

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

**Einfluss des Calcium-aktivierten Kalium-Kanals $K_{Ca3.1}$
auf die Migration von Pankreas-Sternzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Storck, Hannah Maria
aus Münster

2014

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

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II (vegetative Physiologie)

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans Oberleithner -

Referent: Univ.-Prof. Dr. Albrecht Schwab

Koreferent: Prof. Dr. Jörg Haier

ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss des Calcium-aktivierten Kalium-Kanals $K_{Ca3.1}$

auf die Migration von Pankreas-Sternzellen

Storck, Hannah Maria

Pankreas-Sternzellen spielen eine zentrale Rolle in der Progression des duktales Pankreasadenokarzinoms. Angeregt durch Mediatoren der Tumorzellen gehen sie von ihrem physiologisch ruhenden in einen aktivierten Zustand über. Die aktivierten Sternzellen sind nun ihrerseits in der Lage, auf die Tumorzellen zu wirken. Über Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflussen sie z.B. deren Proliferation und Metastasierung und verursachen die charakteristische Desmoplasie des Pankreaskarzinoms.

Sternzellen sind hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Ionenkanälen, die eine wichtige Rolle bei der Progression von Tumoren einnehmen, bislang vollkommen uncharakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sternzellen erstmals auf die Expression von $K_{Ca3.1}$ -Kanälen untersucht. Der Kanal wurde mittels Western-Blot, Immunfluoreszenz und Patch-Clamp-Analyse nachgewiesen. Sein Wirken auf den Ca^{2+} -Haushalt und die Migrationsfähigkeit von Sternzellen wurde untersucht.

In „normal“ kultivierten Zellen scheint der Kanal keine besondere Rolle zu spielen, seine Hemmung mittels des Kanalblockers TRAM-34 wirkte sich weder auf den Ca^{2+} -Haushalt, noch auf die migratorische Fähigkeit der Zellen aus. Im Gegensatz dazu zeigte die Blockade in Sternzellen, die vor den Untersuchungen mit Überständen von Karzinomzellen behandelt und dadurch aktiviert wurden, einen deutlichen Effekt: Die durch Aktivierung erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sank unter Einfluss von TRAM-34 erheblich ab. Dies verdeutlicht den starken Einfluss des $K_{Ca3.1}$ -Kanals auf den Ca^{2+} -Haushalt aktivierter Sternzellen. In den Migrationsversuchen wurde beobachtet, dass die Geschwindigkeitserhöhung der aktivierten Sternzellen unter Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals nicht mehr vorhanden war. Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal nimmt folglich Einfluss auf die stimulatorische Fähigkeit des konditionierten Karzinomzell-Mediums.

Die Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz des Kanals hinsichtlich der Interaktion zwischen Sternzellen und Pankreaskarzinomzellen. Je mehr über Ionenkanäle in Sternzellen und deren Einfluss auf die Tumoraktivität bekannt wird, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit, in Zukunft über diese Einfluss auf die Entwicklung des Karzinoms nehmen zu können.

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2014

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel: „Einfluss des Calcium-aktivierten Kalium-Kanals $K_{Ca}3.1$ auf die Migration von Pankreas-Sternzellen“ im Institut für Physiologie II, Universitätsklinikum Münster unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Albrecht Schwab

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

Münster, den 22.07.2013

Hannah Maria Storck

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2 Pankreas-Sternzellen.....	3
1.2.1 Sternzellen im physiologischen Kontext.....	3
1.2.2 Aktivierte Sternzellen.....	5
1.3 Die Sternzellen und das Pankreaskarzinom im Zusammenhang.....	6
1.4 Ionentransportproteine, Migration und der Calcium-aktivierte Kalium- Kanal $K_{Ca3.1}$	7
1.5 Zielsetzung.....	12
2. Material & Methoden	14
2.1 Zellkultur.....	14
2.2 Western Blot.....	14
2.2.1 Durchführung.....	15
2.3 Immunfluoreszenz.....	18
2.3.1 Durchführung.....	18
2.4 Patch-Clamp-Analyse.....	19
2.4.1 Durchführung.....	21
2.5 Calcium-Messung mittels Fura-2.....	22
2.5.1. Durchführung.....	23
2.5.2 Messungen unter Zugabe des $K_{Ca3.1}$ -Kanalblockers TRAM-34.....	25
2.5.3 Messungen unter Superfusion einer Hochkalium-Lösung & TRAM-34.....	26
2.6 Migrationsexperimente.....	26
2.6.1 Durchführung.....	26
2.6.2 Migration unbehandelter und stimulierter Pankreas-Sternzellen.....	28
2.6.3 Migration unbehandelter und stimulierter Pankreas-Sternzellen unter Zugabe des $K_{Ca3.1}$ -Kanalblockers TRAM-34.....	29
2.7 Statistische Analyse.....	29

3. Ergebnisse	30
3.1 Nachweis der Expression des $K_{Ca}3.1$	30
3.1.1 Western-Blot-Analyse.....	30
3.1.2 Immunfluoreszens.....	30
3.2 Funktioneller Nachweis des $K_{Ca}3.1$ -Kanals mittels Patch-Clamp-Analyse.....	31
3.3 Calcium-Messungen mittels Fura-2	33
3.3.1 Calcium-Haushalt der Sternzellen unter Zugabe des $K_{Ca}3.1$ - Kanalblockers TRAM-34.....	33
3.3.2 Calcium-Haushalt der Sternzellen unter Superfusion einer Hochkalium- Lösung, Zugabe des $K_{Ca}3.1$ -Kanalblockers TRAM-34.....	37
3.4 Migrationsexperimente.....	39
3.4.1 Migration unbehandelter und stimulierter Pankreas-Sternzellen.....	39
3.4.2 Migration unbehandelter und stimulierter Pankreas-Sternzellen unter Zugabe des $K_{Ca}3.1$ -Kanalblockers TRAM-34.....	44
4. Diskussion	49
4.1 Einleitung.....	49
4.2 Untersuchung der Expression und Aktivität des $K_{Ca}3.1$	49
4.3 Calcium-Messungen.....	51
4.4 Migrationsexperimente.....	54
4.5 Ergebnisse im Zusammenhang.....	58
5. Literaturverzeichnis	59
6. Danksagung	67
7. Lebenslauf	68
8. Anhang: Materialienliste	I

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Jeder vierte Todesfall in Deutschland geht auf maligne Tumoren zurück. Zu den zehn häufigsten Tumoren zählt das Pankreaskarzinom. Weniger als 8% der Erkrankten in Deutschland überleben ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung die nächsten fünf Jahre. Damit hat das Pankreaskarzinom die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen^{76 92}.

Das Pankreas (Bauchspeicheldrüse) ist eine retroperitoneal im Oberbauch gelegene Drüse. Funktionell lässt es sich in zwei Teile gliedern: Zum einen sezerniert es Hormone (endokriner Anteil, 2%), die den Kohlenhydratstoffwechsel regulieren. Zum anderen gibt es als wichtigste Verdauungsdrüse des Körpers eine Vielzahl von Enzymen an den Dünndarm ab (exokriner Anteil, 98%). Letztere werden von sogenannten Azinus-Zellen in die Ausführungsgänge (Ducti pancreatici) sezerniert. Mehr als 80% der im Pankreas beschriebenen Neoplasien erscheinen phänotypisch als duktale Zellen. Sie werden deshalb als „duktales Adenokarzinom des Pankreas“ (engl.: pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC, allg.: Pankreaskarzinom) bezeichnet³⁶.

Aus welchen Ursprungszellen sich das Pankreaskarzinom differenziert, ist ungeklärt. Es werden duktale Zellen und Azinus-Zellen, aber auch Insel- und Stammzellen als mögliche Differenzierungs-Quellen diskutiert. Vor allem intraepitheliale Neoplasien (PanINs) scheinen zur Ausbildung des Tumors zu führen^{46 74}. In mehr als 60% der Fälle finden sich die Pankreaskarzinome im Pankreaskopf. Das Corpus und die Cauda pancreatici sind in 18% betroffen, die verbleibenden Anteile sind diffus lokalisiert¹⁵. Makroskopisch erscheint das Pankreaskarzinom als stark sklerotische Masse mit schlecht abzugrenzenden Rändern. Häufig sind Nachbargewebe, inklusive Lymphknoten, Milz und Peritonealhöhlen mit eingenommen, Metastasen finden sich vor allem in Leber und Lunge. Mikroskopisch ist infiltrierendes drüsenförmiges epitheliales Tumorgewebe zu erkennen (*duktales* Phänotyp)³⁴.

Der Tumor ist von einem ausgeprägten Bindegewebsstroma umgeben. Dieses entsteht durch die desmoplastische Reaktion zwischen den malignen Zellen und den Bestandteilen des umgebenden Stromas. Besonders eine Zellart des Stromas interagiert ausgesprochen stark mit den Tumorzellen und nimmt dadurch großen Einfluss auf die Desmoplasie: die Pankreas-Sternzellen⁷⁰.

Molekularpathologisch sind im Pankreaskarzinom eine Vielzahl von mutierten Genen beschrieben. So wird in 90% der Fälle eine Aktivierung des Onkogens K-Ras2 festgestellt. Eine Unterdrückung der Tumorsuppressorgene p16/CDKN2A, DPC4/SMAD4 und TP53 ist ebenfalls sehr häufig beobachtet worden^{34 57}.

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist weitgehend unbekannt, allerdings sind Alkohol- und Nikotin-Abusus sowie Fettleibigkeit als Risikofaktoren eingestuft. Auch genetische Prädisposition kann zum Pankreaskarzinom führen, durch Verwandtschaft ersten Grades mit Erkrankten zählt man zur Risikogruppe. Verschiedene Erkrankungen, z.B. chronische Pankreatitis und Diabetes mellitus (Typ 2), begünstigen die Entstehung¹.

Die Erkrankung verläuft lange Zeit symptomlos. Aus diesem Grund wird die Diagnose meist erst zu einem Zeitpunkt gestellt, an dem eine kurative Therapie bereits nicht mehr möglich ist. Die ersten Krankheitsanzeichen sind häufig unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust und abdominale Schmerzen bzw. Rückenschmerzen. Bedingt durch das invasive Wachstum der Tumorzellen folgt häufig eine Verengung der Gallengänge, die sich symptomatisch als Ikterus äußert. Veränderungen im exokrinen Gewebe können Verdauungsstörungen zur Folge haben. Die Diagnosestellung erfolgt durch abdominelle Sonographie, Computertomographie und/oder endoskopische retrograde Cholangio-pankreatikographie. Zur Bestätigung der Diagnose wird häufig die Bestimmung des Tumormarkers CA 19-9 herangezogen²³. Neuere Forschungen beschäftigen sich damit, ob Mesothelin, ein Glykoprotein, das von Pankreaskarzinomzellen übermäßig exprimiert wird und sich im Plasma nachweisen lässt, eine frühzeitige Erkennung des PDAC erlaubt¹⁰⁸.

Potenziell kurativ ist allein die chirurgische Entfernung (R0-Resektion), diese ist jedoch nur bei 20% der Patienten durchführbar. So erfolgt meist eine palliative Therapie. In

einigen Fällen können primär irresektable Tumoren durch neoadjuvante Radiochemotherapie resezierbar gemacht werden. Da die Rezidivrate (lokal oder als Fernmetastase) jedoch post-operativ sehr hoch ist, erfolgt im Anschluss eine adjuvante Therapie: Erprobt sind Kombinationen aus Radiochemotherapie, sowie alleinige Chemotherapien. Nach aktuellen Erkenntnissen sind letztere am erfolgreichsten und auch die Therapie der Wahl bei fortgeschrittenen, inoperablen Tumorleiden. Eine Drainage der Gallenwege und eine Schmerztherapie sind ebenfalls Teil der palliativen Therapie^{51 106}.

1.2 Pankreas-Sternzellen

Das Pankreaskarzinom ist neben seiner schnellen Progression und der späten Diagnose durch die ausgeprägte desmoplastische Reaktion gekennzeichnet. Es wird eine Akkumulation der Proteine der Extrazellulären Matrix (EZM) beobachtet, bedingt durch einen Verlust der Balance zwischen deren Auf- und Abbau.

Das umgebende Gewebe eines Tumors spielt eine aktive Rolle in der Progression, Metastasierung und Therapieresistenz eines Tumors. Es bietet den Tumorzellen ein Gerüst und schützt es vor Angriffen des Immunsystems, wodurch Wachstum, Differenzierung, Überleben und Beweglichkeit der Tumorzellen unterstützt werden^{10 33}. Deshalb ist die Entstehung und Zusammensetzung dieses Gewebes inzwischen ebenso von Interesse wie die Molekularbiologie der Tumorzellen selbst^{16 56}. So wurde auch der zelluläre Mechanismus hinter der desmoplastischen Reaktion des Pankreaskarzinoms in den vergangenen Jahren genauer untersucht. Es stellte sich heraus, dass die *Sternzellen* des Pankreas (Pancreatic Stellate Cells, PaSCs) die Hauptakteure dieser Reaktion sind⁵.

1.2.1 Sternzellen im physiologischen Kontext

Pankreas-Sternzellen sind ortsständige Zellen des exokrinen Pankreas. Sie wurden von Watari et al. 1982 durch Vitamin-A-Gabe an Ratten entdeckt: Vitamin-A akkumuliert in Fett-Tröpfchen und lässt diese autofluoreszieren. Im Zytoplasma von Sternzellen kommen solche Fett-Tröpfchen vor, und so wurden sie für Watari et al. erstmals

sichtbar ¹⁰⁴. Analog zu den Schwester-Zellen in der Leber (Ito-Zellen) wurde ein Mitwirken der pankreatischen Sternzellen bei der Fibrose des Pankreas vermutet. Diese spielt eine zentrale Rolle bei vielen Erkrankungen des Pankreas, wie z.B. der Chronischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom. Es dauerte viele Jahre, ehe für diese Vermutungen experimentelle Grundlagen geschaffen werden konnten: 1998 wurden erstmals Sternzellen aus tierischem Pankreas-Gewebe (Ratte) und menschlichem Pankreas-Gewebe isoliert und anschließend kultiviert ^{3 8}.

Es folgte eine genauere Charakterisierung der Sternzellen: Sie sind neben den Azinuszellen im Pankreasgewebe lokalisiert, ihren Namen tragen sie aufgrund ihrer langen Zellfortsätze, mit denen sie die Azinuszellen „umarmen“. Auch periductal und perivaskulär sind sie zu finden.

Einem spezifischen Zelltypen lassen sich die Sternzellen nicht zuordnen. Vielmehr sind sie, rückführend auf die Expression von verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts (Intermediärfilamenten), die alle auf unterschiedliche Zelltypen schließen lassen, offenbar „multipotent“: Desmin ist typisch für Muskelzellen, Vimentin kommt üblicherweise in Fibroblasten und Endothelzellen vor, GFAP ist charakteristisch für Astrozyten. Alle wurden in Sternzellen nachgewiesen und lassen ein breites Spektrum von möglichen Eigenschaften offen ^{3 8 17 68}.

Sternzellen nehmen physiologisch Einfluss auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM). Sie sezernieren beispielsweise Matrixmetalloproteasen (MMPs) und deren Gegenspieler (TIMPs), Enzyme, die den Auf- und Abbau von EZM-Proteinen beeinflussen ⁷². Auch Kollagen als wichtigste Komponente der EZM wird von den Sternzellen synthetisiert ⁸. Neben dem Einfluss auf die EZM konnte beobachtet werden, dass die Sternzellen geschädigte und nekrotische Zellen in ihrer Umgebung phagozytierten. Eine genauere Charakterisierung dieser möglicherweise immunologischen Funktion der Sternzellen erfolgt aktuell. Ebenfalls wird derzeit ein Einfluss der Sternzellen auf die Regulation der Cholecystokinin-induzierten Abgabe des pankreatischen Verdauungsssekrets an den Dünndarm untersucht. Als weiteres Charakteristikum der Sternzellen wird eine möglicherweise vorhandene Funktion als Progenitor-Zelle diskutiert ⁷.

1.2.2 Aktivierte Sternzellen

Beeinflusst durch verschiedene Faktoren können die Sternzellen von ihrem sog. ruhenden Zustand in einen aktivierten Zustand übergehen: Sie verändern sich sowohl in ihrem Erscheinungsbild als auch funktionell: Morphologisch ist zu beobachten, dass sich der Kern vergrößert und die Masse des endoplasmatischen Retikulums zunimmt. Die Anzahl der beschriebenen Fett-Tröpfchen nimmt hingegen ab. Funktionell geht die Aktivierung der Sternzellen mit einer gesteigerten Produktion von EZM-Komponenten (Kollagen I und III, Fibronectin, Laminin) einher. Außerdem exprimieren die Zellen fortan das zytoskelettale Protein alpha-smooth-muscle-actin (α -SMA), weshalb sie auch als Myofibroblasten-ähnliche Zellen bezeichnet werden^{8 30}. Neben der Freisetzung von EZM-Komponenten sezernieren aktivierte Sternzellen weiterhin MMPs und TIMPs und sind phagozytotisch aktiv. Über diese Eigenschaften hinaus proliferieren sie stark und migrieren schneller als inaktive Sternzellen^{24 73 90 101}.

Von besonderem Interesse sind die Faktoren, die zur Aktivierung der Sternzellen führen. Es sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden:

1. Aktivierung durch Alkohol und dessen Metaboliten: Ethanol und sein Abbauprodukt Acetaldehyd aktivieren die Sternzellen zum einen auf direktem Wege, zum anderen durch den resultierenden oxidativen Stress in der Zelle⁶.
2. Aktivierung durch Zytokine und Wachstumsfaktoren: Werden umgebende Zellen der Sternzellen geschädigt, z.B. durch Alkohol oder Entzündungsprozesse (Pankreatitis), sezernieren diese eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Bei den geschädigten Zellen kann es sich z.B. um Azinus-Zellen oder Zellen der Ausführungsgänge handeln. Aber auch Leukozyten oder Tumorzellen sind in der Lage, die Sternzellen durch Mediator-Freisetzung zu aktivieren. Die aufgezählten Zellen sezernieren beispielsweise die Wachstumsfaktoren TGF- β und PDGF. Ersterer stimuliert in den Sternzellen die Synthese von EZM-Proteinen und MMPs, PDGF wirkt proliferativ. Auch die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α können von den genannten Zellen ausgeschüttet werden. Sie aktivieren ebenfalls die Kollagen-Synthese und können zudem die Expression von α -SMA steigern^{4 29 78}.

Neben diesen *parakrinen* Wegen ist ein weiterer Mechanismus der Aktivierung nachgewiesen worden:

3. Autokrine Aktivierung: Sternzellen sind in der Lage, Mediatoren zu sezernieren, durch die sie selbst auf autokrinem Weg aktiviert werden. Dazu zählen verschiedene Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren, z.B. TGF- β , Interleukine, Aktivin-A und Endothelin-1^{2 60 67 88}. Diese autokrine Aktivierungsschleife ermöglicht den Sternzellen nach initialer Aktivierung ihren Status auch ohne weitere Stimulation durch fremde Zellen aufrecht zu halten.

Alle beschriebenen Mediatoren sind exogene Faktoren. Im Zellinneren müssen die Signale der Mediatoren umgesetzt werden, um schließlich einen der o.g. Effekte zu erzeugen. Die intrazellulären Signalwege sind in den letzten Jahren zunehmend genauer untersucht worden: Im Zellinneren werden die Signale der exogenen Mediatoren z.B. häufig an sog. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) geleitet, darunter ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase), JNK (c-jun-Terminal-Kinase) und p38-Kinase. Viele weitere Signalwege sind inzwischen beschrieben. Ihre Aktivierung führt über Veränderungen in der Gen-Expression zu den oben beschriebenen Prozessen (z.B. Proliferation, Protein-Synthese etc.)⁴².

1.3 Die Sternzellen und das Pankreaskarzinom im Zusammenhang

Die Sternzellen spielen eine wichtige Rolle in der Progression des Pankreaskarzinoms: Sie nehmen Einfluss auf die Ausbildung des charakteristischen fibrotischen Stomas der Karzinomzellen. Die von letzteren freigesetzten Mediatoren TGF- β_1 und FGF-2 regen die Kollagen-Produktion in den Sternzellen an, dieses ist einer der Hauptbestandteile des Stomas^{5 9 38}.

Auch über die fibrotische Reaktion hinaus stehen die Sternzellen in enger Interaktion mit den Tumorzellen. Sie beeinflussen sich gegenseitig in vielen Prozessen: Beispielsweise stimuliert das von den Sternzellen sezernierte PDGF die Proliferation der Tumorzellen. Des Weiteren sind sie in der Lage, die Apoptose der Tumorzellen zu unterdrücken. Die Proliferation der Sternzellen wiederum wird durch Mediatoren der

Tumorzellen angeregt (vermittelt über ERK-1/2 und COX-2) ^{112 115 116}. Gegenseitig üben beide Zellarten einen fördernden Effekt auf die Zellmigration aus, die Tumorzellen werden durch die Sternzellen zur Invasion in das umliegende Gewebe stimuliert ^{102 103}. Auch die Metastasierung der Tumorzellen wird von den Sternzellen unterstützt. Letztere stimulieren zudem die Angiogenese des Tumors ¹¹². Die Interaktion zwischen den Zellen ist in Abbildung 1 zusammenfassend dargestellt.

Die zentrale Rolle der Sternzellen in der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms ist offensichtlich. Je mehr über die Interaktionen zwischen ihnen und den Tumorzellen bekannt wird, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, über diese in die Tumorprogression eingreifen zu können.

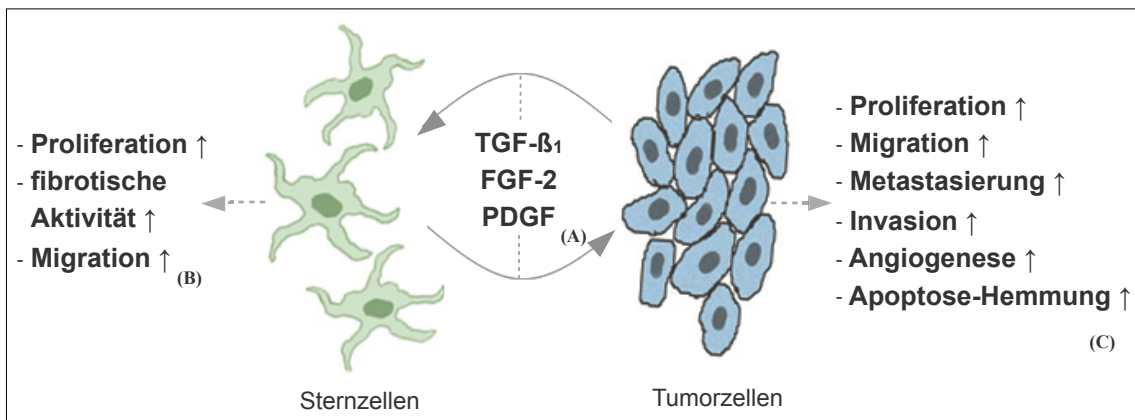


Abb. 1 (nach Omary et al. 2007): Interaktion zwischen Pankreas-Sternzellen und Pankreaskarzinomzellen. Über verschiedene Wachstumsfaktoren (A) regen sich Sternzellen und Tumorzellen gegenseitig zu zahlreichen Prozessen an (B, C).

1.4 Ionentransportproteine, Migration und der Calcium-abhängige Kalium-Kanal K_{Ca}3.1

Bisher gänzlich uncharakterisiert sind die Sternzellen hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Ionentransport-Proteinen. Dabei sind Ionenkanäle für zahlreiche zelluläre Vorgänge essentiell. Durch ihre Transportprozesse über die zelluläre Membran nehmen sie vielfältigen Einfluss auf die Zelle, z.B. auf ihr Volumen und ihr Membranpotenzial ^{35 53}. So spielen sie z.B. physiologisch und auch pathophysiologisch eine wichtige Rolle in der *Zellmigration*.

Migration bezeichnet den Prozess der aktiven Fortbewegung von Zellen im Gewebe. Sie ist wichtig für eine Vielzahl von Vorgängen im menschlichen Organismus. Physiologisch nimmt sie beispielsweise Einfluss auf die Immunabwehr, die Wundheilung und zahlreiche embryologische Abläufe^{45 50 59}. Pathophysiologisch hat die Migration vor allem in der Tumorprogression einen wichtigen Stellenwert: Die Fernmetastasierung von Tumorzellen setzt unter anderem das Ausbrechen der Zellen aus dem ursprünglichen Tumorgewebe und deren Einwanderung in Blut- und Lymphgefäße voraus. Außerdem müssen zur Versorgung des Tumors neue Blutgefäße gebildet werden. Zellmigration ist Voraussetzung für beide Prozesse^{96 113}.

Auf zellulärer Ebene charakterisiert ein sich wiederholender Ablauf von verschiedenen Vorgängen die Migration: An die initiale Polarisation der Zelle schließt sich das Vorschieben des vorderen Pols (Protrusion) an. Es folgt die Ausbildung neuer Kontaktpunkte mit der Unterlage und schließlich das Nachziehen des hinteren Zellpols (Retraktion)⁵⁴. Die morphologische Zellpolarisierung und die damit einhergehende funktionelle Asymmetrie zwischen Vorder- und Hinterseite der Zelle sind Voraussetzung für die gerichtete Bewegung: Die Vorderseite bildet sich aus einer blattartigen Membranlamelle, genannt Lamellipodium, sie gibt die Bewegungsrichtung vor und kann sich dynamisch auf- und abbauen. Der hintere Teil der Zelle (=Zellkörper und sog. Uropod) beinhaltet den Zellkern und alle weiteren Organellen.

Das zytoskelettale Grundgerüst der Zelle ist einer der Hauptakteure im Migrationsprozess. Es unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung zwischen den Polen. Im vorderen Zellteil dominiert vor allem das Strukturprotein Aktin^{13 65 75}. Über sog. fokale Kontakte (überwiegend bestehend aus Integrin), interagiert die Zelle unterschiedlich stark ausgeprägt mit der extrazellulären Matrix^{105 117}. Durch Aktinpolymerisation wird die Zellmembran im Lamellipodium nach vorn geschoben (Protrusion). Es bilden sich neue fokale Kontakte zur Matrix. Durch die folgenden (myosin-getriebenen) Filamentkontraktionen im Zellkörper, die sich über die neu ausgebildeten Kontaktstellen auf die Matrix übertragen, kann sich die Zelle nach vorne ziehen. Dies erfordert das gleichzeitige Lösen der Integrin-Matrix-Kontakte am hinteren Zellteil, damit dieser dem vorderen Teil „folgen“ kann (Retraktion)^{37 39 62}.

Diese grob dargestellten Migrationsmechanismen sind im Einzelnen sehr fein reguliert. Vor allem sind sie abhängig vom umgebenden pH-Wert und vom Zusammenspiel verschiedenster Ionenkanäle^{58 80 83 94}. Beide Parameter können direkt auf Prozesse der Migration wirken, so z.B. auf die Interaktion der Zellen mit der EZM⁹³. Alternativ können sie indirekt Einfluss auf die Migrationsvorgänge nehmen: Hier spielt die Regulation des Zellvolumens über die Verteilung von Ionen im Intra- und Extrazellularraum eine wichtige Rolle⁹⁵. pH-Wert und Ionenverteilung müssen also sehr genau kontrolliert und gesteuert werden. Dies ist wiederum die Aufgabe von Ionenkanälen und -transportern. Zahlreiche dieser Ionenkanäle und -transporter sind inzwischen bezüglich ihres Einflusses auf die Migration sehr gut beschrieben⁷⁹.

Ionenkanäle rücken hinsichtlich der Entwicklung von Tumoren in den letzten Jahren verstärkt ins Zentrum des Interesses, da sie u.A. die Tumorzellproliferation begünstigen⁴⁸. Auch im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom konnte eine Wirkung von Ionenkanälen auf die Proliferation beobachtet werden: Der *K_{Ca}3.1-Kanal* wurde in den Karzinomzellen nachgewiesen und sein Proliferations-fördernder Einfluss beschrieben⁴¹. Der Kanal gehört zu den Calcium-aktivierten Kalium-Kanälen, einer Kanal-Familie, die über Einwirkung auf das Membranpotenzial Calcium-abhängige Prozesse in erregbaren und unerregbaren Zellen beeinflussen kann. Aktiviert durch einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ermöglicht er den Ausstrom von Kalium-Ionen aus der Zelle. Die hierdurch hervorgerufene Membran-Hyperpolarisation in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotenzials hat je nach Zelltyp unterschiedliche Konsequenzen: In erregbaren Zellen werden spannungsabhängige Calcium-Kanäle durch die Hyperpolarisation von ihrer Aktivierungsschwelle entfernt, sodass die intrazelluläre Calcium-Konzentration wieder absinkt. In nicht-erregbaren Zellen konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass nach Hyperpolarisation durch den Kalium-Ausstrom die treibende Kraft für den Calcium-Einstrom gesteigert ist^{79 100}. Eingeteilt werden die Calcium-aktivierten Kalium-Kanäle in drei Untergruppen: „Large, small und intermediate conductance calcium-activated K⁺-Channels“. Zu letzteren zählt mit einer Leitfähigkeit von 20-100 pS der *K_{Ca}3.1-Kanal*⁴⁰. Der Kanal wurde bislang in einer Vielzahl von Zellen nachgewiesen, darunter Erythrozyten, Endothelzellen,

Fibroblasten, Lymphozyten, epitheliale und Tumor-Zellen. Nach seinem „Entdecker“ wird er auch Gardos-Kanal genannt, weitere Bezeichnungen sind IK_{Ca1} , SK41 und IK1. Der Kanal setzt sich aus vier, zu einem Tetramer zusammengelagerten, alpha-Untereinheiten zusammen, die jeweils sechs Transmembransegmente aufweisen (Abb. 2). Bereits ein geringer Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration aktiviert den Kanal über folgenden Mechanismus: Das Calcium-bindende Protein Calmodulin interagiert mit dem C-Terminus (Carboxyl-Ende) des Kanals. Bindet Calcium an das Calmodulin, bewirkt dies eine Konformationsänderung in allen vier Untereinheiten des $K_{Ca3.1}$ -Kanals und dadurch dessen Öffnung²⁰. Neben der Aktivierung via Calcium kann der Kanal über verschiedene Phosphorylierungswege reguliert werden, nachgewiesen sind bislang Einflüsse durch die Proteinkinasen A und C, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (indirekte Wirkung) und die Nukleotid-Diphosphat-Kinase NDPK (direkte Phosphorylierung am C-Terminus (Histidin 358)). Außerdem kann durch Modulation des Einbaus neu synthetisierter $K_{Ca3.1}$ -Kanäle bzw. ihres Abbaus aus der Membran ihr Wirken verstärkt bzw. vermindert werden. Auf Ebene der Transkription kann darüber hinaus die Expression des Kanals beeinflusst werden¹².

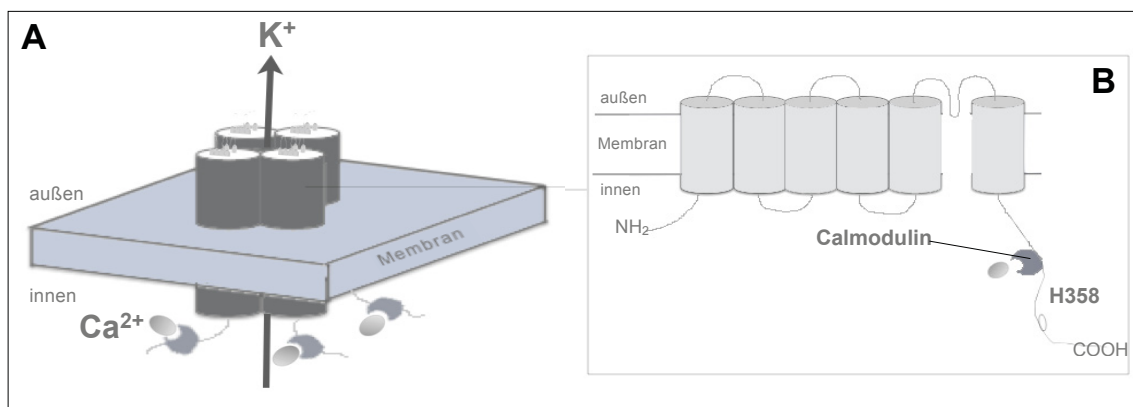


Abb. 2 (nach Wulff et al. 2010 & Franciolini et al. 2012): Schematischer Aufbau des $K_{Ca3.1}$ -Kanals. Der Kanal setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen (Homotetramer, A), die wiederum mit je 6 Transmembrandomänen die Zellmembran durchdringen (sog. alpha-Untereinheit, B). Am C-Terminus (Carboxyl-Ende) der Transmembrandomäne interagiert der Kanal mit dem Calcium-bindenden Protein Calmodulin: Bindet Calcium an das Calmodulin, bewirkt dies eine Konformationsänderung in allen vier Untereinheiten des $K_{Ca3.1}$ -Kanals. Auch über direkte Phosphorylierung (ebenfalls am C-Terminus, Histidin 358 „H358“) kann eine Konformationsänderung hervorgerufen werden.

Pharmakologisch kann die Aktivität des Kanals über eine Vielzahl von Substanzen gehemmt und aktiviert werden, was eine gute Charakterisierung der Kanalfunktion ermöglicht. Für die vorliegende Arbeit wichtige Inhibitoren sind TRAM-34, ein synthetisches Triarylmethan und das ebenfalls synthetische Clotrimazol. Als Kanal-Aktivator wird 1-EBIO eingesetzt^{97 111}.

Über seine gezielte Blockade konnten dem $K_{Ca3.1}$ -Kanal vielerlei Funktionen zugeordnet werden. Physiologisch ist er z.B. in die Volumenregulation von Erythrozyten involviert und nimmt Einfluss auf die Vasodilatation^{11 18}. Auch patho-physiologisch konnte dem $K_{Ca3.1}$ -Kanal vielerlei Mitwirken zugeschrieben werden: Durch seine dehydrierende Wirkung auf Erythrozyten, bereits bei geringem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, hat der Kanal eine zentrale Position in der Pathogenese der Sichelzellanämie¹¹. In Lymphozyten wurden durch die Dehydrierung Verformungen bis hin zur Apoptose beobachtet¹⁹. Auch die durch den Kanal stimulierte Angiogenese kann sich pathologisch auswirken²⁶. In der Niere unterstützt er die Progression von fibrotischen Reaktionen²⁷.

Darüber hinaus nimmt der $K_{Ca3.1}$ -Kanal eine besondere Stellung in der Tumorphprogression ein, die erwähnte proliferationsfördernde Wirkung im Pankreaskarzinom konnte in vielen weiteren Tumorarten nachgewiesen werden^{21 52 71}. Ebenfalls eine Rolle spielt der Kanal in den Prozessen der Migration. Seine Expression wurde in zahlreichen migrierenden Zellen belegt, und seine Hemmung durch spezifische Blocker, z.B. TRAM-34 oder Clotrimazol, führte meist zur Abnahme der migratorischen Aktivität^{12 14 44 83 85 99}. Im Zuge des Migrationsprozesses kommt es am vorderen Zellpol zur Aufnahme von Natriumchlorid (über den Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) und über den Cl^-/HCO_3^- -Austauscher). Osmotisch bedingt strömt Wasser mit in die Zelle ein, was ein Anschwellen zur Folge hat. Durch die Schwellung und die folgende Vorwärtsbewegung des Lamellipodiums wird die Zellmembran im hinteren Zellteil unter Spannung gesetzt. Dies führt hier zur Öffnung mechanosensitiver Calcium-Kanäle und einem dadurch bedingten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration im hinteren Zellteil. Dieser wiederum aktiviert nun lokal Calcium-abhängige Kalium-Kanäle, z.B. $K_{Ca3.1}$ -

Kanäle. Der folgende Kalium-Ausstrom zieht osmotisch Wasser mit sich, das Volumen im hinteren Zellteil nimmt ab, und es kommt zur Retraktion. Entscheidend ist die periodische Aktivität des Kanals, nämlich immer nur dann, wenn bedingt durch Volumenänderungen die Calcium-Konzentration zunimmt^{49 82 86}.

Durch sein Wirken auf den Calcium-Haushalt trägt der $K_{Ca3.1}$ -Kanal auch zu weiteren Calcium-abhängigen Prozessen der Migration bei, z.B. zur Polymerisation des Aktins, zur Ausbildung der fokalen Kontakte und zur Kontraktion im hinteren Zellteil im Zuge der Retraktion^{22 47 80 114}.

Die vielen Untersuchungen des $K_{Ca3.1}$ -Kanals sind deshalb bedeutsam, weil seine Regulation Einfluss auf vielerlei Prozesse nehmen kann. Die gezielte pharmakologische Angreifbarkeit des Kanals führte inzwischen zu therapeutischem Nutzen¹¹⁰.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Pankreas-Sternzellen erstmals auf die Expression des Ionenkanals $K_{Ca3.1}$ zu untersuchen und dessen Wirken in den Sternzellen, besonders in Hinsicht auf deren Migrationsverhalten zu erforschen. Parallel soll die Rolle des $K_{Ca3.1}$ -Kanals in der Interaktion der Sternzellen mit Pankreaskarzinomzellen beobachtet werden.

Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal spielt in zahlreichen Zellen und (patho-)physiologischen Prozessen eine Rolle. Sein Einfluss auf Tumorzellen des Pankreaskarzinoms wurde beschrieben. Auch der Einfluss der Sternzellen auf das Pankreaskarzinom ist bekannt, sie fördern unter anderem die Migration und Proliferation der Tumorzellen. Diese Prozesse sind ebenfalls vom $K_{Ca3.1}$ -Kanal abhängig. So ist es von Interesse, ob dieser Kanal in den Sternzellen ebenfalls exprimiert wird, und darüber hinaus, ob der Einfluss der Tumorzellen mit dem Kanal im Zusammenhang steht. Die Möglichkeit des sehr spezifischen pharmakologischen Angriffs auf den Kanal, z.B. durch den Inhibitor TRAM-34, bietet eine gute Gelegenheit, seine Aufgaben in den Sternzellen zu untersuchen und die Auswirkungen der Blockade auf die Interaktion mit den Tumorzellen zu beobachten.

So soll zunächst die Expression des Kanals in den Sternzellen durch verschiedene Methoden untersucht werden. Dabei soll auch die Expression im Zusammenhang mit Pankreasadenokarzinomzellen geprüft werden. Die Tumorzellen sezernieren in vivo zahlreiche Mediatoren, die Einfluss auf die Sternzellen nehmen. Diese Situation gilt es in vitro nachzustellen, um dadurch bedingte Veränderungen zu beobachten. Hierzu soll konditioniertes Medium von kultivierten Pankreasadenokarzinomzellen gesammelt und mit den Sternzellen zusammengebracht werden.

Im Anschluss sollen die Messungen der intrazellulären Calcium-Konzentration und die spezifische Hemmung des ggf. vorhandenen Kanals Informationen über dessen Aktivität in den Sternzellen liefern. Auch hier soll durch konditioniertes Medium der Karzinomzellen deren Wirkung auf die Sternzellen betrachtet werden.

Schließlich soll die physiologische Migration der Sternzellen mit der Migration unter Einfluss des Tumorzellüberstands verglichen werden. Darüber hinaus soll hierbei nun erstmals die Auswirkung der $K_{Ca3.1}$ -Hemmung auf das Migrationsverhalten untersucht werden.

Über eine gezielte Beeinflussung des Kanals könnte das Verhalten der Sternzellen in bestimmten Punkten gesteuert werden und damit, im weitesten Sinne, auch indirekt Einfluss auf das Pankreaskarzinom genommen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die in den Versuchen verwendeten Pankreas-Sternzellen stammen aus einer immortalisierten Zelllinie, Rlt-Psc ⁴³. Zur Stimulation dieser Zellen in den verschiedenen Versuchen dienten zwei weitere Zelllinien, isoliert aus humanen duktalem Pankreasadenokarzinomen: Panc-1 ⁵⁵ und Colo-357 ⁶⁴.

Jede Zelllinie wurde in einem spezifischem Medium in Zellkulturschalen (Falcon, 10 cm) kultiviert. Die Zusammensetzung dieser Medien ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Rlt-Psc-Medium	Panc-1-Medium	Colo-357-Medium
- DMEM & F12 im Verhältnis 1:1 - 10% FCS	- DMEM - 10% FCS	- DMEM & RPMI im Verhältnis 1:1 - 10% FCS

Tab. 1: Zusammensetzung der Zell-Kultur-Medien

Die Zelllinien wurden spätestens alle vier Tage subkultiviert (je nach Konfluenz des Zellrasens). Hierfür wurde zunächst das alte Medium aus der Kulturschale abgesaugt und die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Anschließend wurden mit Hilfe von Trypsin (0,05%) und EDTA (0,02%) die Adhäsion am Untergrund und die Zell-Zell-Kontakte gelöst. Die gelösten Zellen wurden nun in frischem Medium neu ausgesät und unter optimalen Bedingungen im CO₂-Inkubator (5% CO₂) bis zur maximal siebten Passage weiter kultiviert.

Das konditionierte Medium der Karzinomzellen wurde nach 72 Stunden Kultur durch Abnahme des Mediums von Colo-357- bzw. Panc-1-Zellen bei ca. 80% konfluentem Zellrasen gewonnen.

2.2 Western Blot

Zum Nachweis des K_{Ca}3.1-Kanals wurde die Methode des Western Blots herangezogen. Die Durchführung gliedert sich in mehrere Teilschritte, die im Folgenden erläutert werden.

2.2.1 Durchführung

Lysat-Herstellung

Um einen Proteinnachweis durchführen zu können, musste zunächst das Gesamtprotein aus den zu untersuchenden Zellen gewonnen werden. Hierzu wurde aus einer zu 80% konfluent bewachsenen Zellkulturschale ein Proteinlysate hergestellt: Zunächst wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen in einem dreigängigen Waschschrift mit kaltem Phosphatpuffer (PBS, 4°C) gewaschen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

500 µl eines Lyse-Puffers (Zusammensetzung s. Tab. 2) wurden auf die Zellen gegeben, diese mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Homogenisieren der Zellen wurde das Lysat mittels einer Kanüle drei mal auf- und abgezogen. Anschließend wurde die Probe bei 4°C für 30 Minuten auf einem Schüttler lysiert. Nach abschließender Zentrifugation (5 Minuten, 4°C, 13.000 U/Min) erhielt man so die im Überstand gelösten Proteinbestandteile der Zellen. Die Bestimmung der Gesamtprotein-Menge erfolgte photometrisch mit dem „BCA Protein Assay Kit“.

50 mM	Tris-HCl pH 7,6
0,15M	NaCl
10 mM	Nonidet-P40
3,5 mM	SDS (Natriumdodecylsulfat)
10%	Natrium-Deoxycholat
1 Tabl.	PhosSTOP Roche (auf 10 ml Puffer)
1 Tabl.	CompleteMini Roche (auf 10 ml Puffer)

Tab. 2: Zusammensetzung des Ripa-Lyse-Puffers

SDS-Polyacrilamidgelelektrophorese (SDS-Page)

In diesem Schritt wurden die Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Zunächst wurde im BIORAD-Gießstand ein Sammelgel entsprechend der Zusammensetzung in Tabelle 3 gegossen. Zur Glättung der Oberfläche wurde es mit Butanol überschichtet, welches nach 30-minütiger Auspolymerisation wieder entfernt wurde. Es folgte die Überschichtung mit dem Sammelgel, in das ein Zehn-Taschen-Gelkamm gesteckt wurde. Nach erneuter Auspolymerisation konnte das Gel nun mit

den Protein-Proben und einem Größenmarker (Thermo Scientific) befüllt werden. Die Proben wurden zuvor mit einem Auftragspuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Eingespannt in eine SDS-Elektrophoresekammer und umgeben von einem Laufpuffer (s. Tab. 4) wurde nun über dem Gel ein elektrisches Feld angelegt (80 V). Der Laufpuffer, der Auftragspuffer und das Gel enthielten SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches Detergenz, das die Proteine im Lysat gleichmäßig negativ auflud. Bedingt durch die angelegte Spannung wanderten die negativ geladenen Proteine nun ihrer Größe entsprechend unterschiedlich schnell vom Minus- zum Plus-Pol. (Größere Proteine können schwerer durch die Gel-Maschen wandern als kleinere.)

	5% Sammelgel	10% Trenngel
Aqua bidest.	1,3 ml	1,25 ml
Rotiphorese-Gel A	0,375 ml	1,62 ml
Rotiphorese-Gel B	0,15 ml	0,67 ml
Tris/ SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,5 ml (5 M)	1,3 ml (1,5 M)
10% APS (Ammoniumpersulfat)	25 µl	25 µl
Temed	2,5 µl	3,75 µl

Tab. 3: Zusammensetzung des Sammelgels und des Trenngels

Elektrophoretischer Transfer mittels TankBlot-Verfahren (Blotting)

In diesem Versuchsschritt wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurde das Gel luftblasenfrei auf die zuvor in Methanol aktivierte Membran gelegt, von in Transferpuffer (s. Tab. 4) getränkten Filterpapieren umschlossen, und schließlich in die ebenfalls mit Transferpuffer gefüllte Transferbox eingespannt. Bei konstanter Spannung von 20 V wurden die Proteine über Nacht auf die PVDF-Membran transferiert.

Transferpuffer	Laufpuffer	TBS-T
10 mM Tris	4 mM Tris	1,37 mM NaCl
100 mM Glycin	200 mM Glycin	200 mM Tris
10 % Methanol	1 % SDS	0,1% Tween 20
pH 8,0	pH 8,3	pH 6,7

Tab. 4: Eingesetzte Pufferlösungen

Detektion der Proteine durch spezifische Antikörper und Auswertung

Prinzip

Das spezifische Antigen-Muster eines jeden Proteins ermöglicht dessen Detektion mittels Antikörpern. An das zu detektierende Protein bindet ein spezifischer Primärantikörper, der wiederum durch einen Zweitantikörper nachgewiesen wird. Letzterer ist mit einem Enzym konjugiert (HRP-Meerrettich-Peroxidase), das die Oxidation von Luminol katalysiert. Diese Oxidation wird durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Färbung

Zunächst mussten unspezifische Bindungsstellen der Proteine durch eine Blockierlösung (5% Magermilchpulver in Tris buffered saline Tween, TBS-T, s. Tab. 4) 60 Minuten lang bei Raumtemperatur abgesättigt werden. Danach konnte die Membran mit einem spezifischen Primärantikörper gegen das nachzuweisende Protein, in diesem Fall K_{Ca}3.1 (s. Tab. 5), inkubiert werden: Der verdünnte Antikörper wurde zusammen mit der Membran in eine Kunststoff-Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am Folgetag wurden ungebundene Erstantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt, im Anschluss erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper bei Raumtemperatur. Auch nach dieser Inkubation wurde die Membran dreimal je 15 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Detektion

Im letzten Schritt wurde die Membran fünf Minuten lang mit Luminol (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate) inkubiert. Durch die ablaufende Chemolumineszenz-Reaktion konnten die Proteine in einem Gel-Dokumentations-System (BIORAD) sichtbar gemacht und detektiert werden.

Die entstandenen Bandenmuster wurden mit Hilfe des PC-Programms Quantity One densitometrisch ausgewertet. Durch Vergleich mit Proteinbanden eines sog. House-keeping-Proteins (hier: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) konnten die Ergebnisse untereinander verglichen werden: Housekeeping-Proteine werden unabhängig von regulatorischen Einflüssen exprimiert. Setzt man das zu untersuchende

Zielprotein ins Verhältnis zum Housekeeping-Protein, wird ein quantitativer Vergleich zwischen verschiedenen Proben möglich.

	Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)
K _{Ca} 3.1	Rabbit anti-K _{Ca} 3.1 (1:2000)	Goat-anti Rabbit POD (1:1000)
GAPDH	Mouse anti-GAPDH (1:3000)	Goat-anti Mouse POD (1:100000)

Tab. 5: Zum Western Blot eingesetzte Antikörper und deren Konzentration (verdünnt in 5% Magermilchpulver in TBS-T)

2.3 Immunfluoreszenz, durchgeführt von Sarah Sargin

Die Immunfluoreszenz ermöglicht, ähnlich wie der Western Blot, den Nachweis von Proteinen über die Bindung spezifischer Antikörper. Im Gegensatz zum Western Blot werden hier jedoch die Zellen nicht lysiert, sondern man arbeitet mit unbeschädigten Zellen, an denen die räumliche Verteilung des nachzuweisenden Proteins bildlich dargestellt wird.

2.3.1 Durchführung

Auf mit verdünnter Basalmembran (1:10 in RPMI, Zusammensetzung der Basalmembran-Beschichtung s. Tab. 8) beschichteten Gläschen (Assiston, 20 mm) wurden die Sternzellen im Rlt-Psc-Medium ausgesät. Die Zellen wurden nach dreimaligem Waschen in PBS (3,5%, 4°C) eine Stunde lang, ebenfalls in PBS, fixiert. Nach 10-minütiger Inkubation mit 100 mM Glycin/PBS (0,75 g/ 100 ml) und erneutem Waschen konnte die Zellmembran permeabilisiert werden. Dieser Schritt ist deshalb wichtig, da erst eine perforierte Membran das Eindringen der Antikörper in die Zelle erlaubt und dadurch dessen anschließendes Binden an die intrazellulär gelegenen Strukturen des K_{Ca}3.1-Kanals ermöglicht. Die Permeabilisierung erfolgte durch 0,5% Triton/ 1% SDS/ PBS für 10 Minuten, anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen. Analog zur Methode des Western Blots mussten unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zunächst mit einem Blockierungs-Reagenz (10% Ziegennormalserum) abgesättigt werden. Danach erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Erstantikörper (s. Tab. 6),

nach fünfmaligem Waschen in PBS jene mit dem Zweitantikörper (45 Minuten). Das an den Zweitantikörper gekoppelte Fluorochrom wurde nach erneutem Waschen, Fixieren und Eindecken der Zellen mit Vectashild-Eindeckmedium im Epifluoreszenz-Mikroskop detektiert. Dieses Mikroskop verfügt über spezielle zweigeteilte optische Filter: der erste Filter (Anregungsfilter) lässt nur Licht mit der für den Fluoreszenzfarbstoff spezifischen Anregungs-Wellenlänge passieren (in diesen Versuchen Wellenlänge 488 nm). Das emittierte Fluoreszenzlicht wird vom zweiten Filter, dem Emissionsfilter gesammelt, Farbteiler trennen das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht, und letzteres wird zur Darstellung über eine Kamera (in unseren Versuchen) auf den PC geleitet.

Sichtbar werden also Zellproteine, an denen sowohl Erst- als auch Zweitantikörper gebunden haben. Um auszuschließen, dass möglicherweise der Zweitantikörper unspezifisch an den Zellen gebunden hat, wurde stets eine Negativ-Kontrolle ohne Inkubation mit dem Erstantikörper durchgeführt. Die entstandenen Bilder ließen einen Rückschluss auf die Präsenz und Lokalisation des $K_{Ca3.1}$ -Kanals zu.

Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)
Rabbit Anti- $K_{Ca3.1}$ (1:2000)	Goat-Anti Rabbit Alexa 488 (1:1000)

Tab. 6: Zur Immunfluoreszenz eingesetzte Antikörper und deren Konzentration (verdünnt in Ziegennormalserum)

2.4 Patch-Clamp-Analyse, durchgeführt von der Arbeitsgruppe Prof. Budde,

Institut für Physiologie I, WWU Münster

Die Sternzellen wurden mit Hilfe der 1976 von Neher und Sakman³² entwickelten Patch-Clamp-Technik auf das funktionelle Vorkommen des $K_{Ca3.1}$ -Kanals untersucht. Mit der Methode lassen sich Ströme über der Plasmamembran messen und dadurch einzelne Ionenkanäle charakterisieren.

Eine Mikropipette aus Glas (Borsilikat) wird auf die Zellmembran der zu untersuchenden Zelle aufgesetzt. Durch Anlegen eines Unterdrucks wird ein Stück der Membran (sog. „Patch“) angesaugt und eine mechanisch und elektrisch dichte

Verbindung zwischen der Pipette und der Zelle geschaffen („seal“). Ausgehend von diesem sogenannten „Cell-attached“-Modus kann durch weiteres Ansaugen die Zellmembran an dieser Stelle durchbrochen und dadurch in die sogenannte Ganz-Zell-Konfiguration übergegangen werden (Abb. 3). Es besteht nun eine direkte Verbindung zwischen Pipette und Zellinnerem, sodass das Zytoplasma der Zelle durch Lösungszugabe moduliert werden kann. Ebenfalls angepasst werden kann die Badlösung, in der sich die Zelle befindet.

Über eine Elektrode aus chloriertem Silberdraht, die mit der Pipette verbunden ist, und eine weitere Elektrode im umgebenden Zellbad können die Ströme über der Zellmembran abgeleitet werden. Mit Hilfe eines elektronischen Verstärkers wird das Membranpotenzial auf eine definierte Spannung (sog. Haltepotenzial V_H) festgelegt, und der hierbei fließende Strom registriert.

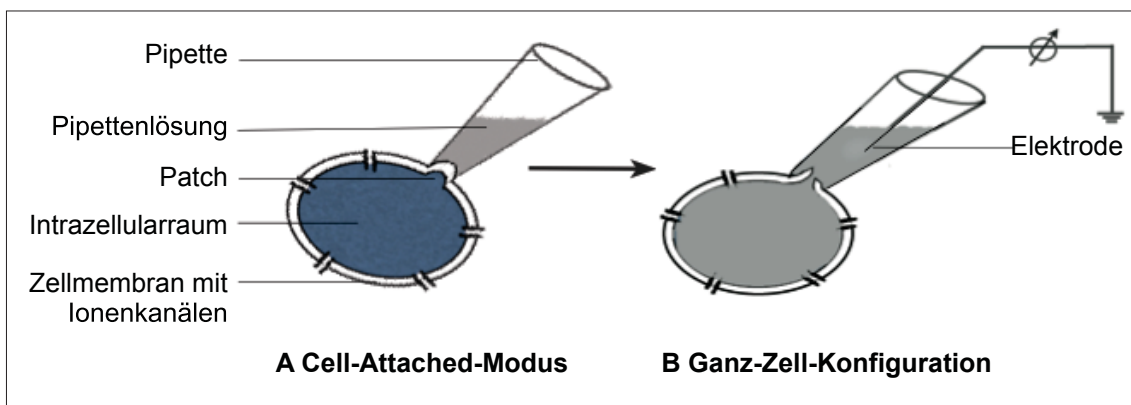


Abb. 3: Mess-Konfigurationen Patch-Clamp. A zeigt den sog. „Cell-Attached“-Modus, bei dem ein Stück der Zellmembran angesaugt und eine dichte Verbindung zwischen dieser und der Pipette geschaffen wird. Durch stärkeres Ansaugen wird die Ganz-Zell-Konfiguration (B) erreicht: die Zellmembran ist durchbrochen und eine direkte Verbindung zwischen Intrazellularraum und Pipette geschaffen.

Durch pharmakologische Beeinflussung kann die Aktivität von einzelnen Ionenkanälen gesteigert oder gehemmt werden, was eine Veränderung des Membranwiderstandes bewirkt. Gemäß des Ohmschen Gesetzes ($I=U/R$) ändert sich auch der Strom, wodurch ein Rückschluss auf die Aktivität einzelner Kanäle möglich wird: Wird ein Kanal beispielsweise pharmakologisch stimuliert, nimmt er stärkeren Einfluss auf das Membranpotenzial der Zelle, das sich in Abhängigkeit der Permeabilitäten und der

Gleichgewichtspotenziale einzelner Ionen ergibt. Nähert sich also ein Ion seinem Gleichgewichtspotenzial durch erhöhte Kanalaktivität an, verschiebt sich das Membranpotenzial in Richtung dieser Größe. Als zu vergleichender Parameter wird das Umkehrpotenzial herangezogen, also jene Spannung unter der weder Ionen ein- noch ausströmen, sodass kein Nettostrom messbar ist.

2.4.1 Durchführung

Die Pankreas-Sternzellen wurden auf Zellkulturschalen (10 mm) ausgesät. Nach dreistündiger Adhäsionszeit wurden sie in die Patch-Clamp-Vorrichtung eingespannt und mit Badlösung (s. Tab. 7) umspült. Eine Zelle wurde ausgewählt und mit der Patchpipette angesaugt. Zwischen den beiden Elektroden wurde ein definiertes Potenzial (Haltepotenzial V_H : -40 mV) angelegt und der fließende Strom über einen Verstärker und die gekoppelte Computersoftware detektiert.

Zunächst wurde die Zelle mit einer Kontrolllösung überspült, im Anschluss wurde der $K_{Ca3.1}$ -Aktivator 1-EBIO (50 μ M, gelöst in DMSO) appliziert, abschließend der Kanalhemmer Clotrimazol (1 μ M, gelöst in DMSO). Die sich dadurch verändernden Stromamplituden und Umkehrpotenziale wurden im Vergleich mit der Kontrollmessung ausgewertet. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung (Abb. 4) konnte das Gleichgewichtspotenzial der Kalium-Ionen für die verwendeten Pipetten- und Bad-Lösungen berechnet und mit den Umkehrpotenzialen der Sternzellen unter den verschiedenen Bedingungen verglichen werden, wodurch ein Rückschluss auf die Aktivität des $K_{Ca3.1}$ -Kanals möglich wurde.

Badlösung	Pipettenlösung
140 mM NaCl	140 mM KCl
5 mM KCl	1,3 mM EGTA
1 mM $CaCl_2$	10 mM HEPES
1 mM $MgCl_2$	1,217 mM $CaCl_2$
10 mM HEPES	1 mM $MgCl_2$
	- Die freie $[Ca^{2+}]_i$ beträgt 1 μ M -
pH 7,4 bei 37°C	

Tab. 7: Zusammensetzung der Lösungen für die Patch-Clamp-Experimente

$$E_{X=} = \frac{R \times T}{F \times Z} \times \ln \frac{[X]_a}{[X]_i}$$

Abb. 4: Nernst-Gleichung zur Berechnung des Gleichgewichtspotenzials eines Ions. E_x : Gleichgewichtspotenzial des Ions X; R: allgemeine Gaskonstante; T: absolute Temperatur; F: Ladung pro Mol (Faraday-Konstante); z: Ladungszahl des Ions; [X]: Konzentration des Ions im Extra- bzw Intrazellularraum

2.5 Calcium-Messungen mittels Fura-2

Mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes Fura-2 wurde die zytosolische Calcium-Konzentration der Sternzellen unter verschiedenen Bedingungen gemessen.

Die zugrundeliegende Methode nach Grynkiewicz et al. ²⁸ basiert auf der Erkenntnis, dass Fura-2 Calcium-Ionen mit hoher Spezifität bindet. Fura-2 ist ein fünffach negativ geladenes Anion, abgeleitet vom Calcium-Chelator EGTA. Zwischen die negativ geladenen Carboxylgruppen kann sich ein Calcium-Ion einlagern, wodurch sich das Anregungsspektrum und das Fluoreszenzverhalten des Moleküls verändern: Abbildung 5 ist zu entnehmen, dass Fura-2 zwei Anregungsmaxima mit gegensätzlichem Fluoreszenzverhalten besitzt: Bei einer Wellenlänge von 340 nm *steigt* die Fluoreszenzintensität mit steigender Calcium-Konzentration, bei 380 nm *sinkt* sie. Bei sinkender Calcium-Konzentration verhalten sich die Fluoreszenzintensitäten umgekehrt.

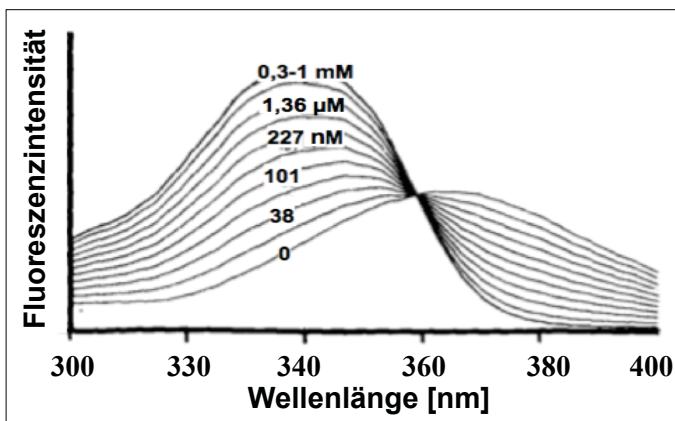


Abb. 5 (nach Grynkiewicz et al., 1985): Anregungsspektrum von Fura-2 [1 µM] bei 20°C in Pufferlösungen mit variierender freier $[Ca^{2+}]$ (zwischen <1 nM & >10 µM). Kurvenmaximum für hohe $[Ca^{2+}]$ bei 340 nm, für Ca^{2+} -freie Pufferlösung (=ungebundenes Fura-2) bei 380 nm.

Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten (bzw. des emittierten Lichts) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen ermöglicht ratiometrisch den Rückschluss auf die Calciumkonzentration.

Das geladene und dadurch polare Fura-2-Molekül kann die Zellmembran nicht durchdringen, weshalb ein mit Acetomethylgruppen verestertes, lipophiles Derivat (Fura-2-AM) zur Versuchsdurchführung eingesetzt wird. Die Estergruppen werden innerhalb der Zelle durch Esterasen abgespalten, was zur Folge hat, dass sich kein Diffusionsgleichgewicht zwischen intra- und extrazellulären Fura-2-AM einstellt. Immer mehr Fura-2-AM dringt in die Zelle ein, es wird zu Fura-2 abgebaut, welches die Zelle nicht verlassen kann und deshalb akkumuliert.

2.5.1 Durchführung

Versuchsvorbereitung

Die Sternzellen wurden auf mit Basalmembran (s. Tab. 9) beschichteten Glasbodenschalen (Willco, 10 mm) ausgesät. Vorgelegt wurden je nach Versuchsreihe 2 ml Panc-1-Überstand, Colo-357-Überstand oder Rlt-Psc-Medium. Nach dreistündiger Adhäsionszeit wurden 200 µl des Mediums abgenommen, im Dunkeln 6 µl Fura-2-AM-Farbstoff darin aufgenommen und die Lösung wieder auf die Zellen gegeben. Nach 20-minütiger Inkubationszeit im Brutschrank konnten die Versuche begonnen werden.

Versuchsablauf

Die Glasbodenschale wurde in das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Deutschland) eingespannt und ein Ausschnitt mit getrennt liegenden Zellen (ca. fünf pro Messung) fokussiert. Im Zeitintervall von 10 Sekunden wurden Aufnahmen unter Anregung des Fura-2-Farbstoffs mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 340 nm bzw. 380 nm erstellt (Visichrome Polychromator, Company Visitron Systems) und die Emissionsintensitäten der Zellen bei 500 nm erfasst. Über das angeschlossene Perfusionssystem wurden die Zellen mit verschiedenen im Wasserbad vorgewärmten Superfusionslösungen umspült (Zusammensetzung s. Tab. 8). Die An- und Absaugschläuche gewährleisteten durch einen gleichmäßigen Zustrom bei konstantem Absaugen eine kontinuierliche Umspülung mit frischer Lösung. In der initialen Kontrollphase wurde Hepes-gepufferte Ringer-Lösung zugeführt. Nach dieser etwa 10 Minuten andauernden Phase wurden die Zellen mit Lösungen, die durch ihre

Zusammensetzung (ggf. inkl. Hemmstoff) eine spezifische Wirkung auf die Zellen ausüben sollten, umspült.

Abschließend wurde die Kalibrierung der Messung durch Zugabe definierter Calcium-Konzentrationen durchgeführt: zunächst wurde eine calciumfreie Lösung („Nullcalcium“) um die Zellen gespült, der ein Calcium-Ionophor (Ionomycin) zugesetzt war, sodass alle Calcium-Ionen aus der Zelle ausströmen konnten. Im Anschluss wurden die Zellen komplett mit Calcium beladen, indem sie mit einer Hochcalciumlösung (5mM), ebenfalls mit Ionomycin versetzt, umspült wurden. Hiermit wurde erreicht, dass Fura-2 minimal bzw. maximal mit Calcium gesättigt wurde, die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten konnten zur Eichung der Messwerte genutzt werden. Über die an das Mikroskop gekoppelte Computersoftware MetaFluor (Visitron Systems, Deutschland) konnte die Messung am PC gesteuert werden.

Auswertung

Die während der Versuchsphase gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden mit den Eichwerten ins Verhältnis gesetzt und die Calciumkonzentration ratiometrisch berechnet. Hierzu wurden die Versuchsbilder erneut im MetaFluor-Programm aufgerufen. Pro Zelle wurde eine Messregion („Region of Interest: ROI“) festgelegt, die in einem möglichst großen Bereich außerhalb des Zellkerns gewählt wurde. Um die mögliche Hintergrundfluoreszenz durch Eigenfluoreszenz der Versuchskomponenten herauszurechnen, wurde auch eine Messregion außerhalb der Zellen gelegt. Ein erneutes Durchlaufen der Versuchsbilder lieferte je Versuchszeitpunkt und Anregungswellenlänge die entsprechenden Emissionsintensitäten der ROI. Aus diesen Werten wurde nach folgender Formel die jeweilige Calcium-Konzentration berechnet (nach Grynkiewicz et al. ²⁸):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times B$$

K_D steht für die Dissoziationskonstante von Fura-2 und wird aus der Literatur übernommen (224 nM). Die übrigen Parameter wurden aus den experimentell ermittelten Werten berechnet: R ist der Quotient der Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 bei 340 und 380

nm, R_{\min} und R_{\max} geben die Fluoreszenzverhältnisse in Calcium-freier Lösung (Nullcalcium) bzw. bei mit Calcium gesättigtem Fura-2 (Hochcalcium 5 mM) an. B steht für den Quotienten der Fura-2-Intensitäten unter Nullcalcium und 5 mM Calcium bei 380 nm.

Die gemessenen Emissionsintensitäten des Hintergrundes wurde jeweils von R subtrahiert. Die berechneten Calcium-Konzentrationen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2007 ausgewertet und graphisch dargestellt.

Hepes Ringer-Lösung
122,5 mM NaCl (bzw. 77,9 mM für Hochkalium-Lösung)
5,4 mM KCl (bzw. 50 mM für Hochkalium-Lösung)
1,2 mM CaCl ₂
0,8 mM MgCl ₂
10 mM HEPES
5,5 mM Glukose
pH 7,4 bei 37°C

Nullcalcium-Lösung	Hochcalcium-Lösung
122,5 mM NaCl	122,5 mM NaCl
5,4 mM KCl	5,4 mM KCl
0,8 mM MgCl ₂	5 mM CaCl ₂ (Wasserfrei)
10 mM HEPES	0,8 mM MgCl ₂
5 mM EGTA	10 mM HEPES
pH 7,4 bei 37°C	pH 7,4 bei 37°C

Tab. 8: Zusammensetzung der Superfusionslösungen

2.5.2 Messungen unter Zugabe des K_{Ca}3.1-Kanalblockers TRAM-34

In dieser Versuchsreihe wurden durch Panc-1- und Colo-357-Überstand stimulierte sowie unstimulierte Sternzellen gemessen. Nach der Kontrollphase mit reiner Ringer-Lösung wurden die Zellen mit einer Ringer-Lösung umspült, der 10 µmol/l des K_{Ca} 3.1-Kanalblockers TRAM-34, gelöst in DMSO, zugesetzt waren. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, wurde im gleichen Verhältnis DMSO zur Kontroll-Ringer-Lösung gegeben.

2.5.3 Messungen unter Superfusion einer Hochkalium-Lösung und TRAM-34

Auch in dieser Versuchsreihe wurden unstimulierte und durch Panc-1- und Colo-357-Überstand stimulierte Zellen gemessen. Der Kontrollphase schloss sich eine Umspülung der Zellen mit einer Hochkalium-Lösung an. Diese enthielt 50 mmol/l Kaliumchlorid. Um die Osmolarität der Lösung konstant zu halten, war die Konzentration von Natriumchlorid um 44,6 mmol/l erniedrigt. Nach beobachtetem Wirkungseintritt wurde erneut die Kontrolllösung zugeführt. Hatten sich die Zellen den Kontrollbedingungen wieder angepasst, wurde eine mit TRAM-34 versetzte Ringer-Lösung zugeführt, diesmal auf 500 nM verdünnt. Das Lösungsmittel DMSO wurde auch zur Kontrolllösung zugegeben.

2.6 Migrationsexperimente

Das Migrationsverhalten der Sternzellen wurde mittels Zeitraffer-Videomikroskopie untersucht. Die Zellen wurden auf einen beschichteten Untergrund gegeben und ihre Bewegungen über einen bestimmten Zeitraum beobachtet. Die Beschichtung des Untergrunds wurde in den verschiedenen Versuchsreihen variiert, ebenfalls Versuchsreihenabhängig wurden die Zellproben mit TRAM-34, einem Hemmstoff des $K_{Ca3.1}$ -Kanals, versetzt.

2.6.1 Durchführung

Versuchsvorbereitung

Zunächst wurden Zellkulturflaschen (Falcon) mit Matrices beschichtet, um den Zellen eine gute Migrationsgrundlage zu bieten. Zur Nachstellung der (patho-) physiologischen Umgebung der Sternzellen, wurden die Versuche auf Matrices durchgeführt, die in ihrer Zusammensetzung entweder den Komponenten der Basalmembran oder der desmoplastischen Umgebung der Sternzellen im pathophysiologischen Kontext ähnelten (s. Tab. 9). Nach 24-stündiger Auspolymerisation der Matrixkomponenten wurden die Flaschen je nach Versuchsreihe mit 2 ml entsprechendem Medium/ Überstand befüllt und ggf. ein Hemmstoff zugefügt. Je nach Konfluenz der Versuchszellschale wurden

1-4 Tropfen Sternzellsuspension in die Flaschen gegeben, gerade so viel, dass die Zellen einzeln und gleichmäßig auf der Matrix zu liegen kommen konnten. Die Zellen wurden zum Ädhärieren drei Stunden im CO₂-Inkubator (5% CO₂) belassen. Eine Unterschreitung dieser Zeit hätte zu mangelnder Adhäsion der Zellen geführt. Um dies auszuschließen, war eine genaue Einhaltung der Zeiträume unabdingbar.

Versuchsablauf

Nach den drei Stunden im CO₂-Inkubator waren die Zellen zur Beobachtung mit den Mikroskopen Axiovert 40c und Axiovert 25 (Zeiss, Deutschland) bereit. Diese sind eigens für die Migrationsexperimente mit Videokameras (Sony und Hamamatsu, Japan) und mit beheizbaren Wärmekammern ausgestattet worden. Es wurde eine Temperatur von 37°C eingestellt. Die Zellflaschen wurden in die vorgeheizten Wärmekammern gestellt und bei 20-facher Vergrößerung ein zufälliger Bildausschnitt gewählt, der nach Möglichkeit fünf Zellen zeigte. Parallel wurden vier Versuche durchgeführt, wobei darauf zu achten war, dass sich die gewählten Bildausschnitte hinsichtlich der Zelldichte in etwa glichen. Die zufällige Auswahl der Zellen und der vergleichbare Dichtegrad gewährleisteten, dass es sich um einen repräsentativen und dadurch vergleichbaren Ausschnitt der jeweiligen Zellpopulation handelte. Die mit den Mikroskopen gekoppelte Computer-Software WASABI bzw. HiPic (Hamamatsu, Japan) wurde zu jedem Versuch so programmiert, dass sie im fünf-Minuten-Intervall über einen Gesamtzeitraum von drei Stunden Standbilder der Zellbewegung anfertigte. Diese wurden gespeichert und standen nach Beendigung des Versuches zur Auswertung bereit.

Basalmembran-ähnliche Matrix
208 µl 5x RPMI (52 g/l, Endkonzentration 10,8 g/l)
208 µl 5x HEPES (50 mmol/l, Endkonzentration 10,4 mmol/l)
15 µl 1M NaOH (1 mol/l)
25 µl Laminin (1 mg/ml, Endkonzentration 25 µg/ml)
25 µl Fibronectin (1 mg/ml, Endkonzentration 25 µg/ml)
320 µl Collagen IV (0,45 mg/ml, Endkonzentration 144 µg/ml)
pH 7,4

Desmoplastische Matrix
200 µl 5xRPMI (52 g/l, Endkonzentration 10,4 g/l)
200 µl 5x HEPES (50 mmol/l, Endkonzentration 10 mmol/l)
~15 µl 1M NaOH (1 mol/l)
200 µl H ₂ O dest.
120 µl Laminin (1mg/ml, Endkonzentration 120µg/ml)
40 µl Fibronectin (1mg/ml, Endkonzentration 40 µg/ml)
12 µl Collagen IV (0,45 mg/ml, Endkonzentration 5,4µg/ml)
10 µl Collagen III (1,2 mg/ml, Endkonzentration 12µg/ml)
200 µl Collagen I (4 mg/ml, Endkonzentration 800 µg/ml)
pH 7,4

Tab. 9: Zusammensetzung der Migrationsflaschen-Beschichtungen, Menge für eine Versuchsreihe (entspricht 4 Flaschen)

Auswertung

In den entstandenen Bildsequenzen wurden mit Hilfe des Programms AMIRA die Konturen der einzelnen Zellen erfasst. Anhand dieser konnten über die NIH ImageJ Software die Koordinaten für jede Zelle als xy-Datensätze erfasst werden. Aus diesen wurden verschiedene Parameter ermittelt: Zur Bestimmung der Translokation zwischen Start- und Endpunkt wurde die Entfernung zwischen den Mittelpunkten des Anfangs- und Endbildes einer Zelle gemessen. Die insgesamt zurückgelegte Strecke wurde durch Addition der Teilstrecken (nach Pythagoras: $\Delta s = \sqrt{(x^2 + y^2)}$) berechnet. Die Mittelungen der Einzelgeschwindigkeiten als Funktion der Zeit ($v = s/t$) ergaben die Geschwindigkeit der Zellen pro Minute. Die Fläche der Zellen als weiterer Parameter ergab sich aus der Pixelanzahl des von der Zellkontur eingeschlossenen Bereiches. Darüber hinaus konnte der Strukturindex (SI) erfasst werden, der die Morphologie einer Zelle anhand deren Umfangs p und deren Fläche A beschreibt ($SI = (4\pi A)/p^2$, $SI=1$ bei runden Zellen und $SI \rightarrow 0$ bei Zellen mit vielen Ausläufern).

2.6.2 Migration unbehandelter und stimulierter Pankreas-Sternzellen

Die Sternzellen wurden in mit desmoplastischer bzw. Basalmembran-Matrix beschichteten Zellkulturflaschen ausgesät. Vorgelegt wurden je nach Versuch Sternzell-

Medium oder Karzinomzell-Überstand der Zelllinien Colo-357- bzw. Panc-1. Nach dreistündiger Adhäsionszeit wurde die Zeitraffer-Mikroskopie gestartet.

2.6.3 Migration unbehandelter und stimulierter Pankreas-Sternzellen unter Zugabe des $K_{Ca}3.1$ -Kanalblockers TRAM-34

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.6.2, jedoch wurden nach der dreistündigen Adhäsionszeit $10 \mu\text{M}$ des Kanal-Blockers TRAM-34 (gelöst in DMSO) hinzugefügt. Nach 15-minütiger Einwirkzeit wurden die Filme gestartet. Um einen Einfluss des Lösungsmittels DMSO auszuschließen, wurden vergleichend ebenfalls Versuche mit reinem DMSO-Zusatz durchgeführt.

2.7 Statistische Analyse

Alle Daten wurden durch mehrfache Durchführung der Versuche ($N \geq 3$) ermittelt. Es wurden pro Versuch mindestens 15 Zellen ($n \geq 15$ bei den Calcium-Messungen, $n \geq 20$ bei den Migrationsexperimenten) aus \geq drei Zellpassagen analysiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte inklusive der Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) mit Microsoft Excel 2007 dargestellt und ausgewertet.

Die Signifikanz-Prüfung wurde mittels des t-Tests durchgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05\%$ (Signifikanzgrenze α) wurden die Ergebnisse als signifikant unterschiedlich eingestuft (in den Abbildungen gekennzeichnet mit *).

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals

3.1.1 Western-Blot-Analyse

Die Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in den Pankreas-Sternzellen konnte durch Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Nach Behandlung der Sternzell-Lysate mit einem Antikörper gegen den $K_{Ca}3.1$ -Kanal konnte eine eindeutige Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts des Kanals (46 kDa) detektiert werden. In den mit Karzinomzell-Überstand stimulierten Zellen wurde ebenfalls ein Signal detektiert (Stimulationszeit: 48 Stunden). Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Die Dichtemessung der detektierten Banden und deren quantitativer Vergleich mittels des unter allen Bedingungen gleichmäßig exprimierten Housekeeping-Proteins GAPDH ergaben keine unterschiedlich stark ausgeprägte Expression zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen.

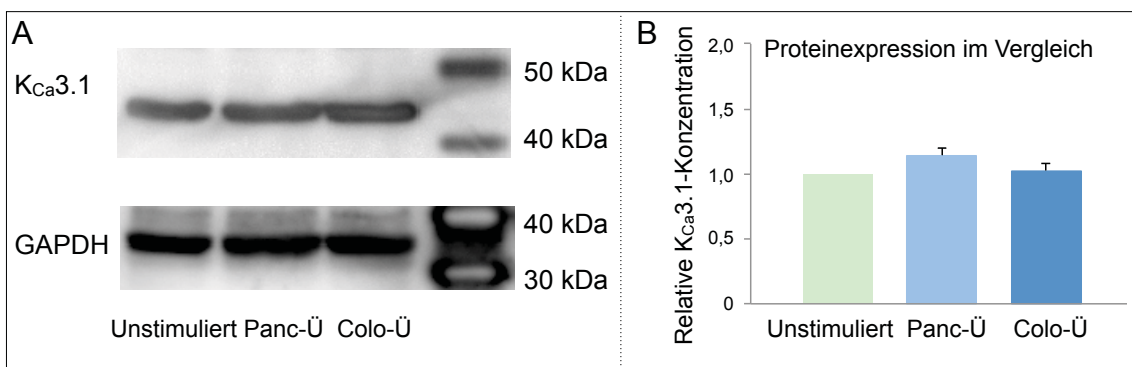


Abb. 6: Western-Blot-Analyse der Sternzellen. A: Die Behandlung der Proteinlysate der unstimulierten und mit Karzinomzell-Überstand stimulierten Zellen mit Antikörpern gegen den $K_{Ca}3.1$ -Kanal und deren anschließende Detektion ergaben deutliche Banden auf Höhe von 46 kDa. Die Kontroll-Analyse mittels GAPDH und die vergleichende densitometrische Quantifizierung zeigte keine Unterschiede in der Expressions-Rate zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen. B: Statistische Auswertung der densitometrischen Quantifizierung. „Panc-Ü“/ „Colo-Ü“= mit Überstand der Zelllinie Panc-1 bzw Colo-357 vorbehandelte Zellen. n=3.

3.1.2 Immunfluoreszenz

Diese weitere Methode sollte über die Western-Blot-Ergebnisse hinaus die Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals belegen. Es wurden erneut Versuche mit unbehandelten und vorbehandelten Zellen durchgeführt.

Durch Anregung des Fluorochroms, das an den Zweit-Antikörper gebunden war, wurden von den Sternzellen Bilder erstellt, die das Vorhandensein des $K_{Ca3.1}$ -Kanals zeigen. In Abbildung 7 ist je ein Bild aus jeder Versuchsbedingung dargestellt.

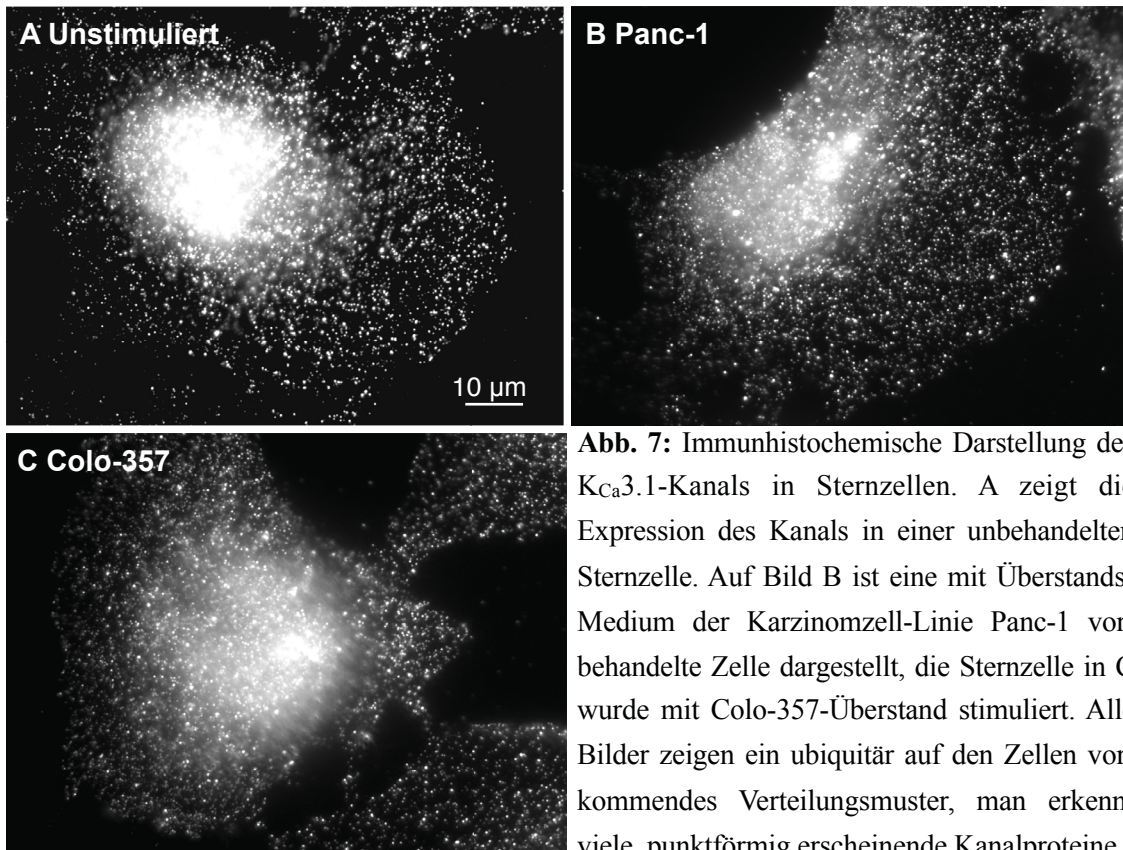


Abb. 7: Immunhistochemische Darstellung des $K_{Ca3.1}$ -Kanals in Sternzellen. A zeigt die Expression des Kanals in einer unbehandelten Sternzelle. Auf Bild B ist eine mit Überstands-Medium der Karzinomzell-Linie Panc-1 vorbehandelte Zelle dargestellt, die Sternzelle in C wurde mit Colo-357-Überstand stimuliert. Alle Bilder zeigen ein ubiquitär auf den Zellen vorkommendes Verteilungsmuster, man erkennt viele, punktförmig erscheinende Kanalproteine.

3.2 Funktioneller Nachweis des $K_{Ca3.1}$ -Kanals mittels Patch-Clamp-Analyse

Der funktionelle Nachweis des $K_{Ca3.1}$ -Kanals erfolgte mittels der Patch-Clamp-Methode. In der anfänglichen Kontrollphase konnte ein deutlicher Auswärtsstrom gemessen werden. Dessen Umkehrpotenzial E_{rev} lag bei $-41,8 \pm 0,7$ mV. Anhand der verwendeten Kalium-Konzentrationen in Bad- und Pipettenlösungen errechnete sich nach der Nernst-Gleichung folgendes Gleichgewichtspotenzial für Kalium:

$$E_K = -61 \cdot \lg \frac{[140]}{[5]} = -88,3 \text{ mV}$$

Die Behandlung mit dem $K_{Ca3.1}$ -Aktivator 1-EBIO hatte eine Zunahme der Stromamplitude über der Zellmembran zur Folge. Das Umkehrpotenzial verschob sich von $-41,8 \pm 0,7$ mV auf $-65,2 \pm 3,0$ mV (s. Abb. 8). Dies lässt schließen, dass 1-EBIO zu erhöhter Aktivität des $K_{Ca3.1}$ -Kanals führte, und damit einhergehend der Kalium-Ausstrom zunahm und die Membran weiter in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotenzials ($-88,3$ mV) polarisierte. Das anschließende Hinzufügen des $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Blockers Clotrimazol verschob das Umkehrpotenzial wieder in Richtung des Ausgangswertes ($-51,7 \pm 2,4$ mV). Ebenfalls bedingt durch die Hemmung nahm der Beitrag des Stromflusses durch den $K_{Ca3.1}$ -Kanal zum Gesamtstrom ab, eine Senkung der Amplitude war zu verzeichnen.

Die beschriebenen Effekte durch die zwei etablierten Kanalmodulatoren auf die Stromamplitude und das Umkehrpotenzial beweisen das Vorkommen funktionsfähiger $K_{Ca3.1}$ -Kanäle in der Plasmamembran der Sternzellen.

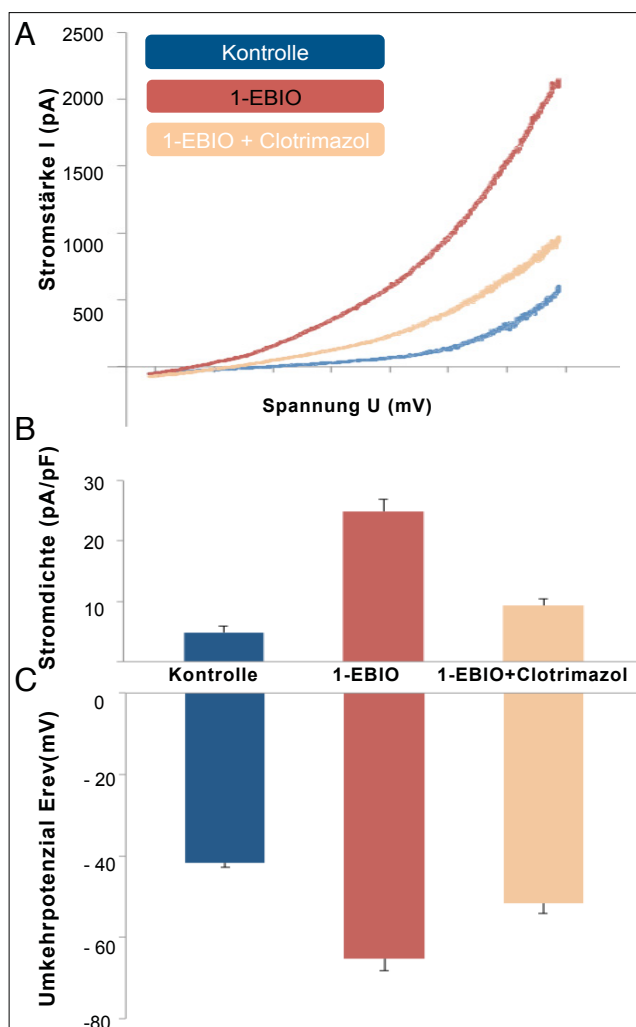


Abb. 8: Patch-Clamp-Messungen an Sternzellen. A zeigt die Aufzeichnung von Strom-Spannungs-Kurven in der Ganz-Zell-Konfiguration. Der anfänglichen Kontrollphase schließt sich die Zugabe von 1-EBIO ($50 \mu\text{M}$) an, die Stromamplitude nimmt hierdurch zu. Anschließendes Zuführen von Clotrimazol ($1 \mu\text{M}$) senkt die Amplitude wieder ab. In B ist die Stromdichte unter den verschiedenen Bedingungen dargestellt, die durch Modulation der $K_{Ca3.1}$ -Kanäle zunimmt (Kontrolle: $4,8 \pm 1,0$ pA/pF, 1-EBIO: $24,9 \pm 2,0$ pA/pF, 1-EBIO + Clotrimazol: $9,3 \pm 1,1$ pA/pF). Im Zuge dessen verschieben sich die Umkehrpotenziale von $-41,8 \pm 0,7$ mV unter Kontrollbedingungen auf $-65,2 \pm 3,0$ mV unter Zugabe von 1-EBIO und $-51,7 \pm 2,4$ mV unter Zugabe von 1-EBIO + Clotrimazol. $n=9$.

3.3 Calcium-Messungen mittels Fura-2

Die Einflussnahme des zuvor in den Sternzellen nachgewiesenen $K_{Ca3.1}$ -Kanals auf die Calcium-Konzentration in den Zellen wurde mittels intrazellulärer Calcium-Messungen untersucht. Die Messungen wurden sowohl an unstimulierten als auch an stimulierten Pankreas-Sternzellen durchgeführt.

3.3.1 Calcium-Haushalt der Sternzellen unter Zugabe des $K_{Ca3.1}$ -Kanalblockers

TRAM-34

In der initialen Kontrollphase wurde nach Anpassung der Zellen an die Perfusionsbedingungen eine konstante Calcium-Konzentration von $90,2 \pm 6,1$ nM gemessen. Unter anschließender Zufuhr von $10 \mu\text{M}$ TRAM-34 zeigten sich im zeitlichen Verlauf keine Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration.

Abbildung 9 gibt durch Darstellung beispielhafter Einzelmessungen einen Eindruck der Calcium-Messungen.

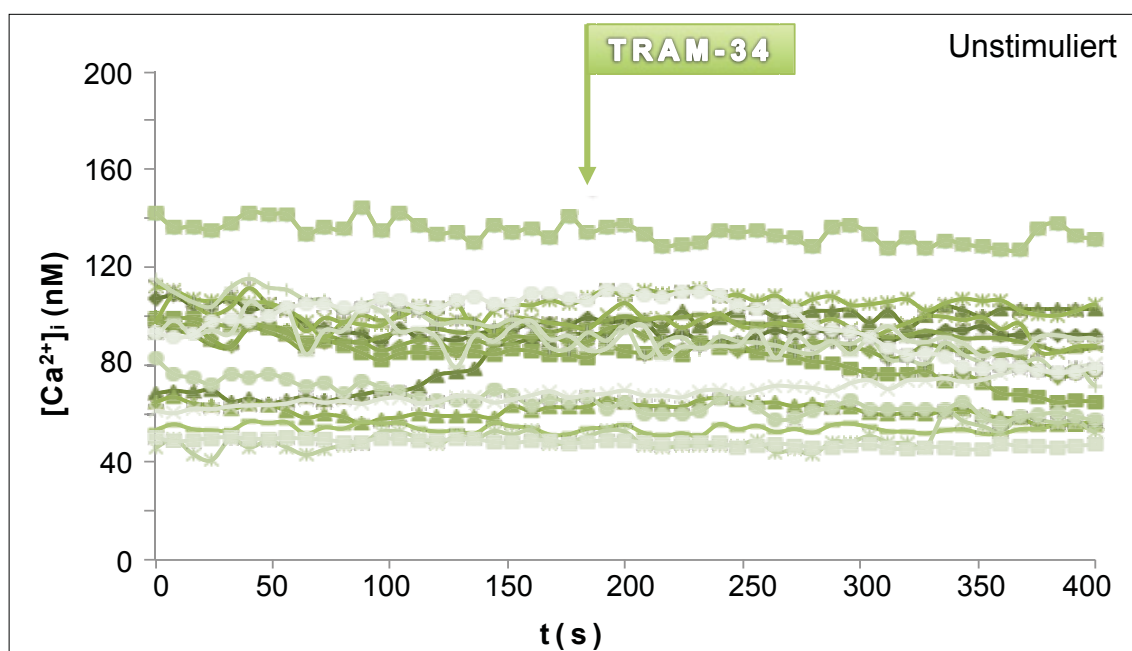
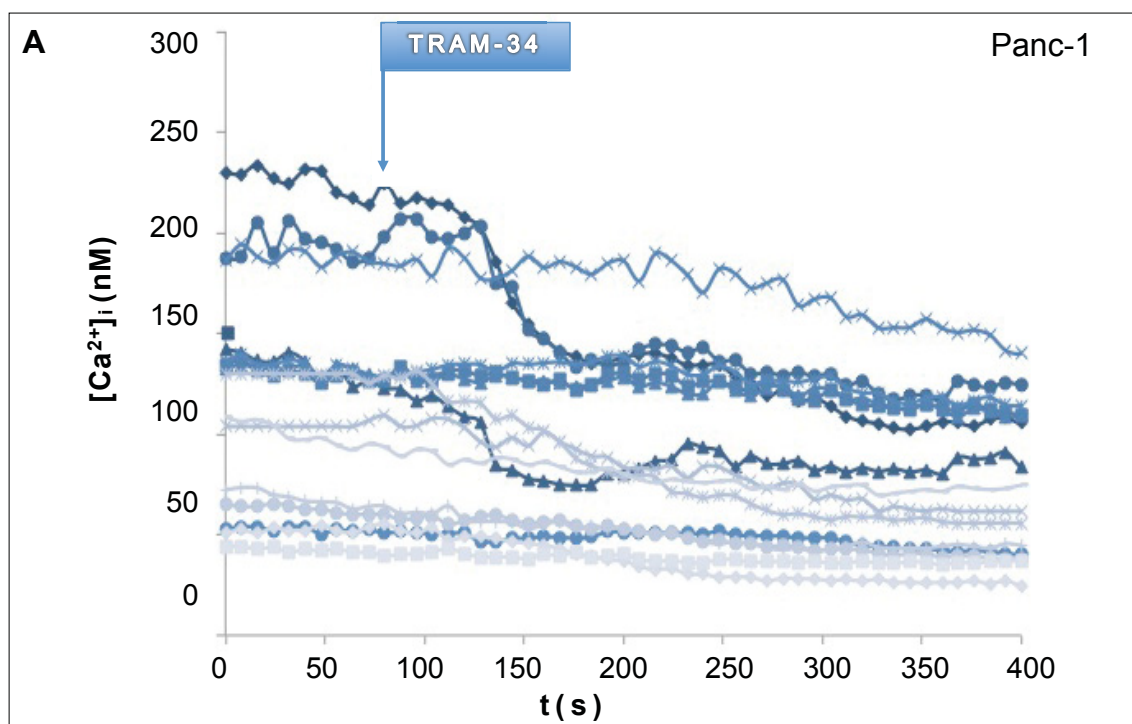


Abb. 9: Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration an unstimulierten Sternzellen. Jede Kurve repräsentiert die Messung einer frei gewählten Stelle an einer Zelle. Nach konstant bleibenden Werten in der Kontrollphase erfolgte die Zufuhr von $10 \mu\text{M}$ TRAM-34, einem Hemmstoff des $K_{Ca3.1}$ -Kanals.

Die Messungen an stimulierten Zellen ergaben schon während der Kontrollphase einen deutlichen Unterschied zu den Messungen an unstimulierten Zellen: Die intrazelluläre Calcium-Konzentration war im Mittel deutlich höher (Panc-1-stimuliert: $109,1 \pm 9,8$ nM, Colo-357-stimuliert: $148,3 \pm 21,4$ nM).

Auch die Zufuhr von TRAM-34 zeigte an stimulierten Zellen eine Wirkung, die sich deutlich von der an unstimulierten Zellen unterschied. Schon nach kurzer Überspülungszeit war ein Absinken der Calcium-Konzentration zu verzeichnen: Sie fiel gemittelt um 20% (Panc-1-stimuliert: $87,0 \pm 8,2$ nM) bzw. 45% (Colo-357-stimuliert: $95,6 \pm 10,2$ nM) ab. Die Abnahme der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals ist konsistent mit einer durch TRAM-34 induzierten Depolarisation des Membranpotenzials.

Im Vergleich des Einflusses der zwei verschiedenen Karzinomzell-Überstände war festzustellen, dass die Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals durch TRAM-34 in Panc-1-Überstand-stimulierten Zellen im Mittel einen seichteren Abfall der Calcium-Konzentration bewirkte als in Colo-357-Überstand-stimulierten. Letzterer trat zeitlich etwas verzögerter ein (Abb. 10). Im Gegensatz zu den Versuchen an unstimulierten Zellen konnte in diesen Versuchsreihen ein deutlicher Einfluss des Kanals auf den Calcium-Haushalt der Sternzellen beobachtet werden.



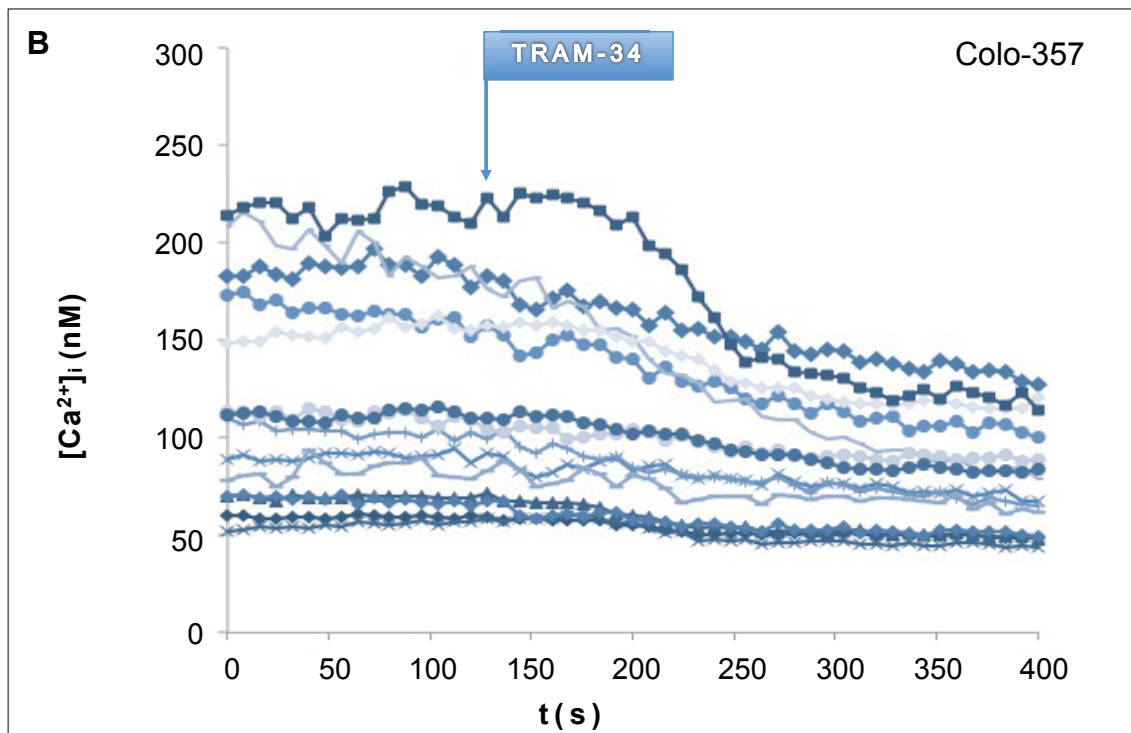


Abb. 10: Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration an stimulierten Sternzellen. Nach initialer Kontrollzeit wurden die Zellen mit 10 μ M TRAM-34 umspült. Dies bewirkte bei den dreistündig mit Karzinomzellüberstand der Linie Panc-1 (A) bzw. Colo-357 (B) vorbehandelten Sternzellen ein Absinken der intrazellulären Calcium-Konzentration.

Im direkten Vergleich der gemittelten Messwerte zwischen Kontroll- und vorbehandelten Zellen wird die beschriebene Beobachtung sehr deutlich (Abb. 11): Die unstimulierten Zellen zeigen kein signifikantes Ansprechen auf die TRAM-34-Zufuhr. Im Gegensatz dazu errechnet sich bei den mit Panc-1-Überstand behandelten Zellen ein signifikanter Abfall der Calcium-Konzentration nach TRAM-34-Zugabe. Dasselbe gilt für die mit Colo-357-Überstand stimulierten Zellen, hier ist der Abfall sogar noch deutlicher. Ebenfalls ist erkennbar, dass die unterschiedlichen Bedingungen bereits von vornherein zu verschiedenen Calcium-Konzentrationen in den Zellen führen. Diese ist in den stimulierten Zellen im Mittel höher als in den unstimulierten, bei den Colo-357-stimulierten Zellen ist dieser Unterschied am stärksten ausgeprägt.

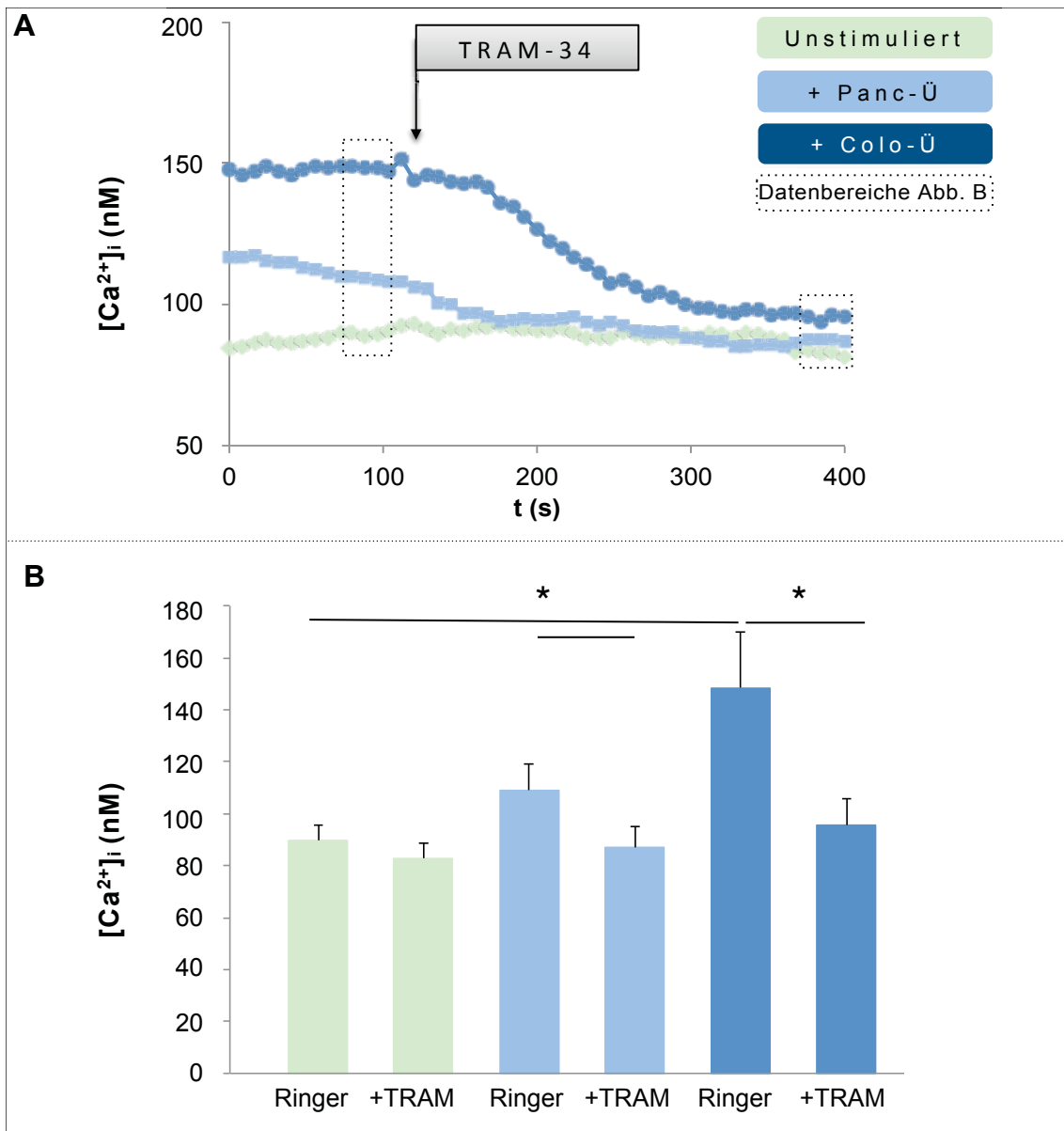


Abb. 11: Calcium-Messungen an Sternzellen ohne und mit Hemmung des $K_{Ca3.1}$ -Kanals. (A) Dargestellt sind die gemittelten Calcium-Werte in unstimulierten (grün) und mit Panc-1-Überstand (hellblau) bzw. Colo-357-Überstand (dunkelblau) stimulierten Zellen. Nach Vorbehandlung mit Colo-357-Überstand ist die initiale Calcium-Konzentration am höchsten. Ebenfalls unter dieser Bedingung ist die stärkste Reaktion auf TRAM-34-Zufuhr zu beobachten. Bei den unstimulierten Zellen hingegen ist keine Änderung im zeitlichen Verlauf zu erkennen. (B) Die intrazelluläre Calcium-Konzentration in unbehandelten Sternzellen mit bzw. ohne TRAM-34-Einfluss unterscheidet sich nicht signifikant. Nach Vorbehandlung mit den Karzinomzell-Überständen hingegen ist eine signifikante Abnahme der Calcium-Konzentration bis nahezu auf die Werte der unstimulierten Zellen zu erkennen. Der Unterschied zwischen initialer Calcium-Konzentration zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen ist zwar erkennbar, statistisch signifikant ist er aber nur unter Colo-357-Stimulation. $n=30$ Zellen pro Bedingung, aus ≥ 4 Experimenten.

3.3.2 Calcium-Haushalt der Sternzellen unter Superfusion einer Hochkalium-Lösung, Zugabe des $K_{Ca}3.1$ -Kanalblockers TRAM-34

Um den Zusammenhang zwischen dem Membranpotenzial und dem Calcium-Haushalt darzustellen, wurden die Sternzellen in dieser Versuchsreihe mit einer Lösung, die im Verhältnis zum physiologischen Extrazellularraum um ein vielfaches mehr Kalium (50 mM) enthielt, umspült. Die hierdurch erzwungene Depolarisation des Membranpotenzials wirkte sich, wie in Abbildung 12 (A) erkennbar, auf den Calcium-Haushalt aus. Es resultierte ein abruptes Absinken der intrazellulären Calcium-Konzentration. Dieses Verhalten zeigte sich unter allen drei Bedingungen. Durch das anschließende Überspülen mit physiologischer Ringer-Lösung normalisierte sich die extrazelluläre Kalium-Konzentration wieder und führte unter allen drei Bedingungen zu einem Wiederanstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration.

Analog zu den Versuchen der vorangegangenen Versuchsreihen war durch Zufuhr von TRAM-34, auch in geringerer Konzentration (500 nM), ein Absinken der Calcium-Konzentration in den mit Karzinomzell-Überstand behandelten Sternzellen zu verzeichnen. Ebenfalls wie in den vorherigen Versuchen war die durchschnittlich gemessene Calcium-Konzentration in den stimulierten Zellen höher. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 12 als Balkendiagramm (B) zusammengefasst. Deutlich erkennbar sind die starken Abnahmen der Calcium-Konzentrationen durch Zugabe der Hochkalium-Lösung, es sind im Mittel Abfälle von bis zu 30 % (Colo-357-Überstand) gemessen worden.

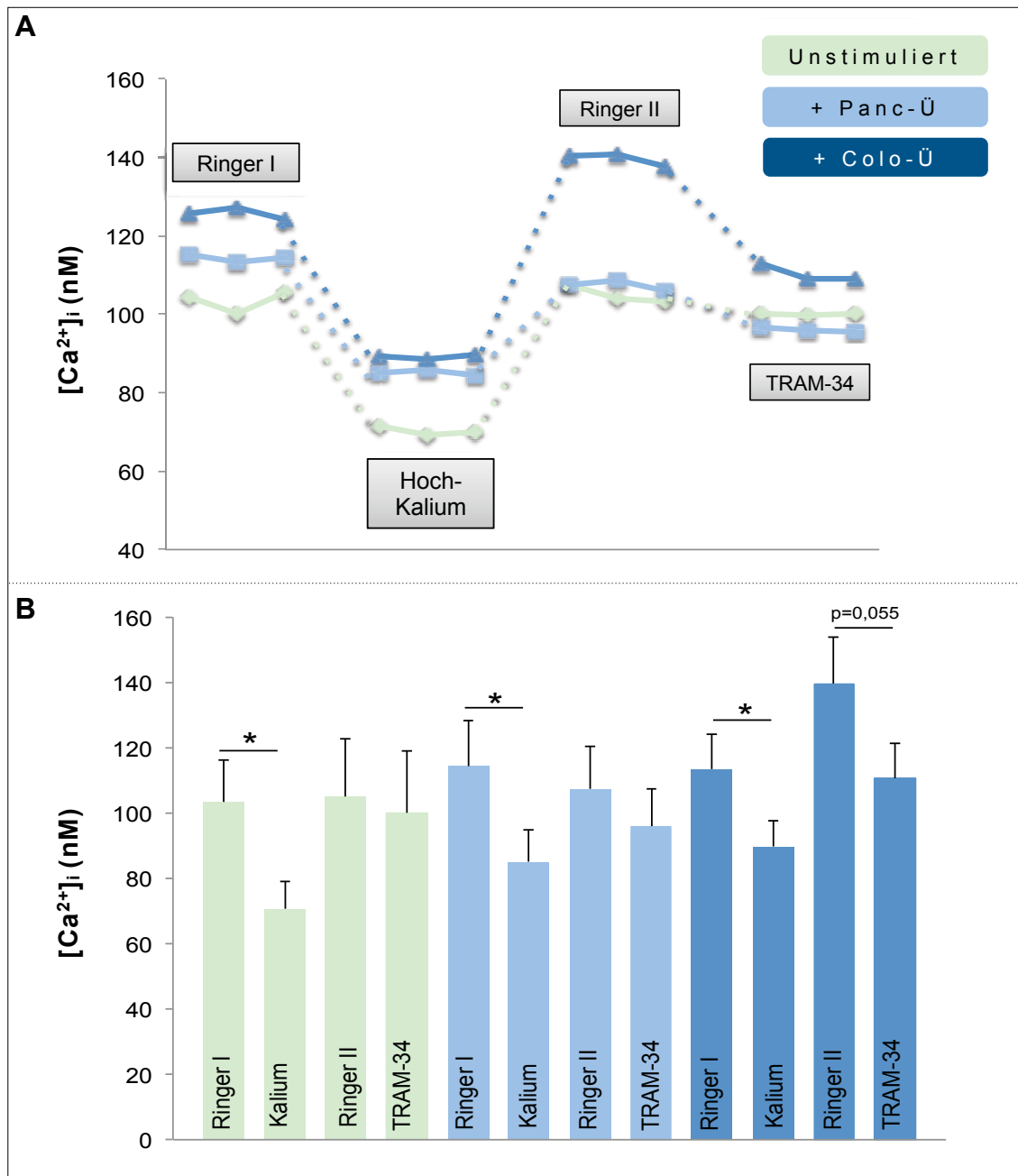


Abb. 12: Calcium-Messungen an Sternzellen, Einfluss von Hochkalium-Lösung und TRAM-34. (A) Darstellung der gemittelten Calcium-Werte im Verlauf. Die Zufuhr der Hochkalium-Lösung bewirkte eine starke Abnahme der intrazellulären Calcium-Konzentration. Anschließende Zufuhr von Ringer-Lösung ließ die Calcium-Konzentration wieder ansteigen, abschließende Überspülung mit TRAM-34 (500 nM) führte zum erneuten Absinken- kaum ausgeprägt bei unstimulierten, stärker ausgeprägt bei stimulierten Zellen. (B) Der jeweils erste Balken zeigt die gemittelten Werte *vor*, der zweite *unter* Zugabe der Hochkalium-Lösung, der dritte Balken repräsentiert die $[Ca^{2+}]_i$ unter erneuter Überspülung mit Ringer-Lösung, der vierte Balken stellt die Ergebnisse unter TRAM-34-Einfluss dar. $n \geq 15$ Zellen pro Bedingung aus ≥ 5 Experimenten.

3.4 Migrationsexperimente

Nach umfangreicher Analyse der Expression und Aktivität des $K_{Ca}3.1$ -Kanals wurde dessen Einflussnahme auf die Migration von Pankreas-Sternzellen untersucht. Hierzu wurden verschiedene Parameter (Gesamtstrecke, Translokation, Geschwindigkeit, Fläche, Strukturindex) erfasst. Abbildung 13 zeigt exemplarisch den zurückgelegten Weg einer Sternzelle in einem Zeitraum von drei Stunden.

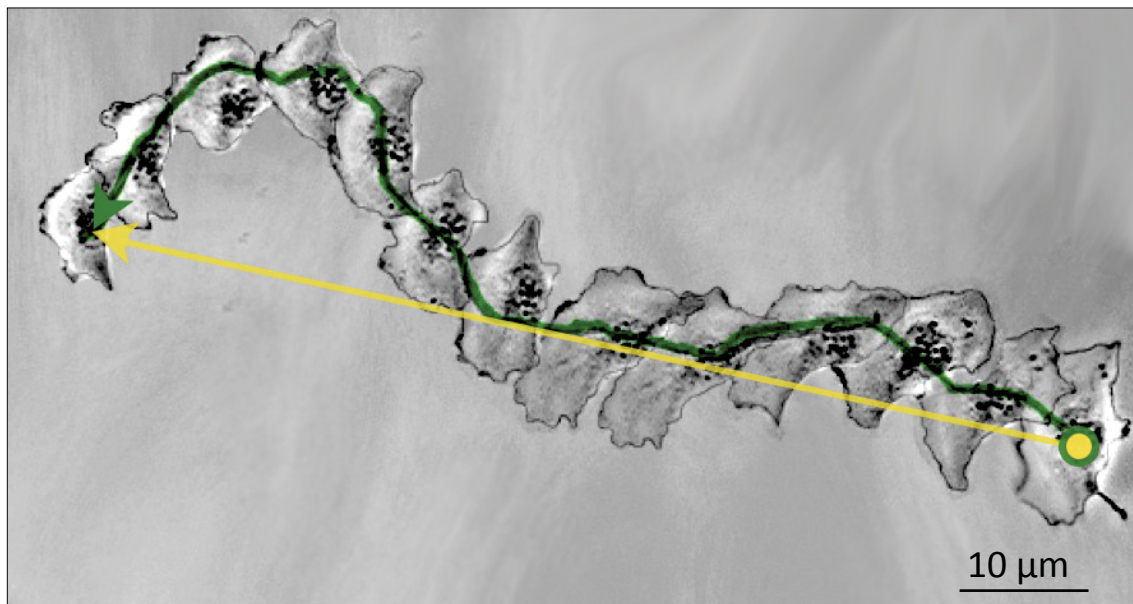


Abb. 13: Migration einer Sternzelle. Die Abbildung zeigt die Wanderung einer Sternzelle über einen Zeitraum von drei Stunden. Die Zellbewegung erfolgte von rechts unten nach links oben. Der grüne Pfeil (=sog. Trajektorie der Zelle) stellt die gesamte zurückgelegte Strecke der Zelle dar. Der gelbe Pfeil ist der Abstand zwischen Start- und Endposition des Zellmittelpunkts, die Verschiebung zwischen diesen beiden Punkten wird Translokation genannt.

3.4.1 Migration unbehandelter und stimulierter Pankreas-Sternzellen

In dieser Versuchsreihe wurde die Migration von Pankreas-Sternzellen unter Variation der Matrix und des zugegebenen Mediums beobachtet: Es wurden Versuche auf Basallamina-ähnlicher, sowie auf desmoplastischer Matrix durchgeführt. Zugegeben wurde entweder Rlt-Psc-Medium („unbehandelt“) oder konditioniertes Medium der Karzinomzell-Linien Panc-1 bzw. Colo-357.

Geschwindigkeit

Bei den unbehandelten Zellen betrug die durchschnittliche Geschwindigkeit der Sternzellen auf mit Basalmembran-Matrix beschichtetem Untergrund $0,31 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$. Die dreistündige Stimulation mit Panc-1-Karzinomzell-Überstand resultierte in einem deutlich veränderten Verhalten der Sternzellen: Sie wanderten schneller als die unbehandelten Zellen. Durchschnittlich erreichten sie eine Geschwindigkeit von $0,49 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$, was einer Geschwindigkeitszunahme um beinahe 50% gegenüber den unbehandelten Zellen entspricht. Eine noch stärkere Zunahme der Geschwindigkeit konnte durch die dreistündige Stimulation der Sternzellen mit Colo-357-Überstand beobachtet werden. Sie waren mehr als doppelt so schnell wie die unstimulierten Zellen ($0,31 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$ vs. $0,65 \pm 0,09 \mu\text{m}/\text{min}$).

Auf desmoplastischer Matrix migrierende Sternzellen waren insgesamt etwas schneller. Der zuvor beschriebene Effekt des Karzinomzell-Überstands auf die Sternzell-Migration auf Basalmembran konnte auch auf desmoplastischer Matrix reproduziert werden, wenn auch in geringerer Ausprägung. Der errechnete Unterschied lag bei einer um ca. 30% gesteigerten Wandergeschwindigkeit. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

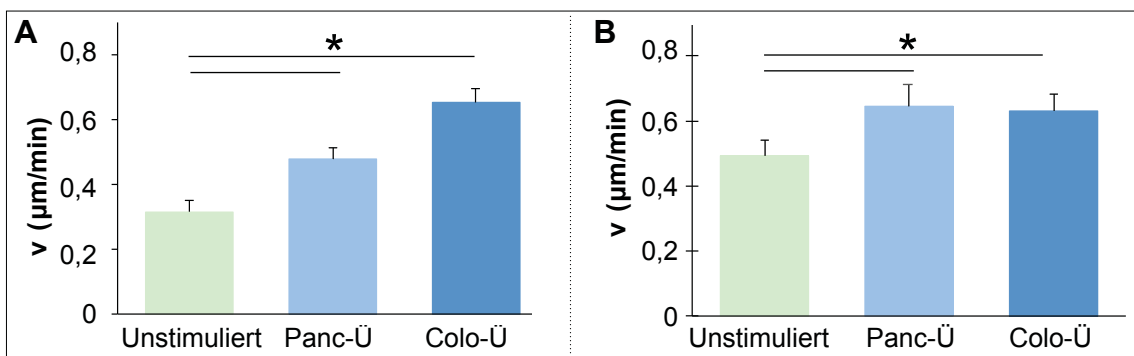


Abb. 14: Geschwindigkeiten der Sternzellen auf Basalmembran- (A) und desmoplastischer Matrix (B). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$. Die unstimulierten Sternzellen (grün) waren auf beiden Untergründen im Mittel signifikant langsamer als die mit Karzinomzell-Überstand (blau) behandelten Zellen. Auf desmoplastischer Matrix migrierten die Zellen außer unter Colo-357-Überstand etwas schneller als auf Basalmembran. $n \geq 20$ Zellen je Bedingung bei ≥ 4 Experimenten.

Gesamtstrecke und Translokation

Die zurückgelegte Gesamtstrecke der unbehandelten Sternzellen betrug im Mittel $101,0 \pm 8,9 \mu\text{m}$. Die schneller migrierenden, stimulierten Sternzellen legten eine Strecke von $129,5 \pm 12,8 \mu\text{m}$ unter Panc-1-Überstand und eine Strecke von $170,2 \pm 19,6 \mu\text{m}$ unter Colo-357-Überstand zurück, also deutlich weiter als die unbehandelten Zellen. Die Translokation ergab hingegen unter allen Versuchsbedingungen eine mittlere Verschiebung um $50 \mu\text{m}$. Eine Erklärung bringt die Betrachtung der Geradlinigkeit der Zellbewegung, genannt Direktionalität: Sie ist ein Maß für die Persistenz der Migration einer Zelle, also für die Fähigkeit, eine einmal eingeschlagene Migrationsrichtung über einen längeren Zeitraum beizubehalten. Durch den Vergleich zwischen Translokation und tatsächlich zurückgelegter Strecke gibt sie Auskunft über die Richtungsänderungen einer Zelle. Die unstimulierten Zellen ändern auf ihrem Weg weniger stark bzw. seltener ihre Richtung als die stimulierten Zellen. So erklärt sich, dass letztere in gleicher Zeit zwar *direkt* zwischen Start- und Endpunkt keine längere Strecke zurücklegen als die unbehandelten Sternzellen, jedoch durch höhere Geschwindigkeit und stärkeres Abweichen vom direkten Weg deutlich mehr *tatsächliche* Strecke wandern. Verdeutlicht wird dies auch durch den genauen Vergleich einzelner Trajektorien: Die unbehandelten Zellen weichen weniger vom direkten Weg zwischen Start- und Endpunkt ab, sie migrieren geradliniger, die Direktionalität ihrer Bewegung ist höher als die der stimulierten Zellen (Abb. 15 D).

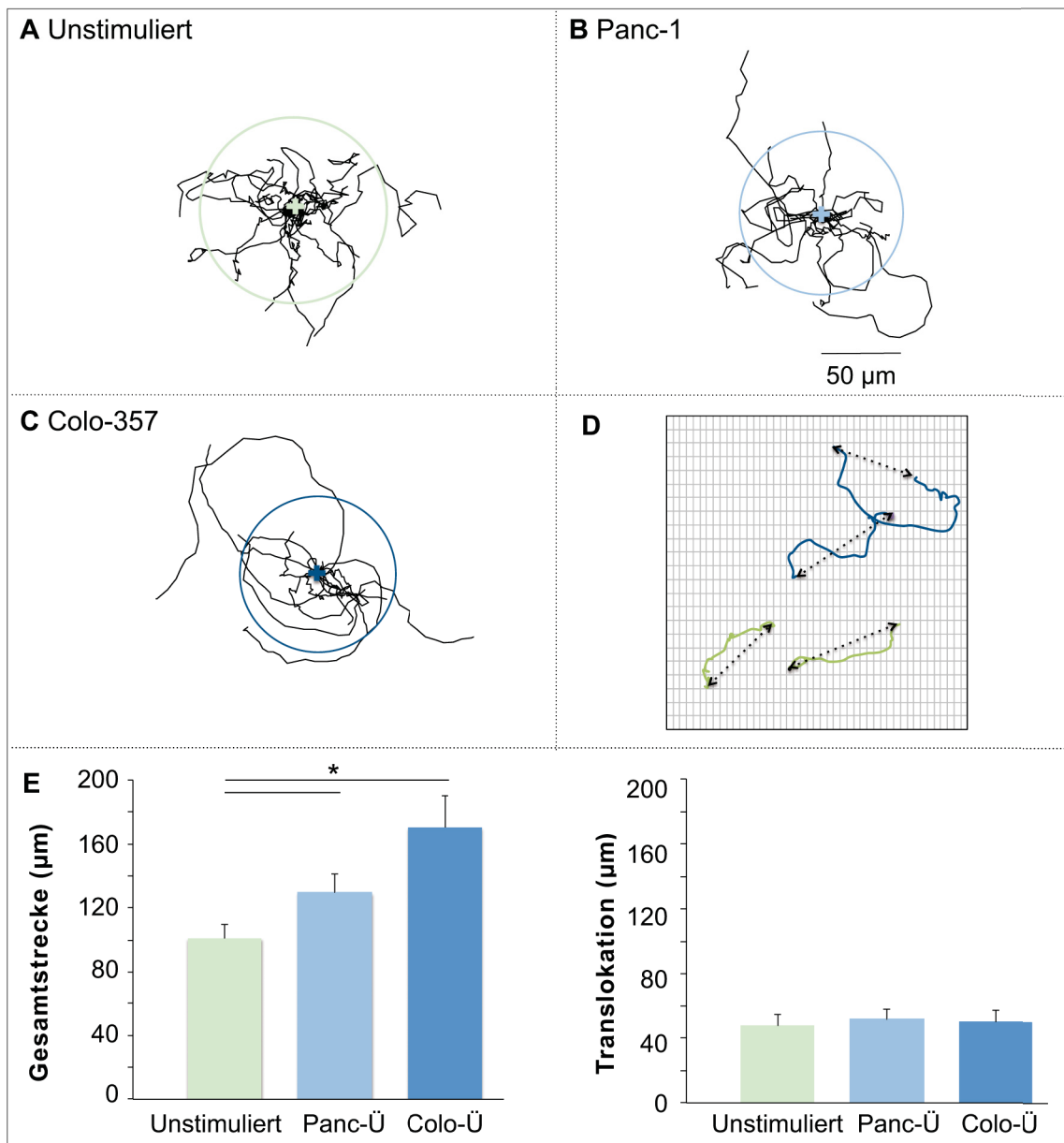


Abb. 13: Gesamtstrecke und Translokation der Sternzellen auf Basalmembran. A,B,C: Jede Trajektorie beschreibt die zurückgelegte Gesamtstrecke einer Sternzelle im Verlauf von drei Stunden. Alle Trajektorien sind auf denselben Startpunkt normiert. Die Radius der Kreise steht jeweils für die im Mittel erreichte Translokation zwischen Start- und Endpunkt der Sternzellen, diese betrug unter allen Bedingungen ca. 50 µm. Der Vergleich der Trajektorien mit der Translokation (D) liefert Informationen zur Direktionalität der Zellen: In grün dargestellt sind die Gesamtstrecken zweier beispielhafter unbehandelter Zellen, in blau die der behandelten. Die gestrichelten Pfeile markieren den Weg, der als Translokation beschrieben wird. Es wird deutlich, dass die unbehandelten Zellen deutlich weniger vom direkten Weg abweichen als die stimulierten Zellen, sie migrieren geradliniger. In E ist die statistische Auswertung dargestellt. $n \geq 20$ Zellen je Bedingung bei ≥ 4 Experimenten.

Zellgröße und Morphologie

Die Fläche der Sternzellen unterschied sich zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht signifikant (Abb. 16 A). Auch eine Veränderung der Zell-Morphologie konnte nicht beobachtet werden: Unter allen Versuchsbedingungen wurde anhand Umfang und Fläche der Zellen im Mittel ein Strukturindex um 0,5 errechnet, was aussagt, dass die Zellen weder absolut rund sind noch ausschließlich zu einer stark dendritischen Morphologie tendieren (Abb 16 B).

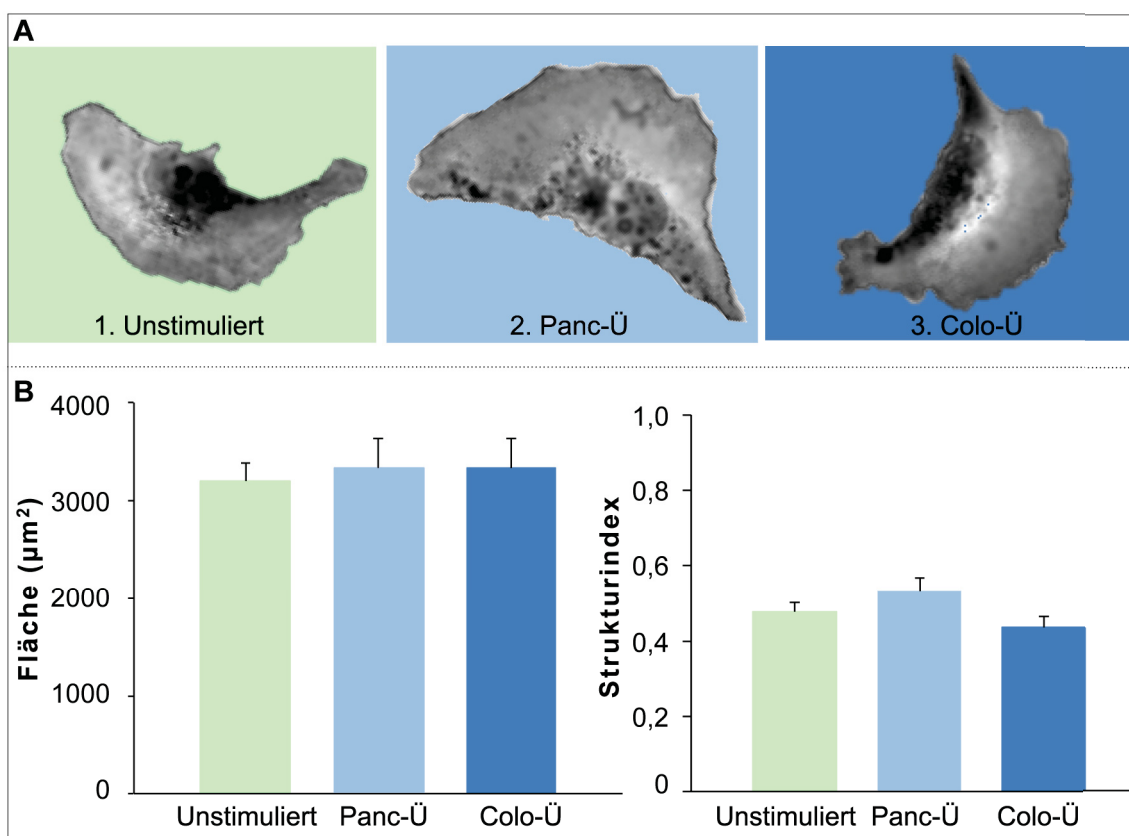


Abb. 16: Zellgröße und Morphologie der Sternzellen. A: Die Abbildung zeigt exemplarisch eine unbehandelte (hellgrün), eine mit Panc-1-Überstand (hellblau) und eine mit Colo-357-Überstand (dunkelblau) vorbehandelte Pankreas-Sternzelle in der Aufsicht. Die Zellgröße beträgt $3289 \mu\text{m}^2$ (1), $3320 \mu\text{m}^2$ (2) bzw. $3571 \mu\text{m}^2$ (3). Die Zellen sind weder kreisrund noch bilden sie sehr viele Zellausläufer. B: Die in A erkennbare Größe und zweidimensionale Morphologie ist typisch für Pankreas-Sternzellen, die Fläche unstimulierter Zellen beträgt im Mittel $3193 \mu\text{m}^2$, der Strukturindex liegt bei Werten um 0,5. Ein signifikantes Abweichen von dieser Größe und Morphologie nach Vorbehandlung mit Panc-1- bzw. Colo-357-Überstand wurde nicht festgestellt. $n \geq 20$ Zellen je Bedingung bei ≥ 4 Experimenten.

3.4.2 Migration unbehandelter und stimulierter Pankreas-Sternzellen unter Zugabe des $K_{Ca}3.1$ -Kanalblockers TRAM-34

Die Blockade des zuvor nachgewiesene $K_{Ca}3.1$ -Kanals mittels TRAM-34 sollte in dieser Versuchsreihe Auskunft über dessen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Sternzellen liefern.

Geschwindigkeit

Zunächst wurde ein Einfluss des Dimethylsulfoxid (DMSO), in dem der Hemmstoff TRAM-34 gelöst wurde, durch vergleichende Migrationsversuche ausgeschlossen: Die mit DMSO versetzten Zellen migrierten weder schneller, noch langsamer als die Kontrollzellen (Abb. 17).

In Folge wurde den unstimulierten Zellen TRAM-34 zugefügt, ein signifikanter Effekt dessen konnte nicht beobachtet werden, die Inaktivierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals machte die Zellen nur unwesentlich langsamer (Geschwindigkeitsminderung um ca. 3%).

Der Geschwindigkeitsanstieg der Sternzellen unter Panc-1-Überstand wurde durch Zugabe von TRAM-34 unterdrückt: Anstatt der erreichten Geschwindigkeit von $0,69 \pm 0,07 \mu\text{m}/\text{min}$ ohne TRAM-34 erreichten die Zellen mit TRAM-34 nur $0,45 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$, was der Geschwindigkeit der unstimulierten Zellen entspricht.

Die Colo-357-Stimulation rief wie in vorherigen Versuchen die stärkste Geschwindigkeitszunahme hervor, die Zellen waren mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,98 \pm 0,09 \mu\text{m}/\text{min}$ mehr als doppelt so schnell wie die unbehandelten Zellen. Die Blockade des $K_{Ca}3.1$ -Kanals durch TRAM-34 hob zwar diese Geschwindigkeitszunahme nicht gänzlich auf, jedoch war der Anstieg weitaus weniger ausgeprägt als ohne TRAM-34-Zugabe (*mit* TRAM-34: 62% schneller als die unstimulierten Kontrollzellen vs. *ohne* TRAM-34: 117% schneller als die unstimulierten Kontrollzellen).

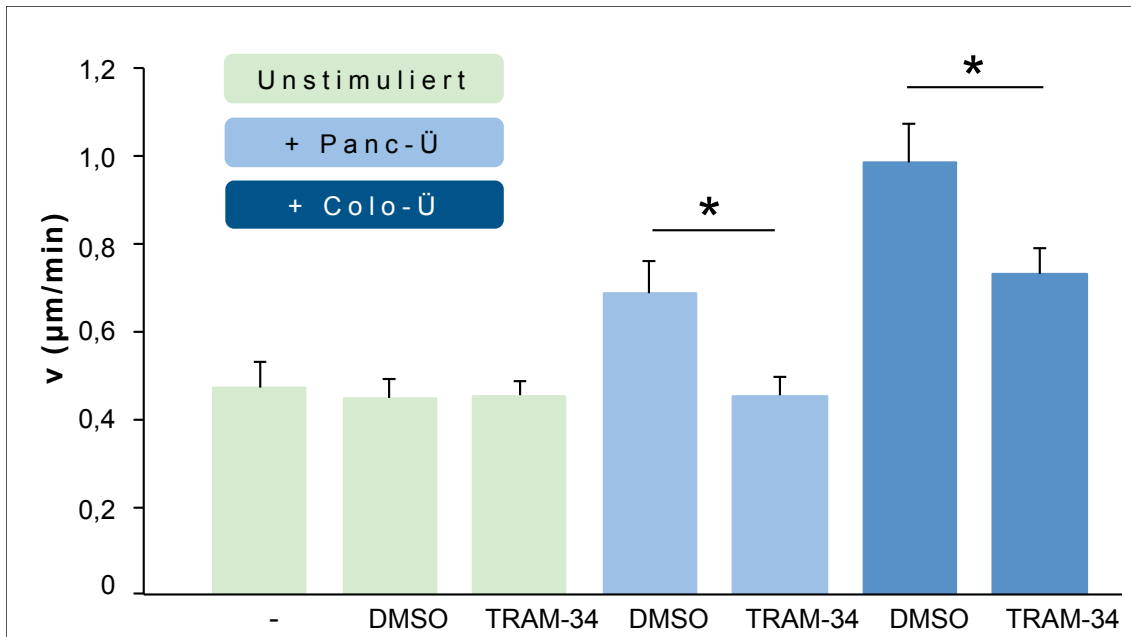


Abb. 17: Geschwindigkeiten der Sternzellen, Einfluss des Hemmstoffes TRAM-34. Das Lösungsmittel DMSO hat keinen Einfluss auf die Bewegung der unstimulierten Zellen, der Blocker TRAM-34 ebenfalls nicht (grün). Nach Vorbehandlung mit dem Panc-1-Überstand (hellblau) migrieren die Sternzellen schneller. Der Einfluss des TRAM-34 ist sehr deutlich, die Geschwindigkeit nimmt signifikant bis auf die Werte der unstimulierten Zellen ab. Die mit Colo-357-Überstand vorbehandelten Sternzellen (dunkelblau) zeigen dasselbe: Der Überstand stimuliert die Zellen zur Migration, die Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals mindert diesen Effekt. $n=20$ Zellen je Bedingung aus ≥ 3 Experimenten.

Gesamtstrecke und Translokation

Zwischen den unstimulierten Zellen *mit* und jenen *ohne* TRAM-34-Zusatz wurden keine signifikanten Unterschiede in den zurückgelegten Gesamtstrecken gemessen, sie bewegten sich in drei Stunden wie in der vorherigen Versuchsreihe im Mittel ca. 100 μm (Abb. 18).

Der stimulierende Effekt des Pankreaskarzinomzell-Überstands wurde in dieser Versuchsreihe reproduziert: unter Vorbehandlung wurde gemittelt eine um 45 μm (Panc-1) bzw. 100 μm (Colo-357) längere Gesamtstrecke als bei den unstimulierten Zellen gemessen (Abb. 19). Unter TRAM-34-Zugabe wurde die Streckenzunahme hingegen nicht mehr gleichermaßen erreicht: Unter Colo-357-Einfluss *inklusive* TRAM-34-Zusatz war die Gesamtstrecke im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nur

noch 42 μm länger (*ohne* TRAM-34: 100 μm länger). Die mit Panc-1-Überstand stimulierten Zellen kamen unter der Blockade gar nicht mehr signifikant weiter voran (zurückgelegte Strecke im Mittel: $95,0 \pm 7,2 \mu\text{m}$). Die Ergebnisse der Streckenmessungen stehen in logischer Korrelation mit den Ergebnissen der Geschwindigkeitsmessungen (die Zugabe von TRAM-34 führte unter stimulierten Bedingungen zu einer Abnahme der Geschwindigkeit, einhergehend mit einer Verminderung der zurückgelegten Strecke).

Die Translokation unterschied sich nicht signifikant zwischen den unstimulierten und den mit Panc-1-Überstand stimulierten Zellen: Sowohl mit als auch ohne TRAM-34-Zugabe verschoben sich die Zellen entlang eines Vektors der Länge von ca. 50 μm . Dies ist deutlich kürzer, als die tatsächlich zurückgelegte Strecke, was in Bezug auf die Direktionalität bedeutet, dass die Zellen vom *direkten* Weg zwischen Start- und Endpunkt stark abgewichen sind.

Die Translokation der mit Colo-357-Überstand stimulierten Zellen war deutlich weiter als unter den übrigen Bedingungen ($110,7 \pm 16,1 \mu\text{m}$), korrelierend mit der höheren Geschwindigkeit und der längeren Gesamtstrecke. Unter TRAM-34 war die stimulatorische Eigenschaft des Colo-357-Überstands nicht zu beobachten. Die beschriebene Erhöhung der Gesamtstrecke unter Stimulation mit Karzinomzell-Überstand und deren Unterdrückung durch die Blockade des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals durch TRAM-34 werden durch die Darstellung der einzelnen Trajektorien zu den jeweiligen Bedingungen sehr deutlich (Abb.17).

Das Verhältnis zwischen Translokation und Gesamtstrecke lässt sich mit Hilfe des Direktionalitätskoeffizienten rechnerisch darstellen: Ist die Entfernung zwischen Start- und Endpunkt T gleich der insgesamt zurückgelegten Strecke G, ist die Zelle *ohne Abweichung vom direkten Weg* migriert: $T:G=1$. Je stärker die insgesamt zurückgelegte Strecke vom direkten Weg abweicht, desto kleiner wird der Direktionalitätskoeffizient ($T:G<1$). Unter TRAM-34 nimmt der Direktionalitätskoeffizient der Sternzellen ab (Unstimuliert $T:G=0,43 \pm 0,05$ *ohne* vs. $0,32 \pm 0,04$ *mit* TRAM-34; stimuliert: $T:G=0,63 \pm 0,10$ *ohne* vs. $0,47 \pm 0,05$ *mit* TRAM-34). TRAM-34 reduziert also durch die Blockade des $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals die Direktionalität der Sternzellen, sie scheinen punktuell

„festgeklebt“ und drehen sich um die eigene Achse, anstatt sich geradlinig fortzubewegen.

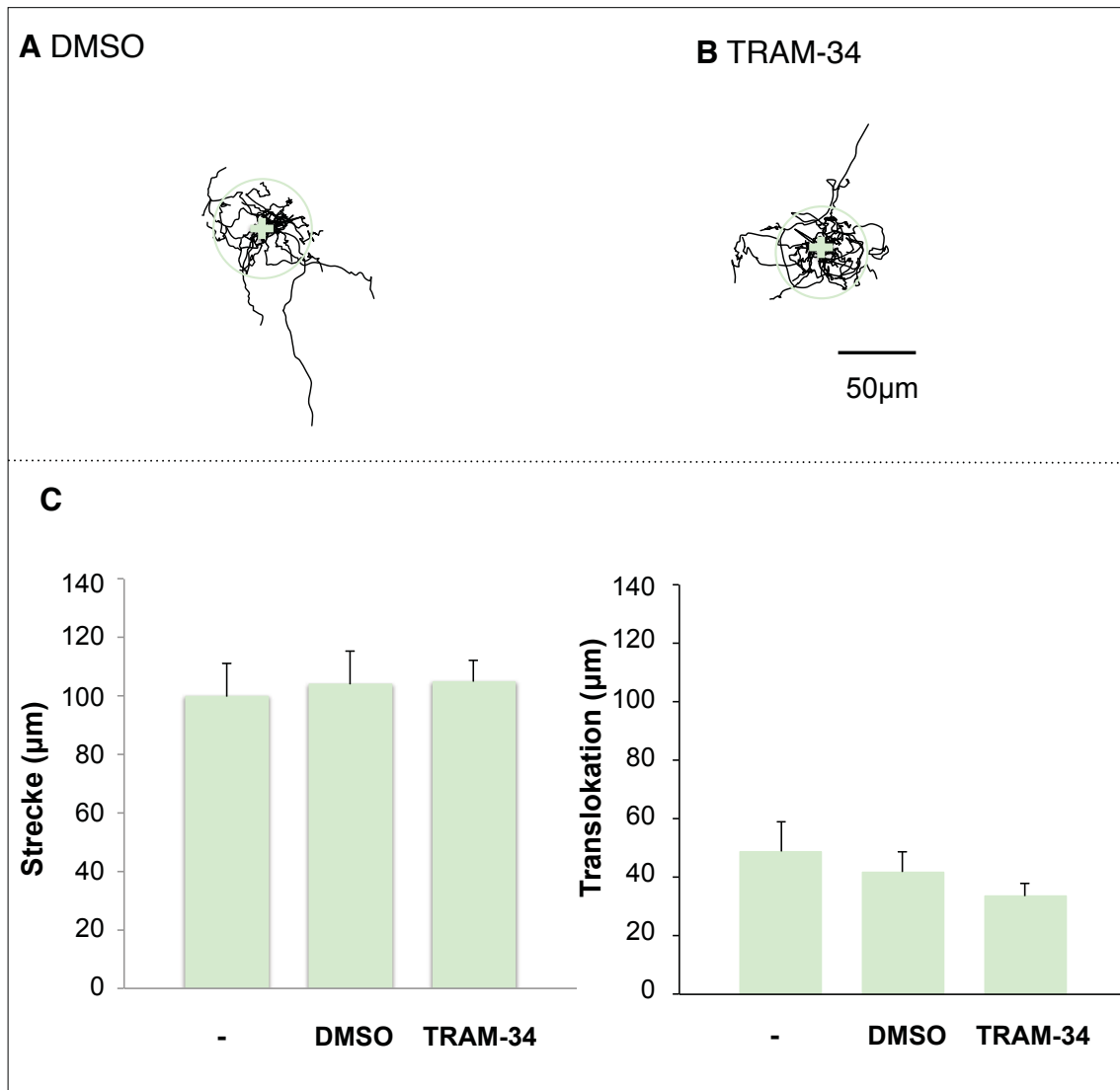


Abb. 18: Gesamtstrecke und Translokation der unstimulierten Sternzellen. A zeigt die zurückgelegten Gesamtstrecken der Sternzellen unter DMSO-Einfluss, den Zellen in B wurde der Hemmstoff des $K_{Ca3.1}$ -Kanals TRAM-34, gelöst in DMSO, zugefügt. Der Radius der Kreise markiert jeweils die gemittelte Translokation der Zellen. In C ist die statistische Auswertung der Translokation und der Gesamtstrecke unter den verschiedenen Bedingungen aufgeführt, signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt. $n=20$ Zellen je Bedingung aus ≥ 3 Experimenten.

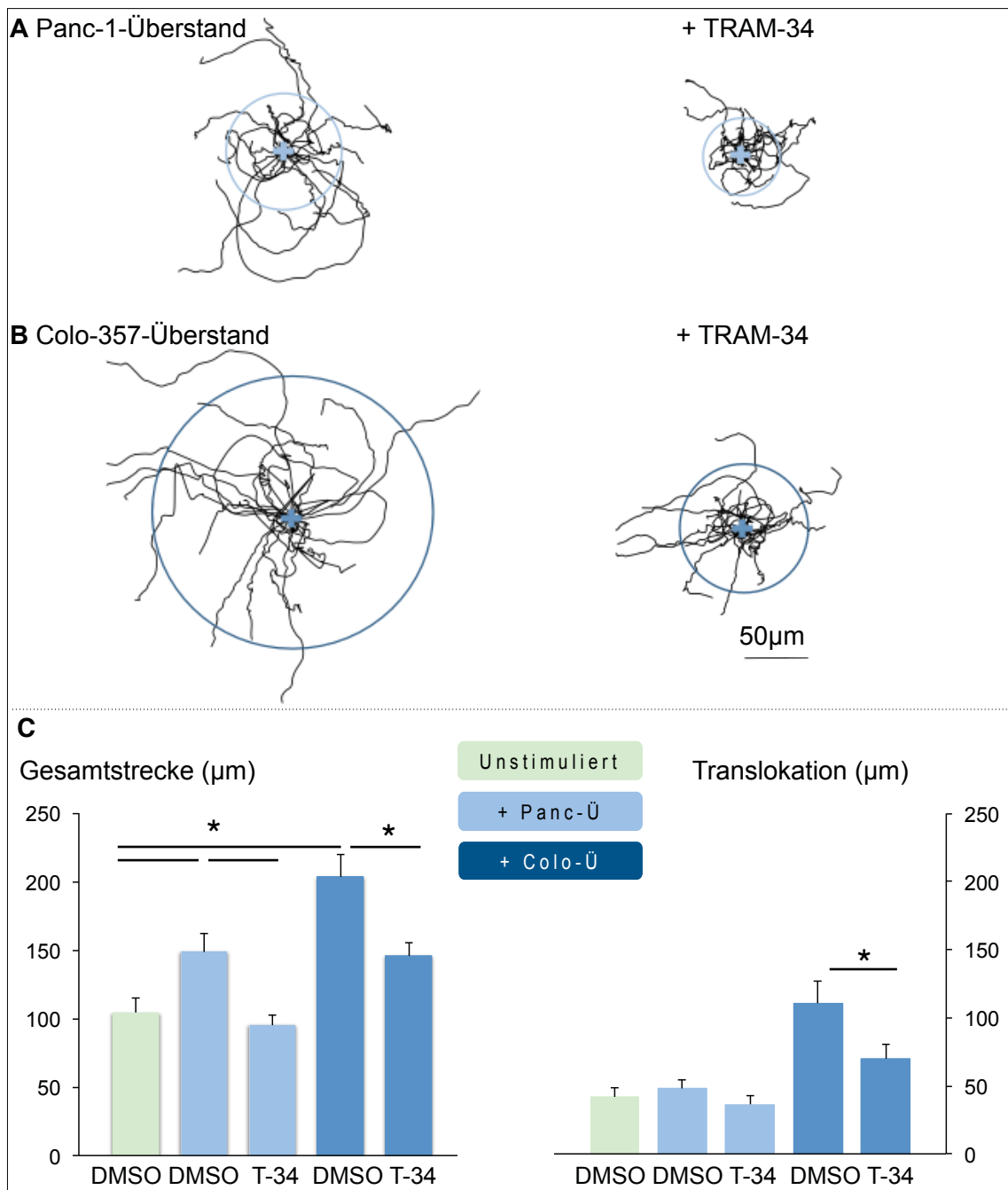


Abb. 19: Strecke und Translokation der stimulierten Sternzellen, Einfluss von TRAM-34. Unter A sind links die zurückgelegten Wege der Panc-1-stimulierten migrierenden Sternzellen zu sehen (+DMSO). Rechts sind die Wege der Sternzellen, ebenfalls unter Panc-1-Überstand, und mit Zugabe von TRAM-34 (T-34) abgebildet. Der Unterschied ist eindeutig, die zurückgelegte Strecke ist unter TRAM-34-Einfluss deutlich reduziert. Die links unten (B) sehr weit laufenden Zellen stehen unter Einfluss von Colo-357-Überstand und DMSO. Rechts davon sind die Wege ebenfalls unter Colo-357-Überstand migrierender Zellen dargestellt, hier jedoch unter Zugabe von TRAM-34, wodurch die Wegstrecke im Mittel stark gemindert ist. Der Radius der Kreise steht jeweils für die Translokation, die unter TRAM-34-Zugabe verringert ist. Unter C ist die statistische Auswertung der Ergebnisse dargestellt. n=20 Zellen je Bedingung aus ≥ 3 Experimenten.

4. Diskussion

4.1 Einleitung

Dem Calcium-abhängigen Kalium-Kanal $K_{Ca3.1}$ werden in der Literatur vielfältige Funktionen zugeschrieben, so zum Beispiel ein Einfluss auf den Calcium-Haushalt und den damit verbundenen intrazellulären Prozessen¹⁰⁰. Des Weiteren wird sein Mitwirken an den Vorgängen der Migration beschrieben⁷⁹.

Ziel der Arbeit war es, erstmals die Expression und die Funktion des $K_{Ca3.1}$ -Kanals in immortalisierten Pankreas-Sternzellen zu untersuchen. Es wurden

1. Western-Blot-, Immunfluoreszenz- und Patch-Clamp-Analysen zur Untersuchung der Expression und Aktivität des Kanals, sowie
2. intrazelluläre Calcium-Messungen und Migrationsexperimente zur funktionellen Untersuchung des Kanals durchgeführt.

Pankreas-Sternzellen stehen in einem engem Zusammenhang mit Pankreaskarzinomzellen: Über die Sekretion von Mediatoren stimulieren die beiden Zelltypen unter anderem die gegenseitige Migration⁷. In allen Versuchsreihen wurde der Einfluss von Pankreaskarzinomzellen untersucht. Durch das Zusammenbringen der Sternzellen mit Karzinomzellüberstand sollten mögliche Effekte reproduziert werden. Um stets ein „Zufallsergebnis“ auszuschließen wurden in allen Versuchsreihen parallel zwei unterschiedliche Karzinomzell-Linien verwendet. Da sich Sternzellen in vitro nach einiger Zeit selbst aktivieren, wurde streng darauf geachtet, dass die Sternzellen maximal nur bis zur siebten Passage verwendet wurden.

4.2 Untersuchung der Expression und Aktivität des $K_{Ca3.1}$ -Kanals

Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Expression des $K_{Ca3.1}$ -Kanals untersucht. In unstimulierten Zellen wurde eine deutliche Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts sichtbar. Die mehrfache Reproduktion unter variierendem Einsatz der Antikörper-Menge präziserte die Aussagekraft der Western-Blots.

Untersuchungen der Kanalexpression wurden auch in mit Karzinomzell-Überstand-stimulierten Zellen durchgeführt. Um einen direkten Vergleich mit den unbehandelten Zellen machen zu können, wurde bereits bei der Lysatherstellung auf die gleichen Vorbedingungen geachtet: Eine Sternzell-Kolonie wurde gesplittet und auf drei verschiedene Zellkulturschalen verteilt. Jeder Schale wurde das spezifische Medium hinzugefügt und nach der Wachstumszeit wurden aus allen drei Kulturen zum gleichen Zeitpunkt Protein-Lysate angefertigt. Um zu verifizieren, dass die Ergebnisse nicht bedingt durch feine Unterschiede in der Auftragsmenge verfälscht wurden, wurde jeder Versuch auch gegen ein sog. Housekeeping-Gen (ein Gen, dass unter allen Bedingungen gleichmäßig exprimiert wird), durchgeführt. Dadurch ließen sich die Proteinmengen vergleichend abschätzen. Die Versuche ergaben eine klare Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals unter allen Bedingungen, eine verstärkte Expression unter Stimulation ließ sich jedoch auf diesem Wege nicht zeigen.

Durch die Western-Blot-Analysen wurde erstmals der $K_{Ca}3.1$ -Kanal in den Sternzellen nachgewiesen, wodurch die Grundlage für dessen genaue funktionelle Charakterisierung in den Sternzellen geschaffen wurde. Interessant wäre, ob eine „Verfeinerung“ der Versuchsbedingungen durch Stimulation mit *einem* speziellen Mediator der Karzinomzellen anstelle des gesamten Überstandes eine verstärkte Expression des Kanals ergeben würde. So hat beispielsweise die Stimulation von glatten Muskelzellen mit TGF- β eine erhöhte Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals zur Folge⁸⁹ - vielleicht hat dieser von den Pankreaskarzinomzellen ebenfalls sezernierte Wachstumsfaktor durch *direkte* Stimulation der Sternzellen den selben Effekt.

Die Immunfluoreszenz-Versuche dienten ebenfalls dem Expressions-Nachweis des $K_{Ca}3.1$ -Kanals. Die Idee war, die Expression auf verschieden Wegen zu belegen, um eine mehrfach gesicherte Aussage treffen zu können. Die Darstellung des Kanals gelang in allen Versuchsreihen. So konnte man zusammen mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen die Expression des Kanals sicher bestätigen. Darüber hinaus bieten die Ergebnisse eine Einschätzung der Lokalisation des Kanals, was für zukünftige Versuche von Vorteil sein kann: So können Kolo-kalisationen zu anderen Ionenkanälen oder Bestandteilen der Membran erforscht werden. Schließlich kann es vielleicht irgendwann

gelingen, die Membran der Sternzellen in Zusammensetzung und lokalem Verteilungsmuster zu charakterisieren.

Die Patch-Clamp-Analyse diente nach vorhergegangenem Expressions-Nachweis durch Western Blot und Immunfluoreszenz nun der *funktionellen* Untersuchung des $K_{Ca3.1}$ -Kanals. Durch die etablierten Aktivatoren und Blocker 1-EBIO und Clotrimazol und die durch sie hervorgerufenen Verschiebungen der Umkehrpotenziale der Stromspannungskurven konnte das Vorhandensein aktiver $K_{Ca3.1}$ -Kanäle in der Plasmamembran der Sternzellen sicher belegt werden.

4.3 Calcium-Messungen

Basierend auf der funktionellen Expression des $K_{Ca3.1}$ -Kanals konnten nun Untersuchungen zu seiner Funktion in den Sternzellen durchgeführt werden. In den Versuchsreihen sollte getestet werden, ob der Kanal Einfluss auf den Calcium-Haushalt der Sternzellen nimmt. Die gewählte Methode hatte sich zuvor in vielen Projekten im eigenen Institut und darüber hinaus bewährt^{66 80 84}. Vor allem aber sollte auch der Einfluss der Zellstimulation durch den Karzinomzellüberstand auf die Aktivität des Kanals untersucht werden. Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zeigten erstmals Unterschiede zwischen Kontroll- und stimulierten Zellen: Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Calcium-Konzentration in den stimulierten Zellen deutlich höher war als in den unbehandelten Zellen. Der Literatur kann entnommen werden, dass

1. die intrazelluläre Calcium-Konzentration in *aktivierten* Sternzellen im Vergleich zu ruhenden Sternzellen in erhöhter Konzentration gemessen worden ist¹⁰⁹,
2. unter Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und TGF- β die intrazelluläre Calcium-Konzentration in vielen Zellen ansteigt^{63 77}.

Dies lässt schlussfolgern, dass

1. die durch Karzinomzell-Überstand stimulierten Zellen höhergradig aktiviert waren, als die unstimulierten Zellen, was z.B. auf die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β und

FGF-2, die allesamt von den Karzinomzellen sezerniert werden, zurückzuführen sein könnte ⁶⁹.

2. die beiden von Pankreaskarzinomzellen nachweislich ^{69 107} sezernierten Wachstumsfaktoren EGF und TGF- β den beschriebenen Effekt des konditionierten Mediums auf die Sternzellen induziert haben könnten.

Durch die Reaktion auf die Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals konnte dessen Einfluss besonders in den *aktivierten* Sternzellen gezeigt werden: TRAM-34 wirkte sich auf diese Zellen sehr viel deutlicher aus als auf unstimulierte Sternzellen, es kam zu einem Absinken der intrazellulären Calcium-Konzentration. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass die Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals eine Depolarisation des Membranpotenzials bewirkt. Dadurch reduziert sich die elektrochemische Triebkraft für den Calcium-Einstrom (z.B. durch TRP-Kanäle), resultierend in einer erniedrigten Calcium-Konzentration im Intrazellulärraum ²⁵. Die Tatsache, dass dieser Effekt nur in den aktivierten Sternzellen beobachtet wurde, zeigt, dass Mediatoren im konditionierten Medium Einfluss auf den $K_{Ca3.1}$ -Kanal genommen haben müssen (z.B. indirekt, Rezeptor-vermittelt, s.u.).

Viele vorangegangene Untersuchungen beschreiben den aktivierenden Effekt der Pankreaskarzinomzellen auf das Verhalten der Sternzellen ^{9 69}. Ein Einfluss auf Ionenkanäle wurde bislang aber nicht untersucht. Die Ergebnisse zeigen also erstmals, dass die Karzinomzellen offenbar auch auf die Ionenkanäle der Sternzellen wirken können. Eine weiterführende Frage wäre nun, über welchen Mechanismus die von den Karzinomzellen sezernierten Stoffe auf den $K_{Ca3.1}$ -Kanal wirken. In der Literatur sind verschiedene modulierende Mechanismen in anderen Zelltypen beschrieben ¹²:
Modulation durch

1. direktes Binden von Calcium an Calmodulin und dessen Interaktion mit dem C-Terminus des Kanals. Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch die Mediatoren der Karzinomzellen wurde gezeigt, so kann man vermuten, dass die Mediatoren via Calmodulin die Aktivität des $K_{Ca3.1}$ -Kanals stimulieren. Offen bleibt, ob der Calcium-Anstieg durch Einstrom aus dem Extrazellulärraum oder aus

- intrazellulären Speichern (z.B. aus dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Zellkern) bedingt ist.
2. Förderung der Kanal-Transkription: Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und REST wirken fördernd bzw. hemmend auf die Expression des $K_{Ca3.1}$ -Kanals (MAP-Kinase-Signalweg). Ein Expressions-Unterschied durch den Karzinomzell-Überstand konnte in unseren Versuchen nicht gezeigt werden, was entweder nahe legt, dass keiner der enthaltenen Mediatoren auf die Transkriptionsfaktoren wirkte, oder aber, dass die Dauer der Stimulation zu kurz war.
 3. Kinase-Aktivität: Durch direkte Phosphorylierung der alpha-Untereinheit des Kanals kann beispielsweise die Nukleotid-Diphosphat-Kinase NDPK die Kanalaktivität modulieren, indirekt wirkende Kinasen sind die Proteinkinase A und C (PKA, PKC) und die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Letztere wird beispielsweise durch den Wachstumsfaktor PDGF aktiviert, dieser wird nachweisbar von den Pankreaskarzinomzellen sezerniert. Auch der entsprechende Rezeptor des PDGF (PDGF-R) wurde bereits in den Sternzellen nachgewiesen^{4 78}. So ergibt sich hier ein möglicher Signalweg, über den der Karzinomzell-Überstand die Aktivität des $K_{Ca3.1}$ -Kanals moduliert haben könnte.
 4. Einfluss auf den exozytotischen Einbau bzw. den endozytotischen Abbau des Kanals: Möglicherweise hat einer der Mediatoren stimulatorisch auf den $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Einbau in die Membran gewirkt (oder den Abbau gehemmt) und dadurch die absolute Zahl der Kanäle erhöht, was ebenfalls die stärkere Aktivität unter Karzinomzell-Überstand erklären könnte.

Die Hypothesen über die Modulationswege der Pankreaskarzinomzellen auf die Aktivität des $K_{Ca3.1}$ -Kanals in den Sternzellen könnten durch spezifischere Versuchsbedingungen konkretisiert werden. Beispielsweise könnte man das konditionierte Medium durch einzelne Mediatoren ersetzen und deren Wirken auf intrazelluläre Signalwege untersuchen.

Die Versuchsreihe unter Hochkalium-Lösung stellte in Analogie zur Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals den Effekt der Membrandepolarisation auf den Calcium-Haushalt dar. So

sollte, genau wie unter Blockade des Kanals, eine Membrandepolarisation durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration ein Absinken der Calcium-Konzentration zur Folge haben. Genau dies wurde durch die Zufuhr einer Hochkalium-Lösung unter allen drei Versuchsbedingungen gezeigt. Vor allem die schnelle Reversibilität verdeutlichte den direkten Einfluss des Kaliums. Die anschließende Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals mittels TRAM-34 reproduzierte den bereits beschriebenen Effekt vor allem in den aktivierten Sternzellen.

4.4 Migrationsexperimente

Die nachgewiesene Expression des $K_{Ca3.1}$ -Kanals in den Sternzellen gab Anlass, seinen Einfluss auf deren migratorischen Eigenschaften zu untersuchen. Zuvor sollte jedoch sichergestellt werden, dass der bereits in der Literatur beschriebene Einfluss der Karzinomzellen auf die Migration der Sternzellen auch mit unseren Zellen reproduziert werden kann. Die Ergebnisse waren eindeutig, die Überstands-stimulierten Zellen wanderten deutlich schneller und weiter. In der Literatur wird für diesen Effekt vor allem der von den Tumorzellen sezernierte Wachstumsfaktor PDGF verantwortlich gemacht⁷³. Über den in den Sternzellen nachgewiesenen PDGF-Rezeptor^{4 78} führt er intrazellulär zur Aktivierung verschiedener Kinasen, z.B. der PI3-Kinase. Über weitere Signalwege wird schließlich die Serin/Threonin-Kinase Akt aktiviert, welche auf die migratorischen Fähigkeiten der Sternzellen wirkt. Auch die ebenfalls über den PDGF/PI3-Kinase-Signalweg aktivierte MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 tragen zur Migration der Sternzellen bei⁶¹.

Durch Migrations-Studien mit PDGF konnte über die intrazellulären Signalwege hinaus festgestellt werden, dass PDGF stark chemotaktisch wirkt⁷³. Unter unseren Versuchsbedingungen war jedoch kein Chemokin-Gradient vorhanden, was die stark ungerichtete Bewegung der Zellen erklären könnte.

Die Variation der Matrices sollte unterschiedliche Umgebungsbedingungen der Sternzellen nachstellen: Die physiologische Umgebung sollte durch Basalmembran-ähnliche Komponenten nachempfunden werden, die patho-physiologische fibrotische Umgebung durch eine desmoplastische Matrix. Offenbar erleichterte letztere die

Migration der Zellen, sie kamen auch unstimuliert schneller voran, die fokalen Kontakte konnten möglicherweise leichter gelöst werden. Es lässt sich deshalb vermuten, dass die Migration der Sternzellen zum einen durch die Mediatoren der Karzinomzellen erleichtert werden kann, zum anderen aber auch durch die von den aktivierten Sternzellen selbst hervorgerufene desmoplastische Umgebung. Entscheidend an den Vorversuchen war neben der Reproduktion der aus der Literatur bekannten Ergebnisse mit „unseren“ Zellen, dass Bedingungen herausgefunden wurden, unter denen die Sternzellen gut zu untersuchen waren. So konnte eine gute Ausgangsbasis für die folgende Versuchsreihe zum $K_{Ca3.1}$ -Kanal geschaffen werden.

Die Versuchsreihe ergab, dass die Blockade des $K_{Ca3.1}$ -Kanals mit TRAM-34 die Migrationsgeschwindigkeiten der stimulierten Zellen minderte. Ein Effekt des Blockers bei den unstimulierten Zellen war jedoch nicht zu verzeichnen. Die logische Schlussfolgerung ist, dass der $K_{Ca3.1}$ -Kanal an der Stimulation der Sternzell-Migration durch den Karzinomzell-Überstand beteiligt ist, denn durch seine Hemmung scheint der stimulierende Effekt nicht mehr gegeben zu sein. Auf den Punkt gebracht bewirkt der Karzinomzell-Überstand einen gesteigerten Einfluss des $K_{Ca3.1}$ -Kanals auf die migratorischen Prozesse der Sternzellen. Wieder ist die Frage, *welcher* Mechanismus dieser Erkenntnis zugrunde liegt.

Zunächst ist folgendes Zusammenspiel des $K_{Ca3.1}$ -Kanals mit den Prozessen der Migration festzuhalten:

1. Die Retraktion des hinteren Zellteils wird durch die Volumenregulation mittels der $K_{Ca3.1}$ -Kanäle unterstützt.
2. Die Kanäle haben Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration und damit auf die von dieser abhängigen migratorischen Prozesse (Aktinpolymerisation; Ausbildung fokaler Kontakte)⁴⁷.
3. Sie interagieren mit *direkt* an der Migration beteiligten Modulatoren (z.B. Integrine, FAK, Cortactin)⁷⁹.

Der letzte Punkt ist vor allem mit der Beobachtung zusammenzuführen, dass unter Blockade des Kanals mit TRAM-34 die Direktionalität der Sternzellen abnimmt: Durch die verminderte $K_{Ca3.1}$ -Kanal-Aktivität ist der Anstieg der intrazellulären Calcium-

Konzentration im Zuge der Migration vermindert. Die Calcium-getriggerte Lösung von Zell-Matrix-Kontakten am Hinterende ist beeinträchtigt, und die Zelle kann ihr Hinterende nicht lösen⁷⁹. Dadurch bedingt ist nicht nur die gesamte Fortbewegung verlangsamt, sondern auch die geradeaus gerichtete Migration wird erschwert: Es bildet sich möglicherweise ein Fixpunkt am Hinterende der Zelle, um den sich der vordere Teil herumbewegt, bis der Zelle schließlich die Deadhäsion gelingt.

Ebenso könnte die durch TRAM-34 gehemmte Wirksamkeit von Chemokinen die Direktionalität der Zellen vermindern: In den Sternzellen wurde beispielsweise der Chemokin-Rezeptor EGF-R nachgewiesen, dessen Ligand EGF (von den Pankreas-karzinomzellen sezerniert!) über den PI3K-Signalweg die $K_{Ca}3.1$ -Kanäle aktivieren kann. Durch TRAM-34 kann diese Wirkung blockiert werden, und die Chemokin-induzierte *direktionale* Migration wird erschwert^{12 31 87 91}.

Der Beitrag zu den unter 1.-3. beschriebenen Prozessen der Migration nimmt vermutlich durch Stimulation der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle zu. Die möglicherweise durch den Karzinom-zellüberstand bedingten modulatorischen Mechanismen wurden bereits erläutert und lassen sich auf die Migrationsversuche übertragen: Steigt die Expression bzw. Aktivität der Kanäle, wird folglich auch ihr Beitrag zu den Prozessen der Migration höher.

Als ein möglicher Modulator könnte erneut der Wachstumsfaktor PDGF in Frage kommen: Bezogen auf den $K_{Ca}3.1$ -Kanal konnte an Gefäßmuskelzellen gezeigt werden, dass die Migrations-stimulierende Eigenschaft von PDGF unter Hemmung des Kanals aufgehoben wird. Vermittelt über den MAP-Kinase-Signalweg wird der $K_{Ca}3.1$ -Kanal moduliert, und es werden dadurch migratorische Prozesse erleichtert^{81 98 99}. Ähnlich dieses Modulationsweges könnten vermutlich weitere Wachstums-faktoren, z.B. FGF-2 auf die $K_{Ca}3.1$ -Kanäle der Sternzellen wirken^{44 98}. Natürlich können es auch viele weitere im Karzinomzellüberstand vorhandene Mediatoren sein, die modulierend auf die $K_{Ca}3.1$ -Kanäle wirken und dadurch bedingt die beobachteten Effekt hervorrufen. Dies gilt es, genauer zu untersuchen, um die Interaktion zwischen Pankreassternzellen und Karzinomzellen in Bezug auf den $K_{Ca}3.1$ -Kanal weiter zu spezifizieren.

In Abbildung 18 sind die beschriebenen Wege der möglichen Modulation des $K_{Ca3.1}$ -Kanals sowie sein Wirken auf die Migration der Sternzellen schematisch zusammengefasst.

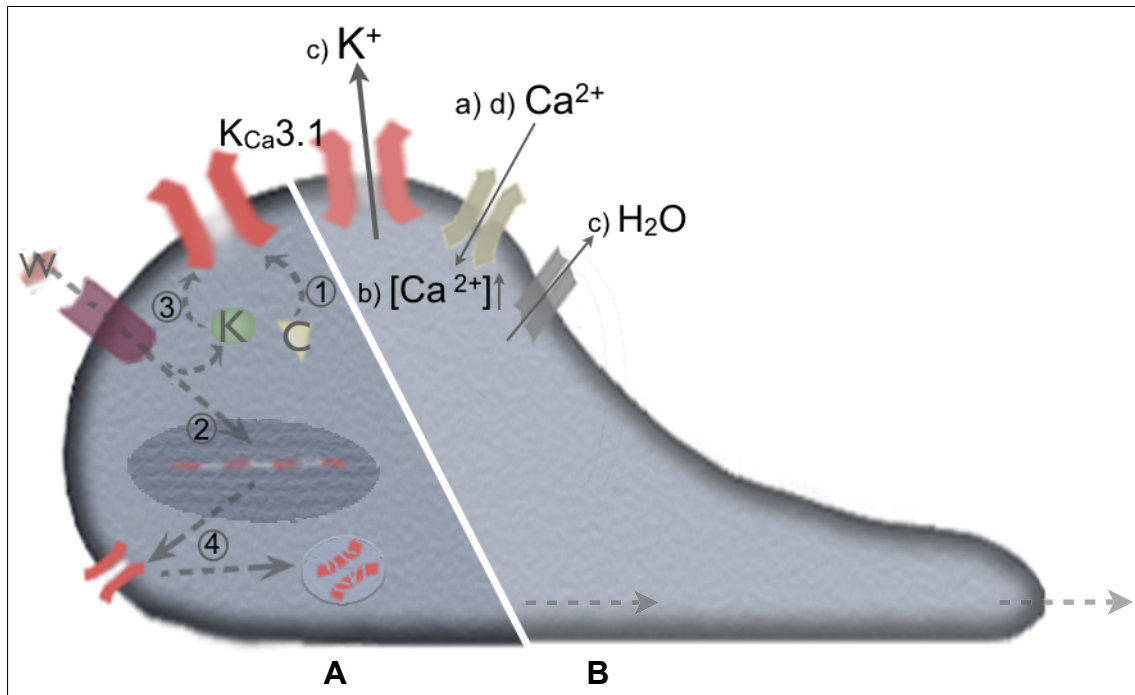


Abb. 18: Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal in den Pankreas-Sternzellen (modifiziert nach Schwab et al. 2012 & Franciolini et al. 2012). **A: Modulationsmöglichkeiten des $K_{Ca3.1}$ -Kanals.** Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal kann moduliert werden durch 1. das Binden von Calcium an Calmodulin (C) und dessen direkte Interaktion mit dem Kanal, 2. durch Einfluss auf die Transkription über den MAP-Kinase-Signalweg, der wiederum u.A. durch Wachstumsfaktoren (W) aktiviert wird, 3. durch Aktivität verschiedener Kinasen (K), z.B. PKA, PKC & PI3K, die ebenfalls durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden können, 4. durch Einfluss auf den exozytotischen Einbau bzw. den endozytotischen Abbau des Kanals. **B Einfluss des Kanals auf die Migration:** Im Zuge der migratorischen Prozesse der Sternzellen im vorderen Zellteil wird die Zellmembran im hinteren Zellteil unter Spannung gesetzt, was zur Öffnung mechanosensitiver Ca^{2+} -Kanäle (grün) und dadurch bedingten Ca^{2+} -Einstrom führen kann (a). Die nun lokal erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ (b) aktiviert $K_{Ca3.1}$ -Kanäle (rot) im hinteren Zellteil, es kommt zum Ausstrom von K^+ und osmotisch bedingt auch von H_2O (c). Der dadurch bedingte Volumenverlust im hinteren Zellteil unterstützt dessen Retraktion. Die ebenfalls durch den K^+ -Ausstrom bedingte Hyperpolarisation der Zellmembran führt zu weiterem Einstrom von Ca^{2+} (d), der resultierende weitere Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wirkt ebenfalls fördernd auf die Migration.

4.5 Ergebnisse im Zusammenhang

Die Sternzellen konnten durch die durchgeführten Versuche erstmals hinsichtlich ihrer Expression von Ionenkanälen charakterisiert werden. Zudem konnte der nachgewiesene Kanal funktionell durch verschiedene Versuche eingeordnet werden. Vor allem die Ergebnisse im Zusammenspiel mit den Karzinomzell-Überständen verdeutlichen aus neuer Perspektive die Relevanz der Interaktion zwischen Pankreassternzellen und Karzinomzellen. Deren gegenseitige Stimulation bedeutet schließlich immer indirekt ein Vorantreiben der Karzinom-Progression, vor allem durch das Hervorrufen der Desmoplasie und der Förderung der Tumorinvasion.

Auf die Ergebnisse der Arbeit bezogen kann man zusammenfassen, dass eine kleine Basis für fortführende Versuche auf diesem Gebiet geschaffen wurde. So wäre es von Bedeutung, in Zukunft herauszufinden, auf welchem Wege genau der Karzinomzell-Überstand über den $K_{Ca3.1}$ -Kanal die Sternzell-Aktivierung beeinflusst. Und welcher der vielen beschriebenen, von den Tumorzellen sezernierten Mediatoren liegt den beobachteten Prozessen zugrunde? Eine direkte Stimulation mit den auf die Sternzellen wirkenden Wachstumsfaktoren, z.B. EGF oder PDGF, könnte weitere Schlüsse bezüglich der Einflüsse von Pankreaskarzinomzellen auf die Sternzellmigration bringen. Über all dieses hinaus wäre es von Nutzen, ein Tiermodell zu etablieren, um über genetische Modifizierung den $K_{Ca3.1}$ -Kanal auszuschalten und seine Funktionen auf diesem Wege noch tiefer zu charakterisieren und die Interaktion von Stern- und Tumorzellen weiter zu verstehen.

Abschließend kann im groben Zusammenhang gesagt werden, dass durch jede genauere Erforschung dieses Zusammenspiels neue kleine Angriffspunkte für die Unterdrückung der Tumor-Progression geschaffen werden können. Diese könnten eines Tages vielleicht Fortschritte in Diagnose und Therapie des Pankreaskarzinoms ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

1. Adler G, Bischoff SC, Seufferlein T, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegler W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I (2007) S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 45: 1–37
2. Andoh A, Takaya H, Saotome T, Shimada M, Hata K, Araki Y, Nakamura F, Shintani Y, Fujiyama Y, and Bamba T (2000) Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1 and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Gastroenterology* 119: 211–219
3. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS (1998) Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas- identification, isolation, and culture. *Gut* 43: 128–33
4. Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS (1999) Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines. Implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44: 534–541
5. Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS (2004) Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29: 179–187
6. Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Naidoo D, Wilson JS (2000) Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 118: 780–794
7. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS (2012) Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol* 3: 344
8. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G (1998) Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115 (2): 421–432
9. Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M et al (2005) Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128: 907–21
10. Bissell MJ, Radisky D (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1: 46–54
11. Brugnara C, Gee B, Armsby CC, Kurth S, Sakamoto M, Rifai N, Alper SL, Platt OS (1996) Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest* 97: 1227–34
12. Catacuzzeno L, Fioretti B, Franciolini F (2012). Expression and role of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel $K_{Ca}3.1$ in glioblastoma. *J Signal Transduct* 2012: 421564
13. Cramer LP (2010) Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration. *Nat Cell Biol* 12: 628 – 632

14. Cruse G, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P (2006) Functional $K_{Ca3.1}$ K^+ channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax* 61: 880–885
15. Cubilla A, Fitzgerald P (1984) Tumors of the exocrine Pankreas. Washington, D.C. Armed Forces Inst. Pathol p 116
16. De Wever O, Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200: 429-47
17. Ding Z, Maubach G, Masamune A, Zhuo L (2009) Glial fibrillary acidic protein promoter targets pancreatic stellate cells. *Digestive and Liver Disease* 41: 229-236
18. Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, Köhler R (2003) Selective blockade of endothelial Ca^{2+} -activated small- and intermediate-conductance K^+ -channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol* 138: 594-601
19. Elliott JI, Higgins CF (2003) IK_{Ca1} activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Rep* 4(2): 189–194
20. Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J (1999) Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IK_{Ca1} . *J Biol Chem* 274: 5746-5754
21. Faouzi M, Chopin V, Ahidouch A, Ouadid-Ahidouch H (2010) Intermediate Ca^{2+} -sensitive K^+ channels are necessary for prolactin-induced proliferation in breast cancer cells. *J Membr Biol* 234: 47-56
22. Franco SJ, Huttenlocher A (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* 118: 3829-3838
23. Freelove R, Wallung AD (2006) Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Phys* 73: 482-493
24. Gao R, Brigstock DR (2005) Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin $\alpha 5\beta 1$ as a novel CCN2 receptor. *Gastroenterology* 129: 1019-1030
25. Gao YD, Hanley PJ, Rinne S, Zuzarte M, Daut J (2010) Calcium-activated K^+ channel ($K_{Ca3.1}$) activity during Ca^{2+} -store depletion and store-operated Ca^{2+} entry in human macrophages. *Cell Calcium* 48: 19 -27
26. Grgic I, Eichler I, Heinau P, Si H, Brakemeier S, Hoyer J, Köhler R (2005) Selective blockade of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ -channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 704-709
27. Grgic I, Kiss E, Kaistha BP, Busch C, Kloss M, Sautter J, Müller A, Kaistha A, Schmidt C, Raman G, Wulff H, Strutz F, Gröne HJ, Köhler R, Hoyer J (2009) Renal fibrosis is attenuated by targeted disruption of $KCa_{3.1}$ potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 14518-14523
28. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6): 3440-50

29. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ (1997) Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest*, 100: 1853-1862
30. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DHG, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS (1999) Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *The Am J Pathol* 155: 1087-1095
31. Hama K, Ohnishi H, Yasuda H, Ueda N, Mashima H, Satoh Y, Hanatsuka K, Kita H, Ohashi A, Tamada K, Sugano K (2004). Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 905-11
32. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigwirth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflug Arch* 391: 85-100
33. Hanahan D, Weinberg RA (2011) The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674
34. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20: 1218-1249
35. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.* 89: 193-27
36. Hruban RH, Pitman MB, Klimstra DS (2007) Tumors of the Pancreas. *Atlas of Tumor Pathology Series* 4: 111
37. Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF (1995) Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 7: 697-706
38. Imamura T, Iguchi H, Manabe T, Ohshio G, Yoshimura T, Wang Z, Suwa H, Ishigami S, Imamura M (1995) Quantitative analysis of collagen and collagen subtypes I, III, and V in human pancreatic cancer, tumor-associated chronic pancreatitis, and alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreas* 4: 357-64
39. Insell RH, Machesky LM (2009) Actin dynamics at the leading edge: From simple machinery to complex networks. *Developmental Cell* 17: 310-322
40. 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 USA* 94: 11651-11656
41. Jäger H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S (2003) Blockage of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol Pharmacol* 65: 630-638
42. Jaster R (2004) Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol Cancer* 3: 26
43. Jesnowski R, Fürst D, Ringel J, Chen Y, Schrödel A, Kleeff J, Kolb A, Schareck WD, Lühr M (2005) immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab Invest* 85:1276-91
44. Kessler W, Budde T, Gekle M, Fabian A, Schwab A (2008) Activation of cell migration

- with fibroblast growth factor-2 requires calcium-sensitive potassium channels. *Pflügers Arch* 456: 813-823
45. Kirfel G, Herzog V (2004) Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation and biological significance. *Protoplasma* 223: 67–78
 46. Korc M (2007) Pancreatic cancer–associated stroma production. *Am J Surg* 194: 84-86
 47. Kumar N, Tomar A, Parrill A, Khurana S (2004) Functional dissection and molecular characterization of calcium-sensitive actin-capping and actin-depolymerizing sites in villin. *J Biol Chem* 279: 45036-45046
 48. Kunzelmann K (2005) Ion Channels and Cancer. *J. Membrane Biol.* 205: 159–173
 49. Kuras Z, Yun YH, Chimote AA, Neumeier L, Conforti L (2012) $K_{Ca3.1}$ and TRPM7 channels at the uropod regulate migration of activated human T cells. *PLoS One* 7: e43859
 50. Kurosaka S, Kashina A (2008) Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Research Part C* 84: 102–12
 51. Laethem JL, Verslype C, Iovanna JL, Michl P, Conroy T, Louvet C, Hammel P, Mitry P, Ducreux M, Maraculla T, Uhl W, Van Tienhoven G, Bachet JB, Maréchal R, Hendlisz A, Bali M, Demetter P, Ulrich F, Aust D, Luttgies J, Peeters M, Mauer M, Roth A, Neoptolemos JP, Lutz M (2012) New strategies and designs in pancreatic cancer research: consensus guidelines report from a European expert panel. *Ann Oncol* 23: 570-576.
 52. Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A, Mariot P, Gackière F, Bidaux G, Urbain R, Gosset P, Delcourt P, Fleurisse L, Slomianny C, Dewailly E, Mauroy B, Bonnal JL, Skryma R, Prevarskaya N (2009) Intermediate- conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* 28: 1792-1806
 53. Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78: 247-306
 54. Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell Migration: A physically integrated molecular process. *Cell* Vol 84: 359–369
 55. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G (2006) Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Can* 15:741-747
 56. Liotta LA, Kohn EC (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411:375-9
 57. Maitra A, Hruban RH (2008) Pancreatic Cancer. *Annu Rev Pathol* 3: 157–188
 58. Martin C, Pedersen SF, Schwab A, Stock C (2011) Intracellular pH gradients in migrating cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: 490-495
 59. Martin P, Leibovich SJ (2005) Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 15: 599-607
 60. Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T (2005) Endothelin-1 stimulates contraction and migration of rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 11: 6144-6151

61. McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV (2004) Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-kinase) pathway. *Biochem Pharmacol* 67: 1215-25
62. Mogilner A, Oster G (2003) Polymer motors: pushing out the front and pulling up the back. *Curr Biol* 13: R721–733
63. Moolenaar WH, Aerts RJ, Tertoolen LG, Laar SW (1986) The epidermal growth factor-induced calcium signal in A431 cells. *J Bio Chem* 261: 279-284
64. Morgan RT, Woods LK, Moore GE, Quinn LA, McGaavran L, Gordon SG (2006). Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int J Can* 25: 591-598
65. Nabi IR (1999) The polarization of the motile cell. *J Cell Sci* 112: 1803–1811
66. Oberleithner H, Wojnowski L, Mason WT, Schwab A (1994) Extracellular pH determines the rate of Ca^{2+} entry into Madin-Darby canine kidney-focus cells. *J Membr Biol* 138(2): 143-9
67. Ohnishi N, Miyata T, Ohnishi H, Yasuda H, Tamada K, Ueda N, Mashima H, Sugano K (2003) Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential role of follistatin for pancreatic fibrosis. *Gut* 52: 1487-1493
68. Omary MB, Coulombe PA, Irwin McLean WH (2004) Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 351(20): 2087-100
69. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ (2007) The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 117: 50-9
70. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A (2009) Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastr Hep* 7: 44-47
71. Parihar AS, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M, Shieh CC (2003) Effects of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 471: 157–164
72. Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV (2003) Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases- implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 52: 275–282
73. Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, Doherty E, McCarroll JA, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV (2003) Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut* 52: 677-682
74. Pour PM, Pandey KK, Batra SK (2003) What is the origin of pancreatic adenocarcinoma? *Mol Cancer* 2: 13
75. Rafelski SM, Theriot JA (2004) Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem* 73: 209 –239
76. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin.
77. Rodland KD, Muldoon LL, Magun BE (1990) Cellular mechanisms of TGF-beta action. *J Invest Dermatol* 94: 33-40

78. Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Bachem MG et al (2001) Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C532-543
79. Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, Stock C (2012) Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev* 92: 1865-1913
80. Schwab A, Finsterwalder F, Kersting U, Danker T, Oberleithner H (1997) Intracellular Ca^{2+} distribution in migrating transformed renal epithelial cells. *Pflugers Arch* 434: 70-76
81. Schwab A, Hanley P, Fabian A, Stock C (2008) Potassium channels keep mobile cells on the go. *Physiology* 23: 212-20
82. Schwab A, Oberleithner H (1996) Plasticity of renal epithelial cells: the way a potassium channel supports migration. *Pflügers Arch* 432: 87-93
83. Schwab A, Reinhardt J, Seeger P, Schuricht B, Dartsch PC (1999) Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K^+ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflügers Arch* 438: 330-337
84. Schwab A, Stock C, Dieterich P, Dreval V (2005) The role of Ca^{2+} transport across the plasma membrane of cell migration. *Cell Physiol Biochem* 16: 119-126
85. 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: 1631-163
86. Schwab, A (2001) Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Renal Physiol* 280: 739-747
87. Sciacaluga M, Fioretti B, Catacuzzeno L, Pagani F, Bertollini C, Rosito M, Catalano M, D'Alessandro G, Santoro A, Cantore G, Ragozzino D, Castigli E, Franciolini F, Limatola C (2010) CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C175-84
88. Shek FW, Benyon RC, Walker FM, McCrudden PR, Pender SL, Williams EJ, Johnson PA, Johnson CD, Bateman AC, Fine DR, Iredale JP (2002) Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 160: 1787- 1798
89. Shepherd MC, Duffy SM, Harris T, Cruse G, Schuliga M, Brightling CE, Neylon CB, Bradding P, Stewart AG (2007) $K_{Ca}3.1$ Ca^{2+} activated K^+ channels regulate human airway smooth muscle proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 525-31
90. 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: 2105-2118
91. Srivastava S, Di L, Zhdanova O, Li Z, Vardhana S, Wan Q, Yan Y, Varma R, Backer J, Wulff H, Dustin ML, Skolnik EY (2009) The class II phosphatidylinositol 3 kinase C2beta is required for the activation of the K^+ channel $K_{Ca}3.1$ and CD4 T-cells. *Mol Biol Cell* 20: 3783-91
92. Statistisches Bundesamt (2012) Todesursachen in Deutschland 2010. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

93. Stock C, Cardone RA, Busco G, Krähling H, Schwab A, Reshkin SJ (2008) Protons extruded by NHE1: digestive or glue? *Eur J Cell Biol* 87: 591-599
94. Stock C, Gassner B, Hauck CR, Arnold H, Mally S, Eble JA, Dieterich P, Schwab A (2005) Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *J Physiol* 567: 225-238
95. Stock C, Schwab A (2006) Role of the Na/H exchanger NHE1 in cell migration. *Acta Physiol* 187: 149-157
96. Stock C, Schwab A (2009) Protons make tumor cells move like clockwerk. *Pflugers Arch, Eur J Physiol* 458: 981-992
97. Syme CA, Gerlach AC, Singh AK, Devor, DC (2000) Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: 570-581
98. Tharp DL, Bowles DK (2009) The intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (K_{Ca}3.1) in vascular disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 7: 1-11
99. Toyama K, Wulff H, Chandy KG, Azam P, Raman G, Saito T, Fujiwara Y, Mattson DL, Das S, Melvin JE, Pratt PF, Hatoum OA, Gutterman DD, Harder DR, Miura H (2008) The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel K_{Ca}3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans. *J Clin Invest* 118: 3025-37
100. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP (1998) Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8: 321-329
101. Vogelmann R, Ruf D, Wagner M, Adler G, Menke A (2001) Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGFβ1 transgenic mouse model. *Am J Physiol* 280: G164-G172
102. Vonlaufen A, Joshi S, Phillips PA, Wilson JS, Apte MV (2008) Pancreatic stellate cells: Partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 68: 2085-2093
103. Vonlaufen A, Phillips PA, Goldstein D, Wilson JS, Apte MV (2008) Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance. *Cancer Res* 68: 7707- 7710
104. Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y (1982) Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn* 58: 837-858
105. Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells- over and over and over again. *Nature Cell Biology* 4: E97-100
106. Werner J, Büchler MW (2011) Pankreaskarzinom: ein Schritt vorwärts in der Behandlung. *Dtsch Med Wochensch* 136: 1807-1810
107. Westphal S, Kalthoff H (2003). Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 7: 2-6
108. Winter JM, Tang LH, Klimstra DS (2012) A novel survival-based tissue microarray of pancreatic cancer validates MUC1 and mesothelin as biomarkers. *PLoS One* 7
109. Won JH, Zhang Y, Ji B, Logsdon CD, Yule DI (2011) Phenotypic changes in mouse pancreatic stellate cell Ca²⁺ signaling events following activation in culture and in a disease model of pancreatitis. *Mol Biol Cell* 3:421-436

110. Wulff H, Castle NA (2010) Therapeutic potential of $K_{Ca}3.1$ blockers: an overview of recent advances, and promising trends. *Expert Rev Clin Pharmacol* 3: 385–396
111. Wulff H, Miller MJ, Chandy KG et al (2000) Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IK_{Ca1} : a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8151-8156
112. Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Apte MV (2010) Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol* 177(5): 2585-96
113. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J (2005) Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 17: 559–564
114. Yang S, Huang XY (2005) Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem* 280: 27130-27137
115. Yoshida S, Ujiki M, Ding XZ et al (2005) Pancreatic stellate cells (PSCs) express cyclooxygenase-2 (COX-2) and pancreatic cancer stimulates COX-2 in PSCs. *Mol Cancer* 4: 27
116. Yoshida S, Yokota T, Ujiki M et al (2004) Pancreatic cancer stimulates pancreatic stellate cell proliferation and TIMP-1 production through the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys Res Commun*: 323: 1241–5
117. Zamir E, Geiger B (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J of Cell Sci* 114: 3583–3590

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Schwab für die intensive Betreuung, wissenschaftliche Begleitung und Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken.

Ebenfalls danke ich Dr. Etmar Bulk, Dr. Christian Stock, Dr. Florian Ludwig, Sabine Mally und Sarah Sargin für die vielen Ratschläge und die Hilfe im Labor.

Ein besonderer Dank für die vielfältige Unterstützung während der gesamten Arbeit gilt meiner Familie.

Materialienliste

Name	Hersteller, Firmensitz
1-EBIO	
Amino-Dihydro-Phthalazinedione (Luminol)	Sigma-Aldrich, München
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich, München
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
CaCl ₂ (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Clotrimazol	Sigma-Aldrich, München
Collagen Typ I	Biochrom, Berlin
Collagen Typ III	BD Bioscience, Heidelberg
Collagen Typ IV	Sigma-Aldrich, München
Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Serva, Heidelberg
EGTA	Sigma-Aldrich
F-12	Gibco, Berlin
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA, Pasching
Fibronectin	Sigma-Aldrich, München
Fura-2 AM	Invitrogen, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Goat- Anti Rabbit Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe
Goat-Anti-Rabbit POD	Sigma-Aldrich, München
HEPES	Sigma-Aldrich, München
Ionomycin	Sigma-Aldrich, München
KCl	Merck, Darmstadt
Laminin L2020	Sigma-Aldrich, München
Magic Mark XP Western Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mouse Anti-GAPDH	Dianova, Hamburg
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Merck, Darmstadt

Name	Hersteller, Firmensitz
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, München
Phosphate Bufferede Saline (PBS)	PAA, Pasching
Phosphonoformic ACID (PFA)	Sigma-Aldrich, München
PhosStop	Roche, Basel
Rabbit Anti-KCNN4	Sigma-Aldrich, München
Rotiphorese Gel A /Gel B	Roth, Karlsruhe
RPMI Medium 1640	Gibco, Berlin
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
SuperSignal Luminol Kit	Thermo Scientific, Rockford
Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tram-34	
Tris-HCL	Roth, Karlsruhe
Triton X	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	Roth, Karlsruhe