neu erlernt wurde. Nach erfolgreicher Isolierung konnten die pankreatischen Sternzellen anhand ihrer Migrationseigenschaften weiter charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der platelet-derived growth factor (PDGF) als auch der epidermal growth factor (EGF) die Migration der pankreatischen Sternzellen fördern. Es wurde nachgewiesen, dass EGF und PDGF die Sternzellen sowohl bei homogener Konzentration der Stimulanzen als auch bei Experimenten mit Konzentrations-Gradienten schneller migrieren lassen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EGF und PDGF, jedoch insbesondere PDGF, in der Lage sind, Chemotaxis in murinen Sternzellen zu induzieren. Die Stimulierung durch EGF und PDGF konnte durch die Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals verhindert werden. Weiterhin war die Chemotaxis-Induktion durch PDGF bei nicht-funktionalem $K_{Ca}3.1$ -Kanal zeitlich deutlich verzögert und abgeschwächt.

Diese Arbeit liefert wichtige Ergebnisse zur Charakterisierung der pankreatischen Sternzellen. Insbesondere die Beobachtungen der Chemotaxis-Induktion und deren Beeinflussung durch Inhibierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals offenbaren mögliche Ansätze für Therapien gegen die desmoplastische Reaktion in PDAC.

7 Lebenslauf

8 Materialien

Tabelle 11: Benutzte Materialien

Substanz	Firma	Firmensitz Deutschland
Albumin Bovine Fraction V	Serva	Heidelberg
Anti-GFAP	Cell Signaling	Danvers (USA)
Anti- α -SMA	Dako	Glostrup (Dänemark)
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo-Scientific	Rockford (USA)
DMEM	Gibco	Darmstadt
FCS (Heat Inactivated, EU Approved)	Invitrogen	Darmstadt
Fibronektin	Sigma-Aldrich	München
Goat anti-Mouse POD Antikörper	Jackson-Immuno	Suffolk (UK)
HEPES	Sigma-Aldrich	München
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin
RPMI 1640	Biochrom	Berlin
Taq DNA Polymerase	Segenetic	Borken
Taq DNA Polymerase Buffer A+	Segenetic	Borken

9 Literaturverzeichnis

- (1) Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22 (10): 1276-1312
- (2) Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, et al. (1998) Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43 (1): 128-133
- (3) Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, et al. (1999) Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44 (4): 534-541
- (4) Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, et al. (2004) Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29 (3): 179-187
- (5) Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, et al. (2005) Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128 (4): 907-921
- (6) Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, et al. (2005) Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128 (4): 907-921
- (7) Bachem MG, Zhou Z, Zhou S, Siech M (2006) Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 21 Suppl 3: S92-6
- (8) Bachem MG, Zhou S, Buck K, Schneiderhan W, Siech M (2008) Pancreatic stellate cells--role in pancreas cancer. *Langenbecks Arch.Surg.* 393 (6): 891-900
- (9) Balut CM, Hamilton KL, Devor DC (2012) Trafficking of intermediate (KCa3.1) and small (KCa2.x) conductance, Ca(2+)-activated K(+) channels: a novel target for medicinal chemistry efforts? *ChemMedChem* 7 (10): 1741-1755
- (10) Blaine SA, Ray KC, Branch KM, Robinson PS, Whitehead RH, Means AL (2009) Epidermal growth factor receptor regulates pancreatic fibrosis. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 297 (3): G434-41
- (11) Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA, Fay FS (1991) Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* 254 (5032): 703-706
- (12) Cain RJ, Ridley AJ (2009) Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol.Cell.* 101 (1): 13-29
- (13) Casini A, Galli A, Pignatola P, Frulloni L, Grappone C, Milani S, et al. (2000) Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J.Pathol.* 192 (1): 81-89
- (14) Chen L, Iijima M, Tang M, Landree MA, Huang YE, Xiong Y, et al. (2007) PLA2 and PI3K/PTEN pathways act in parallel to mediate chemotaxis. *Dev.Cell.* 12 (4): 603-614

- (15) Chigurupati S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, et al. (2010) Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res.* 70 (1): 418-427
- (16) Cuddapah VA, Turner KL, Seifert S, Sontheimer H (2013) Bradykinin-induced chemotaxis of human gliomas requires the activation of KCa3.1 and ClC-3. *J.Neurosci.* 33 (4): 1427-1440
- (17) Dreval V, Dieterich P, Stock C, Schwab A (2005) The role of Ca²⁺ transport across the plasma membrane for cell migration. *Cell.Physiol.Biochem.* 16 (1-3): 119-126
- (18) Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Deucker S, Sauliunaite D, Streit S, et al. (2009) Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia* 11 (5): 497-508
- (19) Erkan M, Weis N, Pan Z, Schwager C, Samkharadze T, Jiang X, et al. (2010) Organ-, inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells. *Mol.Cancer.* 9: 88-4598-9-88
- (20) Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, et al. (2012) StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* 61 (2): 172-178
- (21) Fang C, Illingworth CD, Qian L, Wormstone IM (2013) Serum deprivation can suppress receptor-mediated calcium signaling in pterygial-derived fibroblasts. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 54 (7): 4563-4570
- (22) Farooqi AA, Waseem S, Riaz AM, Dilawar BA, Mukhtar S, Minhaj S, et al. (2011) PDGF: the nuts and bolts of signalling toolbox. *Tumour Biol.* 32 (6): 1057-1070
- (23) Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA (2012) The pancreas cancer microenvironment. *Clin.Cancer Res.* 18 (16): 4266-4276
- (24) Froeling FE, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, et al. (2011) Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt-beta-catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 141 (4): 1486-97, 1497.e1-14
- (25) Gao YD, Hanley PJ, Rinne S, Zuzarte M, Daut J (2010) Calcium-activated K(+) channel (K(Ca)3.1) activity during Ca(2+) store depletion and store-operated Ca(2+) entry in human macrophages. *Cell Calcium* 48 (1): 19-27
- (26) Haanes KA, Schwab A, Novak I (2012) The P2X7 receptor supports both life and death in fibrogenic pancreatic stellate cells. *PLoS One* 7 (12): e51164
- (27) Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, et al. (1999) Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am.J.Pathol.* 155 (4): 1087-1095
- (28) Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, et al. (2012) Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 421 (2): 349-354
- (29) Harshey RM (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol.Microbiol.* 13 (3): 389-394
- (30) Heldin CH (1992) Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 11 (12): 4251-4259

- (31) Herbst RS (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 59 (2 Suppl): 21-26
- (32) Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004) MAP kinases and cell migration. *J.Cell.Sci.* 117 (Pt 20): 4619-4628
- (33) Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K (1999) In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 29 (6): 1760-1767
- (34) Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J (1997) A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94 (21): 11651-11656
- (35) Jager H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S (2004) Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol.Pharmacol.* 65 (3): 630-638
- (36) Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S (2002) Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut* 51 (4): 579-584
- (37) Jaster R (2004) Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol.Cancer.* 3: 26
- (38) Kadono G, Ishihara T, Yamaguchi T, Kato K, Kondo F, Naito I, et al. (2004) Immunohistochemical localization of type IV collagen alpha chains in the basement membrane of the pancreatic duct in human normal pancreas and pancreatic diseases. *Pancreas* 29 (1): 61-66
- (39) Kobayashi T, Sokabe M (2010) Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions. *Curr.Opin.Cell Biol.* 22 (5): 669-676
- (40) Kohler R, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, et al. (2003) Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 108 (9): 1119-1125
- (41) Krause M, Gautreau A (2014) Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 15 (9): 577-590
- (42) Kuras Z, Yun YH, Chimote AA, Neumeier L, Conforti L (2012) KCa3.1 and TRPM7 channels at the uropod regulate migration of activated human T cells. *PLoS One* 7 (8): e43859
- (43) Le Clainche C, Carlier MF (2008) Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol.Rev.* 88 (2): 489-513
- (44) Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363 (9414): 1049-1057
- (45) Lindemann O, Umlauf D, Frank S, Schimmelpfennig S, Bertrand J, Pap T, et al. (2013) TRPC6 regulates CXCR2-mediated chemotaxis of murine neutrophils. *J.Immunol.* 190 (11): 5496-5505
- (46) Lonardo E, Frias-Aldeguer J, Hermann PC, Heeschen C (2012) Pancreatic stellate cells form a niche for cancer stem cells and promote their self-renewal and invasiveness. *Cell.Cycle* 11 (7): 1282-1290

- (47) Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB (2011) Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through beta1-integrin signaling. *Cancer Res.* 71 (10): 3453-3458
- (48) Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Shimosegawa T (2008) Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 295 (4): G709-17
- (49) Mato E, Lucas M, Petriz J, Gomis R, Novials A (2009) Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *Biochem.J.* 421 (2): 181-191
- (50) Merlot S, Firtel RA (2003) Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J.Cell.Sci.* 116 (Pt 17): 3471-3478
- (51) Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, et al. (2002) Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut* 50 (4): 535-541
- (52) MG Bachem, Schmid-Kotsas A, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A (1998) Isolation, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115: 421-432
- (53) Nabi IR (1999) The polarization of the motile cell. *J.Cell.Sci.* 112 (Pt 12) (Pt 12): 1803-1811
- (54) Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA, et al. (2011) Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60 (6): 861-868
- (55) Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. (2009) Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324 (5933): 1457-1461
- (56) Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, et al. (2014) Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer.Cell.* 25 (6): 719-734
- (57) Partida-Sanchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, et al. (2001) Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat.Med.* 7 (11): 1209-1216
- (58) Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, Doherty E, McCarroll JA, Park S, et al. (2003) Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut* 52 (5): 677-682
- (59) Phillips PA, Yang L, Shulkes A, Vonlaufen A, Poljak A, Bustamante S, et al. (2010) Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107 (40): 17397-17402
- (60) Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR (2012) Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer.Cell.* 21 (3): 418-429
- (61) Ratajczak MZ, Kim C, Wu W, Shin DM, Bryndza E, Kucia M, et al. (2012) The role of innate immunity in trafficking of hematopoietic stem cells-an emerging link between activation of complement cascade and chemotactic gradients of bioactive sphingolipids. *Adv.Exp.Med.Biol.* 946: 37-54

- (62) Rebours V, Albuquerque M, Sauvanet A, Ruzniewski P, Levy P, Paradis V, et al. (2013) Hypoxia pathways and cellular stress activate pancreatic stellate cells: development of an organotypic culture model of thick slices of normal human pancreas. *PLoS One* 8 (9): e76229
- (63) Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302 (5651): 1704-1709
- (64) Robert-Koch-Institut Krebsstatistik Bauchspeicheldrüsenkrebs.
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html
- (65) Robert-Koch-Institut Krebsprävalenz in Deutschland.
http://www.krebsdaten.de/Krebs/SharedDocs/Downloads/Krebspraevalenz.pdf?__blob=publicationFile
- (66) Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A (2011) Chemotaxis in cancer. *Nat.Rev.Cancer.* 11 (8): 573-587
- (67) Sarris M, Masson JB, Maurin D, Van der Aa LM, Boudinot P, Lortat-Jacob H, et al. (2012) Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr.Biol.* 22 (24): 2375-2382
- (68) Schiffmann E, Showell HV, Corcoran BA, Ward PA, Smith E, Becker EL (1975) The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. *J.Immunol.* 114 (6): 1831-1837
- (69) Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, et al. (2001) Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 281 (2): C532-43
- (70) Schneider L, Cammer M, Lehman J, Nielsen SK, Guerra CF, Veland IR, et al. (2010) Directional cell migration and chemotaxis in wound healing response to PDGF-AA are coordinated by the primary cilium in fibroblasts. *Cell.Physiol.Biochem.* 25 (2-3): 279-292
- (71) Schneider SW, Pagel P, Rotsch C, Danker T, Oberleithner H, Radmacher M, et al. (2000) Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* 439 (3): 297-303
- (72) Schneiderhan W, Diaz F, Fundel M, Zhou S, Siech M, Hasel C, et al. (2007) Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. *J.Cell.Sci.* 120 (Pt 3): 512-519
- (73) Schwab A, Wojnowski L, Gabriel K, Oberleithner H (1994) Oscillating activity of a Ca(2+)-sensitive K⁺ channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J.Clin.Invest.* 93 (4): 1631-1636
- (74) Schwab A, Finsterwalder F, Kersting U, Danker T, Oberleithner H (1997) Intracellular Ca²⁺ distribution in migrating transformed epithelial cells. *Pflugers Arch.* 434 (1): 70-76
- (75) Schwab A, Schuricht B, Seeger P, Reinhardt J, Dartsch PC (1999) Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K⁺ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflugers Arch.* 438 (3): 330-337

- (76) Schwab A, Hanley P, Fabian A, Stock C (2008) Potassium channels keep mobile cells on the go. *Physiology (Bethesda)* 23: 212-220
- (77) Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, Stock C (2012) Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol.Rev.* 92 (4): 1865-1913
- (78) Sciacaluga M, Fioretti B, Catacuzzeno L, Pagani F, Bertollini C, Rosito M, et al. (2010) CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 299 (1): C175-84
- (79) Shimizu K, Kobayashi M, Tahara J, Shiratori K (2005) Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 128 (7): 2105-2118
- (80) Si H, Grgic I, Heyken WT, Maier T, Hoyer J, Reusch HP, et al. (2006) Mitogenic modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in proliferating A7r5 vascular smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.* 148 (7): 909-917
- (81) Statistisches Bundesamt Todesursachen nach ICD10.
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html;jsessionid=3CBE7DA94BC2D94E2B4C8285DC00E61D.cae3>
- (82) Stephens L, Milne L, Hawkins P (2008) Moving towards a better understanding of chemotaxis. *Curr.Biol.* 18 (11): R485-94
- (83) Storck H, Hild B, Schimmelpfennig S, Sargin S, Nielsen N, Zaccagnino A, et al. (2014) Ion channels in control of pancreatic stellate cell migration. eingereicht
- (84) Tajima N, Schonherr K, Niedling S, Kaatz M, Kanno H, Schonherr R, et al. (2006) Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1alpha and the von Hippel-Lindau protein. *J.Physiol.* 571 (Pt 2): 349-359
- (85) Tharp DL, Wamhoff BR, Turk JR, Bowles DK (2006) Upregulation of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (IKCa1) mediates phenotypic modulation of coronary smooth muscle. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 291 (5): H2493-503
- (86) Thiery JP, Duband JL, Tucker GC (1985) Cell migration in the vertebrate embryo: role of cell adhesion and tissue environment in pattern formation. *Annu.Rev.Cell Biol.* 1: 91-113
- (87) Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, et al. (2011) Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J.Clin.Oncol.* 29 (34): 4548-4554
- (88) Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, et al. (2008) Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 68 (7): 2085-2093
- (89) Wang JY, Chen BK, Wang YS, Tsai YT, Chen WC, Chang WC, et al. (2012) Involvement of store-operated calcium signaling in EGF-mediated COX-2 gene activation in cancer cells. *Cell.Signal.* 24 (1): 162-169
- (90) Wang Z, Ahmad A, Li Y, Kong D, Azmi AS, Banerjee S, et al. (2010) Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression. *Biochim.Biophys.Acta* 1806 (1): 122-130

- (91) Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y (1982) Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat.Jpn.* 58 (4-6): 837-858
- (92) Weiger MC, Vedham V, Stuelten CH, Shou K, Herrera M, Sato M, et al. (2013) Real-time motion analysis reveals cell directionality as an indicator of breast cancer progression. *PLoS One* 8 (3): e58859
- (93) Welch MD, Mullins RD (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 18: 247-288
- (94) Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2001) Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J.Biol.Chem.* 276 (34): 32040-32045
- (95) Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Fiala-Beer E, Zhang X, Yang L, et al. (2010) Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am.J.Pathol.* 177 (5): 2585-2596
- (96) Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J (2005) Cell migration in tumors. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17 (5): 559-564
- (97) Yamaguchi H, Condeelis J (2007) Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim.Biophys.Acta* 1773 (5): 642-652
- (98) Yen TW, Aardal NP, Bronner MP, Thorning DR, Savard CE, Lee SP, et al. (2002) Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* 131 (2): 129-134