

Aus der Klinik für Innere Medizin I
(Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Isolierung, Kultur und Charakterisierung fibroblastärer Zellen
des menschlichen Pankreas**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Christian Timke
aus Leonberg

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Reiner Siebert

Tag der mündlichen Prüfung: 5. August 2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 2. Juni 2010

gez. Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Isolierung humaner Pankreasfibroblasten	2
1.2 Speicherung von Lipiden.....	2
1.3 Produktion von Kollagen.....	2
1.4 Expression von zytoskelettalen Proteinen.....	3
1.5 Faktoren zur Regulation von Pankreasfibroblasten.....	3
1.6 Einfluss von Zelldichte und Extrazellulärmatrrix.....	4
1.7 Ziele der Arbeit.....	5
2. Material und Methoden	6
2.1 Isolierung von humanem Pankreasfibroblasten.....	6
2.2 Morphologische Untersuchungen der isolierten Zellen.....	7
2.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltens mit MTS-Tests.....	9
2.4 Molekularbiologische Analysen.....	10
2.5 Biochemische Analysen.....	13
2.6 Expressionsstudien in Atlas-Arrays TM	18
3. Ergebnisse	22
3.1 Explantation und Isolierung der Pankreasfibroblasten.....	22
3.2 Morphologische Charakterisierung isolierter Pankreasfibroblasten.....	23
3.3 Mikroskopischer Nachweis von Lipiden durch Ölrotfärbung.....	23
3.4 Nachweis von zytoskelettalen Proteinen in der Immunfluoreszenz.....	24
3.5 Wachstumsverhalten der Fibroblasten in Kultur.....	26
3.6 Funktionelle Untersuchungen an lebenden Pankreasfibroblasten mit MTS-Tests.....	28
3.7 Expression von Kollagen in Pankreasfibroblasten.....	31
3.8 Expression, Sekretion und Bedeutung von Transforming Growth Factor beta.....	33
3.9 Expression von Thrombospondin-1.....	39
3.10 Untersuchung der Expression multipler Gene in Pankreasfibroblasten mit Differential Display Membranen (Atlas Array TM).....	42

4. Diskussion	46
4.1 Isolierung von humanen Pankreasfibroblasten.....	46
4.2 Morphologie der isolierten Pankreasfibroblasten.....	47
4.3 Lipidspeicherung in humanen Pankreasfibroblasten.....	47
4.4 Expression zytoskelettaler Proteine in humanen Pankreasfibroblasten	48
4.5 Wachstumsverhalten der Pankreasfibroblasten in Kultur.....	49
4.6 Faktoren zur Regulation von Pankreasfibroblasten.....	50
4.7 Untersuchung der Expression multipler Gene in HPF mittels Array-Analyse.....	55
5. Zusammenfassung	59
6. Literaturverzeichnis	61
7. Danksagung	66
8. Lebenslauf	67

Abkürzungsverzeichnis

α SMA	Alpha-Glattmuskelaktin (Smooth Muscle Actin)
cDNA	Complementary-DNA (nach reverser Transkription)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazellulärmatix
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HPF	Humane Pankreasfibroblasten
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MAP3K11	Mitogen Aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase 11
mRNA	Messenger-RNA (nach Transkription)
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PSC	Pankreassternzelle (Pancreatic Stellate Cell)
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese
TBS	TRIS Buffered Saline
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TNF	Tumornekrosefaktor
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

Im menschlichen Pankreas führen sowohl chronisch entzündliche als auch hereditäre und neoplastische Erkrankungen zu einer Fibrose des Organs. Besonders im Vergleich zu anderen epithelialen Tumoren fällt die deutlich ausgeprägte Stroma-Komponente in der Umgebung von Pankreaskarzinomzellen auf. Dieses Phänomen wird als desmoplastische Reaktion beschrieben (Apte et al. 2004). Die Organfibrose zeichnet sich durch einen gegenüber dem gesunden Organ deutlich vermehrten Gehalt an extrazellulärer Matrix aus. In der Extrazellulärmatrix des fibrosierten Pankreas finden sich verschiedene Proteine wie Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Laminin und Fibronectin (Bachem et al. 1998). Die pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung der Organfibrose des Pankreas sind bisher nicht vollständig geklärt. Als möglicher Mechanismus gilt eine Dysregulation von Deposition und Degradation der Extrazellulärmatrix durch rekurrente oder permanente Inflammation, vermittelt durch vermehrte Ausschüttung oder verminderten Abbau von Entzündungsmediatoren.

Auch bei Erkrankungen der Leber tritt eine Organfibrose durch Vermehrung der Extrazellulärmatrix auf. Die Fibrogenese in der Leber ist ein schon länger bekanntes Phänomen. Als Quelle der Extrazellulärmatrix in der fibrosierten Leber gelten so genannte hepatische Sternzellen oder Ito-Zellen, die 1876 Carl Wilhelm von Kupffer zuerst beschrieb und die 75 Jahre später von Ito weiter charakterisiert wurden (Ito 1951; von Kupffer 1898). Diese Zellen zeichnen sich durch Speicherung von Vitamin A und Expression von bestimmten Markerproteinen wie dem Intermediärfilament Desmin und der Glattmuskel-Isoform des Aktins aus. Weiterhin sind Ito-Zellen in der Lage, sich nach Aktivierung zu einem myofibroblastären Phänotypen zu differenzieren (Gressner et al. 1995). Analog den hepatischen Sternzellen gibt es auch im Pankreas fibroblastäre Zellen, die in der Lage sind, Proteine der extrazellulären Matrix zu synthetisieren und zu sezernieren und die in Morphologie, Funktion und Expressionsmuster den hepatischen Sternzellen ähnlich sind (Kato et al. 1996). Histologische Untersuchungen haben ergeben, dass in fibrotischen Arealen des Pankreas eine erhöhte Aktivität von myofibroblastär differenzierten Zellen besteht und dass in diesen Zellen Kollagen exprimiert wird (Yen et al. 2002). Später wurde nachgewiesen, dass fibroblastoide Zellen des menschlichen Pankreas auch in der Lage sind, Matrixmetalloproteinasen zu sezernieren und damit einen Beitrag zur Degradation der Extrazellulärmatrix zu leisten (Phillips et al. 2003).

Im gesunden menschlichen Pankreas sind fibroblastäre Zellen nur in verhältnismäßig geringer Zahl vorhanden. Sie liegen in Nachbarschaft zu den Azini des exokrinen Pankreas, finden sich in der Nähe von Blutgefäßen und Ausführungsgängen und bilden teilweise ausgedehnte Zytoplasmaausläufer, die den Kontakt untereinander und zu den parenchymatösen Zellen des Pankreas gewährleisten (Apte et al.

1998; Omary et al. 2007). Um diese fibroblastären Zellen näher zu charakterisieren, ist eine Isolierung und Anreicherung unter Zellkultur-Bedingungen sinnvoll.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode zur Isolierung und Kultivierung fibroblastoider Zellen des menschlichen Pankreas sowie deren Charakterisierung in vitro.

1.1. Isolierung humaner Pankreasfibroblasten

Die Isolierung fibroblastärer Zellen des Pankreas wurde von mehreren Autoren beschrieben, dabei wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt. Williams et al. beschrieben bereits 1978 eine Methode, bei der nach Injektion von Kollagenase und Chymotrypsin in das Pankreas die Azini aufgenommen und in Kulturmedium suspendiert wurden (Williams et al. 1978). In späteren Arbeiten wurde berichtet, dass aus so isolierten Azini Fibroblasten als spindelförmige Zellen herauswuchsen, die weiter kultiviert wurden (Bachem et al. 1998). Eine andere Methode, die sich an der Isolierung hepatischer Sternzellen orientiert, beinhaltet einen Gewebeverdau von Pankreasgewebe mittels Proteinasen und DNasen und eine anschließende Differentialzentrifugation, bei der die fetthaltigen Zellen abgetrennt und weiter kultiviert wurden (Apte et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wird eine Isolierung durch Auswachsen aus mittels Blutplasma in Zellkulturschalen fixierten Gewebeproben des Pankreas beschrieben, wie sie für Pankreasfibroblasten der Ratte bereits publiziert wurde (Kruse et al. 2000).

1.2. Speicherung von Lipiden

Ein charakteristisches Merkmal von Sternzellen der Leber ist die Fähigkeit zur Speicherung von Vitamin A in intrazytoplasmatisch gelegenen Lipidvakuolen. Das Vorkommen von Vitamin A-speichernden Zellen im Pankreas wurde zunächst in Mäusen untersucht, denen Vitamin A in hoher Dosis verabreicht wurde. Zur Identifikation der Zellen wurde die Autofluoreszenz von Vitamin A unter ultraviolettem Licht genutzt (Watari et al. 1982). In bisherigen Arbeiten zu fibroblastären Zellen des Pankreas wurde eine Abnahme der Lipidspeicherung in Abhängigkeit von der Dauer der in vitro Zellkultur beschrieben. Dies wurde als Ausdruck der Aktivierung und myofibroblastären Differenzierung der Zellen gewertet (Apte et al. 1998; Bachem et al. 1998).

1.3. Produktion von Kollagen

Eine wesentliche Eigenschaft fibroblastärer Zellen bzw. Sternzellen des Pankreas liegt in der Produktion von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix. Von besonderem Interesse sind unter anderem die

Extrazellulärmatrix-Proteine Kollagen Typ 1 und Typ 3. Während Kollagen Typ 3 von Fibroblasten in der Frühphase der Wundheilung gebildet wird, ist Kollagen Typ 1 ein typischer Bestandteil narbigen Bindegewebes nach abgeschlossener Wundheilung. Beide Typen finden sich in großer Menge in fibrosiertem menschlichem Pankreasgewebe (Bachem et al. 1998).

1.4. Expression von zytoskelettalen Proteinen

Zur Charakterisierung fibroblastärer Zellen des Pankreas wurde von mehreren Autoren die Expression und Verteilung verschiedener Filamentproteine beschrieben. Da sich hepatische Sternzellen durch die Expression diverser Proteine des Zytoskeletts auszeichnen, wurden diese Proteine auch in fibroblastären Zellen des Pankreas untersucht.

Desmin ist ein Intermediärfilament und bekanntes Markerprotein hepatischer Sternzellen (Yokoi et al. 1984). Es wurde auch als charakteristisches Merkmal pankreatischer Sternzellen beschrieben (Apte et al. 1998; Bachem et al. 1998).

Die Glattmuskel-Isoform des alpha-Aktins ist ein Mikrofilament und gilt ebenfalls als Markerprotein hepatischer und pankreatischer Sternzellen, dessen Expression außerdem als Zeichen der Aktivierung dieser Zellen gewertet wird (Ballardini et al. 1988).

1.5. Faktoren zur Regulation von Pankreasfibroblasten

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von TGF β 1 (Transforming Growth Factor beta 1) und PDGF (platelet derived growth factor) auf das Wachstum, die endogene Produktion von TGF β 1 und die Expression des potentiellen TGF β -Aktivators Thrombospondin-1 durch menschliche Pankreasfibroblasten beschrieben.

1.5.1. Transforming Growth Factor beta

Zur Regulation von Wachstum und Funktion von Pankreasfibroblasten wurden bisher viele Zytokine untersucht. Eine besondere Rolle spielt dabei Transforming Growth Factor beta (TGF β), dessen Funktion in Sternzellen des Pankreas von mehreren Autoren beschrieben wurde. TGF β ist ein Zytokin, das in drei Isoformen sezerniert wird (TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3). Die ausführlichsten Untersuchungen für die Bedeutung in der Fibrogenese des Pankreas sind bisher für die TGF β 1-Isoform erfolgt. TGF β 1 wurde als positiver Faktor für die Produktion von Extrazellulärmatrix identifiziert

(Ignatz et al. 1987). Es wurde gezeigt, dass die Inhibition von TGF β 1 Aktivität in Ratten mit experimentell induzierter Pankreatitis die Produktion von Extrazellulärmatrix vermindert (Menke et al. 1997), während die Gabe von TGF β 1 an Mäuse mit wiederholten akuten Pankreatitiden eine vermehrte Matrixproduktion zur Folge hatte (Van Laethem et al. 1996). Über die Frage der Produktion von Extrazellulärmatrix hinaus konnte an Pankreasfibroblasten der Ratte eine Zunahme der Wachstumsrate durch Inhibition von TGF β gezeigt werden (Kruse et al. 2001). Als Quelle der TGF β -Produktion kommen zunächst parenchymale Zellen des Pankreas in Frage. Für fibroblastäre Zellen des Pankreas der Ratte konnte jedoch auch eine endogene Produktion von TGF β 1 gezeigt werden, die eine autokrine Regulation nahe legt (Kruse et al. 2000). Um eine biologische Wirksamkeit zu erreichen, muss TGF β von einer latenten in die reife Form überführt werden. Thrombospondin-1, ein Protein, das erstmals aus Thrombozyten isoliert wurde und das an der Regulation von Gefäßneubildung und Wundheilung beteiligt ist, ist ein bekannter Aktivator von TGF β (Lawler 2000; Schultz-Cherry et al. 1993).

1.5.2. Platelet derived Growth Factor

Ein weiterer bekannter Faktor mit Einfluss auf die Regulation pankreatischer Sternzellen ist PDGF (platelet derived growth factor). PDGF ist ein dimeres Glycoprotein mit Einfluss auf das Wachstum von mesenchymalen Zellen, das zunächst in Thrombozyten nachgewiesen wurde (Heldin et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass pankreatische Sternzellen der Ratte Rezeptoren für PDGF exprimieren und dass PDGF einen positiven Einfluss auf das Wachstum dieser Zellen hat (Apte et al. 1999).

1.6. Einfluss von Zelldichte und Extrazellulärmatrix auf Pankreasfibroblasten

Unter physiologischen Bedingungen liegen fibroblastäre Zellen des Pankreas verhältnismäßig vereinzelt in Umgebung der Parenchymzellen des exokrinen Pankreas. Sie sind umgeben von einer relativ lockeren Extrazellulärmatrix. In fibrotisch verändertem Pankreasgewebe wird diese Extrazellulärmatrix deutlich dichter. Bisherige Arbeiten konzentrierten sich auf fibroblastäre Zellen des Pankreas als Ursprung der Extrazellulärmatrix, ohne den Einfluss der Matrix auf die Zellen selbst näher zu untersuchen (Schneider et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wird das Verhalten von fibroblastären Zellen des Pankreas ohne und mit umgebender Extrazellulärmatrix in Zellkultur in unterschiedlicher Wachstumsdichte beschrieben.

1.7. Ziele der Arbeit

- Etablierung und Beschreibung der Methode zur Isolierung von fibroblastären Zellen des menschlichen Pankreas durch Auswachsen aus mittels homologem Blutplasma fixierten Gewebestückchen.
- Untersuchung des Wachstumsverhaltens der isolierten Zellen in Langzeit-Kultur, insbesondere im Vergleich der Kultur ohne und mit Einsatz von Extrazellulärmatrix (ECM).
- Charakterisierung der isolierten Zellen nach Kriterien der Morphologie, Lipidspeicherung und der Expression von Kollagen sowie der Filamentproteine Desmin, Vimentin und α -SMA.
- Untersuchung des Wachstumsverhaltens der isolierten Zellen unter Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF β 1 und PDGF.
- Untersuchung der Expression von TGF β 1 und dessen Rezeptoren durch die isolierten Zellen selbst.
- Untersuchung der Expression von Thrombospondin-1 als möglichem Aktivator von TGF β .
- Vergleichende Untersuchung der Expression multipler Gene durch die isolierten Zellen in Kultur ohne und mit Einsatz von ECM durch Gen-Array-Analyse.

2. Material und Methoden

2.1. Isolierung von humanem Pankreasfibroblasten

2.1.1. Gewebeproben

Proben menschlichen Pankreasgewebes von etwa 2 ml Volumen wurden aus Resektaten gewonnen, die bei chirurgischen Teilresektionen des Pankreas entnommen wurden. Die Teilresektionen des Pankreas wurden in der Klinik für Allgemeine und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, an Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen oder bösartigen Neubildungen des Pankreas bzw. benachbarter Organe durchgeführt. Die Einverständniserklärung der Patienten lag vor. Die Proben wurden innerhalb der ersten 30 Minuten nach Entnahme vom Resektat getrennt und zum Transport in Phosphat gepufferter Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS) mit Zusatz von Aprotinin und Sojabohnen Trypsin Inhibitor (STI) aufbewahrt, um eine Zersetzung des Gewebes durch Autolyse zu verhindern. Im Labor wurde die Probe in eine Zellkulturschale aus Kunststoff in Explantationsmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Zusatz von 20 % fetalem Kälberserum (FCS, Firma Biochrom, Berlin), 10 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum, 10 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, Glutamat, 10 mM HEPES Puffer (2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure) und 5 µg/ml Gentamicin) transferiert und mit einem Skalpell zerteilt. Ein Teil der Probe wurde in Aluminiumfolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert, während ein anderer Teil zur Explantation vorbereitet wurde.

2.1.2. Explantation

Die Hälfte der Proben wurde auf Extrazellulärmatrix (ECM) explantiert. Zur Explantation der Proben auf ECM wurden runde Zellkulturschalen aus Kunststoff mit einem Durchmesser von 8 cm (Firma Falcon, Fort Worth, TX, USA) vorbereitet, indem in jede Schale 40µl MatrigelTM (Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)-Lösung (0,5 mg/ml) pipettiert, mit einem Zellschaber verteilt und unter laminarer Luftströmung getrocknet wurden. Die zur Explantation bestimmten Probestücke wurden mit einem Skalpell weiter in Würfel von etwa 2 mm Kantenlänge zerteilt.

In die Zellkulturschalen wurden je 10 Tropfen zu 4 µl menschliches Blutplasma mit Zusatz von Natriumcitratlösung (Monovette, Firma Sarstedt) gegeben. In diese Plasmatropfen wurde jeweils ein Gewebestückchen gelegt und das Plasma durch Zugabe von Thromboplastin (Thromborel[®], Firma Behring, Marburg) zum Gerinnen gebracht, so dass das Gewebe durch das entstandene Koagulat in der

Kulturschale fixiert wurde. Nach Zusatz von 10 ml Explantationsmedium wurden die Schalen im Zellkulturschrank bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Das Kulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

2.1.3. Zellkultur

Nach Auswachsen einer ausreichenden Zahl fibroblastärer Zellen wurden die Gewebestückchen mit einem Skalpell entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und zum Ablösen von der Kulturschale für 10 Minuten in PBS mit 0,025% Trypsin und 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bei 37° C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein steriles 15 ml-Kunststoffröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette abgesaugt und das Präzipitat mit Kulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Suspension ein Tropfen entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer übertragen. Etwa 300.000 Zellen wurden anschließend in jeweils eine neue mit ECM beschichtete bzw. unbeschichtete Zellkulturschale pipettiert und in 10 ml Explantationsmedium im Zellkulturschrank inkubiert. Die passagierten Zellen erhielten nach 3 Tagen frisches Kulturmedium, nach weiteren 3 Tagen fand die jeweils nächste Passage der Zellen statt.

2.1.3.1. Aussaat der Zellen für morphologische Untersuchungen

Für die indirekte Fluoreszenzmikroskopie und die Ölrotfärbung wurden Zellkulturen auf sterilen Deckgläschen angelegt. Hierzu wurden die Deckgläschen in Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen (Firma Costar, Acton, MA, USA) gelegt und gegebenenfalls mit 4 µl MatrigelTM-Lösung beschichtet. Jeweils zwei explantierte Gewebestückchen wurden mittels eines koagulierten Plasmatropfens auf einem Deckgläschen fixiert. Nach der ersten Passage wurden 10.000 Zellen in Suspension auf ein Deckgläschen pipettiert und in 2 ml Explantationsmedium kultiviert.

2.2. Morphologische Untersuchungen der isolierten Zellen

2.2.1. Phasenkontrastmikroskopie

Zur morphologischen Untersuchung der auswachsenden und isolierten Zellen in Kultur wurden mikroskopische Fotografien (AxiovertTM Mikroskop, Firma Zeiss; Tmax 400 Film, Firma Kodak, New York, USA) in Phasen- und Varelkontrast erstellt.

2.2.2. Ölrotfärbung

Zellkulturen auf Deckgläschen wurden mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 2,5 % Paraformaldehyd-Lösung in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Die Aufbewahrung fand ebenfalls bei 4°C in 0,01 % Natriumazidlösung in PBS statt.

Die Farbstofflösung wurde hergestellt, indem 4 ml einer gesättigten Lösung des Ölrot-Farbstoffes (Firma Polysciences, Warrington, PA, USA) in 50 % Aceton und 50 % Ethanol mit 6 ml destilliertem Wasser versetzt wurden. Zur Färbung wurden die Deckgläschen für 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Ethanol-Reihe vorbereitet. Dabei wurden die Deckgläschen für jeweils 2 Minuten in wässrige Ethanol-Lösungen aufsteigender Konzentration (10 %, 20 %, 30 % und 40 %) gelegt. Dann erfolgte die Inkubation mit der Farbstofflösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die gefärbten Proben wurden in destilliertem Wasser gewaschen und mit Hematoxylin-Kernfarbstoff (Firma Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 1 Minute gegengefärbt. Nach erneutem Waschen für 3 Minuten in destilliertem Wasser wurden die Deckgläschen mit Glyceringelatine auf Objektträgern fixiert. Die mikroskopischen Untersuchungen an den Ölrot-Präparaten wurden mit einem Axioplan Mikroskop (Firma Carl Zeiss, Jena) durchgeführt.

2.2.3. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Zur gezielten Untersuchung von Proteinen in Zellen mit indirekter Fluoreszenz wurden Zellkulturen auf Deckgläschen verwendet. Das Medium wurde abgesaugt, die Kulturen mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 20 Minuten bei -20°C fixiert. Die so fixierten Kulturen wurden in PBS mit 0,01 % Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und für drei Mal 15 Minuten mit TRIS-gepufferter Salzlösung (TBS; 20 mM TRIS-HCl (Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid), 150 mM Natriumchlorid, pH 7,6) mit 0,2 % Glycin und 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA) behandelt. Danach wurden die Deckgläschen für 5 Minuten mit TBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert.

Folgende Primärantikörperlösungen (Firma Sigma, Springfield, NY, USA) wurden verwendet:

- Monoklonale Anti-Tubulin Antikörper aus Mäusen 1:400 in TBS
- Monoklonale Anti- α -SMA Antikörper aus Mäusen 1:200 in TBS
- Polyklonale Anti-Desmin Antikörper aus Kaninchen 1:100 in TBS
- Polyklonale Anti-Vimentin Antikörper aus Ziegen 1:100 in TBS

Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Deckgläschen zweimal für 15 Minuten in TBS gewaschen und dann für 1 Stunde bei 37°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die verwendeten Sekundärantikörper aus Esel als Wirtstier (Firma Dianova, Hamburg) waren:

- Anti-Maus-TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) 1:200 in TBS
- Anti-Kaninchen FITC (Fluoresceinisothiocyanate) 1:200 in TBS
- Anti-Ziege CY 5 1:200 in TBS

Der Sekundärantikörperlösung wurden 5 µg/ml Bis-Benzimid zur Kernfärbung zugesetzt. Nach der Sekundärantikörperinkubation wurden die Deckgläschen erneut zweimal für 5 Minuten in TBS gewaschen, kurz mit destilliertem Wasser gespült und in 5 µl Eindeckmedium (SlowFade™, Firma Molecular Probes, Eugene, OR, USA) auf einen Objektträger gelegt. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Axioplan Mikroskop ausgestattet zur Fluoreszenzmikroskopie (Firma Carl Zeiss, Jena) und mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (LSM 510, Firma Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Konventionelle Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden auf Diafarbfilm (T160, Firma Kodak, New York, USA) dokumentiert.

2.3. Untersuchung des Wachstumsverhaltens mit MTS-Tests

Funktionelle Untersuchungen zum Wachstumsverhalten an isolierten Pankreasfibroblasten wurden mit einem MTS-Farbstofftest durchgeführt (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Firma Promega, Madison, WI, USA). Hierbei wurde eine Methyltetrazoliumblau-Lösung in das Zellkulturmedium gegeben, die von stoffwechselaktiven Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt reduziert wurde (Mosmann 1983).

2.3.1. Aussaat der Zellen

Zur Vorbereitung wurden Pankreasfibroblasten in unterschiedlicher Dichte in Mikrotiterplatten ausgesät. Um einen Vergleich von Zellen auf Extrazellulärmatrix (ECM) und ohne ECM zu ermöglichen, wurde die Hälfte der Platten mit ECM beschichtet. Dazu wurde eine Lösung aus Matrigel™ 1:100 in H₂O hergestellt, jeweils 100 µl der Lösung in eine Vertiefung pipettiert und die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Für eine niedrige Zelldichte wurden 250, für eine hohe Zelldichte 1000 Zellen je Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden mit 100 µl Zellkulturmedium für 24 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt, jede Vertiefung mit 100 µl PBS gewaschen und die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium (OPTIMEM®) inkubiert.

2.3.2. Inkubation mit Wachstumsfaktoren

Nach dieser Vorbereitungsphase wurden die Zellen erneut mit 100 μ l PBS gewaschen und mit 100 μ l Medium je Vertiefung für 24 Stunden inkubiert.

Die wachstumsfaktorhaltigen Kulturmedien wurden auf der Basis von serumfreiem Medium (OPTIMEM[®]) erstellt, das im Experiment als Kontrolle diente. In jedem Experiment wurde als Stimulationskontrolle eine Versuchsreihe mit fetalem Kälberserum 10% durchgeführt. Folgende Medien wurden verwendet:

- Reines OPTIMEM[®] als Kontrolle
- Fetales Kälberserum (FCS) 10%
- TGF β 1 (Firma R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in unterschiedlichen Konzentrationen
- Anti-pan-TGF β (Firma Sigma, Springfield, NJ, USA) Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen
- PDGF (Platelet Derived Growth Factor) in unterschiedlichen Konzentrationen

Nach 12 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium einmal gewechselt, um in der Zwischenzeit aufgetretene Stoffwechselprodukte zu entfernen.

2.3.3. Auswertung

Zur Auswertung wurden 20 μ l MTS-Reagenz je Vertiefung in das Kulturmedium pipettiert und die Platte im Zellkulturschrank inkubiert. Die Extinktion bei 490 nm wurde mit einem Mikrotiterplattenleser (Dynatech MR 5000, Firma Dynex Laboratories, Chantilly, VA, USA) in den folgenden 4 Stunden in 30-Minuten-Intervallen bestimmt. Zur Auswertung wurden die erhaltenen Werte für die Optische Dichte mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (MS Excel, Firma Microsoft, Seattle, WA, USA) verglichen.

2.4. Molekularbiologische Analysen

2.4.1. RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Zur Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) aus Zellkulturen wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 2 ml TRIZOL-Reagenz (Firma Life Technologies, Rockville, MD, USA) in jede 75 cm²-Zellkulturflasche pipettiert. Die Zellen wurden

mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche gelöst, mit der Pipette homogenisiert und die gewonnene Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen. Die Proben wurden mit Chloroform im Volumenverhältnis 1:5 versetzt, durchmischt und anschließend für 10 Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Die obere, klare Phase wurde mit einer Pipette aufgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß eiskaltes Isopropanol im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei -20°C wurden die Proben erneut für 10 Minuten bei 14.000 U/Min zentrifugiert. Der Isopropanol-Überstand wurde entfernt, das Präzipitat mit 80% RNase-freiem Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 14.000 U/Min zentrifugiert. Der Ethanol-Überstand wurde mit einer feinen Metallkanüle entfernt und das Präzipitat unter einer sterilen Arbeitsbank luftgetrocknet. Das Präzipitat wurde mit 10 bis 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen, mit der Pipette vermischt und bei -70°C aufbewahrt.

2.4.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde in Zweifachbestimmung mit einem automatischen UV-Photometer (Firma Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) ermittelt. Dazu wurden für jede RNA-Probe zwei 1:100 Verdünnungen mit Wasser erstellt, die optische Dichte gemessen und über lineare Regression die RNA-Konzentration bestimmt.

2.4.3. Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription erfolgte mit dem Omniscript-Kit (Firma Qiagen, Hilden). 500 ng RNA wurden in 14 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und für 2 Minuten bei 65°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden 2 µl 10-fach RT-Pufferlösung, 2 µl dNTP Mix (5 mM für jedes Nukleotid), 1 µl Oligo-dT Primer (0,5 µg/µl, Firma Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt, so dass sich ein Volumen von 20 µl ergab. Der Ansatz wurde vermischt und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA-Lösung bei -20°C aufbewahrt.

2.4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis spezifischer Genprodukte in der isolierten RNA wurde die revers transkribierte cDNA mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Es wurden jeweils 2 µl cDNA-Lösung mit 26 µl

PCR-Supermix (Firma Life Technologies, Grand Island, NY, USA) und jeweils einem Mikroliter 5' und 3' spezifischen Oligonukleotid (Primer) in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert.

Die Amplifikation erfolgte in einer automatischen PCR-Maschine (Gene Amp, Firma Perkin Elmer) unter für das untersuchte Genprodukt spezifischen Bedingungen.

Für die Amplifikation von TGFβ1- und Thrombospondin-1-cDNA wurde folgendes Programm verwendet:

1. 5 Minuten bei 95°C
2. 30 Sekunden bei 95°C
45 Sekunden bei 62°C
30 Sekunden bei 72°C
3. 24malige Wiederholung des 2. Schrittes
4. 10 Minuten bei 72°C

Für die Amplifikation von beta-Aktin- und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase)-cDNA wurde folgendes Programm verwendet:

1. 5 Minuten bei 95°C
2. 30 Sekunden bei 95°C
45 Sekunden bei 60°C
30 Sekunden bei 72°C
3. 29malige Wiederholung des 2. Schrittes
4. 10 Minuten bei 72°C

Für die Amplifikation von Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-cDNA wurde folgendes Programm verwendet:

1. 5 Minuten bei 95°C
2. 30 Sekunden bei 95°C
45 Sekunden bei 60°C
30 Sekunden bei 72°C
3. 29malige Wiederholung des 2. Schrittes
4. 10 Minuten bei 72°C

Die PCR-Produkte wurden bei -20° aufbewahrt.

2.4.5. DNA-Auftrennung mit Polyacrylamid-Elektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel unter Verwendung des Multigel long Systems (Firma Biometra, Göttingen).

Ansatz zur Herstellung des Gels:

- 4 ml Acrylamid-Lösung 30%
- 3,75 ml 2-fach TBE (45 mM TRIS-Borat, 1 mM EDTA, pH 7,9)
- 7,1 ml H₂O
- 150 µl Ammoniumpersulfatlösung 10%
- 15 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer in 0,5-fach TBE-Puffer. Das PCR-Produkt wurde mit Formamid-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt, in die Tasche eines Gels pipettiert und anschließend bei einer Spannung von 190 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Auswertung der PAA-Elektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml in TBE) gefärbt, unter ultraviolettem Licht betrachtet und mit einer Sofortbildkamera (Firma Kodak, New York) fotografiert.

2.4.6. Quantifizierung der PCR-Produkte

Um eine quantitative Auswertung der PCR zu ermöglichen, wurde das Gel mit einer Digitalkamera aufgenommen und das Bild mit einem Computerprogramm (Scanpack, Firma Biometra, Göttingen) durch Ermitteln der Gelbandendichte ausgewertet. Die Dichte der Gelbände eines spezifischen Produktes wurde dabei mit der von β -Aktin, einem nicht signifikant regulierten Genprodukt, verglichen.

2.5. Biochemische Analysen

2.5.1. Proteinisolierung aus Zellkulturen

Die Gewinnung von Proteinen aus adhärennten Zellkulturen erfolgte, indem die Zellkulturen mit PBS gewaschen und 1 ml einer 10 mM TRIS-HCl Lösung (pH 7,6) mit Proteinase-Inhibitoren (Mini Complete Tablets, Firma Roche, Mannheim) in jede Schale pipettiert wurde. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale abgelöst und die Proteinlösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Zur Homogenisierung wurde die Lösung für 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Die Aufbewahrung der Zellysate erfolgte bei -20° C.

2.5.2. Proteingehaltbestimmung im Bradford-Assay

Der Proteingehalt der Kulturlysate wurde mit dem Bradford-Assay (Firma BioRad, München; (Bradford 1976)) bestimmt. Jeweils drei Mal 1 μ l und drei Mal 3 μ l eines Zellysates wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 μ l einer wässrigen 1:5 Verdünnung der Farbstofflösung versetzt. Zur Erstellung einer Eichreihe wurde eine Verdünnungsreihe mit 1 μ g bis 5 μ g bovinem Serumalbumin (BSA) ebenfalls in Dreifachbestimmung angesetzt. Die Extinktion bei 595 nm wurde mit einem Mikrotiterplattenleser (Dynatech MR 5000, Firma Dynex Laboratories, Chantilly, VA, USA) gemessen und die Proteinkonzentration des Zellysates über lineare Regression errechnet.

2.5.3. Proteinauftrennung mit SDS-PAGE

(Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels diskontinuierlicher, reduzierender Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970).

Um die Bildung sauberer Startbanden zu ermöglichen, wurde ein zweiteiliges Elektrophoresegel erstellt. Dafür wurde ein Trenngel mit 12,5 % Polyacrylamid bei pH 8 überschichtet mit einem Sammelgel von mit 4 % Polyacrylamid bei pH 6,8.

Folgende Lösungen und Puffer wurden verwendet:

- Trenngelpuffer: 1,5 M TRIS-HCl (Trishydroxymethylaminomethan)
0,4 % SDS
pH 8,8
- Trenngel: 12,5 ml Acrylamid 30 %
7,5 ml Trenngelpuffer
10 ml H₂O
150 μ l Ammoniumpersulfat 10 %
15 μ l TEMED (N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin)
- Sammelgelpuffer: 0,5 M TRIS-HCl
0,4 % SDS
pH 6,8
- Sammelgel: 1333 μ l Acrylamid 30 %

- 7,5 ml Sammelgelpuffer
- 1167 μ l H₂O
- 50 μ l Ammoniumpersulfat 10%
- 25 μ l TEMED
- Probenpuffer: 128 mM TRIS-HCl
- 4,6 % SDS
- 10 % Glycerin
- 0,005 % Bromphenolblau
- pH 6,8
- Laufpuffer: 25 mM TRIS
- 192 mM Glycin
- 0,1 % SDS
- pH 8,3

Den Proteinlysat-Proben wurde in gleichem Volumen 2-fach Probenpuffer sowie 10 % DTT (Dithiothreitol) hinzupipettiert, diese Lösung für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 100 Volt, bis die Proben am Übergang von Sammelgel zu Trenngel eine saubere Bande bildeten, und wurde dann mit einer Spannung von 150 Volt fortgeführt.

2.5.4. Proteinnachweis im Western-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine aus dem Elektrophoresegel mit dem Western-Blot Verfahren untersucht.

2.5.4.1. Membrantransfer

Die Proteine aus dem Elektrophoresegel wurden mit dem Nass-Blot-Verfahren auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dazu wurde die PVDF-Membran (Immobilon P, Firma Millipore, Eschwege) zunächst für 2 Minuten in Methanol und anschließend für 10 Minuten in Transferpufferlösung (240 mM Glycerin, 25 mM TRIS, 20 % Methanol) gelegt, um die Benetzbarkeit der Membran zu gewährleisten. Das SDS-PAGE-Gel wurde zusammen mit der Membran zwischen je 3 Lagen Filterpapier (Whatman 3mm, Firma Biometra, Göttingen) platziert und in einer Nass-Blot-

Kammer so orientiert, dass die Membran der Anode zugewandt war. Die Proteine wurden über Nacht bei einer Stromstärke von $0,5 \text{ mA je cm}^2$ Gelfläche elektrophoretisch auf die Membran transferiert.

2.5.4.2. Antikörperinkubation und Immundetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran für 4 Stunden in Blockierungspuffer (3 % Milchpulver, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20 (Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmonolaurat, Firma Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), 0,005 % Thimerosal in TBS) gewaschen und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit dem Primärantikörper in Blockierungspuffer inkubiert.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

- Anti-Kollagen Typ I
- Anti-Kollagen Typ III
- Anti-SMA
- Anti-TGF β -Rezeptor Typ I
- Anti-TGF β -Rezeptor Typ II

Danach wurde die Membran drei Mal für jeweils 15 Minuten in Blockierungspuffer gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war.

Folgende Sekundärantikörper-Konjugate wurden verwendet:

- Anti-Maus-AP 1:30.000
- Anti-Kaninchen-AP 1:15.000

Nach der Sekundärantikörper-Inkubation wurde die Membran zweimal für 15 Minuten in Blockierungspuffer, zweimal 15 Minuten in TBS/T (TBS mit 0,2 % Tween 20), zweimal 10 Minuten in TBS und einmal 5 Minuten in Assay-Puffer (Firma New England Biolabs, Beverly, MA, USA) gewaschen.

Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten mit der Chemilumineszenz-Substratlösung (CDP StarTM, Firma New England Biolabs, Beverly, MA, USA) in Assay-Puffer inkubiert, in Kunststoffolie eingelegt und in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Firma Kodak, New York, USA) exponiert. Die Expositionszeiten lagen zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten.

2.5.5. Proteinnachweis im ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Zum Nachweis von TGF β 1 in Mediumüberständen aus Zellkulturen wurde ein ELISA (TGF β 1-E_{max}TM ImmunoAssay System, Firma Promega, Madison, WI, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden in serumfreiem Kulturmedium (OPTIMEM[®]) inkubiert. Das Medium wurde in sterile Gefäße pipettiert und zur Entfernung zellulärer Bestandteile für 10 Minuten bei 13000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

Von jeder Probe wurde ein Aliquot säurebehandelt, um evtl. inaktiven TGF β 1 zu aktivieren. Dazu wurde das entsprechende Aliquot mit 1 molarer Salzsäure im Verhältnis 1:50 versetzt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Säure mit 1 molarer Natronlauge im Verhältnis 1:50 neutralisiert.

Eine Mikrotiterplatte wurde mit monoklonalen Anti-TGF β Maus-Antikörpern beschichtet, indem 100 μ l einer Antikörperlösung in Karbonatpuffer (0,04 μ g/ml Anti-TGF β ; 0,025 M NaHCO₃/0,025 M Na₂CO₃; pH 9,7) in jede Vertiefung pipettiert und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert wurde.

Anschließend wurde die Platte mit 300 μ l Waschpufferlösung (0,05% Tween 20 in TBS) pro Vertiefung gewaschen und mit 270 μ l Blockierungspuffer für 35 Minuten bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungskapazitäten zu blockieren.

Der Blockierungspuffer wurde entfernt und die Platte 5 mal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Erstellung einer Eichreihe wurde eine Verdünnungsreihe mit 16 pg bis 1000 pg der Standard- TGF β 1-Lösung in Dreifachbestimmung angesetzt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und ebenfalls in Dreifachbestimmung in die Platte pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben entfernt, die Platte 5 mal mit Waschpuffer gewaschen und mit 100 μ l je Vertiefung einer Anti-pan-TGF β Antikörperlösung (2 μ g/ml Anti-TGF β in Probenpuffer) unter Schütteln für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Antikörperlösung wurde entfernt, die Platte 5 mal gewaschen und mit 100 μ l Meerrettichperoxidase-konjugierter Sekundärantikörperlösung je Vertiefung erneut für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurde die Konjugatlösung entfernt, die Platte 5 mal gewaschen und mit 100 μ l Substratlösung je Vertiefung für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 1 molarer Phosphorsäure je Vertiefung beendet. Die Extinktion bei 450 nm wurde mit einem Mikrotiterplattenleser (Dynatech MR 5000, Firma Dynex Laboratories, Chantilly, VA, USA) gemessen und die Konzentration von TGF β 1 über lineare Regression berechnet.

2.6. Expressionsstudien mit DNA in Atlas-Arrays™

Zum Vergleich der Expression einer großen Anzahl von Genprodukten zwischen jeweils zwei unterschiedlichen Zelllinien wurde das Atlas™ Human cDNA Expression Array (Firma Clontech, Palo Alto, CA, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Nylon Membran, auf der DNA-Sonden von insgesamt 588 Genen immobilisiert sind. Die RNA der zu untersuchenden Zellen wurde unter Verwendung radioaktiver Nukleotide revers transkribiert und die so markierte cDNA mit den DNA-Sonden hybridisiert. Die benötigten Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Atlas™ Array System entnommen.

2.6.1. DNase Behandlung

Um eine Verunreinigung der verwendeten RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurden die RNA-Proben mit DNase behandelt. Dazu wurde für jede Probe folgender Reaktionsansatz in ein steriles 500 µl Reaktionsgefäß pipettiert:

- 25 µl RNA-Lösung mit etwa 50 µg Gesamt-RNA
- 20 µl steriles RNase-freies H₂O
- 5 µl 10-fach DNase Puffer (Firma Promega, Madison, WI, USA)
- 0,25 µl RNase-freie DNase (Firma Promega, Madison, WI, USA)

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Terminationslösung (Firma Promega, Madison WI, USA) beendet.

Zur Aufreinigung wurden 55 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (Verhältnis 25:24:1) hinzupipettiert, die Lösung durchmischt und für 10 Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Die obere, klare Phase wurde in ein neues Gefäß übertragen. Diese Aufreinigung wurde noch zweimal wiederholt, die RNA durch Zusatz von 10 µl einer 7,5 molaren Kaliumacetatlösung und 125 µl Ethanol präzipitiert, erneut durchmischt, für 20 Minuten bei 14.000 U/Min zentrifugiert und anschließend die Flüssigkeit vollständig aus dem Gefäß entfernt. Das Präzipitat wurde mit 200 µl RNase freiem Ethanol aufgenommen, durchmischt und für 10 Minuten bei 14.000 U/Min zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde mit einer Metallkanüle vorsichtig aus dem Gefäß entfernt, das Präzipitat unter der sterilen Arbeitsbank für 15 Minuten luftgetrocknet und in 20 µl sterilem RNase-freiem Wasser gelöst.

Nach der DNase-Behandlung wurde die RNA-Konzentration erneut gemessen (siehe 2.13.).

2.6.2. Reverse Transkription und radioaktive Markierung

Die RNA der Proben wurde unter Verwendung von radioaktiv markiertem Adenosintriphosphat (ATP) revers transkribiert. Es wurde eine vorgefertigte Oligonukleotid-Lösung (CDS-Primer) verwendet, die spezifisch die Primer für die auf der Membran vorhandenen DNA-Sequenzen enthielt. Hierzu wurde ein Stockansatz mit folgenden Reagenzien in einem sterilen 50 µl Reaktionsgefäß vorbereitet.

- 6 µl 5-fach Reaktionspuffer
- 3 µl 10-fach dNTP Mix
- 1,5 µl DTT (Dithiothreitol)
- 3 µl Superscript II Reverse Transkriptase (Firma Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 10,5 µl [α -³²P] dATP (Firma Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)

In einem neuen Reaktionsgefäß wurden 1 µl CDS Primer und 2 µl RNA-Lösung vermischt und für 2 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 50°C über 2 Minuten wurden 8 µl aus dem Stockansatz hinzupipettiert, vermischt und für 25 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 10-fach Terminationslösung beendet.

2.6.3. Probenaufreinigung

Um die radioaktiv markierte cDNA von freien Nukleotiden zu trennen, wurde eine Probenaufreinigung mit Matrixsäulen (CHROMA SPIN-200 DEPC-H₂O) durchgeführt.

Dazu wurde die Probe auf eine Säule aufgetragen und gewartet, bis die Lösung vollständig von der Matrix absorbiert wurde. Dann wurde in mehreren Teilschritten RNase-freies Wasser auf die Säule aufgetragen, um die Nukleinsäuren in mehreren Fraktionen zu eluieren:

1. Mit 40 µl H₂O, das Eluat wurde verworfen
2. 250 µl H₂O, das Eluat wurde als „Fraktion 0“ aufbewahrt.
3. Sechs mal mit jeweils 100 µl H₂O, die Eluate bildeten die Fraktionen 1 bis 7

Die Eluate wurden in einem Szintillationszähler auf ihre Radioaktivität überprüft. Dabei ergab sich ein zweigipfliger Verlauf der Radioaktivitätskurve, mit den freien Nukleotiden im ersten und der radioaktiv markierten cDNA im zweiten Maximum. Für die Hybridisierung wurden die ersten beiden Fraktionen des zweiten Radioaktivitätsmaximums verwendet.

2.6.4. Prähybridisierung

Vor der Hybridisierung mit der radioaktiven cDNA-Probe wurde die Nylon-Membran mit einer Hering-Sperma-DNA-Lösung (Firma Sigma, Springfield, NY, USA) prähybridisiert. Zum Erstellen der Prähybridisierungslösung wurden 3 µg Hering-Spermien-DNA für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, dann kurz auf Eis abgekühlt und in 30 ml ExpressHyb-Lösung mit einer Temperatur von 68°C gegeben. Jede AtlasTM Nylon Membran wurde in einer Hybridisierungsflasche mit 10 ml Prähybridisierungslösung unter Rotation für 30 Minuten bei 68°C inkubiert.

2.6.5. Hybridisierung

Die radioaktiv markierte cDNA wurde in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 22 µl Denaturierungslösung (1 M NaOH, 10 mM EDTA) vermischt und für 20 Minuten bei 68°C denaturiert. Anschließend wurden zur Blockierung von Bindungsstellen für repetitive DNA-Sequenzen 5 µl C₀t-1 DNA und 227 µl Neutralisierungslösung (1 M NaH₂PO₄, pH 7) hinzugegeben und die Lösung für 10 Minuten bei 68°C inkubiert. Diese Lösung wurde mit 5 ml Prähybridisierungslösung vermischt, so dass etwa 5,5 ml Hybridisierungslösung entstanden. Die AtlasTM Nylon Membran wurde in einer Hybridisierungsflasche mit der Hybridisierungslösung unter Rotation über Nacht bei 68°C inkubiert.

2.6.6. Waschen der Membran und Exposition

Zwei verschiedene Waschlösungen wurden vorbereitet; Waschlösung 1 mit 2-fach SSC (150 mM Natriumchlorid, 150 mM Natriumzitat) und 1% SDS (Natriumdodecylsulfat) in H₂O, Waschlösung 2 mit 0,1x SSC und 0,5% SDS in H₂O. Die Membran wurde bei 68°C unter Rotation mit jeweils 50 ml Waschlösung gewaschen; zunächst mit Lösung 1 für jeweils 25, 15 und 5 Minuten, dann mit Lösung 2 für zwei Mal 5 Minuten. Die Membran wurde aus der Flasche entfernt, in Kunststofffolie eingelegt und in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Firma Kodak) exponiert. Die Expositionszeiten lagen zwischen 6 und 48 Stunden, der Film wurde anschließend maschinell entwickelt.

2.6.7. Auswertung

Die entwickelten Filme wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen und mit dem Programm AtlasImageTM (Firma Clontech) ausgewertet. Dabei wurde Intensität der durch die Radioaktivität geschwärzten Punkte auf dem Röntgenfilm verglichen. Es wurde ein Hintergrund-Wert für jede einzelne

Membran ermittelt und in die Berechnung der Daten einbezogen. Die Expressionsintensität der zu untersuchenden Gene wurde im Verhältnis zur derjenigen von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Ubiquitin, zweier nicht signifikant regulierter Gene, normalisiert. Die Expression eines Genes auf den zu vergleichenden Membranen wurde dann als unterschiedlich gewertet, wenn die festgelegten Schwellenwerte für das Verhältnis der Intensitäten (ratio threshold) oder die Differenz zwischen den Intensitäten (difference threshold) überschritten wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Explantation und Isolierung der Pankreasfibroblasten

Die Explantation der Proben menschlichen Pankreasgewebes erfolgte durch Fixierung der Gewebestückchen in Zellkulturschalen mit kleinen Tropfen menschlichen Blutplasmas. Die Hälfte der Kulturschalen wurde zuvor mit Extrazellulärmatrix beschichtet (Abb. 1).

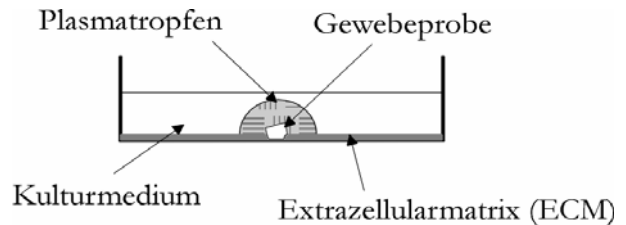


Abb. 1 Schematische Darstellung der Explantationstechnik.

Die Fixierung der Proben am Boden der

Kulturschale war für ein Auswachsen von fibroblastären Zellen unbedingt erforderlich. In Versuchen ohne Fixierung der Gewebestückchen konnte kein Auswachsen der Fibroblasten beobachtet werden. Auch bei nicht erfolgreicher Fixierung der Proben fand kein Auswachsen statt. Somit ist das Auswachsen nicht allein vom Zusatz menschlichen Blutplasmas abhängig, sondern war in jedem Fall abhängig von einer Anheftung der Proben. Die Zellen in den Gewebestücken waren während der Phase des Auswachsens dem Einfluss der in den Plasmotropfen enthaltenen Faktoren ausgesetzt.

Das Auswachsen der Fibroblasten wurde in Phasen- und Varelkontrastmikroskopie beobachtet. Nach etwa 5 Tagen konnten die ersten auswachsenden Zellen um die fixierten Gewebestückchen beobachtet werden; nach 2-3 Wochen bildete sich ein dichter Hof auswachsender Zellen um die Gewebeproben (Abb. 2).

Die Explantate in Kulturschalen mit Extrazellulärmatrix (ECM) zeigten ein beschleunigtes Auswachsen verglichen mit den Explantaten, die ohne Beschichtung direkt auf den Kunststoffschalen fixiert wurden.

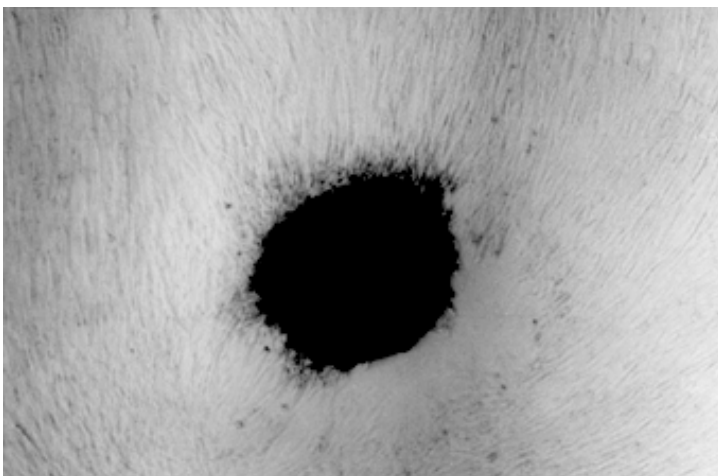


Abb. 2 Mikroskopische Aufnahme der Explantationstechnik im Varelkontrast. Eine Probe menschlichen Pankreasgewebes ist umgeben von einem dichten Rasen auswachsender fibroblastärer Zellen.

3.2. Morphologische Charakterisierung isolierter Pankreasfibroblasten

Die lebenden isolierten Zellen wurden im Varel- und Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Die Morphologie der Pankreasfibroblasten in Kultur war abhängig von der Gegenwart von Extrazellulärmatrix. So zeigten die Zellen in ECM-beschichteten Kulturschalen ein langgezogen spindelförmiges Aussehen mit schmalen Zellausläufern, während Zellen in unbeschichteten Schalen weit ausgebreitet erschienen (Abb. 3).

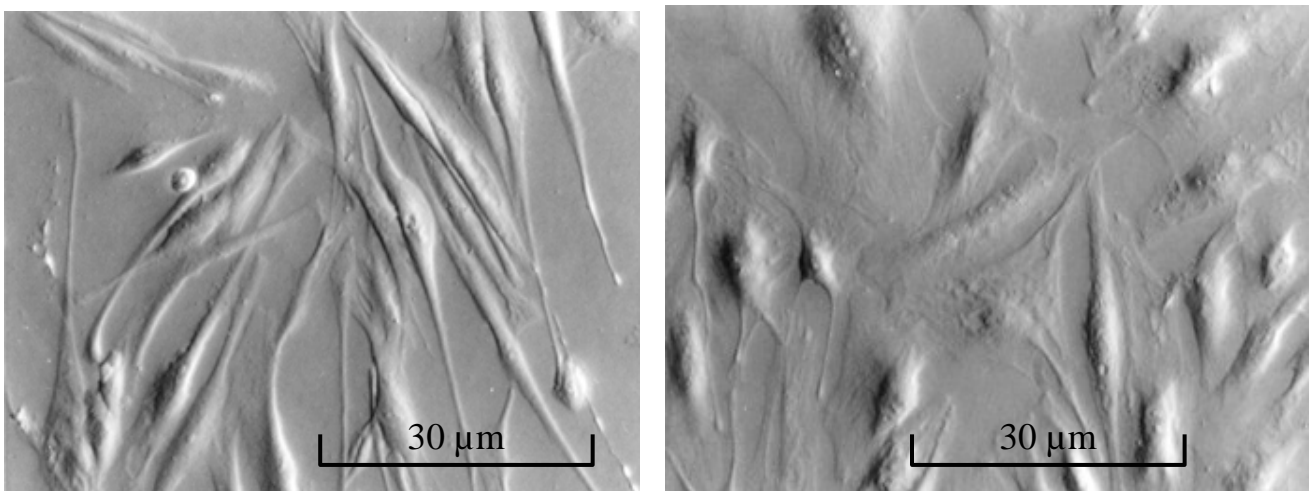


Abb. 3 Varelkontrastmikroskopische Aufnahmen lebender Pankreasfibroblasten in Kultur. Die linke Aufnahme zeigt Zellen auf Extrazellulärmatrix in langgezogener Spindelform, die rechte Aufnahme weit ausgebreitete Zellen in Kulturschalen ohne Beschichtung.

3.3. Mikroskopischer Nachweis von Lipiden durch Ölrotfärbung

Lipidspeicherung ist ein wesentliches Merkmal von Pankreassternzellen der Ratte, die basierend auf ihrem Lipidgehalt isoliert werden. Um Lipidspeicherung in menschlichen Pankreasfibroblasten nachzuweisen wurde eine Ölrot-Färbung durchgeführt, die saure und neutrale Lipide anfärbt. Es zeigten sich Ölrot-positive Vakuolen in juxt nukleärer Position in etwa der Hälfte der untersuchten Zellen (Abb. 4). Dabei konnte keine signifikante Abhängigkeit der Fettspeicherung isolierter Zellen von Passagezahl und Gegenwart bzw. Abwesenheit von ECM festgestellt werden.

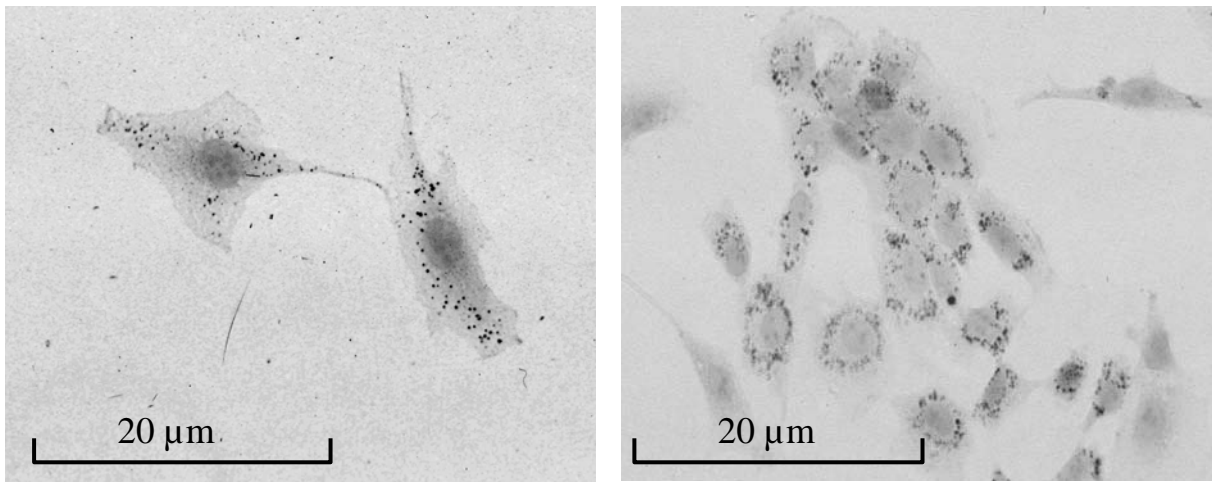


Abb. 4 Isolierte Pankreasfibroblasten in Ölrotfärbung zeigen eine kernnahe Anreicherung lipidspeichernder Vakuolen.

3.4. Nachweis von zytoskelettalen Proteinen in der Immunfluoreszenz

Zur näheren Charakterisierung der isolierten Zellen wurden die Intermediärfilamente Vimentin und Desmin und das Mikrofilament α SMA (alpha Smooth Muscle Actin) mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen.

Vimentin diente dem Nachweis des mesenchymalen Ursprungs der untersuchten Zellen. Alle isolierten Zellen wiesen dieses Intermediärfilament auf. Es wurde kein Unterschied in der Vimentin-Expression in Abhängigkeit von Passagezahl oder An- bzw. Abwesenheit von ECM beobachtet. Vimentinfasern bildeten ein dichtes Netzwerk im gesamten Zytoplasma einschließlich sehr schmaler Ausläufer.

Das Intermediärfilament Desmin gilt als Markerprotein für hepatische und pankreatische Sternzellen. Es konnte in 20-70% aller isolierten Zellen nachgewiesen werden und trat dann meist nicht in Form langgezogener Fasern, sondern in einem eher punktierten Muster auf (Abb. 5). Auch für Desmin ergab sich eine Expression unabhängig von der Passagezahl und der Zellkulturbedingungen bezüglich ECM.

Die Alpha-Isoform des Aktins glatter Muskelzellen (α SMA) als charakteristisches zytoskelettales Protein aktivierter Sternzellen zeigte eine Abhängigkeit von der Anzahl der Passagen. In der Auszählung gefärbter Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie waren von den frisch ausgewachsenen Fibroblasten nach der ersten Passage im Mittel nur 37% α SMA-positiv, während dieser Anteil nach 6 Passagen im Mittel auf 67% angestiegen war (Abb. 6).

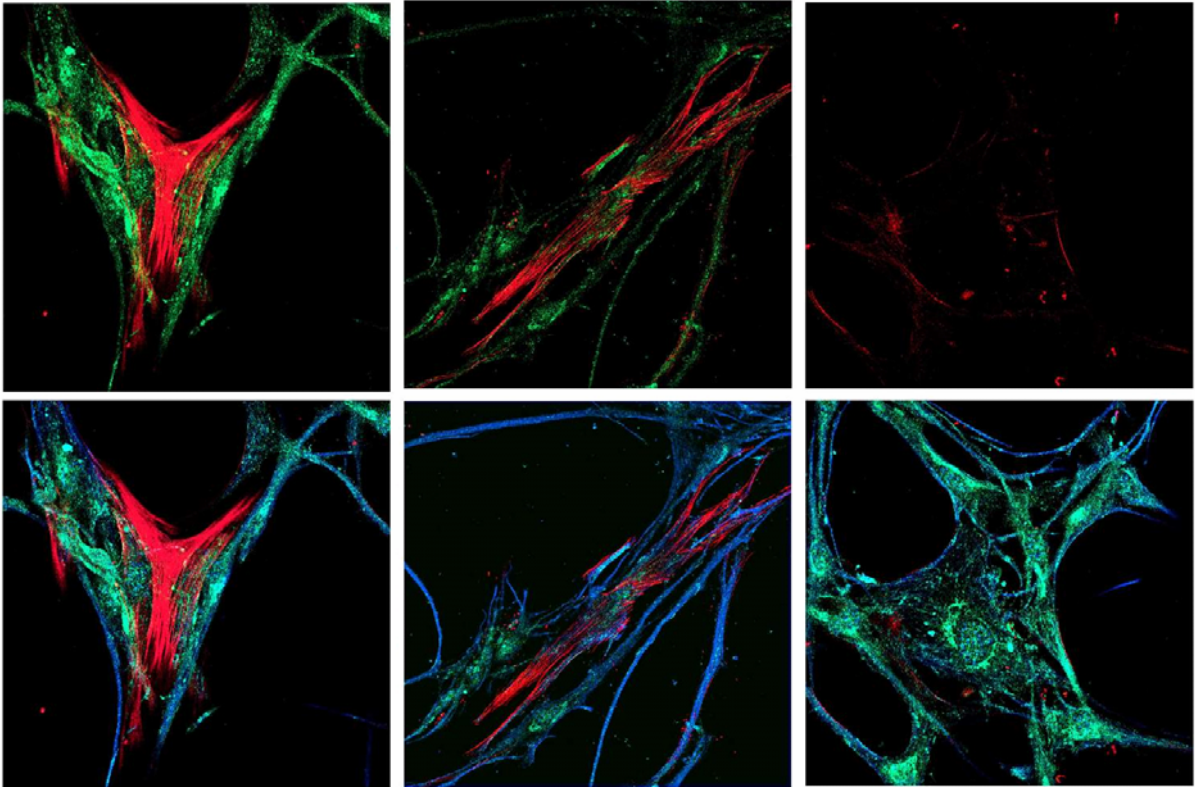


Abb. 5 Mikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenz-Mehrfachfärbungen zytoskelettaler Proteine in humanen Pankreasfibroblasten mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. In der oberen Zeile sind die Zellen nach Färbung von Desmin (grün) und alpha-Glattmuskelaktin (α SMA, rot) gezeigt. In der unteren Zeile wird im selben Ausschnitt zusätzlich eine Färbung von Vimentin (blau) dargestellt. Die Färbungen zeigen die Variabilität der α SMA-Expression in humanen Pankreasfibroblasten in Kultur mit von links nach rechts abnehmendem Expressionsgrad. Alle gezeigten Zellen wurden auf Extrazellulärmatrix kultiviert.

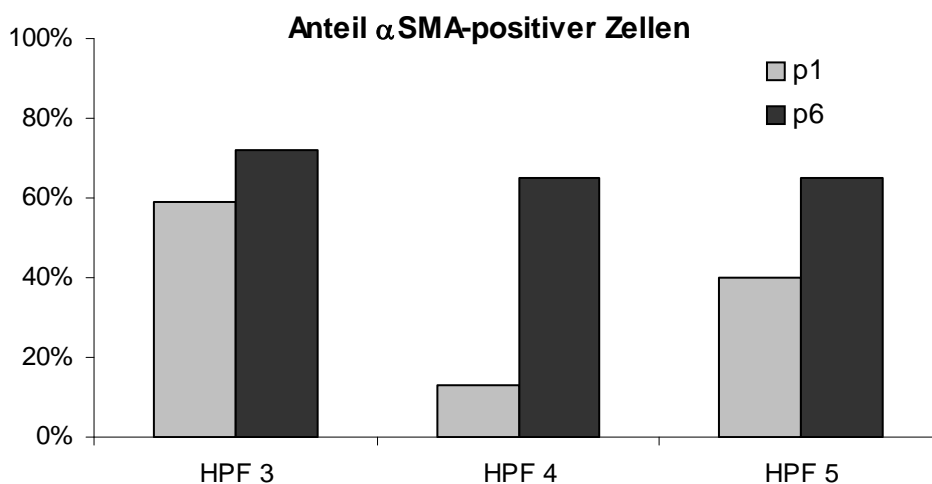


Abb. 6 Darstellung des Anteils α SMA-positiver Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie aus drei Zelllinien humaner Pankreasfibroblasten (HPF) in der ersten (p1) und sechsten (p6) Passage.

3.5. Wachstumsverhalten der Fibroblasten in Kultur

28 Tage nach der Explantation wurden die Gewebestückchen aus den Zellkulturschalen entfernt und die ausgewachsenen Zellen erstmals passagiert. Die passagierten Zellen konnten für einige Wochen in Kultur gehalten werden. Nach jeweils 6 Tagen erfolgte eine erneute Passage. Zur Dokumentation der Vermehrungsrate der isolierten Zellen wurden die Zellen bei jeder Passage gezählt und ein Vermehrungsfaktor (als Quotient aus Zellzahl in folgender Passage geteilt durch Zellzahl in vorheriger Passage) errechnet.

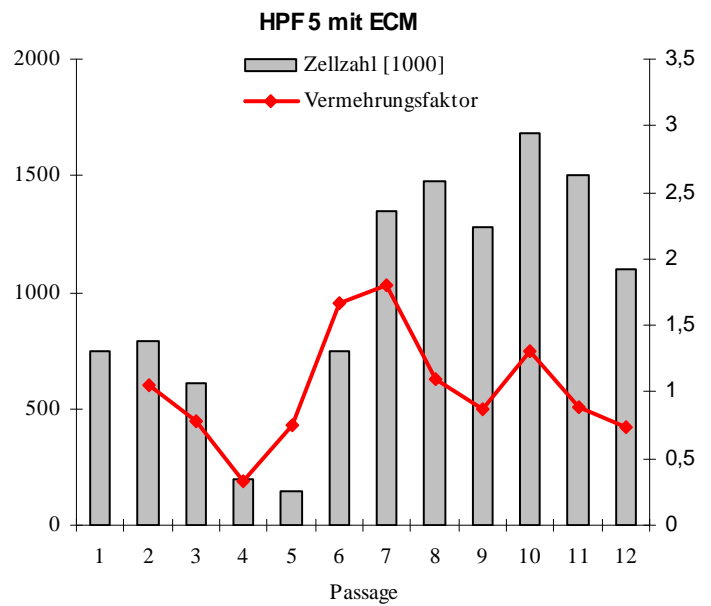
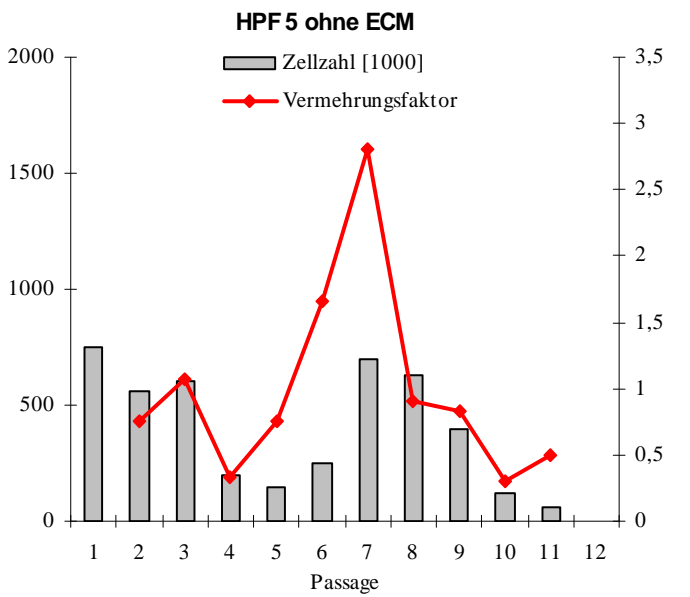
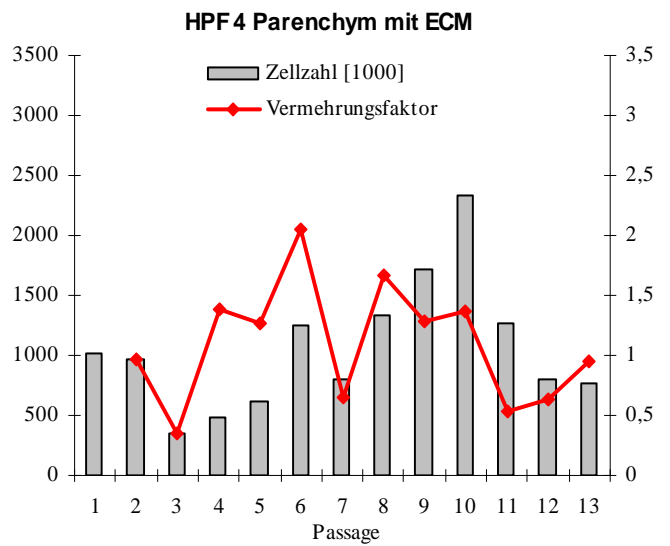
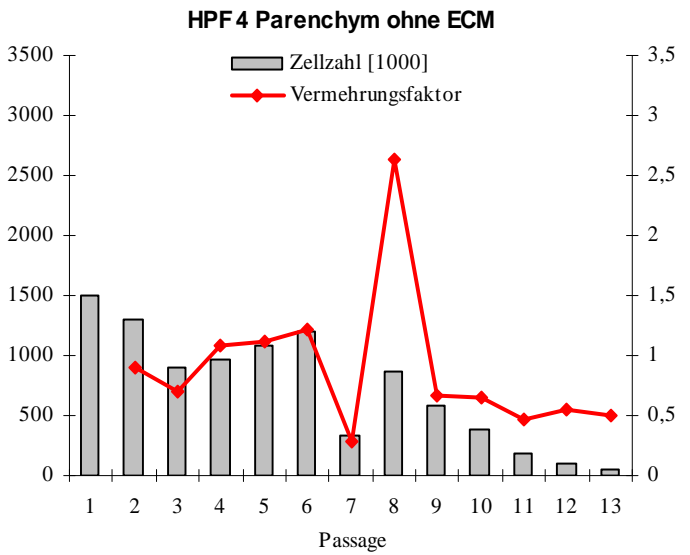
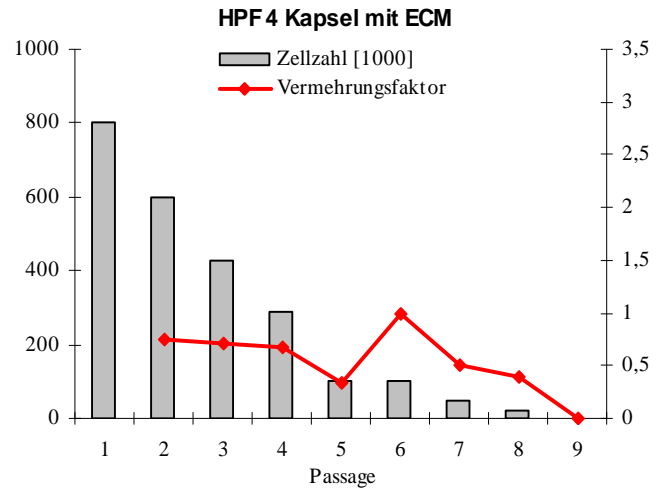
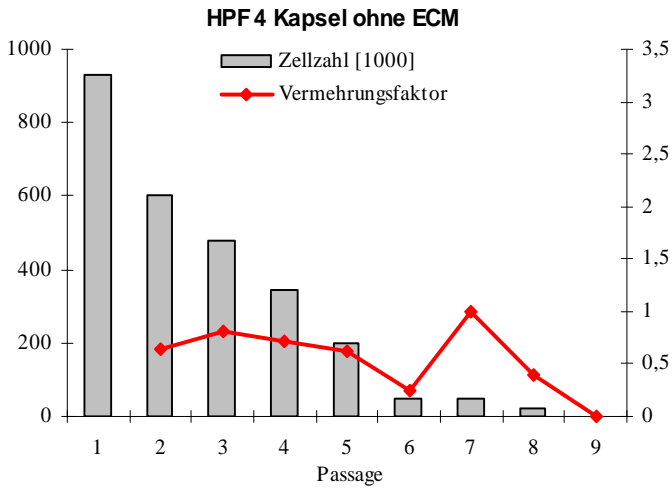
Einige Isolate zeigten dabei zumindest in den frühen Passagen eine hohe Mitoserate, während andere mit fortlaufender Passage ständig abnehmende Zellzahlen lieferten. In den kultivierten Isolaten wurde ein verbessertes Wachstumsverhalten der Kulturen auf Extrazellulärmatrix beobachtet. Die Zellen in ECM-beschichteten Kulturschalen blieben insbesondere in den späteren Passagen deutlich länger lebensfähig (Abb. 7).

Die Kurve der Vermehrungsfaktoren weist zumeist einen zweigipfligen Verlauf auf; mit einem ersten Gipfel >1 in den ersten drei Passagen und einem zweiten Anstieg über 1 um Passagen 7-8, sofern diese erreicht wurden. Nach spätestens 10 Passagen nahmen die Zellzahlen aller Isolate kontinuierlich ab (Abb. 7). Nach etwa 15 Passagen ließen sich nur noch wenige Zellen gewinnen.

Die Proben menschlichen Pankreasgewebes, die zur Explantation verwendet wurden, bilden eine heterogene Gruppe in Bezug auf Alter und Erkrankung der Patienten. So fällt auf, dass aus der Gewebeprobe des jüngsten Patienten (HPF 6) initial deutlich mehr Zellen auswachsen als aus den anderen Proben. Die Zellen aus der Probe des ältesten Patienten (HPF 7) hingegen zeigten zwar zunächst ein gutes Auswachsen, ließen sich jedoch nach Isolierung nicht lange in Kultur halten, so dass für HPF7 nur die sechste Passage erreicht wurde.

Beim Isolat HPF4 wurde eine Gewebeprobe aus der Organkapsel und eine Probe aus dem Parenchym zur Explantation verwendet. Auch die beiden aus diesen Proben ausgewachsenen Zellreihen verhielten sich unterschiedlich; die Zellen aus der Parenchym-Probe waren in Kultur länger lebensfähig und wiesen besonders in den späteren Passagen eine nochmals verbesserte Lebensfähigkeit in Anwesenheit von ECM auf (Abb. 7).

Zellreihe	Alter des Patienten [Jahre]	Diagnose	Zellzahl in Passage 1
HPF 4	64	Chronische Pankreatitis	4240
HPF 5	59	Papillenkarzinom	10650
HPF 6	49	Chronische Pankreatitis	22650
HPF 7	69	Papillenkarzinom	10640



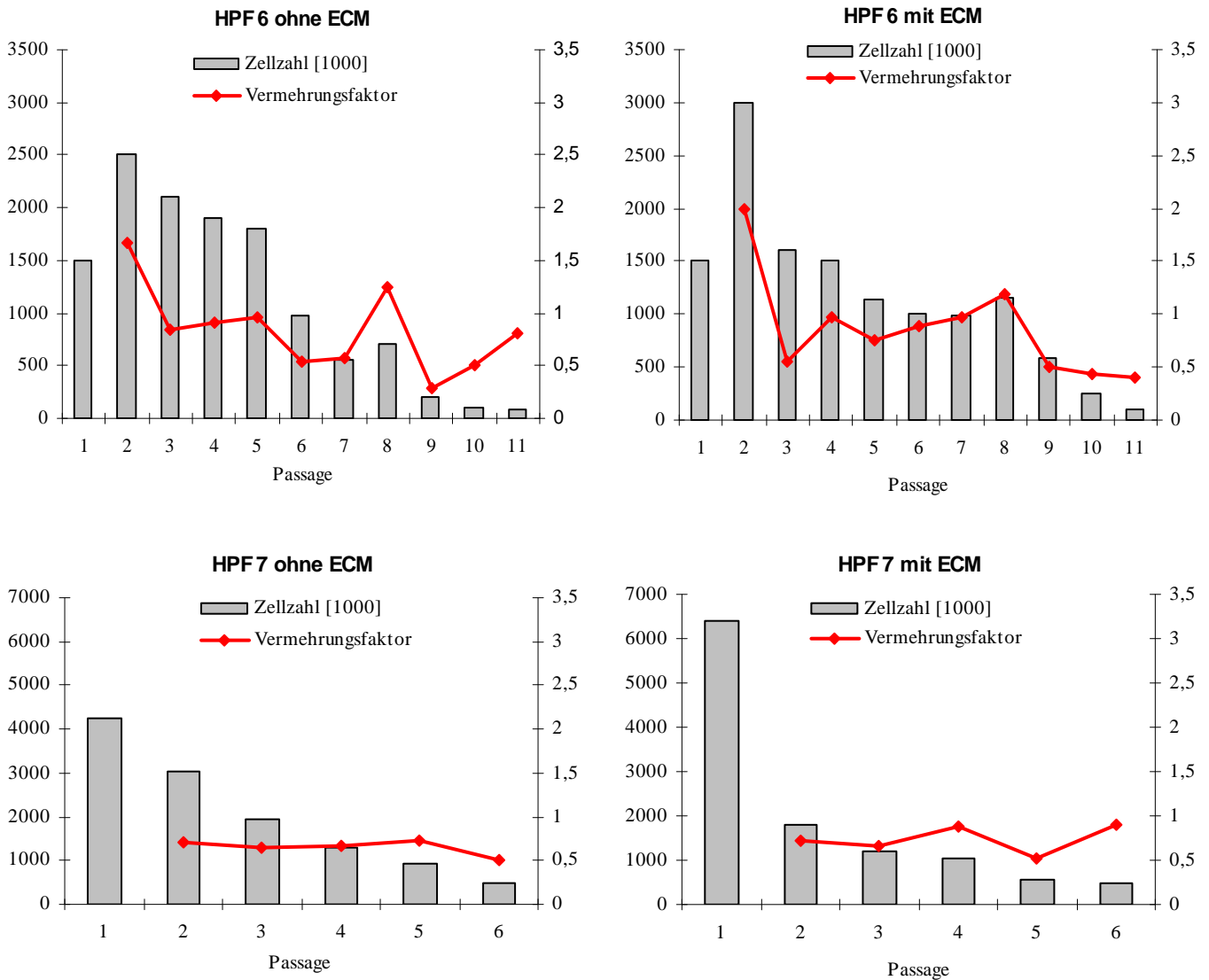


Abb. 7 Wachstumsverhalten mehrerer Isolate humaner Pankreasfibroblasten (HPF) auf Extrazellulärmatrix (ECM) und auf Kunststoff. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen in jeder Passage und die Vermehrungsfaktoren vor der betreffenden Passage. Ein Vermehrungsfaktor >1 beschreibt somit eine Zunahme der Zellzahl in Kultur.

3.6. Funktionelle Untersuchungen an lebenden Pankreasfibroblasten mit MTS-Tests

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung verschiedener Wachstumsfaktoren für humane Pankreasfibroblasten in Kultur wurden MTS-Farbstofftests durchgeführt. Neben der Aktivität unter Einsatz verschiedener Wachstumsfaktoren im Kulturmedium wurde zusätzlich das Ansprechen bei niedriger bzw. hoher Wachstumsdichte der Zellen untersucht. Nachdem humane Pankreasfibroblasten in Mikrotiterplatten ausgesät und mit Kulturmedien mit verschiedenen Zusätzen für jeweils 24 Stunden inkubiert wurden, wurde eine Farbstofflösung hinzugegeben, die von stoffwechselaktiven Zellen zu

einem farbigen Produkt reduziert wird. Zur Auswertung wurden die Zellen in Medien mit unterschiedlichem Gehalt an Wachstumsfaktoren jeweils mit einer Kontrollgruppe in serumfreiem Medium verglichen.

3.6.1. Aktivität der Zellen nach Inkubation mit fetalem Kälberserum

Nach 24 Stunden Inkubation in Kulturmedium mit 10 % Gehalt an fetalem Kälberserum (FCS) zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien eine vermehrte Stoffwechselaktivität gegenüber den Zellen in serumfreiem Medium. Das Ausmaß der Wachstumsantwort war dabei von der Dichte der ausgesäten Zellen abhängig; so ließen sich Pankreasfibroblasten in geringer Aussaatdichte von 250 Zellen pro Vertiefung durch FCS zu einer ausgeprägteren Steigerung der Wachstumsaktivität stimulieren als in größerer Dichte von 1000 Zellen pro Vertiefung (Abb. 8). Dieses Phänomen legt eine Kontaktinhibition der dicht wachsenden Zellen nahe, die die Wachstumsantwort auf Serumfaktoren begrenzt.

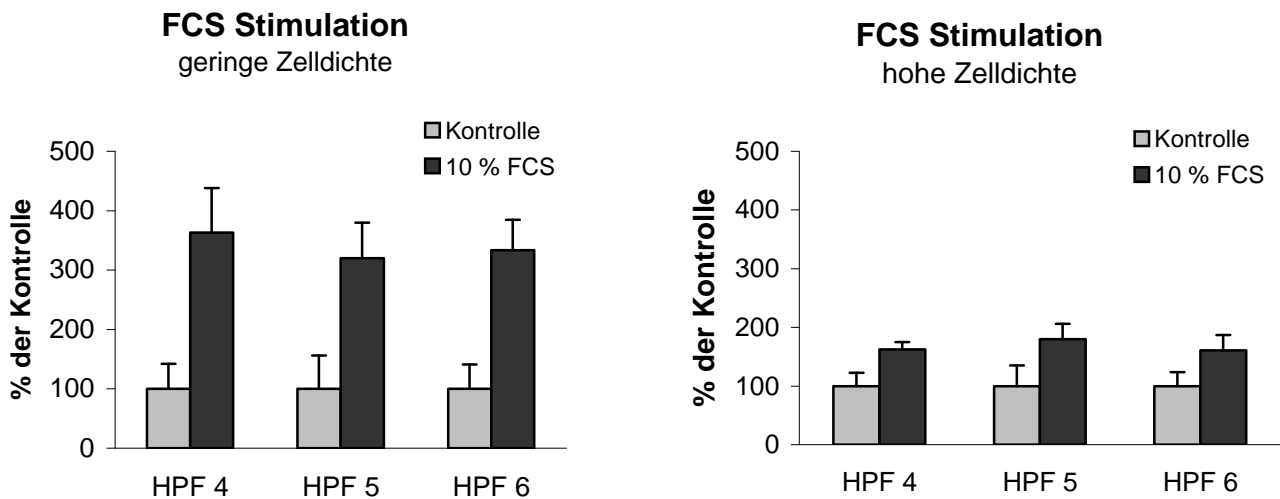


Abb. 8 Wachstumsantwort nach Inkubation mit serumfreiem Kontrollmedium und nach Stimulation mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS). Dargestellt sind drei Zelllinien humaner Pankreasfibroblasten (HPF) jeweils in geringer und hoher Aussaatdichte.

3.6.2. Aktivität der Zellen nach Inkubation mit Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Platelet Derived Growth Factor (PDGF) wurde als ein wichtiger Wachstumsfaktor in pankreatischen Sternzellen beschrieben (Luttenberger et al. 2000). Um die Bedeutung von PDGF als Wachstumsfaktor bei den isolierten humanen Pankreasfibroblasten zu untersuchen,

wurden Stimulationstests mit PDGF in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Als Kontrollen dienten serumfreies Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und fetales Kälberserum (FCS), das multiple Wachstumsfaktoren enthält. Es zeigte sich eine tendenziell vermehrte Stoffwechselaktivität nach PDGF-Stimulation gegenüber der Kontrollreihe (Abb. 9). Der positive Effekt von PDGF auf das Wachstum erreichte bei geringer Zelldichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p > 0,1$), hier konnte nur mit FCS eine signifikante Wachstumssteigerung erzielt werden ($p < 0,001$). In hoher Zelldichte hingegen war die PDGF-Stimulation signifikant ($p < 0,01$), ohne sicheren Hinweis auf eine Abhängigkeit von der PDGF-Konzentration.

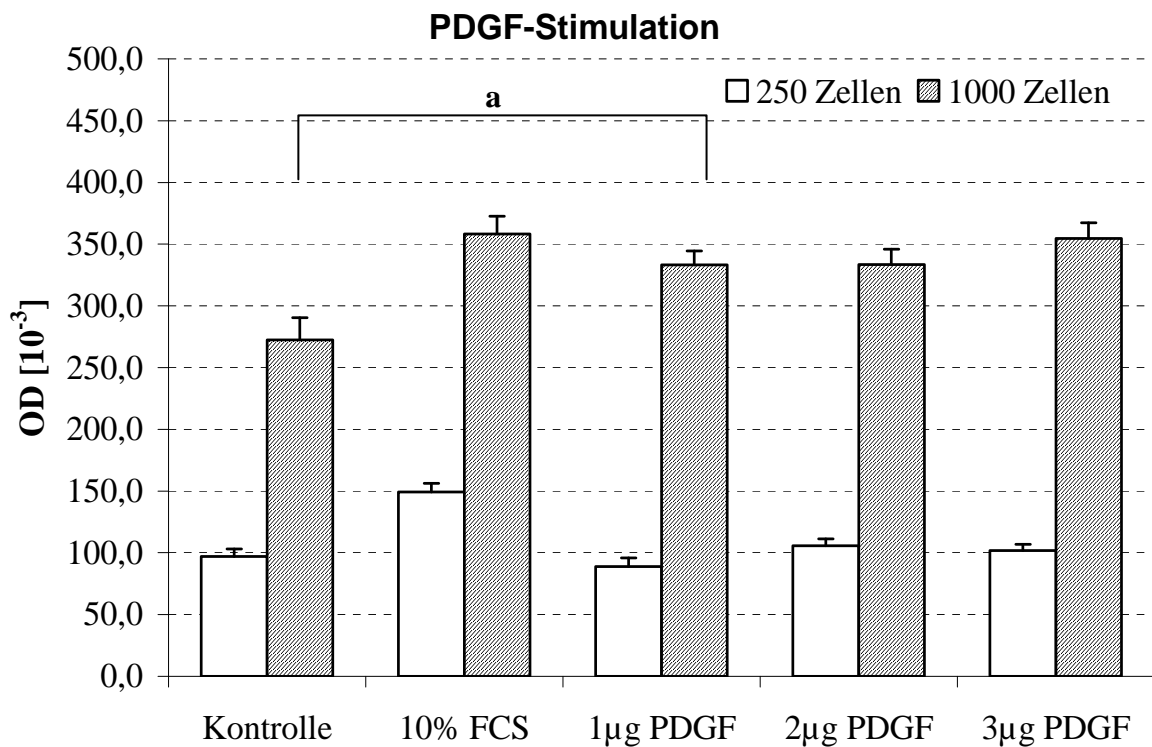


Abb. 9 Effekt der Stimulation humaner Pankreasfibroblasten durch Platelet Derived Growth Factor (PDGF) bei geringer (250 Zellen pro well) und bei hoher (1000 Zellen pro well) Zelldichte. Das Diagramm zeigt Daten einer Zelllinie auf Extrazellulärmatrix nach Inkubation in serumfreiem Kontrollmedium und nach Stimulation mit fetalem Kälberserum (FCS) und mit PDGF in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 2 und 3 µg/ml). Es zeigt sich eine signifikante Wachstumssteigerung nach Stimulation mit PDGF bei hoher Zelldichte (n=16).

3.7. Expression von Kollagen in Pankreasfibroblasten

Fibroblastäre Zellen sind Produzenten von Extrazellulärmatrix (ECM). In den isolierten Zellen wurden die ECM-Proteine Kollagen Typ 1, das nach abgeschlossener Wundheilung die wichtigste Komponente der fibrotischen Reaktion darstellt, und Kollagen Typ 3, das im Rahmen der Wundheilung als Bestandteil von Granulationsgewebe produziert wird, nachgewiesen. Der Nachweis der Produktion von Kollagen in den isolierten Zellen erfolgte auf RNA-Ebene durch Reverse Transkription mit anschließender PCR und auf Protein-Ebene durch Western-Blot.

3.7.1. Nachweis der Kollagenproduktion mittels PCR

In der RT-PCR wurde die Produktion von mRNA für die Kollagene der Typen 1 und 3 nachgewiesen (Abb. 10). Zur Kontrolle der Spezifität der Oligonukleotide, die zur Amplifikation verwendet wurden, wurden neben den Proben kommerziell erhältliche Positivkontrollen amplifiziert. In den untersuchten Zelllinien konnte mRNA für Kollagen Typ 1 sowie Kollagen Typ 3 nachgewiesen werden. Die Kontrollreaktionen mit nicht revers transkribierter RNA lieferten kein erkennbares Signal, so dass eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte. Zur weiteren Kontrolle der Spezifität der verwendeten Oligonukleotide wurden zusätzlich nested-PCRs durchgeführt. Dabei wird mit einem weiteren Satz von Oligonukleotiden ein Nukleinsäure-Strang innerhalb des primären PCR-Produktes amplifiziert.

Zur Untersuchung der Auswirkung von TGF β 1 auf die Kollagen-Expression der Zellen wurde die mRNA aus Zellen isoliert, die für 24 Stunden unter drei verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden:

1. Inkubation in serumfreiem Medium
2. Inkubation in serumfreiem Medium mit TGF β 1
3. Inkubation in serumfreiem Medium mit inhibierendem Anti-TGF β -Antikörper

Das Kulturmedium aller 3 Gruppen wurde nach 12 Stunden erneuert, um den Einfluss endogen produzierter Faktoren zu minimieren. Es zeigten sich keine Unterschiede in der mRNA-Menge von Kollagen Typ 1 bzw. Kollagen Typ 3 in Abhängigkeit von TGF β 1 nach 24 Stunden.

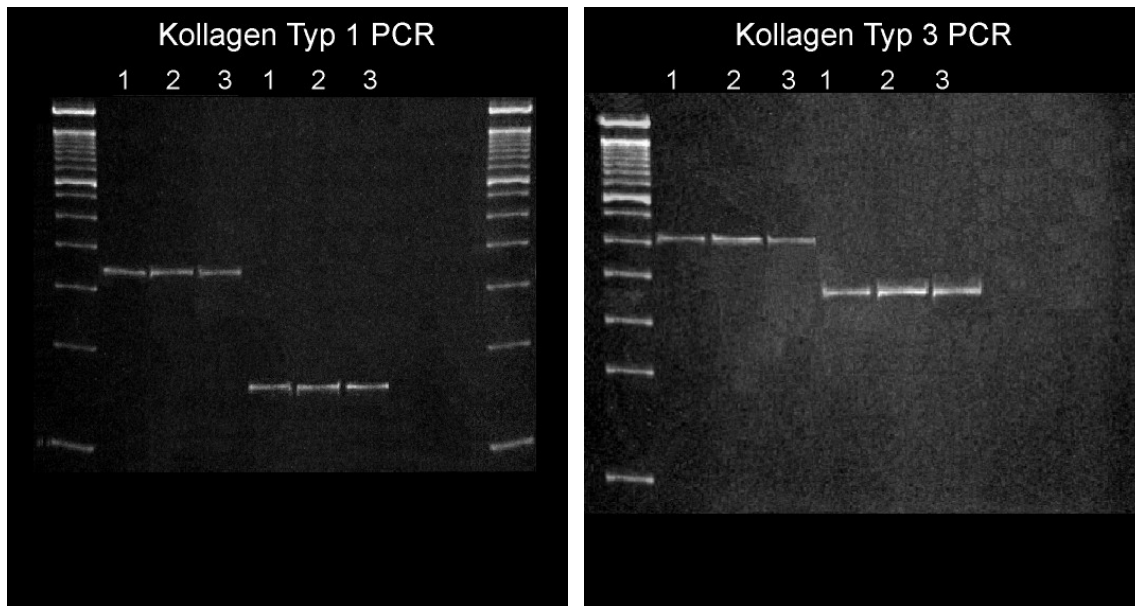
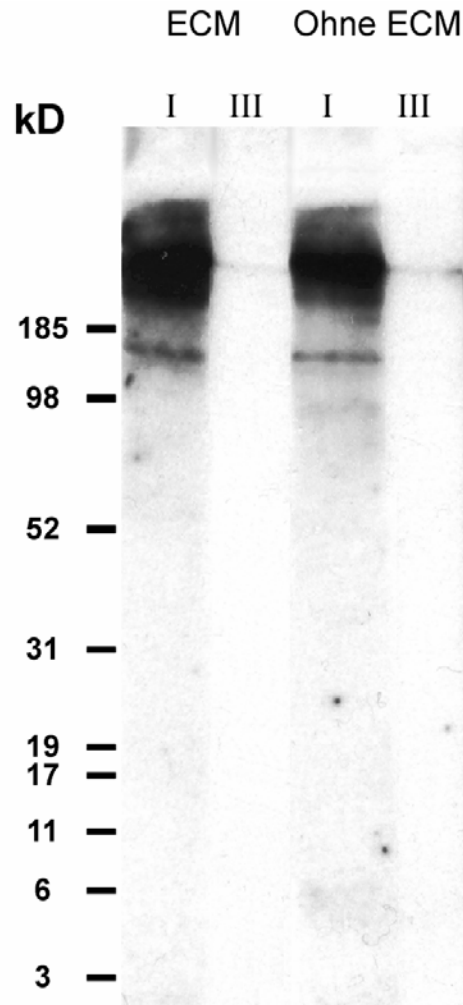


Abb. 10 RT-PCR Analyse für die Kollagene Typ 1 und Typ 3 in humanen Pankreasfibroblasten. Die Expression von Kollagen Typ 1 und 3 war in der Kontrolle in serumfreiem Medium (Spur 1), nach TGF β 1-Stimulation (Spur 2) und nach TGF β 1-Inhibition (Spur 3) identisch. Zur Kontrolle der Spezifität der verwendeten Oligonukleotide wurden zu jeder Probe nested-PCRs sekundär amplifiziert (die jeweils rechts gelegenen Spuren).

3.7.2. Nachweis der Kollagenproduktion mittels Western-Blot

Auf Protein-Ebene wurde die Kollagen-Produktion von humanen Pankreasfibroblasten mittels Western-Blot nachgewiesen. Durch die Verwendung von Zelllysaten erfolgte der Nachweis intrazellulärer Proteine. Dabei lieferte Kollagen Typ 1 ein weit stärkeres Signal als Kollagen Typ 3 (Abb. 11). Zellen, die auf ECM-beschichteten Kulturschalen kultiviert wurden, lieferten für beide Kollagen-Typen ein Signal etwa gleicher Stärke wie Zellen, die auf unbeschichtetem Kunststoff kultiviert wurden.

Abb. 11 Western-Blot-Analyse der Kollagen-Typ 1 und Typ 3-Produktion in humanen Pankreasfibroblasten auf Extrazellulärmatrix (ECM) und ohne ECM. Das Kollagen Typ 3-Signal ist nur schwach bei etwa 400 kD erkennbar. Kollagen Typ 1 liefert ein deutliches Signal bei 400 kD sowie bei 150 kD, was sich durch ein Auflösen der Tripelstruktur der Kollagen-Helix und somit Detektion einer einzelnen Alpha-Helix erklärt.



3.8. Expression, Sekretion und Bedeutung von Transforming Growth Factor beta (TGF β)

Transforming Growth Factor beta1 (TGF β 1) ist ein wichtiger Faktor zur Aktivierung und Regulation der Produktion von Extrazellulärmatrix in fibroblastären Zellen des Pankreas (Apte et al. 1998). Als primärer Ursprung von TGF β 1 im Pankreas werden epitheliale Azinuszellen diskutiert. Die nachfolgenden Ergebnisse belegen, dass die durch Auswachsen gewonnenen humanen Pankreasfibroblasten selbst in der Lage sind, TGF β 1 zu produzieren und in aktiver Form zu sezernieren.

3.8.1. Nachweis der Expression von TGF β 1 durch RT-PCR

Der Nachweis der Expression des Gens für TGF β 1 in humanen Pankreasfibroblasten erfolgte durch Reverse Transkription der mRNA, anschließende Amplifikation durch PCR und Auftrennung durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Abb.12).

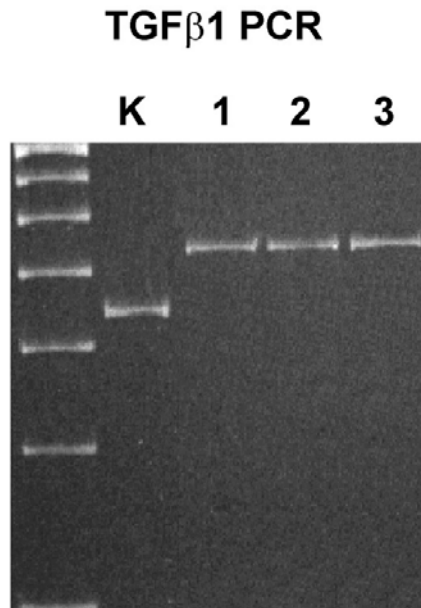


Abb. 12 PCR-Analyse der TGF β 1-Expression in humanen Pankreasfibroblasten. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einer Zelllinie, die unter unterschiedlichen Matrix-Konditionen kultiviert wurde. Die Zellen der Probe 1 wurden ständig auf Extrazellulärmatrix (ECM) kultiviert; die Zellen der Probe 2 wurden nach einigen Passagen von nicht-ECM-beschichteten Kulturen auf ECM transferiert, und die Zellen der Probe 3 wurden ständig ohne ECM gehalten. In Spur K ist die Positivkontrolle dargestellt.

In allen untersuchten Zelllinien konnte eine Expression von TGF β 1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Der Nachweis war positiv sowohl in Zellen, die auf Extrazellulärmatrix kultiviert wurden, als auch in Zellen ohne ECM. Die durchgeführten Kontrolluntersuchungen mit nicht revers transkribierter RNA lieferten kein Signal, so dass eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte.

3.8.2. Nachweis von sezerniertem TGF β 1 in Zellkulturmedium durch ELISA

Die Sekretion von aktivem TGF β 1 durch humane Pankreasfibroblasten in das umgebende Zellkulturmedium wurde mittels ELISA untersucht. Nach 24 Stunden Inkubation in serumfreiem Medium wurde die TGF β 1-Konzentration im Kulturmedium bestimmt.

Als Negativkontrolle wurde die TGF β 1-Konzentration in serumfreiem Medium ohne Inkubation mit Pankreasfibroblasten bestimmt und lieferte keinen Nachweis von TGF β 1.

In den untersuchten Mediumüberständen nach 24 Stunden Inkubation konnte die TGF β 1-Isoform sowohl in latenter als auch in aktivierter Form nachgewiesen und quantifiziert werden (Abb. 13). Die Menge des latenten TGF β 1 lag dabei deutlich höher als die des bereits aktivierten TGF β 1.

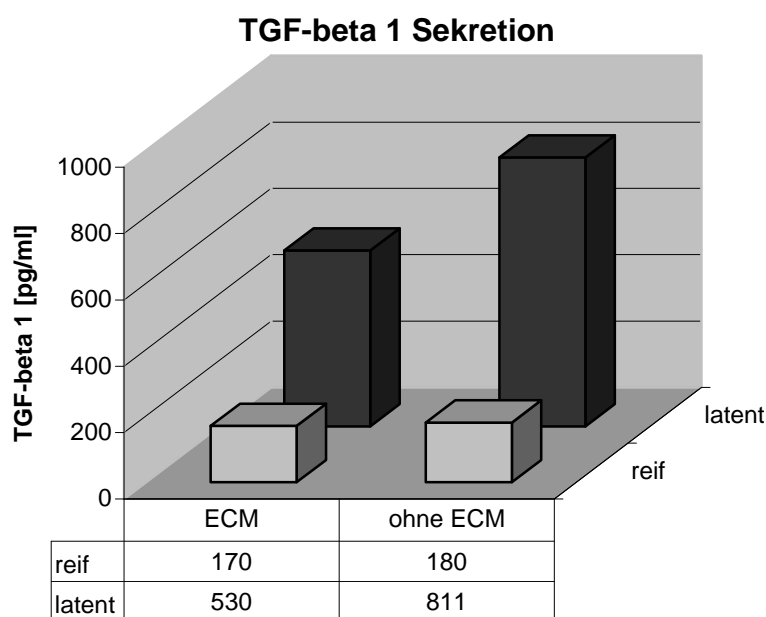


Abb. 13 ELISA-Untersuchung der Sekretion von TGF β 1 in das umgebende Zellkulturmedium. Dargestellt ist jeweils die TGF β 1-Konzentration im Kulturmedium nach 24 Stunden Inkubation.

3.8.3. Nachweis der Expression von TGF β -Rezeptoren durch RT-PCR

Die obigen Ergebnisse belegen eine Produktion von TGF β 1 durch die isolierten Pankreasfibroblasten. Die Wirkung von TGF β wird über membranständige Rezeptoren

vermittelt. Um eine Wirkung auf Pankreasfibroblasten auszuüben, muss daher in den Zielzellen eine Expression von TGF β -Rezeptoren vorliegen. Es werden TGF β -Rezeptoren der Typen 1, 2 und 3 unterschieden, dabei haben die Rezeptor-Typen 1 und 2 eine hohe Affinität für die TGF β 1-Isoform.

Zum Nachweis der Expression von TGF β -Rezeptoren in humanen Pankreasfibroblasten auf mRNA-Ebene wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Expression der TGF β -Rezeptoren der Typen 1 und 2 konnte dabei unabhängig von der Gegenwart oder Abwesenheit einer ECM-Beschichtung der Kulturschalen nachgewiesen werden (Abb. 14).

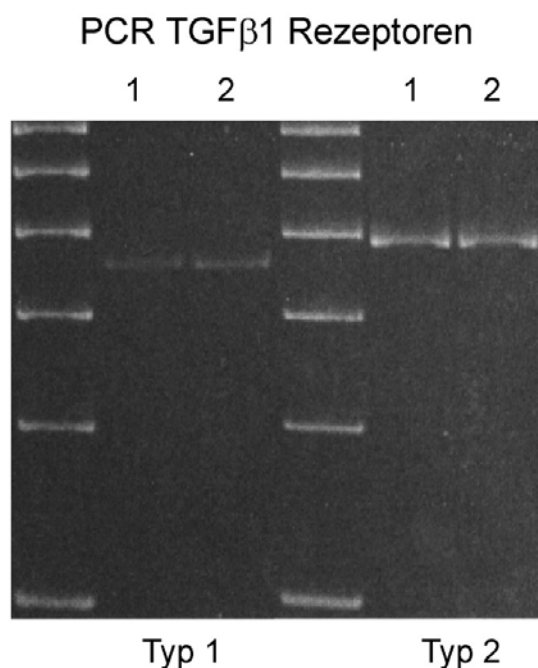


Abb. 14 PCR-Analyse der Expression der TGF β -Rezeptoren Typ 1 und 2 in HPF. Dargestellt ist jeweils eine Probe aus einer Zelllinie auf ECM (Spur 1) und ein Probe aus einer Zelllinie ohne ECM (Spur 2).

3.8.4. Nachweis der Synthese von TGF β -Rezeptoren durch Western-Blot

Der Nachweis der Produktion von TGF β -Rezeptoren in humanen Pankreasfibroblasten auf Protein-Ebene erfolgte durch Western-Blot-Analyse. Dabei lieferte der TGF β -Rezeptor Typ 2 ein etwas stärkeres Signal als Typ 1, eine Tendenz, die schon in der RT-PCR-Untersuchung auf mRNA-Ebene bestand. Wie schon auf mRNA-Ebene nachgewiesen, bestand auch im Protein-Nachweis kein Unterschied in der Rezeptor-Expression zwischen Zellen auf ECM oder auf Kunststoff (Abb. 15).

TGF-beta Rezeptoren

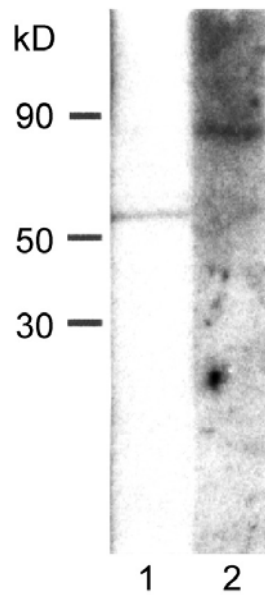


Abb. 15 Western-Blot-Analyse der Synthese der TGF β -Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 in HPF, die auf ECM kultiviert wurden. Rezeptor Typ 2 (Molekulargewicht 80 kD) wird etwas stärker exprimiert als Rezeptor Typ 1 (Molekulargewicht 53 kD).

3.8.5. Wachstumsaktivität der Zellen nach Inkubation mit TGF β 1 und mit inhibierenden TGF β -Antikörpern

Um die Bedeutung von TGF β 1 für das Wachstum von humanen Pankreasfibroblasten zu untersuchen, wurden Stimulationsversuche mit menschlichem TGF β 1 durchgeführt.

Aus den bisher genannten Ergebnissen ergibt sich weiterhin, dass die vorliegenden fibroblastären Zellen des Pankreas selbst in der Lage sind, TGF β 1 zu produzieren und in aktivierter Form zu sezernieren. Es wurden daher Versuche mit inhibierenden Anti-TGF β Antikörpern durchgeführt, um die Bedeutung des endogen produzierten TGF β 1 beurteilen zu können. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit Anti-TGF β Antikörperlösung inkubiert und die Wachstumsaktivität gegenüber der Kontrolle in serumfreiem Kulturmedium bestimmt (Abb. 16).

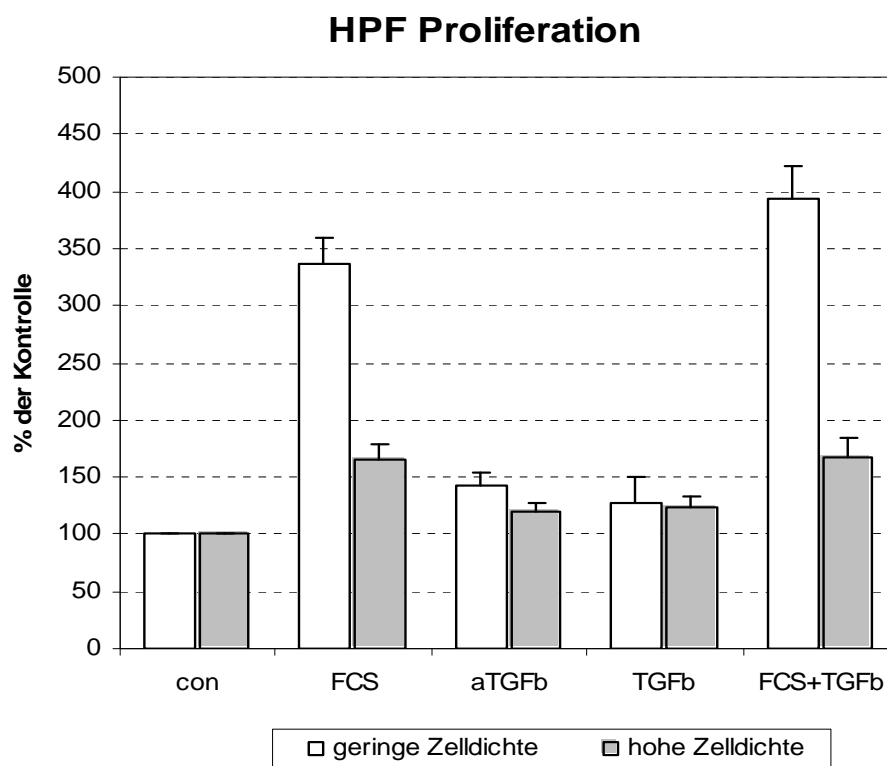


Abb. 16 Wachstumsaktivität humaner Pankreasfibroblasten nach Inkubation mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), nach Inhibition von TGF β durch 1 μ g/ml inhibierende Anti-TGF β Antikörper (aTGFb), mit 80 pmol/l exogen zugesetztem TGF β 1 (TGFb) sowie mit 10% FCS und 80 pmol/l TGF β 1 (FCS+TGFb) über 24 Stunden gegenüber einer Kontrolle (con) in serumfreiem Medium (n=16). Die Zellen für diese Untersuchung wurden auf Extrazellulärmatrix kultiviert.

Die Reaktion der Zellen auf exogene Zufuhr von TGF β 1 und auf Inhibition von TGF β waren abhängig von der Wachstumsdichte der Zellen in Kultur und von der Zugabe weiterer multipler Wachstumsfaktoren in fetalem Kälberserum (FCS).

Bei niedriger Zelldichte zeigte sich eine signifikant gesteigerte Stoffwechselaktivität nach Inhibition von TGF β , während nach exogener TGF β 1-Zugabe keine signifikante Änderung in der Aktivität erfolgte. Die bei geringer Zelldichte ausgeprägte Wachstumssteigerung nach Zugabe von FCS (siehe 3.6.1.) hingegen wurde durch zusätzliche TGF β 1-Stimulation noch weiter gesteigert.

Bei hoher Zelldichte hatte sowohl die Inhibition des endogen produzierten TGF β als auch die exogene Zugabe von TGF β 1 eine positive Wirkung auf das Wachstum der Zellen. Die bei hoher Zelldichte relativ geringe Wachstumssteigerung nach Zugabe von FCS (siehe 3.6.1.)

konnte weder durch Inhibition noch durch Zugabe von TGF β 1 weiter gesteigert werden (Abb. 16).

Die Steigerung der Konzentration von Anti-TGF β Antikörpern im Kulturmedium auf 10 μ g/ml erbrachte sowohl in geringer als auch in hoher Zelldichte etwa die gleiche Zunahme der Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass bereits durch eine Antikörperkonzentration von 1 μ g/ml der von den untersuchten Zellen selbst produzierte TGF β hinreichend inhibiert wurde.

3.9. Expression von Thrombospondin-1 (TSP-1)

TGF β wird zunächst in latenter Form produziert und dann durch Abspaltung einer Polypeptidkette (latency associated peptide, LAP) in die reife, aktive Form überführt. Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein bekanntes Protein mit der Eigenschaft, latenten TGF β in die reife Form zu überführen und somit zu aktivieren.

Um die Möglichkeit der Aktivierung von TGF β durch Pankreasfibroblasten zu untersuchen, wurde die Expression von TSP-1 in HPF mittels RT-PCR und mittels Western-Blot ermittelt.

3.9.1. Nachweis der Expression von TSP-1 durch RT-PCR

Zur Untersuchung der Auswirkung von TGF β 1 auf die TSP-1-Expression der Zellen wurde die mRNA aus Zellen isoliert, die für 24 Stunden unter drei verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden:

1. Inkubation in serumfreiem Medium
2. Inkubation in serumfreiem Medium mit TGF β 1
3. Inkubation in serumfreiem Medium mit inhibierendem Anti-TGF β -Antikörper

Das Kulturmedium aller 3 Gruppen wurde nach 12 Stunden erneuert, um den Einfluss endogen produzierter Faktoren zu minimieren.

Analog zur RT-PCR Analyse der TGF β 1-Expression wurde auch für TSP-1 eine Sekundäramplifikation (nested PCR) durchgeführt, die die Spezifität der verwendeten Oligonukleotide bestätigte (Abb. 17a).

PCR Thrombospondin 1

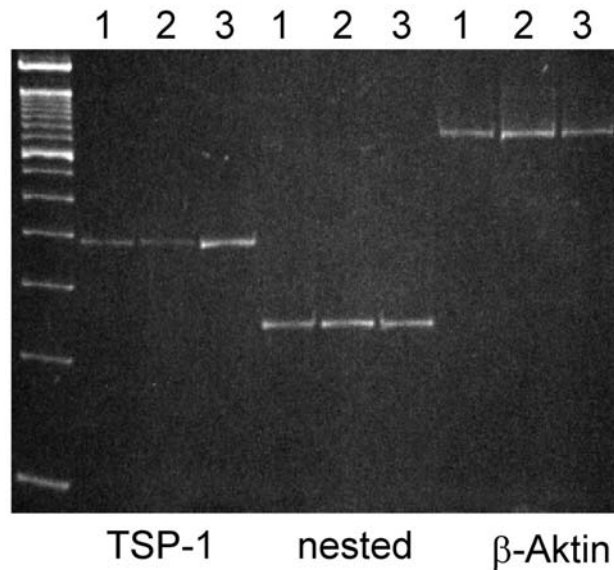


Abb. 17a RT-PCR Analyse der Thrombospondin-1-Expression in humanen Pankreasfibroblasten. Die Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium mit 1 µg/ml anti-TGFβ (Reihe Nr. 2) bzw. mit 80 pmol/l rekombinantem humanem TGFβ1 (Reihe Nr. 3) inkubiert. Die erste Gruppe zeigt den Nachweis der TSP-1 Expression durch RT-PCR. Während die zweite Gruppe die Spezifität des amplifizierten Produktes durch Sekundäramplifikation (nested PCR) belegen, wird in der dritten Gruppe die β-Aktin-Expression der Proben verglichen.

Die quantitative Auswertung der TSP-1-Expression ergab eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Expression unter Einfluss von TGFβ1-Zusatz. Demgegenüber war die TSP-1-Expression in Zellen, die mit inhibierendem Anti-TGFβ-Antikörper inkubiert waren, im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Die Normalisierung der TSP-1-Signale im Verhältnis zur Expression des nicht signifikant regulierten beta-Aktin lieferte ein identisches Ergebnis (Abb. 17 b).

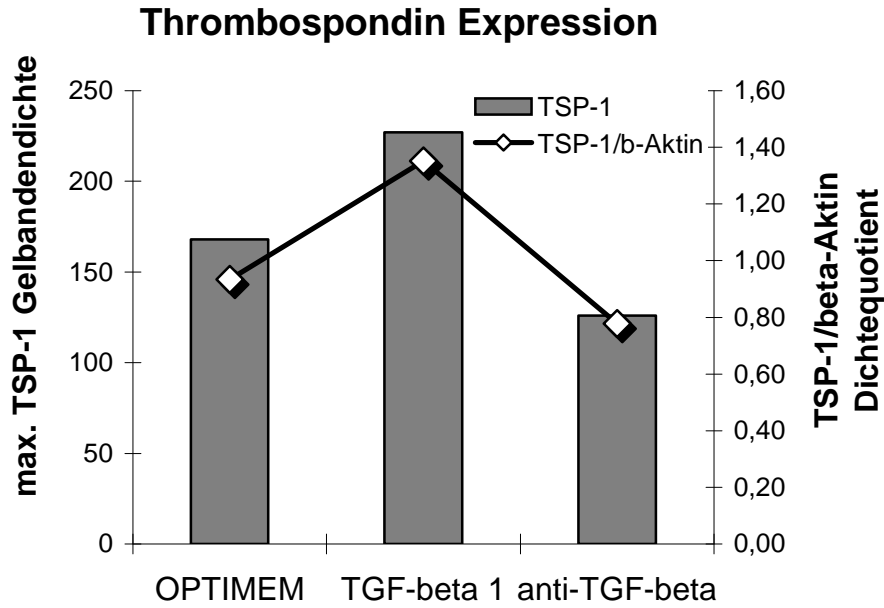


Abb. 17b Quantitative Auswertung der RT-PCR-Analyse der Thrombospondin-1- (TSP-1)-Expression in humanen Pankreasfibroblasten. Dargestellt ist die TSP-1-Expression nach Inkubation mit Transforming Growth Factor beta 1 und mit inhibierenden anti-TGF beta Antikörpern.

3.9.2. Nachweis der Produktion von TSP-1 durch Western-Blot

Die Produktion von TSP-1 wurde mittels Western-Blot-Analyse auf Protein-Ebene untersucht. Dabei wurde sowohl in Zellen auf ECM als auch in Zellen auf unbeschichteten Kunststoffschalen eine positive Immunreaktivität nachgewiesen (Abb. 18).

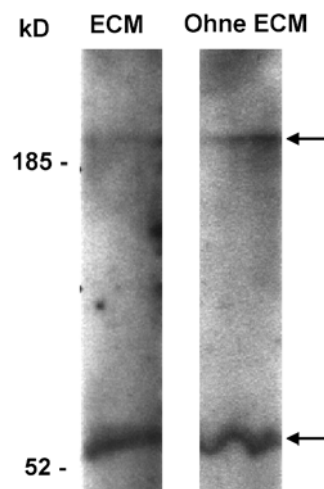


Abb. 18 Western-Blot Analyse der Thrombospondin-1 (TSP-1)-Expression in humanen Pankreasfibroblasten auf bzw. ohne Extrazellulärmatrix (ECM). Anti-TSP-1-Immunreaktivität zeigt sich bei etwa 70kD und bei hohem Molekulargewicht, was sich durch die trimere Proteinstruktur des Thrombospondins erklärt.

3.10. Untersuchung der Expression multipler Gene in Pankreasfibroblasten mit Differential Display Membranen (Atlas Array™)

Zur Analyse des Einflusses von Extrazellulärmatrix auf das Verhalten von Pankreasfibroblasten in Kultur wurde die Expression multipler Gene mit dem kommerziell erhältlichen Atlas Array™-System untersucht. Dabei wurden die Expressionsdaten von HPF auf ECM und auf unbeschichteten Kulturschalen verglichen.

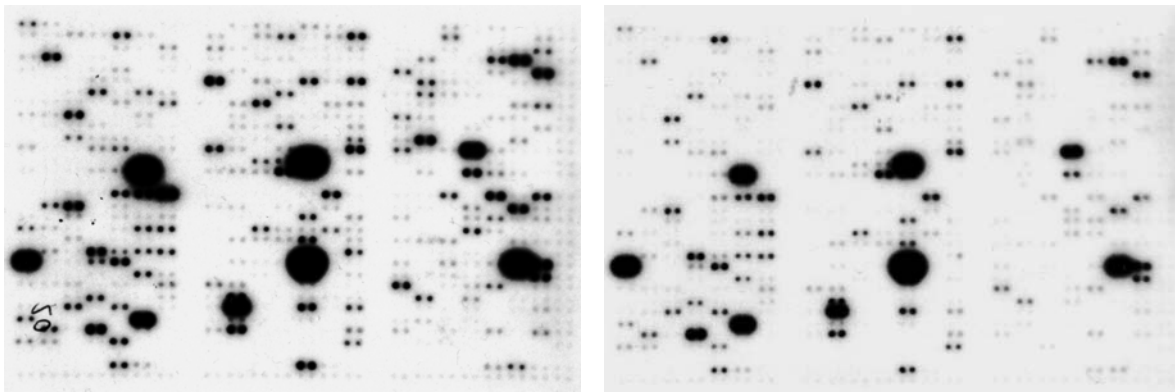


Abb. 19 Atlas-Array™ Analyse der Expression multipler Gene in HPF auf ECM (links) und ohne ECM (rechts). Die einzelnen cDNA-Sonden sind jeweils in Paaren auf der Membran angeordnet um Artefakte auszuschließen.

Bei 198 der insgesamt 598 Sonden wurde ein sicher als positiv zu wertendes Expressionssignal identifiziert, dessen Intensität im Mittel der beiden Einzelpunkte über dem membranspezifischen Hintergrund lag (Abb.19). In der Auswertung der Daten mit dem Atlas-Image™-Programm wurden mehrere Gruppen der Genexpression in HPF definiert.

Für die Analyse der Expressionsintensitäten mittels AtlasImage™ Software wurden folgende Referenzdaten erhoben:

Werte für:	ohne ECM	mit ECM
Hintergrund	3584	4864
Normalisierungskoeffizient	1,3093	
Difference threshold	30.000	
Ratio threshold	1,50	

3.10.1. In beiden Proben stark exprimierte Gene mit geringer Expressionsdifferenz

Es wurden 7 Gene identifiziert, die in beiden Proben mit einer Intensität von mindestens 50.000 Einheiten über dem Hintergrund stark exprimiert waren, ohne eine bedeutsame Differenz (über 12.000 Intensitätseinheiten) aufzuweisen. Die meisten der in beiden Proben gleichsam stark exprimierten Gene spielen eine Rolle bei der Regulierung von Inflammationsaktivität, Stress und Wundheilung.

Gen	Intensität ohne ECM	Intensität mit ECM	Ratio	Differenz
interleukin-2 receptor alpha subunit	73.025	61.068	0,836	11.957
thrombin receptor PAR 1	69.903	60.754	0,869	9.149
UV excision repair protein	68.925	60.798	0,882	8.127
3'5'-cAMP phosphodiesterase HPDE4A6	61.094	59.182	0,969	1.912
transforming protein rhoA	60.711	60.834	1,002	123
caspase-10 precursor	56.160	60.380	1,075	4.220
mitogen activated protein kinase kinase kinase 11	51.717	58.666	1,134	6.949

3.10.2. Gene mit stark abweichender Expression

Das einzige Gen, das in der Array-Analyse einen höheren Wert für die Expression in HPF ohne ECM aufwies, wird nach derzeitigem Kenntnisstand nur in Lymphozyten exprimiert. Bei genauer Ansicht der Primärdaten auf den exponierten Röntgenfilmen wird deutlich, dass es sich um ein Überstrahlungs-Artefakt aus einer benachbarten Sonde (für alpha1 catenin) handelt, da diese Sonde ein extrem starkes Signal in beiden Proben liefert.

Ratio < 0,67 (stärkeres Signal in HPF ohne ECM)	Intensität ohne ECM	Intensität mit ECM	Ratio	Differenz
CD27L antigen receptor	59.819	33.240	0,556	26.579

Insgesamt 38 Gene lieferten ein deutlich stärkeres Signal in Zellen auf ECM. Von den identifizierten Genen kodieren einige für Proteine, die in Vorgängen der Zell-/ECM-Interaktion eine Rolle spielen.

Ratio > 1,5 (stärkeres Signal in HPF mit ECM)	Intensität ohne ECM	Intensität mit ECM	Ratio	Differenz
vascular endothelial growth factor receptor precursor	7.419	41.360	5,575	33.941
c-myc purine-binding transcription factor puf	7.713	40.148	5,205	32.435
thymosin beta-10	10.691	54.126	5,063	43.435
retinoic acid receptor beta	11.925	60.152	5,044	48.227
neurotrophin-3	12.115	60.728	5,013	48.613
fibronectin receptor beta subunit (CD29)	10.590	49.444	4,669	38.854
monocyte chemotactic protein 1	11.432	48.616	4,253	37.184
basic transcription factor 2 44-kDa subunit	15.526	47.330	3,048	31.804
DNA-dependent protein kinase	12.944	38.218	2,953	25.274
DNA mismatch repair protein MLH1	15.894	43.870	2,760	27.976
ras-related protein RAB6	14.533	37.560	2,584	23.027
ras-related protein RAB5A	18.520	47.226	2,550	28.706
extracellular matrix receptor-III (CD44)	13.544	34.380	2,538	20.836
integrin alpha L (CD11a)	16.880	40.216	2,382	23.336
interferon gamma precursor	17.015	39.120	2,299	22.105
tumor necrosis factor precursor	17.070	39.174	2,295	22.104
CDC-like kinase 1	16.572	37.224	2,246	20.652
60S ribosomal protein L6	20.194	44.948	2,226	24.754
defender against cell death 1	22.559	47.734	2,116	25.175

glutathione S-transferase pi	15.349	32.266	2,102	16.917
nuclease-sensitive element DNA-binding protein	27.955	58.670	2,099	30.715
heat shock 90-kDa protein A	18.835	38.856	2,063	20.021
40S ribosomal protein S19	21.128	42.966	2,034	21.838
R kappa B DNA-binding protein	26.124	52.944	2,027	26.820
transcription factor ETR101	27.355	51.776	1,893	24.421
transcription factor LSF	30.756	57.656	1,875	26.900
DNA-binding protein inhibitor Id-3	17.975	32.288	1,796	14.313
neuro epithelioma transforming gene 1	25.845	45.220	1,750	19.375
insulin receptor precursor	15.542	27.066	1,741	11.524
interferon-gamma-induced monokine	34.440	58.366	1,695	23.926
interferon-gamma receptor beta subunit	25.981	43.476	1,673	17.495
rantes pro-inflammatory cytokine	29.608	49.392	1,668	19.784
tyrosine-protein kinase receptor tyro3	36.657	60.638	1,654	23.981
nucleobindin precursor	22.001	35.846	1,629	13.845
beta catenin	16.324	25.534	1,564	9.210
cellular nucleic acid binding protein	14.686	22.724	1,547	8.038
neurotrophic tyrosine kinase receptor-related 3	38.297	58.682	1,532	20.385
zinc-finger DNA-binding protein	18.123	27.632	1,525	9.509

4. Diskussion

4.1. Isolierung von humanen Pankreasfibroblasten

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur Isolierung und Kultur fibroblastärer Zellen des menschlichen Pankreas beschrieben. Eine kleine Gewebeprobe wurde mit homologem Blutplasma auf dem Boden einer Zellkulturschale angeheftet. Die auswachsenden Zellen wurden weiter kultiviert und charakterisiert.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, durch Auswachsen isolierten Zellen weisen zum Teil Eigenschaften von hepatischen Sternzellen (sog. Ito-Zellen) auf, insbesondere das Vorliegen von Lipidvakuolen und die Expression der Zytoskelett-Proteine Desmin und alpha-SMA. Andere Autoren haben aus Pankreasgewebe isolierte fibroblastäre Zellen daher auch als pankreatische Sternzellen (pancreatic stellate cells, PSC) bezeichnet (Apte et al. 1998; Bachem et al. 1998). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen werden hier als humane Pankreasfibroblasten (HPF) bzw. fibroblastäre Zellen des Pankreas bezeichnet, um damit auch diejenigen Zellen korrekt zu beschreiben, die nicht alle Merkmale von Ito-Zellen aufweisen. Die von anderen Autoren verschiedene Methode der Isolierung könnte zudem eine andere Selektion von Zellen zur Folge haben, so dass die in dieser Arbeit untersuchte Zellpopulation nicht vollständig den vorbeschriebenen pankreatischen Sternzellen entspricht.

Andere Autoren haben bereits Methoden zur Isolierung von pankreatischen Sternzellen beschrieben. Dabei wurde in Analogie zur Isolierung von hepatischen Sternzellen Enzyme wie Kollagenasen und DNasen eingesetzt, mit denen Pankreasgewebe aufgelöst wurde, um isolierte Azini zu gewinnen. Zusätzlich erfolgte eine Differentialzentrifugation um lipidhaltige Zellen zu isolieren (Apte et al. 1998). Diese bisher beschriebenen Methoden bewirken eine zusätzliche Stresskomponente für die Fibroblasten. Die Einbettung in koaguliertes Blutplasma, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, erwies sich als erfolgreiche Methode, um auch aus kleinen Gewebeproben schon initial verhältnismäßig viele fibroblastäre Zellen zu gewinnen. Darüber hinaus wurden Bedingungen geschaffen, denen Pankreasgewebe auch *in vivo* bei Wundheilungsprozessen ausgesetzt ist. Diese Wundheilungsprozesse treten nicht nur bei entzündlichen Prozessen wie der chronischen Pankreatitis auf, sondern kommen in ähnlicher Form auch beim Pankreaskarzinom vor (Dvorak 1986). Die explantierten Gewebeproben waren somit in eine dreidimensionale Matrix eingebettet, die neben einem Gerüst aus Fibrinfasern multiple Serumfaktoren enthält

(Clark 1989). Das entscheidende Kriterium zur Selektion der fibroblastären Zellen in der vorliegenden Arbeit war Vitalität, also die Fähigkeit zu Migration und Proliferation. In Versuchen mit Pankreasgewebe in Suspension ohne Anheftung der Gewebeprobe in den Zellkulturschalen konnte kein Auswachsen von Zellen beobachtet werden.

4.2. Morphologie der isolierten Pankreasfibroblasten

Mikroskopische Untersuchungen lebender humaner Pankreasfibroblasten in Kultur ergaben eine Abhängigkeit der Morphologie von der Anwesenheit von Extrazellulärmatrix (ECM). Während des Auswachsens aus der Gewebeprobe wiesen sämtliche Zellen eine Spindelform auf (Abb. 2). Nach der ersten Passage, wenn die Zellen nicht mehr ständigen Kontakt zur jeweiligen Nachbarzelle hatten, zeigten sich Unterschiede. Zellen auf ECM-beschichteten Kulturschalen nahmen wieder eine Spindelform an, mit zum Teil weit reichenden Zytoplasmaausläufern. Die Zellen auf unbeschichteten Schalen hingegen hatten einen ausgebreiteten Zellkörper (Abb. 4). Diese Beobachtung deutet auf einen Zusammenhang zwischen ECM und dem Verhalten von Pankreasfibroblasten hin. Die Bedeutung von ECM für Wachstum und Charakteristik von HPF wurde in weiteren Versuchen näher untersucht.

4.3. Lipidspeicherung in humanen Pankreasfibroblasten

Die Speicherung von Vitamin A in zytoplasmatischen Lipidvakuolen ist ein klassisches Merkmal von Sternzellen der Leber. Für Pankreasfibroblasten der Ratte wurde ebenfalls eine Lipidspeicherung nachgewiesen, unter Einsatz der Autofluoreszenz von Vitamin A (Apte et al. 1998). In pankreatischen Sternzellen des Menschen wurde auch die Färbung von Lipiden mit Ölrot zur Identifikation von Lipidvakuolen genutzt (Bachem et al. 1998). Alle Arbeitsgruppen beschrieben eine Abnahme der Ölrot-positiven Lipidvakuolen nach wenigen Tagen in Kultur, am ehesten als Effekt einer Aktivierung und Differenzierung der Zellen von einem lipidspeichernden Ruhestadium zu einem aktiven myofibroblastären Stadium. Die in dieser Arbeit untersuchten Pankreasfibroblasten wiesen zu etwa 50% Ölrot-positiven Lipidvakuolen auf. Der Anteil Ölrot-positiver Zellen blieb auch unter Zellkultur-Bedingungen annähernd gleich. Ein Teil der durch Auswachsen isolierten Fibroblasten behält offensichtlich auch im aktivierten Zustand die Fähigkeit zur Lipidspeicherung.

4.4. Expression zytoskelettaler Proteine in humanen Pankreasfibroblasten

4.4.1. Vimentin

Vimentin ist ein Intermediärfilament, das in allen Zellen mesenchymaler Herkunft exprimiert wird. Sämtliche isolierten Zellen wiesen Vimentin als Teil ihres Zytoskeletts auf, somit konnte eine Abstammung von oder Kontamination mit Zellen epithelialen Ursprunges ausgeschlossen werden. Es zeigte sich keine Änderung der Vimentin-Expression über die Zeit in Abhängigkeit von der Zahl der Zellkultur-Passagen.

4.4.2. Desmin

Desmin ist ein weiteres Intermediärfilament, das als Marker für hepatische Sternzellen gilt (Yokoi et al. 1984). Es wird auch als charakteristisches Merkmal pankreatischer Sternzellen beschrieben (Apte et al. 1998; Bachem et al. 1998). Der Anteil der Desmin-positiven Zellen lag bei den Untersuchungen von Bachem et al. bei 20-50%, in Abhängigkeit von der Passage der Zellen, während in den Untersuchungen von Apte et al. Desmin in sämtlichen Zellen nachgewiesen wurde. In einer weiteren Arbeit wurde ein eher granuläres Desmin-Muster und eine Abnahme der Desmin-Expression in Pankreasfibroblasten unter Langzeit-Zellkultur-Bedingungen beschrieben (Manapov et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit lag Desmin ebenfalls nicht in allen Pankreasfibroblasten und nicht in fibrillärer, sondern in granulärer Form im Zytoplasma vor. Die Expression von Desmin variierte unter den untersuchten Zelllinien zwischen 23 und 72 Prozent, eine Abhängigkeit des Expressionslevels von der Passagezahl, der Herkunft oder den Kulturbedingungen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

4.4.3. Alpha-SMA

Die in glatter Muskulatur vorkommende Alpha-Isoform des Aktins (α SMA) ist ein weiteres charakteristisches Merkmal von Ito-Zellen und periazinären Fibroblasten des Pankreas (Apte et al. 1998; Ballardini et al. 1988). Die Expression von α SMA wird als Zeichen der Aktivierung und myofibroblastären Differenzierung von Sternzellen gewertet (Ramadori et al.

1990). In histologischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass α SMA in Arealen mit Tumordinfiltration deutlich stärker exprimiert wird als im gesunden Pankreas (Yen et al. 2002). In bereits ausgeprägt fibrosiertem Pankreasgewebe hingegen sinkt die α SMA-Expression wieder auf ein geringes Niveau ab (Manapov et al. 2005).

Die hier beschriebenen, durch Auswachsen gewonnenen, humanen Pankreasfibroblasten zeigten eine Zunahme der α SMA-Expression in Kulturbedingungen als Zeichen der Aktivierung und myofibroblastären Differenzierung (Abb. 5 und 6). Sowohl in Ito-Zellen als auch in fibroblastoiden Zellen des Pankreas der Ratte und des Menschen wurde von mehreren Autoren eine Zunahme der α SMA-Expression über die Zeit in Kultur beschrieben (Apte et al. 1998; Ballardini et al. 1994; Kruse et al. 2001). Unter Einfluss von extern appliziertem TGF β 1 konnte ebenfalls eine Differenzierung zu einem myofibroblastären Phänotyp induziert werden (Apte et al. 1999). Eine weitere Untersuchung lieferte Hinweise, dass pankreatische Sternzellen in der Lage sind, sich zu apoptoseresistenten Fibroblasten oder zu aktiven, α SMA-positiven Myofibroblasten zu entwickeln, die in Kultur apoptotisch wurden (Manapov et al. 2005). Ob die in Kultur beobachtete Zunahme der α SMA-Expression ein Kulturartefakt ist oder der *in vivo* Entwicklung der Pankreasfibroblasten entspricht, ist bisher nicht geklärt. Um klinisch relevante, therapeutisch bedeutsame Aussagen treffen zu können, wird in Zukunft die Frage geklärt werden müssen, in welchem Stadium der Differenzierung die fibroblastoiden Zellen des Pankreas im Rahmen der Erkrankungen *in vivo* vorliegen (Pandol 2005).

4.5. Wachstumsverhalten der Pankreasfibroblasten in Kultur

In Langzeitkultur mit isolierten Pankreasfibroblasten wurde durch Zählung die Vermehrungsrate der Zellen nach den einzelnen Passagen bestimmt. Dabei fiel auf, dass nach etwa 10 Passagen die Zellzahlen sämtlicher Zelllinien kontinuierlich abnahmen, bis schließlich keine teilungsfähigen Zellen mehr gefunden werden konnten. Gerade in den mittleren Passagen 5-9 zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied: Die Zellen auf ECM-beschichteten Kulturschalen blieben länger lebensfähig. Die zum Beschichten verwendete ECM (MatrigelTM) enthält als Hauptkomponente Laminin, gefolgt von Kollagen Typ IV, Heparansulfat-Proteoglykanen und Entactin, gewonnen aus Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkomen der Maus. Dass diese ECM-Komponenten auf Fibroblasten in Kultur signifikanten Einfluss nehmen können, ist bekannt (Emonard et al. 1987), welche Rolle sie bei

fibroblastären Zellen des menschlichen Pankreas einnehmen, ist bisher nicht beschrieben. Die verbesserte Überlebensfähigkeit der Zellen in Kultur beruht möglicherweise auf Regulierung über Rezeptoren für die eigentlichen Basalmembran-Proteine selbst, oder sie ist eine Folge der auch in ECM in geringer Konzentration enthaltenen Wachstumsfaktoren (Vukicevic et al. 1992). Im gesunden menschlichen Pankreas ist nur wenig ECM vorhanden, das Parenchym besteht in erster Linie aus nebeneinander liegenden Azinuszellen. Im chronisch entzündlich veränderten Organ jedoch steigt der Anteil an ECM stark an. Hier könnte ein positiver Stimulus auf die Pankreasfibroblasten liegen, der zu einer weiteren Vermehrung derselben führt und somit einen *circulus vitiosus* aus Zellvermehrung und Matrixdeposition unterhält.

Neben der Abhängigkeit von der Anwesenheit von Extrazellulärmatrix war das Wachstumsverhalten der Zellen in Kultur abhängig von der Ausgangsprobe menschlichen Pankreas', das zur Explantation verwendet wurde. Insbesondere das Lebensalter der Patienten, deren Proben explantiert wurden, hatte Einfluss auf das Auswachsen und die Lebensfähigkeit der isolierten Zellen in Kultur. So lieferte die Explantation aus der Probe der jüngeren Patienten sowohl initial eine höhere Zellzahl als auch eine verlängerte Lebensfähigkeit in Kultur, während die aus Proben älterer Patienten gewonnenen Zellen das Wachstum in Kultur schneller einstellten.

4.6. Faktoren zur Regulation von Pankreasfibroblasten

Fibroblastäre Zellen des Pankreas werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dabei handelt es sich in erster Linie um Wachstumsfaktoren, inflammatorisch wirksame Zytokine, oxidativen Stress und Toxine. Um die Funktionen der isolierten Pankreasfibroblasten näher zu charakterisieren, wurde das Ansprechen auf Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und die Bedeutung von Transforming Growth Factor beta 1 (TGF β 1) untersucht.

4.6.1. Platelet Derived Growth Factor

Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ist ein zunächst aus Thrombozyten isoliertes Glykoprotein mit Einfluss auf Entwicklung, Proliferation, Wachstum und Migration von Zellen mesenchymalen Ursprungs (Andrae et al. 2008). Die Rolle von PDGF in der Regulation von pankreatischen Sternzellen wurde von mehreren Autoren untersucht (Apte et al. 1999; Luttenberger et al. 2000). Apte et al. beschreiben eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferationsrate von pankreatischen Sternzellen der Ratte nach Stimulation

mit exogenem PDGF. Luttenberger et al. konnten einen mitogenen Effekt von Thrombozytenlysaten nachweisen, der sich durch Zusatz von PDGF-inhibierenden Antikörpern schon in geringer Konzentration deutlich reduzierte.

Die in dieser Arbeit beschriebenen humanen Pankreasfibroblasten zeigten ebenfalls ein Ansprechen auf die exogene Zugabe von PDGF, dessen Signifikanz jedoch von der Wachstumsdichte abhing. Während bei hoher Zelldichte unter PDGF-Stimulation ein deutlich positiver Effekt auf die Stoffwechselaktivität resultierte, war dieser bei geringer Wachstumsdichte nicht signifikant (Abb. 9). Die höhere Wachstumsdichte war in den durchgeführten Untersuchungen eine Voraussetzung für die aktivitätssteigernde Wirkung von PDGF. Als Ursache kommen von den untersuchten Zellen selbst produzierte Faktoren in Frage, die nur im Zusammenspiel mit dem exogen zugesetzten PDGF eine Zunahme der Aktivität bewirken konnten. In geringer Zelldichte könnte die Konzentration der endogen produzierten Faktoren zu niedrig sein, um die volle Wirksamkeit von PDGF zu ermöglichen. Dies wird unterstützt von bisherigen Arbeiten, die eine Abhängigkeit der PDGF-Wirkung von den Wachstumsfaktoren in der Umgebung belegen (Kim et al. 1995).

Die Erhöhung der PDGF-Konzentration erbrachte auch in hoher Zelldichte keine weitere Steigerung der Stoffwechselaktivität (Abb. 9). Die durch PDGF-Zugabe erreichte Aktivitätssteigerung lag auf demselben Niveau wie nach Zugabe von multiplen Wachstumsfaktoren in fetalem Kälberserum (FCS). Dies legt nahe, dass in den Zellen ein Aktivitätsmaximum erreicht wurde, dass durch weitere Faktoren nicht zu steigern war.

4.6.2. Transforming Growth Factor beta

Transforming Growth Factor beta 1 (TGF β 1) ist ein Zytokin, das eine wichtige Rolle in der Regulation von fibroblastären Zellen spielt. So wurde nachgewiesen, dass die exogene Zufuhr von TGF β 1 bei Fibroblasten der Ratte eine vermehrte Deposition von Extrazellulärmatrix zur Folge hat (Igotz et al. 1987). In späteren Untersuchungen zeigte sich eine vermehrte Produktion von ECM-Proteinen in pankreatischen Sternzellen unter TGF β 1-Stimulation (Apte et al. 1999). Über die Frage der Produktion von Extrazellulärmatrix hinaus konnte an Pankreasfibroblasten der Ratte eine Zunahme der Wachstumsrate durch Inhibition von TGF β gezeigt werden (Kruse et al. 2000).

In menschlichem Pankreas wurde zunächst in immunhistochemischen Untersuchungen eine TGF β 1-Expression in duktalem und azinären Zellen nachgewiesen (Slater et al. 1995). Andere

Autoren vermuteten Thrombozytenaggregate, deren Vorliegen bei akuter Pankreatitis nachgewiesen wurde, als Quelle des TGF β 1 (Luttenberger et al. 2000). In isolierten fibroblastären Zellen des Pankreas der Ratte konnte auch eine eigene, endogene Expression und Sekretion von TGF β 1 gezeigt werden (Kruse et al. 2000).

4.6.2.1. Expression und Sekretion von TGF β 1 und Vorliegen von TGF β 1-Rezeptoren in isolierten HPF

Um die Rolle von TGF β 1 in den hier beschriebenen, isolierten menschlichen Pankreasfibroblasten näher zu charakterisieren, erfolgte der Nachweis der Expression und Sekretion von TGF β 1 sowie der TGF β 1-Rezeptoren.

In PCR-Untersuchungen wurde eine Expression von TGF β 1 in HPF auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Dabei ergab sich keine Abhängigkeit der mRNA-Menge von der Kulturumgebung in Bezug auf Extrazellulärmatrix (ECM) (Abb. 12).

Um eine TGF β 1-Sekretion in das umgebende Zellkulturmedium nachzuweisen, erfolgten ELISA-Untersuchungen konditionierter Medienüberstände. Nach 24 Stunden Inkubation konnte TGF β 1 im Medium sowohl in latenter als auch - in geringerer Menge - in reifer Form nachgewiesen werden. Die Menge des reifen TGF β 1 war unabhängig von der Anwesenheit von ECM in der Zellkultur, lediglich in der Menge des latenten TGF β 1 zeigte sich ein geringer Unterschied zugunsten der auf Kunststoff kultivierten Zellen.

Damit wurde eine Produktion von TGF β 1 in biologisch wirksamer Form und die Sekretion in die Umgebung von HPF nachgewiesen. Der den Anteil des reifen TGF β 1 noch übersteigende latente TGF β 1 erlaubt zusätzlich eine Aktivierung durch exogene Faktoren wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), reaktive Sauerstoffradikale oder andere Proteasen, die im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion im Pankreas auftreten (Yu et al. 2000).

Die Wirkung von TGF β wird über membranständige Rezeptoren vermittelt. Um eine Wirkung auf Pankreasfibroblasten auszuüben, muss daher in den Zielzellen eine Expression von TGF β -Rezeptoren vorliegen. In den hier beschriebenen Zellen wurde die Expression der TGF β 1-Rezeptoren auf mRNA-Ebene mittels PCR und auf Protein-Ebene mittels Western-Blot nachgewiesen. Es bestand dabei kein Intensitätsunterschied in den Nachweissignalen zwischen Proben aus Isolaten, die ohne oder mit ECM kultiviert wurden.

Dass die isolierten Pankreasfibroblasten sowohl TGF β 1 in aktiver Form sezernieren als auch selbst Träger von TGF β 1-Rezeptoren sind, legt eine autokrine Regulation von HPF über

TGF β 1 nahe. Somit kann sich die Wirkung von TGF β 1 auf HPF nicht nur in Anwesenheit externer Quellen entfalten, sondern in einem autoregulatorischen Zyklus aufrechterhalten werden.

4.6.2.2. Einfluss von exogen zugesetztem und Inhibition von endogen produziertem TGF β 1 in HPF

Nachdem in den bisherigen Untersuchungen die Fähigkeit von HPF zur Produktion von TGF β und zur Signaltransduktion mittels entsprechender Rezeptoren nachgewiesen wurde, sollte die funktionelle Bedeutung von TGF β 1 für HPF untersucht werden. Es wurde ein kommerzielles System zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Zellen in Kultur auf Basis eines MTS-Farbstofftests verwendet. Dabei wurde die Aktivität sowohl nach Stimulation mit exogen zugesetztem TGF β 1 als auch nach Inkubation mit inhibierenden TGF β -Antikörpern untersucht, um die Bedeutung des von den HPF selbst produzierten TGF β 1 zu analysieren. Als Kontrolle diente serumfreies Kulturmedium ohne Zusätze. Es zeigte sich eine Reaktion der HPF auf TGF β 1-Stimulation und -Inhibition, die von der Wachstumsdichte der Zellen und von der Anwesenheit weiterer Wachstumsfaktoren abhängig war (Abb. 16).

Bei niedriger Zelldichte bewirkte die exogene TGF β 1-Zufuhr keine signifikante Änderung der Wachstumsaktivität gegenüber der Kontrolle. Durch Inhibition des endogenen TGF β hingegen konnte eine Aktivitätssteigerung erreicht werden. Bei niedriger Zelldichte hat TGF β 1 als einziger Faktor also eine inhibierende Wirkung auf HPF. Der Zusatz von multiplen Wachstumsfaktoren in fetalem Kälberserum bewirkte eine deutliche Steigerung der Aktivität, die durch TGF β 1-Zugabe noch weiter verstärkt wurde. Bei Vorliegen zusätzlicher Wachstumsfaktoren hat TGF β 1 eine positive Wirkung auf das Wachstum der HPF. Die scheinbar gegensätzliche Wirkung des TGF β 1 lässt sich dadurch erklären, dass nur im Zusammenspiel mit anderen Faktoren eine stimulatorische Wirkung von TGF β 1 ausgehen kann, während TGF β 1 ohne weitere Kofaktoren eine Inhibition bewirkt. Eine ähnliche Konstellation konnte für PDGF bereits gezeigt werden (Kim et al. 1995).

Anders als bei geringer Zelldichte wurde bei hoher Zelldichte bereits durch die exogene TGF β 1-Zufuhr eine Steigerung der Aktivität erreicht - auch ohne Einfluss von FCS. Hier könnte TGF β 1 gemeinsam mit endogen produzierte Faktoren, deren Konzentrationen bei hoher Wachstumsdichte entsprechend höher liegen, seine wachstumsstimulatorische Wirkung entfalten. Die durch FCS erzielte Steigerung der Aktivität ließ sich durch exogene TGF β 1-

Zufuhr nicht weiter erhöhen. Analog den Beobachtungen für PDGF könnte bereits durch den FCS-Zusatz ein Aktivitätsmaximum der Zellen erreicht sein, das keine weitere Steigerung ermöglicht. Die in Abb. 8 gezeigten Daten zur Stimulation von HPF mit FCS zeigen ebenfalls, dass bei hoher Zelldichte nur eine verhältnismäßig geringe Aktivitätssteigerung möglich ist. Dies legt eine Begrenzung der Zellaktivität durch Kontaktinhibition bei hoher Wachstumsdichte nahe.

Übertragen auf die Situation *in vivo* bedeutet dies, dass im gesunden Pankreas, in dem fibroblastäre Zellen vereinzelt in der Nähe von Blutgefäßen und periazinär zwischen den Parenchymzellen liegen, eine geringe Wachstumsdichte vorliegt, so dass der autokrine TGF β 1 eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum hat und somit zur Wachstumskontrolle beiträgt. Im entzündlich veränderten Pankreas hingegen ist die Permeabilität der Kapillaren erhöht, so dass multiple Zytokine aus dem Blutserum in das Interstitium gelangen und gemeinsam mit autokrin produziertem TGF β 1 eine fördernde Wirkung auf Wachstum und Matrixproduktion entfalten.

4.6.2.3. Expression von Thrombospondin als möglichem TGF β -Aktivator

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass HPF in der Lage sind, TGF β 1 sowohl in latenter als auch in reifer Form zu sezernieren und auf TGF β 1-Stimulation mit Aktivitätsänderungen zu reagieren. Um TGF β 1 von der latenten in die reife Form zu überführen, kommen eine Reihe von Faktoren in Frage. Neben anderen Proteasen, pH-Verschiebung und reaktiven Sauerstoffradikalen ist Thrombospondin 1 (TSP1) ein bekannter Aktivator von TGF β (Lawler 2000). Um die Bedeutung von TSP1 in HPF zu untersuchen, wurden RT-PCR-Analysen und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse belegen eine TSP1-Expression in HPF auf mRNA-Ebene und auf Protein-Ebene. Die Expression von TSP1 war dabei unabhängig von der Anwesenheit von Extrazellulärmatrix in der Zellkultur. Die Auswertung der RT-PCR ergab eine Abhängigkeit der Expression von TSP1-mRNA von der Stimulation durch TGF β 1. Nach exogener Gabe von TGF β 1 zeigte sich eine vermehrte Expression der TSP1-mRNA, während unter Einfluss von inhibitorischen TGF β -Antikörpern die Expression von TSP1 vermindert wurde.

Diese Ergebnisse belegen somit die Fähigkeit der HPF, selbst sezernierten TGF β 1 über TSP1 zu aktivieren. Darüberhinaus wird die Aktivierung über TSP1 durch TGF β 1 selbst gesteigert. Dies könnte eine autoregulatorische Schleife von TGF β 1-Produktion, Aktivierung und

vermehrter Produktion darstellen, die *in vivo* eine überschießende fibrotische Reaktion im Pankreas zur Folge haben könnte.

4.7. Untersuchung der Expression multipler Gene in HPF mittels Array-Analyse

Um den Einfluss von Extrazellulärmatrix (ECM) auf humane Pankreasfibroblasten in Kultur zu analysieren, wurde die Expression multipler Gene mit einem Array-System untersucht. Mit dem kommerziell erhältlichen Atlas Array System wurde Expression von insgesamt 598 Genen in Zellen auf ECM und auf unbeschichteten Kulturschalen verglichen. In der Auswertung ließen sich mehrere Gruppen der Genexpression identifizieren

Dabei wurden 7 Gene identifiziert, die in beiden Proben stark exprimiert waren, ohne einen wesentlichen Unterschied aufzuweisen. Von diesen Genen sind einige in Prozessen von Stress, Inflammation und Wundheilung beteiligt, so dass sie für die Rolle der Pankreasfibroblasten von näherem Interesse sind:

„Interleukin-2 receptor alpha subunit“ als Bestandteil des Rezeptors für Interleukin 2 ist bisher nur in Lymphozyten beschrieben. Das Signal ist für beide Proben deutlich positiv, möglicherweise handelt es sich um ein Artefakt.

„Thrombin receptor PAR1“ (protease-activated receptor 1) ist ein membranständiges Rezeptorprotein, das durch Thrombin aktiviert wird und dessen Rolle in der Pathogenese der Organfibrose der Leber von mehreren Autoren untersucht und beschrieben wurde. So wurde in immunhistochemischen und molekulargenetischen Analysen gezeigt, dass die Expression von PAR1 in fibrotischer Leber gesteigert ist (Marra et al. 1998). Sternzellen der Leber in Kultur reagieren über PAR1 auf Thrombin mit Proliferation und vermehrter Produktion von ECM (Gaca et al. 2002; Mallat et al. 1998) sowie inhibierter Migration (Gillibert-Duplantier et al. 2007). In gentechnisch modifizierten PAR1-defizienten Mäusen ist die fibrotische Reaktion nach experimenteller Leberzellschädigung deutlich gemindert (Rullier et al. 2008). Diese zentrale Rolle könnten Proteinase-aktivierte Rezeptoren auch in fibroblastären Zellen des Pankreas haben, bisherige Untersuchungen im Pankreas beschränkten sich jedoch auf den Rezeptor PAR2, dessen Ligand nicht Thrombin ist. Die Signaltransduktion mittels PAR1 könnte die Verbindung zwischen Blutgerinnung und Entzündung bei der Pankreatitis darstellen (Dugina et al. 2002).

„UV excision repair protein“ ist ein Protein, das an der Zellzykluskontrolle und Ubiquitinierung, einer posttranslationalen Regulation von Proteinen, beteiligt ist (Elder et al. 2002).

„3'5'-cAMP phosphodiesterase HPDE4A6“ ist eine Isoform der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase, die über den Abbau des second messenger-Moleküls cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) an vielen Signaltransduktionen beteiligt ist. An Sternzellen der Leber konnte gezeigt werden, dass eine Phosphodiesterase-Inhibition eine verminderte Proliferation und Aktivierung zur Folge hat (Shimizu et al. 1999). Somit könnte eine hohe Phosphodiesterase-Aktivität auch im Pankreas über eine cAMP-Signaltransduktion die Aktivierung fibroblastärer Zellen begünstigen.

„Transforming protein rhoA“ ist ein Protein, das in der Regulation von Aktin-Remodeling eine wichtige Rolle spielt (Takai et al. 1995). Für Rho wurde eine Beteiligung in der Aktivierung von Lebersternzellen und pankreatischen Sternzellen nachgewiesen (Masamune et al. 2003).

„Caspase 10“ (cysteinyll aspartat specific protease 10) ist ein Enzym aus der Familie der Caspasen, die in einer Kaskade organisiert sind und im Rahmen einer Apoptose aktiviert werden (Wang et al. 2001). Die relativ hohe Menge der in der Array-Analyse nachgewiesenen mRNA könnte auf eine hohe Apoptose-Aktivität in den Pankreasfibroblasten deuten, die unabhängig von der Anwesenheit von ECM vorhanden ist.

„Mitogen activated protein 3 kinase 11“ (MAP3K11) ist eine Proteinkinase, die ebenfalls im Rahmen einer Signalkaskade in erster Linie über die Phosphorylierung von c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) wirkt (Zhong et al. 2007). Über den JNK-Signalweg werden in erster Linie Stressfaktoren wie proinflammatorische Zytokine und zytotoxische Reize verarbeitet (Vlahopoulos et al. 2004). Somit könnte sich in der erhöhten Signalstärke der MAP3K11 zeigen, dass die untersuchten Zellen in Kultur Stressfaktoren unterliegen und auf diese reagieren. Dies wird durch die zunehmende Aktivierung, wie durch steigende Expression von alpha-SMA nachgewiesen wurde (Abb. 6), noch unterstützt.

Für insgesamt 39 Gene konnte ein Signal mit deutlichem Intensitätsunterschied zwischen den beiden Proben nachgewiesen werden. Dabei war nur ein einziges Signal in der Probe der Zellen ohne Extrazellulärmatrix (ECM) stärker, es handelt sich um ein Artefakt durch Überstrahlung. Alle übrigen waren in der Probe der Zellen auf ECM stärker nachweisbar. Dies könnte auf eine insgesamt gesteigerte Transkriptionsaktivität in den Zellen auf ECM hinweisen. Des Weiteren sind einige der stärker exprimierten Gene bekanntermaßen an Vorgängen der Inflammation und der Zell-/ECM-Interaktion beteiligt:

„Vascular endothelial growth factor receptor“ ist eine Tyrosinkinase, an die der Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) bindet und so sein Signal in

das Zellinnere weiterleitet. Für hepatische Sternzellen wurde gezeigt, dass sie VEGF-Rezeptoren exprimieren und auf VEGF eine Reaktion zeigen, die von der Extrazellulärmatrix abhängig ist (Ankoma-Sey et al. 1998). Hepatische Sternzellen reagieren auf VEGF mit einer verstärkten Proliferation und einer verstärkten Expression von Prokollagen-mRNA (Yoshiji et al. 2003). Die Rolle der VEGF-Rezeptoren in Sternzellen des Pankreas ist bisher nicht untersucht, es konnte jedoch gezeigt werden, dass pankreatische Sternzellen eine Quelle des Liganden VEGF sind (Erkan et al. 2009). Diese Ergebnisse könnten auf eine autokrine Regulierung von fibroblastären Pankreaszellen durch VEGF hinweisen.

„Retinoic acid receptor beta“ (RAR beta) ist ein nuklearer Rezeptor, dessen Ligand Retinsäure, die biologisch aktive Form von Vitamin A, ist. In hepatischen Sternzellen der Ratte wurde gezeigt, dass Retinsäure die Proliferation der Zellen inhibierte und zu einer verminderten Expression von SMA führte. Unter Einfluss von Retinsäure nahm die Expression von RAR beta in hepatischen Sternzellen zu (Huang et al. 2000). Die Rolle dieses Rezeptors in fibroblastären Zellen des Pankreas ist bisher ungeklärt.

„Fibronectin receptor beta subunit (CD29)“ oder Integrin beta1 ist ein Glykoprotein, das mit einem anderen Integrin ein Heterodimer bildet und so als Rezeptor wirkt. Für Sternzellen des Pankreas der Ratte wurde gezeigt, dass das Integrin-Heterodimer alpha5 beta1 nach Bindung seines Liganden Fibronectin, eines Proteins der Extrazellulärmatrix, Migration, Adhäsion, Fibrogenese und Proliferation stimuliert (Gao et al. 2006). Die vermehrte Expression in humanen Pankreasfibroblasten auf ECM und somit in Gegenwart von Fibronectin könnte die generell erhöhte Aktivität der Zellen auf ECM erklären.

„Monocyte chemotactic protein 1“ ist ein Zytokin, dessen Funktion in der Rekrutierung von Monozyten, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten liegt. In Kokultur-Experimenten mit Monozyten und pankreatischen Sternzellen wurde deren Fähigkeit zur Expression von diesem und anderen chemotaktisch wirksamen Zytokinen nachgewiesen (Michalski et al. 2007). Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Interaktion zwischen fibroblastären Zellen des Pankreas und inflammatorisch wirksamen Leukozyten bei entzündlichen Erkrankungen des Pankreas.

„Extracellular matrix receptor 3 (CD44)“ ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche, das an Vorgängen der Zell-/Zell-Interaktion, Adhäsion und Migration beteiligt ist und dessen Liganden Hyaluronsäure und andere Bestandteile der Extrazellulärmatrix sind (Ponta et al. 2003). Die vermehrte Expression in humanen Pankreasfibroblasten auf ECM zeigt eine weitere Möglichkeit der Stimulation von HPF durch die Anwesenheit einer Matrix.

„Interferon gamma precursor“, „Interferon gamma induced monokine“ und „Interferon gamma receptor beta subunit“ sind Proteine, die an der Signalübermittlung über Interferon gamma beteiligt sind. In Sternzellen des Pankreas der Ratte wurde die Rolle von Interferon gamma bereits untersucht. Hier deuten die bisher publizierten Ergebnisse auf eine eher wachstumshemmende Wirkung des Zytokins über eine verminderte Expression des Wachstumsfaktors CTGF (connective tissue growth factor) (Fitzner et al. 2007).

„Tumor necrosis factor precursor“ ist Vorläufer des Zytokines TNF (Tumornekrosefaktor), das an Entzündungsvorgängen beteiligt ist und dessen Rolle in der Regulierung von Immunzellen besteht. Ferner ist TNF in der Lage, Apoptose zu induzieren und die Vermehrung erkrankter Zellen zu verhindern. In Zellkultur-Analysen wurde gezeigt, dass TNF in pankreatischen Sternzellen eine Aktivierung, Proliferation und vermehrte Kollagenproduktion induzieren kann (Mews et al. 2002). Die Expression von TNF in den Pankreasfibroblasten selbst könnte auf eine autokrine Regulierung hinweisen, ähnlich wie sie in dieser Arbeit für TGF β beschrieben wird.

„RANTES pro-inflammatory cytokine“ ist ein chemotaktisch wirksames Zytokin, dessen Wirkung in der Rekrutierung von T-Lymphozyten und Monozyten zu Orten mit inflammatorischer Aktivität besteht (Schall et al. 1990). Für aktivierte hepatische Sternzellen wurde die Expression von RANTES nachgewiesen, und es wurde gezeigt, dass die Expression unter Einfluss anderer proinflammatorisch wirksamer Zytokine wie TNF weiter zunimmt (Schwabe et al. 2003). Für fibroblastäre Zellen des Pankreas ist die Rolle von RANTES bisher nicht beschrieben. RANTES könnte analog zu hepatischen Sternzellen an der Interaktion zwischen Pankreasfibroblasten und proinflammatorischen Effektorzellen beteiligt sein.

Die Ergebnisse der Array-Analysen bedürfen zur näheren Beurteilung der weiteren Untersuchung z.B. mittels RT-PCR einzelner Gene, so dass gezielte Informationen über die einzelnen betroffenen Gene und deren Bedeutung in humanen Pankreasfibroblasten gewonnen werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Pankreasfibroblasten ließen sich nur für kurze Zeit unter Zellkulturbedingungen halten und lieferten äußerst geringe Mengen an RNA-Material, so dass die weitere Evaluation der Array-Ergebnisse zunächst offen bleiben musste. So könnten zukünftige Analysen die Frage nach der Regulation der Interaktion zwischen Pankreasfibroblasten und Extrazellulärmatrix, zwischen Fibroblasten und Tumorzellen sowie zwischen Fibroblasten und Leukozyten des Blutes näher untersuchen.

5. Zusammenfassung

Bei vielen Erkrankungen des menschlichen Pankreas stellt eine Organfibrose eine entscheidende Komponente dar. Die Organfibrose zeichnet sich durch einen gegenüber dem gesunden Organ deutlich vermehrten Gehalt an extrazellulärer Matrix aus. Als Ursprungszellen der Extrazellulärmatrix des fibrotischen Pankreas werden periazinäre Fibroblasten diskutiert, die von vielen Autoren analog zu den hepatischen Sternzellen als Pankreassternzellen bezeichnet werden. Im gesunden Pankreas liegen fibroblastäre Zellen nur sehr vereinzelt vor, so dass zu näherer Charakterisierung eine Untersuchung isolierter Fibroblasten unter Zellkulturbedingungen sinnvoll ist. In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur Isolierung und Kultur humaner Pankreasfibroblasten beschrieben, und die isolierten Zellen anhand ihrer Morphologie, ihres Expressionsprofils und ihres Wachstumsverhaltens charakterisiert.

Zur Isolierung der Pankreasfibroblasten wurden frische Proben menschlichen Pankreasgewebes mittels homologem Blutplasma in Zellkulturschalen fixiert und unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Aus den so fixierten Gewebeproben wuchsen fibroblastoide Zellen in die Kulturmgebung aus. Die Gewebeproben wurden entfernt und die auswachsenden Zellen wurden somit isoliert in Kultur gehalten. Mittels Ölrotfärbung wurde eine intrazelluläre Lipidspeicherung analog hepatischen Sternzellen nachgewiesen. Durch Immunfluoreszenz wurde der mesenchymale Ursprung und in etwa der Hälfte der Zellen das Intermediärfilament Desmin als typischer Marker für Sternzellen nachgewiesen. Die Immunfluoreszenzanalyse von Glattmuskelaktin als Marker für die Aktivierung und myofibroblastäre Differenzierung von Sternzellen zeigte eine zunehmende Expression über die Zeit in Kultur. Ob dieses Phänomen ein Zellkulturartefakt ist oder der *in vivo* Entwicklung der Pankreasfibroblasten entspricht, ist bisher nicht geklärt. Die isolierten Zellen ließen sich nur über einen begrenzten Zeitraum in Kultur halten. Mit Zunahme der Kulturpassagen nahmen die Vermehrungsraten der Zellen deutlich ab. Das Wachstumsverhalten war dabei von der Anwesenheit von Extrazellulärmatrix in der Kultur und vom Alter der Patienten, denen die Gewebeproben entnommen wurden, abhängig. So blieben die Zellen aus Proben jüngerer Patienten und solche, die auf Extrazellulärmatrix kultiviert wurden, länger lebensfähig.

Mittels Farbstofftests wurde nachgewiesen, dass die isolierten Zellen auf Stimulation durch den Wachstumsfaktor PDGF (Platelet Derived Growth Factor) dichteabhängig reagieren, das heißt nur bei verhältnismäßig hoher Wachstumsdichte eine Zunahme der Aktivität aufwies.

Für den Wachstumsfaktor TGF β 1 (Transforming Growth Factor beta 1) wurde eine Expression und Sekretion von den Fibroblasten selbst nachgewiesen, ebenso wie eine Expression der zugehörigen TGF β -Rezeptoren und des TGF β -Aktivators Thrombospondin-1, so dass die Voraussetzungen für eine autokrine Regulierung vorliegen. In weiteren Farbstofftests wurde gezeigt, dass die Reaktion der Zellen auf TGF β 1 abhängig von der Wachstumsdichte und vom Vorhandensein zusätzlicher endogener und exogener Faktoren ist. Es wurde gezeigt, dass endogener TGF β 1 in Abwesenheit weiterer Faktoren eine wachstumshemmende Wirkung entfaltet. Im Zusammenspiel mit anderen Faktoren, die entweder exogen zugesetzt oder von den Fibroblasten selbst produziert werden, bewirkt TGF β 1 hingegen eine Stimulation der Fibroblasten. Übertragen auf die in vivo Situation könnte dies bedeuten, dass im gesunden Pankreas, in dem fibroblastäre Zellen nur in geringer Dichte vorliegen, autokrin sezernierter TGF β 1 eine regulierende Funktion ausübt, während bei Störung der Gefäßpermeabilität durch inflammatorische Prozesse zusätzliche Faktoren in das Gewebe gelangen und TGF β 1 zu einer stimulierenden Wirkung verhelfen.

In Gen-Array-Analysen wurden isolierte Pankreasfibroblasten auf ihr Expressionsmuster in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von Extrazellulärmatrix untersucht. Dabei zeigte sich, dass viele Gene in Fibroblasten auf Extrazellulärmatrix deutlich stärker exprimiert wurden; dies könnte auf eine insgesamt gesteigerte Aktivität der Zellen in Umgebung von Extrazellulärmatrix hinweisen. Unter den stärker exprimierten Genen finden sich einige, die an der Zell-Matrix-Interaktion und an Inflammation und Wundheilung beteiligt sind. Dies verdeutlicht die Rolle der Matrixumgebung für humane Pankreasfibroblasten. In Erkrankungen des Pankreas, die mit einer Organfibrose einhergehen, könnte sich somit eine Mikroumgebung mit ständiger gegenseitiger Einflussnahme fibroblastärer Zellen und der von ihnen selbst produzierten Extrazellulärmatrix ausbilden.

6. Literaturverzeichnis

1. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008 May 15;22(10):1276-312.
2. Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, Warren RS, Friedman SL. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene.* 1998 Jul 9;17(1):115-21.
3. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.* 1998 Jul;43(1):128-33.
4. 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.* 1999 Apr;44(4):534-41.
5. Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas.* 2004 Oct;29(3):179-87.
6. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology.* 1998 Aug;115(2):421-32.
7. Ballardini G, Fallani M, Biagini G, Bianchi FB, Pisi E. Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1988;56(1):45-9.
8. Ballardini G, Groff P, Badiali de Giorgi L, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology.* 1994 Feb;19(2):440-6.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
10. Clark RA. Wound repair. *Curr Opin Cell Biol.* 1989 Oct;1(5):1000-8.
11. Dugina TN, Kiseleva EV, Chistov IV, Umarova BA, Strukova SM. Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation. *Biochemistry (Mosc).* 2002 Jan;67(1):65-74.
12. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986 Dec 25;315(26):1650-9.
13. Elder RT, Song XQ, Chen M, Hopkins KM, Lieberman HB, Zhao Y. Involvement of rhp23, a *Schizosaccharomyces pombe* homolog of the human HHR23A and *Saccharomyces*

cerevisiae RAD23 nucleotide excision repair genes, in cell cycle control and protein ubiquitination. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jan 15;30(2):581-91.

14. Emonard H, Grimaud JA, Nusgens B, Lapiere CM, Foidart JM. Reconstituted basement-membrane matrix modulates fibroblast activities in vitro. *J Cell Physiol.* 1987 Oct;133(1):95-102.

15. Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Deucker S, Sauliunaite D, Streit S, Esposito I, Friess H, Kleeff J. Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia.* 2009 May;11(5):497-508.

16. Fitzner B, Brock P, Nechutova H, Glass A, Karopka T, Koczan D, Thiesen HJ, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Inhibitory effects of interferon-gamma on activation of rat pancreatic stellate cells are mediated by STAT1 and involve down-regulation of CTGF expression. *Cell Signal.* 2007 Apr;19(4):782-90.

17. Gaca MD, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol.* 2002 Mar;36(3):362-9.

18. Gao R, Brigstock DR. A novel integrin alpha5beta1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells. *Gut.* 2006 Jun;55(6):856-62.

19. Gillibert-Duplantier J, Neaud V, Blanc JF, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Thrombin inhibits migration of human hepatic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Jul;293(1):G128-36.

20. Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis--a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion.* 1995;56(5):335-46.

21. Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Aug 19;1378(1):F79-113.

22. Huang GC, Zhang JS, Zhang YE. Effects of retinoic acid on proliferation, phenotype and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in TGF-beta1-stimulated rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* 2000 Dec;6(6):819-23.

23. Igotz RA, Endo T, Massague J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1987 May 15;262(14):6443-6.

24. Ito T. Cytological studies on stellate cells of Kupffer and fat-storing cells in the capillary wall of human liver. *Acta Anat Jpn.* [abstract]. 1951;26:42.

25. Kato Y, Inoue H, Fujiyama Y, Bamba T. Morphological identification of and collagen synthesis by periacinar fibroblastoid cells cultured from isolated rat pancreatic acini. *J Gastroenterol.* 1996 Aug;31(4):565-71.

26. Kim HR, Upadhyay S, Li G, Palmer KC, Deuel TF. Platelet-derived growth factor induces apoptosis in growth-arrested murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 10;92(21):9500-4.

27. Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Fölsch UR, Schäfer H, Schmidt WE. Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid/stellate cells. *Pancreas*. 2001 Jul;23(1):49-54.
28. Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Fölsch UR, Schmidt WE. TGFbeta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul Pept*. 2000 Jun 30;90(1-3):47-52.
29. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
30. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Oct;12(5):634-40.
31. Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, Grunert A, Bachem MG. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest*. 2000 Jan;80(1):47-55.
32. Mallat A, Gallois C, Tao J, Habib A, Maclouf J, Mavier P, Preaux AM, Lotersztajn S. Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J Biol Chem*. 1998 Oct 16;273(42):27300-5.
33. Manapov F, Muller P, Rychly J. Translocation of p21(Cip1/WAF1) from the nucleus to the cytoplasm correlates with pancreatic myofibroblast to fibroblast cell conversion. *Gut*. 2005 Jun;54(6):814-22.
34. Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pinzani M, Pellegrini G, Laffi G, Gentilini P. Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology*. 1998 Feb;27(2):462-71.
35. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh K, Shimosegawa T. Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells. *Br J Pharmacol*. 2003 Dec;140(7):1292-302.
36. Menke A, Yamaguchi H, Gress TM, Adler G. Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor beta1 in pancreatitis in the rat. *Gastroenterology*. 1997 Jul;113(1):295-303.
37. 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*. 2002 Apr;50(4):535-41.
38. Michalski CW, Gorbachevski A, Erkan M, Reiser C, Deucker S, Bergmann F, Giese T, Weigand M, Giese NA, Friess H, Kleeff J. Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis. *J Transl Med*. 2007;5:63.

39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
40. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):50-9.
41. Pandol SJ. Are we studying the correct state of the stellate cell to elucidate mechanisms of chronic pancreatitis? *Gut*. 2005 Jun;54(6):744-5.
42. Phillips 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*. 2003 Feb;52(2):275-82.
43. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jan;4(1):33-45.
44. Ramadori G, Veit T, Schwogler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H, Meyer zum Buschenfelde KH. Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1990;59(6):349-57.
45. Rullier A, Gillibert-Duplantier J, Costet P, Cubel G, Haurie V, Petibois C, Taras D, Dugot-Senant N, Deleris G, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Protease-activated receptor 1 knockout reduces experimentally induced liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Jan;294(1):G226-35.
46. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990 Oct 18;347(6294):669-71.
47. Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grunert A, Bachem MG. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Aug;281(2):C532-43.
48. Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol*. 1993 Aug;122(4):923-32.
49. Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Nov;285(5):G949-58.
50. Shimizu S, Ishii M, Kawakami Y, Kiuchi Y, Momose K, Yamamoto T. Presence of excess tetrahydrobiopterin during nitric oxide production from inducible nitric oxide synthase in LPS-treated rat aorta. *Life Sci*. 1999;65(26):2769-79.
51. Slater SD, Williamson RC, Foster CS. Expression of transforming growth factor-beta 1 in chronic pancreatitis. *Digestion*. 1995;56(3):237-41.

52. Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci.* 1995 Jun;20(6):227-31.
53. Van Laethem JL, Robberecht P, Resibois A, Deviere J. Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology.* 1996 Feb;110(2):576-82.
54. Vlahopoulos S, Zoumpourlis VC. JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry (Mosc).* 2004 Aug;69(8):844-54.
55. von Kupffer C. Über Sternzellen der Leber. In: von Bardeleben K, editor. Abdruck aus Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft auf der 12 Versammlung in Kiel vom 17-20 April 1898. Jena: Gustav Fischer; 1898. p. 80-6.
56. Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res.* 1992 Sep;202(1):1-8.
57. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 20;98(24):13884-8.
58. 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.* 1982 Mar;58(4-6):837-58.
59. Williams JA, Korc M, Dormer RL. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol.* 1978 Nov;235(5):517-24.
60. Yen TW, Aardal NP, Bronner MP, Thorning DR, Savard CE, Lee SP, Bell RH, Jr. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery.* 2002 Feb;131(2):129-34.
61. Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, Komatsu I, Miyazaki A, Watanabe S, Usui K. Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology.* 1984 Jul-Aug;4(4):709-14.
62. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut.* 2003 Sep;52(9):1347-54.
63. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):163-76.
64. Zhong Q, Li G, Gvozdenovic-Jeremic J, Greenberg ML. Up-regulation of the cell integrity pathway in *saccharomyces cerevisiae* suppresses temperature sensitivity of the *pgs1Delta* mutant. *J Biol Chem.* 2007 Jun 1;282(22):15946-53.

7. Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Erstellung der Arbeit sowie Frau Dr. rer. physiol. Marie-Luise Kruse, die mit außerordentlichem Einsatz von der Durchführung der Experimente bis zum Erstellen der Dissertation zum Gelingen der Arbeit entscheidend beigetragen hat. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Fölsch für die Möglichkeit, in seinen Laboratorien zu arbeiten.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. med. Bernd Kremer und Herrn Dr. med. Andreas Schmid für die freundliche Zusammenarbeit bei der Beschaffung der Gewebeproben.

Ich danke meinen klinischen Kollegen in der Kinderklinik, besonders Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Sippell und Herrn Prof. Dr. med. Werner Nikischin für die unermüdliche Aufmunterung und Unterstützung zur Fertigstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die ausdauernde und liebevolle Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

8. Lebenslauf

Name	Timke
Vorname	Christian
Geburtsdatum	15.10.1974
Geburtsort	Leonberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
8/1981-12/1982	Grundschule Drakenburg
1/1983-7/1985	Grundschule Marklohe
8/1985-7/1987	Orientierungsstufe Marklohe
8/1987-7/1994	Gymnasium Hindenburgschule, Nienburg/Weser
7/1994	Allgemeine Hochschulreife
8/1994-10/1995	Zivildienst im Heilpädagogischen Kindergarten der Lebenshilfe Nienburg/Weser
10/1995-5/2002	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
8/1997	Ärztliche Vorprüfung
8/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5/2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 10/2002	Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein Campus Kiel