Universität Ulm
Zentrale Einrichtung Klinische Chemie
des Universitätsklinikums Ulm
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. M. G. Bachem

# Zell-Zell-Interaktionen zwischen Tumorzellen und Sternzellen des Pankreas: Freisetzung chemotaktischer Faktoren durch Tumorzellen

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

**Karin Buck**
aus Ulm

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Max Bachem

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Marko Kornmann

Tag der Promotion: 23. November 2007

# INHALTSVERZEICHNIS

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

**1. EINLEITUNG ---------- 1**

1.1. Das Pankreaskarzinom ---------- 1

1.2. Die desmoplastische Reaktion im Pankreaskarzinom ---------- 3

1.3. Die pankreatische Sternzelle ---------- 4

1.4. Chemotaxis, Migration und Wachstumsfaktoren ---------- 6

1.5. Rezeptoren, Tyrosinphosphorylierung und Signaltransduktion ---------- 7

1.6. Fragestellung ---------- 9

**2. MATERIAL UND METHODEN ----------11**

2.1. Material ----------11

2.1.1. Zellen ----------11

2.1.2. Reagenzien ----------11

2.1.3. Verbrauchsmaterial ----------13

2.1.4. Geräte ----------13

2.1.5. Lösungen und Puffer ----------14

2.1.6. Antikörper und Inhibitoren ----------16

2.2. Methoden ----------18

2.2.1. Zellkultur ----------18

2.2.2. Zellzählung ----------19

2.2.3. Konditionierung von Tumorzellüberständen ----------19

2.2.4. Wound healing assay ----------19

2.2.5. Stimulation der Migration von PSCs durch Tumorzellüberstände in Agarosegel ----------21

2.2.6. Stimulation der Migration von PSCs durch Tumorzellen (Cokultur) ----------22

2.2.7. Stimulation von PSCs durch Tumorzellüberstände und Gewinnung von PSC-Zelllysat ----------24

2.2.8. Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysat ----------25

2.2.9. Western Blot zum Nachweis tyrosinphosphorylierter

Signalproteine ----------25
2.2.10. Immunfluoreszenzfärbung tyrosinphosphorylierter Signalproteine ----------27
2.2.11. Statistik ----------28

**3. ERGEBNISSE ----------29**
3.1. Stimulation und Inhibition der Migration von Sternzellen ----------29
3.1.1. PSC-Migration im Wound healing assay ----------29
3.1.2. PSC-Migration durch Freisetzung chemotaktischer Faktoren aus einem Agarosegel (mit Tumorzellüberstand) ----------40
3.1.3. PSC-Migration durch Freisetzung chemotaktischer Faktoren aus Tumorzellen (Cokultur) ----------49
3.2. Stimulation von F-Aktin, Paxillin und der Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen in PSCs durch Tumorzellüberstand ----------56
3.3. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen in PSCs durch Tumorzellüberstand ----------60
3.4. Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung von PDGF-Rezeptor β, p42/44 MAPK, p38 MAPK und Akt ----------61
3.5. Dosisabhängige Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen in PSCs durch Tumorzellüberstand ----------64
3.6. Inhibition der Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen durch Anti-PDGF-BB, AG1295, LY294002 und PD98059 ----------65
3.7. Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen durch PDGF-AB ----------76

**4. DISKUSSION ----------78**
4.1. Die Pathogenese der Desmoplasie im Pankreaskarzinom ----------78
4.2. Die Kommunikation zwischen pankreatischen Sternzellen und Tumorzellen ----------79
4.3. Neue Therapieoptionen beim duktalen Pankreasadenokarzinom --------90

**5. ZUSAMMENFASSUNG ----------91**

**6. LITERATURVERZEICHNIS ----------93**

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| AEBSF | 4-(2-Aminoethyl)-Benzolsulfonylfluorid |
| ANOVA | One-way Analysis of Variance |
| APS | Ammoniumperoxydisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BRCA2 | Breast Cancer Antigen |
| Ca 19-9 | Carbohydrate Antigen 19/9 |
| CEA | Carcino-Embryonales Antigen |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CTGF | Connective tissue growth factor |
| DMEM | Dulbecco's Modification of Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleid acid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal growth factor |
| ERCP | Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikografie |
| Erk | Extracellular signal-regulated kinase |
| Fak | focal adhesion kinase |
| FCS | Fetale Calf Serum = Fötales Kälberserum |
| FDG-PET | 18-Fluor-deoxyglucose-Positronen-Emission-Tomographie |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HSC | Hepatic stellate cell |
| Jnk | Jun N-terminus kinase |
| KGF | Keratinocyte growth factor |
| KRAS2 | Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MAPKK | Mitogen-activated protein kinase kinase |
| MAPKKK | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase |
| MEK | MAPK/ERK kinase |

| | |
|---|---|
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| PanIN | Pankreatische intraepitheliale Neoplasie |
| PBS | Phosphat buffered saline |
| PDGF AA | Platelet-derived growth factor AA |
| PDGF AB | Platelet-derived growth factor AB |
| PDGF BB | Platelet-derived growth factor BB |
| PDGFRα | Platelet-derived growth factor receptor α |
| PDGFRβ | Platelet-derived growth factor receptor β |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinase |
| PLC | Phospholipase C |
| PSC | Pancreatic Stellate Cell = pankreatische Sternzelle |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Sodium-dodecyl-sulfat |
| SN | Zellkulturüberstand |
| STH | Somatotropin |
| TBST | Tris-buffered saline enthaltendes Tween-20 |
| TEMED | Tetramethylehtylendiamine |
| TGFα | Transforming growth factor α |
| TGFβ1 | Transforming growth factor β1 |
| TIMP | Tissue inhibitor of metalloproteinase |
| TNB | Tris/HCl NaCl Bovine Albumin Fraction V |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| α-SMA | α-smooth muscle actin |

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Das Pankreaskarzinom

Das Pankreas liegt im Retroperitonealraum des oberen Abdomens, wo es vor Traumen gut geschützt ist. Diese Lokalisation macht es unzugänglich für die körperliche Untersuchung, so dass pankreatische Erkrankungen über lange Zeiträume unbemerkt bleiben. Gewöhnlich wird das Pankreaskarzinom deshalb erst nach lokaler Infiltration oder Metastasierung diagnostiziert [54].

In den westlichen Industriestaaten steht der Bauchspeicheldrüsenkrebs an vierter Stelle der Krebssterblichkeit. Die Prognose dieser Erkrankung ist düster, mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 0,4% und einer mittleren Überlebenszeit nach Diagnose von 4-6 Monaten [61]. Zwischen 1920 und 1978 verdreifachte sich die Inzidenzrate in den Industrienationen und hat sich nun auf einen Wert von etwa 9 neuen Fällen pro 100 000 Personen und Jahr stabilisiert und übernimmt damit den 11. Platz unter den Krebsarten, wobei Männer etwas häufiger erkranken als Frauen (Relatives Risiko 1,35) [29, 20]. Das mittlere Lebensalter bei Diagnosestellung liegt zwischen 60 und 65 Jahren [2].

Es gibt viele verschiedene Typen des Pankreaskarzinoms. Das duktale Adenokarzinom ist dabei für die große Mehrheit der malignen pankreatischen Neoplasien verantwortlich [64]. In weniger als 5% handelt es sich um ein Azinuszellkarzinom oder ein Zystadenokarzinom. Vorstufen werden in mehreren Graden als pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN I-III) bezeichnet [48].

Die Mehrheit der Tumore ist hart und szirrhös, wenige sind zystisch. Die Durchschnittsgröße der duktalen Adenokarzinome, die im Pankreaskopf gefunden werden, beträgt 5 cm, wohingegen die, die im Pankreaskörper oder –schwanz lokalisiert sind, eine durchschnittliche Größe von 10 cm aufweisen. Diese Größendifferenz ist auf eine frühere Diagnosestellung bei im Pankreaskopf entstandenen Tumoren zurückzuführen. Die Mehrzahl der Karzinome findet sich im Kopf der Bauchspeicheldrüse (3:1 im Vergleich zu Körper und Schwanz). Karzinome, die dem Körper oder Schwanz des Pankreas entstammen, verursachen keine frühen Symptome und werden typischerweise erst entdeckt, wenn eine lokale Ausbreitung zu retroperitoneal gelegenen Nerven, die Schmerzen verursacht, oder eine Metastasierung stattgefunden hat, so dass eine

komplette chirurgische Beseitigung unmöglich wird. Metastasen finden sich früh in den retroperitonealen Lymphknoten, Leber, Peritoneum, Lungen und Pleura [54].

Da sogar ein kleiner Tumor eine Gallengangsobstruktion und damit einen Ikterus verursachen kann, ist eine frühe Entdeckung im Pankreaskopf eher wahrscheinlich, als in Körper und Schwanz. Pankreaskarzinome können auch eine Obstruktion des Pankreasausführungsgangs auslösen, welche zu chronischer Pankreatitis führt. Allerdings sind akzessorische Ausführungsgänge häufig, so dass es normalerweise zu keiner exokrinen Pankreasinsuffizienz als klinisches Frühzeichen kommt [54]. Da die Frühstadien meistens asymptomatisch sind oder eine geringe Spezifität der Symptome aufweisen, werden sie oft anderen Krankheiten zugeordnet. Ernstzunehmende Symptome sind tiefliegende Oberbauch- und Rückenschmerzen, herabgesetzter Allgemeinzustand, Appetit- und Gewichtsverlust. Schlechte Prognosezeichen sind eine verlängerte Prothrombinzeit, erhöhte Werte von Harnstoff, Bilirubin, CRP und Ca 19-9 [72].

Bisher ist kein ideales Serumscreening verfügbar. Allen zur Zeit getesteten Tumormarkern (insbesondere CA 19-9 und CEA) mangelt es an ausreichender Sensitivität für eine Routinenutzung, da sie häufig in den Frühstadien nicht erhöht sind und deshalb eher der späteren Verlaufskontrolle dienen. Allerdings gibt es Anhaltspunkte, dass Sensitivität und Spezifität durch eine Kombination der Marker verbessert werden können. Bildgebende diagnostische Verfahren wie Computertomografie und Kernspintomografie könnten ausreichende Sensitivität erreichen (Erkennung ab einer Größe von 1 cm), scheiden aber aus Kostengründen als Screeningmethode aus. Auch Ultraschall verfügt allein nicht über genügend Sensitivität. Die Positronenemissionstomographie (FDG-PET) kann zusätzliche Informationen zum Staging liefern. Ihre Aussagekraft zur Dignitätsbestimmung von Pankreastumoren ist noch nicht endgültig abzuschätzen [93].

Eine Anzahl demografischer Risikofaktoren werden mit dem Entstehen eines Pankreastumors assoziert. Dies schließt fortgeschrittenes Lebensalter, schwarze Rasse, männliches Geschlecht, niedriger sozialer Status und jüdische Herkunft ein. Weitere Risikofaktoren sind fettreiche Ernährung, chronische Pankreatitis, Diabetes mellitus und eine vorhergehende Cholezystektomie. Raucher haben ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko [28, 89].

Neuerdings werden auch genetische Zusammenhänge in Betracht gezogen. Tatsächlich sind einige familiäre Syndrome mit dem Pankreaskarzinom assoziiert. Mehrere Studien zeigen, dass ein Muster an Mutationen mit fortschreitender Meta- und Dysplasie einhergeht, welches normalerweise mit Mutationen in KRAS2, p53, p16 und BRCA2 beginnt und mit einem Fortschreiten von PanIN I-III bis zum invasivem Wachstum zusammenhängt [87].
Zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine wie beispielsweise EGF, FGF, KGF, VEGF, TGF und PDGF werden in karzinomatösem Gewebe vermehrt exprimiert und können in Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden [83]. Dabei geht die Überexprimierung einiger Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren mit einer schlechteren Prognose und einem fortgeschrittenem Tumorstadium einher.

Bei den meisten Patienten hängen Prognose und Behandlung sehr von Lokalisation und Metastasierungsausmaß zu Diagnosestellung ab [1]. Die wirksamste Therapie des exokrinen Pankreaskarzinoms besteht in der operativen Entfernung. 10-15% der Patienten können dieser Pankreasresektion unterzogen werden, wobei die radikale Chirurgie nicht wesentlich die mittlere Überlebensrate verlängert. Die postoperative 5-Jahresüberlebensrate beträgt nur 17-24%. Auch verbessert eine adjuvante und chemotherapeutische oder chemoradiologische Intervention die Prognose bisher nicht oder allenfalls mäßig [63].

### 1.2. Die desmoplastische Reaktion im Pankreaskarzinom

Das gesunde Pankreasgewebe ist von einer dünnen kollagenfaserigen Kapsel umgeben, von der aus schmale Bindegewebssepten ins Innere ziehen und zu einer Lobulierung führen. Die Läppchen bestehen aus einem exokrinen Anteil und den endokrinen Langerhansinseln, außerdem sind Pankreasausführungsgänge und Blutgefäße zu finden. Im szirrhösen Neoplasma dagegen ist die septale Organisation zerstört, die Tumorzellen sind polymorph und bilden Stränge und Azini, die in reichlichem, dichten, bindegewebigem Stroma liegen [19].

Das Adenokarzinom wird in drei Grade eingeteilt: Grad 1 zeigt tubulär angeordnete Tumorzellen, die meist noch Kontakt zur Basallamina haben und vom umliegenden Bindegewebe abgegrenzt sind. In Grad 2 ist die Basalmembran unterbrochen und Kollagenfasern umgeben direkt die Karzinomzellen. Grad 3 zeichnet sich dadurch aus, dass keine Basallamina mehr zu erkennen ist und das Bindegewebe im Tumor den Hauptbestandteil bildet.

Charakteristisch für die Mehrheit der pankreatischen Tumore ist die ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion um das Tumorgewebe, welche aus Bindegewebe (hauptsächlich Kollagen Typ I und IV, aber auch Typ III, Fibronektin, Undulin und Laminin [53] und neu eingesprossenen Blutgefäßen aufgebaut ist und mit einer Proliferation von fibroblastischen Zellen einhergeht, welche sogar die Zahl der Tumorzellen übersteigen kann. Der Zusammenhang zwischen dieser Stromareaktion und der lokalen Invasivität oder der späteren Metastasierung des Karzinoms ist noch unbekannt [6]. Ebenso ist noch nicht geklärt, ob die Fibrosierung im tumorösen Pankreas eine Abwehrreaktion des Organismus ist, um das Karzinom gegen das umliegende Gewebe abzugrenzen und ihn an einer weiteren Ausbreitung zu hindern, oder ob sich dadurch die Tumorzellen selbst vor der Immunantwort des Körpers schützen [33]. Interessant ist zu erwähnen, dass der weniger aggressive muzinöse Typ der Pankreastumore auch von einer kleineren Stromareaktion begleitet ist [45].

Wertvolle Einblicke in die Pathogenese des Karzinomwachstums würde also die Abklärung der Biologie der Zellen bringen, die für die Fibrose verantwortlich sind, sowie die Art der Kommunikation zwischen Stromazellen und Tumorzellen. Frühere Studien haben gezeigt, dass es sich dabei um pankreatische Sternzellen (PSCs) handelt, die die Hauptquelle für das Kollagen in der Fibrose um den Tumor darstellt. Die pankreatische Sternzelle spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen Extrazellulärmatrixverhältnisse, wobei die Dysregulation dieses Prozesses für den fibroseauslösenden Faktor gehalten wird. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten eines Tumors im Pankreas die Aktivierung, Migration sowie die Proliferation von PSCs auslöst. Gegenwärtig besteht grosses Interesse in der Charakterisierung der PSC-Aktivierung, der Apoptose von PSCs und den Signaltransduktionswegen, die daran beteiligt sind. Einige Zytokine und Wachstumsfaktoren, besonders TGFβ und PDGF, werden als Hauptstimulus für die Fibrogenese betrachtet [65].

### 1.3. Die pankreatische Sternzelle

Bereits im Jahr 1982 wurde von Vitamin A-speichernden Zellen im Pankreas von Mäusen berichtet [86], deren Erstbeschreibung im menschlichen Pankreas 1990 erschien [39]. In den letzten Jahren folgte mit der Isolierung von Myofibroblasten-ähnlichen Zellen im humanen Pankreasgewebe die Erklärung einer möglichen

zellulären Quelle für das Übermaß an Extrazellulärmatrix, die in der Pankreasfibrose beobachtet wird [75]. Bachem et al. [10] gelang es 1998 zu zeigen, dass die Vitamin A-speichernde Zelle und die Myofibroblasten-ähnliche Zelle ein und dieselbe ist: es konnte gezeigt werden, dass Vitamin A- enthaltende Zellen, die in Zellkulturen aus Pankreasgewebe isoliert wurden, sich zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen differenzieren, und Kollagen Typ I und III, Laminin und Fibronectin sowie α-SMA produzieren. Dieser Aktivierungsprozess wird mit dem Verlust der charakteristischen Retinoid-enthaltenden Fetttröpfchen begleitet und der Änderung ihrer Morphologie in eine spindel- oder sternförmige Gestalt. Im gesunden Pankreas enthalten ruhende pankreatische Sternzellen Vitamin A-speichernde Fetttröpfchen im Zytoplasma und befinden sich nur im Interlobulärraum sowie zwischen den Azini. Sie machen dann etwa nur 4% der gesamten pankreatischen Zellen aus und können mit der Immunfärbung für das Zytoskelettprotein Desmin identifiziert werden.

Von diesen Zellen weiß man jetzt, dass sie durch Ethanol und verschiedene Faktoren, welche im geschädigten Pankreas vermehrt ausgeschüttet werden, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Sauerstoffmangel, aktiviert werden [8]. PDGF sowie TGF spielen hierbei eine wichtige Rolle in der Steigerung von Proliferation und Migration, was die Zahl der PSCs im geschädigten Pankreas ansteigen lässt sowie zu einer vermehrten Synthese und Ablagerung fibrillärer Extrazellulärmatrixproteinen führt.

Morphologisch und funktionell gleichen die PSCs also stark den durch zahlreiche Untersuchungen bestens bekannten hepatischen Sternzellen (HSCs), die eine bedeutende Rolle in der Leberfibrose spielen [27]. Diese, auch Ito-Zellen genannt, werden durch unterschiedliche Zell-Zell-Interaktionen über parakrine und autokrine Stimulationsmechanismen aktiviert.

Die Identifikation und die Charakterisierung der pankreatischen Sternzellen hatten in den letzten Jahren bedeutenden Einfluss auf den Forschungstand der Pankreasfibrogenese, welcher die Schlüsselrolle aktivierter PSCs andeutet [4, 10, 31]. Seitdem PSCs im umgebenden Stroma von menschlichem pankreatischem Adenokarzinomen gefunden wurden, wird angenommen, dass pankreatische Tumorzellen das PSC-Verhalten beeinflussen können [92].

### 1.4. Chemotaxis, Migration und Wachstumsfaktoren

Die Fähigkeit der Zellen äußere chemische Reize wahrzunehmen und auf sie durch gelenkte Bewegung zu reagieren ist ein grundlegender Vorgang, genannt Chemotaxis [13]. Um entlang eines chemotaktischen Gradienten zu migrieren, muss eine Zelle eine höhere Konzentration einer diffusionsfähigen Substanz auf der einen Seite von der entgegengesetzten Seite unterscheiden [51]. Rezeptorproteine auf der Oberfläche der Zellen ermöglichen es ihnen, sehr geringe Konzentrationen des Lockstoffes zu erkennen. Klassischerweise ist die chemotaktische Antwort durch eine glockenförmige Kurve gekennzeichnet, welche die Chemotaxis durch entweder zu geringe oder zu hohe Ligandenkonzentrationen limitiert [21]. Gerichtete Zellmigration kommt in mehreren physiologischen und pathologischen Prozessen vor, welche Entwicklung, Wundheilung, Arteriosklerose, Immunität, Angiogenese und Metastasierung einschließt. Die chemotaktische Antwort besteht aus der Reorganisierung des Aktinzytoskeletts, Polarisation, Zelladhäsion und –ablösung. Demnach erfordert die Migration die Zellkommunikation mit umgebenden Zellen und mit der Extrazellulärmatrix und wird durch einen Gradienten eines chemotaktischen Faktors gesteuert [43]. Wachstumsfaktoren fungieren gewöhnlich als lokale Botenstoffe bei sehr niedrigen Konzentrationen (ca. $10^{-9}$ – $10^{-11}$ M). Sie sind körpereigene Substanzen, die das Wachstum, die Vermehrung, die Differenzierung oder das Überleben von Zellen in Geweben stimulieren , z. B. Hormone (z. B. STH) mit Wirkung auf verschiedene Zellgruppen, mitogene Polypeptide oder Proteine (Zytokine), deren Wirkung über spezifische Zellmembranrezeptoren vermittelt wird (z. B. PDGF, TGF, Somatomedine, Lymphokine).

In den letzten Jahren wurde ersichtlich, dass die Aktivierung pankreatischer Sternzellen durch ein komplexes Netzwerk von Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert wird, und sich dadurch eine gesteigerte Freisetzung von Kollagen I und III, Fibronektin und anderen Bestandteile der Extrazellulärmatrix einstellt und sich ihre gesamte Zahl in der Umgebung des Tumors erhöht. Unter den Zytokinen, die in die PSC-Aktivierung und anderen grundlegenden Mechanismen pankreatischer Fibrose verwickelt sind, ist TGF-β von besonderem Belang. Es stimuliert die PSC-Aktivierung und induziert die Transkription von Extrazellulärmatrixproteinen. Der Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktor, bezeichnet Platelet-derived growth

factor (PDGF), ist das bedeutendste Mitogen für PSCs und auch anderer Zellen wie Bindegewebszellen und glatte Muskelzellen und gilt als chemotaktischer Lockstoff. Dieses Polypeptid beeinflusst die Migration, Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen. PDGF ist in der Ausbildung verschiedener solider Tumore beteiligt [77]. Ursprünglich wurde PDGF als Bestandteil von zellreichem Blutserum identifiziert und nachträglich aus Blutplättchen gewonnen. Obwohl die α-Granula der Blutplättchen den Hauptspeicherort für PDGF darstellen, kann PDGF von einer Vielzahl an verschiedenen Zelltypen synthetisiert werden [35]. PDGF ist ein 30 kDa großes kationisches Homo- oder Heterodimer, welches aus A- oder B-Aminosäureketten aufgebaut ist und durch verschiedene Zusammensetzung PDGF-AA, PDGF-AB oder PDGF-BB bildet. Es gibt zwei PDGF-Rezeptor-Untereinheiten: α und β. Der PDGF-β-Rezeptor wirkt nur auf B-Ketten enthaltende Isoformen, während der α-Rezeptor alle 3 Formen binden kann [79]. PDGF hat wichtige physiologische Funktionen im Bereich der Embryogenese, besonders in der Entwicklung von Nieren, Blutgefäßen, Lunge und ZNS. Eine bedeutsame Aufgabe beim Erwachsenen besteht in der Wundheilung. Pathologisch kommt PDGF im Glioblastom und in Sarkomen vor, wo es durch autokrine Stimulation das Tumorzellwachstum fördert. Ferner ist die parakrine Stimulation von Stromazellen durch Tumorzellen in Neoplasien von Bedeutung. Eine Übersekretion von PDGF findet sich auch in der Arteriosklerose sowie in verschiedenen fibrotischen Erkrankungen [35].

### 1.5. Rezeptoren, Tyrosinphosphorylierung und Signaltransduktion

Kommunikationsmechanismen hängen stark von extrazellulären Signalmolekülen ab, die von Zellen erzeugt werden, um Signale an weiter entfernte Zellen zu vermitteln. Sie hängen auch von ausgefeilten, in jeder Zelle vorhandenen Proteinsystemen ab, die die Zelle befähigen, in zelleigener Weise auf spezielle, nachrangige Signalfolgen zu reagieren. Diese Proteine umfassen Zelloberflächen-Rezeptorproteine, die das Signalmolekül binden, und zusätzlich eine Vielfalt von intrazellulären Signalproteinen, die das Signal an geeignete Zellorte verteilen. Unter den intrazellulären Signalproteinen sind Kinasen, Phosphatasen, GTP-Bindungsproteine und andere Proteine, mit denen sie wechselwirken. Jeder intrazelluläre Signalweg endet schließlich bei einem Zielprotein, das bei der

Aktivierung des Signalwegs eine Änderung erfährt, womit sich auch das Zellverhalten, wie z. B. Form, Bewegung, Genexpression usw., ändert. Je nach Signalwirkung können diese Zielproteine Regulatorproteine, Ionenkanäle, Komponenten eines Stoffwechselwegs, Teile des Cytoskeletts usw. sein.

Ungeachtet der Herkunft des Signals antwortet die Zielzelle also mithilfe eines spezifischen Rezeptorproteins. Dieses bindet das Signalmolekül an einer spezifischen Stelle und ruft eine Antwort in der Zielzelle hervor. In manchen Fällen befinden sich die Rezeptoren innerhalb der Zielzelle. Um sie zu aktivieren, muss das Signalmolekül in die Zelle gelangen. Meist handelt es sich allerdings um Transmembranproteinrezeptoren, die nach Ligandenbindung eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen. Die drei größten Klassen von diesen Zelloberflächen-Rezeptorproteinen sind Ionenkanal gekoppelte, G-Protein gekoppelte und Enym-gekoppelte Rezeptoren, die mit einer intrinsischen Proteinkinase-Aktivität ausgestattet sind [76].

Der Aktivitätszustand von Proteinen innerhalb einer Zelle kann durch kovalentes Anfügen einer Phosphatgruppe an einer seiner zugänglichen Aminosäure-Seitenketten verändert werden, indem die spezifischen Rezeptor-roteinkinasen den Transfer des γ-Phosphats von ATP auf Hydroxylgruppen der Aminosäuren auf den Zielproteinen katalysiert [37]. Die grosse Mehrheit stellen die Serin/Threonin-Kinasen, die Proteine an Serin und an Threonin phosphorylieren. Weiterhin gibt es Tyrosin-Kinasen, die an Tyrosin phosphorylieren. Man schätzt, dass stets ein Drittel der Proteine in einer eukaryotischen Zelle phosphoryliert sind. Alle Rezeptor-Tyrosinkinasen beinhalten eine extrazelluläre ligandenbindende Domäne, die normalerweise glykosyliert ist. Die ligandenbindende ist mit der zytoplasmatischen Domäne durch eine einzelne transmembranäre Helix verbunden. Die zytoplasmatische Domäne enthält eine Proteintyrosinkinase und zusätzlich regulatorische Sequenzen, die der Autophosphorylierung dienen [36]. Mit Ausnahme des Insulinrezeptors sind alle bekannten Rezeptortyrosinkinasen (z.B. EGF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor) Monomere in der Zellmembran. Ligandenbindung induziert die Rezeptordimerisation, die in der Autophosphorylation von Tyrosinen ihrer zytoplasmatischen Domänen resultiert [42]. Die autotyrosinphosphorylierten Stellen des ca. 190 kDa großen PDGF-Rezeptors können von SH2-Domäne-enthaltenden Proteinen als Andockstellen genutzt werden. Einige dieser Moleküle

sind selbst Enzyme, wie die Phosphatidyl 3-Kinase (PI 3-Kinase), die Phospholipase C (PLC) γ, Src, SHP-2 und Ras. Andere Moleküle wie Grb2, Grb7, Nck, Shc und Crk haben Adapterfunktionen. Jedes dieser SH2-Moleküle, das an PDGFR bindet, induziert einen Signaltransduktionsweg [34]. Intrazelluläre Signaltransduktionswege, die in der PSC-Aktivierung eine elementare Rolle spielen und bisher untersucht wurden sind v. a. der Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-, der Phosphatidyl 3 (PI 3)-Kinase- und der Rho-Rho-Kinase (ROCK)- Signalweg.

Drei MAPK- Familien konnten bisher identifiziert und in Bezug auf die PSC-Aktivierung untersucht werden: Extracellular signal-regulated kinase ERK, c-Jun N- erminal Kinase JNK und p38-Kinase [66]. Sie sind typischerweise in einer Kaskade aus drei folgenden Kinasen angeordnet, die sich nacheinander phosphorylieren: MAPK Kinase Kinase, MAPK Kinase und schließlich MAPK. Aktiviertes Ras bindet an die Serin-/Threoninkinase Raf-1 [66], welche die Aktivierung MAPK-Kaskade auslöst, die für Zellwachstum, Migration und Differenzierung Bedeutung hat.

Die PI 3-Kinase besteht aus einer regulatorischen Untereinheit p85 und einer katalytischen p110 und vermittelt verschiedene zelluläre Antworten, wie die Aktin-eorganisierung, Chemotaxis, Zellwachstum und Antiapoptosis [85]. Sie hat mehrere stromabwärtsgerichtete Effektormoleküle, darunter die Serin-/Threoninkinase Akt/PKB [16].

In Anbetracht der Bedeutung von PSCs in der pankreatischen Fibrose und Entzündung, ist es von besonderer Wichtigkeit die molekularen Mechanismen, die deren Aktivierung und zellulären Funktionen zugrunde liegen, zu klären.

### 1.6. Fragestellung

Das Pankreaskarzinom sowie die chronische Pankreatitis sind mit einer fortschreitender Fibrose verbunden, die mit einem Verlust von Funktionsgewebe und dessen Ersatz mit Extrazellulärmatrixkomponenten gekennzeichnet ist. Pankreatische Sternzellen spielen dabei eine tragende Rolle, ähnlich wie die bereits länger bekannten hepatischen Sternzellen in der Leberfibrose [27]. Gründe für die relative Zunahme ihrer Zahl und die Bindegewebsvermehrung sind ihre Proliferation, ihre gerichtete Migration, eine allgemeine Degeneration von Funktionsgewebe und eine Steigerung ihrer Kollagenproduktion. Für das

Verständnis der zellulären und pathobiochemischen Mechanismen, die zur Pankreasfibrosierung führen, und damit auch für eine mögliche therapeutische Intervention, sind potentielle fibrogene, mitogene und chemotaktische Mediatoren, die zur PSC-Aktivierung und -Vermehrung führen von besonderem Interesse sowie die Klärung der intrazellulären Signaltransduktionswege.
Ziel der vorliegenden Arbeit war daher festzustellen, ob und auf welche Art pankreatische Tumorzellen das Verhalten und die Funktion von Sternzellen beeinflussen. Im Einzelnen sollten insbesondere folgende Fragen geklärt werden:

1. Setzen pankreatische Tumorzellen Faktoren frei, welche die ungerichtete und gerichtete Migration von PSCs stimulieren?
2. Falls ja, welche Faktoren sind für diese Effekte verantwortlich?
3. Lösen konditionierte Medien von pankreatischen Tumorzelllinien eine Steigerung der Expression von F- Aktin in PSCs aus?
4. Welche intrazellulären Signalproteine werden in PSCs durch konditionierte Tumorzellmedien aktiviert?

Durch die Beantwortung dieser Fragen soll geklärt werden, ob und in welche Richtung eine chemotaktische Interaktion zwischen pankreatischen Tumorzellen und Sternzellen existiert und falls ja, welche Intrazellulärproteine und Wachstumsfaktoren beteiligt sind.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1. Material

### 2.1.1. Zellen

- Drei humane pankreatische Tumorzelllinien: MiaPaCa2 und Panc1 wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) sowie SW850 von Prof. Dr. H. Kalthoff (Christian-Albrechts-Universität, Kiel) bezogen.
- Humane pankreatische Sternzellen (PSC) wurden aus humanem Pankreasgewebe isoliert. Sie stammen aus fibrotischen Arealen von Patienten, deren Pankreas aufgrund von Tumor oder chronischer Pankreatitis teilreseziert wurde. Die Zustimmung der Patienten und ein Votum der Ethikkommission lagen vor.

### 2.1.2. Reagenzien

| | |
|---|---|
| Aceton | Fluca, Seelze |
| AEBSF | Merck, Darmstadt |
| Agarose Type VII | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Albumin, bovines Fraktion V | SERVA, Heidelberg |
| Ammoniumperoxydisulfat (APS) | Merck, Darmstadt |
| Amphotericin B | Boehringer, Mannheim |
| Aprotinin | Merck, Darmstadt |
| BisBenzimid | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Bromophenolblau | Merck, Darmstadt |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM) | Biochrom AG, Berlin |
| EDTA | Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz |
| Fetales Kälberserum (FCS) | PAA Laboratories GmbH, Seelze |
| Formaldehyd | Sigma- Alsrich Chemie, Steinheim |
| Giemsa | Merck, Darmstadt |
| Glycerin | Merck, Darmstadt |
| Glycerol | Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz |

| | |
|---|---|
| Glycin | Sigma, Deisenhofen |
| Ham's F-2 Medium | Biochrom AG, Berlin |
| L-Glutamin | GIBCO, Eggenstein |
| Leupeptin | Sigma, Steinheim |
| β-Mercaptoethanol | Sigma, Steinheim |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Micro BCA™ Proteinassay Kit 23235 | Pierce, Illinois, USA |
| Natriumchlorid (NaCl) | Fluka, Seelze |
| Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4$) | Merck, Darmstadt |
| Natriumfluorid | Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz |
| Natriumorthovanadate ($Na_3VO_4$) | Sigma- Aldrich Chemie, Steinheim |
| Natriumpyrophosphat | Fluka BioVhemika, Buchs, Schweiz |
| Natronlauge | Baker, Deventer, USA |
| Paraformaldehyd | Merck, Darmstadt |
| PBS (steril) | GIBCO, Auckland, New Zealand |
| Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin | PAA Laboratories GmbH, Österreich |
| Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), ohne $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$ | Biochrom AG, Berlin |
| Precision Plus Protein™ Standard | BioRad Laboratories, Hercules, USA |
| Puffertabletten (GIEMSA) | Merck, Darmstedt |
| Restore™ Western Blot Stripping Buffer | Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA |
| Rotiphorese 10x SDS- Page Laufpuffer | ROTH, Karlsruhe |
| Rotiphorese Gel A | ROTH, Karlsruhe |
| Rotiphorese Gel B | ROTH, Karlsruhe |
| Salzsäure (HCl) | Merck, Darmstadt |
| Silikon | Bayer, Deutschland |
| Sodium-dodecyl- sulfat (SDS) | Sigma, Steinheim |
| SuperSignal® West Pico Chemiluminescent substrate kit | Pierce, Illinois, USA |
| TEMED | Sigma, Deisenhofen |
| Tris | USB™, Ohio, USA |
| Triton X-100 | Sigma, Missouri, USA |
| Trypsin/EDTA | PAA Laboratories GMbH, |

| | |
|---|---|
| | Österreich |
| Tween 20 | Sigma, Steinheim |

### 2.1.3. Verbrauchsmaterial

| | |
|---|---|
| 6-well Zellkulturplatte | Becton Dickinson labware, NJ, USA |
| 96-well Mikrotiterplatte | Nunc-Maxi sorp, Roskilde, Dänemark |
| Blue max TN 15 ml Falcons | Becton Dickinson labware, NJ, USA |
| Blue max TN 50 ml Falcons | Becton Dickinson labware, NJ, USA |
| DAKO Pen S2002 | DAKO, Glostrup, Denmark |
| Gel-Blotting Paper | Schleicher und Schuell, Dassel |
| Eppendorf Tubes | Eppendorf |
| FlexiPerm disc (1,8 $cm^2$) | Greiner bio-one International AG, Kremsmünster, Österreich |
| FlexiPerm micro 12 (0,2 $cm^2$) | Greiner bio-one International AG, Kremsmünster, Österreich |
| Kanülen | Braun, Melsungen |
| Kodak Scientific imaging film | Eastman Kodak Company, NY, USA |
| Objektträger | Menzel, Braunschweig |
| Pasteurpipetten | Brand |
| Pipettenspitzen | Eppendorf |
| PVDF Westernblotting Membranen | Boehringer, Mannheim |
| Skalpelle | Braun, Aesculap, Tuttlingen |
| Zellkulturflasche (75 $cm^2$) | Becton Dickinson labware, NJ, USA |
| Zellscraper | NUNC, Wiesbaden |

### 2.1.4. Geräte

| | |
|---|---|
| Dampfsterilisator KSG 112 | KSG, Olching |
| Elektronische Waage IC2201P, KB BA 200 | Sartorius, München |
| Elektronische Waage MC210P, KB BA 100 | Sartorius, München |
| Elektrophoreseapparat Mini Protean II | BioRad, München |
| Fluoreszenz Mikroskop /Axioskop) | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Handstückzähler | IVO, Villingen-Schwenningen |

| | |
|---|---|
| Inkubator BB 6220 | Heraeus Instruments, Hanau |
| Invert Mikroskop TELAVALC31 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Multipipette plus | Eppendorf, Köln |
| Neubauer-Zählkammer | LO- Laboroptik, Friedrichsdorf |
| Perfect BlueTM Vertical electrophoresis system & Consort power supply E 831 | peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| PH- Meter, digitales pH 525 | WTW, Weilheim |
| Phasenkontrastmikroskop Telaval 31 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Pipetten | Eppendorf, Köln |
| Plattformschwenker Polymax 1040 | Heidolph |
| Proteinbestimmungsgerät | SLT Labinstruments GmbH |
| Semi-Dry Elektroblotkammer 2177 | LKB Bromma, Schweden |
| Sterilbank Typ HS 18/2 | Heraeus Instruments |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf, Köln |
| Thermostar 300-0132 | BMG, Offenburg |
| Vortex-2$^{TM}$ Genie Model G-560E | Scientific Industries, NY, USA |
| Wasserbad | Köttermann Labortechnik |
| Zentrifuge High-speed Labofuge 400R | Heraeus Instruments, Fellbach |
| Zentrifuge Rotixa/RP 4200 | Hettich, Tuttlingen |

### 2.1.5. Lösungen und Puffer

#### 2.1.5.1. Frisch hergestellte Puffer und Lösungen

*Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen in dd$H_2O$ angesetzt. Der jeweilige pH wurde mit HCl bzw. NaOH eingestellt.*

| | |
|---|---|
| 10 x Laufpuffer | 0,25 M Tris/HCl<br>1,92 M<br>1% SDS |
| AEBSF | 50 mg AEBSF in 2 ml dd$H_2O$ |
| Albumin-Puffer zur Antikörper-Verdünnung | 2 g Albumin, bovines Fraktion V in 100 ml PBST |
| APS-Lösung 10% | 100 g APS in 1 ml dd$H_2O$ |
| BisBenzimid | 1 mg BisBenzimid in 500 ml DNA-Puffer |

| | |
|---|---|
| Blocking-Puffer | 5 g Albumin, bovines Fraktion V in 100 ml PBST |
| Deck-Lösung | Laufpuffer/Methanol 1:1 (v/v) |
| DNA-Puffer (pH 7,4) | 50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$<br>2 M NaCl |
| Laemmli Proben-Puffer 2x | 125 mM Tris/HCl, pH 6,8<br>4% SDS (w/v)<br>0,5 ml 0,02% Bromophenolblau<br>20% Glycerol<br>5% β- Mercaptoethanol<br>0,5 ml $ddH_2O$ |
| Laemmli Proben-Puffer 6x | 156,25 mM Tris/HCl, pH 6,8<br>12% SDS (w/v)<br>60% Glycerol<br>15% β- Mercaptoethanol |
| Lysis-Puffer | 10 mM Tris/HCl (pH 7,6)<br>5 mM EDTA<br>50 mM NaCl<br>30 mM Natriumpyrophosphat<br>50 mM Natriumfluorid<br>1 % Triton X-100<br>vor Gebrauch hinzufügen:<br>0,1 mM $Na_3VO_4$<br>10 µl/ml AEBSF<br>10 µl/ml Aprotinin<br>10 µl/ml Leupeptin |
| PBS | 9,55 g in 1 l $ddH_2O$ |
| PBST (0,05%): | 0,05% Tween 20 in PBS |
| PBST (0,1%) | 0,1% Tween 20 in PBS |
| Sammelgel | 933 µl Gel A<br>736 µl Gel B<br>50 µl 20% SDS<br>1,25 ml Tris/HCl, pH 6,8<br>7,03 ml $ddH_2O$ |

| | |
|---|---|
| | 10 µl TEMED |
| | 100 µl 10% APS |
| SDS 20 % | 20 g SDS in 100 ml $ddH_2O$ |
| TNB-Puffer (pH 7,5): | 0,1 M Tris/HCl |
| | 0,15 M NaCl |
| | 0,5% bovine Albumin Fraktion V |
| Transfer-Puffer | 39 mM Glycin |
| | 48 mM Tris |
| | 0,0375% SDS |
| | 20 % Methanol |
| Trenngel 8% | 3,2 ml Gel A |
| | 2 ml Gel B |
| | 62 µl 20% SDS |
| | 7,225 ml Tris/HCl, pH 8,8 |
| | 7,5 µl TEMED |
| | 100 µl 10% APS |
| Tris/ HCl 0,625 M | 37,84 g Tris in 1 l $ddH_2O$, pH 6,8 |
| Tris/HCl 0,75 M | 90 g Tris in 1 l $ddH_2O$, pH 8,8 |

### 2.1.5.2 Fertige Puffer und Lösungen

| | |
|---|---|
| 10x SDS-PAGE Laufpuffer | ROTH, Karlsruhe |
| Gel A (29% Methylenbisacrylamid) | ROTH, Karlsruhe |
| Gel B (30% Acrylamid) | ROTH, Karlsruhe |
| Restore™ Western Blot Stripping Buffer | Pierce Biotechnology, Rockford IL, USA |

### 2.1.6. Antikörper und Inhibitoren

| | |
|---|---|
| Alexa Fluor 488 phalloidin | MolecularProbes, Eugene, USA |
| Alexa Fluor 594 | MolecularProbes, Eugene, USA |
| Alexa Fluor Streptavidin | MolecularProbes, Eugene, USA |
| Anti-Akt | Cell Signaling Technology, USA |
| Anti-mouse-Biotin | DAKO, Hamburg |
| Anti-mouse-HRP | DAKO, Hamburg |
| Anti-p38 MAP Kinase (5F11) | Cell Signaling Technology, USA |

| | |
|---|---|
| Anti-p42 MAP Kinase (3A7) | Cell Signaling Technology, USA |
| Anti-Paxillin mAb, clone 5H11 | Upstate, Lake Placid, USA |
| Anti-PDGF- BB | R&D Systems, Abington, GB |
| Anti-PDGF Rezeptor ß | Upstate, Lake Placid, USA |
| Anti-Phospho-Akt (Ser473) (587F11) | Cell Signaling Technology, USA |
| Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10) | Cell Signaling Technology, USA |
| Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (E10) | Cell Signaling Technology, USA |
| Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10 | Upstate, Lake Placid, USA |
| Anti-Phosphotyrosine, clone P-Tyr-100 | Cell Signaling Technology, USA |
| Anti-rabbit-biotin | DAKO, Hamburg |
| Anti-rabbit-HRP | DAKO, Hamburg |
| LY294002 | Cell Signaling Technology, USA |
| PD98059 | Sigma Aldrich, USA |
| PDGF-AB | Biosource Int., Camarillo, USA |
| SB 203580 | Calbiochem |
| Streptavidin-HRP | DAKO, Hamburg |
| Tyrphostin AG1295 | Calbiochem |

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkultur

In den Versuchen wurden pankreatische Sternzellen zwischen der 3. und 10. Passage verwendet.

Außerdem wurden die pankreatischen Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 bis zur 100. Passage für die Experimente benutzt. Während es sich bei MiaPaCa2-Zellen um eine undifferenzierte pankreatische Tumorzelllinie handelt, sind Panc1-Zellen duktalen Ursprungs und haben ultrastrukturelle Eigenschaften eines Grad 2 Tumors. SW850 ist eine Tumorzelllinie, die aus dem exokrinen Teil des Pankreas stammt [53].

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5% $CO_2$-Gehalt in gesättigter Wasserdampfatmosphäre kultiviert. Das Medium bestand zu gleichen Teilen aus DMEM und HAM's-F12-Lösung mit L-Glutamin (2% Vol), 1% Streptomycin/Penicillin, 0,1% Amphotericin B und 10% fetalem Kälberserum. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie konfluent waren oder für einen Versuch benötigt wurden. Beim Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Flaschen mit sterilem PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen 1,5 ml Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche zugegeben. Anschließend wurden die Zellen drei Minuten lang im Brutschrank inkubiert, danach wurde die erfolgte Ablösung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls mechanisch unterstützt. Die Zellsuspension wurde in einen 50 ml Falcon überführt und 20 ml 20% FCS-Medium zugegeben. Dies wurde bei 1000 U/min und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in neuem Medium aufgenommen und Anteile in neue Kulturflaschen (75 $cm^2$, 20 ml Medium) ausgesät.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig mikroskopisch auf ihre Reinheit und einen bakteriellen oder mykotischen Befall hin kontrolliert.

### 2.2.2. Zellzählung

Beim Zählen der Zellen wurden dieselben Schritte wie beim Passagieren angewandt, jedoch wurde das Zellpellet nach dem Zentrifugieren in einem bestimmten, je nach geschätzter Anzahl der Zellen gewünschtem Volumen an Medium verdünnt. Daraus wurden 10 µl entnommen und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Mit einem Handstück- Zähler wurden die einzelnen Zellen in den vier Kreuzen der Kammer gezählt und die Gesamtanzahl an Zellen im aufgenommenen Medium berechnet. Auf diese Weise konnte jedes Mal dieselbe benötigte Zellzahl entnommen und neu ausgesäht werden.

### 2.2.3. Konditionierung von Tumorzellüberständen

Tumorzellen der drei verwendeten Zelllinien wuchsen in 75 $cm^2$-Kulturflaschen in oben beschriebenen Medium bis zur nahezu vollständigen Konfluenz. Das Medium wurde dann abgesaugt und durch 10 ml Medium ohne FCS für 48 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium in einen 50 ml-Falcon überführt und 5 min bei 1000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch setzten sich feste Zellbestandteile wie z.B. apoptotische Zellen ab und der Überstand konnte abpipettiert, portioniert und bei –20°C eingefroren werden.

### 2.2.4. Wound healing assay

Nach dem Passagieren von humanen pankreatischen Sternzellen wurden diese gezählt und es erfolgte eine Aussaat von 1,5 $x10^5$ PSCs/Well in 6-Well-Platten. Nachdem die Zellen nach zwei Tagen die ausreichende Dichte erreicht hatten, efolgte ein Mediumwechsel, bei dem das FCS auf 0% reduziert wurde. Nach einer Reduktionszeit von 12 h, wurden mittels einer 10 µl-Pipettenspitze drei parallele zellfreie Linien in den Zellrasen des 6-Wells gezogen (s. Abb.1). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Die PSCs wurden mit den Tumorzellüberständen der drei Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850, die im Wasserbad bei 37°C für 2 h aufgetaut und inkubiert wurden, stimuliert. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen an Tumorzellüberstand im Medium verwendet (25%; 50%; 75%), sowie unterschiedliche FCS- Konzentrationen (0,1%; 1%; 5%; 10%). Das Gesamtvolumen des zugegebenen Tumorzellüberstand/Medium-Gemischs betrug 2 ml/6-Well. Als Kontrolle dienten PSCs ohne Tumorzellüberstand im Medium. Die Zellen wurden so über 24 h im Brutschrank inkubiert, dabei wurde darauf geachtet, dass die 6-Well-Platten

möglichst nicht bewegt wurden, um eine eventuelle mechanische Stimulation der Zellen auszuschließen. Nach dieser Zeit wurden mit dem Mikroskop Fotos von der zellfreien Fläche im Zellrasen gemacht. Nach Ermittlung der besten Kondition (hier: 50% Tumorzellüberstand und 5% FCS- Gehalt im Medium), bei der die meiste Migration bzw. Proliferation der PSCs innerhalb der Linie beobachtet wurde, wurden die Zellen 1 h vor dem Linienziehen mit 10 µM AG1295 (Inhibitor der PDGF Rezeptor-Kinase), 25 µM LY294002 (Inhibitor der PI3-Kinase), 20 µM SB203580 (Inhibitor der p38 MAP-Kinase), sowie 20 µM PD89059 (Inhibitor der MAPK/ERK-Kinase) präinkubiert, sowie nach dem Ziehen der Linien in den angegebenen Konzentrationen für die Versuchsdauer von 24 h hinzugegeben bzw. wurde der Tumorzellüberstand vor Versuchsstart für 1 h mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB präinkubiert. Anschließend wurden wieder Fotos der Linie aufgenommen.

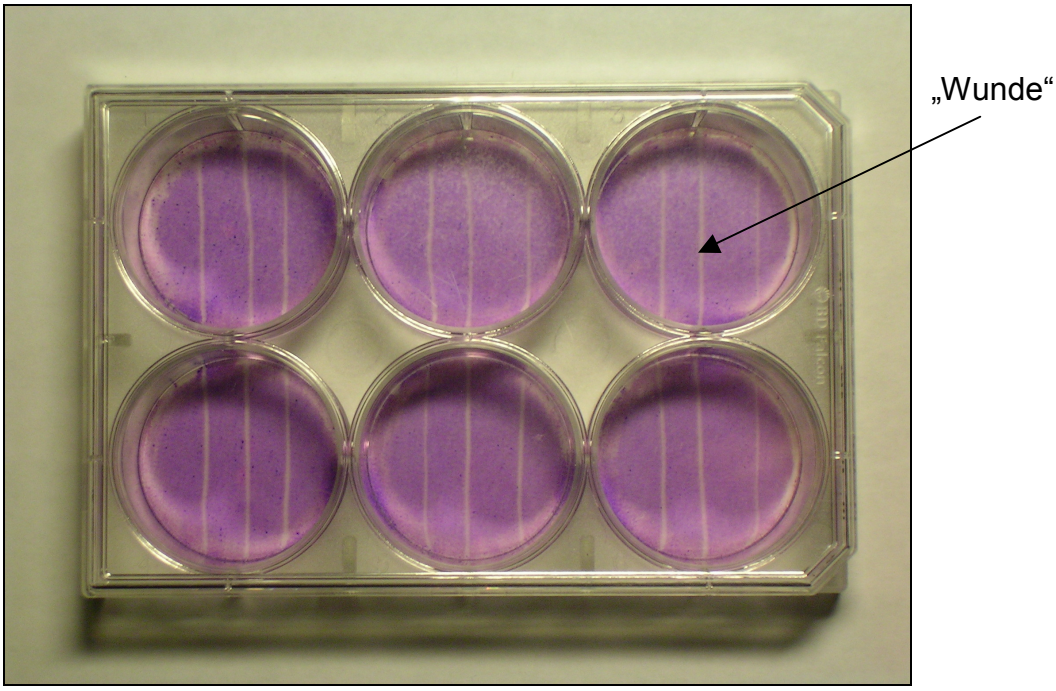



**Abb.1: Wound healing assay.** 6-Well-Kulturplatte mit PSC (Pankreatische Sternzell)-Monolayer, in den „Wunden“ durch eine Pipettierspitze eingekratzt wurde. Die „Wunde“ ist etwa 500 µm breit. Nach Durchführen des Experiments wurden die Zellen mit Formaldehyd (4%) fixiert und mit Giemsa-Lösung angefärbt.

### 2.2.5. Stimulation der Migration von PSCs durch Tumorzellüberstände in Agarosegel

Für die Herstellung des Agarose/Tumorzellüberstandgels wurde zunächst das Agarosepulver abgewogen und mit Medium (1:1 HAM's und DMEM) zu einer 2%igen Lösung gebracht. Dazu wurde dieses Gemisch auf einem Heiz-Rührer zweimal zum Kochen gebracht. Anschließend wurde die Flüssigkeit für 30 Minuten im Wasserbad auf 40°C abgekühlt. Daraufhin wurde diese flüssige 2%ige Agarose 1:1 mit aufgetautem Tumorzellüberstand der drei Tumorzelllinien gemischt. Bevor 700 µl dieses noch flüssigen Gels auf die rechte Seite eines 6-Wells gegossen wurde, wurde der Boden auf der rechten Seite des 6-Wells mit einer sterilen Kanüle aufgerauht. Beim Gießen des Gels wurde die 6-Well Platte mit einer Steigung von 40° positioniert. Das Gel härtete in dieser Position bei Raumtemperatur für 1 h aus und die Gelkante wurde mit einem Skalpell gerade gezogen. Nach Festwerden des Gels wurden die selbsthaftenden FlexiPermRinge (Ø 6 mm) mit Hilfe einer Pinzette im 6-Well angebracht, wobei darauf geachtet wurde, dass der Innenkreis des Rings sich in einem Abstand von 3 mm von der Gelkante befand. Nun wurden die PSCs wie oben beschrieben passagiert und gezählt. Pro FlexiPermRing wurden mit 200 µl 10%igem Medium 5500 PSCs gesäht (s. Abb. 2). Nach einer Anwachszeit der Zellen von 2½ h im Brutschrank, wurde der FlexiPermRing vorsichtig mit einer Pinzette entfernt, das 6-Well zweimal mit Medium gewaschen und 2 ml Medium/Well mit jeweils unterschiedlicher FCS-Konzentration (0,1%; 1%; 5%; 10%) hinzugefügt. Dann erfolgte die mikroskopische Kontrolle des Zellkreises. Zur objektiven Markierung des rechten Randes des Zellkreises als „Startlinie" für die migrierenden Zellen, wurde auf der Bodenunterseite des 6-Wells mit Hilfe von Klebestreifen ein auf Folie gedrucktes „Lineal" mit feiner Skalierung aufgebracht. Die Skalierungsmarke für die Position der „Startlinie" wurde notiert. Die Zellen wurden so für 48 h im Brutschrank inkubiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die 6-Well Platte in dieser Zeit nicht bewegt wurde, um eine mechanische Stimulation der Zellen möglichst zu vermeiden, und damit sich ein Gradient an Wachstumsfaktoren aus dem Gel entwickeln konnte. Als Kontrolle diente ein 1%iges Agarosegel ohne Zugabe von Tumorzellüberstand. Nach der Inkubationszeit wurden mit dem Mikroskop Fotos gemacht, wobei auf die Einstellung der Position der ursprünglichen „Startlinie" der Zellen vom rechten Rand des Zellkreises mit Hilfe der notierten Skalierungsmarke geachtet wurde. Nach Ermitteln der geeignetsten

Kondition (0,1% FCS-Konzentration) für die weiteste Migration der PSCs von links nach rechts, wurden die Zellen im FlexiPermRing 1 h vor Start der 48 h Versuchsdauer mit 10 µM AG1295 (Inhibitor der PDGF Rezeptor-Kinase) präinkubiert, sowie in dieser Konzentration für die Versuchsdauer von 48 h hinzugegeben bzw. der Tumorzellüberstand 1 h vor Mischen mit der 2%igen Agarose zum Gel mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB präinkubiert. Anschließend wurden wieder Fotos gemacht.

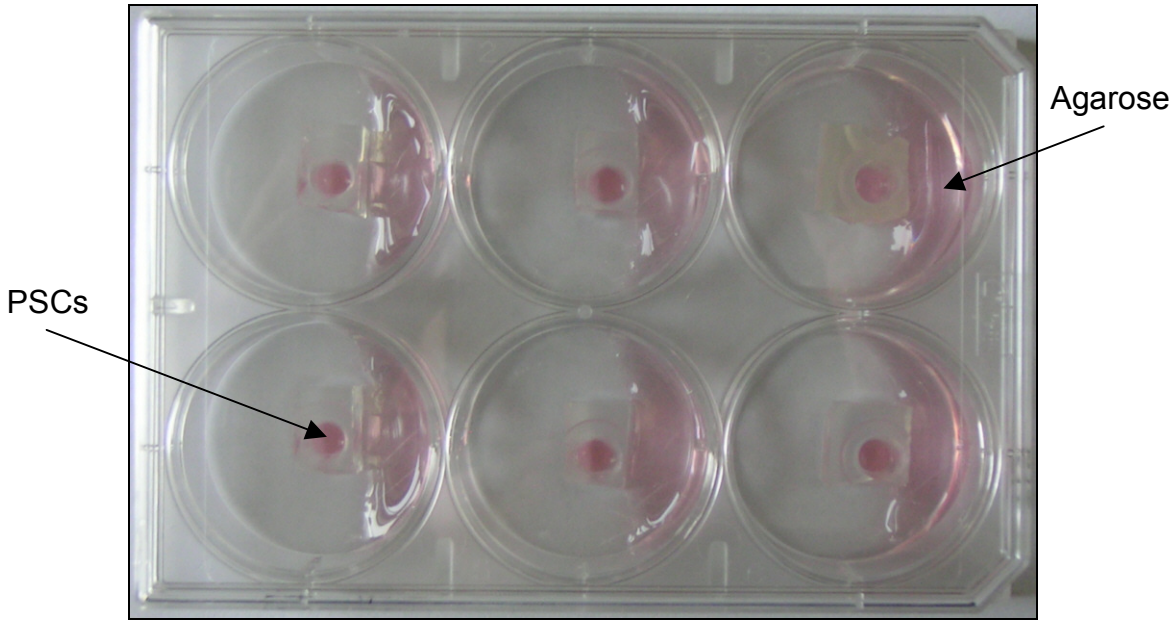



**Abb.2: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch Tumorzellüberstände in Agarosegel.** In jedem 6-Well dargestellt ist rechts das Agarose/Tumorzellüberstandgel, links die PSC-Zellkultur in einem 6 mm-Flexiperm-Ring.

### 2.2.6. Stimulation der Migration von PSCs durch Tumorzellen (Cokultur)

Auf die linke Seite eines 6-Wells wurde mit Hilfe einer Pinzette ein FlexiPermRing im Durchmesser von 6 mm angebracht und auf die rechte Seite ein FlexiPermRing im Durchmesser von 12 mm. Dann wurden PSCs und Tumorzellen passagiert und gezählt. In den kleineren Ring auf der linken Seite wurden mit 200 µl 10%igem Medium 5500 PSCs und in den größeren rechten Ring mit 900 µl 10%igem Medium 50 000 MiaPaCa2 bzw. 50 000 Panc1 bzw. 70 000 SW850 gesäht (s. Abb. 3). Nach einer Anwachszeit der Zellen für 2½ h im Brutschrank, wurden die FlexiPermRinge entfernt, das 6- Well zweimal mit Medium gewaschen und 2 ml Medium in unterschiedlicher FCS- Konzentration (0,1%; 1%; 5%; 10%) zugegeben. Wie oben beschrieben, wurde wieder zur Markierung der „Startlinie“ der PSCs am rechten Rand des kleineren Rings an der Bodenunterseite der 6-

Well-Platte ein auf Folie gedrucktes „Lineal“ befestigt und die Skalierungsmarke der „Startlinie“ notiert. Die Zellen wurden für 48 h im Brutschrank inkubiert, wobei aus oben genannten Gründen darauf geachtet wurde, dass die 6-Well-Platte nicht bewegt wurde. Als Kontrolle diente ein 6-Well, in dem ausschließlich im kleineren FlexiPermRing PSCs gesäht und auf Tumorzellen verzichtet wurde. Dann wurden mit dem Mikroskop Fotos gemacht, wobei auf die genaue Einstellung der ursprünglichen „Startlinie“ der PSCs mit Hilfe der Skalierungsmarke geachtet wurde. Nach Ermitteln der geeignetsten Kondition (0,1% FCS-Konzentration) für die weiteste Migration der PSCs von links nach rechts, wurden die Zellen im FlexiPermRing 1 h vor Start der 48 h Versuchsdauer mit 10 µM AG12195 (Inhibitor der PDGF Rezeptor-Kinase) präinkubiert, sowie in dieser Konzentration für die Versuchsdauer von 48 h hinzugegeben. Davon wurden Fotos gemacht.

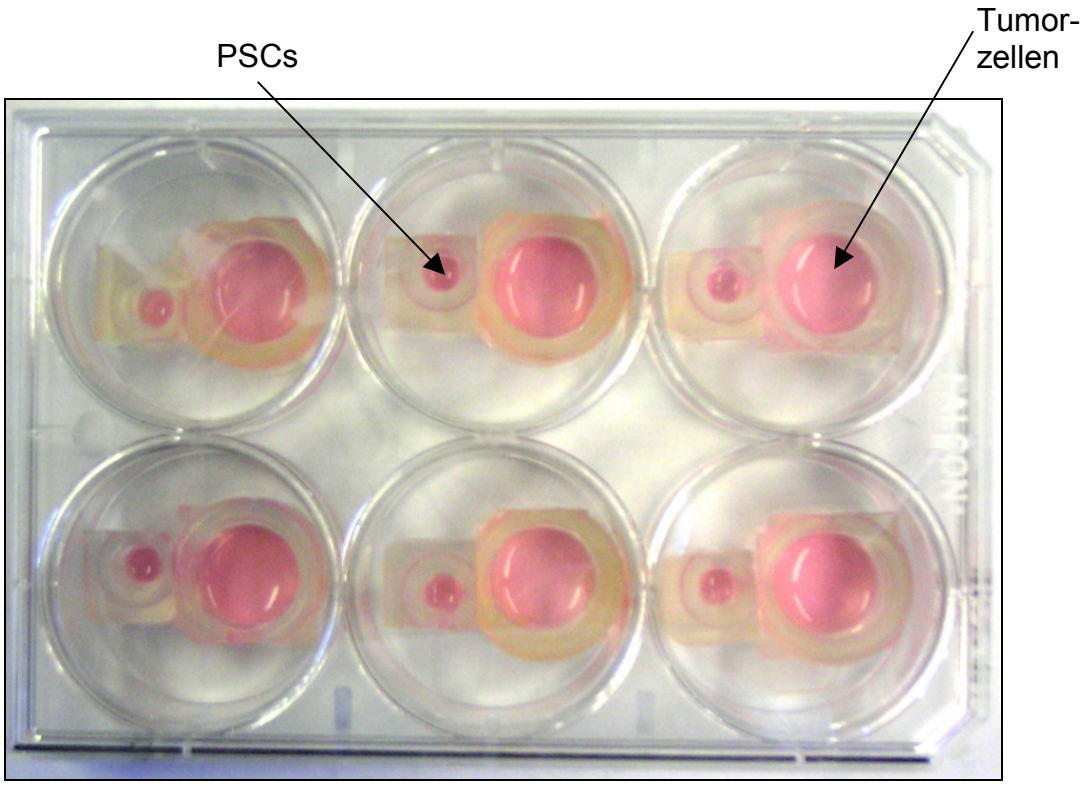



**Abb.3: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch Tumorzellen (Cokultur).** In jedem 6-Well dargestellt ist rechts die Tumorzellen-Zellkultur in einem 12 mm-Flexiperm-Ring, links die PSC-Zellkultur in einem 6mm-Flexiperm-Ring.

### 2.2.7. Stimulation von PSCs durch Tumorzellüberstände und Gewinnung von PSC-Zelllysat

Nach dem Passagieren von PSCs, wurden diese gezählt und 2 x $10^5$ Zellen/Well in 6-Well-Platten kultiviert und für 48 h im Brutschrank mit 10%igem Medium inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das FCS auf 0% reduziert und pro 6-Well nur 1 ml Medium hinzugegeben wurde. Die Reduktionszeit betrug 24 h Stunden, wobei darauf geachtet wurde, dass zur Vermeidung einer mechanischen Aktivierung der Zellen, die 6-Well-Platte im Inkubator nicht bewegt wurde. Vor Beginn der Stimulation der Zellen wurde der Tumorzellüberstand 2 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Für die Stimulation wurde zu den PSCs im Brutschrank mit Hilfe der Multipipette 3 ml purer Tumorzellüberstand pro 6-Well zugegeben und nach einem Zeitschema (45 Min.; 30 Min.; 20 Min.; 10 Min.; 5 Min.) inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation der Zellen mit 3 ml 37°C warmen Medium für 5 Minuten. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen, nachdem das Medium verworfen worden war, mit Lysispuffer 10 Minuten auf Eis inkubiert, wobei wiederum grobe Bewegungen der 6-Well-Platte vermieden wurden. Mittels eines Zellscrapers wurden die lysierten Zellen danach vom 6-Well-Boden geschabt und in gekühlte Eppendorf-Tubes pipettiert. Durch die Zentrifugation der Proben bei 13 000 U/min für 10 Minuten bei 4°C setzten sich feste Zellbestandteile ab und die Überstände konnten abpipettiert und bis zu ihrer Verwendung bei –20°C eingefroren werden.

Zur Ermittlung der Dosis-abhängigen Stimulation der PSCs durch Tumorzellüberstände wurden diese vor Zugabe zu den Zellen mit Medium gemischt, um folgende Konzentrationen an Tumorzellüberständen zu erhalten: 10%; 20%; 30%; 40%; 50%. Die Stimulation der PSCs mit diesem Tumorzellüberstand/Medium-Gemisch erfolgte für 5 Minuten. Danach erfolgte die Lyse der Zellen wie oben beschrieben.

Für die Stimulation der PSCs mit Inkubation der Zellen mit Inhibitoren wurde folgendermaßen vorgegangen: 10 µM AG1295 (Inhibitor der PDGF Rezeptor-Kinase) wurden 24 h vor der 5-minütigen Stimulation der Zellen mit 10%igem Tumorzellüberstand zugegeben. Für die Inkubation mit 20 µM PD98059 (Inhibitor der MAPK/ERK-Kinase) und mit 25 µM LY294002 (Inhibitor der PI3-Kinase) wurden die PSCs vor der 5-minütigen Stimulation mit 10%igem Tumorzellüberstand 1 h lang mit den Inhibitoren inkubiert.

Bei der Verwendung des PDGF-BB-Antikörpers wurde der Tumorzellüberstand 1 h vor der 5-minütigen Stimulation der PSCs mit 75%igem Tumorzellüberstand mit 1 µg/ml Anti-PDGF-BB bei 37°C inkubiert.
Zur Stimulation der Sternzellen mit PDGF-AB, wurde für 5 Minuten 3 ml Medium, das 2,5 µg/ml PDGF-AB enthielt, zugegeben.

### 2.2.8. Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysat

Mit Hilfe des Micro BCA$^{TM}$ Protein Assay Kit der Firma Pierce erfolgte die Proteinbestimmung aus dem Zelllysat. Zunächst wurden die Proben im Verhältnis 1:250 mit dd$H_2O$ verdünnt. Dann wurde eine Standardverdünnungsreihe (höchster Standard 1:100 mit dd$H_2O$ verdünnt, die folgenden Standards je 1:1) erstellt. Die Standard-Stocklösung enthielt 2000 µg/ml Protein. Vom Standard und den Probe wurden je 100 µl (Doppelbestimmung) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Danach erfolgte die Herstellung des Working-Reagent (Reagenz A; Reagenz B; Reagenz C). Von dieser Lösung wurden 100 µl/Well auf den Standard und die Proben pipettiert, über 2 h bei 37°C im Dunkeln rüttelnd inkubiert und anschließend die Proteinkonzentration im Proteinmeßgerät gemessen.

### 2.2.9. Western Blot

Die Trennkammer wurde zusammengebaut, in den Gießstand gesteckt und mit Laufpuffer auf Dichtheit geprüft. Trenn- und Sammelgele wurden hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel in den Gießstand gegossen und mit einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Laufpuffer zur Erlangung einer geraden Gelkante überschichtet. Nachdem das 8%ige Trenngel innerhalb von 15 Minuten auspolymerisiert war, wurde das Methanol/Laufpuffer-Gemisch abgeschüttet und durch Sammelgel ersetzt. In das Sammelgel wurde ein Kamm zur Herstellung der Geltaschen positioniert. Dem Gel wurden 30 Minuten Zeit zum Auspolymerisieren gegeben. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Proben: Nach Stimulation der Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysat (s. o.) wurden die Proben mit Lyse-Puffer alle auf das gleiche Volumen angeglichen, sofern sich Unterschiede in der Proteinbestimmung ergeben hatten. Danach wurden die Proben mit 6-fach reduzierendem Laemmli-Probenpuffer im Verhältnis 1:6 gemischt und über 5 Minuten bei 95°C im Thermoschüttler inkubiert. Nun erfolgte die Zentrifugation der Proben bei Raumtemperatur für 3 Minuten und 8000 U/min. Nach Entfernung des Kamms aus dem Sammelgel wurden die Geltaschen mit

dem gleichen Volumen (25 – 32 µl/Tasche) und Proteinmenge (ca. 18 µg Protein/Probe) der Proben befüllt. Als Standardmarker diente der Dual Color Precision Plus Protein™ Standard von BioRad. Die Trennkammer wurde mit Laufpuffer in die Elektrophoresekammer gestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstant 22 mA über 2 h. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels eines Semi-Dry-Elektrotransfer-Geräts unter konstant 0,8 V/cm$^2$ 1½ h auf die zugeschnittenen PVDF-Membranen übertragen. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden die PVDF-Membranen nach dem Elektroblot über 2 h bei Raumtemperatur in 5%igem Albuminblockierpuffer inkubiert. Über Nacht wurden die Membranen in 50 ml-Falcons bei 4°C mit dem Erstantikörper in 2%iger Albuminlösung (siehe unten) inkubiert. Nach mehrmaligem gründlichen Waschen (8 x 5 Minuten) in 0,1%igem PBST wurden die Membranen entweder 1 h lang mit dem Zweitantikörper Anti-Maus-Biotin (1:2000 in 2%iger Albuminlösung) bzw. Anti-Ratte-Biotin (abhängig vom Erstantikörper) zur Verstärkung der Banden inkubiert, 8 x 5 Minuten in PBST gewaschen und mit Streptavidin-HRP (1:2000 in 2%iger Albuminlösung) inkubiert oder gleich mit dem Zweitantikörper Anti-Maus-HRP bzw. Anti-Ratte-HRP (1:2000 in 2%iger Albuminlösung) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde wieder gründlich (8 x 5 Minuten) gewaschen. Nun wurden die Membranen für 5 Minuten in West Picco Chemieluminescent Substrate Kit geschwenkt. Die Banden zeigten sich nach der Entwicklung der Kodak x-ray Filme.

| Erstantikörper: | Zweitantikörper: |
|---|---|
| a) Phospho-Akt (1:1000) | Maus |
| b) Total-Akt (1:1000) | Ratte |
| c) Phospho-Erk (1:2000) | Maus |
| d) Total-Erk (1:2000) | Maus |
| e) Phospho-p38 (1:2000) | Maus |
| f) Total-p38 (1:2000) | Maus |
| g) Total-PDGF Rezeptor β (1:1000) | Ratte |
| h) Phospho-Tyrosine 4G10 (1:1000) | Maus |

Um das totale Protein der Kinasen in der Probe als Ladungskontrolle zu detektieren, wurde die Membran gestrippt und neu mit dem jeweiligen Antikörper gegen das gesamte Protein inkubiert. Dazu wurde die Membran für 30 Minuten bei

37°C im Wasserbad mit 25 ml Stripping Buffer inkubiert. Danach wurde der Blot mindestens 3x alle 5 Minuten in PBST gewaschen, danach für 1 Stunde erneut in 5% Albumin blockiert und über Nacht bei 4°C im nächsten Antikörper inkubiert. Die folgenden Schritte sind dieselben wie oben beschrieben.

### 2.2.10. Immunfluoreszenzfärbung

Es wurden 5 x $10^4$ PSCs/6-Well auf Glasplättchen kultiviert. Nach 24 h wurde das 10%ige Medium durch 1,5 ml FCS-freies Medium/Well ersetzt. Nach der Reduktionszeit von 24 h erfolgte die Stimulation der Zellen im Brutschrank mit 3 ml Tumorzellüberstand für 5 bzw. 20 Minuten. Als Kontrolle diente die Stimulation mit 3 ml Medium für 5 Minuten. Tumorzellüberstand und Medium wurden vor Stimulation für 3 h im Wasserbad bei 37°C präinkubiert. Nach Verwerfen des Mediums wurden anschließend die Zellen mit PBS zweimal gewaschen und mit 4%igem Paraformaldehyd 10 Minuten lang fixiert. Wieder wurde zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Bis zum Beginn der Färbung wurden die Zellen in PBS bei 4°C aufgehoben.

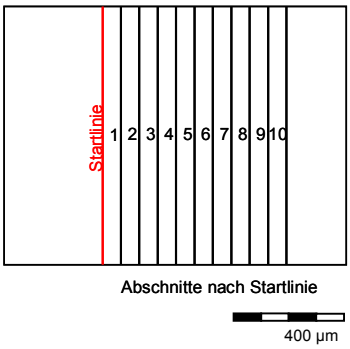
Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen zunächst zweimal mit $H_2O$ gewaschen und anschließend getrocknet. Die Glasplättchen wurden mit Silikonpaste auf Objektträger geklebt. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte mit 0,2%igem Triton X-100 (in PBS) bei Raumtemperatur. Nach 10 Minuten wurde 3 x 5 Minuten mit 0,05%igen PBST gewaschen und unspezifische Bindungen durch 30-minütige Inkubation mit einem 1:1 Gemisch aus FCS und PBS blockiert.

Zum Nachweis von Paxillin und der Tyrosinphosphorylierung wurden folgende Färbeschritte nacheinander durchgeführt. Die Antikörper wurden in TNB-Puffer verdünnt: Inkubation mit dem Erstantikörper Anti-Paxillin (1:100) bzw. Anti-Phosphotyrosine 4G10 (1:100) für 1 h, Inkubation mit dem Zweitantikörper Rabbit-Anti-Maus-Alexa-Fluor 594F (rot) (1:100) im Dunkeln für 1 h. Zum Nachweis von F-Aktin wurde der Erstantikörper Alexa-Fluor-488-Phalloidin (grün) (1:20) verwendet und 1 h im Dunkeln inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte anschließend mit BisBenzimid für 15 Minuten. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurde in einer feuchten Kammer gefärbt. Nach jedem der Färbeschritte wurden die Objektträger gründlich in 0,05%igem PBST 3 x 5 Minuten gewaschen. Mit dem Immunfluoreszenzmikroskop wurden Fotos der Zellen gemacht.

### 2.2.11. Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal reproduziert. Die Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz zwischen unterschiedlichen Gruppen wurde durch Verwendung der einfaktoriellen Varianzanalye ANOVA ONEWAY (Scheffé-Test) ermittelt. Der Wert $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den Abbildungen als $*$ markiert. Es wurde das Statistikprogramm SPSS (11. Version) verwendet.

Die Auswertung der Ergebnisse der Zellkulturversuche, bei denen die direkte Migration der Sternzellen zum einen durch Tumorzellüberstandgel und zum anderen durch Tumorzellen selbst ausgelöst wurde (Methoden erläutert in 2.2.5. und 2.2.6., Ergebnisse dargestellt in 3.1.2 und 3.1.3.) soll zeigen, welche Anzahl der Sternzellen migrieren und welche Strecke sie ab der markierten „Startlinie“ zurücklegen. Dazu wurde unten abgebildete Schablone zur Auswertung jedes mikroskopischen Fotos verwendet. Eingezeichnet ist die Startlinie der Zellen bei Versuchsanfang an gleicher Stelle wie bei den mikrospopischen Fotos, sowie die Unterteilung der zurückgelegte Strecke in 10 Abschnitte. In der statistischen Darstellung im Ergebnisteil wurde die Anzahl der Zellen pro Abschnitt gezählt und die Mittelwerte aus 3 Versuchen im Diagramm dargestellt.



# 3. ERGEBNISSE

## 3.1 Stimulation und Inhibition der Migration von Sternzellen

Die Fähigkeit der drei verwendeten pankreatischen Tumorzelllinien (MiaPaCa2, Panc1 und SW850), Sternzellen zur Migration durch Freisetzung chemotaktischer Faktoren zu stimulieren, wurde mit den folgenden Methoden untersucht. In anschließenden Versuchen wurde die Auswirkung auf die PSC-Migration unter Verwendung von Antikörpern und Inhibitoren gegen das Zytokin PDGF-BB (Anti-PDGF-BB) und seines Rezeptors (AG1295) sowie gegen die Signaltransduktionsproteine PI3-K (LY294002), Erk (PD98059) und p38 (SB203580) dargestellt.

### 3.1.1 PSC-Migration im Wound healing assay

#### 3.1.1.1 Stimulation der PSC-Migration durch Tumorzellüberstand

Die Migration von Sternzellen hervorgerufen durch Stimulation mit Tumorzellüberstand wurde mittels des Wound healing assays untersucht.

PSCs wurden in 6-Wells in 10% FCS-Medium bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Nach einer Ruhephase von 12 h in 0% FCS-Medium wurden die Zellen über 24 h mit 25%, 50% oder 75% konditioniertem Überstand der Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 in 0,1%, 1%, 5% oder 10% FCS- Medium inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils die 24stündige Inkubation mit 100% Medium der angegebenen vier FCS-Konzentrationen. Die Abb.4 – Abb.7 zeigen die beschleunigte PSC-Migration in Abhängigkeit von Tumorzellüberstand bei vier verschiedenen FCS-Konzentrationen im Medium.

Konditionierter Tumorzellüberstand der drei Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 schmälert die Lücke im PSC-Zellrasen unabhängig von der FCS-Konzentration.

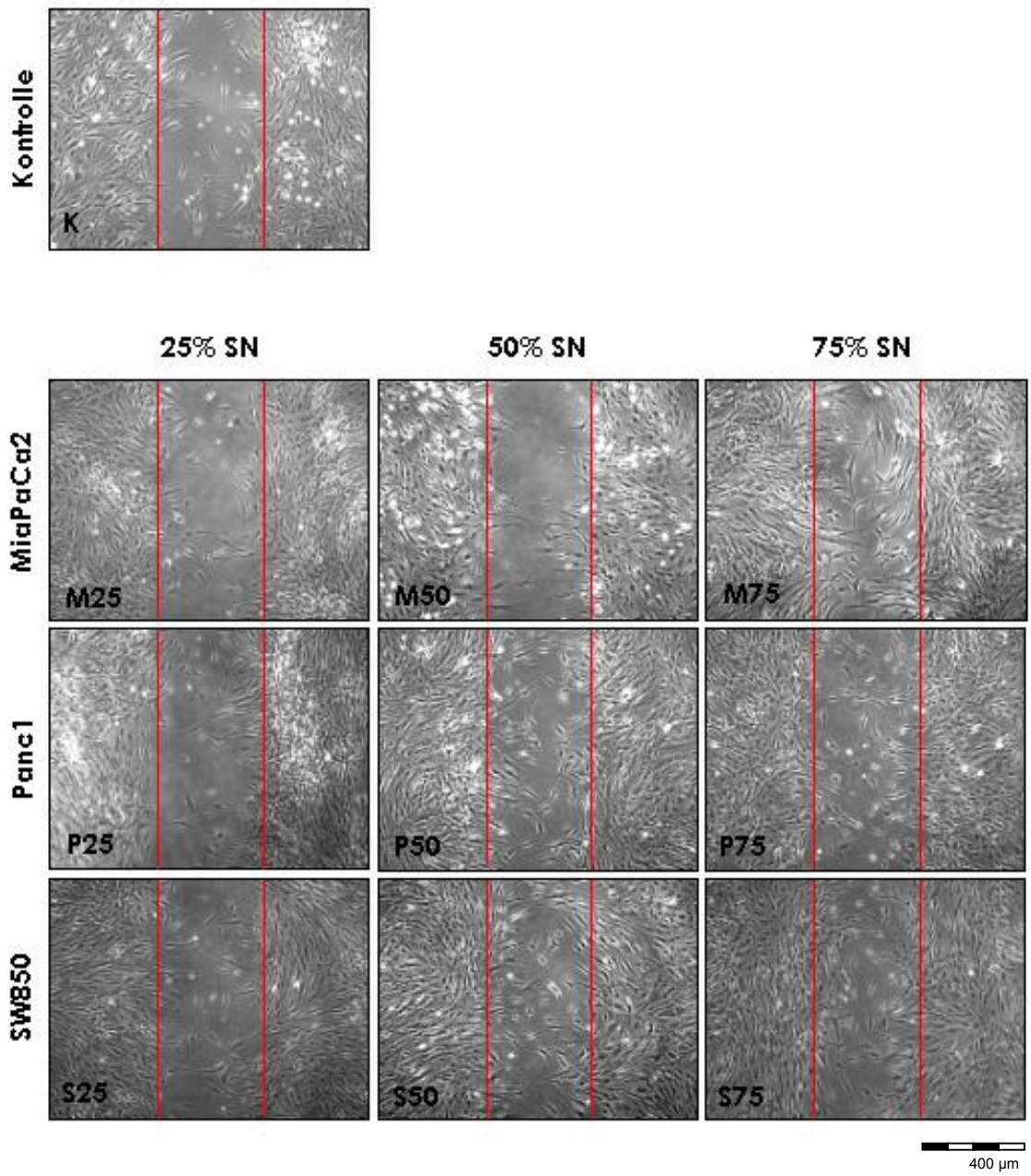



**Abb. 4: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration mit Tumorzellüberstand (SN) in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Herstellen der zellfreien Fläche innerhalb des konfluenten PSC-Zellrasens mittels einer 10 µl Pipettenspitze wurden die Sternzellen über 24 h mit drei verschiedenen Konzentrationen (25%; 50%; 75%) an konditioniertem Tumorzellüberstand in 0,1% FCS-Medium inkubiert. **K:** Kontrolle (2 ml 0,1% FCS-Medium über 24 h). **M25**: Stimulation mit 25% MiaPaCa2-Überstand. **M50**: Stimulation mit 50% MiaPaCa2-Überstand. **M75**: Stimulation mit 75% MiaPaCa2-Überstand. **P25**: Stimulation mit 25% Panc1-Überstand. **P50**: Stimulation mit 50% Panc1-Überstand. **P75**: Stimulation mit 75% Panc1-Überstand. **S25**: Stimulation mit 25% SW850-Überstand. **S50**: Stimulation mit 50% SW850-Überstand. **S75:** Stimulation mit 75% SW850-Überstand.

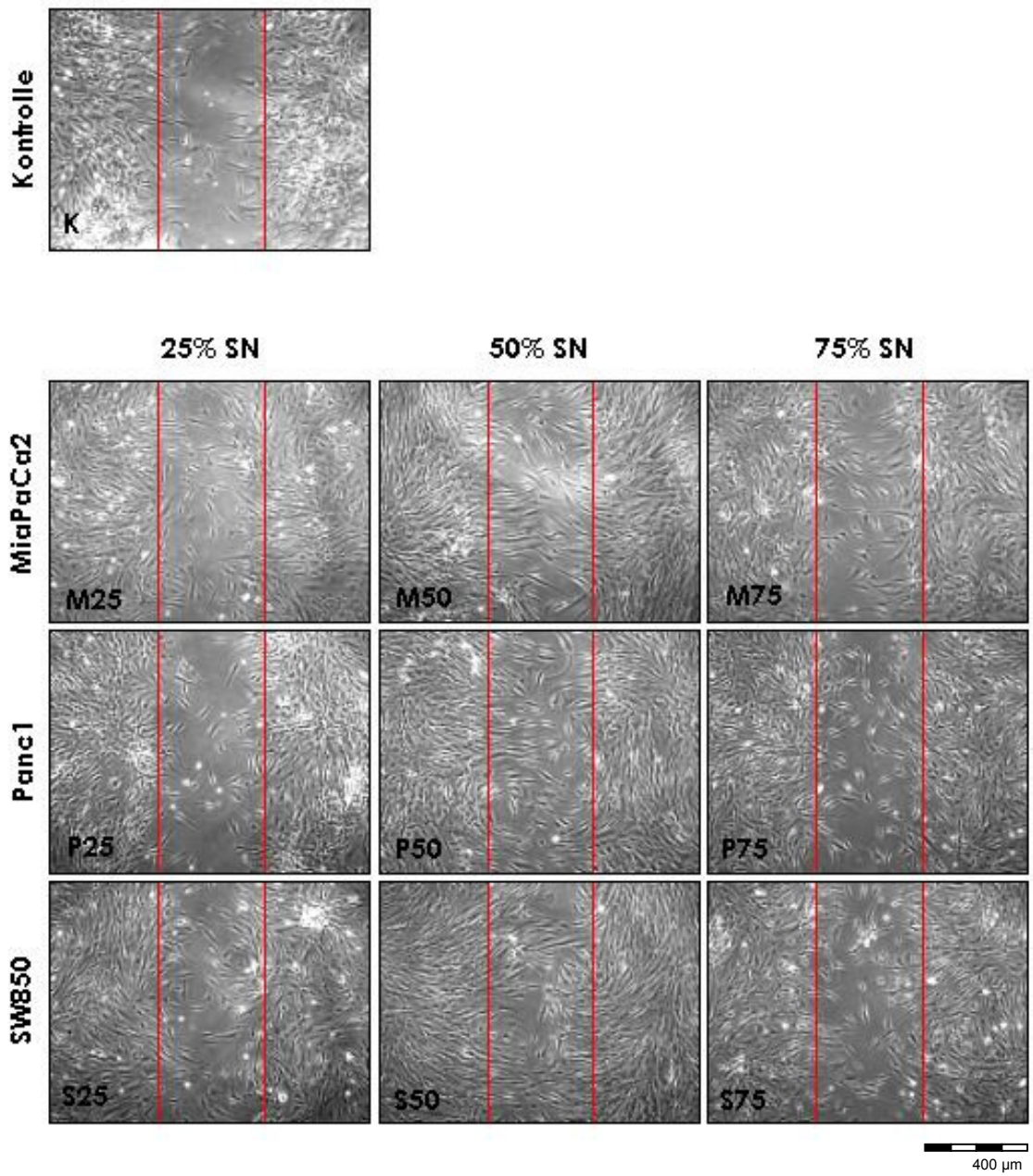



**Abb. 5: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration mit Tumorzellüberstand (SN) in 1% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Herstellen der zellfreien Fläche innerhalb des konfluenten PSC-Zellrasens mittels einer 10 µl Pipettenspitze wurden die Sternzellen über 24 h mit drei verschiedenen Konzentrationen (25%; 50%; 75%) an konditioniertem Tumorzellüberstand in 1% FCS-Medium inkubiert. **K:** Kontrolle (2ml 1% FCS-Medium über 24 h). **M25**: Stimulation mit 25% MiaPaCa2-Überstand. **M50**: Stimulation mit 50% MiaPaCa2-Überstand. **M75**: Stimulation mit 75% MiaPaCa2-Überstand. **P25**: Stimulation mit 25% Panc1-Überstand. **P50**: Stimulation mit 50% Panc1-Überstand. **P75**: Stimulation mit 75% Panc1-Überstand. **S25**: Stimulation mit 25% SW850-Überstand. **S50**: Stimulation mit 50% SW850-Überstand. **S75:** Stimulation mit 75% SW850-Überstand.

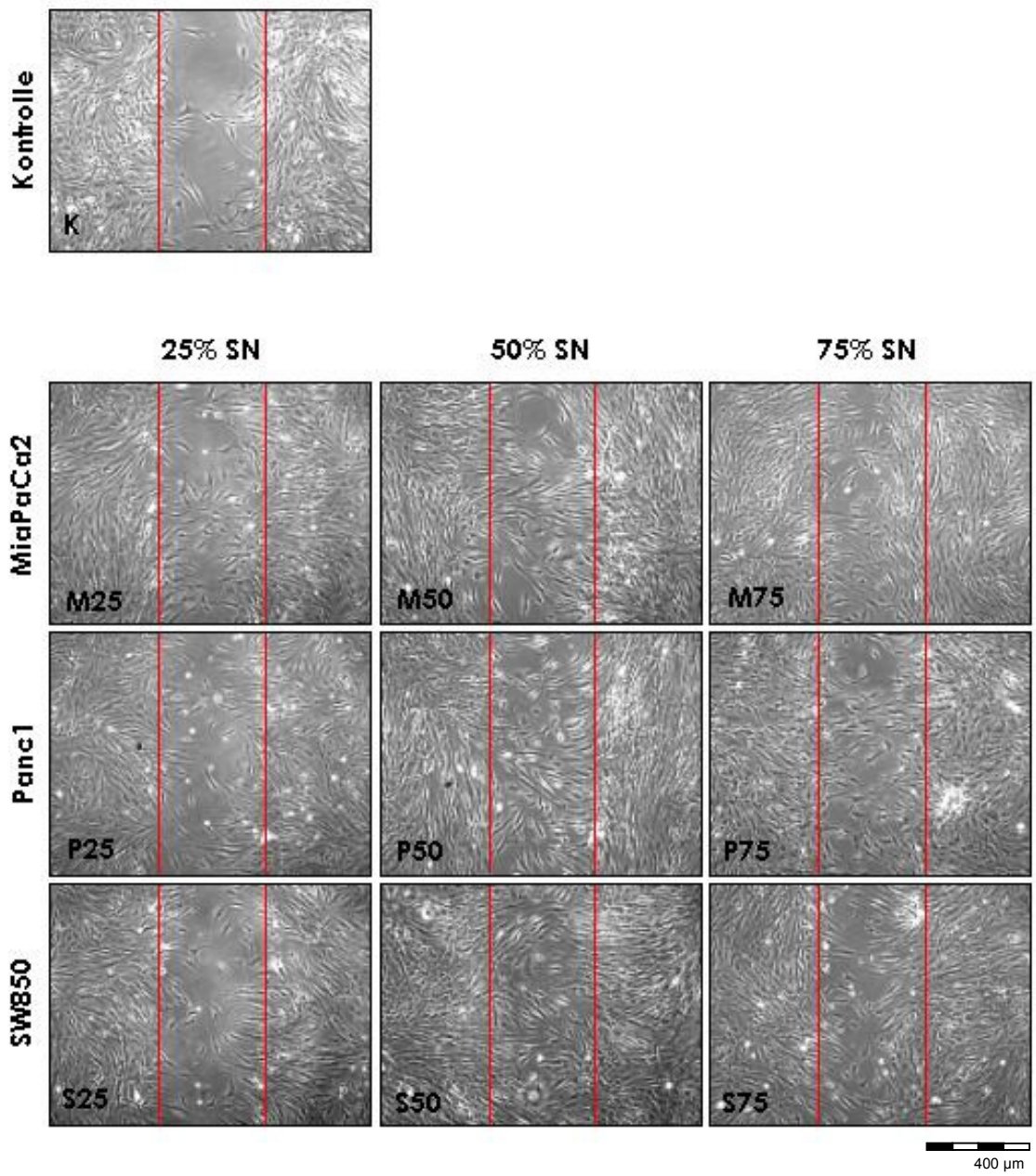



**Abb. 6: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration mit Tumorzellüberstand (SN) in 5% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Herstellen der zellfreien Fläche innerhalb des konfluenten PSC-Zellrasens mittels einer 10 µl Pipettenspitze wurden die Sternzellen über 24 h mit drei verschiedenen Konzentrationen (25%; 50%; 75%) an konditioniertem Tumorzellüberstand in 5% FCS-Medium inkubiert. **K:** Kontrolle (2ml 5% FCS-Medium über 24 h). **M25**: Stimulation mit 25% MiaPaCa2-Überstand. **M50**: Stimulation mit 50% MiaPaCa2-Überstand. **M75**: Stimulation mit 75% MiaPaCa2-Überstand. **P25**: Stimulation mit 25% Panc1-Überstand. **P50**: Stimulation mit 50% Panc1-Überstand. **P75**: Stimulation mit 75% Panc1-Überstand. **S25**: Stimulation mit 25% SW850-Überstand. **S50**: Stimulation mit 50% SW850-Überstand. **S75:** Stimulation mit 75% SW850-Überstand.

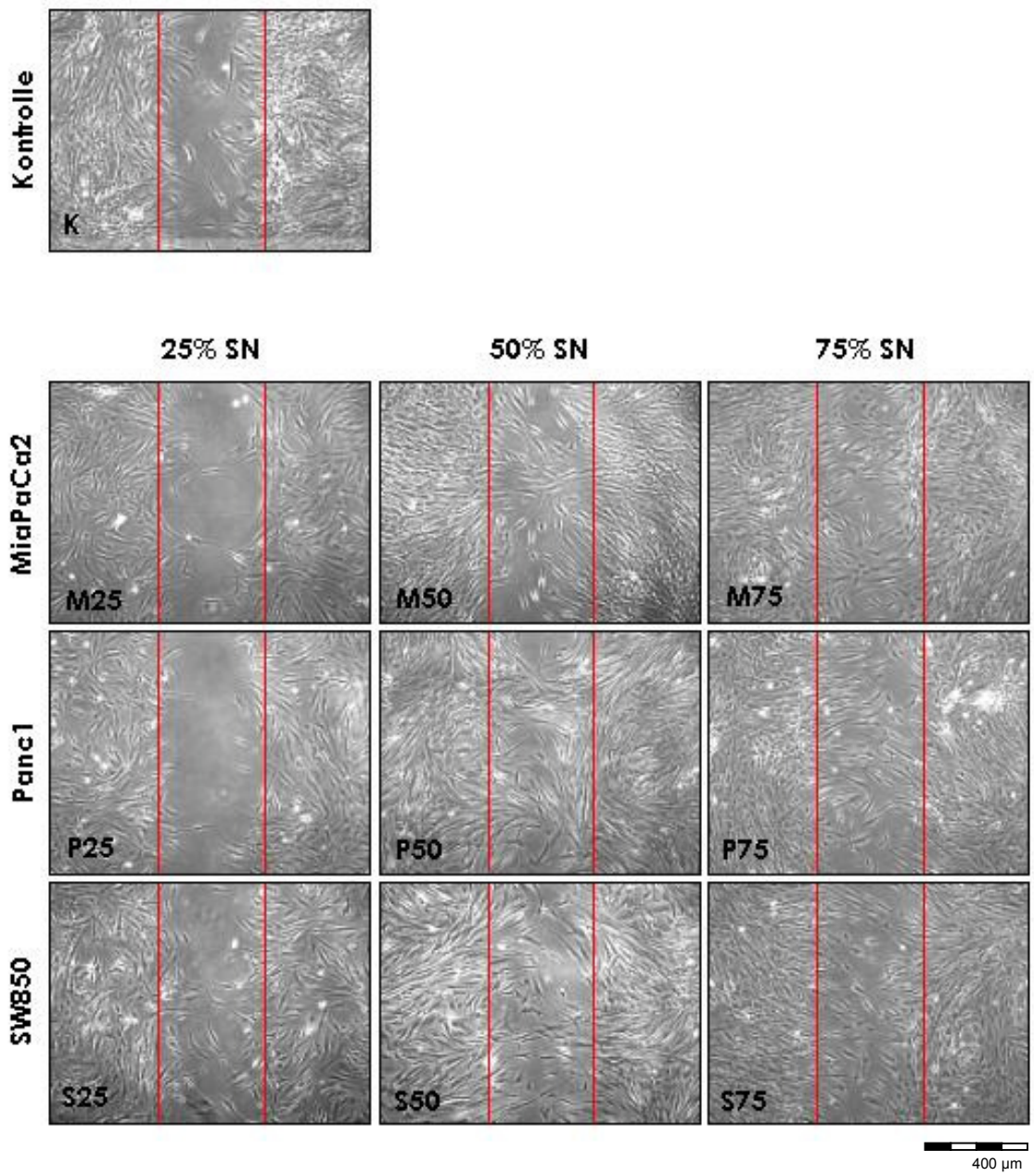



**Abb. 7: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration mit Tumorzellüberstand (SN) in 10% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Herstellen der zellfreien Fläche innerhalb des konfluenten PSC-Zellrasens mittels einer 10 µl Pipettenspitze wurden die Sternzellen über 24 h mit drei verschiedenen Konzentrationen (25%; 50%; 75%) an konditioniertem Tumorzellüberstand in 10% FCS-Medium inkubiert. **K:** Kontrolle (2ml 10% FCS-Medium über 24 h). **M25**: Stimulation mit 25% MiaPaCa2-Überstand. **M50**: Stimulation mit 50% MiaPaCa2-Überstand. **M75**: Stimulation mit 75% MiaPaCa2-Überstand. **P25**: Stimulation mit 25% Panc1-Überstand. **P50**: Stimulation mit 50% Panc1-Überstand. **P75**: Stimulation mit 75% Panc1-Überstand. **S25**: Stimulation mit 25% SW850-Überstand. **S50**: Stimulation mit 50% SW850-Überstand. **S75:** Stimulation mit 75% SW850-Überstand.

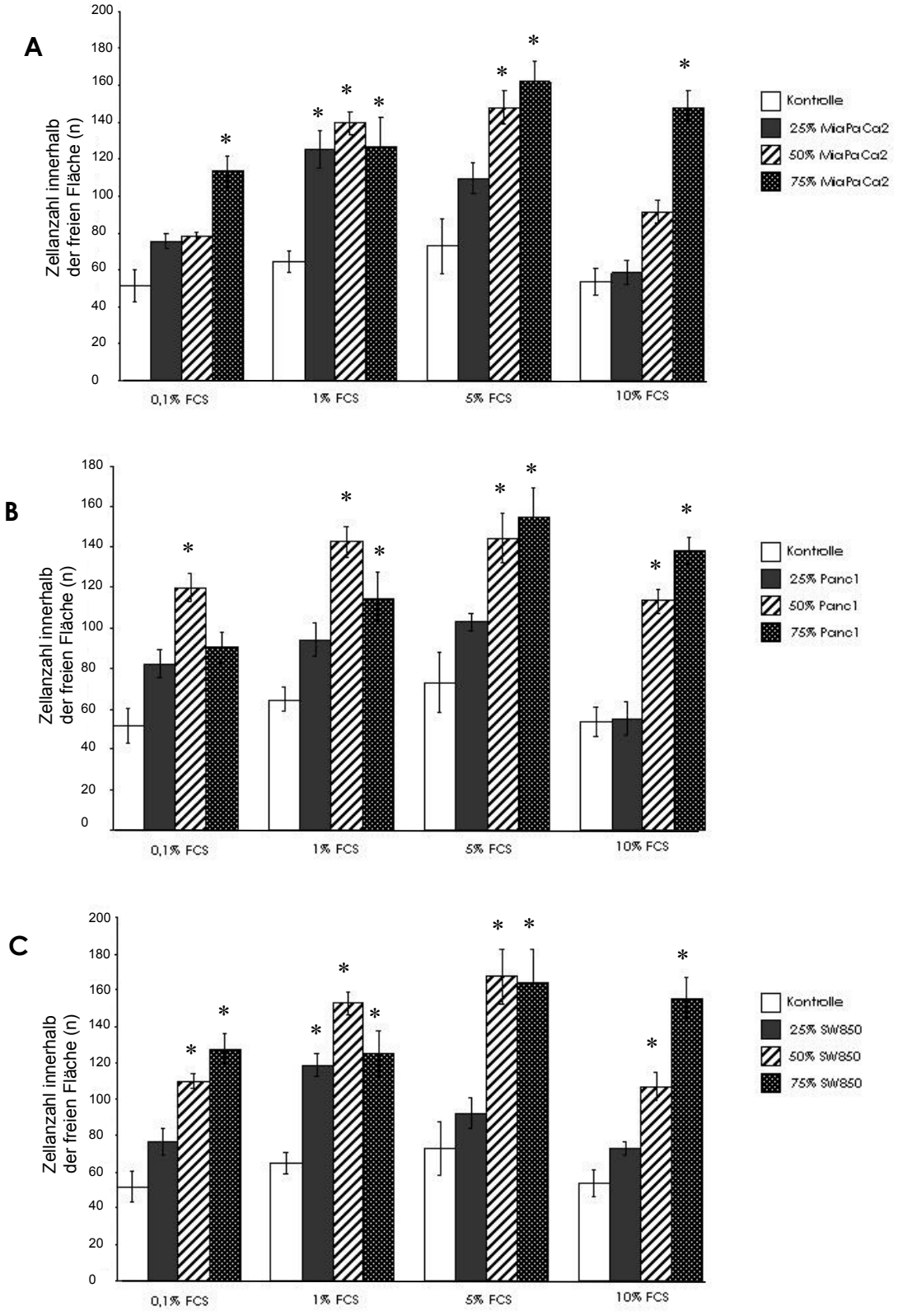



**Abb.8: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration mit Tumorzellüberstand (SN) der 3 Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850.** Zellanzahl innerhalb der Grenzen der zellfreien Fläche in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung. Dargestellt sind Mittelwerte + SD. Signifikant unterschiedliche Werte ($p<0,05$) zu jeweiligen Kontrolle sind mit * gekennzeichnet. **A**: Stimulation mit MiaPaCa2-Überstand. **B**: Stimulation mit Panc1-Überstand. **C**: Stimulation mit SW850-Überstand

### 3.1.1.2 Auswirkung der Hemmung von PDGF-BB und seines Rezeptors auf die PSC-Migration

Um die Rolle des Zytokins PDGF im konditionierten Tumorzellüberstand in der Stimulation der PSC-Migration zu ermitteln, wurde ein neutralisierender Antikörper gegen PDGF-BB verwendet sowie ein Inhibitor gegen die PDGF-Rezeptor-Kinase AG1295 (Tyrphostin).

Vor Beginn der 24stündigen Stimulation der Sternzellen mit konditioniertem Überstand der drei Tumorzelllinien, wurde dieser für die Neutralisierung des PDGF-BB im Tumorzellüberstand zunächst für 1 h mit 2 µg/ml anti-PDGF-BB präinkubiert. Als Kontrolle wurde zu 5% FCS-Medium 2 µg/ml anti-PDGF-BB für eine 1 h zugegeben.

Für die Blockierung der PDGF-Rezeptor-Kinase wurden dagegen die PSCs zunächst für 1 h mit 10 µM AG1295 präinkubiert und auch während der 24stündigen Stimulation 10 µM AG1295 zugegeben. Als Kontrolle wurde zu den mit AG1295 präinkubierten Zellen 5% FCS-Medium und AG1295 hinzugefügt.

Für die Versuche wurde die Bedingung mit 50% konditioniertem Tumorzellüberstand in 5% FCS-Medium für die drei Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 gewählt (s. Abb.6), da unter dieser Kondition eine gute Migration der Sternzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe in vorhergehenden Versuchen festzustellen war.

Abb.9 zeigt im Vergleich zu Abb.6 eine Hemmung der Tumorzellüberstand-induzierten Migration in die zellfreie Fläche durch die Hemmung der Wirkung des PDGFs bei der Stimulation mit allen verwendeten Tumorzelllinien.

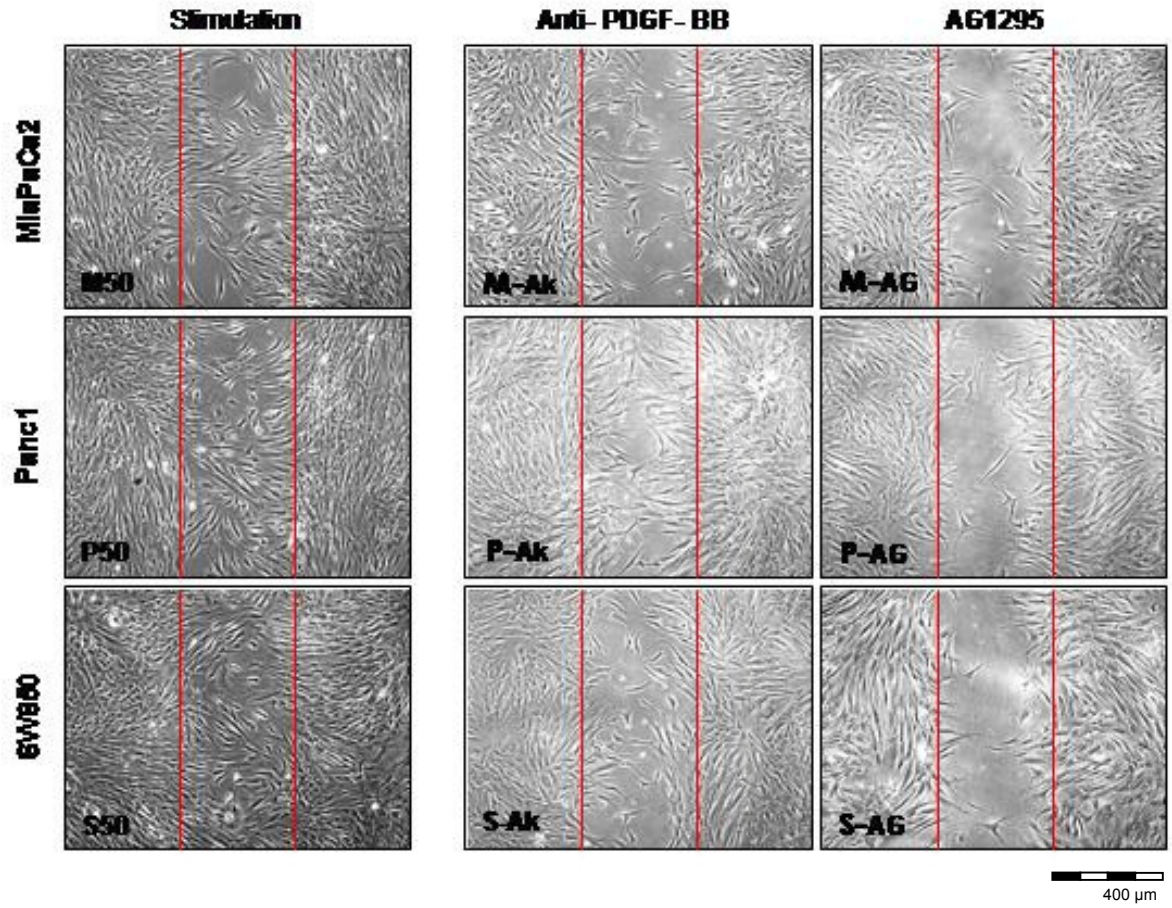



**Abb.9: Auswirkung von anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB) und AG1295 (Inhibitor des PDGF-Rezeptors) auf die PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration.** Nach Herstellen der zellfreien Fläche innerhalb des konfluenten PSC-Zellrasens mittels einer 10 µl Pipettenspitze wurden die Sternzellen über 24 h mit 50% konditioniertem Tumorzellüberstand in 5% FCS (Fötales Kälberserum)-Medium inkubiert. Zuvor wurde der Überstand der drei Tumorzelllinien für 1h mit 2 µg/ml anti-PDGF-BB bzw die PSCs mit 10 µM AG1295 präinkubiert. **M50**: Stimulation mit 50% MiaPaCa2-Überstand. **P50**: Stimulation mit 50% Panc1-Überstand. **S50**: Stimulation mit 50% SW850-Überstand. **M-Ak** bzw. **M-AG**: 1ml konditionierter MiaPaCa2-Überstand mit anti-PDGF-BB bzw. AG1295 + 1 ml 5% FCS-Medium. **P-Ak** bzw. **P-AG:** 1ml konditionierter Panc1-Überstand mit anti-PDGF-BB bzw. AG1295 + 1 ml 5% FCS-Medium. **S-Ak** bzw**. S-AG:** 1ml konditionierter SW850-Überstand mit anti-PDGF-BB bzw. AG1295 + 1 ml 5% FCS-Medium.

### 3.1.1.3 Auswirkung der Hemmung von PI3-K, p44/42-MAPK und p38-MAPK auf die PSC-Migration

Ob die Phosphatidylinositol 3 (PI3) -Kinase, ein intrazelluläres Protein der Signaltransduktion, an der Stimulation der PSC-Migration durch Tumorzellüberstand beteiligt ist, wurde durch die Verwendung von LY294002, einem Inhibitor dieser Kinase, dargestellt.

Ebenso wurde der Inhibitor der MAP Kinase p38 SB203580 und der Inhibitor der MAP Kinase Kinase (auch bekannt als MAPK/ERK Kinase oder MEK Kinase) PD98059 eingesetzt, um auch diese beiden intrazellulären Signaltransduktionsproteine auf ihre Beteiligung an der durch Tumorzellüberstand stimulierten PSC-Migration zu prüfen.

Vor Beginn der 24stündigen Stimulation der Sternzellen mit konditioniertem Überstand der drei Tumorzelllinien, wurden die PSCs zunächst für 1 h mit 25 µM LY294002 bzw. 20 µM SB203580 bzw. 20 µM PD98059 präinkubiert.

Es wurde die Bedingung mit 50% konditioniertem Tumorzellüberstand in 5% FCS-Medium für die drei Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 gewählt (s. Abb.6) und hierzu ebenfalls 25 µM LY294002 bzw. 20 µM SB203580 bzw. 20 µM PD98059 für die Versuche zugegeben. Als Kontrolle wurde zu den mit dem Inhibitor präinkubierten Zellen 5% FCS-Medium und die jeweiligen Inhibitoren zugegeben.

Abb.10 zeigt im Vergleich zu Abb.6 eine Hemmung der Tumorzellüberstand-induzierten Migration in die zellfreie Fläche am deutlichsten durch den Inhibitor der PI3-Kinase bei allen verwendeten Tumorzelllinien. Auch SB203580 und PD98059 konnten die Zellbewegung der PSCs signifikant behindern.

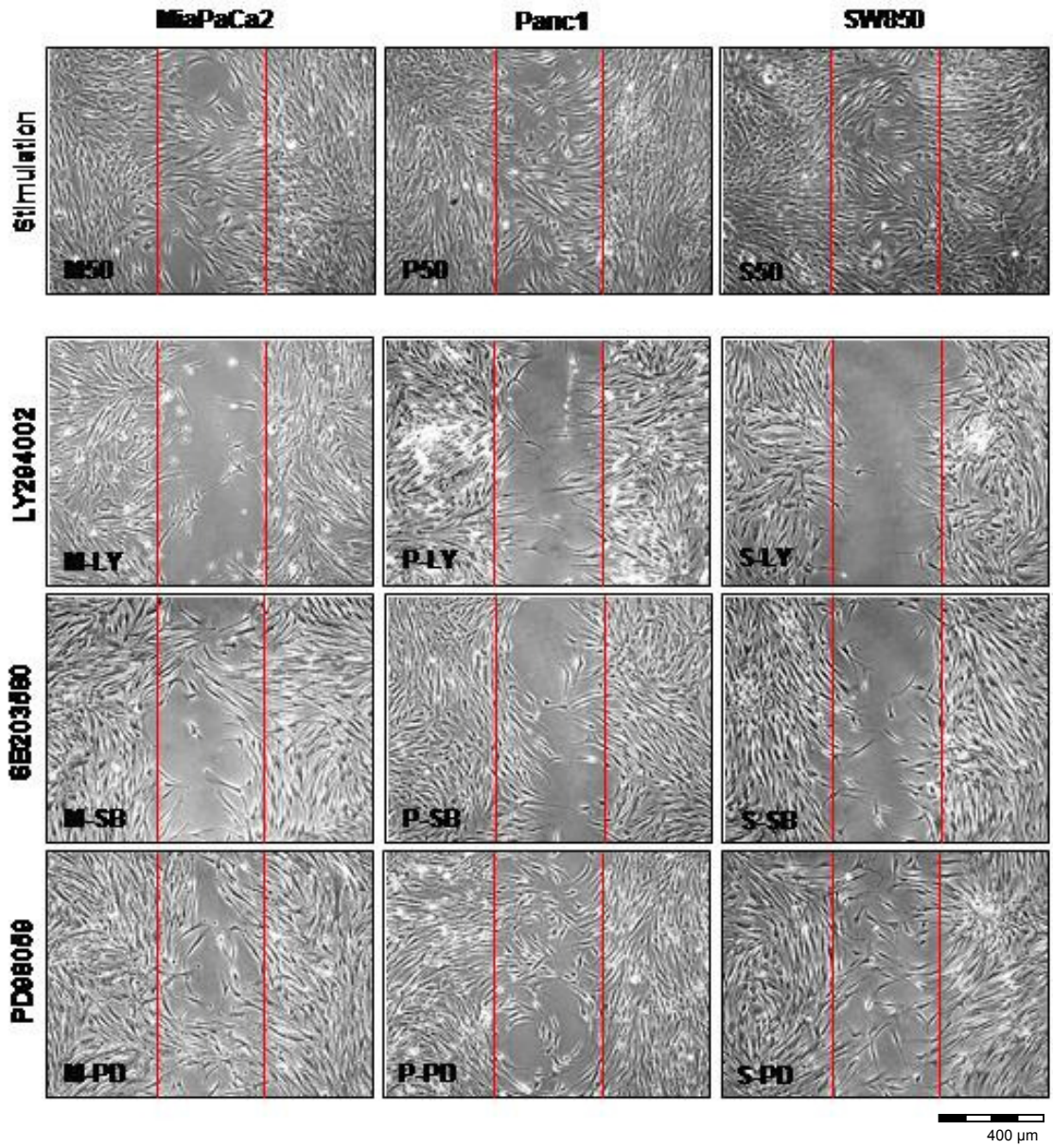



**Abb.10: Auswirkung von LY294002 (Inhibitor der Phosphatidylinositol 3 Kinase PI3K), SB203580 (Inhibitor der p38 Mitogen-Activated Protein Kinase) und PD98059 (Inhibitor der Extracellular signal-regulated Kinase Erk) auf die PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration.** Nach Herstellen der zellfreien Fläche innerhalb des konfluenten PSC-Zellrasens mittels einer 10 µl Pipettenspitze wurden die Sternzellen über 24 h mit 50% konditioniertem Tumorzellüberstand in 5% FCS (Fötales Kälberserum)-Medium inkubiert und es wurde 25 µM LY294002 bzw. 20µM SB203580 bzw. 20 µM PD98059 hinzugegeben. Zuvor wurden die PSCs für 1h mit 25 µM LY294002 bzw. 20µM SB203580 bzw. 20 µM PD98059 präinkubiert. **M50**: Stimulation mit 50% MiaPaCa2-Überstand. **P50**: Stimulation mit 50% Panc1-Überstand. **S50**: Stimulation mit 50% SW850-Überstand. **M-LY** bzw. **M-SB** bzw. **M-PD:** 1ml konditionierter MiaPaCa2-Überstand und LY294002 bzw. SB203580 bzw. PD98059 in 1ml 5% FCS-Medium. **P-LY** bzw. **P-SB** bzw. **P-PD:** 1ml konditionierter Panc1-Überstand und LY294002 bzw. SB203580 bzw. PD98059 in 1 ml 5% FCS-Medium. **S-LY** bzw. **S-SB** bzw**. S-PD:** 1ml konditionierter SW850-Überstand und LY294002 bzw. SB203580 bzw. PD98059 in 1 ml 5% FCS-Medium.

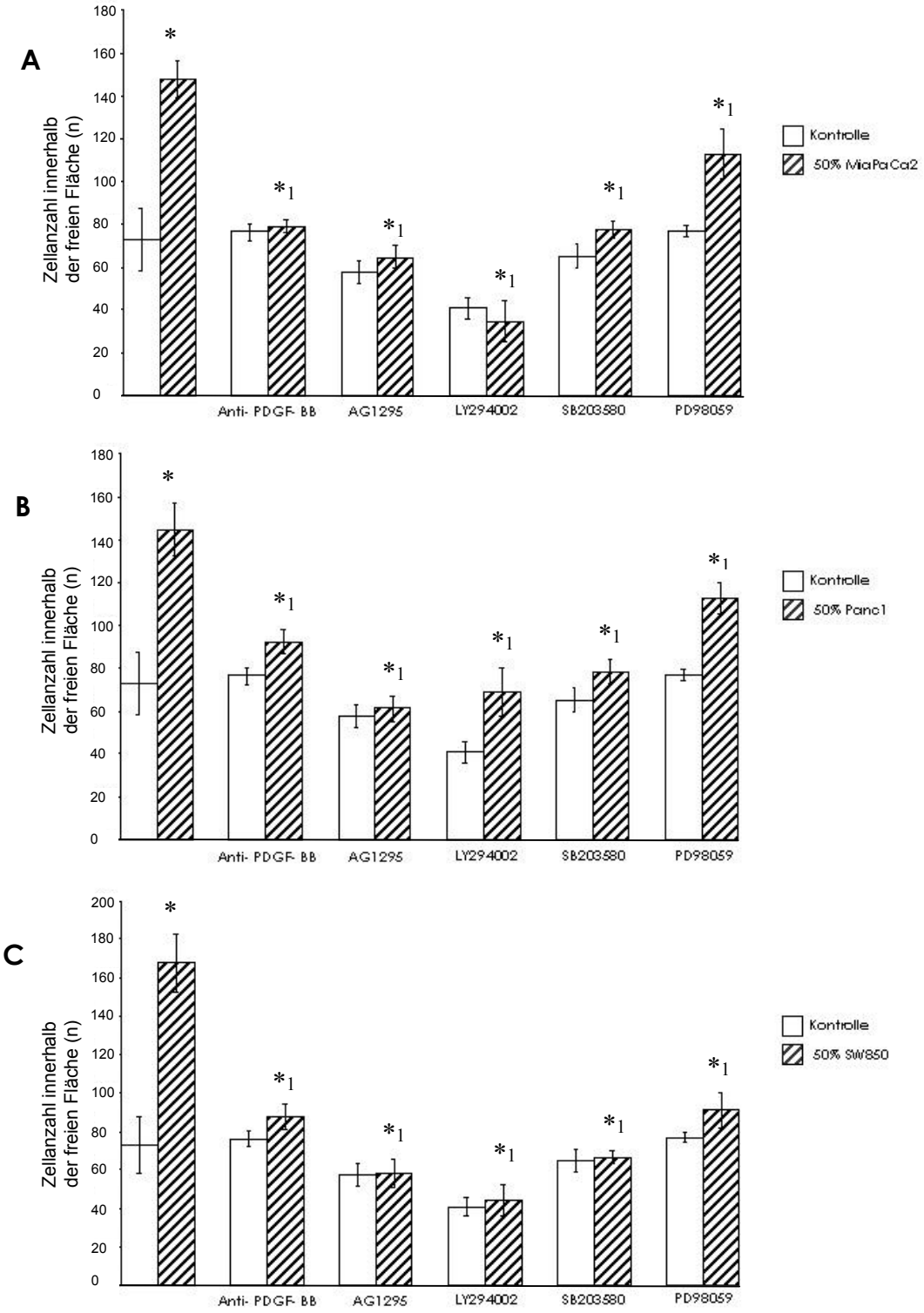



**Abb.11: Auswirkung von anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor BB) und AG1295 (Inhibitor des PDGF-Rezeptors), LY294002 (Inhibitor der Phosphatidylinositol 3 Kinase PI3K), SB203580 (Inhibitor der p38 Mitogen-Activated Protein Kinase) und PD98059 (Inhibitor der Extracellular signal-regulated Kinase Erk), auf die PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration.** Zellanzahl innerhalb der Grenzen der zellfreien Fläche in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung. Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3 Versuchen. Signifikant unterschiedliche Werte ($p<0,05$) der Versuche mit Inhibitor-Zusatz zur 50%-Tumorzellüberstandstimulierten Kontrolle ohne Inhibitor-Zusatz sind mit $*_1$ gekennzeichnet. Mit * gekennzeichnet sind die signifikant unterschiedlichen Werte ($p<0,05$) der 50%-Tumorzellüberstandstimulierten Kontrolle zu ihrer Kontrolle **A**: Stimulation mit MiaPaCa2-Überstand. **B**: Stimulation mit Panc1-Überstand. **C**: Stimulation mit SW850-Überstand.

### 3.1.2 PSC-Migration durch Freisetzung chemotaktischer Faktoren aus einem Agarosegel (mit Tumorzellüberstand)

#### 3.1.2.1 Stimulation der PSC-Migration

In den vorhergehenden Versuchen wurde gezeigt, dass konditionierter Tumorzellüberstand die Migration von pankreatischen Sternzellen stimuliert. Nun galt es herauszufinden, ob Sternzellen chemotaktisch von Tumorzellen angelockt werden können und fähig sind, direkt in Richtung Tumorzellen bzw. konditionierten Tumorzellüberstand zu migrieren.

Um dies darzustellen wurde auf die rechte Seite eines 6-Wells 700 µl eines 1:1 Gemisch aus 2%iger Agarose und konditioniertem Tumorzellüberstand der drei verwendeten Tumorzelllinien gegossen und im Winkel von etwa 45° die Aushärtung zum Gel abgewartet. Dann wurde ein Flexiperm-Ring (Ø 6mm) im Abstand von 3 mm zur Gelkante im 6-Well angebracht und Sternzellen darin ausgesäht. Die PSCs wurden für 3 h kultiviert. Nach Entfernen des Rings wurde Medium jeweils unterschiedlicher FCS-Konzentration (0,1%; 1%; 5%; 10%) zugegeben und der Versuch gestartet. Nach 48 h wurden mikroskopische Fotos gemacht. Zur objektiven Erfassung der Startlinie der Zellen wurde eine Markierung vor Versuchsstart am Wellboden angebracht. Als Kontrolle diente ein Gel aus 1%iger Agarose ohne Tumorzellüberstand.

In Abb.12 und Abb.14 wird eine, direkt auf das Tumorzellüberstandgel auf der rechten Seite, gerichtete Bewegung der Sternzellen deutlich. Die zurückgelegte Strecke sowie die Anzahl der migrierenden Zellen ist deutlich höher als in der Kontrollgruppe.

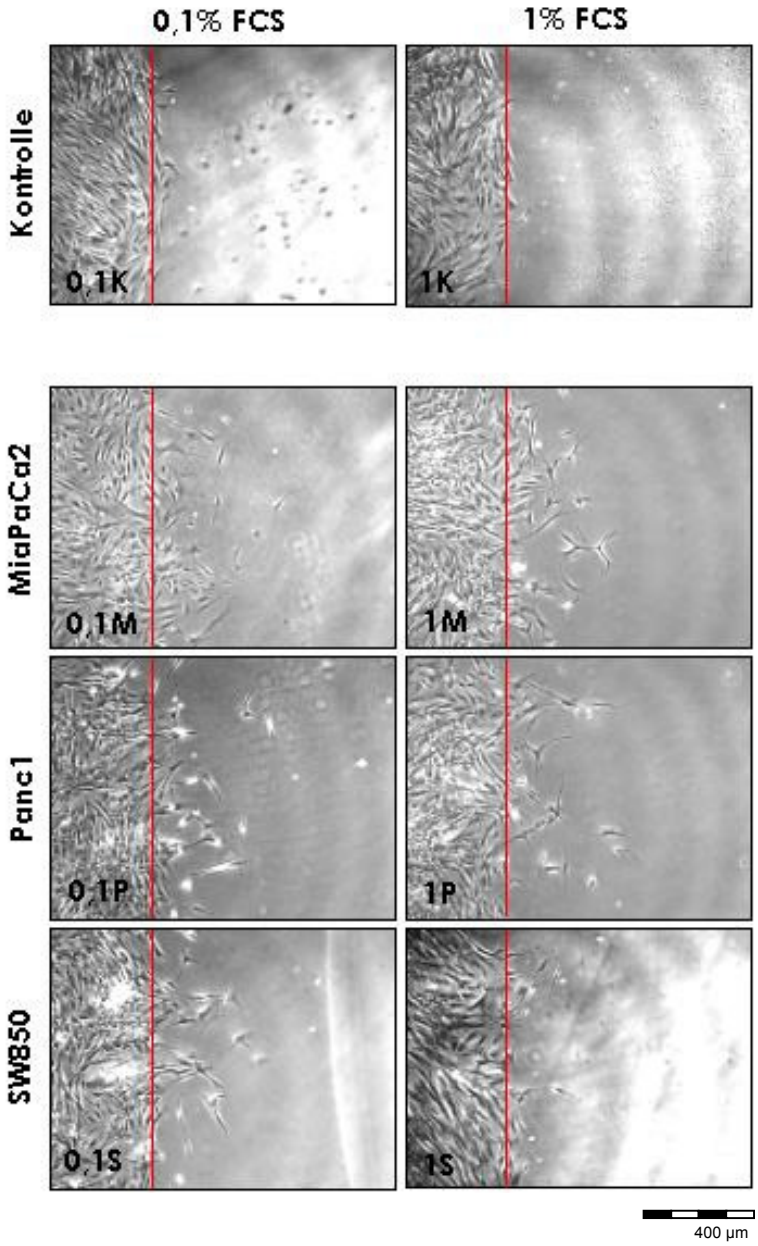



**Abb.12: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch das Tumorzellüberstandgel in 0,1% und 1% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Gießen des Agarosegels (mit Tumorzellüberstand) auf der rechten Seite eines 6-Wells und 3stündigem Kultivieren von PSCs in einem Flexiperm-Ring auf der linken Seite, wurden die Zellen für 48h in 0,1% bzw. 1% FCS-Medium inkubiert. **K**: Kontrolle (ohne Tumorzellüberstand im Gel). **M**: konditionierter MiaPaCA2-Überstand im Gel. **P**: konditionierter Panc1-Überstand im Gel. **S**: konditionierter SW850-Überstand im Gel.

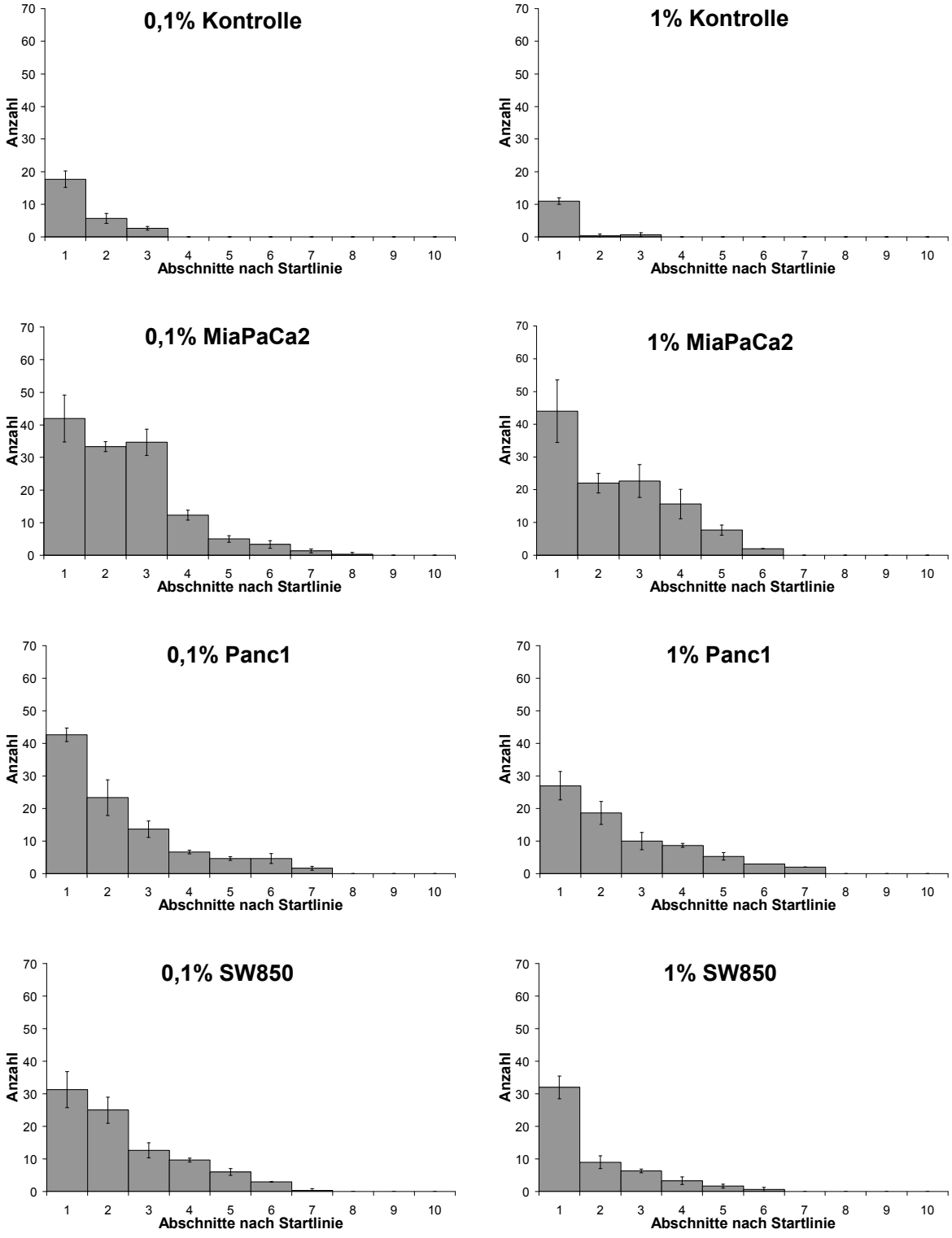



**Abb.13: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch das Tumorzellüberstandgel in 0,1% und 1% FCS (Fötales Kälberserum).** Zellanzahl innerhalb der 10 festgelegten Abschnitte ab der Startlinie (vergleiche Methodenteil in Kap. 2.2.11.) in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung . Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3. Linke Spalte: Inkubation mit 0,1% FCS, rechte Spalte: Inkubation mit 1% FCS. 1. Zeile: Kontrolle ohne Tumorzellüberstand im Gel; 2. Zeile: MiaPaCa2-Überstand im Gel; 3. Zeile: Panc1-Überstand im Gel; 4. Zeile: SW850-Überstand im Gel.

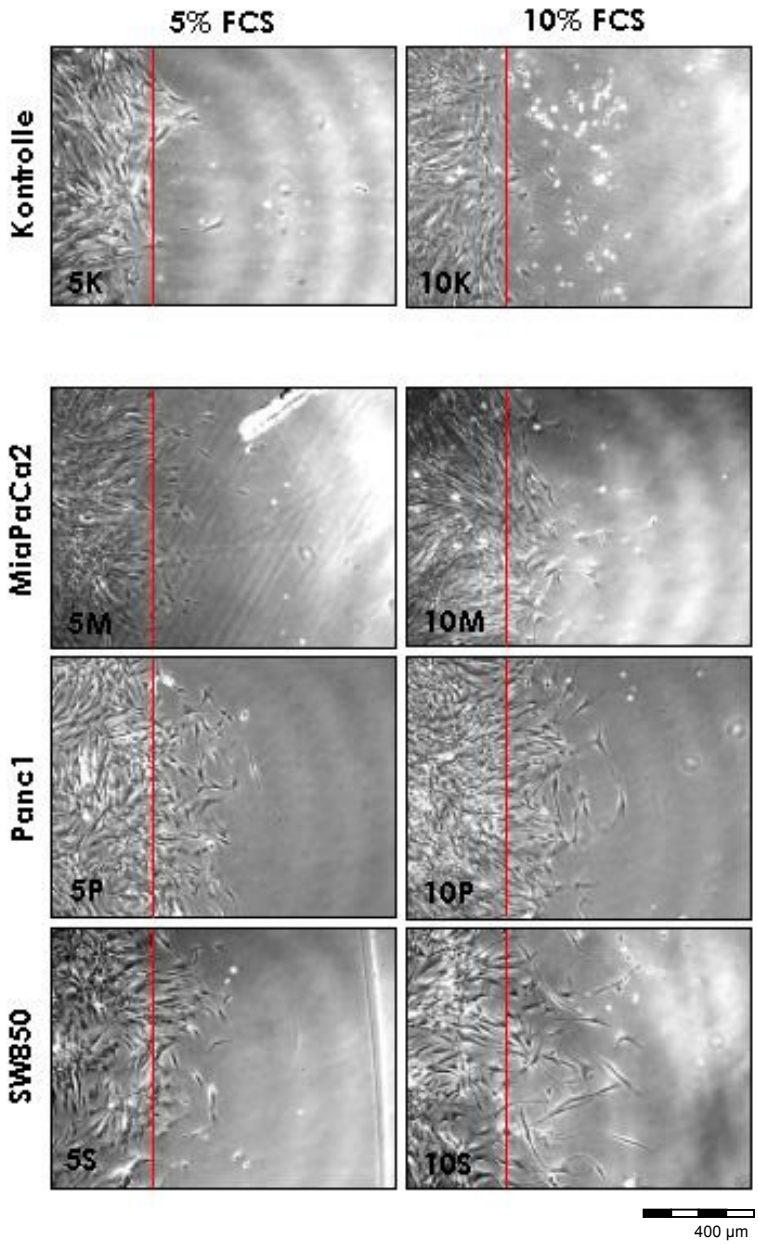



**Abb.14: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch das Tumorzellüberstandgel in 5% und 10% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Gießen des Agarosegels (mit Tumorzellüberstand) auf der rechten Seite eines 6-Wells und 3stündigem Kultivieren von PSCs in einem Flexiperm- Ring auf der linken Seite, wurden die Zellen für 48h in 5% bzw. 10% FCS-Medium inkubiert. **K**: Kontrolle (ohne Tumorzellüberstand im Gel). **M**: konditionierter MiaPaCA2-Überstand im Gel. **P**: konditionierter Panc1-Überstand im Gel. **S**: konditionierter SW850-Überstand im Gel.

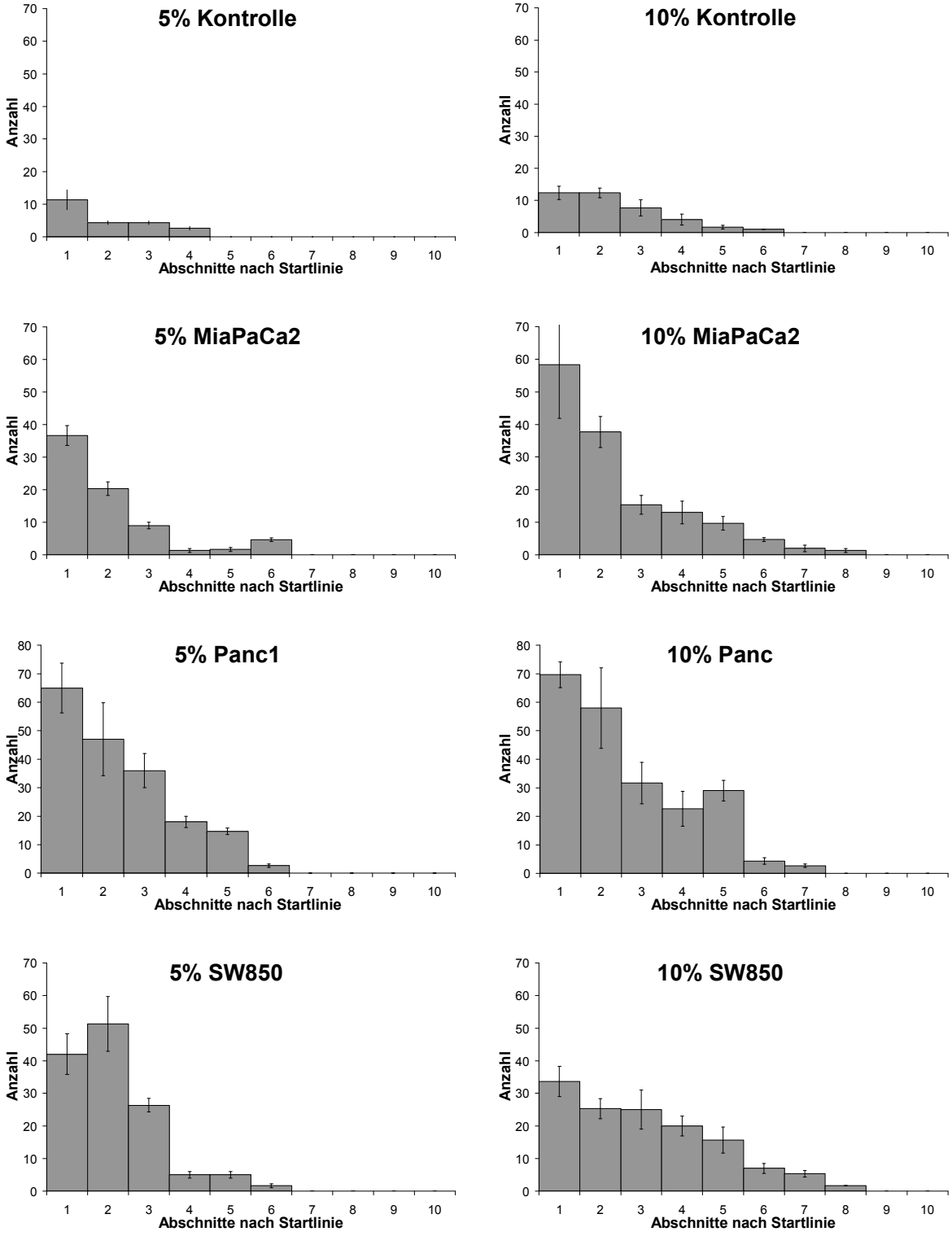



**Abb.15: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch das Tumorzellüberstandgel in 5% und 10% FCS (Fötales Kälberserum).** Zellanzahl innerhalb der 10 festgelegten Abschnitte ab der Startlinie (vergleiche Methodenteil in Kap. 2.2.11.) in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung . Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3. Linke Spalte: Inkubation mit 5% FCS, rechte Spalte: Inkubation mit 10% FCS. 1. Zeile: Kontrolle ohne Tumorzellüberstand im Gel; 2. Zeile: MiaPaCa2-Überstand im Gel; 3. Zeile: Panc1-Überstand im Gel; 4. Zeile: SW850-Überstand im Gel.

### 3.1.2.2 Auswirkung der Hemmung von PDGF-BB und seines Rezeptors auf die PSC-Migration

Ob PDGF eine Beteiligung an der gerichteten Migration der PSCs zugeschrieben werden kann, wurde wieder durch die Verwendung des neutralisierenden Antikörpers gegen PDGF-BB und des Inhibitors der PDGF-Rezeptor-Kinase AG1295 ermittelt. Dazu wurde der Tumorzellüberstand vor Gießen des Gels für 1 h mit 2 µg/ml anti-PDGF-BB bzw. die Sternzellen vor Entfernen des Flexiperm-Rings für 1 h mit 10 µM AG1295 präinkubiert. Es wurden für die Versuche die Bedingung mit 0,1% FCS-Medium gewählt, weil darunter zuvor eine gute PSC-Migration beobachtet werden konnte. (s. Abb.16-18)

Man sieht eine ausgeprägte Unterdrückung der Tumorzellüberstand-induzierten Migration der Sternzellen durch anti-PDGF-BB und AG1295. Dabei zeigt die statistische Analyse (s. Abb.19-21), dass weniger Zellen durch Blockierung der PDGF β-Rezeptors als durch Blockierung des Liganden selbst noch fähig zur gerichteten Migration sind und dass außerdem auch ihre zurückgelegte gemessene Strecke im Durchschnitt geringer ausfiel.

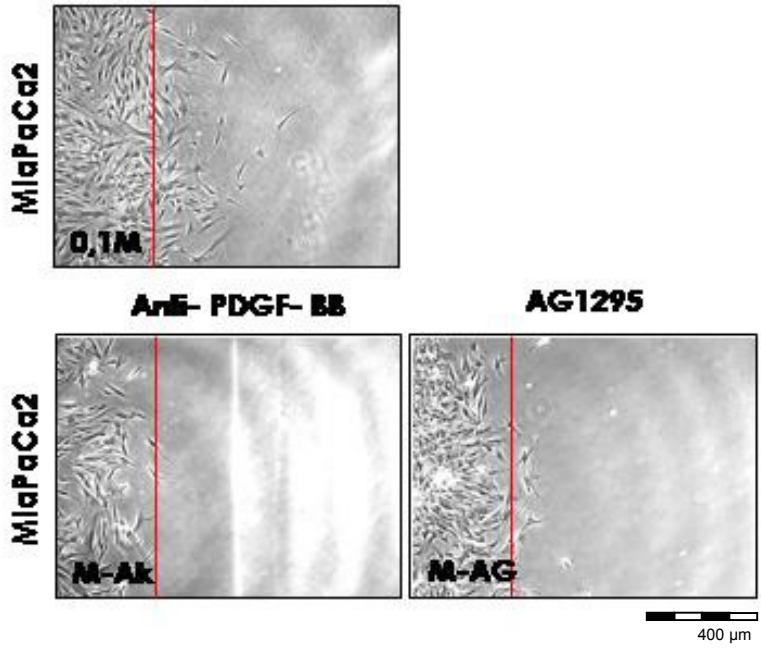



**Abb.16: Auswirkung von anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB) und AG1295 (Inhibitor des PDGF-Rezeptors) auf die MiaPaCa2-stimulierte-PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Gießen des Agarosegels (mit MiaPaCa2-Tumorzellüberstand) auf der rechten Seite eines 6-Wells und 3stündigem Kultivieren von PSCs in einem Flexiperm-Ring auf der linken Seite, wurden die Zellen für 48 h in 0,1% FCS-Medium inkubiert. Zuvor wurde der MiaPaCa2-Überstand für 1h mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB bzw. die PSCs mit 10 µM AG1295 präinkubiert. 1. Zeile: Stimulation mit MiaPaCa2-Überstand im Gel; 2. Zeile: links: MiaPaCa2-Überstand im Gel mit Inkubation mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB; rechts: MiaPaCa2-Überstand im Gel mit Inkubation mit 10 µM AG1295.

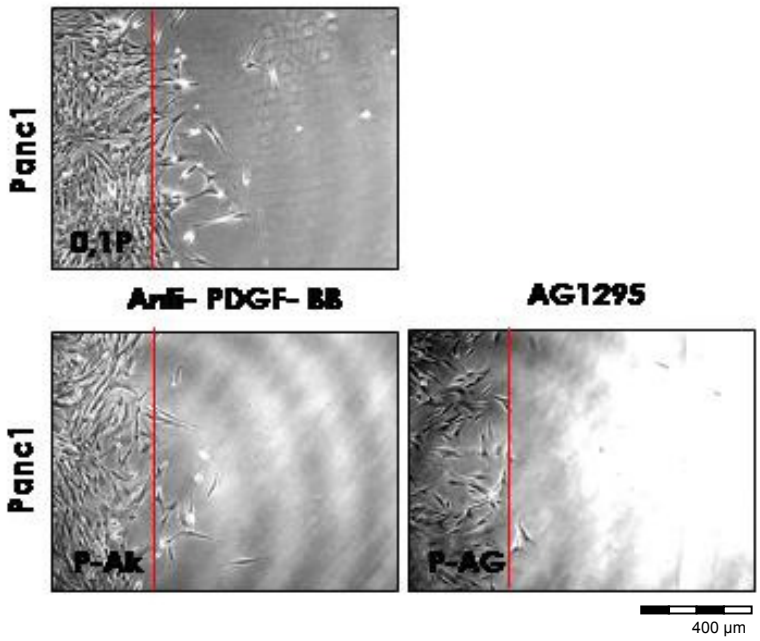



**Abb.17: Auswirkung von anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB) und AG1295 (Inhibitor des PDGF-Rezeptors) auf die Panc1-stimulierte-PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Gießen des Agarosegels (mit Panc1-Tumorzellüberstand) auf der rechten Seite eines 6-Wells und 3stündigem Kultivieren von PSCs in einem Flexiperm-Ring auf der linken Seite, wurden die Zellen für 48 h in 0,1% FCS-Medium inkubiert. Zuvor wurde der Panc1-Überstand für 1h mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB bzw. die PSCs mit 10 µM AG1295 präinkubiert. 1. Zeile: Stimulation mit Panc1-Überstand im Gel; 2. Zeile: links: Panc1-Überstand im Gel mit Inkubation mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB; rechts: Panc1-Überstand im Gel mit Inkubation mit 10 µM AG1295;

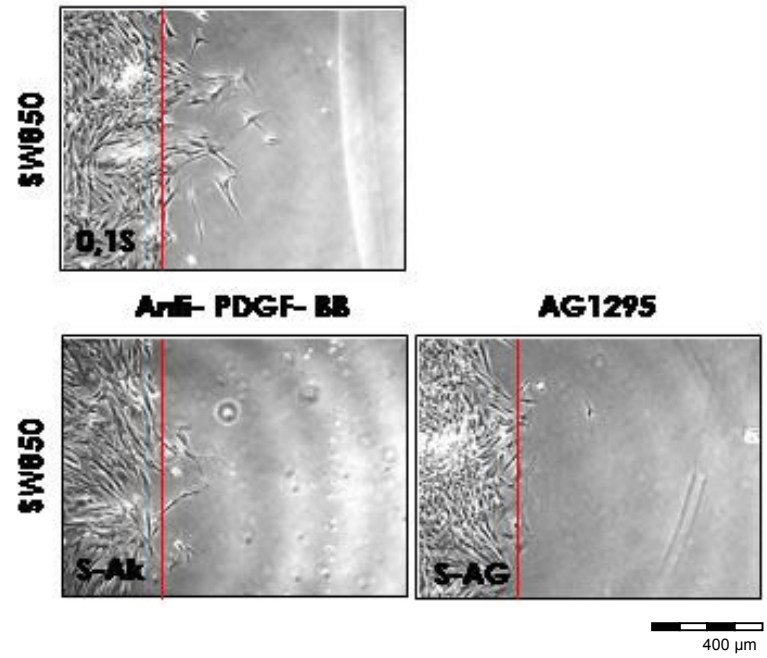



**Abb.18: Auswirkung von anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB) und AG1295 (Inhibitor des PDGF-Rezeptors) auf die SW850-stimulierte-PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach Gießen des Agarosegels (mit SW850-Tumorzellüberstand) auf der rechten Seite eines 6-Wells und 3stündigem Kultivieren von PSCs in einem Flexiperm-Ring auf der linken Seite, wurden die Zellen für 48 h in 0,1% FCS-Medium inkubiert. Zuvor wurde der SW850-Überstand für 1h mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB bzw. die PSCs mit 10 µM AG1295 präinkubiert. 1. Zeile: Stimulation mit SW850-Überstand im Gel; 2. Zeile: links: SW850-Überstand im Gel mit Inkubation mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB; rechts: SW850-Überstand im Gel mit Inkubation mit 10 µM AG1295.

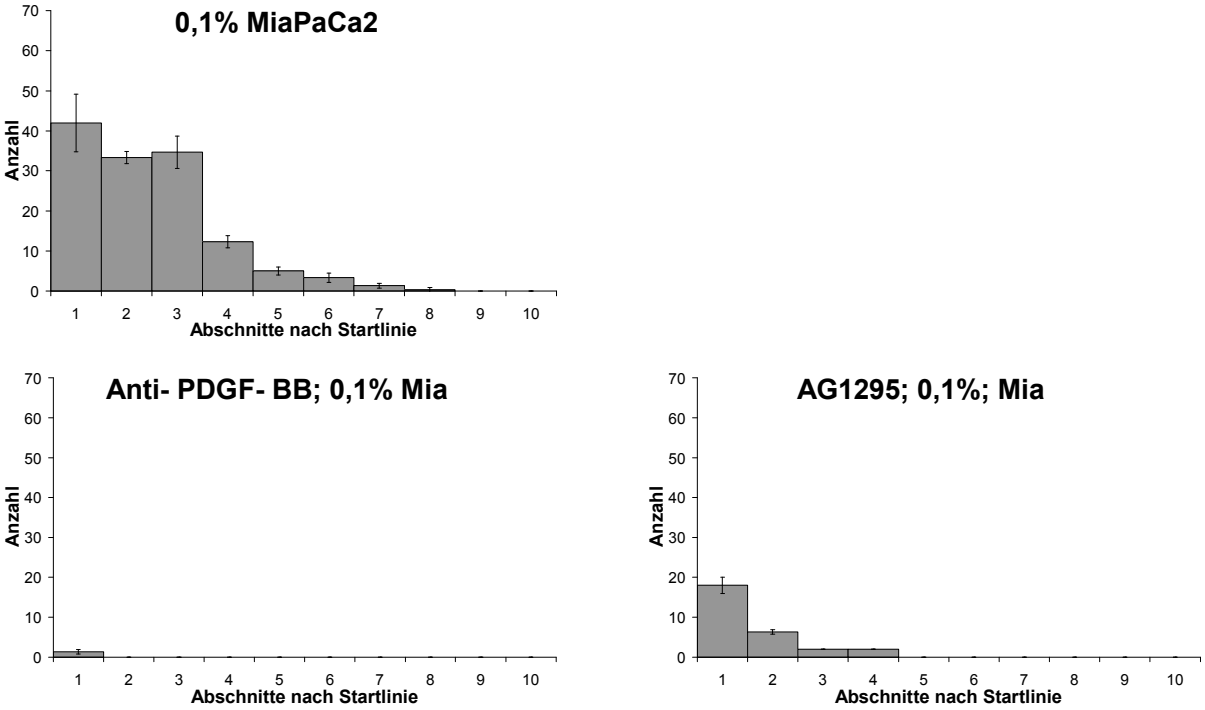



**Abb.19: Auswirkung von Anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB) und AG1295 (Inhibitor des PDGF-Rezeptors) auf die MiaPaCa2-stimulierte-PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum).** Zellanzahl innerhalb der 10 festgelegten Abschnitte ab der Startlinie (vergleiche Methodenteil in Kap. 2.2.11.) in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung . Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3. 1. Zeile: Stimulation mit MiaPaCa2-Überstand im Gel; 2. Zeile: links: MiaPaCa2-Überstand im Gel mit Inkubation mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB; rechts: MiaPaCa2-Überstand im Gel mit Inkubation mit 10 µM AG1295;

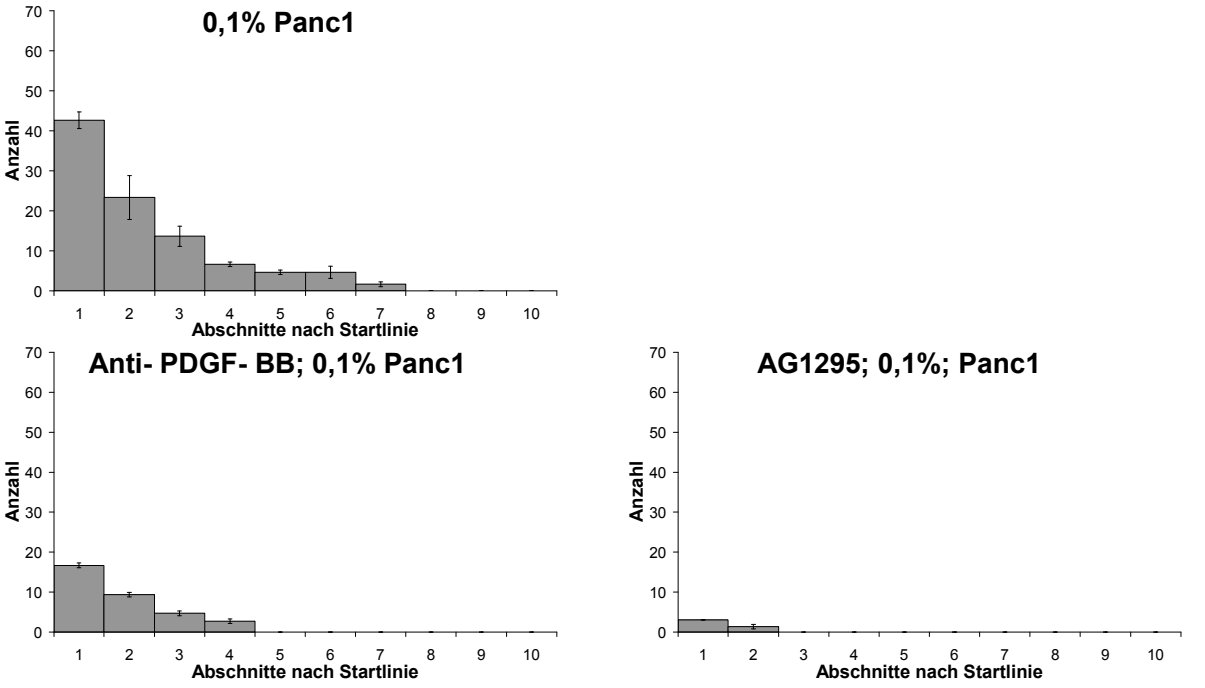



**Abb.20: Auswirkung von Anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB) und AG1295 (Inhibitor des PDGF-Rezeptors) auf die Panc1-stimulierte-PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum).** Zellanzahl innerhalb der 10 festgelegten Abschnitte ab der Startlinie (vergleiche Methodenteil in Kap. 2.2.11.) in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung . Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3. 1. Zeile: Stimulation mit Panc1-Überstand im Gel; 2. Zeile: links: Panc1-Überstand im Gel mit Inkubation mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB; rechts: Panc1-Überstand im Gel mit Inkubation mit 10 µM AG1295;

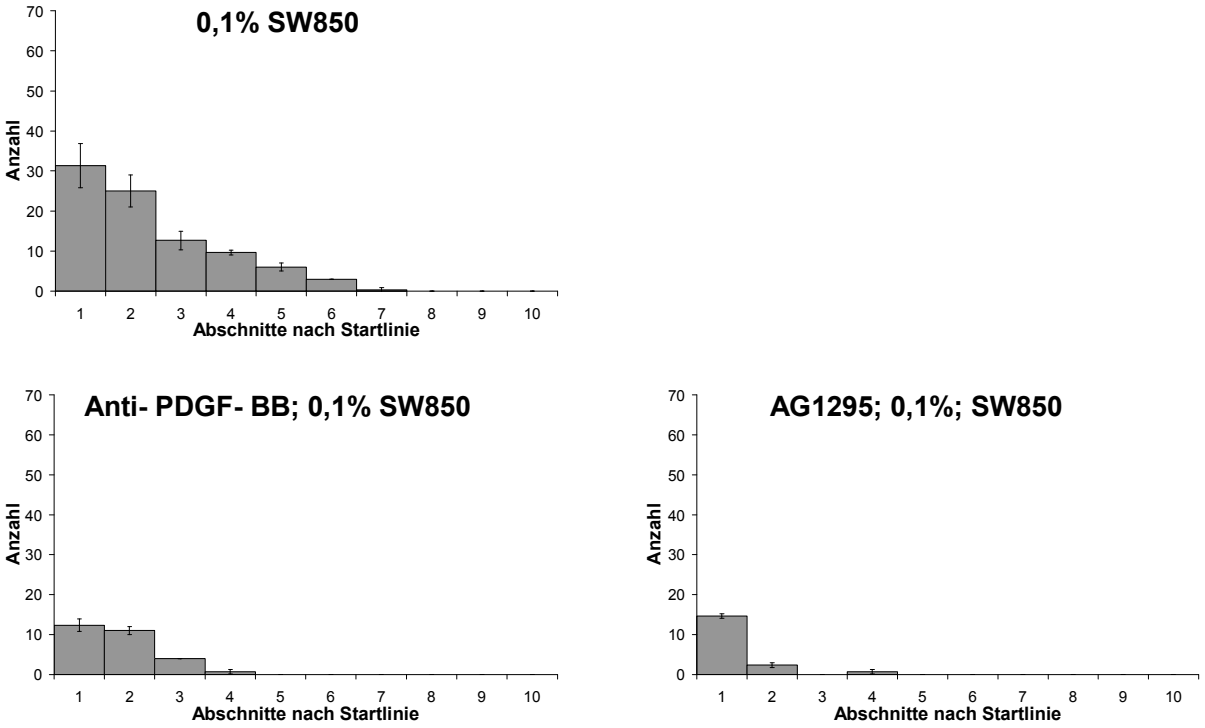



**Abb.21: Auswirkung von Anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB) und AG1295 (Inhibitor des PDGF-Rezeptors) auf die SW850-stimulierte-PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum).** Zellanzahl innerhalb der 10 festgelegten Abschnitte ab der Startlinie (vergleiche Methodenteil in Kap. 2.2.11.) in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung . Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3. 1. Zeile: Stimulation mit SW850-Überstand im Gel; 2. Zeile: links: SW850-Überstand im Gel mit Inkubation mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB; rechts: SW850-Überstand im Gel mit Inkubation mit 10 µM AG1295;

### 3.1.3 PSC-Migration durch Freisetzung chemotaktischer Faktoren aus Tumorzellen (Cokultur)

#### 3.1.3.1 Stimulation der PSC-Migration

Nachdem im vorherigen Versuch gezeigt wurde, dass konditionierter Tumorzellüberstand Faktoren enthält, die fähig sind, Sternzellen durch Chemotaxis anzulocken, sollte sodann untersucht werden, ob die Tumorzellen selbst in der Lage sind, diese Faktoren aktiv zu produzieren und auf diese Weise mit den Sternzellen chemotaktisch interagieren können.

Dazu wurden PSCs und Tumorzellen gleichzeitig in ein 6-Well ausgesäht und für 3 h kultiviert. Nach Entfernen der Ringe wurde Medium jeweils unterschiedlicher FCS-Konzentration (0,1%; 1%; 5%; 10%) zugegeben und der Versuch gestartet. Nach 48 h wurden mikroskopische Fotos gemacht. Zur objektiven Erfassung der Startlinie der Zellen wurde eine Markierung vor Versuchsstart am Wellboden angebracht. Als Kontrolle wurden Sternzellen allein ausgesäht.

Abb.22 und Abb.24 zeigen die direkte Wanderung der PSCs in Richtung Tumorzellen auf der rechten Seite. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der keine Tumorzellen ausgesäht wurden, die einen chemotaktischen Gradienten aufbauen könnten, ist Anzahl und Weite der Strecke größer.

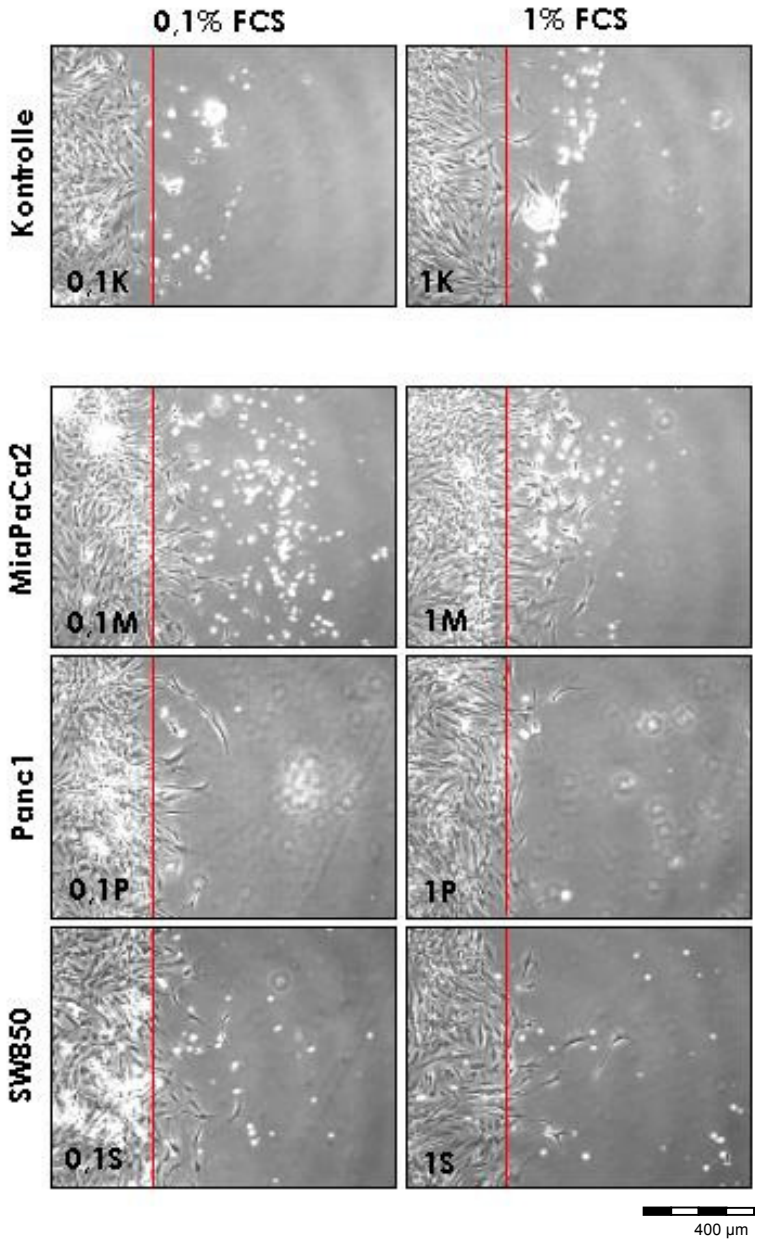



**Abb.22: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch Tumorzellen in 0,1% und 1% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach 3stündigem Kultivieren von PSCs auf der linken Seite eines 6-Wells und Tumorzellen auf der rechten Seite, wurden die Zellen für 48h in 0,1% bzw. 1% FCS-Medium inkubiert. **K**: Kontrolle (ohne Tumorzellen im Well). **M**: MiaPaCA2-Tumorzellen rechts. **P**: Panc1-Tumorzellen rechts. **S**: SW850-Tumorzellen rechts.

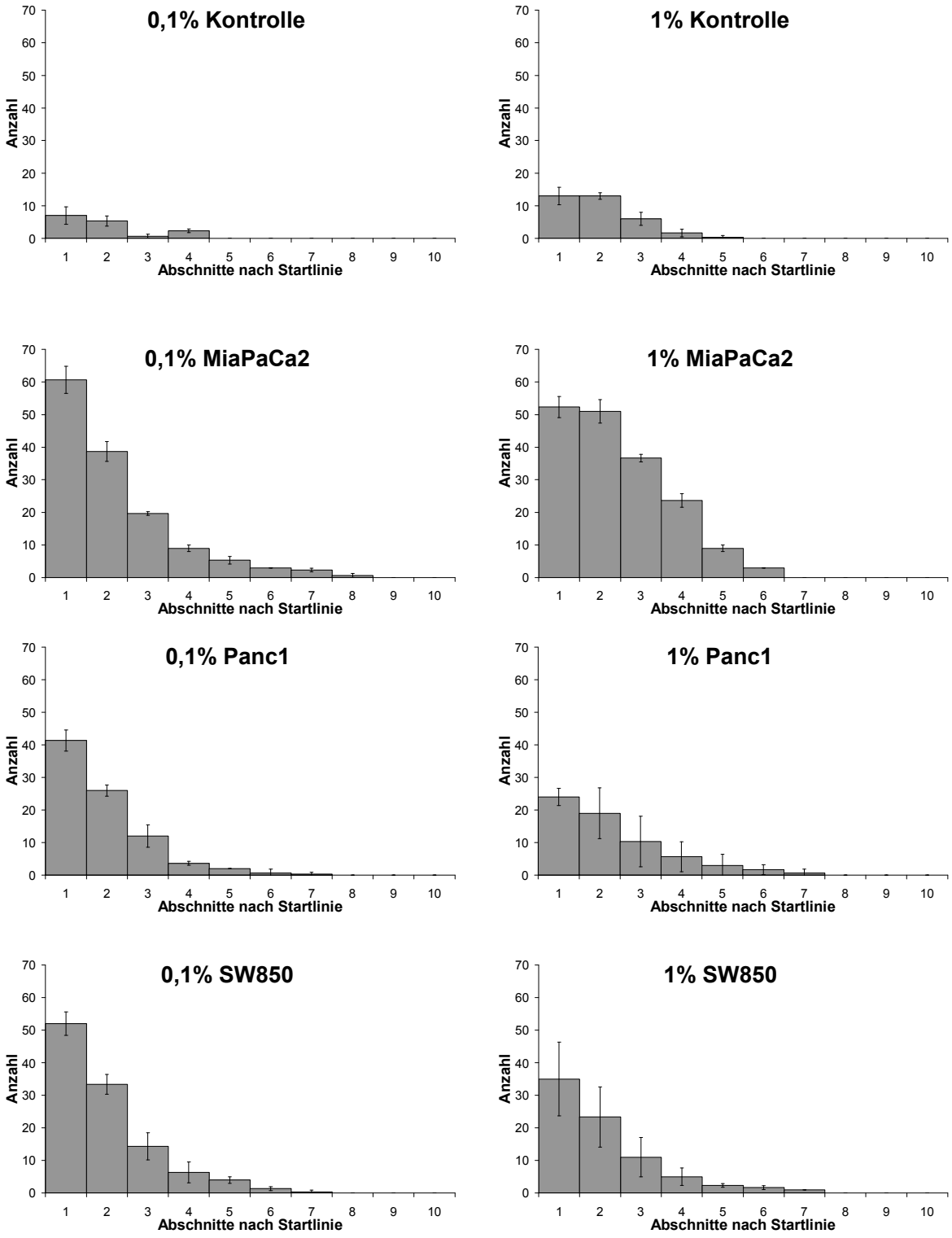



**Abb.23: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch Tumorzellen in 0,1% und 1% FCS (Fötales Kälberserum).** Zellanzahl innerhalb der 10 festgelegten Abschnitte ab der Startlinie (vergleiche Methodenteil in Kap. 2.2.11.) in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung . Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3. Linke Spalte: Inkubation mit 0,1% FCS, rechte Spalte: Inkubation mit 1% FCS. 1. Zeile: Kontrolle ohne Tumorzellen; 2. Zeile: MiaPaCa2-Zellen; 3. Zeile: Panc1-Zellen; 4. Zeile: SW850-Zellen.

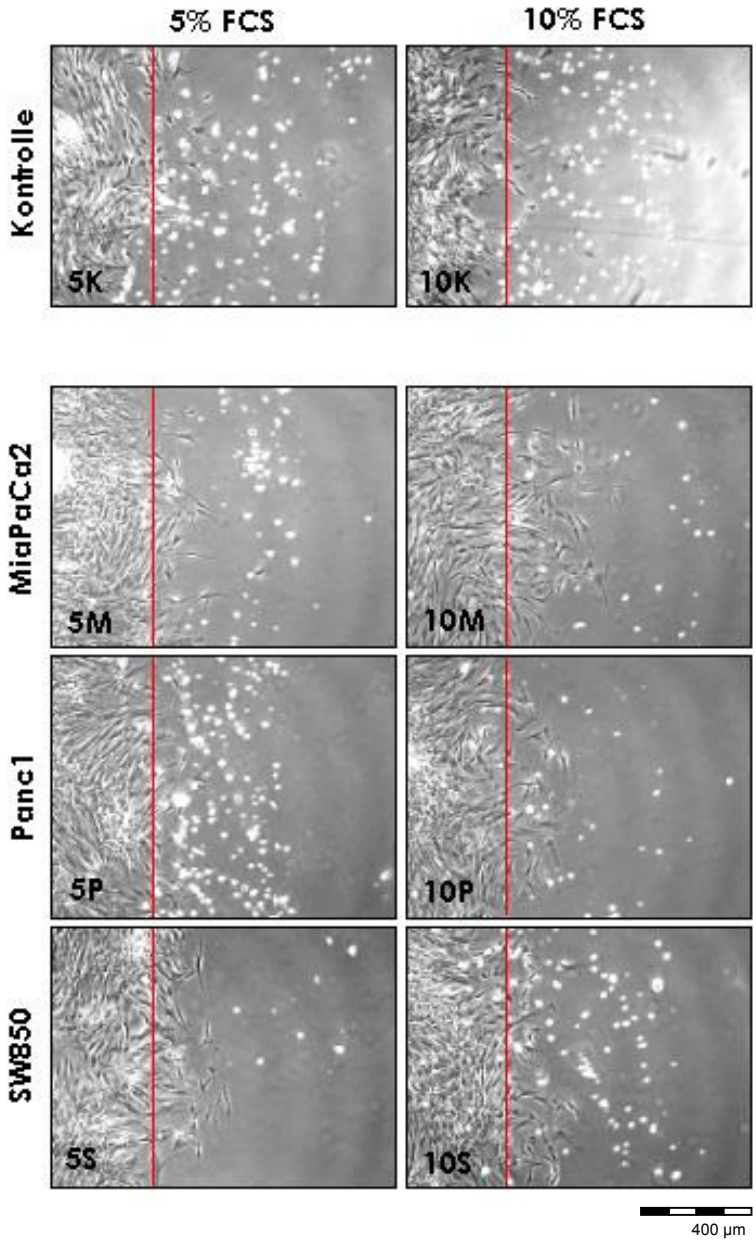



**Abb.24: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch Tumorzellen in 5% und 10% FCS (Fötales Kälberserum).** Nach 3stündigem Kultivieren von PSCs auf der linken Seite eines 6-Wells und Tumorzellen auf der rechten Seite, wurden die Zellen für 48h in 5% bzw. 10% FCS- Medium inkubiert. **K**: Kontrolle (ohne Tumorzellen im Well). **M**: MiaPaCA2-Tumorzellen rechts. **P**: Panc1-Tumorzellen rechts. **S**: SW850-Tumorzellen rechts.

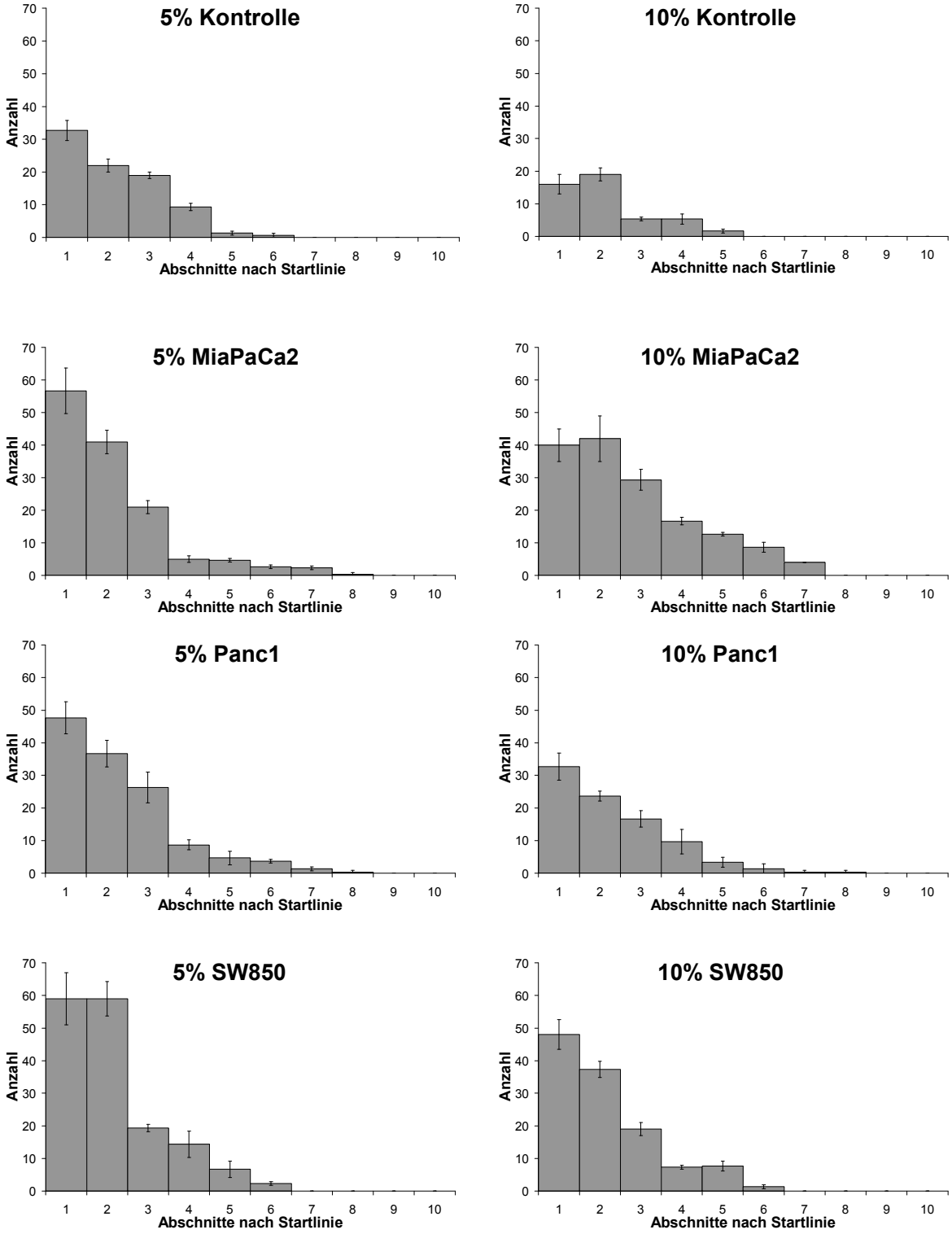



**Abb.25: Stimulation der PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration durch Tumorzellen in 5% und 10% FCS (Fötales Kälberserum).** Zellanzahl innerhalb der 10 festgelegten Abschnitte ab der Startlinie (vergleiche Methodenteil in Kap. 2.2.11.) in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung . Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3. Linke Spalte: Inkubation mit 5% FCS, rechte Spalte: Inkubation mit 10% FCS. 1. Zeile: Kontrolle ohne Tumorzellen; 2. Zeile: MiaPaCa2-Zellenl; 3. Zeile: Panc1Zellenl; 4. Zeile: SW850-Zellen.

### 3.1.3.2 Auswirkung der Hemmung des PDGF-Rezeptors auf die PSC-Migration

Ob die direkte PSC-Migration in Richtung Tumorzellen auch in diesem Versuch durch den Inhibitor der PDGF-Rezeptor- Kinase AG1295 hemmbar ist, sollte als nächstes geprüft werden, um PDGF wieder als ein für die PSC-Migration verantwortlicher Faktor darzustellen. Dazu wurden die PSCs vor Entfernen der Flexiperm-Ringe für 1 h mit 10 µM AG1295 präinkubiert. Die Zellen wurde in 0,1% FCS-Medium für 48 h inkubiert und es wurde 10 µM AG1295 zugegeben. Als Kontrolle wurden PSCs allein kultiviert und mit AG1295 behandelt. Anti-PDGF-BB wurde in dieser Zellkulturmethode nicht verwendet, da die Tumorzellen über die 48 h Versuchsdauer ständig PDGF-BB sezernieren, welcher durch einmalige anfängliche Zugabe des Antikörpers nicht hätte neutralisiert werden können. Abb.26 zeigt dass der spezifische Inhibitor der Rezeptor-Kinase des PDGFs zur Hemmung der Migration fähig ist, da sich Anzahl und Streckenlänge der PSCs in Richtung auf die Tumorzellen verringert haben.

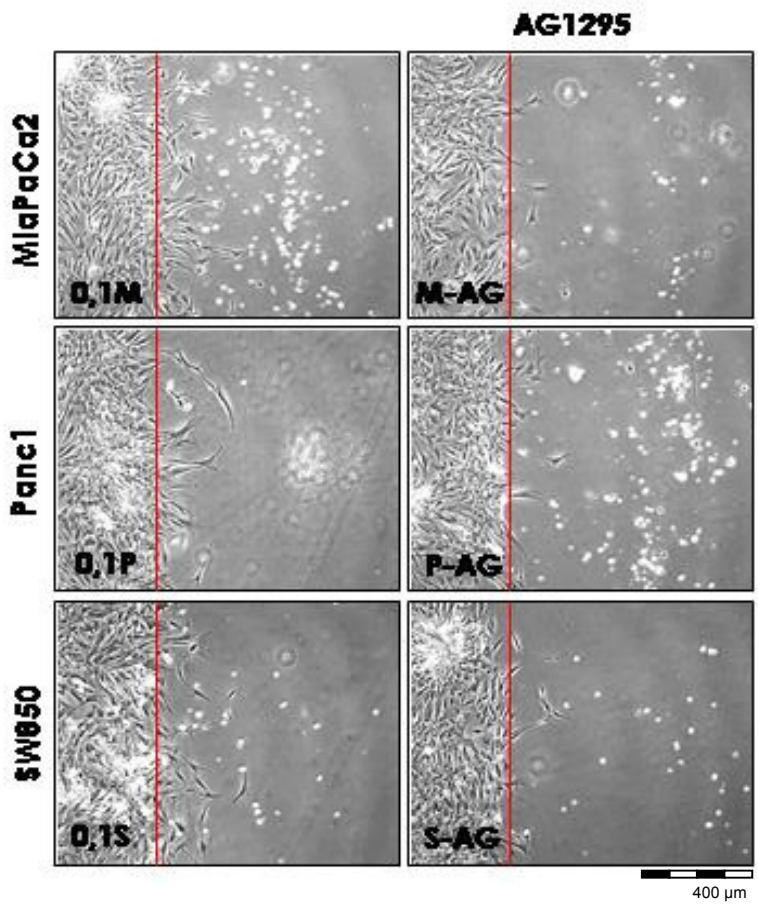



**Abb. 26: Auswirkung von AG1295 (Inhibitor des Platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptors) auf die PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum)**. Nach 3stündigem Kultivieren von PSCs auf der linken Seite eines 6-Wells und Tumorzellen auf der rechten Seite, wurden die Zellen für 48h in 0,1% FCS-Medium inkubiert. Zuvor wurden die PSCs für 1 h mit 10 µM AG1295 präinkubiert. Linke Spalte: Stimulation mit den Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850; rechte Spalte: Inhibition mit AG1295

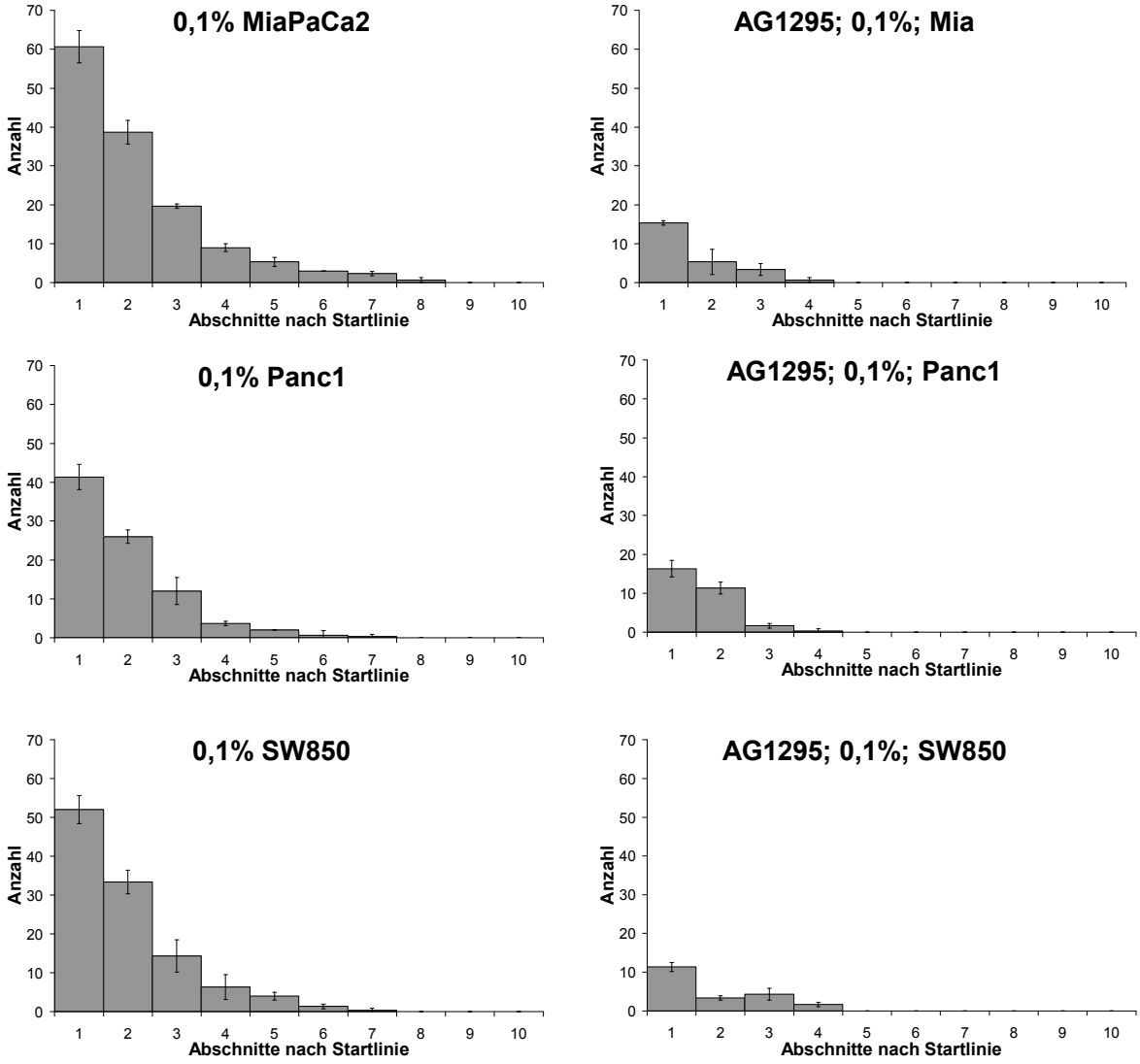



**Abb.27: Auswirkung von AG1295 (Inhibitor des Platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptors) auf die PSC (Pankreatische Sternzell)-Migration in 0,1% FCS (Fötales Kälberserum).** Zellanzahl innerhalb der 10 festgelegten Abschnitte ab der Startlinie (vergleiche Methodenteil in Kap. 2.2.11.) in jeweils drei voneinander unabhängigen mikroskopischen Fotos pro Bedingung . Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus n=3. Inkubation mit 10 µM AG1295. Linke Spalte: Stimulation mit den Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850; rechte Spalte: Inhibition mit AG1295

### 3.2 Stimulation von F-Aktin, Paxillin und der Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen in PSCs durch Tumorzellüberstand

Um die tyrosinphosphorylierten Proteine, sowie das „focal adhesion complex-related“ Protein Paxillin als auch die F-Aktin „stress fibers“ in pankreatischen Sternzellen darzustellen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt. Die Färbung erfolgte jeweils nach 5-minütiger als auch nach 20-minütiger Stimulation der PSCs mit konditioniertem Tumorzellüberstand der drei verwendeten Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850. Als Kontrolle wurden die Proteine der PSCs angefärbt, die 5 Minuten lang mit Medium stimuliert wurden.

Die Abb. 28-30 zeigen eine deutliche Zunahme der Tyrosinphosphorylierung der PSCs, die mit Tumorzellüberstand stimuliert wurden. Die Intensität der Färbung, und damit das Ausmaß der Phosphorylierung, scheint nach 5-minütiger Stimulierung ausgeprägter zu sein als nach 20 Minuten.

Ebenso bildeten sich hochpolymerisierte Aktinfilamente, die sich in der Kontrollgruppe nur als wenige dünne „stress fibers“ darstellten. Die Intensität und Anzahl der F-Aktin-Filamente nahm nach 5- wie auch nach 20-minütiger Stimulation in etwa gleichem Ausmaß zu.

Die Paxillin- Färbung nahm deutlich durch den konditionierten Tumorzellüberstand in diesem Zeitabstand zu. Paxillin erschien in den charakteristischen rotgefärbten länglichen Spritzern und kurzen Streifen. Die Färbeintensität als auch die Anzahl der Streifen innerhalb der einzelnen Zelle nahm durch die 5- und 20-minütige Stimulation ungefähr gleich stark zu.

Das Ergebnis dieser Immunfluoreszenzfärbung stellte sich bei der Stimulation mit den drei Tumorzelllinien sehr ähnlich dar und ist in den Abb.28-30 zu sehen.

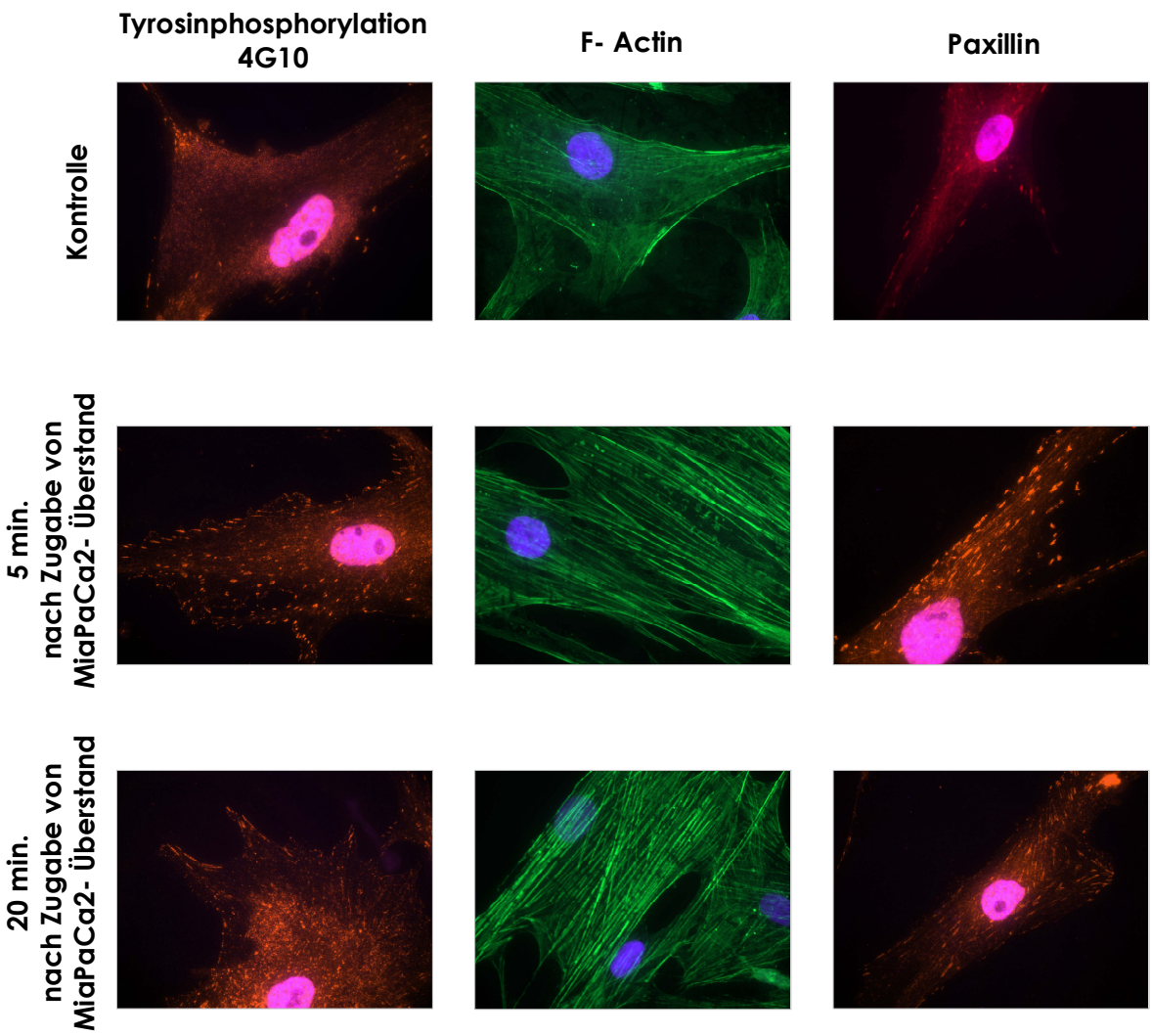



**Abb.28: Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin „stress fibers“, „focal adhesion complex“ Protein Paxillin und Proteinphosphorylierung in PSCs (Pankreatische Sternzellen) nach Stimulierung mit MiaPaCa2-Überstand.** Auf Glasplättchen kultivierte PSCs wurden für 5 und 20 Minuten mit konditioniertem MiaPaCa2-Überstand stimuliert. Als Kontrolle diente die 5-minütige Stimulation mit Medium. Danach erfolgte die Färbung der Tyrosinphosphorylierung mittels der Antikörper Anti-Phosphotyrosine 4G10 und Alexa Fluor 594F (rot), die Färbung für Paxillin mittels Anti-Paxillin und Alexa Fluor 594F (rot), die F-Aktin Färbung mittels Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün) sowie die Kernfärbung mittels BisBenzimid.

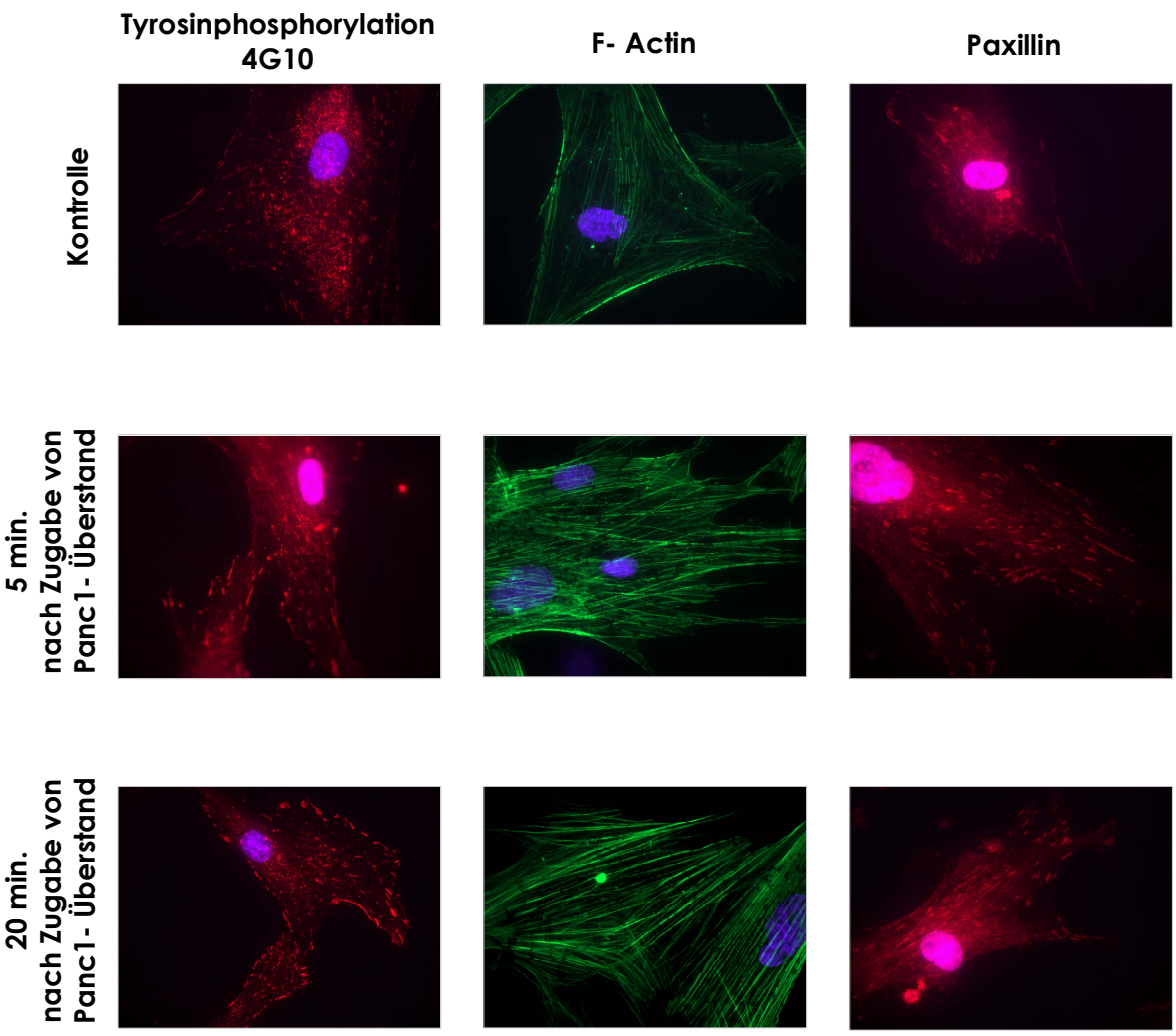



**Abb.29: Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin „stress fibers“, „focal adhesion complex“ Protein Paxillin und Proteinphosphorylierung in PSCs (Pankreatische Sternzellen) nach Stimulierung mit Panc1-Überstand.** Auf Glasplättchen kultivierte PSCs wurden für 5 und 20 Minuten mit konditioniertem Panc1-Überstand stimuliert. Als Kontrolle diente die 5-minütige Stimulation mit Medium. Danach erfolgte die Färbung der Tyrosinphosphorylierung mittels der Antikörper Anti- Phosphotyrosine 4G10 und Alexa Fluor 594F (rot), die Färbung für Paxillin mittels Anti-Paxillin und Alexa Fluor 594F (rot), die F-Aktin Färbung mittels Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün) sowie die Kernfärbung mittels BisBenzimid.

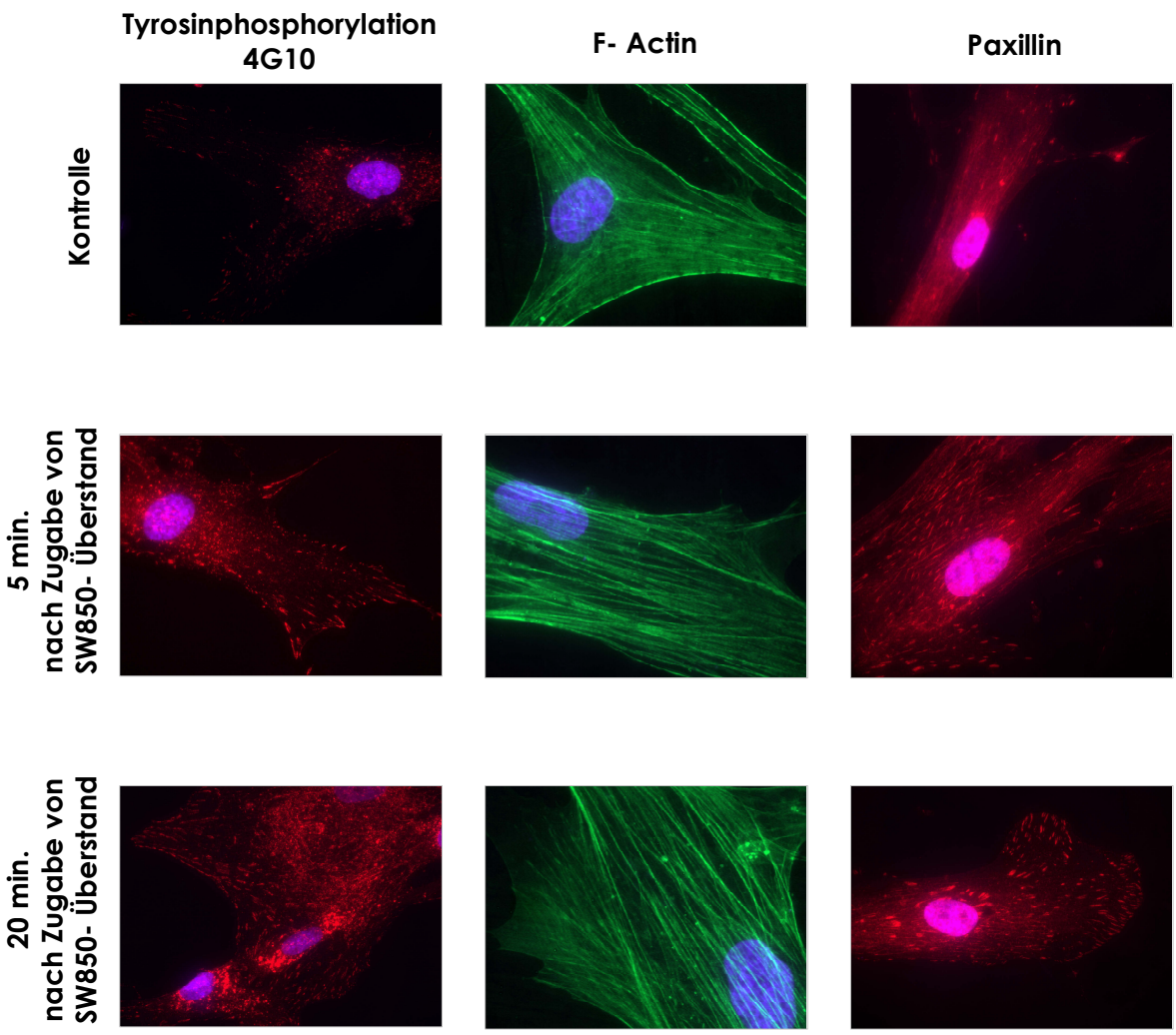



**Abb.30: Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin „stress fibers“, „focal adhesion complex“ Protein Paxillin und Proteinphosphorylierung in PSCs (Pankreatische Sternzellen) nach Stimulierung mit SW850-Überstand.** Auf Glasplättchen kultivierte PSCs wurden für 5 und 20 Minuten mit konditioniertem SW850-Überstand stimuliert. Als Kontrolle diente die 5-minütige Stimulation mit Medium. Danach erfolgte die Färbung der Tyrosinphosphorylierung mittels der Antikörper Anti-Phosphotyrosine 4G10 und Alexa Fluor 594F (rot), die Färbung für Paxillin mittels Anti-Paxillin und Alexa Fluor 594F (rot), die F-Aktin Färbung mittels Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün) sowie die Kernfärbung mittels BisBenzimid.

### 3.3 Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung von Proteinen in PSCs durch Tumorzellüberstand

Um den Effekt von konditioniertem Tumorzellüberstand der drei Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 auf die Tyrosinposphorylierung von Proteinen in PSCs und dessen Zeitabhängigkeit zu untersuchen, wurden PSC-Zellkulturen mit 75% Tumorzellüberstand für jeweils 5, 10, 20, 30 und 45 Minuten stimuliert und anschließend lysiert. Die Kontrollgruppe wurde für 5 Minuten mit Medium stimuliert. Abb.31 zeigt eine deutliche Zunahme der Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle bei verschiedenen Molekulargewichten (z.B. bei ca. 150-250 kDa; 60 kDa; 45 kDa).

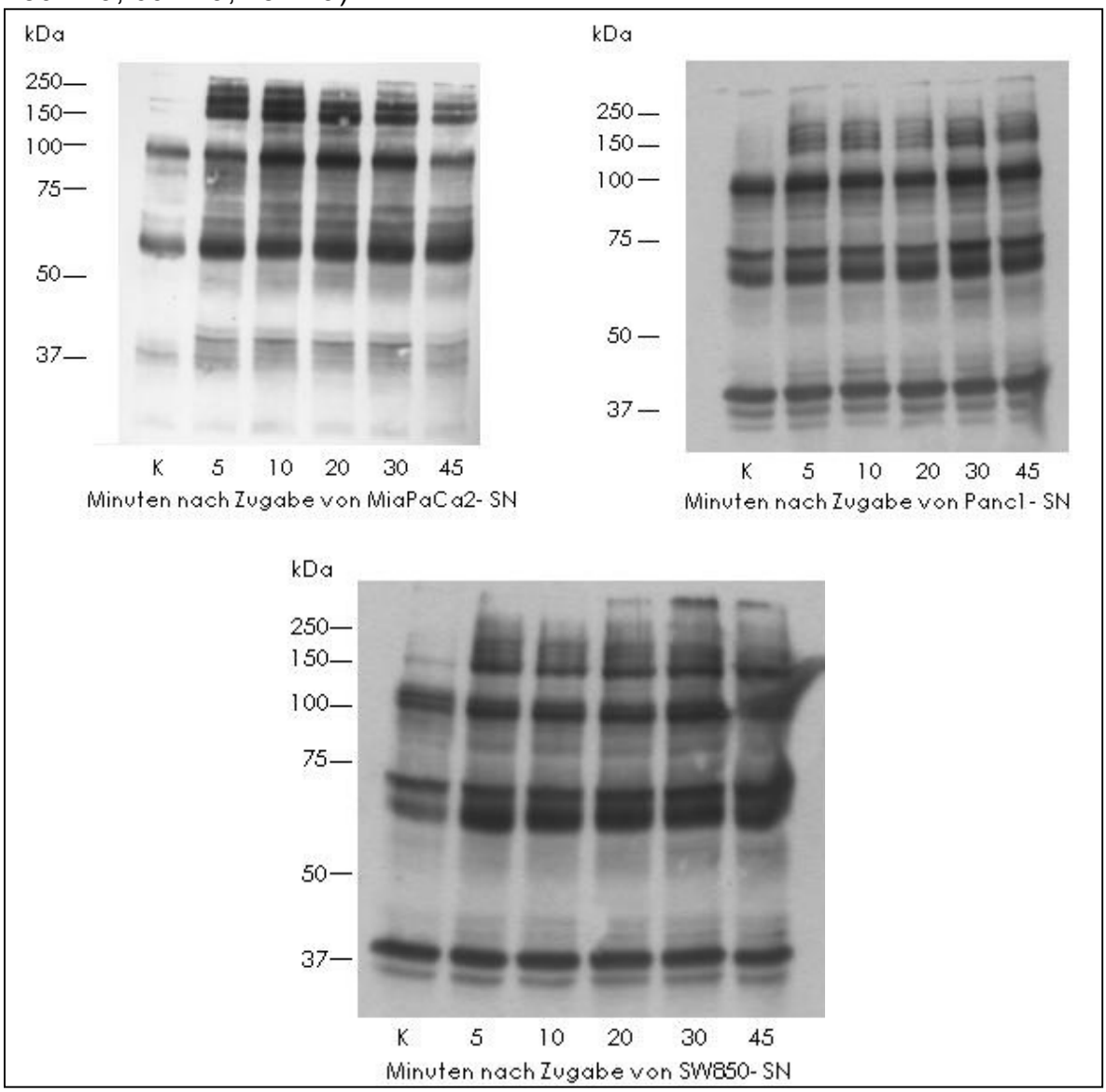



**Abb.31: Tyrosinphosphorylierung in PSCs (Pankreatischen Sternzellen) nach Zugabe von Tumorzellüberstand (SN).** PSC-Kulturen wurden mit konditioniertem Tumorzellüberstand der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 stimuliert und nach den angegebenen Zeitabständen gestoppt und lysiert. Dargestellt sind die Western Blots mit dem Anti-Phosphotyrosin 4G10. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert. (K= Kontrollgruppe)

## 3.4 Zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung von PDGF-Rezeptor β, p42/44 MAPK, p38 MAPK und Akt

### 3.4.1 Aktivierung der Tyrosinphosphorylation des PDGF-Rezeptor ß

Um eine Beteiligung des PDGF-Rezeptor ß an der Stimulation von PSCs durch konditionierte Tumorzellüberstände zu untersuchen, wurde zunächst die gesamte Tyrosinphosphorylierung der Proteine in PSCs wie oben beschrieben mittels Western Blot unter zu Hilfenahme des Antikörpers 4G10 detektiert. Anschließend wurden die Blots gestrippt und mit einem spezifischen Antikörper gegen den PDGF-Rezeptor ß inkubiert, um das Molekulargewicht dieses Rezeptors von 180 kDa zu verifizieren und um eine Ladungskontrolle zu gewinnen. Das Signal hat sein Maximum bei 10 Minuten und nimmt bis 45 Minuten schrittweise ab. Der Verlauf der Aktivität ist bei der Stimulation durch die drei verwendeten Tumorzelllinien ähnlich.

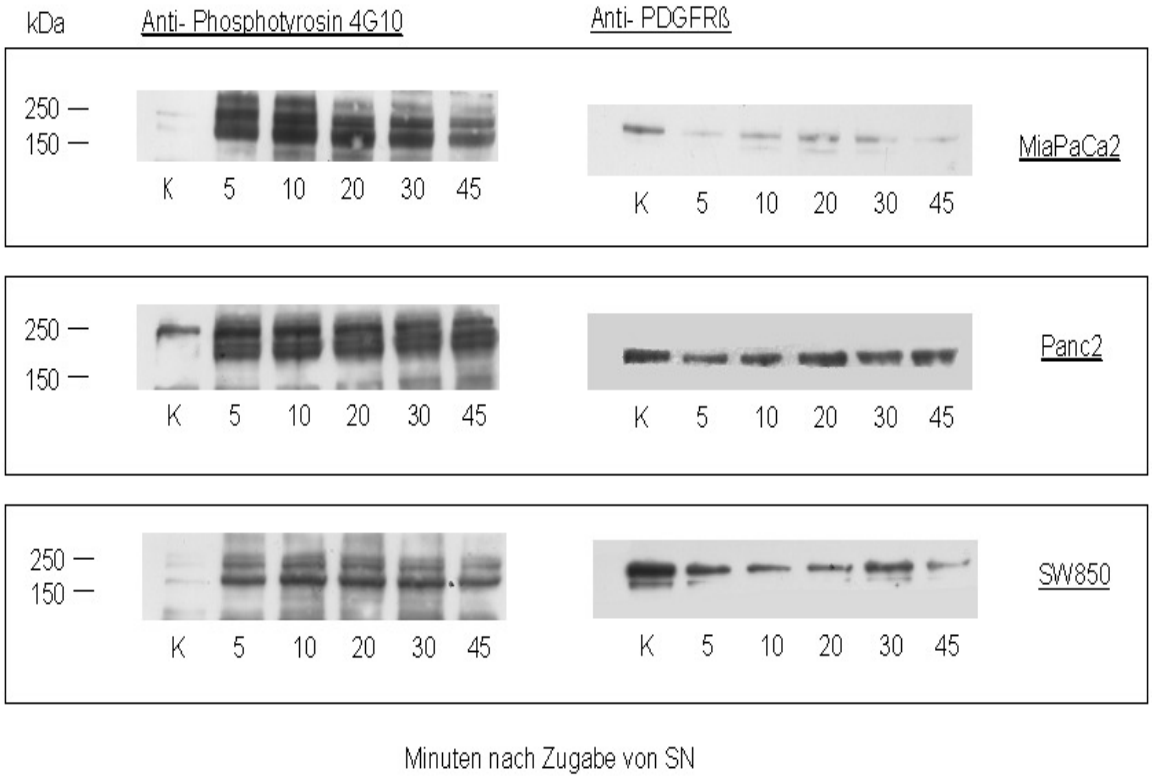



**Abb.32: Aktivierung der Phosphorylierung des PDGF (Platelet-derived growth factor)-Rezeptor ß.** PSC (Pankreatische Sternzell)- Kulturen wurden mit konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 stimuliert und nach den angegebenen Zeitabständen gestoppt und lysiert. Dargestellt sind auf der linken Seite die Western Blots mit dem Anti-Phosphtyrosin 4G10, auf der rechten Seite die gestrippten Blots, die mit Anti-PDGFRß inkubiert wurden. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert. (K=Kontrollgruppe)

### 3.4.2 Aktivierung der Tyrosinphosphorylierung der MAP Kinasen p42/44 und p38

Die Auswirkungen von konditioniertem Tumorzellüberstand auf die Aktivität der MAP Kinasen p42/44 (Erk 1/2; Extracellular signal-regulated kinases) und p38, sind in den Western Blots in Abb.33 und Abb.34 dargestellt. Verwendet wurden dazu spezifische monoklonale Antikörper gegen die phosphorylierten Erk- bzw. p38 MAP Kinasen. Für die Ladungskontrolle wurden die Blot-Membranen gestrippt und mit Antikörpern gegen Total-Erk bzw. Total-p38 inkubiert. Wie Abb.33 zeigt, aktiviert konditionierter Tumorzellüberstand die p44/42-MAPK-Aktivität in hohem Maße bei allen drei Tumorzelllinien. Erst ab 45 Minuten scheint die Aktivität etwas abzunehmen. Ebenso nimmt das Signal der phosphorylierten p38 MAPK durch MiaPaCa2- und SW850-Überstand ab 20 Minuten stetig ab wie in Abb.33 zu sehen ist, wohingegen durch Stimulation mit Panc1-Überstand die Aktivität mit der Zeit zuzunehmen scheint.

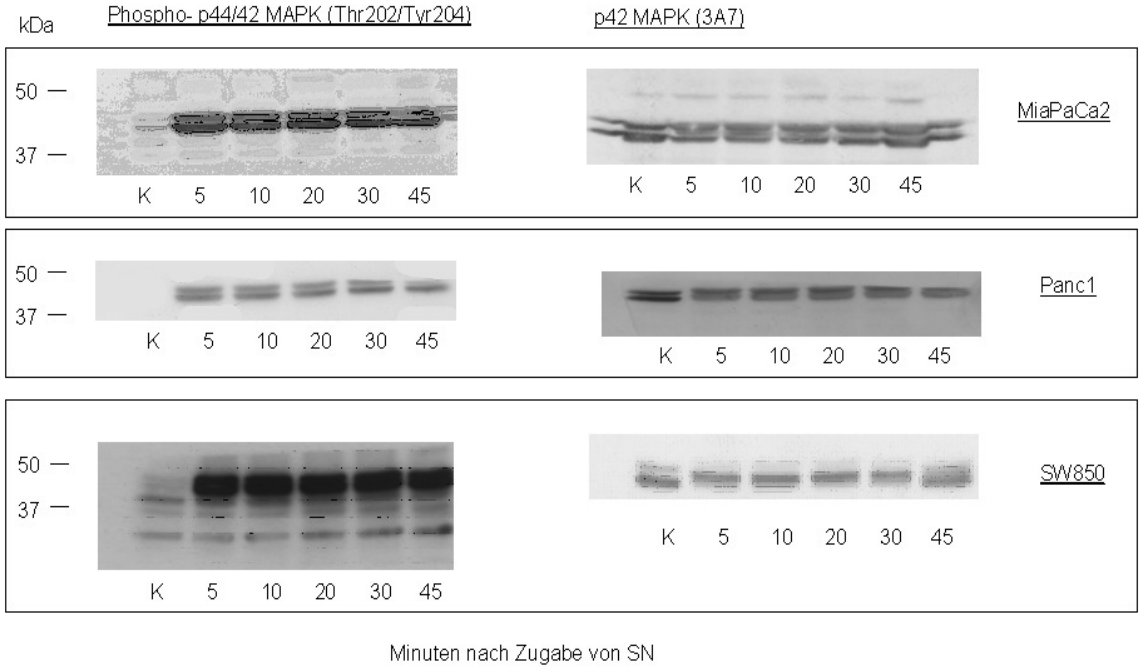



**Abb.33: Aktivierung der Phosphorylierung von p44/42.** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 stimuliert und nach den angegebenen Zeitabständen gestoppt und lysiert. Dargestellt sind auf der linken Seite die Western Blots mit Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Mitogen-activated protein kinase), auf der rechten Seite die zugehörigen gestrippten Blots, die das Total-p42 MAPK zeigen. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert. (K=Kontrollgruppe)

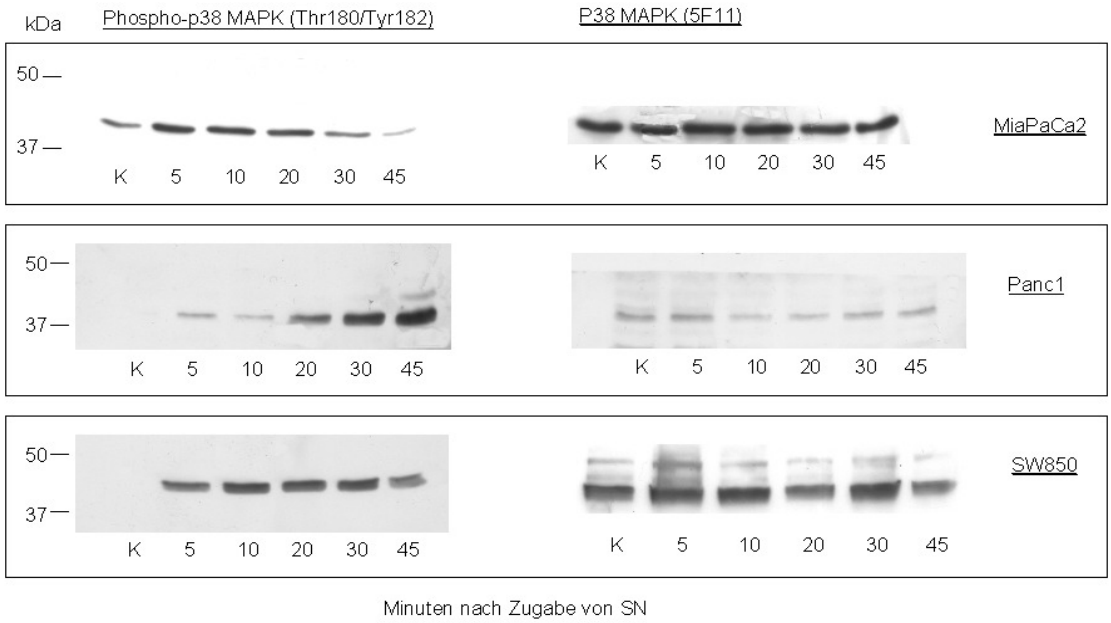



**Abb.34: Aktivierung der Phosphorylierung von p38.** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 stimuliert und nach den angegebenen Zeitabständen gestoppt und lysiert. Dargestellt sind auf der linken Seite die Western Blots mit Anti-Phospho-p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase), auf der rechten Seite die zugehörigen gestrippten Blots, die das Total-p38 MAPK zeigen. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert. (K=Kontrollgruppe)

### 3.4.3 Aktivierung der Tyrosinphosphorylierung von Akt

Um die phosphorylierte Proteinkinase Akt zu detektieren wurde für den Western Blot ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen Phospho-Akt verwendet. Akt wird durch Tumorzellüberstandstimulation in PSCs rasch phosphoryliert wie Abb.35 darstellt. Dabei war kein Aktivitätsunterschied in den verwendeten Zeitabständen der Stimulation festzustellen. Auch rufen die drei Tumorzelllinien ähnliche Akt-Antworten auf die Stimulation hervor.

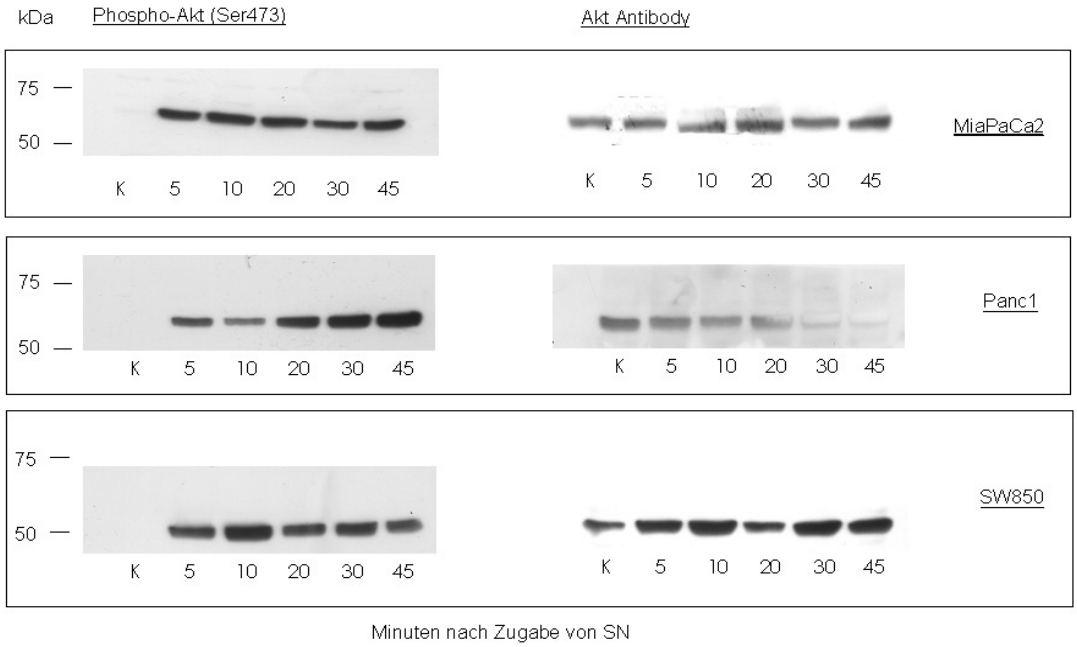



**Abb.35: Aktivierung der Phosphorylierung von Akt.** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 stimuliert und nach den angegebenen Zeitabständen gestoppt und lysiert. Dargestellt sind auf der linken Seite die Western Blots mit Anti-Phospho-Akt, auf der rechten Seite die zugehörigen gestrippten Blots, die das Total-Akt zeigen. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert. (K=Kontrollgruppe)

## 3.5 Dosisabhängige Tyrosinphosphorylierung von Proteinen in PSCs durch Tumorzellüberstand

Um herauszufinden, ob geringer konzentrierte Tumorzellüberstände als die bisher verwendeten 75% ausreichen, um Proteine in PSCs mittels Tyrosinphosphorylierung zu aktivieren, wurden Tumorzellüberstand-konzentrationen zu 10, 20, 30, 40 und 50 % verwendet. Die PSC- Zellkulturen wurden für 5 Minuten stimuliert. Wie Abb.36 zeigt, reicht bereits eine Konzentration an konditioniertem Überstand von 10% aus, um Proteine deutlich zu phosphorylieren. Außerdem scheint die Konzentration von 40% bei allen verwendeten Tumorzelllinien die höchste Aktivität hervorzurufen.

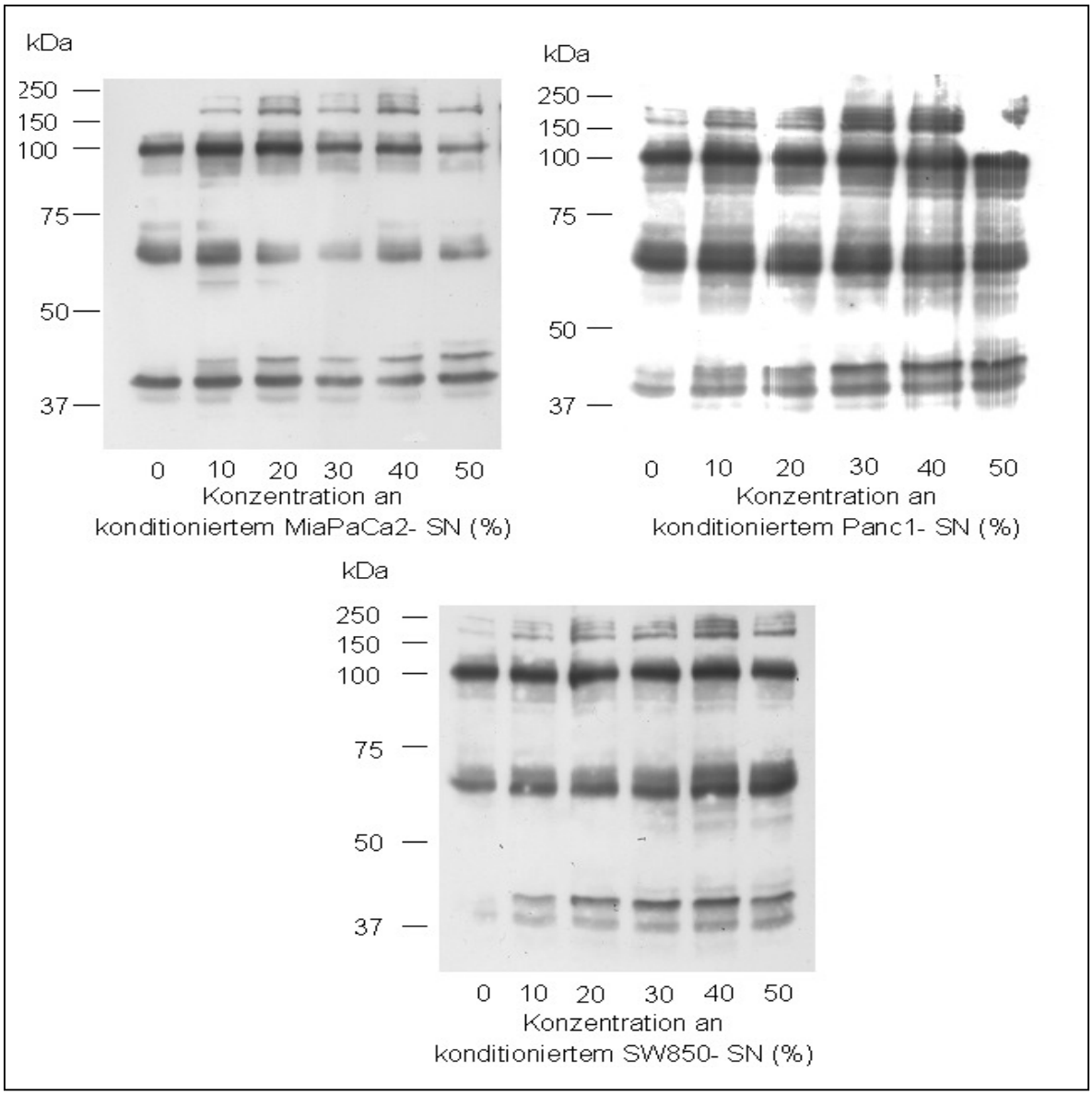



**Abb.36: Dosisabhängige Phosphorylierung.** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden in den angegebenen Konzentrationen an konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 stimuliert und nach 5 Minuten gestoppt und lysiert. Dargestellt sind die Western Blots mit dem Anti-Phosphtyrosin 4G10. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

## 3.6 Inhibition der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen durch Anti-PDGF-BB, AG1295, LY294002 und PD98059

### 3.6.1 Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch Anti-PDGF-BB

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass konditionierter Tumorzellüberstand der drei verwendeten Tumorzelllinien die Tyrosinphosphorylierung einiger Proteine in PSCs aktiviert. Um nun zu klären, ob der Wachstumsfaktor PDGF-BB an der bisher gezeigten Aktivierung der Tyrosinphosphorylierung in PSCs durch konditionierten Tumorzellüberstand beteiligt ist, wurde der konditionierte Tumorzellüberstand der Zelllinien MiaPaCa2,

Panc1 und SW850 vor der 5minütigen Stimulation der Sternzellen mit 75% Tumorzellüberstand, für 1 Stunde mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB präinkubiert. Abb. 37 zeigt, dass durch die vorherige Inkubation mit dem Antikörper gegen PDGF-BB, das Signal im Western Blot bei einem Molekulargewicht von 190 kDa deutlich geringer ist, als im Vergleich zur reinen Tumorzellüberstand-Stimulation. Außerdem fällt im Western Blot bei der Verwendung des Anti-Phosphotyrosins 4G10 ebenfalls eine Signalminderung bei den Molekulargewichten um 60 kDa und um 45 kDa auf. Dieses Ergebnis ist bei der Verwendung aller drei Tumorzelllinien deutlich erkennbar. Am ausgeprägtesten bei der Stimulation mit MiaPaCa2- und Panc1-Überstand. Für die Ladungskontrolle und um die Position des PDGF-Rezeptor ß bei 190 kDa zu verifizieren, wurde die Membran gestrippt und neu mit dem Antikörper gegen diesen Rezeptor inkubiert.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Kinasen Erk, p38 und Akt am Signaltransduktionsweg des PDGF-Rezeptors beteiligt sind. Hierfür wurden die spezifischen Antikörper gegen diese Proteine verwendet.

Im Western Blot sieht man eine deutliche Signalminderung bei der Verwendung von Anti-Phospho-p44/42 (Erk), Anti- Phospho-p38 und Anti-Phospho-Akt durch die Präinkubation des Tumorzellüberstandes mit Anti-PDGF-BB im Vergleich zur reinen Tumorzellüberstand-Stimulation. Wieder ist dieser Effekt ausgeprägter bei MiaPaCa2- und Panc1-Überstand als bei SW850. In Abb. 38 sind außerdem die Ladungskontrollen mit Anti-Total-p44/42, -p38 und –Akt dargestellt, durch die die unterschiedliche Aktivierung der Phosphorylierung ebenfalls deutlich wird.

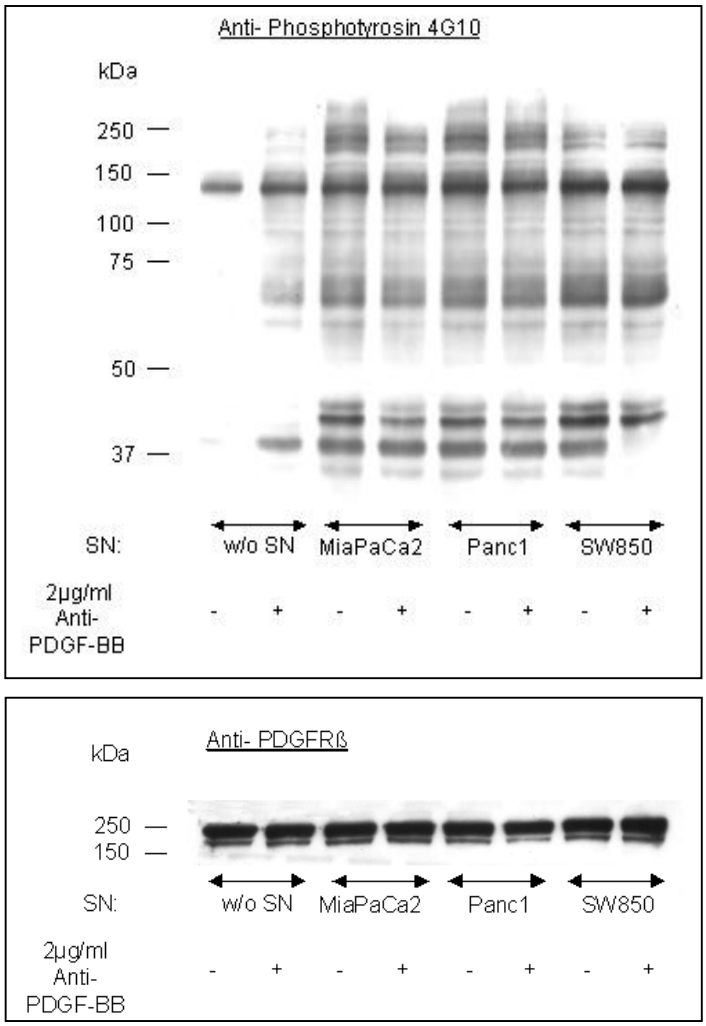



**Abb.37: Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch Anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB).** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 75% konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 mit und ohne vorherige Inkubation (60 Minuten) des Überstands mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB 5 Minuten lang stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit dem Anti-Phosphtyrosin 4G10 und die gestrippte Membran, die mit Anti-PDGFRß erneut inkubiert wurde. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

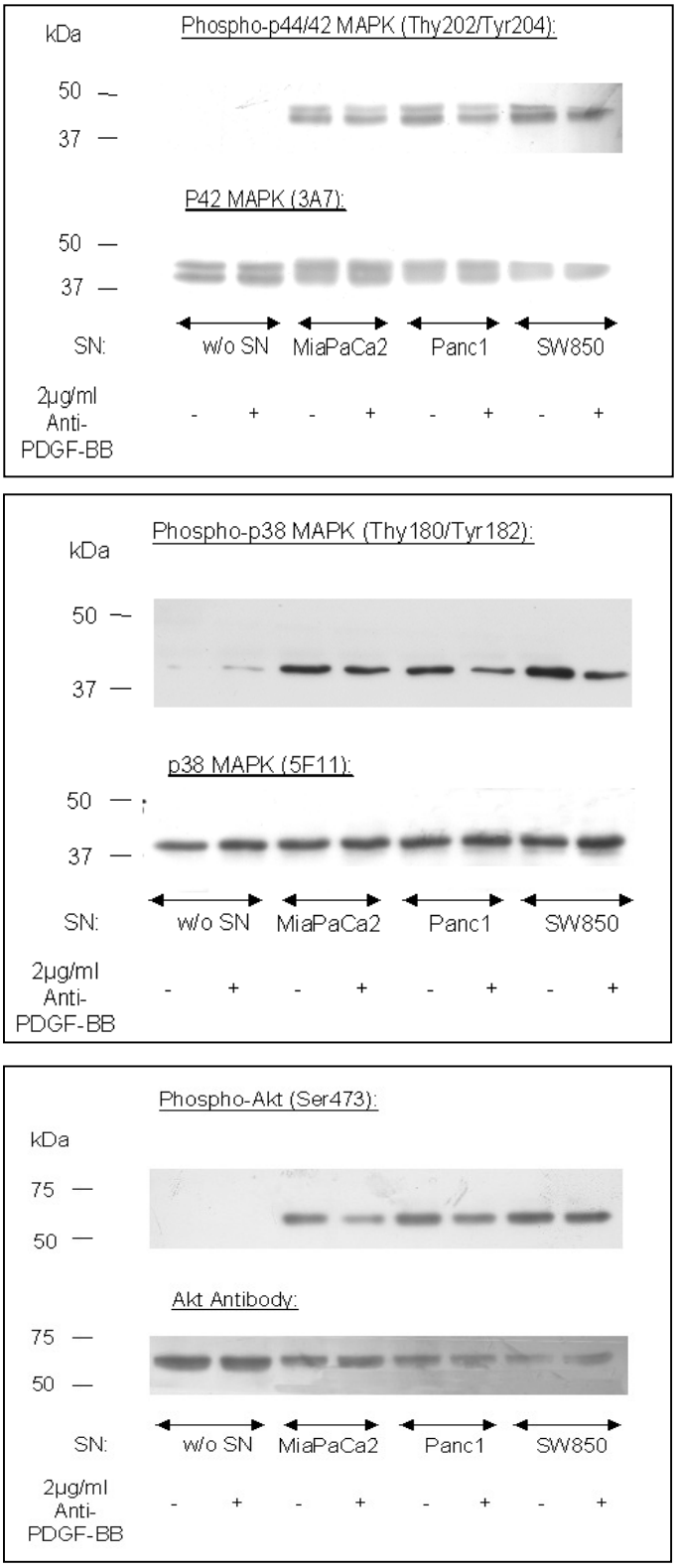



**Abb.38: Inhibition der Phosphorylierung von Erk (Extracellular regulated kinase), p38 und Akt durch Anti-PDGF-BB (Antikörper gegen Platelet-derived growth factor-BB).** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 75% konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 mit und ohne vorherige Inkubation (60 Minuten) des Überstands mit 2 µg/ml Anti-PDGF-BB 5 Minuten lang stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit den Antikörpern Phospho-p44/42 MAPK (Mitogen-activated protein kinase), Phospho-p38-MAPK und Phospho-Akt sowie jeweils darunter dargestellt, die gestrippten Membranen, die mit den Antikörpern p42-MAPK, p38-MAPK und Akt als Ladungskontrolle erneut inkubiert wurden. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

### 3.6.2 Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch AG1295 (Tyrphostin)

Dass die Ausschaltung des PDGF-BB durch den Antikörper im Tumorzellüberstand eine hemmende Wirkung auf die Phosphorylierung mehrerer Proteine in PSCs hat, wurde bereits gezeigt. Als nächstes wurde ein Inhibitor des PDGF- Rezeptors AG1295 (Tyrphostin) verwendet. Dazu wurde die Sternzellkultur vor der 5minütigen Stimulation mit 10% Tumorzellüberstand über 24 h mit 10 µM AG1295 präinkubiert. Es wurden nur 10% konditionierter Tumorzellüberstand verwendet, da durch die Stimulation mit 75% Tumorzellüberstand keine Inhibition sichtbar gemacht werden konnte aufgrund der Überlagerung der Proteinaktivierung durch andere Wachstumsfaktoren im konditioniertem Tumorzellüberstand. Abb. 39 zeigt die gesamte Tyrosinphosphorylierung. Durch die Zugabe von AG1295 wird das Signal im Western Blot im Vergleich zur reinen Tumorzellüberstandstimulation nahezu ausgeschaltet bei Molekulargewichten um 190 kDa, 60 kDa und 45 kDa. Dies ist bei allen drei Tumorzelllinien ähnlich. In der Abbildung ist unten die dazugehörige Ladungskontrolle mit Anti-PDGFRß dargestellt.

Ebenso wurde dieser Versuch mittels den spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes Erk, p38 und Akt sowie die jeweiligen Ladungskontrollen durchgeführt, was Abb.40 zeigt. Auch hier ist der Effekt der Hemmung durch AG1295 deutlich.

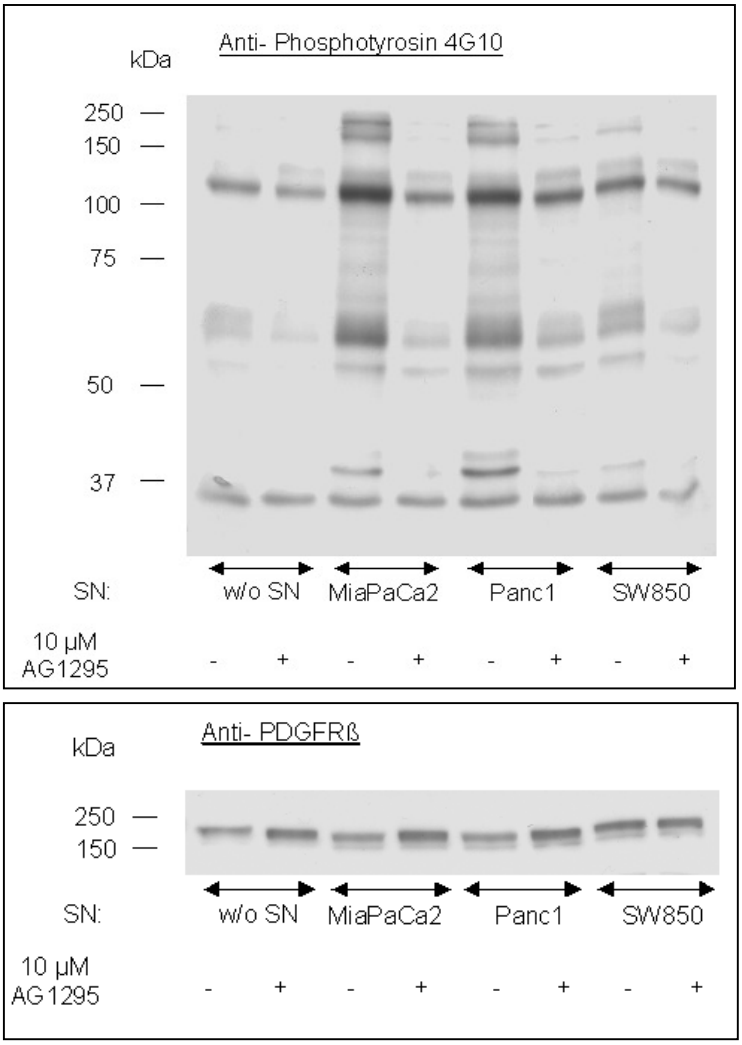



**Abb.39: Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch AG1295 (Inhibitor des Paltelet-derived growth factor (PDGF) Rezeptors).** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 10% konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 mit und ohne vorherige Inkubation (24 Stunden) der Sternzellen mit 10 µM AG1295 für 5 Minuten stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit dem Anti-Phosphtyrosin 4G10 und die gestrippte Membran, die mit Anti-PDGFRß erneut inkubiert wurde. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

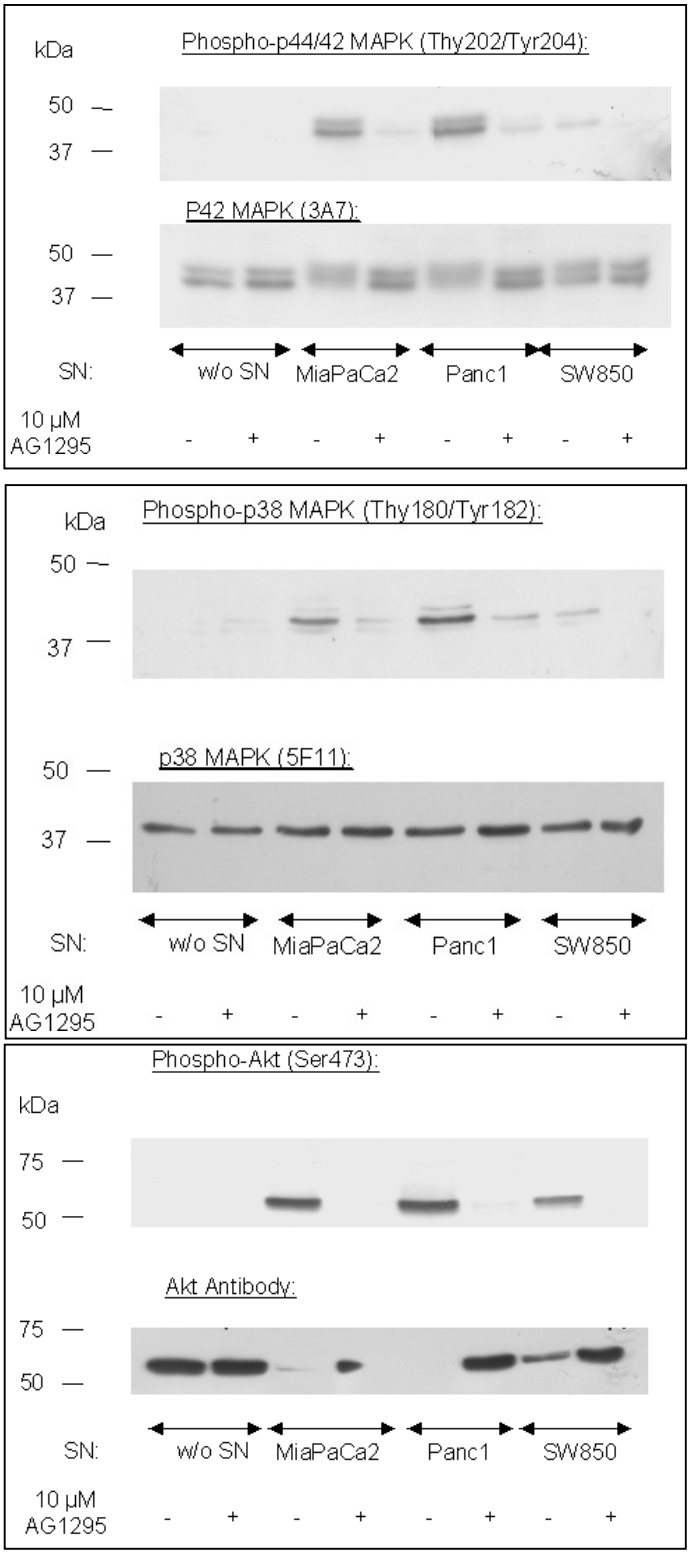



**Abb.40: Inhibition der Phosphorylierung von Erk (Extracellular regulated kinase), p38 und Akt durch AG1295 (Inhibitor des Platelet-derived growth factor (PDGF) Rezeptor).** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 10% konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 mit und ohne vorherige Inkubation (24 Stunden) der Sternzellen 10 µM AG1295 für 5 Minuten stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit den Antikörpern Phospho-p44/42 MAPK (Mitogen-activated protein kinase), Phospho-p38-MAPK und Phospho-Akt sowie jeweils darunter dargestellt, die gestrippten Membranen, die mit den Antikörpern p42-MAPK, p38-MAPK und Akt als Ladungskontrolle erneut inkubiert wurden. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

### 3.6.3 Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch LY294002

LY294002 ist ein selektiver Inhibitor der Phosphatidylinositol 3 (PI3) -Kinase. Da in vorangegangenen Experimenten eine Beteiligung der PI3-Kinase an der gerichteten PSC-Migration auf Tumorzellen nachgewiesen wurde, sollte nun untersucht werden, ob die Hemmung dieser Kinase Auswirkungen auf die durch Tumorzellen ausgelöste Tyrosinphosphorylation von Proteinen in PSCs hat. Durch Darstellung dieses Signaltransduktionsweges wird die Rolle der PI3-Kinase in den aktivierten PSCs deutlich gemacht. Die Sternzellkultur wurde vor der 5minütigen Stimulation mit 10% konditioniertem Tumorzellüberstand für eine Stunde mit 25 µM LY294002 präinkubiert. Abb.41 zeigt die Tyrosinphosphorylation durch den Antikörper 4G10, darunter die Ladungskontrolle mittels Anti-PDGFRß. Auch durch die Hemmung mittels LY294002 ist eine leichte Abschwächung des Signals bei 190 kDa festzustellen. Außerdem eine deutliche Verringerung der Aktivierung um 60 kDa und 45 kDa. Äußerst deutlich ist allerdings die Auswirkung des Inhibitors der PI3-Kinase auf die Hemmung der Kinasen Erk und Akt, in Abb.42. Das Protein p38 erfährt durch die Inhibition ebenfalls nur eine leichte Abschwächung.

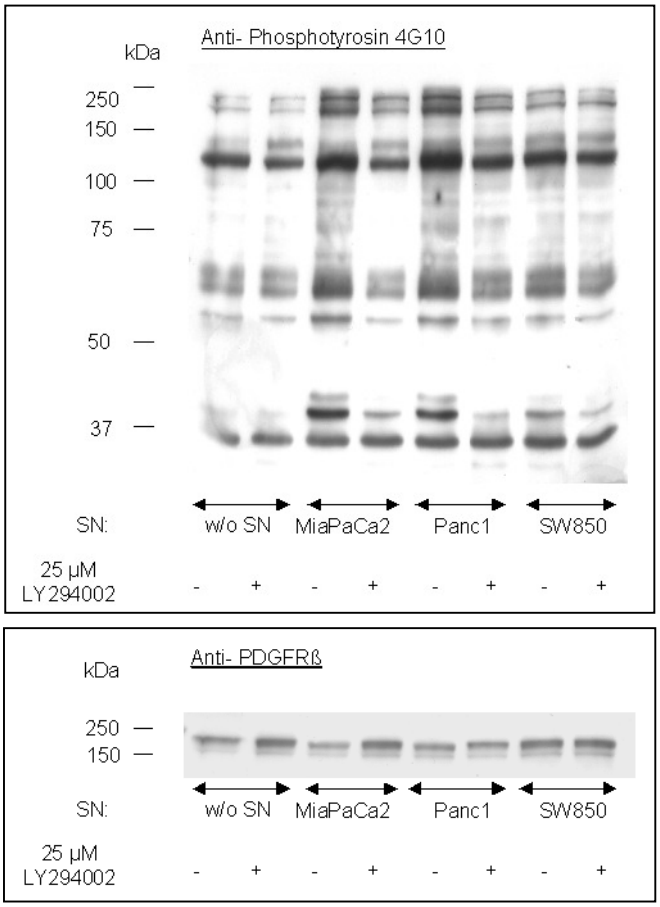



**Abb.41: Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch LY294002 (Inhibitor der Phosphatidylinositol 3 Kinase PI3K).** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 10% konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 mit und ohne vorherige Inkubation (1 Stunde) der Sternzellen mit 25 µM LY294002 für 5 Minuten stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit dem Anti-Phosphtyrosin 4G10 und die gestrippte Membran, die mit Anti-PDGFRß (Platelet-derived growth factor Rezeptor) erneut inkubiert wurde. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

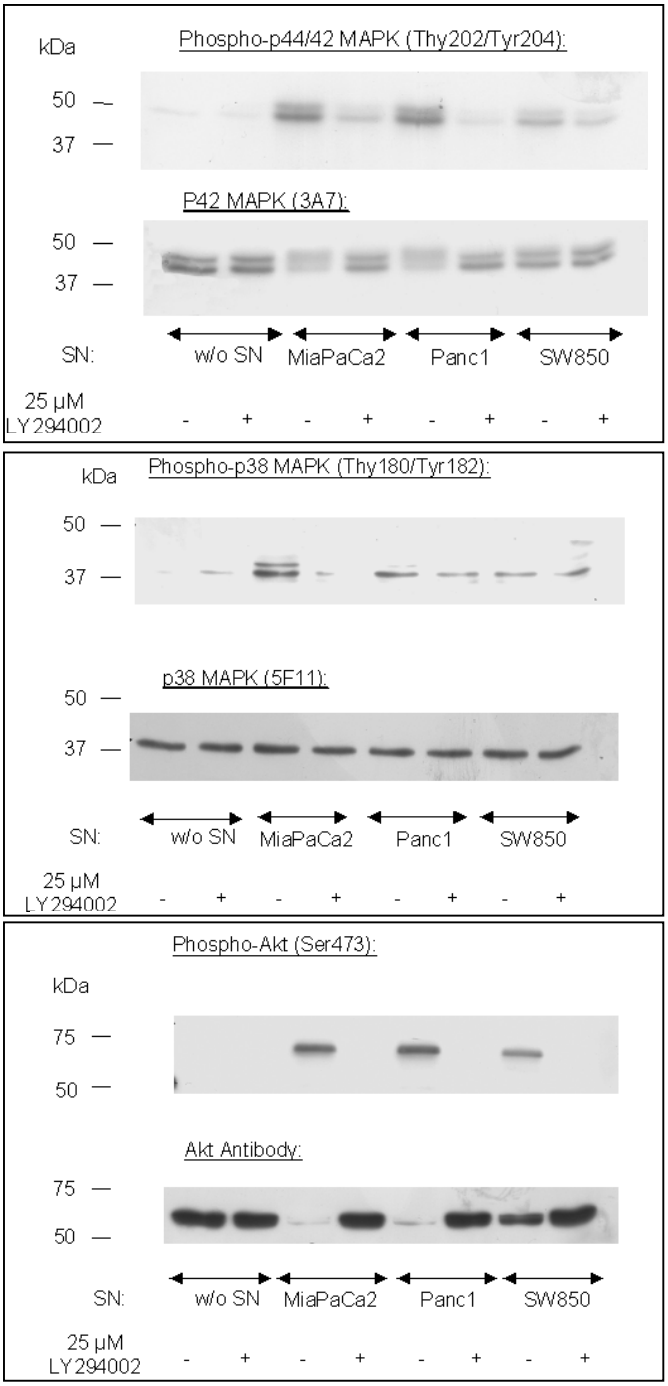



**Abb.42: Inhibition der Phosphorylierung von Erk (Extracellular regulated kinase), p38 und Akt durch LY294002 (Inhibitor der Phosphatidylinositol 3 Kinase PI3K).** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 10% konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 mit und ohne vorherige Inkubation (1 Stunde) der Sternzellen 25 µM LY294002 für 5 Minuten stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit den Antikörpern Phospho-p44/42-MAPK (Mitogen-activated protein kinase), Phospho-p38-MAPK und Phospho-Akt sowie jeweils darunter dargestellt, die gestrippten Membranen, die mit den Antikörpern p42-MAPK, p38-MAPK und Akt als Ladungskontrolle erneut inkubiert wurden. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

### 3.6.4 Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch PD98059

PD 98059 ist ein spezifischer Inhibitor der MAP Kinase Kinase und hemmt die Phosphorylierung der MAP Kinase durch die MAP Kinase Kinase. Dieser Inhibitor wurde hier verwendet um herauszufinden, um die durch Tumorzellüberstand hervorgerufenene Erk-Aktivierung abhängig ist von der Funktion von MEK-1. Dazu wurden Sternzellen vor der 5minütigen Stimulation mit 10% konditioniertem Tumorzellüberstand für eine Stunde mit 20 µM PD98059 präinkubiert. In Abb.43 ist zu sehen, dass PD98059 in der Darstellung der gesamten Phosphorylierung mit dem Antikörper 4G10 eine Verringerung des Signals um 45 kDa hervorruft. Diese Hemmung von Erk ist ebenfalls deutlich gemacht in Abb. 44 mit Hilfe des spezifischen Antikörpers gegen p44/42 MAPK. Wie zu erwarten trat keine Veränderung durch die Verwendung von PD98059 bei den Kinasen p38 und Akt auf.

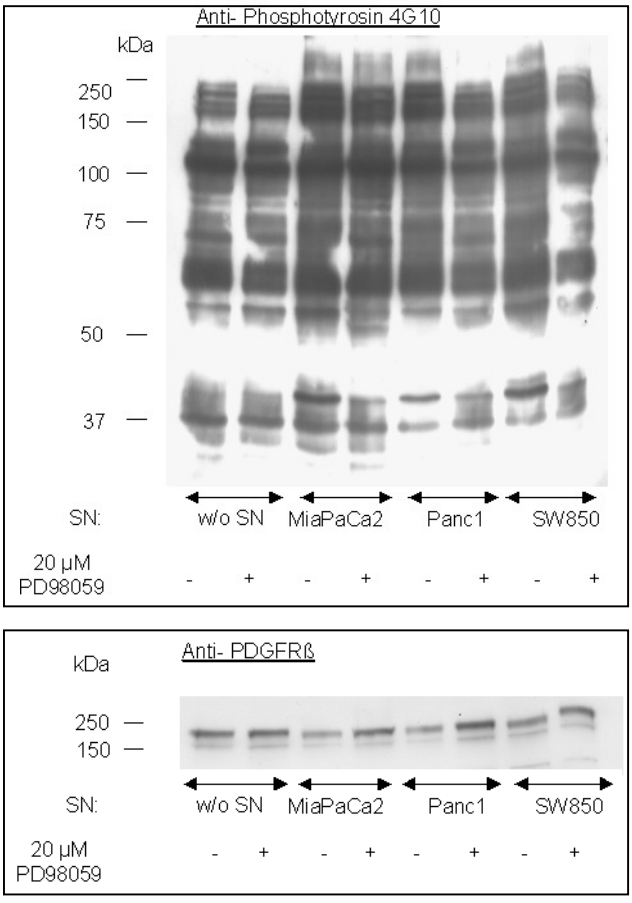



**Abb.43: Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch PD98059 (Inhibitor der Extracellular signal-regulated Kinase Erk).** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 10% konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 mit und ohne vorherige Inkubation (1 Stunde) der Sternzellen mit 20 µM PD98059 für 5 Minuten stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit dem Anti-Phosphtyrosin 4G10 und die gestrippte Membran, die mit Anti-PDGFRß (Platelet-derived growth factor (PDGF) Rezeptor) erneut inkubiert wurde. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

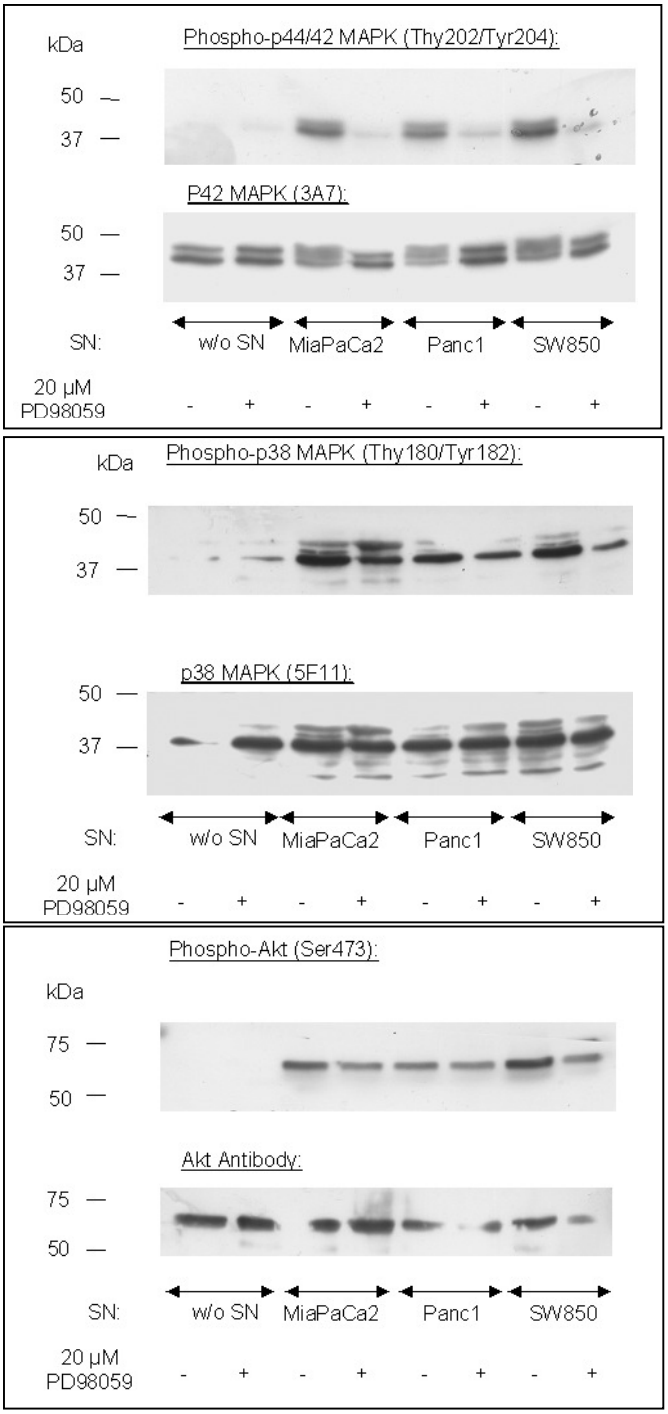



**Abb.44: Inhibition der Phosphorylierung von Erk (Extracellular regulated kinase), p38 und Akt durch PD98059 (Inhibitor der Extracellular signal-regulated Kinase Erk).** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 10% konditioniertem Tumorzellüberstand (SN) der Zelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 mit und ohne vorherige Inkubation (1 Stunde) der Sternzellen 20 µM PD98059 für 5 Minuten stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit den Antikörpern Phospho-p44/42-MAPK (Mitogen-activated protein kinase), Phospho-p38-MAPK und Phospho-Akt sowie jeweils darunter dargestellt, die gestrippten Membranen, die mit den Antikörpern p42-MAPK, p38-MAPK und Akt als Ladungskontrolle erneut inkubiert wurden. Die Position des Molekulargewichts ist auf der linken Seite markiert.

## 3.7 Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen durch PDGF-AB

PDGF-AB bindet an beide PDGF-Rezeptoren: α und ß. Um zu zeigen, dass der Wachstumsfaktor PDGF allein dieselben Auswirkungen auf die

Tyrosinphosphorylierung in PSCs hat wie der bisher verwendete konditionierte Tumorzellüberstand, in dem dieser Wachstumsfaktor für die gezeigten Effekte verantwortlich gemacht wurde, wurden Sternzellen mit 2,5 µg/ml PDGF-AB für 5 Minuten stimuliert und anschließend lysiert. Abb. 45 zeigt, dass der Western Blot mit dem Antikörper 4G10 dasselbe Bild hervorruft, wie unter Verwendung von Tumorzellüberstand. Ebenfalls wird durch PDGF-AB die Proteine PDGFRß, Erk, p38 und Akt im selben Ausmaß phosphoryliert.

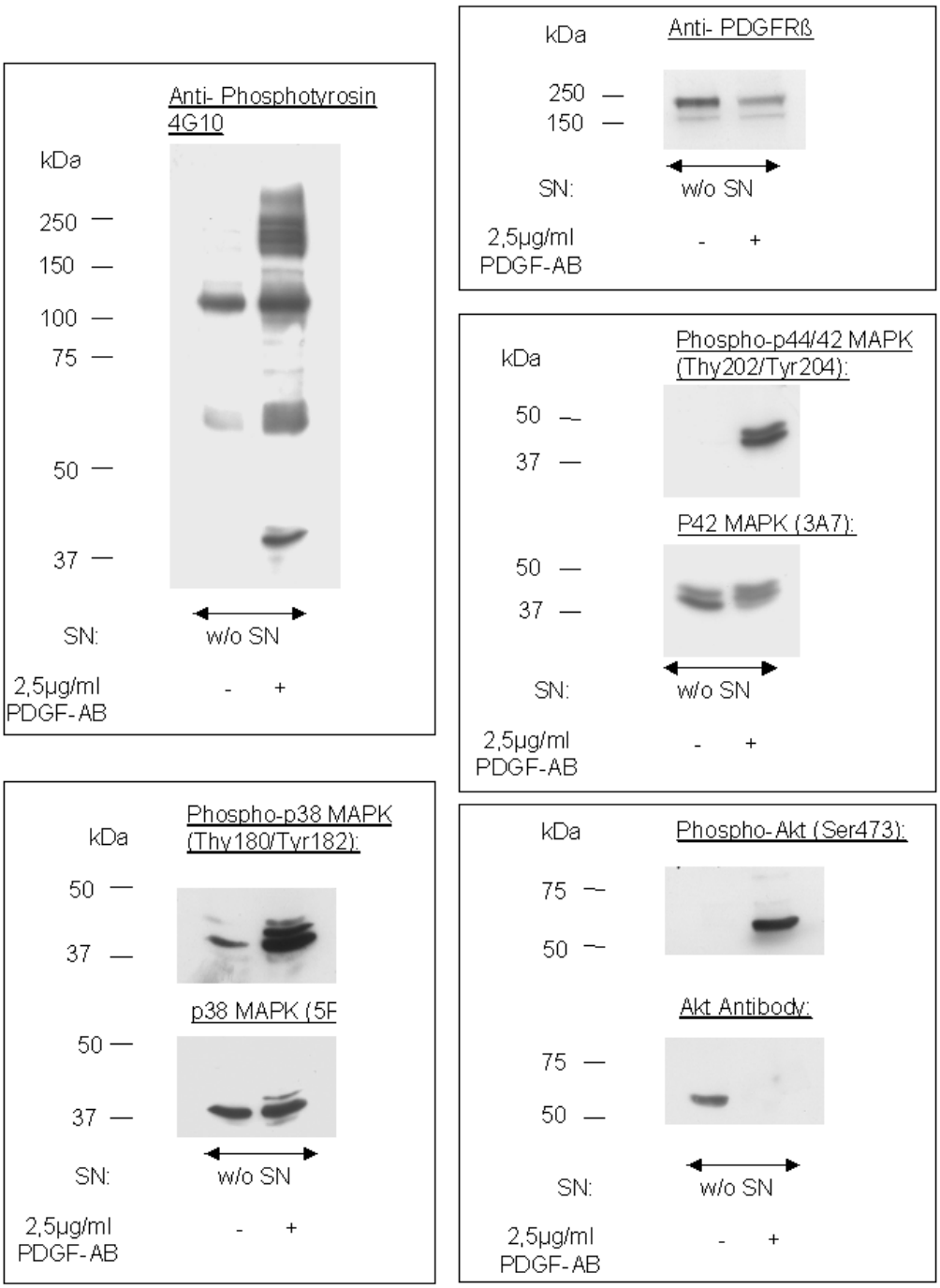



**Abb.45: Stimulation der Tyrosinphosphorylierung durch PDGF (Platelet-derived growth factor)-AB.** PSC (Pankreatische Sternzell)-Kulturen wurden mit 2,5 µg/ml PDGF-AB für 5 Minuten stimuliert. Dargestellt sind die Western Blots mit den Antikörpern 4G10, PDGFRβ, P-Erk, P-p38 und P-Akt sowie die jeweiligen Ladungskontrollen darunter. Die Position des Molekulargewichts ist jeweils auf der linken Seite markiert.

# 4. DISKUSSION

## 4.1. Die Pathogenese der Desmoplasie im Pankreaskarzinom

Die übermäßige Produktion von Bindegewebsmolekülen, welche die Extrazellulärmatrix bilden, trägt wesentlich an der pathologischen Entwicklung einiger Organsystemerkrankungen einschließlich Leber, Lunge, Nieren, Darm und Pankreas bei. Die hieraus resultierende Fibrose führt häufig zu einem fortschreitenden Verlust spezifischer Organfunktionen. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde die Fibrogenese von vielen Forschungsgruppen intensiv untersucht, wodurch wertvolle Erkenntnisse bezüglich der Bindegewebszunahme in diversen Organen gewonnen werden konnten. Seit einigen Jahren stellt hierbei jedoch die Pankreasfibrose eine Ausnahme dar: obwohl sie seit langer Zeit als ein zentrales pathologisches Charakteristikum sowohl der chronischen Pankreatitis als auch des Pankreaskarzinoms [26] bekannt ist, blieben ihre zellulären und molekularen Grundlagen über lange Zeit unklar. Dieser Zustand änderte sich mit der Identifikation eines myofibroblasten-ähnlichen Zelltyps im Pankreas mit naher Verwandtschaft zur hepatischen Sternzelle (ebenso bekannt als Ito-Zelle) [4, 10], welche die überwiegende Quelle der Extrazellulärmatrix in der fibrotischen Leber ist [30]. In der Zwischenzeit wurde zunehmend ersichtlich, dass die aktivierten Sternzellen des Pankreas die grundlegenden Effektorzellen der Fibrose sind. Allerdings bleiben die physiologischen Funktionen ihrer ruhenden Vorläuferzellen noch weitestgehend ungeklärt. Dabei ist zu erwähnen, dass PSCs nicht nur die Extrazellulärmatrix produzieren, sondern auch Matrix-abbauende Enzyme der Matrixmetalloproteinase (MMP)-Familie sowie deren Inhibitoren (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs). So konnte gezeigt werden, dass PSCs MMP-2, MMP-9 und MMP-13, sowie TIMP-1 und TIMP-2 sezernieren [68]. Daher ist es wahrscheinlich, dass PSCs an der Regulation des Matrixumsatzes im gesunden Pankreas beteiligt sind, und dass die Dysregulation dieses Prozesses ein wichtiger Faktor im fibrotisch geschädigten Pankreas darstellt [65]. Interessant am derzeitigen Forschungsstand der Sternzellen ist deren Zusammenhang mit undifferenzierten pankreatischen sternähnlichen-Zellen, die von Kruse et al. isoliert und kultiviert werden konnten und die Fähigkeit besitzen sich selbst spontan in Zellen aller 3 Keimblätter zu differenzieren.

Das Wissen über die Interaktionen zwischen PSCs und pankreatischen Tumorzellen steckt weiterhin noch in den Kinderschuhen. Neueste Befunde sprechen darauf hin, dass der PSC-Aktivierung eine aktive Rolle in der Tumorprogression zukommt. Es konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum und die Tumorprogression durch komplexe Wechselwirkungen zwischen Karzinomzellen und PSCs beschleunigt werden [9] und die wachsende Deposition von Bindegewebe durch parakrine Stimulation der PSCs durch Krebszellen hervorgerufen wird. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war also die Fokussierung auf (I) die Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Sternzellen im neoplastischen Pankreas, insbesondere die Möglichkeit der Chemotaxis der PSCs in Richtung Tumorzellen, (II) die für die PSC-Motilität verantwortlichen extrazellulären Mediatoren und (III) die durch diese Faktoren induzierte intrazelluläre Signalkaskade, um daraus Anknüpfungspunkte für die zukünftige Forschung zu erhalten und aktivierte PSCs als mögliches Ziel antifibrotischer Therapien zu sehen.

### 4.2. Die Kommunikation zwischen pankreatischen Sternzellen und Tumorzellen

Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, ob die desmoplastische Reaktion im Pankreaskarzinom primär oder sekundär ist und ob Tumorwachstum und Invasion gefördert oder unterdrückt werden. So ist die grundsätzliche Frage, ob die Desmoplasie den Tumor vor der Immunantwort des Körpers schützt oder ob sie eine Abwehrreaktion des Organismus darstellt. Jedoch gibt es Hinweise, dass die Stromareaktion förderlich für den Tumor ist [81].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese verfolgt und bestätigt, dass die ausgeprägte Desmoplasie im Pankreaskarzinom durch die Tumorzellen beeinflußt wird. Bisherige Forschungsarbeiten konnten noch nicht komplett klären, wie es zu dieser tumorbegleitenden überschießenden Stromareaktion kommt. In vivo Studien, in denen mit pankreatischem Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis oder Pankreaskarzinom gearbeitet wurde, sowie auch experimentelle Versuche mit pankreatischer Fibrose, konnten histologisch die ausgedehnte Anzahl an PSCs in den fibrotischen Arealen innerhalb der Drüse zeigen [25]. Somit kann von der bedeutungsvollen Rolle der PSCs als Haupteffektorzelle der Fibrose ausgegangen werden. Die Zunahme der PSCs im Pankreaskarzinom

könnte durch zwei Mechanismen bedingt sein: (I) die gesteigerte lokale Proliferation der PSCs und (II) die Rekrutierung von PSCs aus dem umliegenden Gewebe in die Tumorregion durch Chemotaxis. Die Fähigkeit der PSCs zu proliferieren nach Aktivierung durch Faktoren wie z. B. PDGF und proinflammatorische Zytokinen ist bereits ausführlich beschrieben [12, 31, 77]. Auch die weitere mögliche Erklärung für die Stromareaktion neben Proliferation und Migration, nämlich die gesteigerte Sekretion von Extrazellulärmatrixproteinen durch aktivierte PSCs, ist bereits bekannt [31, 91]. Jedoch ist das Potential der PSCs zur Migration, im Gegensatz zur gesicherten migratorischen Fähigkeit der HSCs [38, 57], noch nicht geklärt.

### 4.2.1. Fähigkeit pankreatischer Sternzellen zur Migration in der Zellkultur

Zunächst wurde die Fähigkeit zur Proliferation bzw. Migration pankreatischer Sternzellen in Abhängigkeit von konditioniertem Tumorzellüberstand der Tumorzelllinien MiaPaCa2, Panc1 und SW850 im Wound healing assay untersucht, bei dem die Random-Migration der Sternzellen in den zellfreien Raum quantifiziert wird. Dabei wurde festgestellt, dass bereits eine 25%ige Konzentration des Tumorzellüberstand die Migration deutlich steigert im Gegensatz zur unstimulierten Kontrollgruppe. Signifikante Ergebnisse können allerdings erst ab einer 50%igen Konzentration für alle verwendeten Konditionen vermerkt werden. Die Anzahl der PSCs in der anfänglich zellfreien Fläche stieg in Abhängigkeit der FCS-Konzentration von 0,1% bis 5% FCS im Medium. Der Grund hierfür liegt in der Anwesenheit von Nutritions- und Wachstumsfaktoren im fetalen Kälberserum, welche die Sternzellen ebenso zur Proliferation und Migration stimulieren könnten. Auffällig hierbei ist, dass die gezählte Zellzahl bei einer 10%igen FCS-Konzentration wieder abnimmt, was auf die, neben den stimulatorischen Faktoren im FCS ebenfalls enthaltenen inhibitorischen Substanzen zurückzuführen sein dürfte. In der statistischen Analyse wird deutlich, dass die Zunahme der PSCs zwischen der 50%igen und der 75%igen Tumorzellüberstandkonzentration weit geringer ausfällt oder sogar wieder abnimmt als die Zunahme in der Zellanzahl zwischen 25%- und 50%. Das Fehlen eines weiteren proportionalen Anstiegs der PSC-Dichte in Abhängigkeit eines zunehmenden Tumorzellgehalts im Überstand spiegelt die Sättigung von stimulierenden Wachstumsfaktorrezeptoren an der Zelloberfläche oder eine

maximale Stimulation der PSCs bereits bei der geringeren 50%igen Tumorzellüberstandkonzentration wieder.

Da im Wound healing assay nicht zwischen gerichteter Migration und Proliferation der Zellen in der zellfreien Fläche differenziert werden kann, sondern nur eine Zunahme der Anzahl der Zellen durch Stimulation mit konditioniertem Tumorzellüberstand der drei verwendeten Tumorzelllinien verzeichnet werden kann, wurde zur Darstellung der Chemotaxis eine andere Zellkultur-Methode angewandt. Hier wurde die chemotaktische Bewegung von Sternzellen in Richtung von Tumorzellüberstand im Agarosegel bzw. auf kultivierte Tumorzellen im mikroskopischen Foto festgehalten und in Diagrammen dargestellt. Die Fotos und Diagramme lassen einen eindeutigen Anstieg in Zahl und zurückgelegter Strecke der PSCs in Richtung des von den Tumorzellen erzeugten chemotaktischen Gradienten im Gegensatz zur unstimulierten Kontrollgruppe erkennen.

Nun stellte sich die Frage welche Substanzen die Tumorzellen sezernieren und welche sich deshalb auch im konditionierten Tumorzellüberstand befinden, die diese gerichtete Anziehung der PSCs auslösen. Zytokine, die die Aktivierung von PSCs stimulieren schließen PDGF, TGF-β, TNF-α, IL-1, IL-6 u. a. mit ein. Während TGF-β1 die Extrazellulärmatrixsynthese fördert, wird PDGF als das wirksamste Mitogen betrachtet und steigert außerdem die Fähigkeit zur Migration von PSCs [68]. Von PDGF ist bekannt, dass es auch in anderen Zelltypen als Mitogen und chemotaktischer Lockstoff agiert [57]. Kundra konnte zeigen, dass CHO-Zellen, die mit PDGFR-β Untereinheiten transfiziert wurden, in einer dosisabhängigen Weise in einer Boyden Chemotaxis Chamber auf einen PDGF-BB Gradienten migrieren [52]. Die Wahl der Isoform PDGF-BB für die folgenden Experimente beruht auf die Tatsache, dass PSCs den Rezeptor für diese Isoform auf ihrer Zelloberfläche exprimieren [31] und auf diese Unterform mit Proliferation reagieren [5]. Weiterhin konnte Ikeda et al. aufzeigen, dass PDGF-BB die Migration von HSCs hervorruft [38]. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die These verfolgt, dass PDGF für die von pankreatischen Tumorzellen ausgehende Chemotaxis der PSCs verantwortlich sein könnte. Dementsprechend wurde ein Antikörper gegen die Isoform PDGF-BB sowie AG1295, welches selektiv die Kinase des PDGF- Rezeptors inhibiert, verwendet,

um die in den vorausgegangen Versuchen hervorgerufene Migration zu hemmen. Es zeigte sich im Wound healing assay, sowie in den chemotaktischen Zellkultur-Versuchen eine signifikante Abnahme der gerichteten Migration durch die Hemmung des PDGFs. Die Inhibition der Migration durch Verwendung des Rezeptorkinase-Inhibitors fiel dabei in allen Konditionen stärker aus als durch Anti-PDGF-BB. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass durch die alleinige Blockierung des Wachstumsfaktors PDGF-BB, der für die Migration verantwortliche PDGF-β-Rezeptor ungehemmt bleibt und deswegen noch durch die anderen sezernierten Isoformen des PDGFs aktiviert werden kann. Apte et al. kam durch Verwendung einer Porenmembran ebenfalls zu dem Ergebnis, dass PDGF neben der Stimulation der Proliferation auch die PSC-Migration herbeiführt, und dass dieser Effekt vorwiegend chemotaktisch ist [67]. Dieselbe Forschungsgruppe beobachtete, dass für die PSC-Bewegung die Transformation der ruhenden Sternzellen in den aktivierten Phänotyp Voraussetzung ist. Aktiviert werden PSCs durch Stimulation durch Zytokine oder durch längere Kultivierung. Beide Reaktionen (Zellproliferation und -migration) werden durch die Bindung des PDGF an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche der PSCs vermittelt. Diesbezüglich wurde von mehreren Forschungsgruppen bereits die Gegenwart von PDGF-Rezeptoren auf kultivierten PSCs nachgewiesen [5, 77]. Bekannt ist bereits aus in vivo Studien, dass die vermehrte PDGF-Rezeptor-Expression sowie deren Verteilung in humaner als auch in experimentell erzeugter chronischer Pankreatitis in den Arealen der pankreatische Fibrose übereinstimmend ist mit der Lokalisation der PSCs [31, 15]. Dies weist darauf hin, dass durch einen schädigenden Einfluß auf das Pankreas das Ansprechen der Sternzellen auf PDGF erhöht ist. Für die in vivo Situation relevant ist außerdem die bekannte Hochregulierung des PDGF-Liganden selbst in den betroffenen Arealen des Pankreas [15, 24].

### 4.2.2. Intrazellulärer Signalwege in migrierenden Sternzellen

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass PSCs zur Migration fähig sind und dass diese durch PDGF in chemotaktischer Weise stimuliert bzw. durch Hemmung des PDGFs deutlich reduziert werden kann, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob durch die Blockierung diverser intrazellulärer Signalproteine die PSC-Migration inhibiert werden kann. Signalwege, die PDGF-abhängige Zellreaktionen wie

Migration und Proliferation vermitteln, wurden neuerdings in vaskulären glatten Muskelzellen und Meningeom-Zellen beschrieben [56, 44]. Es wurde gezeigt, dass die Bindung des PDGF an seinen Rezeptor zur Rezeptordimerisierung führt, die von der Aktivierung einer Tyrosinkinase und einer Rezeptorautophosphorylierung begleitet wird [17]. Die phosphorylierten Stellen des PDGF-Rezeptors agieren als hochaffinitive Bindungsstellen für Kinasen, die mit der Signaltransduktion in Verbindung stehen. Eines dieser bindenden Kinasen ist die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase). Nach Aktivierung phosphoryliert die PI3-Kinase Phosphatidylinositol und erzeugt so verschiedene Phosphoinositole, und endet schließlich in der Aktivierung von Akt [76]. Akt, eine Serin/Threonin- Proteinkinase, ist ein Kernbestandteil des PI3-Kinase-Signalwegs, und ist an antiapoptotischen Zellvorgängen beteiligt. Es gibt bereits Hinweise, dass Akt eine Rolle in der Vermittlung von anderen Zellfunktionen wie die Zellmigration spielt [80]. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Verwendung des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 eine erhebliche Reduzierung der Migration im Wound healing assay hervorgerufen werden. Dies spricht deutlich dafür, dass die PI3-Kinase Teil des Signalwegs ist, welcher die Migration von PSCs bewirkt. Studien mit Meningeom- und glatten Muskelzellen sowie HSCs als auch PSCs konnten bereits die tragende Rolle der PI3-Kinase in der Vermittlung der biologischen Funktionen des PDGFs belegen [44, 56, 57, 59]. McCarroll et al. zeigten, dass durch Hemmung der PI3-Kinase mit ihrem spezifischen Inhibitor Wortmannin, der basale sowie der durch PDGF hervorgerufene Anstieg der PSC-Migration verhindert werden kann [59]. Die beobachtete Hemmung der PDGF-vermittelten-Migration durch Wortmannin stimmt mit den Ergebnissen von Marra et al. sowie Reif et al. in HSCs überein [57, 70]. Eine weniger ausgeprägte aber dennoch auffällige Verminderung der durch Tumorzellüberstand ausgelösten PSC-Migration in den Wound healing-Versuchen ergab die Zugabe des MAP Kinase Kinase Inhibitors PD98059, welcher die Phosphorylierung der MAP Kinase Erk durch die MAP Kinase Kinase MEK hemmt. Ähnliche hemmende Wirkung auf die Migration hatte der Inhibitor der p38-MAP-Kinase SB203580 bei allen verwendeten Tumorzelllinien. Aktuelle Studien haben aufgezeigt, dass mitogen-activated protein kinases (MAPKs) entscheidende Rollen in der Zellmigration spielen. Dazu gehören p38, Erk und die Jun-N-terminus kinase (JNK). Bei der Migration von Neutrophilen zeigen Studien über p38, dass diese MAPK die Migration durch Phosphorylierung der Proteinkinase MAPKAP 2/3

reguliert [32]. An Endothelzellen der Aorta von Schweinen [58] sowie an glatten Muskelzellen [49] konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung von p38 erforderlich ist für die PDGF-induzierte Zellmigration und Aktin-Reorganisation. Erk beeinflußt die Zellbewegung durch Phosphorylierung der Proteinkinase „myosin light chain kinase“ (MLCK), Calpain oder FAK. Eine Vielfalt von extrazellulären Signalen ist in der Lage die Erk MAPKs über den Signalweg Ras-Raf1 - MEK1/2 - Erk1/2 zu aktivieren. Bei der Migration verschiedener Zelltypen ist Erk beteiligt [46]. Jnk dagegen ist dafür bekannt, dass es die Zellbewegung durch Phosphorylierung von Paxillin, DCX, Jun und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen beeinflusst und wird über die MAPKKK MEKK über die zwei MAPKK MKK4 und -7 phosphoryliert. Folglich scheinen die verschiedenen Kinasen der MAPK-Familie alle in der Lage zu sein, die Zellmigration zu steuern, allerdings durch verschiedene Mechanismen. Die koordinierte Abstimmung der Kinasen aufeinander und die Phosphorylierung von Paxillin, FAK, Calpain, DCX, MAPKAPK 2/3, MLCK u. a. ist also für die Dynamik der fokalen Adhäsion und der Reorganisation der Mikrotubuli und des filamentösen Aktins als Voraussetzung der gerichteten Migration erforderlich. Durch Inhibition der MAPKs p38 und Erk konnte in der vorliegenden Arbeit bereits deren Zusammenhang mit der Migration bestätigt werden. In neuesten Studien konnte gezeigt werden, dass die JNK-Aktivität für die PDGF-induzierte Chemotaxis von Fibroblasten notwendig ist und dass die Inhibition von Jnk die Phosphorylierung des „focal adhesion proteins“ Paxillin verringert [3] . Paxillin ist ein „focal adhesion adaptor“ Protein wie z. B. FAK. „Focal adhesion adaptor“ Proteine stellen funktionale Verbindungen zwischen der Extrazellulärmatrix und dem Aktinzytoskelett der Zelle dar, und spielen eine Rolle bei der Zellmigration, Proliferation und dem Zellüberleben [18]. Zellmigration ist ein komplexer Prozess, der vereinfacht in vier Abschnitte eingeteilt werden kann: (I) die Zelle streckt Vorstülpungen (Lamellipodien) in die Richtung der Bewegung aus, (II) die Lamellipodien heften sich an die Unterlage durch Bildung von fokalen Adhäsionen, (III) die kontraktile Wirkung des Aktinzytoskeletts bewegt den Zellkörper und (IV) die Rückfront der Zelle löst sich von der Oberfläche [3]. Diese Ereignisse erfordern die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts und den Umsatz von fokalen Adhäsionskomplexen.

Durch Anwendung der Immunfluoreszenzfärbung konnte eine Steigerung der Aktin „stress fibers“ in den PSCs bereits nach 5-minütiger Stimulation mit den drei verwendeten konditionierten Tumorzellüberständen verzeichnet werden, die auch noch nach 20 Minuten nachweisbar ist ( s. Abb. 28, 29, 30). Dieser Befund spricht für die Fähigkeit der im Tumorzellüberstand enthaltenen Mediatoren das Aktinzytoskelett zu aktivieren, was für die für Zellmigration Voraussetzung ist. Ebenso konnte die Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen durch die Immunfluoreszenz des „focal adhesion complex“ Proteins Paxillin nach Tumorzellüberstand-Stimulation nachgewiesen werden. Dies lässt sich mit den Studien von Amagasaki et al. in Einklang bringen, die besagen, dass das „focal adhesion complex“ Protein Paxillin an Ser178 Jnk- abhängig nach PDGF-BB-Stimulation phosphoryliert wird. Diese Forschungsgruppe nimmt aufgrund dieser Paxillinphosphorylierung durch PDGF an, dass Jnk direkt in der Lage ist auf diese Art die Ausbildung der fokalen Adhäsionen zu steuern und die Zellmigration zu beeinflussen [3]. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde außerdem die zunehmende Aktivierung wichtiger Signaltransduktionsproteine durch Tumorzellüberstand sichtbar gemacht. Dies zeigt sich durch die Darstellung des Anstiegs der tyrosinphoshorylierten Proteine während der Tumorzellüberstandstimulation durch Verwendung des Phosphotyrosin-Antikörpers 4G10. Die im konditionierten Tumorzellüberstand enthaltenen Wachstumsfaktoren und Zytokine sind also in der Lage intrazelluläre Proteine, wie z. B. PDGFRβ, PI3-Kinase und Akt, p38-, Erk- und Jnk-Kinase, an Tyrosin zu phosphorylieren und damit zu aktivieren.

### 4.2.3. Tyrosinphosphorylierung in Sternzellen im Western Blot

Die Aktivierung der Sternzellen durch Inkubation mit konditioniertem Tumorzellüberstand wurde auch mit dem Western Blot gezeigt. Diese Methode wurde gewählt, um die Signalwege, die die chemotaktische Antwort des PDGFRβ vermitteln, auf molekularer Ebene näher zu beschreiben. Zunächst konnte im Western Blot gezeigt werden, dass durch Stimulation von Sternzellen mit konditioniertem Tumorzellüberstand aller drei verwendeten Tumorzelllinien, eine Tyrosinphosphorylierung von einigen intrazellulären Proteinen stattfindet. Die Stimulationsdauer wurde dabei variiert, um Maxima und Minima der Aktivierung der einzelnen Proteine heraus zu filtern. Abb. 27 lässt deutlich erkennen, dass

bereits nach 5-minütiger Stimulation eine deutliche Phosphorylierung verschiedener Proteine nachweisbar ist, und dass diese Aktivierung für manche Proteine zeitabhängig ist, d. h. über die Zeitdauer von 45 Minuten eine Abnahme bzw. Zunahme widerfährt. Das vergleichbare Verteilungsmuster der Tyrosinphosphorylierung bei Inkubation mit Überstand von MiaPaCa2-, Panc1- sowie SW850-Zellen, lässt darauf schließen, dass die Aktivierung der Proteine vom intrazellulären Mechanismus innerhalb der Sternzelle abhängt und weniger von den die Sternzelle aktivierenden Tumorzellen. Um diese Proteine zu identifizieren wurden spezifische Antikörper gegen die aktivierte, phosphorylierte Form und gegen die ruhende, unphosphorylierte Form von PDGFRβ, Erk MAPK, p38 MAPK und Akt verwendet. Durch Verwendung des PDGFRβ-Antikörpers konnte die Tyrosinphosphorylierung bei einem Molekulargewicht von 190 kDa als PDGF-Rezeptor β nachgewiesen werden, was den bisher gewonnenen Ergebnissen entspricht, dass PDGF und die Aktivierung seines Rezeptors in der Zellkommunikation zwischen PSC und Tumorzelle involviert sind. Dass die MAPKs Erk und p38, sowie die Proteinkinase Akt, in einer bestimmten Zeitabhängigkeit in PSCs durch Tumorzellüberstand phosphoryliert werden, konnte ebenfalls eindeutig nachgewiesen werden.

Im Western Blot zeigte sich nach Blockierung des Wachstumsfaktors PDGF-BB mit dem Antikörper eine weniger ausgeprägte Tyrosinphosphorylierung als bei der unblockierten Kontrollstimulation, allerdings fiel die Aktivierung dennoch stärker aus als in der unstimulierten Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der detektierte PDGFβ-Rezeptor nicht nur die Untereinheit PDGF-BB sondern auch PDGF-AB binden und auch dadurch aktiviert werden kann. Wie erwartet war dagegen durch Verwendung des Inhibitors gegen die PDGFRβ-Kinase die Hemmung des Rezeptors trotz Tumorzellstimulation ausgeprägter. Durch Blockierung der Wirkung des PDGF-BB durch den Antikörper bzw. den Rezeptorinhibitor konnte auf der Western Blot Membran mit Hilfe des Antikörpers 4G10 die Hemmung der Tyrosinphosphorylierung nicht nur des PDGFRβ bei ca. 190 kDa ausgemacht werden, sondern es konnte auch eine Abschwächung der Phosphorylierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht bei ca. 125 kDa, 60 kDa und um 45 kDa verzeichnet werden. Nun stellt sich die Frage um welche Proteine es sich dabei handelt, die Teil des intrazellulären Signalwegs des

PDGFRβ sind und deswegen durch dessen Wirkungsblockierung ebenfalls in ihrer Aktivität unterdrückt werden. Durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierten Proteine konnten Phospho- Erk (p44/42), Phospho-p38 und Phospho-Akt auf der Membran identifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass diese im Signalweg dem PDGFβ-Rezeptor nachgeschaltet sind. Das abgeschwächte Signal um 125 kDa entspricht dem Molekulargewicht des „focal adhesion proteins“ FAK, welches in dieser Forschungsarbeit nicht sicher im Western Blot dargestellt werden konnte und deshalb nicht dargestellt ist. Auch hier fällt die Hemmung durch AG1295 stärker aus als durch anti-PDGF-BB. In der Ladungskontrolle erscheinen vorher starke Signale mancher phosphorylierter Proteine, bei Anwendung der Antikörper gegen das totale Protein im Vergleich dazu abgeschwächt, was ein in der Literatur bekanntes Phänomen ist.

Da bereits in den Zellkultur- Versuchen gezeigt wurde, dass die PI3-Kinase für die Chemotaxis von PSCs von Wichtigkeit zu sein scheint, und sie laut einiger Studien eine Rolle in der PDGF-stimulierten Zellmigration spielt [3], wurde mit Hilfe des Western Blots ihr nachgeschaltete intrazelluläre Proteine nachgewiesen. Dazu wurden die PSCs vor Stimulation mit Tumorzellüberstand mit dem spezifischen PI3-Kinase- Inhibitor LY294002 inkubiert. Im folgenden Western Blot ergab sich eine Abschwächung verschiedener Signale durch die PI3-Kinase-Blockierung im Vergleich zur unblockierten Stimulation bei Molekulargewichten um 60kDa und 45 kDa, was wieder den Proteinen Akt mit 60 kDa, p38 MAPK mit 43 kDa und Erk MAPK, das mit 42 kDa und 44 kDa typischerweise zweibandig erscheint, entsprechen könnte. Allerdings scheint auch das Signal bei 190 kDa, dem Molekulargewicht des PDGFRβ, leicht verringert, was für eine mögliche Abhängigkeit bzw. Rückkopplung zwischen PDGFβ-Rezeptor und nachgeschalteter PI3-Kinase sprechen könnte. Schließlich wurde in einem weiteren Versuch noch die Erk-MAPK vor Tumorzellstimulation mit dem spezifischen Kinase-Inhbitor PD98059 blockiert. Auch hier wurden wie in den vorangegangenen Versuchen die Membranen mit den Antikörpern gegen PDGFRβ, Erk, p38 und Akt inkubiert. Wie zu erwarten, erfolgte die komplette Auslöschung des Signals von Erk, wohingegen die Hemmung der Erk-Proteinkinase keine Auswirkung auf die Phosphorylierung der anderen untersuchten Proteine hatte.

Letztendlich wurde im Western Blot gezeigt, dass durch Zugabe des Wachstumsfaktors PDGF-AB mehrere Proteine innerhalb der PSCs phosphoryliert werden. Durch Reinkubation der Membranen konnten diese wieder als PDGFRβ, p38 MAPK, Erk MAPK und Akt identifiziert werden. Die untersuchten Proteinkinasen lassen sich also durch Tumorzellüberstand und PDGF-AB in gleicher Weise aktivieren.

### 4.2.4. PDGF als chemotaktischer Lockstoff für Sternzellen

Für den PDGF-Rezeptor gibt es mindestens zwei nachgeschaltete bedeutende Signalwege: Den PI3-Kinase- und den MAP-Kinase-Signalweg [17]. Taylor et al. berichteten von Thekazellen des Schweins, dass die Inkubation mit PDGF zu einer schnellen (10 Minuten) und anhaltenden (über 48 Stunden) Zunahme der PI3-Kinase-Aktivität führt, welche durch das Erscheinen des Akt-Signals im Western Blot sichtbar gemacht wurde, und durch Wortmannin unterdrückt werden konnte [84]. Jaster et al. wiesen 2002 die PDGF-induzierte Erk 1/2-Aktivität nach und dessen Einfluss auf die Proliferation in PSCs [41]. In hepatischen Sternzellen ist der Zusammenhang, dass die PI3-Kinase zur Aktivierung des Erk-Signalwegs beiträgt bereits bekannt, sowie dass die Aktivierung des PI3-Kinase- als auch des Erk-Signalwegs notwendige Vorraussetzung für die PDGF-induzierte Proliferation und Migration ist [57, 27]. In der Studie von Marra et al. 1997 [57] hemmte der spezifische Inhibitor der PI3-Kinase Wortmannin in HSCs die PDGF-induzierte Chemotaxis trotz Inkubation mit PDGF. Außer in HSCs konnte der Zusammenhang zwischen Erk1/2-MAPK und PI3-Kinase auch in Swiss 3T3 Zellen nachgewiesen werden [23]. Diese Verbindung der beiden Signalwege konnte in dieser Arbeit durch die Inhibition von Erk1/2 mit LY294002 im Western Blot ebenfalls gezeigt werden. Auch Apte et al. konnten 2004 in PSCs nachweisen, dass PDGF nach 5minütiger Inkubation eine PI3-Kinase-Aktivierung auslöst, und dass auch hier Wortmannin die PDGF- und PI3-Kinase- induzierte Akt-Aktivität hemmt, und sich ebenfalls eine Abnahme im Erk1/2-Signal ergibt [6]. Daraus kann man schließen, dass die Erk1/2 MAPK der PI3- Kinase nachgeschaltet ist, da Wortmannin das Erk1/2- Signal teilweise unterdrückt, aber nicht die Erk- Aktivität selbst, da diese noch durch andere, der Erk1/2- Kinase auf einem anderen Signalweg vorgeschaltete Substrate, auslösbar ist und Erk damit phosphorylierbar bleibt. In Fibroblasten wurden die MAP-Kinasen Erk und p38 maximal 2 – 5

Minuten nach PDGF-BB-Stimulation aktiviert [3]. In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob die MAPK-p38 ebenfalls an der tumorzellinduzierten Chemotaxis beteiligt ist und ob durch PDGF-Blockade und Inhibition der PI3-Kinase die MAPK-p38 in ihrer Aktivität reduziert wird. Dass PDGF in der Lage ist p38 MAPK zu phosphorylieren, konnte in mehreren Zelltypen bereits nachgewiesen werden. Die Rolle der aktivierten p38 MAPK ist zelltypabhängig: in vaskulären glatten Muskelzellen von Ratten induziert PDGF p38 MAPK – vermittelt das Zellwachstum [90], in Endothelzellen von Schweinen bewirkt die Aktivierung der p38 MAPK die PDGF-induzierte Zellmigration und Aktinreorganisation [58]. Masamune et al. zeigten, dass p38 MAPK eine Rolle im Aktivierungsprozess von PSCs spielt, da SB203580 die PSC-Aktivierung durch Hemmung der p38 MAPK unterdrückt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Reeves et al. an HSCs [69].

Es gibt Hinweise dafür, dass MAPKs eine zentrale Rolle in der Zellmigration spielen. In der vorliegenden Studie wurde die Aktivität und der Einfluss der JNK-Kinase auf die Zellmotilität und Chemotaxis nicht überprüft, allerdings reduziert JNK die Migration in mehreren Zelltypen und reguliert die Zellbewegung über die Phosphorylierung von Paxillin. Die Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen wurde in der vorliegenden Studie mittels Immunfluoreszenzmikroskopie von Paxillin nachgewiesen.

Die grundsätzliche Frage, ob die desmoplastische Reaktion die Tumorprogression fördert oder eher inhibiert, ist derzeit noch nicht eindeutig zu beantworten. Apte et al. gehen aufgrund zahlreicher Studien davon aus, dass PSCs für die überschießende Bindegewebsreaktion verantwortlich sind und dass deren Funktion von Tumorzellen beeinflusst wird [6]. Bachem et al. injizierten Nacktmäusen subkutan Tumorzellen und PSCs und induzierten so schnell wachsende fibrotische Tumoren, was ebenfalls für die parakrine Stimulation der PSCs durch die Karzinomzellen spricht [11]. Friess et al. dagegen propagiert die Gegenthese, dass die desmoplastische Reaktion einen Nachteil für das Karzinom darstellt, da die Expression des „Connective tissue growth factor“ (CTGF) in Bindegewebszellen höher als in Tumorzellen ist und sie herausfanden, dass Patienten mit höheren CTGF-Werten eine bessere Prognose haben [33].

### 4.3 Neue Therapieoptionen beim duktalen Pankreasadenokarzinom

Die Wirksamkeit von Substanzen, welche Mitogene blockieren oder die Synthese der extrazellulären Matrix reduzieren, sollte weiter untersucht werden. Weiterhin sollten Schlüsselmediatoren, welche die PSC-Proliferation, Motilität und Matrixsynthese reduzieren, identifiziert werden. Ein Fortschritt in der Behandlung der Pankreasfibrose könnten Signalproteine wie z. B. PPAR-Gamma, MAP-Kinasen, PI3-Kinase oder SMAD-Proteine darstellen. „Peroxisome proliferator-activated receptor gamma“ (PPAR-γ) hemmt die Aktivierung der hepatischen und pankreatischen Sternzellen [40]. SMAD7 ist ein negativer Regulator des TGF-β-Signalwegs, von dem bisher beschrieben wurde, dass er in HSCs als transkriptionaler Inhibitor der Aktivierung fungiert [22].

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass die weitere wissenschaftliche Bearbeitung der Ursachen der Pankreasfibrose und die Entwicklung antifibrotischer Therapieoptionen dringend erforderlich ist, zumal die derzeit zur Verfügung stehenden Therapiealternativen beim Pankreaskarzinom sehr dürftig sind. Da beim Pankreaskarzinom die vermehrte Synthese und Sekretion der fibrillären extrazellulären Matrix durch aktivierte PSCs sowie deren stimulierte Proliferation und Rekrutierung aus umliegendem Gewebe von Bedeutung ist, war es wichtig, den für die PSC-Motilität und Chemotaxis verantwortlichen Faktor, nämlich PDGF, zu identifizieren und Möglichkeiten zu eruieren, die PDGF-induzierte Vermehrung der PSCs im Bereich des Pankreaskarzinoms zu verhindern. In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass anti-PDGF-BB, die Blockade des PDGF-Rezeptors, sowie die Inhibition verschiedener Proteinkinasen, die am PDGF-induzierten Signalweg beteiligt sind, die PSC-Motilität reduziert. Ausgehend von diesen Befunden könnte eine Blockade des PDGF die tumorassoziierte Fibrosierung und damit auch die Tumorprogression reduzieren. Diese neuen therapeutischen Ansätze sollten durch *in vivo* Studien weiter evaluiert werden.

# 5. ZUSAMMENFASSUNG

Erst in den letzten Jahren wurden pankreatische Sternzellen (PSC) als verantwortliche Zellen für die tumorassoziierte Matrixsynthese (Tumordesmoplasie) identifiziert. Durch Zellkulturexperimente wurde weiterhin gezeigt, dass Tumorzellen sowohl die Proliferation, als auch die Matrixsynthese von PSCs stimulieren. Immunhistologische Untersuchungen belegen, dass die Zahl der PSCs in enger Nachbarschaft zu Tumorzellen zunimmt. Die Zunahme der PSCs im Bereich des Pankreaskarzinoms dürfte bedingt sein durch eine stimulierte Proliferation, könnte aber auch zusätzlich bedingt sein durch eine verstärkte Migration aus dem umliegenden Gewebe in Richtung Karzinom.
In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Pankreas-Adenokarzinom-Zellen die Motilität von PSCs stimulieren und die Migration von PSCs in Richtung Tumor fördern. Im Einzelnen sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Produzieren Pankreastumorzellen lösliche Mediatoren, welche die Migration von PSCs stimulieren?
2. Setzen Tumorzellen chemotaktisch wirkende Faktoren frei und induzieren somit eine gerichtete Migration der PSCs in Richtung Tumorzelle?

Falls die Migration und Chemotaxis bei PSCs stimuliert wird, sollte der von den Tumorzellen produzierte verantwortliche Faktor identifiziert und die durch diesen Faktor induzierte Signalkaskade charakterisiert werden.

Kultivierte humane PSCs der Passagen 3 – 8 (aktivierte PSCs) wurden im „Wound Healing Assay“ mit konditionierten Zellkulturüberständen der Pankreastumorzelllinien MiaPaCa-2, Panc-1 und SW850 inkubiert und die Random-Motilität der PSCs quantifiziert. Die gerichtete Migration der PSCs wurde untersucht, indem a) ein Agarosegel mit Tumorzellüberstand auf eine Seite eines Kulturwells gefüllt wurde und b) Co-Kulturexperimente mit PSCs und Tumorzelllinien durchgeführt wurden.
Ergebnisse: Tumorzellüberstand stimuliert sowohl die ungerichtete als auch die gerichtete Migration von kultivierten PSCs. Durch neutralisierende Antikörper und einen Inhibitor der Rezeptorkinase konnte der Platelet derived growth factor-BB

(PDGF-BB) als der für die Chemotaxis verantwortliche Faktor identifiziert werden. Zugabe von Tumorzellüberstand führte zu einer schnellen Phosphorylierung der Phosphatidylinositol-3- (PI-3-) Kinase, p38 Mitogen-activated protein kinase- (MAPK-) Kinase und Extracellular signal-regulated (Erk) 1/2 MAPK. Durch Zugabe von Inhibitoren des PDGF-β-Rezeptors, der PI3-Kinase und der Erk MAPK konnte gezeigt werden, dass die Signalproteine Akt, p38 MAPK und Erk MAPK am Signaltransduktionsweg des PDGFs beteiligt sind und bei der PDGF-stimulierten Motilität der PSCs involviert sind. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde letztlich gezeigt, dass die Zugabe von Tumorzellüberstand zu kultivierten PSCs zu einer Aktin-Polymerisierung und zur Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen (Paxillin) führt. Die Ausbildung der fokalen Adhäsionskomplexe und die Aktin-Polymerisierung scheinen für die Zellmigration essentiell zu sein.

Die vorliegenden Ergebnisse dokumentieren, dass Tumorzellen chemotaktische Faktoren (PDGF) freisetzen und hierdurch pankreatische Sternzellen aus dem umliegenden Gewebe rekrutieren. Die PDGF-induzierte Zellmotilität geht einher mit einer Phosphorylierung von PI3K Akt und den MAP-Kinasen p38 und Erk. Da PDGF nicht nur die Zellmigration sondern auch die Proliferation der PSCs stimuliert, könnte durch PDGF-Blockade die Tumor assoziierte desmoplastische Reaktion verringert werden.

# 6. LITERATURVERZEICHNIS


1. Adamek HE, Albert J, Breer H, Weitz M, Schilling D, Riemann JF: Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. Lancet 356: 190-193 (2000)

2. Ahlgren JD: Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. Semin Oncol 23: 241-250 (1996)

3. Amagasaki K, Kaneto H, Heldin CH, Lennartsson J: c- Jun N- terminal kinase is necessary for platelet- derived growth factor- mediated chemotaxis in primary fibroblasts. J Biol Chem 281: 22173-22179 (2006)

4. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS: Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 43: 128-133 (1998)

5. Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS: Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. Gut 44: 534-541 (1999)

6. Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS: Desmoplastic Reaction in Pancreatic Cancer – Role of Pancreatic Stellate Cells. Pancreas 29: 179-187 (2004)

7. Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC Naidoo D, Wilson JS: Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. Gastroenterology 118: 780-794 (2000)

8. ApteMV, Wilson JS: Mechanism of pancratic fibrosis. Dig Dis 22 (3): 273-279 (2004)

9. Bachem MG, Fundel M, Zhou S, Diaz F, Buchholz M, Siech M, Schneiderhan W, Adler G: Functional interactions between carcinoma cells and stellate cells accelerate pancreas cancer progression. [abstract] Pancreas 27: 370 (2003)

10. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G: Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. Gastroenterology 115: 421-432 (1998)

11. Bachem MG, Schünemann M, Zhou S, Schneiderhan W, Buck A, Siech M, Beger H, Gress T, Buchholz M, Adler G: Fibrosis associated with pancreatic cancer is the result of paracrine stimulation of stellate cells by carcinoma cells. [abstract] Pancreas 27: 370 (2003)

12. Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid- Kotsas A, Adler G: Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. Gastroenterology 128: 907-921 (2005)

13. Bagorda A, Mihaylov VA, Parent CA: Chemotaxis: moving forward and holding on to the past. Thromb Maemost 95: 12-21 (2006)

14. Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K, Ellenrieder V, Schneiderhan W, Siech M, Adler G, Bachem MG, Gress TM: Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ- specific variations of a common transcroptional phenotype. J Mol Med 83: 795-805 (2005)

15. Casini A, Galli A, Pignalosa P: Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co- localizes with lipid peroxidation- derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. J Pathol 192: 81-89 (2000)

16. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN: AKT/PKB and other D3 phosphoinositide- regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. Annu Rev Biochem 68: 965-1014 (1999)

17. Claesson-Welsh L: Platelet- derived growth factor receptor signals. J Biol Chem 269: 32023-32026 (1994)

18. Clarke DM, Brown MC, LaLonde DP, Turner CE: Phosphorylation of actopaxin regulates cell spreading and migration. J Cell Biol 166: 901-912 (2004)

19. Curran, Crocker: Atlas der Histopathologie. 5. Auflage, Springer Verlag: S. 117 (2001)

20. Devesa S, Blot W, Stone B: Recent cancer trends in the United states. J Natl Cancer Inst 87: 175-182 (1995)

21. Devreotes P, Zigmond S: Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. Annu Rev Cell Biol 4: 649-686 (1988)

22. Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM: Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. Gastroenterology 125: 178-191 (2003)

23. Duckworth BC, Cantley LC: Conditional inhibition of the mitogen- activated protein kinase cascade by wortmannin. Dependence on signal strenght. J Biol Chem 272: 27665-27670 (1997)

24. Ebert M, Kaspar HU, Hernberg S, Friess H, Büchler MW, Roessner A, Korc M, Malfertheiner P: Overexpression of platelet- derived growth factor

(PDGF) B chain and type β PDGF receptor in human chronic pankreatitis. Dig Dis Sci 43: 567-574 (1998)

25. Emmrich J, Weber I, Sparmann GH: Activation of pancreatic stellate cells in experimental chronic pancreatitis in rats. [abstract] Gastroenterology 118: 166 (2000)

26. Etemad B, Whitcomb DC: Chronic pancreatitis: diagnosis, classification and new genetic developments. Gastroenterology 120: 682-707 (2001)

27. Friedman SL: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem 275: 2247-2250 (2000)

28. Gold EB, Goldin SB: Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. Surg Oncol Clin N Am 7: 67-91 (1998)

29. Greenlee R, Hill- Harmon MB, Murray T, Thun M: Cancer statistics. Cancer J Clin 51: 15-36 (2001)

30. Gressner AM, Bachem MG: Molecular mechanism of Liver fibrogenesis – a homage to the role of activated fat- storing cells. Digestion 56: 335-346 (1995)

31. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS: Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. Am J Pathol 155: 1087-1095 (1999)

32. Hannigan MO, Zhan LJ, Ai YX, Kotlyarov A, Gaestel M, Huang CK: Abnormal migration phenotype of mitogen- activated protein kinase-activated protein kinase 2(-/-) neutrophils in Zigmond chambers containing formyl- methionyl- leucyl- phenylalanine gradients. J Immunol 167: 3953-3961 (2001)

33. Hartel M, DiMola FF, Gardini A, Zimmermann A, DiSebastiano P, Guweidhi A, Innocenti P, Giese T, Giese N, Buchler MW, Friess H: Desmoplastic reaction influences cancer growth behavior. World J Surg 28: 818-825 (2004)

34. Heldin CH, Östman A, Rönnstrand L: Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. Biochem Biophys Acta 1378: 79-113 (1998)

35. Heldin CH, Westermark B: Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiol Rev 79: 1283-1316 (1999)

36. Hubbard SR, Mohammadi M, Schlessinger J: Autoregulatory mechanism in protein- tyrosine kinases. J Biol Chem 273: 11987-11990 (1998)

37. Hunter T: The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353: 583-605 (1998)

38. Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ: In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. Hepatology 29: 1760-1767 (1999)

39. Ikejiri N: The vitamin A- storing cells in the human and rat pancreas. Kurume Med J 37: 67-81 (1990)

40. Jaster R, Lichte P, Fitzner B, Brock P, Glass Ä, Karopka T, Gierl L, Koczan D, Thiesen HJ, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S: Peroxisome proliferator-activated receptor γ overexpression inhibits pro- fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. J Cell Mol Med 9: 670-682 (2005)

41. Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S: Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. Gut 51: 579-584 (2002)

42. Jiang G, Hunter T: Receptor activation: when a dimer is not enough. Curr Biol 9: R568-R571 (1999)

43. Jiménez C, Portela RA, Mellado M, Rodríguez-Frade, Collard J, Serrano A, Martínez-A C, Avila J, Carrera AC: Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. J Cell Biol 151: 249-261 (2000)

44. Johnson MD, Okedli E, Woodard A, Toms SA, Allen GS: Evidence for phosphatidylinositol 3- kinase- Akt- p7S6K pathway activation and transduction of mitogenic signals by platelet- derived growth factor in meningioma cells. J Neurosurg 97: 668-675 (2002)

45. Kimura W, Kuroda A, Makuuchi M: Problems in the diagnosis and treatment of a so- called mucin- producing tumor of the pancreas. Pancreas 16: 363-369 (1998)

46. Klemke RL, Cai SC, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresh DA: Regulation of cell motility by mitogen- activated protein kinase. J Cell Biol 137: 481-492 (1997)

47. Klonowski- Stumpe H, Fischer R, Reinehr R, Lüthen R, Häussinger D: Apoptosis in activated rat pancreatic stellate cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283: G819-826 (2002)

48. Kloppel G, Luttges J: WHO- classification 2000: Exocrine pancreatic tumors. Verh Dtsch Ges Pathol 85: 219-228 (2001)

49. Kotylarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez JB, Pitman D, Lin LL, Gaestel M: Distinct cellular functions of MK2. Mol Cell Biol 22: 4827-4835 (2002)

50. Kuna A, Yamada T, Masuda K, Ogawa K, Sogawa M, Nakamura S, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Shirai T, Itoh M: Angiotensin-

converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. Gastroenterology 124: 1010-1019 (2003)

51. Kundra V, Anand- Apte B, Feig L, Zetter BR: The chemotactic response to PDGF-BB: Evidence of a role for ras. J Cell Biol 130: 725-731 (1995)

52. Kundra V, Escobedo JA, Kazlauskas A, Kun Kim K, Goo Rhee S, williams L, Zetter B: Regulation of chemotaxis by the platelet- derived growth factor receptor- β. Nature 367: 474-476 (1994)

53. Löhr M, Trautmann B, Göttler M, Peters S, Zauner I, Maillet B, Klöppel G: Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins. Br J Cancer 69: 144.151 (1994)

54. Longnecker DS: Pathology and Pathogenesis of Diseases of the Pancreas. Am J Pathol 107: 103-121 (1982)

55. Lu G, Shimizu I, Cui X, Itonaga M, Tamaki K, Fukuno H, Inoue H, Honda H, Ito S: Interferon- alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells. J Med Invest 49: 172-181 (2002)

56. Lundberg MS, Curto KA, Bilato C, Monticone RE, Crow MT: Regulation of vascular smooth muscle migration by mitogen- activated protein kinase and calcium/calmodulin- dependent protein kinase II signaling pathways. J Mol Cell Cardiol 30: 2377-2389 (1998)

57. Marra F, Gentilini A, Pinzani M, Choudhury GG, Parola M, Herbst H, Dianzani M, Laffi G, Abboud H, Gentilini P: Phosphatidylinositol 3- Kinase is required for platelet- derived growth factor's actions on hepatic stellate cells. Gastroenterology 112: 1297-1306 (1997)

58. Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, Takemoto M, Ueno S, Saito Y, Mori S: Platelet- derived growth factor activates p38 mitogen. Activated protein

kinase through a Ras- dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. J Biol Chem 274: 13954-13960 (1999)

59. McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV: Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3- kinase) pathway. Biochem Pharmacol 67: 1215-1225 (2004)

60. Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, Apte M: Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. Gut 50: 535-541 (2002)

61. Murr MM, Starr MG, Oishi AJ, van Heerden JA,: Pancreatic cancer. Ca Cancer J Clin 44: 304-318 (1994) aus: Gress T, Müller- Pillasch F, Lerch M, Friess H, Büchler M, Adler G: Expression and in- situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. Int J Cancer 62: 407-413 (1995)

62. Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M: Candesartan, an angiotensin II receptor antagonist, suppresses pancreatic inflammation and fibrosis in rats. J Pharmacol Exp Ther 307: 17-23 (2003)

63. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez- Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Büchler MW: Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. Lancet 358: 1576-1585 (2001)

64. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1997. Ca Cancer J Clin 47: 5-27 (1997)

65. Patel M, Fine DR: Fibrogenesis in the pancreas after acinar cell injury. Scand J Surg 94: 108-111 (2005)

66. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb MH: Mitogen- activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. Endocrine Rev 22: 153-183 (2001)

67. Philipps PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV: Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. Gut 52 : 275-282 (2003)

68. Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, Doherty E, McCarroll JA, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV: Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. Gut 52: 677-682 (2003)

69. Reeves HL, Dack CL, Peak M, Burt AD, Day CP : Stress- activated protein kinases in the activation of rat hepatic stellate cells in culture. J Hepatol 32: 465-472 (2000)

70. Reif S, Lang A, Linduist Jn, Yata Y, Gabele E, Scanga A, Brenner DA, Rippe RA: The role of focal adhesion kinase- phoshatidylinositol 3- kinase-Akt signaling pathway in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression. J Biol Chem 278 : 8083-8090 (2003)

71. Reinehr R, Zoller S, Klonoski – Stumpe H, Kordes C, Häussinger D: Effects of Angiotensin II on rat pancreatic stellate cells. Pancreas 28 : 129-137 (2004)

72. Ridwelski K, Meyer F, Ebert M, Malfertheiner P, Lippert H: Prognostic parameters determining survival in pancreatic carcinoma and, in particular, after palliative treatment. Dig Dis 19: 85-92 (2001)

73. Ronnstrand L, Heldin CH: Mechanisms of platelet- derived growth factor-induced chemotaxis. Int J Cancer 91: 757-762 (2001)

74. Saile B, Eisenbach C, El- Armouche H, Neubauer K, Ramadori G: Antiapoptotic effect of interferon- alpha on hepatic stellate cells (HSC): a

novel pathway of IFN- alpha signal transduction via Janus kinase 2 (JAK2) and caspase-8. Eur J Cell Biol 82: 31-41 (2003)

75. Saotome T, Inoue H, Fujiyama Y, Bamba T: Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast- like cells derived from human pancreatic acini. Pancreas 14: 373-382 (1997)

76. Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 103: 211-225 (2000)

77. Schneider E, Schmid- Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grünert A, Bachem MG: Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. Am J Physiol Cell Physiol 281: C532-543 (2001)

78. Schuppan D, Koda M, Bauer M, Hahn EG: Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? Acta Gastroenterol Belg 63: 366-370 (2000)

79. Seifert RA, Hart CE, Phillips PE, Forstrom JW, Ross R, Murray MJ, Bowen-Pope DF: two different subunits associate to create isoform- specific platelet- derived growth factor receptors. J Biol Chem 264: 8771-8778 (1989)

80. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR: Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. Science 287: 1037-1040 (2000)

81. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, Chilvers ER, Dransfield I, Donnelly SC, Strieter R, Haslett C: Extracellular matrix proteins protect small cell lunger cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. Nat Med 5: 662-668 (1999)

82. Shen H, Zhang M, Minuk GY, Gong Y: Different effects of rat interferon alpha, beta and gamma on rat hepatic stellate cell proliferation and activation. BMC Cell Biol 3: 9 (2002)

83. Tang RF, Itakura J, Aikawa T, Matsuda K, Fujii H, Korc M, Matsumoto Y: Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF- C in human pancreatic cancer. Pancreas 22: 285-292 (2001)

84. Taylor CC: Platelet- derived growth factor activates porcine thecal cdell phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/PKB and Ras-extracellular signal-regulated- 1/2 kinase signaling pathways via the platelet- derived growth factor- beta receptor. Endocrinology 141: 1545-1553 (2000)

85. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD: Phosphoinositide 3- kinases: a conserved family of signal transducers. Trends Biochem Sci 22: 267-272 (1997)

86. Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y: Morphological studies on a vitamin A- storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. Okajimas Folia Anat Jpn 58: 837-858 (1982)

87. Whitcomb DC: Inflammation and cancer. V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287: G315-G319 (2004)

88. Wilson JS, Apte MV: Role ofalcohol metabolism in alcohol pancreatitis. Pancreas 27: 311- 315 (2003)

89. Wynder E: An epidemiological evaluation of the causes of cancer of the pancreas. Cancer Res 35: 2228-2233 (1975)

90. Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, Susa S, Ohnuma H, Tominaga M, Daimon M, Kato T: Platelet- derived growth factor BB- induced p38

mitogen- activated protein kinase activation causes cell growth, but not apoptosis, in vascular smooth muscle cells. Endocr J 48: 433-442 (2001)

91. Yen TW, Aardal Np, Bronner MP, Thorning DR, Savard CE, Lee SP, Bell RH: Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. Surgery 131: 129-134 (2002)

92. Yoshida S, Yokota T, Ujiki M, Ding XZ, Pelham C, Adrian TE, Talamonti MS, Bell RH, Denham W: Pancreatic cancer stimulates pancreatic stellate cell proliferation and TIMP-1 production through MAP kinase pathway. Biochem Biophys Res Commun 323: 1241-1245 (2004)

93. Zimny M: Diagnostic imaging of pancreatic cancer – the role of PET. Front Radiat Ther Oncol 38: 67-75 (2004)

# DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. M. G. Bachem für die Bereitstellung des interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit.

Frau Dr. S. Zhou gilt mein Dank für die geduldigen theoretischen und praktischen Ratschläge.

Frau M. Adam- Jäger, Frau M. deGroot und Frau G. Sailer möchte ich für die herzliche Aufnahme und die freundliche praktische Hilfestellung danken.

Meiner Familie danke ich für die selbstverständliche Unterstützung und Ermöglichung meines Studiums und dieser Arbeit.