



Technische Universität München



Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der TU
München,

Direktor: Prof. Dr. H. Friess

Identifizierung und Charakterisierung des Oberflächenantigens Sca-1 im murinen pankreatischen Epithelzell-Isolat

Georg P. L. Leinenkugel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr.Ch. Michalski
2. Prof. Dr. H. Friess

Die Dissertation wurde am 03.03.2015 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.10.2016
angenommen.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
I.1 ÜBER DIE ENTWICKLUNG DES MURINEN PANKREAS	1
I.1.1 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN UND TRANSKRIPTIONELLE REGULATION IM EMBRYONALEN PANKREAS	1
I.1.2 DIFFERENZIERUNG DER ZELLEN IM STADIUM DER PANKREASKNOSPUNG	2
I.2. GEWEBERESIDENTE PROGENITOREN	4
I.2.1 ADULTE STAMMZELLEN	4
I.2.2 STELLENWERT DER PROGENITORSFORSCHUNG VOR DEM HINTERGRUND WICHTIGER PANKREATISCHER ERKRANKUNGEN	4
I.2.2.1 Diabetes	4
I.2.2.2 PDAC	5
I.2.3 STUDIEN ZUR REGENERATION IM ADULTEN PANKREAS	6
I.2.3.1 Derzeit angewandte in-vitro-Techniken	7
I.2.3.2 Bislang identifizierte Zellpopulationen mit regenerativen Eigenschaften	8
I.3 STEM CELL ANTIGEN-1	9
I.3.1 FUNKTION	9
I.3.2 EXPRESSIONSMUSTER	10
I.3.3 REGULATION	11
II. AUFGABENSTELLUNG	13
III. MATERIAL UND METHODEN	15
III.1 VERWENDETE MATERIALIEN	15
III.1.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	15
III.1.2 MEDIEN, REAGENZIEEN, KITS	17
III.1.3 ANTIKÖRPER, PRIMER	19
III.1.4 PROGRAMME	23
III.1.5. MAUSMODELL	23
III.2 ZELLKULTUR	24
III.2.1 PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER EPITHELZELLEN	24
III.2.2 PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG PANKREATISCHER STROMAZELLEN	25
III.2.2.1 Passagieren	25
III.2.2.2 Kryokonservierung	26
III.2.2.3 Auftauen der Zellen	26
III.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl	26
III.2.3 CO-KULTIVIERUNG PRIMÄRER STROMAZELLEN MIT EPITHELZELL-ISOLAT	27
III.2.4 PRÄPARATIONSTECHNIKEN UND KULTIVIERUNG VON SCA-1 ⁺ ZELLSPHÄREN	27
III.2.4.1 Grundlagen	27
III.2.4.2 Kultur und Passage	28
III.2.4.3 Kultivierung von Sca-1 ⁺ Zellen/ Sphären in Matrigel	28
III.3 IN-VITRO BEHANDLUNG MIT PHARMAKOLOGISCH WIRKSAMEN SUBSTANZEN	29
III.3.1 PRÄEXPERIMENTELLES VERFAHREN	29
III.3.2 STIMULATIONSVERSUCHE PRIMÄRER EPITHELZELLEN MIT CAERULEIN	30
III.3.2.1 Erhebung der exokrinen Funktion primärer Epithelzellen nach Caerulein Stimulation	30

Inhaltsverzeichnis

III.3.2.2 Caerulein-Stimulation zur quantitativen Expressionsanalyse	31
III.3.3 STIMULATIONSVERSUCHE PRIMÄRER EPITHELZELLEN MIT MURINEM INTERFERON-B	31
III.3.3.1 Interferon-Stimulation zur quantitativen Expressionsanalyse	32
III.3.3.2 Interferon-Stimulation zur Zell-quantifizierenden Untersuchung durch FACS	32
III.3.3.3 Interferon-Stimulation in Co-Kultur zur quantitativen Expressionsanalyse	33
III.4.1 HISTOLOGISCHE ANALYSEVERFAHREN	35
III.4.1.1 HERSTELLUNG VON PARAFFINBLÖCKEN	35
III.4.1.2 MIKROTOMIE	35
III.4.1.3 HE-FÄRBUNG	36
III.4.1.4 IMMUNHISTOCHEMIE	37
III.4.1.4.1 Grundlagen	37
III.4.1.4.2 Immunhistochemische Doppelmarkierung an Paraffinschnitten	37
III.4.1.4.3 Immunfluoreszenz doppelmarkierter Zellkulturpräparate	38
III.4.1.4.4 Präparation der Zellen	38
III.4.1.4.5 Zytozentrifugation	39
III.4.1.4.6 Poly-L-Lysin Beschichtung	39
III.4.1.4.7 Matrigel	39
III.4.1.4.8 Immunfluoreszenz Färbung	39
III.4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEVERFAHREN	41
III.4.2.1 PCR	41
III.4.2.1.1 Grundlagen	41
III.4.2.1.2 RNA-Extraktion	41
III.4.2.1.3 Elektrophoretische Bestimmung der RNA-Integrität	42
III.4.2.1.4 Reverse Transkription	42
III.4.2.1.5 Primer Design	42
III.4.2.1.6 RT-PCR	43
III.4.2.1.7 DNA - Elektrophorese	44
III.4.2.1.8 Quantitative RT-PCR	44
III.4.2.1.9 Auswertung der relativen Quantifizierung	45
III.4.2.2 FLUORESZENZAKTIVIERTE ZELLSORTIERUNG (FACS)	47
III.4.2.2.1 Grundlagen	47
III.4.2.2.2 Antikörpermarkierung der Zellen	48
III.4.2.2.3 <i>Gating</i>	49
III.4.3 ZELLSPHÄREN-ASSAY DER SCA-1+ SUBPOPULATION	50
IV. ERGEBNISSE	52
IV.1 ETABLIERUNG DER PANKREATISCHEN EPITHELZELL-ISOLATION	52
IV.1.1 QUALITATIVE UNTERSUCHUNG PRIMÄRER EPITHELZELLEN	52
IV.1.2 FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG ISOLierter EPITHELZELLEN	54
IV.1.2.1 Caerulein induzierte Sekretionsantwort digestiver Enzyme und LDH	54
IV.1.2.2 Caerulein induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine	56
IV.2 UNTERSUCHUNG PANKREATISCHER VORLÄUFERZELLMARKER UND DIE IDENTIFIZIERUNG DES OBERFLÄCHENANTIGENS SCA-1 IN ZUSAMMENHANG MIT INTERFERON-B	58
IV.2.1 INTERFERON-B -INDUZIERTER AKTIVIERUNG DER IFNAR-STAT-SIGNALKASKADE IN PANKREATISCHEN EPITHELZELLEN	58
IV.2.2 SCA-1 UND DIE EXPRESSION WEITERER VORLÄUFERZELLMARKER IM PRIMÄREN EPITHELZELL-ISOLAT	60
IV.2.3 QUALITATIVE UNTERSUCHUNG PRIMÄRER STROMAZELLEN	65
IV.2.4 KULTUR- UND INTERFERON-B-ABHÄNGIGE INDUKTION DER SCA-1 EXPRESSION PRIMÄRER EPITHELZELLEN IN CO-KULTIVIERUNG MIT PRIMÄREN STROMAZELLEN	66
IV.3 CHARAKTERISIERUNG DER SCA-1⁺ SUBPOPULATION	69
IV.3.1 SEPARATION DER SCA-1 ⁺ SUBPOPULATION AUS DEM EPITHELZELL-ISOLAT	69

IV.3.2. KULTUR-ABHÄNGIGE ZUNAHME DER SCA-1 ⁺ EXPRESSION UND EINFLUSS VON INTERFERON-B AUF DIE GRÖÖE DER POPULATION	70
IV.3.3 FÄHIGKEIT ZUR BILDUNG PRIMÄRER SPHÄREN; EINFLUSS VON INTERFERON AUF DIE SPHÄRENBILDUNG	71
IV.3.4 SCA-1 ⁺ ZELLEN IN DREIDIMENSIONALER KULTURUMGEBUNG	75
IV.3.5 IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSEN	78
V. DISKUSSION	83
V.1 DIE EPITHELIALE PRIMÄRZELL-KULTUR	83
V.1.1 QUALITATIVE CHARAKTERISIERUNG:	83
V.1.2 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG:	84
V.2 UNTERSUCHUNG PANKREATISCHER VORLÄUFERZELLMARKER UND DIE IDENTIFIZIERUNG DES OBERFLÄCHENANTIGENS SCA-1 IN ZUSAMMENHANG MIT INTERFERON-B	85
V.2.1 NACHWEIS DER EPITHELIALEN JAK-STAT1/2 SIGNALTRANSDUKTION	85
V.2.2 EXPRESSION VON VORLÄUFERZELLMARKERN UND SCA-1 IN SUSPENSIONSKULTUR	86
V.2.3 SCA-1 EXPRESSION IN CO-KULTUR	89
V.3. CHARAKTERISIERUNG DER SCA-1⁺ SUBPOPULATION	90
V.3.1 DURCHFLUSSZYTOTOMETRISCHE VERFAHREN	90
V.3.2 SPHÄREN-BILDUNGSKAPAZITÄT	91
V.3.3 MORPHOLOGIE UND DIFFERENZIERUNGSSTUFEN IN DREIDIMENSIONALER KULTURUMGEBUNG	93
V.3.4 SCA-1 UND CK19 EXPRESSION IM MURINEN WT-PANKREAS	95
VI. ZUSAMMENFASSUNG	97
VII. LITERATURVERZEICHNIS	99
VIII. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	108
IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110
X. LEBENSLAUF	113
XI. DANKSAGUNG	114

I. Einleitung

I.1 Überblick über die Entwicklung des murinen Pankreas

I.1.1 Morphologische Veränderungen und transkriptionelle Regulation im embryonalen Pankreas

Das Pankreas besteht bei grober histologischer Beurteilung im Wesentlichen aus drei Zelltypen: azinären, duktalem und endokrinen Zellen. Eine funktionelle Unterscheidung grenzt den endokrinen (Glukagon-produzierende α -Zellen, Insulin-produzierende β -Zellen, pankreatisches Polypeptid-produzierende γ -Zellen und Somatostatin-produzierende δ -Zellen [121]) von dem exokrinen Anteil ab, der für die Sezernierung der Verdauungsenzyme verantwortlich ist.

Das Pankreasepithel entsteht wie das Epithel des übrigen Verdauungstraktes aus dem Entoderm, dem Inneren der drei Keimblätter. Gentranskripte, die bei der definitiven Ausbildung des entodermalen Keimblattes beteiligt sind, beinhalten u.a. Nodal ein Mitglied der TGF- β Superfamilie und GATA-4/6.

Auch die Wnt-Signalkaskade ist in der Regulation der Differenzierungsstufen in Mesoderm und Entoderm beteiligt [78]. So ist die Wnt-Signalkaskade im Zusammenspiel mit FGF für die entodermale Ausbildung des Vorderdarmes in eine anteriore-posteriore Achse unabdingbar [27, 120]. Unterhalb der Wnt- und Nodal-Signaltransduktion befinden sich Transkriptionsfaktoren wie Gata-zinc-finger, Sox, Faktoren der HMG (engl.: High Mobility Group) und Fox (engl.: Fork head box) [120, 142]. Aus dem Entoderm bildet sich nach der Gastrulation (Tag 8,5 pc) durch morphologische Änderungen in der anterioren Region das Epithel des tubulären Vorderdarmes [120].

Die weitere Entwicklung im Vorderdarm beginnt mit der Ausknospung von ventralen (Tag 10,25-10,5 pc) und dorsalen Anlagen (Tag 9,5 pc), die zunächst in das umgebende Mesenchym einwachsen und sich dort in distinkte Zellen differenzieren [34]. Das umgebende Mesoderm stützt Signalmuster, die für die Formierung dieses frühen Organstadiums essentiell sind. Dazu gehören FGF, Wnt, Retinsäure (RA) und Sonic-Hedgehog-Signalwege [120]. Unterhalb davon befinden sich wiederum Transkriptionsfaktoren wie Fox/HNF, ParaHox und Hox-Faktoren, die regulierend an der späteren Entoderm-Spezifikation in epitheliale Differenzierungsstufen mitwirken [39, 120]. Es muss dabei vorbehaltlich davon ausgegangen

werden, dass der äußerst komplexe Prozess der Vorderdarmformation auch von weiteren, bislang unbekanntem Faktoren beeinflusst wird [34].

Mit der Rotation des Duodenums nähern sich beide Anlagen an (Tag 13-14 pc) und fusionieren zum unpaaren Endorgan mit Zusammenführung des ventralen und dorsalen Ausführungsgangs zum gemeinsamen Ductus pancreaticus (Syn: Ductus Wirsungianus). Die ventrale Knospe bildet hier Teile des Caput, die dorsale Ausstülpung den Korpus und die Cauda des definitiven Pankreas [34].

I.1.2 Differenzierung der Zellen im Stadium der Pankreasknospe

Es wird davon ausgegangen, dass die Regulation von Vorläuferzellen, die später den exokrinen und endokrinen Teil des Pankreas ausbilden, in erster Linie im Stadium der Pankreasknospe (Tag 9,5-10,5 pc) durch komplexe parakrine Signale sowie durch Interaktion mit dem umgebenden Mesenchym gesteuert wird. Erste Insulin- bzw. Glukagon-sensitive Zellen lassen sich dabei 9,5 Tage pc nachweisen [34]. Wichtige Signale gehen dabei von FGF-10 und Faktoren der TGF- β Familie aus, wie das bereits oben erwähnte Nodal, dessen stadienabhängige Expression oder Repression die Differenzierung der distinkten Populationen im Pankreas beeinflusst [91, 101, 120]. FGF-10 ist nachweislich für die Expansion von Pdx1-exprimierende-Progenitoren verantwortlich [9, 120]. Ein weiterer wichtiger Bestandteil sind die Partizipatoren des Notch-Signalweges, einer Familie die sich aus 3 Rezeptortypen zusammensetzt (Notch 1,2,4) [34]. Der Ligand Notch-Delta reguliert dabei die Expression des Transkriptionsfaktor Ngn3 (Neuroginin 3). Durch *Loss-of-Function*-Experimente konnte gezeigt werden, dass diese Ngn3-exprimierende Zellen die Fähigkeit besitzen, sich in alle Zellen der endokrinen Linie zu differenzieren und deshalb als Marker für endokrine Progenitoren im entwickelnden Pankreas beschrieben sind [37, 112, 120]. Notch, der durch die Liganden Delta, Serrate oder Jagged aktiviert wird führt also über die Expression von Ngn3 in speziellen Zellen des embryonalen Pankreas zu einer endokrinen Differenzierung.

Damit nicht das gesamte Pankreas sich endokrin differenziert, muss diese Notch abhängige Signal-Kaskade wieder reprimiert bzw. abgeschaltet werden. Dies geschieht z.B. durch FGF-Rezeptorabhängige Signalwege [91] und das Prinzip der sogenannten lateralen Inhibition deren zugrundeliegende Prinzipien hier nicht näher ausgeführt werden sollen (Einzelheiten dazu s. Ganten et al. (2006)).

Für die Expansion des exokrinen Kompartiments spielt nach neueren Studien vor allem der β -Catenin/Wnt-Signalweg eine Rolle [120]. So konnten Murtaugh et al. (2005) nachweisen, dass in konditionalen β -Catenin Knockout-Mäusen ein dramatischer Verlust des exokrinen Kompartiments nachweisbar war während endokrine Zellen normal entwickelt waren. In diesem Zusammenhang ist der TF Ptf1a zu nennen. Dieser wurde als Regulator von exokrinen Enzymen wie Amylase und Lipase beschreiben sowie für die Propagierung Ptf1a⁺ exokriner Vorläuferzellen [66, 89, 120].

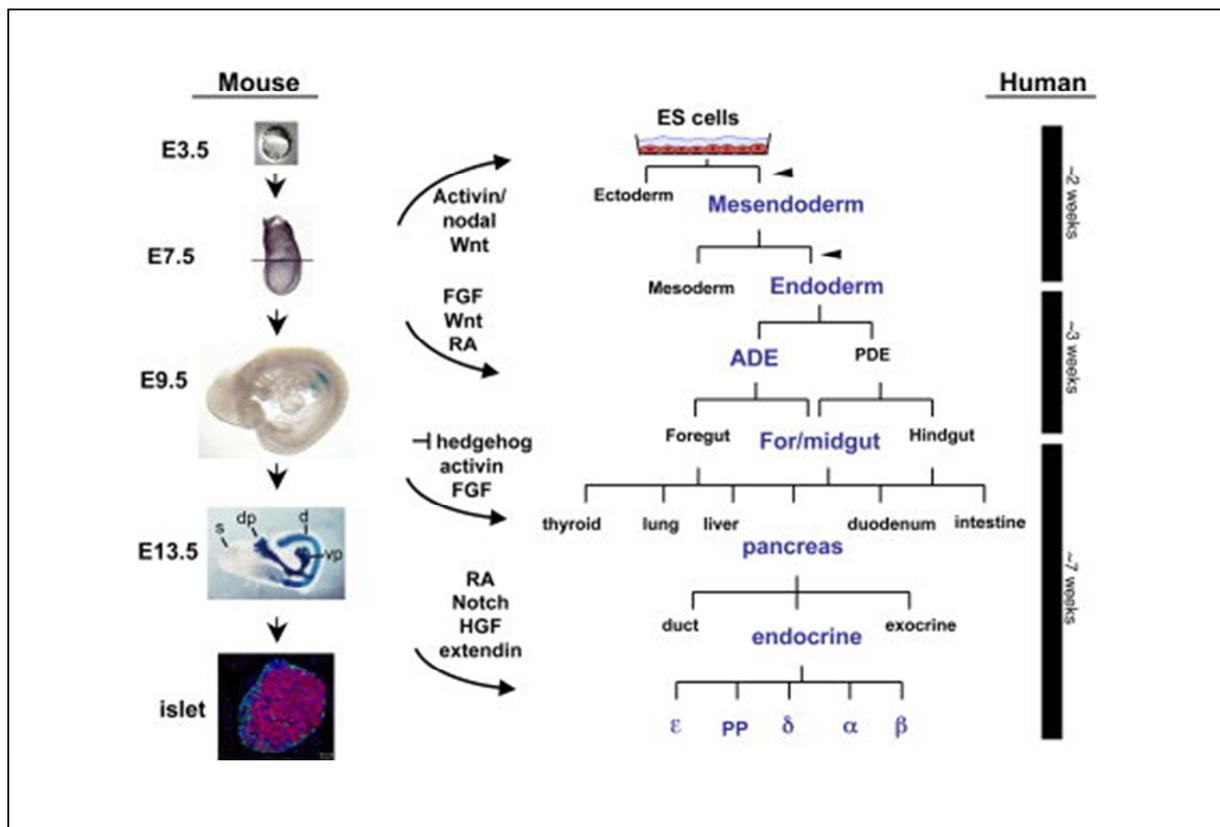


Abb.1: Embryonale Entwicklungsstufen und transkriptionelle Regulation in vivo und in embryonalen Stammzell-Kulturen (ES) [120] (li.) Murine Embryos in verschiedenen Entwicklungsstadien (Tag 3,5-13,4). E9,5/13,5: LAcZ-Färbung zeigt Pdx1⁺ Zellen an; (s=stomach), (d=duodenum), (dp= dorsal pancreas), (vp= ventral pancreas). Islet: Glukagon-exprimierende α -Zellen (grün) und Insulin-exprimierende β -Zellen (rot) (**re.**) Äquivalente Entwicklungsstufen im humanen Pankreas. (**Mitte**) Entwicklungsstufen der pankreatischen Linie bis zur Ausbildung endokriner Zellen.

I.2. Geweberesidente Progenitoren

I.2.1 Adulte Stammzellen

Eine weit verbreitete Definition von Stammzellen unterscheidet anhand des Differenzierungspotentials zwischen embryonalen (ES) und adulten Stammzellen. Hierbei besitzen beide Zelltypen in unterschiedlichem Ausmaß die Fähigkeit zur klonalen Teilung (engl: Self-renewal) und das Potenzial, sich in distinkte Zelllinien zu entwickeln (engl.: Multipotency). Embryonale Stammzellen (ES) die in dem Blastozystenstadium der embryonalen Entwicklung erscheinen und fähig sind, sich in alle drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm) zu differenzieren, bezeichnet man daher als pluripotent und konnten bislang nur aus Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden [5]. Adulte Stammzellen werden auch als gewebsspezifische Stammzellen beschrieben. Hier werden verschiedene Begriffe angewendet, die sich durch das Differenzierungspotential definieren. Multipotenz bedeutet die Fähigkeit, viele verschiedene Zelltypen einer bestimmten Linie auszubilden, Oligopotenz, zwei oder mehrere Linien und Unipotenz lediglich die Fähigkeit, einen einzigen enddifferenzierten Zelltyp zu generieren [61]. Gewebsresidente Zellen mit Progenitoreigenschaften besitzen daher eine Schlüsselfunktion in der Regeneration abgestorbener Zellen, vor allem in Organen mit hohem Zellumsatz. Sie wurden in zahlreichen Geweben charakterisiert: Gehirn [74, 75]), Brust [79] Epidermis (Review: [11]), Darmkrypten des Digestionstraktes [10] und ausführlich beschrieben, in der hämatopoetischen Stammzellnische (Review: [132]).

I.2.2 Stellenwert der Progenitorforschung vor dem Hintergrund wichtiger pankreatischer Erkrankungen

I.2.2.1 Diabetes

Nach der amerikanischen Einrichtung CDC (engl.: Center for disease control and prevention) litten 2010 8,3% der amerikanischen Bevölkerung an Diabetes (insgesamt mehr als 25 Millionen Menschen). Die weltweit ansteigende Inzidenz fördert das Bemühen nach der Suche neuer therapeutischer Strategien, um die bisher am häufigsten durchgeführte Insulin-Ersatztherapie abzulösen. Daher werden derzeit Ansätze verfolgt, die Expansion von adulten β -Zellen voranzutreiben und alternativ nach Wegen gesucht, Stamm-/Vorläuferzellen über

gezielte Induktion von Differenzierungsprogrammen zu Insulin-produzierenden endokrinen Zellen zu verändern [43]. Dazu wird u.a. versucht, Zellmarker von distinkten Subpopulationen zu identifizieren, die unter gezielter Behandlung endokrine Eigenschaften annehmen können [13, 28, 106, 109, 143]. Signalwege, die an der Ausbildung der endokrinen Linie beteiligt sind und zum Teil im vorigen Kapitel in diesem Zusammenhang genannt wurden, sind TGF- β , Wnt, Notch, Sonic Hedgehog [91]. Diskutiert wurden duktale, zur β -Zelltransformation befähigte Zellen [105], Zellen mit Expression von Ptf1a [66], sowie Zellen mit hohen Pdx1 Spiegeln die fähig sind, mehrere pankreatische Linien zu generieren [47, 91].

I.2.2.2 PDAC

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine bösartige Erkrankung und stellt in den USA die vierthäufigste Krebstodesursache dar, mit einer medianen Überlebensrate unter 6 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 3-5% [48]. Aufgrund der vielseitigen Ähnlichkeiten der Tumorphysiologie zu Stamm- und Vorläuferzellen, wie die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Differenzierung, rückten diese zur Erlangung neuer Erkenntnisse in der Tumorinitiation und Progression vermehrt in den Fokus der Aufmerksamkeit [103]. Dieser - als Cancer-Stem-Cell Theorie (CSC) bezeichnet Ansatz- beschreibt Tumorstammzellen als kleine Einheit einer heterogenen Tumormasse, die die Tumorgenese vorantreiben, in dem sie sich durch besonders hohe proliferative Aktivität und Therapieresistenz auszeichnen [103] und hierarchisch von mutierten adulten Stammzellen ausgehen [22].

Auch pankreatische Tumorstammzellen sind, definiert durch spezifische Expressionsmuster, weiterführend beschrieben worden: Pdx1⁺ [55], Cd44⁺Cd24⁺Esa⁺ [76], Cd133⁺ Cxcr4⁺ [46]. Die Forschungsarbeit zu pankreatischen Zellen mit Vorläuferzeleigenschaften ist somit nicht nur für das Verständnis der Tumorgenese wichtig, sondern auch für die Entwicklung neuer zielgerichteter therapeutischer Strategien, wie z.B. an die Oberflächenexpression assoziierte Therapieansätze durch monoklonale Antikörper.

I.2.3 Studien zur Regeneration im adulten Pankreas

Schon frühe Modelle konnten eine regenerative Aktivität auch im adulten Pankreas nachweisen, die als eine Rekapitulation embryonaler Entwicklungsschritte durch Aktivierung von Progenitoren beschrieben worden ist [67]. So konnte bereits in sehr frühen physiologischen Studien am Ratten-Pankreas gezeigt werden, dass selbst nach 90-prozentiger Pankreatektomie das exokrine und endokrine Pankreas regeneriert wurde [15, 18, 115]. Auch Ligation des Ductus Pancreaticus führte zu ähnlichen Ergebnissen d.h., des Ersatzes von abgestorbenem Gewebe durch funktional neue Zellen [128]. In diesen Modellen wurde festgestellt, dass diese regenerative Aktivität zunächst im duktalem Epithel und dann in den Inselzellen nachweisbar war [12, 67] und eine extensive Neubildung vor allem in Nachbarschaft zu duktalem Strukturen zu lokalisieren war [12, 40, 67, 115].

Diesen im duktalem Epithel residente Zellpopulationen, wurden *in vitro* hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials die Fähigkeit zugeschrieben, Zellen der exokrinen und endokrinen Linie generieren zu können [14, 23, 121].

Die unter (I.1.2) erwähnten Differenzierungsstufen sehen einen gemeinsamen endodermalen Ursprung für die pankreatische endokrine und exokrine Linie vor. Fraglich ist, ob die erwähnten transkriptionellen Netzwerke während der Organogenese auch in der Zell-Erneuerung und Re-Organisation von funktionellen Einheiten im adulten Pankreas aktiv sind. Ein Gewebeschaden, wie in Folge einer Pankreatitis, verursacht ein hohen Grad an zellulärer Desorganisation und benötigt nachweislich einen hohen *Zell-Turnover* zur Rehabilitation der Gewebeintegrität [65]. Eine neuere Theorie zur Regeneration im adulten Pankreas erweitert den Ansatz von der Existenz eines klassischen Stammzell- oder Progenitoren-Kompartiments auf bereits ausdifferenzierte adulte Zellen, die auf bestimmte Umweltreize hin progenitor-ähnliche Eigenschaften annehmen können, sog. fakultative Stammzellen (FSCs). [32, 43, 65]. Dazu zählen Transdifferenzierungsprozesse, bei dem der Zelltyp eines Keimblatts sich in den Zelltyp eines anderen Keimblatts umwandeln kann. In manchen Studien wurde dabei vor der Änderung der Zellidentität ein vorhergehendes Stadium mit einem hohen Grad der zellulären Plastizität und Suszeptibilität beobachtet, was als Dedifferenzierung bezeichnet wurde. Dies beschreibt eine rückwärtige Entwicklung bereits ausdifferenzierter Zellen zu einem progenitor-ähnlichen Phänotyp, mit Marker-Expression, die auf die embryonale Entwicklung limitiert sind [96]. Die Eigenschaft der Transdifferenzierung wurde vor allem Zellen azinärer Herkunft attribuiert, die auf diese Weise duktalem Zellen regenerieren konnten. [24, 85, 104,

140]. Auch wurde Zellen, die in enger Nachbarschaft zu azinären Strukturen lokalisiert sind und als zentroazinäre Zellen [72] betitelt wurden die Fähigkeit der klonalen Teilung und Differenzierung in exokrine Zellen und Zelltypen mit Glukagon-reaktiver Insulinsekretion zugeschrieben [106]. Zulewski et al. (2001) beschrieben eine distinkte Nestin positive Population in den Langerhanschen Inseln, die in vivo keine epithelialen Marker aufwies und in vitro exokrine, endokrine und Antigene der Leberzelllinie exprimierte. Weitere Kandidaten für pankreatische Progenitoren vornehmlich mit der Fähigkeit endokrine Eigenschaften anzunehmen, sind mesenchymaler [113] und epithelialer [44] Herkunft. Ergänzend zu den hier beschriebenen Ansätzen postulierte eine andere Gruppe anhand von *Lineage-Tracing*-Experimenten, dass Regeneration in der endokrinen Linie nicht zwangsläufig die Aktivität von progenitor-ähnlichen Zellen benötigt, sondern dass ein großer Teil ausdifferenzierten β -Zellen durch klonale Replikation regenerierbar wird [122].

I.2.3.1 Derzeit angewandte in-vitro-Techniken

Neueren Studien gemein ist, dass versucht wird, über phänotypische Expressionsmuster mögliche Zellen mit progenitortypischen Eigenschaften zu identifizieren, zu isolieren und anzureichern. Dies geschieht technisch vor allem durch den Einsatz von FACS (engl.: Fluorescence-activated cell sorting) bei dem so identifizierte pankreatische Subpopulationen von den übrigen separiert werden können [106, 113, 121]. Diese Methode lehnt sich an die Erfolge in der Erforschung der hämatopoetischen Stammzellnische an, bei der Stammzellen deterministisch über die Oberflächenexpression bestimmter Antigene von den übrigen separiert und so charakterisiert werden konnten [119] (Review: [67]).

Ergänzt wird diese durch FACS-Techniken ermöglichte Untersuchung distinkter Zellpopulationen durch in-vitro-Stammzell-Assays zur Untersuchung klonaler Teilung und Differenzierungskapazität sowie der Verifizierung dieser funktionellen Eigenschaften in vivo [92]. Dazu werden mögliche Vorläuferzellen u.a. unter Limitierung der Zelladhärenz und unter Anwesenheit bestimmter Wachstumsfaktoren wie FGF und EGF kultiviert und ihre Fähigkeit beurteilt, durch klonale Teilung gebildete Zellsphären auszubilden (engl.: Sphere-forming assay). Diese Untersuchungstechnik wurde in der Forschung neuronaler Progenitoren entwickelt, und von Reynolds et al. (1992) erstmals beschrieben. Rovira et al. (2010) übertrugen diese Technik erstmals auf mögliche pankreatische Vorläuferzellen und nannte so gebildete Kolonien fortan Pankreatosphären. Durch diese Methodik charakterisierte

pankreatische Zellen mit Regenerationspotential wurden so schon mit der Expression von Nestin [113] und hohem Level von *Aldh1a1* [96] assoziiert.

I.2.3.2 Bislang identifizierte Zellpopulationen mit regenerativen Eigenschaften

Sehr deutliche Hinweise bestehen bezüglich der Rolle von Pdx1⁺, Cpa1⁺-Zellen als eine während der Organogenese existierende, pankreatische Population, die fähig ist, alle pankreatischen Linien auszubilden [41, 141] (Review: [67]). Auch Ngn 3⁺ (engl: Neuroginin) exprimierende Zellen aus embryonalem und adultem Pankreas scheinen fähig zu sein, zumindest Zellen der endokrinen Linie generieren zu können [41] (Review: [67]). Beide stellen wie oben beschrieben, Transkriptionsfaktoren der embryonalen Entwicklung dar, sind aber aufgrund ihrer nukleären Lokalisation nur schwer von der übrigen Zellmasse separierbar [81]. Zudem ist es nicht nachgewiesen, dass sich diese Transkriptions-Netzwerke die während der Organogenese aktiv sind, auch analog auf die regenerativen Vorgänge im adulten Pankreas übertragen lassen.

Wie bereits zum Teil oben angedeutet, wurden weitere progenitor-ähnliche Zellen anhand ihrer *C-met*- [121], *Aldh1a1*- [106] und Nestin-Expression [113] im adulten Pankreas identifiziert, blieben aber bislang ohne Bestätigung durch die Evaluation weiterer Forschungsgruppen.

Jüngere Ansätze untersuchen die Rolle von pankreatischen Zellen, die hämatopoetische Stammzellmarker wie C-kit, Cd133 und Sca-1 [90, 119, 137] exprimieren und auch vermehrt in extrahämatopoetischem Gewebe identifiziert werden. So zeigten pankreatische C-kit⁺ Zellen eine erhöhte Proliferationsaktivität in vitro im Vergleich zu C-kit⁻ Zellen mit Expression endokriner Marker [77] und klonaler Replikation in einem speziellen Kulturmodell [81]. In einer anderen Studie wurden spezifisch pankreatische Sca-1⁺ Zellen isoliert und in vitro mit Eigenschaften endokriner Zellen und der Expression pankreatischer Vorläuferzellmarker wie Pdx1 und Ngn3 assoziiert [109]. Auch in dieser Arbeit wurde sich schwerpunktmäßig auf die Sca-1 Expression sowie auf die Isolierung und Charakterisierung von Sca-1⁺ Zellen konzentriert.

I.3 Stem cell antigen-1

I.3.1 Funktion

Stem cell antigen 1 (Sca-1 oder Ly6A) ist ein GPI (Glycosyl Phosphatidylinositol) verankertes Zelloberflächenprotein der Ly6 Familie. Dieses Antigen ist auf sog. *Lipid-Rafts* auf der Membran lokalisiert, die eine wichtige Rolle in der Signalübermittlung und Konzentrierung von Schlüssel-Faktoren in der Signal-Transduktion darstellen [116]. Sca-1 - gilt wie im vorigen Absatz beschrieben- als etablierter Marker zur Separation von hämatopoetischen Stammzellen.

Eine Annahme zu Funktion der Sca-1-Signaltransduktion ist die Propagierung von Adhäsion. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Überexpression in murinen transgenen T-Zellen zu Selbstaggregation und Adhärenz zu anderen B- und T-Zellen *in vitro* führt [6], (Review:[50]). In Analogie banden Sca-1/IgM Proteinchimäre an Cd22⁺ B-Zellen [95], (Review:[50]).

Andere Zuordnungen zu der Funktion ließen sich vor allem durch Sca-1^{-/-} Knockout-Mäuse identifizieren. Hinsichtlich der regenerativen Funktionen ließ sich in 7 Monate alten Sca-1^{-/-} Mäusen früh Anzeichen von Osteoporose eruieren, die auf einer verringerten Fähigkeit der Knochenneubildung beruhten, mit nachweislich starkem Abfall von Osteoprogenitoren und Osteoblasten [16], (Review: [50]).

Auch der Durchmesser von Myofibrillen erwies sich in jungen Sca-1^{-/-} Mäusen (2-4 Monate) im Vergleich zu WT-Mäusen etwas erhöht, während er in älteren Tieren (12 Monate) drastisch reduziert war [86], (Review: [50]). Auch konnte anhand von Sca-1^{-/-} Tieren gezeigt werden, dass residente Herzmuskelvorläuferzellen ohne funktionales Sca-1 ihre regenerative Aktivität bei künstlich induziertem Schaden *in vivo* und *in vitro* verloren [4]. Auch die Hämatopoese bei Sca-1^{-/-} Mäuse lief nur eingeschränkt ab, mit verminderter Ausbildung erythroider Zellen, Makrophagen, Megakaryozyten, Thrombozyten sowie einem kompetitiven Nachteil in Repopulationsassays gegenüber WT-Mäusen [56], (Review: [50]). Versuche mit Sca-1^{-/-} Knockout-Tieren zur Evaluation der Rolle von Sca-1 in der Regenerationsfähigkeit des Pankreas stehen noch aus.

I.3.2 Expressionsmuster

Sca-1 wird in Kombination mit anderen Markern verwendet, um hämatopoetische Stammzellen (HSC) zu isolieren [90, 119, 137], (Review: [50]). Ausgehend von der HSC und während der nachfolgenden Differenzierungsstufen ist die Sca-1 Expression komplex und stark stadienabhängig auf verschiedenen Zellen der hämatopoetischen Linie nachweisbar [90]. Eine weitergehende Beschreibung ist allerdings in dieser Arbeit nicht vorgesehen.

Außerhalb des blutbildenden Systems ist die Sca-1 Expression ebenfalls mit Progenitoren assoziiert worden und es wurden mehrere Ansätze verfolgt, diese vorrangig mittels FACS zu charakterisieren. So konnte eine Expression in Prostata [19, 69, 73, 134], Skelettmuskel [59, 71]), Herz [84, 125, 136], Brustdrüse [29, 130], Dermis [123] und in der submandibulären Speicheldrüse [49, 98] bereits nachgewiesen werden (Review:[50]). Nicht in allen Fällen liefern diese Studien eindeutige Evidenz für eine geweberesidente Sca-1⁺-Progenitorpopulation, sie bestärken aber die Fortsetzung der Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet. Deutliche Belege für die regenerativen Fähigkeiten von Sca-1⁺ Zellen, wurden anhand von Repopulationsassays mit Sca-1⁺-Isolaten bislang in Prostata [134] , Brustdrüse [29], Niere [25] erbracht; ebenso durch weitere Ansätze in der submandibulären Speicheldrüse [98] und im Herzen [125]. Bisher durchgeführte Bestimmung der Expressionsverteilung in soliden Organen ergab dabei einen Anteil von 15 – 29% Sca-1⁺ in der Prostata [134], 20% in der Brustdrüse [130] (Review: [50]), 8,55% im murinen Herzen [125] und 1,42% in der submandibulären Drüse [49]. Hinsichtlich der Sca-1 Expression im Pankreas wurde beschrieben, dass sie im embryonalen Pankreas in verschiedenen Entwicklungsstadien (12,5-; 15,15-; 17,5-Tage pc) unterschiedlich stark ausgeprägt ist [81]. Für den adulten Pankreas lieferten lediglich Seaberg et al. (2004) die Daten, dass etwa 9% der Inselzellen und 15% der duktaalen Zellen Sca1⁺ sind. Sca-1 scheint zudem oft quantitativ mehr in Neoplasien exprimiert zu sein. Nachgewiesen wurde dies in Tumoren der Prostata [134], Brustdrüse [38] und im Retinoblastom [114] (Review:[50]).

Expressionsanalysen in soliden Organen sind allerdings nur aussagekräftig, wenn diese Sca-1 exprimierenden Zellpopulationen durch Stammzellassays hinsichtlich Klonalitäts- und Differenzierungsfähigkeiten weiterführend charakterisiert werden. Eine solche Sphärenbildungskapazität von Sca-1⁺ Isolaten konnte mit epithelialen Zellen der Brustdrüse [29], Herzmuskelzellen [94, 136]) und Zellen der Prostata [69] dargelegt werden. Pankreatische Sca-1⁺ Zellen wurden bislang mit diesen in-vitro-Techniken nur unzureichend

untersucht. Lediglich Samuelson et al. (2011) konnten eine erhöhte Proliferationsaktivität in pankreatischen Sca-1⁺ Kolonien feststellen und attribuierten diesen endokrine Eigenschaften.

I.3.3 Regulation

Wenig ist bekannt über die Sca-1 Expression regulierenden Faktoren noch über die Sca-1-*Downstream-Targets*. Neben der Tatsache, dass *Tnf-α* und Anti-Fas Antikörper die Sca-1 Expression herabregulieren [108], sind Interferon- $\alpha/\beta/\gamma$ als Induktoren beschrieben worden (Review:[50]).

Zwei groß angelegte in vivo-Studien belegten, dass Sca-1⁺ hämatopoetische Stammzellen (HSC) durch Interferon- α Applikation und mediiert durch aktiviertes JAK-STAT Protein, vermehrt Sca-1 exprimierten und über einen Eintritt in den Zellzyklus aus G₀ in einen proliferativen Zustand übergingen [110, 124]. HSC mit funktionell inaktivem IFNAR-Rezeptor sowie Sca-1^{-/-} und STAT 1^{-/-} zeigten dabei keine Sensitivität auf Interferon- α , was die Beteiligung von Sca-1 und STAT in der durch Interferon-induzierten Proliferation von HSC beweist [124].

Zhao et al. (2010), schrieben Interferonen, die auch in inflammatorisch veränderten soliden Organen in höheren Mengen sezerniert werden, die Rolle zu, bereits ausdifferenzierte Zellen in einen proliferativen Zustand zu versetzen und verknüpften diese Eigenschaft mit der Sca-1 Expression [139]. Eine andere Studie belegte, dass sich die JAK-STAT-Signalweiterleitung auch in intestinalen Stammzellen (ISCs) Proliferations-induzierend auswirkte [58]. In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Interferon- γ über eine Expressionsinduktion von Sca-1 zu einer Expansion von Lineage⁻, Sca 1⁺, c Kit⁺ (LSK) in vitro und in vivo führt [139]. Auch auf regulatorischer Ebene ist bekannt, dass Sca-1 von einem Interferon-induzierbaren Gen exprimiert wird [45]. In der submandibulären Speicheldrüse konnte nach Gewebeschaden vermehrte Sca-1 Level zusammen mit phosphoryliertem STAT 3 und vermehrter Bindung von Transkriptionsfaktoren an die *γ-interferon-activation-site* (GAS) des Sca-1 Promotors nachgewiesen werden [98]. Bislang unklar ist die transkriptionelle Regulation und Rolle von Typ-I-Interferonen auf die Sca-1 Expression im murinen Pankreas.

In-vitro-Studien haben auch eine Interaktion von Sca-1 mit der Tyrosinkinase Fyn in Myoblasten und T-Zellen als weiteren Signalweg [31, 71], sowie eine Interaktion mit C-kit nachgewiesen [56] (Review: [50]). Diese weiteren regulativen Faktoren sind jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit und sollen daher nicht weiter ausgeführt werden.

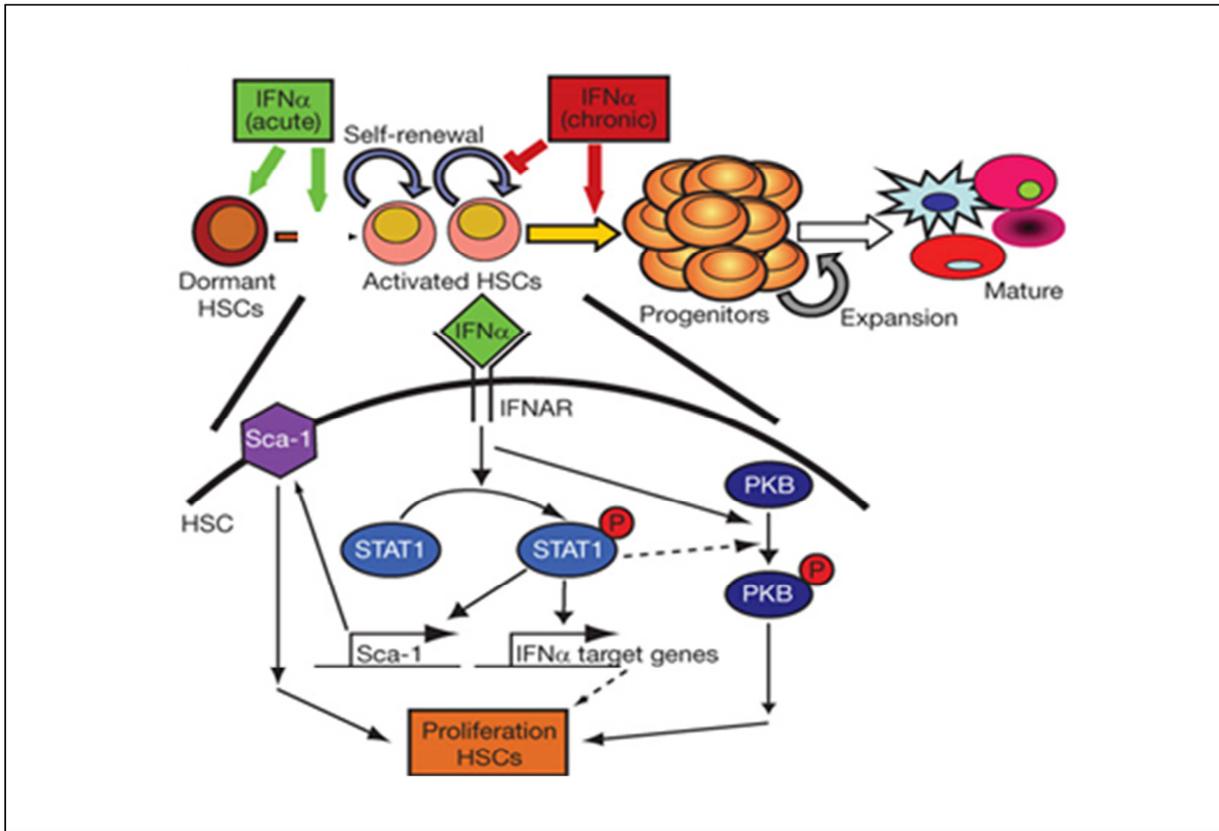


Abb.:2 Schematische Darstellung der Wirkung von Interferon- α auf die Proliferation von HSC in vivo [124] Sca-1 befindet sich unterhalb der IFNAR-STAT 1 Signalkaskade

II. Aufgabenstellung

Generell sind Studien zur Identifizierung von Markern, die Zellen mit Vorläuferzeleigenschaften definieren von großer Bedeutung zum besseren Verständnis regenerativer Prozessen nach Gewebeschäden in adulten Organen, deren zellulärer Originität, so wie zunehmend auch zur Gewinnung eines neuen Erkenntnisgrades zu den Initiationsprozessen von Neoplasien. Mithilfe dieses Grundlagenwissens erhofft man sich Fortschritte bezüglich der Möglichkeiten zur Zell-Ersatztherapie untergegangenen Gewebes, wie z.B. bei Diabetes Mellitus Typ I sowie zur gezielteren und selektiveren Therapie neoplastischer Erkrankungen. In-vitro-Charakterisierungen von Zellpopulationen mit hoher Plastizität könnten somit einen wichtigen Teilaspekt liefern für weiterführende Untersuchungen zur Validierung des regenerativen Potentials der identifizierten Zellen im lebenden Organismus.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung von Vorläuferzellmarkern im murinen Epithelzell-Isolat des Pankreas. Die durchgeführten Untersuchungen orientierten sich dabei vor allem an dem eingehend im hämatopoetischen System und zunehmend auch in soliden Organen beschriebenen Marker Stem-cell-Antigen 1 (Sca-1). Eine Expression von Sca-1 im Pankreas wurde zwar beschrieben, aber bislang ist wenig bekannt über dessen Regulation insbesondere durch den regulativen Faktor Interferon sowie des regenerativen Potentials von Sca-1⁺ Zellen.

Dazu wurden folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

- Die angewandte Methode zur Generierung von Epithelzellen sollte zunächst hinsichtlich der qualitativen Reinheit und des Nutzens untersucht werden, funktionell intakte Zellen als Experimentalgrundlage zu generieren.
- Durch Interferon-Stimulations-Vorversuche sollte die Sensitivität pankreatischer Epithelzellen auf Interferon- β überprüft und ein wirksamer Dosisbereich für die nachfolgenden Experimente festgelegt werden.

Aufgabenstellung

- Anschließend sollte die Expression von etablierten Vorläuferzellmarkern sowie Sca-1 in der epithelialen Suspensionskultur charakterisiert und die regulatorische Funktion von Interferon- β auf das Expressionsniveau geklärt werden.
- In einem weiteren Schritt sollte auch die parakrine Wirkung im Mikromilieu der Zellen auf das Sca-1 Expressionsniveau in den primären Epithelzellen untersucht werden.
- Auf den Ergebnissen dieser Versuche aufbauend sollten nun Sca-1⁺ Zellen isoliert und hinsichtlich progenitortypischer-Fähigkeiten wie Klonalität und Differenzierungspotential weitergehend charakterisiert werden.
- Darüber hinaus sollte versucht werden, Zellen mit Sca-1 Oberflächenexpression im adulten normalen Pankreas zu lokalisieren.

III. Material und Methoden

III.1 Verwendete Materialien

III.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätebezeichnung	Hersteller
Zellkultur	
Heracell® 150 CO ₂ -Inkubator	Thermo Electron, Waltham MA (USA)
Heraeus® Herasafe Flow hood	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Heraeus® Multifuge 3SR	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Zellkultur Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Oberkochen
RNA	
UV-Reiniger Box	Biosan, Riga (Lettland)
UV/VIS -Spektralphotometer NanoDrop® 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Joua Cr3i Zentrifuge	Thermo Electron, Waltham MA (USA)
Thermo Cycler	Eppendorf, Hamburg
LightCycler® 480	Roche Applied Science, Penzberg
Elektrophorese System/Netz-Gerät	Biometra, Göttingen
UV Transilluminator Geno Smart	VWR, Darmstadt
Amylase/Lipase Messung	
Cobas® 8000 Modular Analyzer	Roche Diagnostics, Unterhaching
FACS	
FACS Aria™	BD, Franklin Lakes NJ (USA)
Histologie	
Gewebeinfiltrationsautomat ASP 200S	Leica Microsystems, Wetzlar
Paraffinausgießstation EG1160	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotom RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar
Kälteplatte COP 30	Medite, Burgdorf
Paraffin-Streckbad 1052	GFL, Burgwedel
Schüttler	IKA, Staufen
Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg
Magnetrührer	IKA, Staufen
Trockenschrank	Advantage-Lab, Darmstadt
Mikroskop DM E	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskopie-Kamera AxioCam ICC3	Carl Zeiss, Oberkochen
Allgemein	
Zentrifuge 5418 R	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer® Comfort	Eppendorf, Hamburg
PH-Meter	WTW, Weilheim
Analysewaage	Sartorius, Göttingen

Material und Methoden

Mikrowelle	Sharp, Osaka (Japan)
Wasser Bad	Julabo, Seelbach
Flockeneisbereiter AF 100	Scotsmans, Vernon IL (USA)
Wasseraufbereiter Millipore Mili-Q	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
Kühlschrank 4°C	KBS, Mainz
Tiefkühlschrank Comfort - 20°C	Liebherr, Bulle (Switzerland)
Tiefkühlschrank HeraFreeze® - 80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Autoklav V-75	Systec, Wettenberg
Kamera Canon Power Shot A60	Canon, Tokyo (Japan)
Scanner	Canon, Tokyo (Japan)
Computer Ausstattung	Fujitsu SIEMENS, München

Produkt	Hersteller
Zellkultur	
Zellkultur Schalen (60 × 15mm, 100 × 20mm)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Standard Zellkultur Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Standard Zellkultur Platten (6-,12-, 24 Well)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Costar® Ultra Low Attachment Platten (6-,12-,24 Well)	Corning, Corning NY (USA)
Costar® Ultra Low Attachment Flaschen (25 cm ²)	Corning, Corning NY (USA)
Falcon™ Multiwell-Zellkulturplatten (6 Well)	BD, Franklin Lakes NJ (USA)
Falcon™ Zellkultur-Membraneinsätze (6 Well-Platte 1,0 µm Porengröße)	BD, Franklin Lakes NJ (USA)
Zellschaber	SARSTEDT, Nümbrecht
Zellsieb (Porengröße:100 µm)	BD, Franklin Lakes NJ (USA)
Spritzenfilter (ø 25 mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Skalpell	Feather, Osaka (Japan)
Micro-Fine Insulinspritze (0,33 mm, 29G × 12,7 mm, 1 ml, U100 / 0,30 mm 30G × 8 mm, 0,3 ml, U100)	BD, Franklin Lakes NJ (USA)
Millizell-EZ-Kompartimentierte Mikroskop-Objektträger (Glas, 8 Well)	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
SecureSlip™ Deckgläser (L × W 12 mm × 12 mm)	Sigma Aldrich, St. Louis MO (USA)
Histologie	
Rotilabo®-Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe
Histosec® Paraffinpastillen ohne DMSO	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
Leica® Einweg-Mikrotom Klingen 819	Leica Microsystems, Wetzlar
Super Frost Ultra Plus® Objektträger	Menzel, Braunschweig
Fettstift Dako Pen	Dako, Glostrup (Dänemark)
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
RNA	
Reagiergefäße (1,5 ml DNA, DNase, RNase frei)	Biozym Scientific, Odelndorf

LightCycler® 480 96-PCR-Platten	Roche Applied Science, Penzberg
LightCycler® 480 96-PCR-Platten-Klebefolie	Roche Applied Science, Penzberg
Allgemein	
Einmalspritzen (2 ml, 5 ml,10 ml, 20 ml)	B. Braun, Melsungen
Kanülen (verschiedene Größen)	B. Braun, Melsungen
Falcon™ Reagiergefäße (15 ml, 50 ml)	BD, Franklin Lakes NJ (USA)
Reagiergefäße (1,5 ml)	SARSTED, Nümbrecht
Manuelle Pipetten	Peqlab, Erlangen
elektronische Pipettierhilfe PIPETBOY	Integra, Fernwald
Pipettenspitzen	Peqlab, Erlangen
Serologische Pipetten	Greiner Bio One, Frickenhausen

Tbl.1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

III.1.2 Medien, Reagenzien, Kits

Produkt	Hersteller
Zellkultur	
a. Zell-Medien und Supplemente	
DMEM/HAM`S F-12 mit L-Glutamine	PAA, Pasching (Österreich)
Mc Coy`s 5A Medium	PAA, Pasching (Österreich)
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching (Österreich)
Kollagenase 8	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (= FKS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Boviner Hypophysenextrakt (= BPE)	Invitrogen, Carlsbad CA (USA)
Epidermaler Wachstumsfaktor(= EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (= FGF 2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim
B 27-Supplement	Invitrogen, Carlsbad CA (USA)
Insulin-Transferrin-Selenium (100 x)	Invitrogen, Carlsbad CA (USA)
Matrigel™ Basement Membran Matrix	BD, Franklin Lakes NJ (USA)
b. Behandlungslösungen	
Caerulein C9026	Sigma-Aldrich, Steinheim
Interferon-β HC 1050B	Hycult Biotech, Uden (Niederlande)
Interferon-β 12400-01	PBL Interferon Source, Psicataway NJ (USA)
c. Sonstige	
Trypsin EDTA (0,5%)	PAA, Pasching (Österreich)
Dimethylsulfoxid (= DMSO) Rotipuran® 99,8% S.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan-Blau (0,4%)	GIBCO, Grand Island NJ (USA)

Material und Methoden

Dulbecco`s PBS	PAA, Pasching (Österreich)
Poly-L-lysine 0,1%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNA	
Ethanol absolut (>99,9%)	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
Formaldehyd (37%)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Universal Probe Library	Roche Applied Science, Mannheim
Ladepuffer (6 x)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase AWAY® Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Acetat-EDTA Elektrophoesebuffer (TAE, 50 x)	Bio-Rad, Hercules CA (USA)
Tris-Borat-EDTA-Puffer Elektrophoesebuffer (TBE, 10x)	Carl Roth, Karlsruhe
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Formamid 95%	Carl Roth, Karlsruhe
Histologie	
Bovines Serum Albumin (= BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethansäure (99%)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (50%, 70%, 96%, 99,8%)	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Citronensäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30%)	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin Y	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mayers Hämalaulösung	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
Chlorwasserstoffsäure (= HCL 5mol/L)	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Methanol	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Natriumchlorid	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe
3,3'-Diaminobenzidine (DAB) + Chromogen Substrat	Dako, Carpinteria CA (USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Vectamount™ Einbettungsmedium	Vector Laboratories, Burlingame CA (USA)
Polysorbat 20 (= Tween 20)	Carl Roth, Karlsruhe

Dako EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	Dako, Carpinteria CA (USA)
ProLong® Gold antifade reagent with DAPI Einbettungsmedium	Invitrogen, Carlsbad CA (USA)
Ziegen Serum Blocking Reagenz (10%)	Invitrogen, Carlsbad CA (USA)
Allgemein	
NaCl (0,9%)	B. Braun, Melsungen
ddH ₂ O	B. Braun, Melsungen
Reinstwasser(Typl) aus Milli- Q Wasseraufbereiter	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
RNAse DNase-freies Wasser	Invitrogen, Carlsbad CA (USA)
Isofluran	Abott, Abott Park IL (USA)
Paraformaldehyd (8%)	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Flüssigstickstoff (N ₂)	Tec-Lab, Königstein
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe

Kit	Hersteller
Quantitect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
NeuroCult™ Chemical Dissociation Kit	STEMCELL Technologies, Grenoble (Frankreich)
LightCycler® 480 Probes Master	Roche Applied Science, Mannheim
Dream Taq™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)

Tbl.2: Medien, Reagenzien, Kits

III.1.3 Antikörper, Primer

Primär Antikörper	Wirt	Reaktivität	Isotyp	Verdünnung	Katalog-Nr.	Hersteller:
IFF						
Anti-Sca1 /Ly6A/E mAK	Ratte	Ms	IgG	1 : 25	ab 25195	Abcam, Cambridge (England)
Anti-Aldh1a1 pAK	Hase	Hu,Ms,Rt	IgG	1 : 50	ab23375	Abcam, Cambridge (England)
Anti-C-kit pAK	Hase	Hu,Ms	IgG	1 : 50	ab5506	Abcam, Cambridge (England)
Anti-C-kit[D13A2] pAK	Hase	Hu,Ms	IgG	1 : 50	3074s	Cell Signaling Technology, Cambridge (England)

Material und Methoden

Anti-Pdx1 pAK	Ziege	Hu,Ms	IgG	1 : 25	ab47383	Abcam, Cambridge (England)
Anti-Nestin pAK	Hase	Hu,Ms	IgG	1 : 100	AB5922	Merck Millipore, Billerica MA (USA)
Anti-Amylase [H-281] pAK	Hase	Ms,Rt	IgG	1 : 100	sc-25562	Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX (USA)
Anti-Insulin [H-86] pAK	Hase	Hu,Ms,Rt	IgG	1 : 100	sc-9168	Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX (USA)
Anti-E-Cadherin[DECMA-1] mAK	Ratte	Hu,Ms,Dg	IgG	1 : 100	ab11512	Abcam, Cambridge (England)
Anti-Ck 19 pAK	Hase	Hu,Ms	IgG	1 : 50	ab53119	Abcam, Cambridge (England)
FACS						
Anti-Sca-1-PE-Cy7 pAK	Ratte	Ms	IgG	1:500	25-5981-82	eBioscience, San Diego CA (USA)
Anti-Sca-1-Biotin pAK	Ratte	Ms	IgG		13-5931-85	eBioscience, San Diego CA (USA)
Anti-Sca-1-FITC pAK	Ratte	Ms	IgG		11-5981-82	eBioscience, San Diego CA (USA)
IHC						
Anti-Sca-1 /Ly6A/E mAK	Ratte	Ms	IgG		ab51317	Abcam, Cambridge (England)
Anti-CK 19	Ratte	Ms	IgG			DSHB- University of Iowa, Iowa city IA (USA)

Sekundär Antikörper	Wirt	Konjugat	Isotyp	Verdünnung	Katalog-Nr.	Hersteller
IFF						
Anti-Ratte (H+L)	Ziege	Alexa Fluor® 488 nm	IgG	1 : 200	4416s	Cell Signaling Technology, Cambridge (England)
Anti-Ratte (H+L)	Ziege	Alexa Fluor® 555 nm	IgG	1 : 200	A-21434	MolecularProbes, Eugene OR (USA)
Anti-Hase (H+L)	Esel	Alexa Fluor® 488 nm	IgG	1 : 200	A-21206	MolecularProbes, Eugene OR (USA)

Anti-Hase(F(ab') ₂ Fragment)	Ziege	Alexa Fluor® 555 nm	IgG	1 : 200	4413S	Cell Signaling Technology, Cambridge (England)
Anti-Ziege (H+L)	Esel	Alexa Fluor® 633 nm	IgG	1 : 100	A-21082	MolecularProbes, Eugene OR (USA)

Primer [qRT-PCR]			
Gen	Sequenz	NM- Nr.	Up Nr.
<i>Il-6</i>	5'→3': GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A	NM_031168	# 6
	3'→5': CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA		
<i>Tnf-α</i>	5'→3': TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC	NM_013693.2	# 49
	3'→5': GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT		
<i>Cxcl-10</i>	5'→3': AAT GAA AGC GTT TAG CCA AAA A	NM_021274	# 56
	3'→5': AGG GGA GTG ATG GAG AGA GG		
<i>Il-1b</i>	5'→3': TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC	NM_008361	# 78
	3'→5': TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG		
<i>Aldh1a1</i>	5'→3': CGG ATT TAG GAG GCT GCA TA	NM_013467.3	# 26
	3'→5': TTG TAT AAG TGA AAA TGT CTC CAT CA		
<i>C-met</i>	5'→3': CCA CCC GAC CAA ATC TTT TA	NM_008591.1	# 31
	3'→5': GCT AAC CGA GTT CAG GGT CTT		
<i>Nes</i>	5'→3': TGC AGG CCA CTG AAA AGT T	NM_016701.3	# 2
	3'→5': TTC CAG GAT CTG AGC GAT CT		
<i>Ptf1a</i>	5'→3': CAC CGA CCA GTC CTC TCG	NM_018809.1	# 3
	3'→5': GAA CTC TAC TTC TGC TTG CTC GT		
<i>Pdx1</i>	5'→3': GAA ATC CAC CAA AGC TCA CG	NM_008814.2	# 51
	3'→5': CGG GTT CCG CTG TGT AAG		
<i>Ptprj (Scc-1)</i>	5'→3': TGG TTG GAA TCT GTT CTG TAC G	NM_008982.4	# 12
	3'→5': GGC TCC TTA GGG ACC ACT TC		
	3'→5': TAA TTT CGG GTC AAT GCA CA		

Material und Methoden

<i>Hey 2</i>	5'→3': GTG GGG AGC GAG AAC AAT TA	NM_013904.1	# 104
	3'→5':GTT GTC GGT GAA TTG GAC CT		
<i>Sca-1</i>	5'→3': CCC CTA CCC TGA TGG AGT CT	NM_010738.2	# 16
	3'→5': TGT TCT TTA CTT TCC TTG TTT GAG AA		
<i>C-kit</i>	5'→3': GGA GCC CAC AAT AGA TTG GTA T	NM_001122733.1	# 68
	3'→5': CAC TGG TGA GAC AGG AGT GG		
<i>Ppib</i>	5'→3': TCC ACC TTC CGT ACC ACA TC	NM_011149	# 20
	3'→5': GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT		
<i>Rpl13a</i>	5'→3': CCC TCC ACC CTA TGA CAA	NM_009438	# 108
	3'→5': GTA GGC TTC AGC CGA CA		

Primer [RT-PCR]			
Gen	Sequenz	Länge Amplikon [bp]	Tm [°C]
<i>Amy1</i>	5'→3': TTC TGC TGC TTT CCC TCA TT	300	58
	3'→5': CAT TGT TGC ACC TTG TCA CC		56
<i>Ca2</i>	5'→3': GGA AGC GTG CGG CCT TTG CT	540	63
	3'→5': GCA AGA GGC CAT GTC TGC TC		65
<i>Cfrr</i>	5'→3': CAG TCA TCT CTG CCT TGT GG	370	63
	3'→5': ACG CTG ACC TCC ACT CAG TG		60
<i>Ins1</i>	5'→3': TCC TGC CCC TGC TGG CCC TGC	312	52
	3'→5': CAG TTG CAG TAG TTC TCC A		71
<i>Vim</i>	5'→3': CGT CCT CCT ACC GCA GGA T	233	63
	3'→5': GTC CAC CGA GTC TTG AAG CAG		62
<i>Ptprc</i>	5'→3': CTA TG GCC CTA AAA CCT TTT ACA T		61
	3'→5': GTT GTT CAT CTA AAT TGC TGG ATC T		
<i>Acta 2</i>	5'→3': ACT GGG ACG ACA TGG AAA AG		58
	3'→5': CAT CTC CAG AGT CCA GCA CA		60
<i>Pdgfra</i>	5'→3': TGG CAT GAT GGT CGA TTC TA		56
	3'→5': CTC GCT GAG GTG GTA GAA GG		63
<i>Actb</i>	5'→3': AAA CTG GAA CGG TGA AGG C	430	59
	3'→5': GCT GCC TCA ACA CCT CAA C		57
<i>Gapdh</i>	5'→3': CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC	201	63
	3'→5': CAC ATT GGG GGT AGG AAC CAC		60

Tbl.3: Antikörper, Primer

III.1.4 Programme

Programm	Hersteller
Betriebssoftware NanoDrop® 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
FACSDiva Version 6.1.2	BD, Franklin Lakes NJ (USA)
LightCycler™ 480 Software Version 1.5.0.39	Roche Applied Science, Mannheim
Graph Pad Prism 5	Graph Pad Software, La Jolla CA (USA)
Excel	Microsoft, Redmond WA (USA)
Word	Microsoft, Redmond WA (USA)
Power Point	Microsoft, Redmond WA (USA)
Adobe Photoshop CS 3	AdobeSystems, San Jose CA (USA)
Axio Vision Version 4.8	Carl Zeiss, Oberkochen
End Note X 5	Thomson Reuters, New York NY (USA)
Oligo Analyzer 3.1 (online)	Integrated DNA Technologies, Coralville IA (USA)
Assay Design Center (online)	Roche Applied Science, Penzberg
Pubmed Gene (online)	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda MD (USA)

Tbl.4: Programme

III.1.5. Mausmodell

Für die Versuchsreihe wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 (Charles River), K/O Mäuse mit einer Deletion im Typ 1 Interferon-Rezeptor (α und β) auf dem Hintergrund A 129 SV/EV (B&K Universal) und STAT 1^{-/-} Durbin des Stammes C57 /Bl6 verwendet. Der Tierversuchsantrag wurde durch die Regierung von Oberbayern unter der Nr. 55.2-1-54-2532-147-09 genehmigt. Die Haltung der Versuchstiere fand konform mit den staatlichen Normen für Veterinärwesen in den dafür vorgesehenen tierexperimentellen Institutionen des Klinikums rechts der Isar statt. Alle Tiere waren weiblich und bei Versuchsbeginn 10 - 13 Wochen alt.

Genotyp	Stamm	Geschlecht	Alter bei Ankunft	Zucht
WT	C57BL/6	♀	10 - 12 Wo	Charles River, Wilmington MA (USA)
STAT1 ^{-/-}	C57BL/6	♀	10 - 12 Wo	Charles River, Wilmington MA (USA)
IFNAR ^{-/-}	A129 Sv/Ev	♀	10 - 12 Wo	B&K Universal, Grimston, Aldbrough, Hull, (England)

Tbl.5: Verwendete Mausstämme

III.2 Zellkultur

III.2.1 Präparation und Kultivierung primärer Epithelzellen

IM1: McCoy's 5A Medium (PAA), 5% FKS (PAA), Kollagenase 8 1,2mg/ml (Sigma-Aldrich)
IM2: McCoy's 5A Medium (PAA), 5% FKS (PAA)
IM3: DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), 10% FKS (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA)
Isofloran (Abott) / PBS (PAA) / Skalpell (Feather) / Insulinspritzen 29G (BD) / Zellsieb 100µm (BD) /
Kleine-; Große Kulturschalen 60×15mm; 100×20mm (Greiner Bio One)

Amsterdam und Jamieson et al., beschrieben 1974 erstmalig ein Verfahren, Epithelzellen aus dem Gewebeverband zu isolieren. Diese Methode basierte auf der Verknüpfung eines enzymatischen Verdauens mit mechanischer Separation und ermöglichte im Folgenden die Durchführung funktioneller Untersuchungen an einer individualisierten Zellpopulation. Die Isolation azinärer Zellen in dieser Arbeit erfolgte in Anlehnung an das von William J.A., (1978) modifizierte Protokoll.

Als vorbereitender Schritt wurden die Medien hergestellt, die zur weiteren Prozessierung des entnommenen Gewebes notwendig sind. Unter einer Isoflurannarkose wurde das Tier durch Subluxation der Halswirbelsäule getötet und Fell und Haut des Tieres durch Eintauchen in 70% Ethanol desinfiziert. Der Zugang in das Abdomen erfolgte durch eine Längslaparotomie. Zur Eröffnung des Peritoneums wurde steriles Dissektionswerkzeug verwendet. Nach Darstellung der Pankreasloge wurde das Mesenterium reseziert und das Pankreas in kaudokranialer Richtung erst entlang des Magens dann entlang des Duodenums und Jejunums abgesetzt. Die Milz wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit am Resektat belassen und erst außerhalb des Situs entfernt. Das Pankreas wurde zügig einer Petrischale mit kaltem PBS zugeführt und unter Zuhilfenahme einer Schere peripankreatisches Fettgewebe und sichtbare Lymphknoten sorgfältig entfernt.

Nach zwei weiteren Waschstufen in PBS wurde das gesäuberte Organ in eine kleine Kulturschale mit 5 ml Digestions-Medium (IM1) übertragen. Zur Optimierung der Digestion durch Oberflächenvergrößerung wurde IM1 mittels Insulinspritzen gleichmäßig repetierend in das Pankreasgewebe injiziert bis das Parenchym global aufgetrieben erschien. Als weitere Maßnahme wurde das Pankreas mit dem Skalpell in etwa 4 mm große Stücke zerkleinert. Es folgte eine Inkubationsphase bei 37°C für 10 min. Nach Stoppen der Digestion durch 10 ml Waschmedium (IM2), Zentrifugation bei 300 rpm für 5 min und Verwerfung des Sedimentationsüberstandes schloss sich eine weitere Inkubation für 10 min in 5 ml IM1 an. Nach dem zweiten Digestionsschritt imponierte das Medium durch einen erhöhten Anteil aus

dem Gewebeverband gelöster Zellen bereits deutlich trüber und nicht dissoziierte Gewebestücke konnten mechanisch durch vorsichtiges auf- und abpipettieren weiter homogenisiert werden.

Anschließend wurde das Zellmaterial durch ein Zellsieb mit Nylonnetz gefiltert und mit 10 ml IM2 gespült. Nach Zentrifugation und Verwerfung des Sedimentationsüberstandes folgte ein weiterer Waschschrift in 20 ml IM 2. Im letzten Schritt wurde das aufgereinigte Isolat in Kultur Medium (IM3) bei 37°C und 5% CO₂ für 20h präinkubiert. Durch diese Methode lassen sich 85 – 90% funktionsfähige Epithelzellen isolieren. Die Vitalität der so gewonnenen Zellen wurde durch das Permeationsverhalten über die Zellmembranen nach Trypitan Blau Gabe überprüft.

III.2.2 Präparation und Kultivierung pankreatischer Stromazellen

DMEM/HAM`S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA)
Große Kulturschalen 100×20mm (Greiner Bio One) / Kulturflaschen 75 cm² (Greiner Bio One)

Die Isolationsmethode pankreatischer Stromazellen beruht auf einer Modifikation des in dieser Arbeit verwendeten Protokolls zur Extraktion muriner Epithelzellen. Stromazellen weisen im Gegensatz zu den flottierenden Zell-Konglomeraten azinärer Herkunft ein ausgeprägtes Adhäsionsverhalten an die Polystyrol-Böden unbeschichteter Kulturschalen auf und lassen sich so von der Gesamtpopulation separieren. Ein hoher Dichtegrad flottierender Zellen bewirkt dabei auch eine Steigerung des Anteils adhärerender Zellen, so dass auf diese Beobachtung gestützt die Organzahl auf vier Organe / Isolationsansatz erhöht wurde. Es erfolgte eine Epithelzell-Isolation nach oben beschriebener Methodik unter quantitativer Anpassung der verwendeten Reagenzien. Nach einer Präinkubationszeit von 3 Tagen wurden alle nicht-adhärenen Zellen durch einen Medium-Wechsel entfernt und die Kultivierung bis zur Einstellung einer 70% Konfluenz fortgeführt.

III.2.2.1 Passagieren

Trypsin-EDTA 0,5% (PAA) / Zellschaber (SARSTEDT)

Die Zellen wurden bis zur Passage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Trypsinisierung erfolgte für 5 min bei 37°C, nicht vollständig dissoziierte Zellen wurden ergänzend mithilfe eines Zellschabers in Suspension überführt. Nach Inaktivierung durch Medium und einem Waschschrift mit PBS wurde die Kultivierung der Zellen in unbeschichteten Kulturflaschen (75cm²) und unter Austausch des Mediums in 2-Tages

Intervallen fortgesetzt. Bei Einstellung einer 90% Konfluenz wurde die Kultivierung beendet und die Stromazellen zur Generierung einer Vorratsbank kryokonserviert. Im Mittel bedurfte es einen Zeitraum von $t_{\text{Kultur}} = 17,78$ Tage bis ein solcher Grad an Konfluenz erreicht wurde.

III.2.2.2 Kryokonservierung

Dimethylsulfoxid (DMSO) 99,8% (Carl Roth) / FKS 100% (PAA)

Murine Stromazellen tolerieren eine Lagerung bei -80°C . Dafür wurden die Zellen zur Überführung in Suspension für 5 min bei 37°C trypsinisiert und die sedimentierten Zellen nach einem Waschschrift mit PBS und Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min in FKS / 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Nach Überführung in spezielle Kryogefäße wurden die Zellen in einem Behälter mit Isopropanol bei einer Temperaturadaptionrate von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -80°C abgekühlt und gelagert.

III.2.2.3 Auftauen der Zellen

DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA) / PBS (PAA)

Aufgrund der Zelltoxizität von DMSO ist es nötig, den Auftauvorgang zügig durchzuführen, um die Vitalität der Zellen möglichst wenig zu beeinträchtigen. Dazu wurden die Kryogefäße rasch in ein auf 37°C vorgeheiztes Wasserbad getaucht bis das Stadium erreicht wurde, in dem lediglich die im Zentrum befindlichen Teile gefroren waren. Anschließend wurden die Gefäße unter sterilen Bedingungen geöffnet, die Zellsuspension mit Zellkultur-Medium verdünnt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des DMSO-haltigen Überstandes wurde ein weiterer Waschschrift mit PBS durchgeführt und die sedimentierten Zellen nach Zentrifugation zur Bestimmung der Zellzahl in 1 ml Medium resuspendiert.

III.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Trypan – Blau 0,4% (Gibco)

Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden $10\ \mu\text{l}$ aus einem Gesamtvolumen von 1 ml Zellsuspension entnommen und 1:1 mit 0,5%iger Trypan-Blau-Lösung vermischt. Die so behandelten Zellen wurden auf das Zählnetz der Neubauer Kammer pipettiert und der Anteil vitaler Zellen imponierend durch fehlende Trypan-Blau-Aufnahme durch Auszählung von 16 Quadraten in allen 4 Quadranten und

Erhebung des Mittelwertes bestimmt. Anschließend wurde dieser mit dem Verdünnungsfaktor (VF = 2) und der Größe 10^4 multipliziert um auf die Zellzahl [n] in 1 ml rückzuschließen.

$$[n] / \text{ml} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Quadranten}} \times \text{VF} \times 10^4$$

Abb.1: Berechnung der Zellzahl

III.2.3 Co-Kultivierung primärer Stromazellen mit Epithelzell-Isolat

DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA) / 6 Well-Platten (BD)

Um die Wechselwirkung innerhalb des Mikromilieus mesenchymaler und entodermaler Zellen zu untersuchen, wurden pankreatische Zellen epithelialer Herkunft zusammen mit Stromazellen in räumliche Beziehung gesetzt. Dazu wurden 24h vor Etablierung der Co-Kultur Stromazellen aufgetaut, quantifiziert und anschließend in 6 Well-Platten in einer Dichte von $125 \times 10^4/\text{ml}$ in 1 ml Medium ausgesät und kultiviert. Die Größe der Zellzahl richtete sich hierbei nach der in Vorversuchen evaluierten Zellmenge, die in 1 ml Volumen und verteilt auf $9,6 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche innerhalb 24 Stunden eine Konfluenz von 70% ausbildeten. Am selben Tag wurde eine Epithelzell-Isolation durchgeführt und für 20h im Brutschrank präinkubiert (s. III.2.1).

III.2.4 Präparationstechniken und Kultivierung von Sca-1⁺ Zellsphären

III.2.4.1 Grundlagen

Wesentliche Eigenschaften, die eine adulte Stammzelle von einer ausdifferenzierten Zelle unterscheiden werden durch ihre Fähigkeiten zur Selbsterneuerung und Differenzierung beschrieben. Das Charakteristikum der Selbstreproduktion kann durch in-vitro Untersuchungstechniken überprüft werden mit der Zielsetzung die Fähigkeit einzelner Zellen zu evaluieren, sich durch klonale Teilung in kugelförmigen dreidimensionalen Aggregaten sog. Sphären (engl.: Spheres) anzuordnen. Die Methode selbst entstammt der Forschung mit neuralen Stammzellen, erstmals beschrieben von Reynolds and Weiss et al. (1992), und erlebte seitdem eine stetige Erweiterung des Anwendungsspektrums auch auf extraneurale Organsysteme. Eine sensible konzentrationsabhängige Kombination aus spezifischen Wachstumsfaktoren begünstigt dabei die Ausbildung primärer Sphären. Nach 2-3 Tagen formieren sich morphologisch kleine Zellaggregate (engl.: Cluster), die in den folgenden

Tagen weiter wachsen und eine sphärische Konfiguration ausbilden. Nach 7 Tagen in diesem Milieu können diese 100 – 200 µm messen und aus 15,000 - 20,000 Zellen bestehen [83]. Anlehnend an die morphologischen Charakteristika der Neurosphären gibt die Literatur Durchmesser von 104 ± 8.6 µm für die Sphären aus Zellen pankreatischer Herkunft an [113]. In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die Fähigkeit zur Ausbildung Sca-1⁺ Zellsphären zu überprüfen. Zur Methodik der Isolation von Sca-1⁺ Zellen aus dem Epithelzell-Isolat (s. **III.4.2.2**).

III.2.4.2 Kultur und Passage

DMEM:Hams F12 (PAA), B27-Supplement (50x) 2% (Invitrogen), EGF 20 ng/ml (Sigma-Aldrich), FGF 2 10 ng /ml (Sigma-Aldrich) , Heparin 2 µg/ml (Sigma-Aldrich), Insulin- Transferrin–Selenium (100x) 1% (Invitrogen) , Penicillin-Streptomycin 1% (PAA) / Ultra Low Attachment Flaschen 25 cm² (Corning) / Chemical Dissociation Kit (STEMCELL Technologies)

Zur Schaffung von Kulturbedingungen, die eine Inhibition des Adhäsionsbestrebens von Suspensionszellen fördern, wurden speziell beschichtete Kulturflaschen (Ultra Low Attachment Flaschen) verwendet. So präparierte Oberflächen bestehen aus einer hydrophilen, ungeladenen Beschichtung, die biochemische sowie elektrostatische Wechselwirkung mit Suspensions-Zellen einschränkt bzw. verhindert. Nach der FACS Sortierung von Sca-1⁺ Zellen wurden diese lichtmikroskopisch quantifiziert und in serumfreies Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂. Die dadurch generierten Sphären wurden, anlehnend an die Kultur-Methodik mit Neurosphären, am 7. Tag mithilfe des Chemical Dissociation Kit durch chemische Lyse interzellulärer Verbindungen vereinzelt. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Anschließend erfolgten die Quantifizierung der Zellen und die erneute Aussaat in ansatzabhängiger Dichte. Ein Austausch des Mediums erfolgte im 2-Tage Intervall. Dieser Methode folgend konnten 3 Passagen bis zur Stagnation der Zellteilung erreicht werden.

III.2.4.3 Kultivierung von Sca-1+ Zellen/ Sphären in Matrigel

DMEM:Hams F12 (PAA), B27-Supplement (50x) 2% (Invitrogen), EGF 20 ng/ml (Sigma-Aldrich), FGF 2 10 ng /ml (Sigma-Aldrich) , Heparin 2 µg/ml (Sigma-Aldrich), Insulin- Transferrin–Selenium (100x) 1% (Invitrogen), Penicillin-Streptomycin 1% (PAA) / Matrigel Basement Membran Matrix 4% (BD) / Matrigel Basement Membran Matrix Matrix (BD) / Millizell-EZ-Slides (Merck-Millipore)

Neben zweidimensionalen Kulturmethode wird vorwiegend zur Untersuchung von Determinierungsmechanismen und der räumlichen Anordnung von Zellen, eine dreidimensionale Kulturumgebung gewählt, von der angenommen wird, dass sie strukturell

und biochemisch das zelluläre Mikromilieu in-vivo am ehesten zu simulieren vermag. In dieser Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenz das Verhalten von Sca-1⁺ Zellen / Sphären auf mit Matrigel beschichteten Objektträgern untersucht. Bei Matrigel handelt es sich um das Sekret einer murinen Sarkomlinie (Engelbreth-Hol-Swarm), das aus verschiedenen Komponenten extrazellulärer Matrix wie Kollagen IV, Laminin und Proteoglykanen besteht und bei 37°C gelartig verfestigt [52].

Zur Beschichtung wurde in den Vertiefungen der verwendeten Millizell-EZ-Objektträger unter sterilen Bedingungen je 40 µl flüssiges Matrigel zu einer wenigen mm dicken Schicht ausgetragen und zur Polymerisation für 30 min bei 37°C im Brutschrank belassen. So beschichtete Platten wurden bei 4°C gelagert und am selben Tag verwendet. Sca-1⁺ Zellen / Sphären wurden in serumfreiem Medium, angereichert mit 4% Matrigel den Kammern der beschichteten Glasträger zugeführt und das Medium im Tagesintervall gewechselt. Im Vorfeld der Färbung für die Immunfluoreszenzanalyse wurde das Gel 2 x mit PBS gewaschen.

III.3 In-vitro Behandlung mit pharmakologisch wirksamen Substanzen

III.3.1 Präexperimentelles Verfahren

DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA) Große Kulturschalen 100x20mm (Greiner Bio One) / Standard Zellkultur Platten 6-,12-,24 Well (Greiner Bio One)

Isolierte Epithelzellen wurden vor Durchführung aller Behandlungen unabhängig der verwendeten Substanzen und Messmethoden für 20h bei 37°C und 5% CO₂ in unbeschichteten Kulturplatten im Inkubator belassen. Anschließend wurde das Zell-Isolat den jeweiligen Versuchsansätzen zugeführt und für weitere 4h im Brutschrank gelagert, so dass eine Latenzzeit von 24h vor Behandlungsbeginn eingehalten wurde. Alle Substanz-Behandlungen wurden in 6-/12-/24- Well-Platten durchgeführt. Eine absolute Bestimmung der Zellzahl war aufgrund des Aggregations-Verhalten azinärer Zellen in Suspensionskultur nicht eruiert. Eine relative Äquibrierung der Zellzahl jeder Kammer wurde durchgeführt und den einzelnen Versuchsansätzen stets dieselbe Anzahl an Zelldonoren zugeführt. Dazu wurde eine Ratio von Zell-Isolat eines Organs für je 6 Kammern mit je 2 ml Volumen eingehalten. Abweichungen von diesem Verhältnis sind in den einzelnen Versuchsbeschreibungen vermerkt. Eine Volumen-Äquibrierung der unbehandelten Kontroll-Kammern an das Stimulations-Volumen durch NaCl 0,9% wurde berücksichtigt.

Material und Methoden

Nach Zugabe des Stimulationsagens wurden die Platten bis zum Ablauf des Behandlungsintervalls bei 37°C inkubiert. Alle durchgeführten Versuche wurden mindestens 3mal wiederholt.

III.3.2 Stimulationsversuche primärer Epithelzellen mit Caerulein

Caerulein (3, 7⁻⁵ M/ L; Mw: 50 µg/ml) (Sigma Aldrich)

Es wurden unterschiedliche Caerulein-Stimulationsverfahren an Maus-Epithelzellen durchgeführt. In Abhängigkeit der verschiedenen Messmethoden wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, ausgehend von einer 3,7⁻⁵ molaren Vorrats-Lösung.

Zytokine/Chemokine

90,1 µl	3,698 ⁻⁶ M + 909,90 µl NaCl	→	10 ⁻⁷ M
100 µl	10 ⁻⁷ M + 900 µl NaCl	→	10 ⁻⁸ M

Amylase/Lipase

9,01 µl	3,698 ⁻⁶ M + 990,99 µl NaCl	→	10 ⁻⁸ M
100 µl	10 ⁻⁸ M + 900 µl NaCl	→	10 ⁻⁹ M
100 µl	10 ⁻⁹ M + 900 µl NaCl	→	10 ⁻¹⁰ M
100 µl	10 ⁻¹⁰ M + 900 µl NaCl	→	10 ⁻¹¹ M
100 µl	10 ⁻¹¹ M + 900 µl NaCl	→	10 ⁻¹² M

Tbl. 6: Ansatzabhängige Verdünnungsreihe für Caerulein*

*(Hier beschriebene Stoffmengen beziehen sich auf ein Verteilungsvolumen von 2 ml, zusammengesetzt aus 1,94 ml Medium und 0,06 ml Stimulations-Lösung)

III.3.2.1 Erhebung der exokrinen Funktion primärer Epithelzellen nach Caerulein Stimulation

DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA) / Cobas 8000 Modular Analyzer (Roche) - Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, (Klinikum rechts der Isar) / Caerulein 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹² M (Sigma-Aldrich / T1 (30 min))

Die Epithelzellen wurden wie in der oben beschriebenen Anordnung hinsichtlich Volumina und Zellmenge auf Kammer K₁₋₆ der 6-Well-Platte verteilt und weitere 4h bis zum Behandlungsbeginn (T₀) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ begast. Caerulein wurde bei RT aufgetaut und über die oben beschriebenen Stufen zur Amylase-/Lipase Bestimmung verdünnt. Neben den behandelten Zellpopulationen (P₁) wurde eine unbehandelte Kontrollpopulation (P₀) eingerichtet, die die Basalsekretion nach Ablauf des Stimulationszeitraumes wiedergibt. Mit diesen Basalwerten wurden die erhobenen Werte der behandelten Populationen korreliert. Zur Probenentnahme wurde die Zellsuspension vollständig abpipettiert und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Es wurden je 500 µl aus dem

Zellsedimentationsüberstand aspiriert und die abgenommenen Proben auf Eis gelagert. Das Zellpellet wurde verworfen. In Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie erfolgte die Konzentrationsbestimmung von Amylase und Lipase im Sedimentationsüberstand durch Verwendung des Cobas 8000 Modular Analyzer Systems. Dabei wurde über die photometrische Bestimmung der Farbintensität eines chromogenen Katalyse-Produktes des untersuchten Enzyms die Enzymaktivität bestimmt. Die Messung wurde durch eine technische Hilfskraft durchgeführt. Die Ausgabe erfolgte in u/L.

III.3.2.2 Caerulein-Stimulation zur quantitativen Expressionsanalyse

DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA) / Caerulein 10^{-7} M, 10^{-8} M (Sigma-Aldrich) / T1-2 (4h / 24h)

Frisch isolierte Epithelzellen wurden wie oben beschrieben prozessiert und vor Versuchsbeginn 4h im Brutschrank belassen. Caerulein wurde bei RT aufgetaut und über die oben beschriebenen Stufen zur Zytokinmessung verdünnt (**Tbl. 6**). (P_0) entsprach dabei dem RNA Gehalt der untersuchten Zellen im unbehandelten Zustand nach Ablauf der jeweiligen Stimulationszeiträume T_{1-2} . Alle behandelten Proben (P_1) wurden zu diesen Werten ins Verhältnis gesetzt. Zur Probenentnahme wurde die Zellsuspension für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert, der Zellsedimentationsüberstand abgenommen und zur weiteren Analyse bei -20°C tiefgefroren. Für die weitere Aufbereitung der Zellen zur quantitativen Expressionsbestimmung (s. **III.4.2.1.2**).

III.3.3 Stimulationsversuche primärer Epithelzellen mit murinem Interferon- β

Interferon- β 5×10^4 u (Hycult Biotech) /
Interferon- β 1×10^5 u (Pbl Interferon Source)

Die Behandlung des Epithelzell-Isolates mit murinem Interferon- β war ein wesentlicher Gegenstand in der Überprüfung der in dieser Arbeit untersuchten Hypothese und wurde in verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Verwendet wurde Interferon- β aus rekombinanter Herstellung der Zelllinie CHO (Chinese Hamster Ovary). Dazu wurden Verdünnungsstufen einer 10^4 u enthaltenen Vorratslösung (50 u/ μl) generiert.

200 µl 104 u	+ 91,26 µl NaCl	→	1000 u/ml Lösung A
120 µl Lösung A	+ 120 µl NaCl	→	500 u/ml Lösung B
60 µl Lösung B	+ 240 µl NaCl	→	100 u/ml Lösung C
60 µl Lösung C	+ 240 µl NaCl	→	100 u/ml Lösung D
60 µl Lösung D	+ 540 µl NaCl	→	10 u/ml Lösung E
60 µl Lösung E	+ 540 µl NaCl	→	1 u/ml Lösung F

Tbl. 7: * Ansatzabhängige Verdünnungsreihe für Interferon-β *

*(Hier beschriebene Stoffmengen beziehen sich auf ein Verteilungsvolumen von 2 ml, zusammengesetzt aus 1,94 ml Medium und 0,06 ml Stimulations-Lösung)

III.3.3.1 Interferon-Stimulation zur quantitativen Expressionsanalyse

DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA)
Interferon-β 1000 u/ml, 500 u/ml, 100 u/ml, 10 u/ml, 1 U/ml (Hycult Biotech) / T₁₋₄ (4h / 24h / 48h / 72h)

Die Versuchsansätze wurden nach oben beschriebenem Verfahren vorbereitet und vor Beginn der Behandlung für 4h im Brutschrank gelagert. Eine Interferon-β Vorratslösung wurde aufgetaut und nach dargestelltem Schema (Tbl. 7) eine Verdünnungsreihe erstellt. (P₀) repräsentierte das Expressionsniveau der untersuchten Gene unbehandelter Zellen zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns (T₀). (P₁) entsprach dem Expressionsniveau nach Interferon-Behandlung (T₁₋₄). Nach Ablauf der Behandlung wurden die Proben für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert, der Zellsedimentationsüberstand abgenommen und die pelletierten Zellen lysiert. Für die weitere Aufbereitung der Zellen zur quantitativen Expressionsbestimmung (s. III.4.2.1.2).

III.3.3.2 Interferon-Stimulation zur Zell-quantifizierenden Untersuchung durch FACS

DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA) / Costar® Ultra Low Attachment Platten 24 Well (Corning) (BD) / Interferon-β 100 u/ml, 50 u/ml (Hycult Biotech) / T₁ (48h)

Der Versuch wurde unter Beachtung der vierstündigen Latenzzeit in adhäsionskontrollierter Umgebung (Ultra Low Attachment Platten) angesetzt. In jedem Experiment erfolgte die Bildung von 3 identischen Gruppen, bestehend aus einer unbehandelten Nullprobe (P₀) und der Proben, die eine Interferon-Behandlung erhielten (P₁). Jede dieser Proben wurde durch 6 Kammern der Platte repräsentiert. Nach 4h Latenzzeit (T₀) fand die erste Behandlung durch Applikation von 100 u/ml statt und wurde nach 24h durch Zufügen weiterer 50 u/ml repitiert. 48h (T₁) nach Behandlungsbeginn wurde die Behandlung beendet und die Zelldilutionen der 6

Kammern innerhalb der Gruppen₁₋₃ zu je einer Behandlungs-, und Nullprobe zusammengeführt und für 5 min bei 500 rpm sedimentiert. Für die Durchführung der FACS-Markierung wurden die in (III.1.3) aufgelisteten Antikörper verwendet und nachfolgend dem fluoreszenzbasierten Sortierungsprozess zugeführt (s. III.4.2.2).

III.3.3.3 Interferon-Stimulation in Co-Kultur zur quantitativen Expressionsanalyse

DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamine (PAA), FKS 10% (PAA), Penicillin / Streptomycin 1% (PAA) / 6 Well-Platten (BD) / Falcon™ Zellkultur-Membraneinsätze 1.0 µm (BD) / Trypsin-EDTA 0,5% (PAA) / RLT Puffer, RNEASY Mini Kit (Quiagen) / Interferon-β 100 u/ml, 1 u/ml (Hycult Biotech) / T₁ (48h)

Stimulationsversuche mit Interferon-β wurden neben der Behandlung epithelialer Zellen alleine auch in einem Ansatz erweitert, bei dem das epitheliale Isolat über eine flüssigkeitspermeable Membran mit primären Stromazellen in Verbindung steht. Eine Übersicht des Versuchsansatzes ist in (Abb.2) dargestellt. Die Vorbereitung der partizipierenden Zellpopulationen erfolgte 24h vor Etablierung der Co-Kultur (s. III.2.1).

Am folgenden Tag wurden Adhäsionsgrad und Konfluenz der Stromazellen lichtmikroskopisch beurteilt und bei einem Dichtegrad von 70% der Versuch durchgeführt. Nicht-adhärente Zellen wurden durch einen Medium-Wechsel entfernt und die betreffenden Kammern mit Zellkultureinsätzen versehen. In die obere Kammer der Einsätze wurden die vorher sedimentierten Epithelzell-Proben in mengenmäßig äquivalenten Anteilen ausgesät. Vor Versuchsbeginn wurde der Ansatz für eine Karenzzeit von 4h im Brutschrank belassen.

Anschließend wurde eine Vorratslösung Interferon-β aufgetaut und über eine Verdünnungsreihe auf die verwendeten Verdünnungsstufen titriert. Das Stimulationsagens wurde seitlich der Zellkultureinsätze in die untere Kammer pipettiert, wobei ein gleichmäßiges Verteilungsmuster in beiden Kammern durch Diffusion über die zwischengeschaltete Membran angenommen wurde. Zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns (T₀) wurden die Zellen der Kammern, die jeweils eine der Zellpopulationen einzeln enthielten, zur RNA Extraktion lysiert. Diese stellten die unbehandelten Kontrollwerte (P₀) dar, mit denen die untersuchten Expressionswerte (P₁) nach Ablauf des Behandlungszeitraums (T₁) korreliert wurden. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂. 24h nach Beginn der ersten Behandlung erfolgte ein Medium Wechsel mit erneuter Interferon-Stimulation in äquivalenter Dosis zur ersten Behandlung.

48h nach Behandlung endete der Versuch zur Probenentnahme (P₁), dazu wurden zunächst die in Suspension befindlichen Zellen der oberen Kammer bei 500 rpm 5 min sedimentiert

Material und Methoden

und in RLT-Puffer lysiert und homogenisiert. Durch Zugabe von Ethanol 70% wurde das Lysat durch Präzipitation der RNA in eine stabilere Form überführt. Anschließend wurden die adhärenen Zellen in den unteren Kammern für 5 min bei 37°C trypsinisiert, die Reaktion mit Medium gestoppt und bei 500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von Lyse-Puffer und Ethanol 70% im Mischungsverhältnis 1:1 zur RNA-Isolation vorbereitet. Für die folgenden Schritte (s. **III.4.2.1.2**).

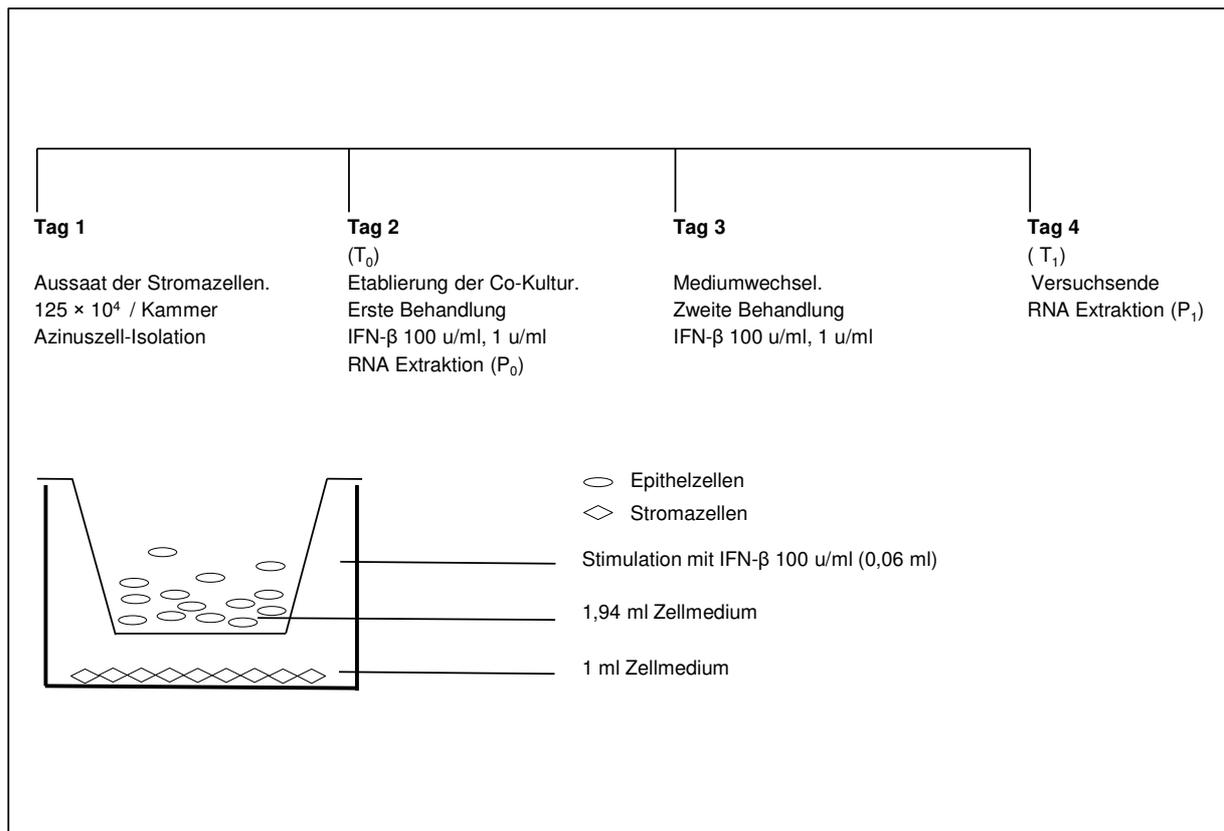


Abb.2: Schematische Darstellung des Versuchsansatzes in Co-Kultur

(T_0 = Behandlungsbeginn), (T_1 = Behandlungsende), (P_0 = Kontroll-Proben, entnommen bei Behandlungsbeginn), (P_1 = Test-Proben, entnommen bei Behandlungsende)

III.4.1 Histologische Analyseverfahren

III.4.1.1 Herstellung von Paraffinblöcken

Gewebeinfiltrationsautomat ASP 20S (Leica Microsystems) / Paraffinausgießstation EG 116 (Leica Microsystems) / Formaldehyd 3,5% (Carl Roth) / 70% Ethanol (Apotheke, Klinikum rechts der Isar) / Paraffin (Carl Roth)

Nach Entnahme des Pankreas aus dem Situs erfolgte nach einem Waschschrift in 2 x 10 ml PBS, die Konservierung der Gewebestruktur durch Fixation in Formaldehyd über Nacht (3,5%, RT) und die Einlage in 70% Ethanol für weitere 12h. In einem Gewebeinfiltrationsautomat erfolgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylen (**Tbl.9**). Die Einbettung des vorbehandelten Gewebes in Paraffinwachs erfolgte mit Hilfe der Paraffinausgießstation, dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. In den darauf folgenden 24h wurden die Schnitte bis zur Erreichung der endgültigen Aushärtung des Paraffin-Wachses histologisch nicht weiter prozessiert.

III.4.1.2 Mikrotomie

Kälteplatte COP 30 (Medite) / Mikrotom RM2255 (Leica Microsystems) / Paraffin-Streckbad 1052 (GFL) / Trockenschrank (Advantage-Lab) / ddH₂O (B.Braun)

Die in Paraffin eingebetteten Gewebestücke wurden an einem Mikrotom zu Schnitten mit einer Schichtdicke von 3,5 µm weiterverarbeitet. Alle Gewebelöcke wurden vor dem Schneiden zur Optimierung des Schneideprozesses auf einer vereisten Fläche gekühlt. Die angefertigten Gewebeschnitte wurden einem Wasserbad mit ddH₂O bei RT zugeführt und von dort auf einen Objektträger aufgezogen. Zum Glätten der Oberflächenstrukturen wurden die Präparate für 10 min in einem 55°C warmen Wasserbad positioniert und anschließend in einem Wärmeschrank bei 60°C für 2h getrocknet.

III.4.1.3 HE-Färbung

Ethanol 50%, 70%, 96%, 100% (Apotheke, Klinikum rechts der Isar) / Mayers Hämalaunlösung (Merck Millipore) / Roticlear (Carl Roth) / Eosin (Sigma-Aldrich) / ddH₂O (B.Braun) / Vectamount Mountin Medium (Vector Laboratories)

Die HE-Färbung ist ein häufig eingesetztes Färbeverfahren zur wenig spezifischen Darstellung zellulärer Strukturen, bestehend aus zwei verschiedenen Einzelfärbungen. Hämatoxylin zeigt einen hohen Grad an Basophilie und färbt so alle aziden Strukturen wie Nuclei und Ribosomen blau, während azidophile Bereiche wie Proteine von Eosin gefärbt rot erscheinen. Vorbereitend für diese Färbung wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte deparaffinisiert und über eine absteigende Ethanolreihe ein wässriges Milieu generiert. Nach einem Spülschritt mit ddH₂O wurden die Schnitte in Mayers Hämalaun eingelegt und über spülen mit Leitungswasser und konsekutiver ph-Wert- Anhebung der Farbton ins Bläuliche vertieft. Es folgte das Eintauchen der Objektträger in Eosin mit anschließendem Spülschritt in Leitungswasser zur Beendigung der Reaktion. Über eine aufsteigende Ethanolreihe wurde das Präparat dehydriert, in Roticlear gereinigt, mit Mounting Medium inkubiert und eingedeckelt.

Schritt	Reagenz	Dauer
1	Roticlear	3 x 10 min
2	Ethanol 100%	2 min
	Ethanol 100%	2 min
	Ethanol 100%	2 min
	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 70%	2 min
	Ethanol 50%	2 min
3	ddH ₂ O	5 sec
5	Hämatoxylin	30 sec
5	Leitungswasser	5 sec
6	Eosin	3 min
7	Ethanol 70%	3 min
	Ethanol 96%	3 min
	Ethanol 100%	3 min
8	Roticlear	3 x 10 min

Tbl.8: Inkubationszeiten der HE-Färbung

Reagenz	Zeit [h]
Ethanol 70%	0,45
Ethanol 80%	0,45
Ethanol 96%	1,00
Ethanol 96%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Xylene	0,45
Xylene	1,00
Xylene	1,15

Tbl.9: Programm der Gewebeprozessierung

III.4.1.4 Immunhistochemie

III.4.1.4.1 Grundlagen

Die Immunhistochemie gehört wie die Western Blot Analyse zu den spezifischen Nachweismethoden proteinogener Strukturen. Das Grundprinzip beruht auf der Visualisierung markierter Antikörper die zuvor mit der zu untersuchenden Zielstruktur (=Antigen) eine feste Bindung eingegangen sind. Eine hohe Affinität des Antigen- Antikörper-Komplexes und ausreichende Spezifität in der Erkennung des Epitops sind Voraussetzung und Qualitätsmerkmal. Bei der in dieser Arbeit verwendeten indirekten Methode erfolgt die eigentliche Färbung über einen zweiten Substrat-gekoppelten Antikörper, der eine spezifische Bindung mit dem Erstantikörper eingeht. Der indirekte Nachweis ist durch die Möglichkeit simultaner Bindung mehrerer Zweitantikörper an den Antigen-Antikörper Verbund signalintensiver und folglich empfindlicher als die direkte Methode.

III.4.1.4.2 Immunhistochemische Doppelmarkierung an Paraffinschnitten

Citratpuffer: pH 6.0, 10 mM, Citronensäure Monohydrat (Carl Roth), Tween 20 0,05% (Carl Roth) / H₂O₂ 3% / Methanol: H₂O₂ 3% (Carl Roth), Methanol (Merck Millipore) / TBST / BSA 1%/3%: pH 7.6; Tris Base 0,1M (Carl Roth), NaCl 1,4M (Carl Roth), Tween 20 0.05%, BSA 1%/3% (Carl Roth) / Anti-Sca-1, Ly6A/E Antikörper (Abcam) / Anti - CK 19 Antikörper (DSHB- University of Iowa) / Roticlear (Carl Roth) / 3,3 '-Diaminobenzidin (DAB) (Dako) / Vectamount Medium (Vector Laboratories) / Mayers Hämalaulösung (Merck Millipore)

Zur Darstellung von Sca-1⁺ Zellen im murinen Gewebeverband und Eingrenzung der originalen Beschaffenheit dieser Subpopulation wurde eine Simultanfärbung mit Anti-Sca-1-Antikörper und einem epithelspezifischen Antikörper gegen CK-19 durchgeführt.

Dazu wurden die Schnitte zunächst in Roticlear deparaffinisiert und über eine absteigende Ethanolreihe ins wässrige Milieu überführt. Nach einem Spülschritt mit ddH₂O erfolgte die Epitop-Demaskierung der Proben durch Citratpuffer in der Mikrowelle. Die Pufferlösung wurde anschließend über einen Spülschritt entfernt und die Proben zur Blockierung der enzymatischen Aktivität endogener Peroxidasen mit H₂O₂ 3% / Methanol versetzt. Es folgte ein Waschschrift mit TBST / BSA 0,1% und eine Inkubationsphase der Proben in Blockier-Reagenz (TBST / BSA 3%) zur Verringerung unspezifischer Bindungsstellen. Die Färbelösung bestehend aus Anti-Sca-1- /Anti-CK-19-Antikörper in TBST/BSA 3% wurde hergestellt und die Schnitte darin über Nacht inkubiert (Eingesetzte Antikörper und Verdünnungen (s. III.1.3).

Nach einem Waschschrift in TBST/BSA 0,1% folgte die Inkubation mit den Enzym konjugierten-sekundär-Antikörpern in TBST/ BSA 3% bei RT unter Einhaltung Antikörper spezifischer Inkubationszeiten. Anschließend folgte nach Substratzugabe von DAB die durch Peroxidase katalysierte Farbreaktion und das Gegenfärben der Kernstrukturen mit Mayers Hämalaunlösung. Nach Dehydratation über eine aufsteigende Ethanolreihe und Reinigung in Roticlear wurden die Schritte mit Mounting Medium versetzt und eingedeckelt. Für die dazu eingehaltenen Inkubationszeiten (s.

Tbl.10). Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit einer technischen Hilfskraft durchgeführt.

III.4.1.4.3 Immunfluoreszenz doppelmarkierter Zellkulturpräparate

Diesem Verfahren liegen dieselben physiologischen Prinzipien zu Grunde wie der Immunhistochemie, Unterschiede bestehen lediglich in der Detektionsmethode des sekundär-Antikörpers. Dieser ist in fluoreszenzbasierten Verfahren anstelle eines Substrates mit einem Fluorochrom konjugiert, dessen Moleküle im angeregten Zustand ein Fluoreszenz Signal emittieren. Anregung, Filterung und Darstellung dieses Signals erfolgen dabei über ein Fluoreszenzmikroskop. In dieser Arbeit wurden Doppelmarkierungen durchgeführt, die eine Co-Expression der gesuchten Epitope in demselben Probenmaterial darstellen können.

III.4.1.4.4 Präparation der Zellen

Pankreatische Epithelzell-Isolate befinden sich unter Standardbedingungen zu einem hohen Grad in Suspension. Dieses Verhalten ist in Abhängigkeit von der eingesetzten Inkubationszeit und dem Differenzierungsgrad zu sehen. Aus technischen Gründen sind dem Färbeprozess ausschließlich Zellen zugänglich, die zuvor auf einem Untergrund fixiert worden sind. Um dies zu gewährleisten, wurden 3 verschiedene Präparationsverfahren verwendet.

III.4.1.4.5 Zytozentrifugation

Shandon Cytospin 3 (Thermo Fisher Scientific) / Super Frost Ultra Plus® Objektträger (Menzel)

Zur Herstellung adhärenter Zellproben wurden Zellen aus 200 µl Zellsuspension mit einer Shandon Cytospin 3 für 5 min bei 50*10 g auf einen Glasobjektträger zentrifugiert. Es folgte eine zügige Fixation in Paraformaldehyd und Färbung nach unten beschriebener Verfahrensweise.

III.4.1.4.6 Poly-L-Lysin Beschichtung

Poly-L-Lysin 0,1% (Sigma-Aldrich) / Millizell-EZ-Kompartimentierte Mikroskop-Objektträger (Merck-Millipore) / Cover Slips SecureSlip™ (Sigma-Aldrich)

Poly-L-Lysin ist ein Aminosäurepolymer, das positiv geladene, hydrophile Aminogruppen besitzt. Elektrostatische Wechselwirkungen dieser Gruppen mit der Zellmembran bewirken eine Anlagerung der Zellen an Poly-L-Lysin beschichtete Untergründe und begünstigen so die Adhäsion der Zellen. Es wurden ansatzabhängig Cover Slips und Millizell-EZ-Objektträger für 5 min mit Poly-L-Lysin 0,1% benetzt und nach einem Spülschritt mit ddH₂O vor Verwendung für 2h im Trockenschrank gelagert.

III.4.1.4.7 Matrigel

Dazu s. III.2.4.3

III.4.1.4.8 Immunfluoreszenz Färbung

Triton X –100 / PBS: PBS (PAA), Triton X –100 0,1% (Carl Roth) / Paraformaldehyd / PBS 3%: Paraformaldehyd 3% (Carl Roth), PBS (PAA) / PBST / BSA 3%: PBS (PAA), Tween 20 0.05% (Carl Roth), BSA 3% (Carl Roth) / PBST 0,5%: PBS (PAA), Tween 20 0.05% (Carl Roth), BSA 0,5% (Carl Roth) / Methanol (Merck-Millipore) / Polysorbat 20 (=Tween 20) (Carl Roth) / Einbettungsmedium ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen)

Die Fixierung der Zellen erfolgte auf Eis mit auf – 20°C heruntergekühltem Methanol oder Antikörper-abhängig bei RT in 3% Paraformaldehyd/PBS. Es folgte ein Spülschritt mit kaltem PBS zum Entfernen aller Rückstände des Fixationsreagenz. Der folgende Schritt diente der Permeabilisierung der Zellmembran, womit die Penetrationsfähigkeit für Antikörper erhöht wurde die intrazellulär lokalisierte Epitope markierten. Diese Maßnahme wurde in Abhängigkeit der Expressionsloci der untersuchten Antigene entsprechend fakultativ

Material und Methoden

durchgeführt. Dazu wurden die Zellproben in einer Lösung aus Triton X – 100 0,1% / PBS inkubiert und in PBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte in PBST / BSA 3% Lösung. Die für die Einzel- / und Doppelmarkierung verwendeten Primärantikörper wurden in den entsprechenden Verdünnungen in PBST / BSA 3% den Proben zugeführt und diese in einer angefeuchteten Kammer bei + 4°C über Nacht gelagert. Am folgenden Tag wurden ungebundene Primärantikörper durch einen Spülschritt mit PBST entfernt und es erfolgte die Inkubation mit den wirtsspezifischen Sekundär-Antikörpern in PBST / BSA 3% für 1h bei RT und unter Ausschluss von Licht. Überschüssige Antikörper wurden durch einen Waschschrift in PBST entfernt. Zur Visualisierung der Zellkerne und zur Erhaltung der Farbintensität wurde ein Eindeckmedium verwendet das 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) beinhaltet. Alle Präparate wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung bei + 4°C und Dunkelheit gelagert. Eine Auflistung der verwendeten Antikörper und Verdünnungen ist unter (III.1.3) dargestellt.

Schritt	Reagenz	Dauer
1	Rotoclear	3 x 10 min
2	Ethanol 3 x 100%	je 2 min
	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 70%	2 min
	Ethanol 50%	2 min
3	ddH ₂ O	5 min
4	Citrat Puffer	3 x 5 min
5	H ₂ O ₂ / Methanol 3%	10 min
6	TBST / BSA 0,1%	5 min
7	TBST / BSA 3%	60 min
8	1.Ak-TBST / BSA 3%	über Nacht
9	TBST / BSA 0,1%	10 min
10	2. Ak-TBST / BSA 3%	45 min
11	TBST / BSA 0,1%	5 min
12	DAB	10 min
13	Hämalaun	1 min
14	Ethanol 50%	2 min
	Ethanol 70%	2 min
	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 3 x 100%	je 2 min
15	Rotoclear	3 x 10 min

Tbl.10: Inkubationszeiten der IHC-Doppelmarkierung

Schritt	Reagenz	Dauer
1	Methanol	20 min
2	Triton-X 100 0,1%/PBS	10 min
3	PBS	3 x 5 min
4	PBST/BSA 3%	30 min
5	1. Ak-PBST/BSA 3%	über Nacht
7	PBST 0,5%	3 x 5 min
8	2. Ak- PBST/BSA 3%	60 min
9	PBST 0,5%	3 x 5 min

Tbl.11: Inkubationszeiten der IFF Markierung

III.4.2 Molekularbiologische Analyseverfahren

III.4.2.1 PCR

III.4.2.1.1 Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur spezifischen Amplifizierung von Nukleinsäuren in vitro, die in Zyklen verläuft und zu einem exponentiellen Anstieg des PCR Produktes führt. Ein Amplifizierungszyklus besteht dabei aus aufeinander abgestimmten Intervallen bestimmter Länge mit unterscheidbarer, chemisch-/enzymatischer Aktivität, die durch Temperaturänderung initiiert wird.

Der Denaturierung der hybridisierten Stränge zu Einzelsträngen durch Auflösung der Wasserstoffbrücken bei 94°C – 98°C folgt die Anlagerungsphase (= engl.: Annealing) der Primer in entgegengesetzter Orientierung an der Einzelstrang-DNA. In der Elongationsphase lagert sich die DNA-Polymerase ihrem temperaturabhängigen Aktivitätsoptimum folgend an die Primer an und komplementiert den DNA Strang durch Synthese vom 3'- 5' Ende. Amplifiziert werden können Nukleinsäuren verschiedener Originalitäten, sofern sie in doppelsträngiger Form vorliegen. In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die Expression der untersuchten Gene in Epithelzellen und Stromazellen zu identifizieren und in verschiedenen Ansätzen quantitativ zu evaluieren.

III.4.2.1.2 RNA-Extraktion

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) / UV/VIS -Spektralphotometer NanoDrop® 2000 (ThermoFisher)

Die RNA-Extraktion erfolgte in allen Ansätzen mithilfe des RNeasy Plus Mini Kits. Bei deren Durchführung wurde sich an das Hersteller-eigene Protokoll gehalten. Die Konzentration enthaltener RNA Oligonukleotide wurde anschließend dem Lambert-Beerschen Gesetz folgend spektrophotometrisch bestimmt. Zur Evaluierung des Reinheitsgrades wurden die Absorptionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm gemessen und das Verhältnis der Extinktionen OD 260nm:OD 280 nm bestimmt. RNA mit dem photometrisch höchst messbaren Reinheitsgrad korrespondiert mit einem Verhältnis OD260/OD280 von 2.1. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Proben mit einem Wert über 1.8 weiterverwendet. Die Lagerung erfolgte in RNase-freiem H₂O bei - 80°C.

III.4.2.1.3 Elektrophoretische Bestimmung der RNA-Integrität

TBE 1x: TBE 10 x (Carl Roth), ddH₂O (B. Braun) / RNA-Puffer: Formamid 50% (Carl Roth), ddH₂O 25% (B. Braun), Ladepuffer 6x 25% (Fermentas) / Agarose (Carl Roth) / Ethidiumbromid (Carl Roth) / Formaldehyd 37% (Carl Roth)

Neben dem Reinheitsgrad stellt die Menge intakter RNA die zweite Säule der Evaluierung des gewonnenen Probenmaterials dar. Um den Grad der Denaturierung zu bestimmen, wurde eine denaturierende 0,8% Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Alle Arbeiten mit Nukleinsäuren und Ethidiumbromid wurden unter Gasabzug und nach vorhergehender DNA-Dekontamination durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurden Agarose (0,8%) und Formaldehyd (1%) in 1xTBE geschmolzen und zur Signaldetektion mit Ethidiumbromidlösung (0,1µg/ml) versetzt. 1µg RNA in RNA-Puffer (Formamid, ddH₂O, Ladepuffer 6 x) wurden zur Denaturierung kontaminierender Proteine 10 min bei 60°C erhitzt, abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Separation erfolgte im elektrophoretischen Spannungsfeld (150 V, TBE 1x –Laufpuffer) und die Emission der 28s / 18s Banden wurde nach UV-Transluminiszenz über eine CCD-Kamera dargestellt und ausgewertet.

III.4.2.1.4 Reverse Transkription

Quantitect Reverse Transcription Kit (Quiagen)

Für die Transkription von RNA in cDNA wurde das Quantitect Reverse Transcription Kit verwendet. Dabei wurde nach Hersteller-Angaben vorgegangen. Die Aufbewahrung der cDNA Proben erfolgte in DNase-freiem H₂O bei - 20°C.

III.4.2.1.5 Primer Design

Pubmed Gene (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) / Assay Design Center (Roche Applied Science) / Oligo Analyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) / Metabion (München)

Ein Teil der verwendeten Primer wurde Publikationen entnommen und sind in der Aufführung als solche gekennzeichnet. Der überwiegende Teil der Primer wurde programm-basiert entworfen. Dazu wurden die mRNA Sequenzen der gesuchten Gene der Online Datenbank von Pubmed Gene entnommen und in das Assay Design Center kopiert. Die dort erstellten Primer Sequenzen und das Amplikon wurden in einem weiteren Schritt durch das Programm Oligo Analyzer 3.1 hinsichtlich Länge, Schmelztemperatur, Intron-

spanning und Glycingehalt überprüft. Des Weiteren wurden thermodynamische Eigenschaften, die eine Ausbildung störender Sekundärstrukturen wie Haarnadelstrukturen oder Dimerisationsprodukte komplementärer Sequenzen begünstigen könnten, bei der Synthese berücksichtigt.

Dazu wurden die unten beschriebenen Grenzwerte eingehalten. Alle Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt und nach Ankunft bei -20°C gelagert. Eine Auflistung der in der RT-PCR und qRT-PCR angewandten Primersequenzen ist unter (III.1.3) dargestellt

Primerkonfiguration	Freie Enthalpie [kcal/mol ⁻¹]
Haarnadelstrukturen	$\Delta G > -4$
Selbst - Dimerisation	$\Delta G > -6$
Hetero - Dimerisation	$\Delta G > -6$

Tbl.12: Thermodynamische Grenzwerte für das 3'-Ende der erstellten Sequenzen

III.4.2.1.6 RT-PCR

Dream Taq™ Green PCR Master Mix 2 x: MgCl₂ 4mM, dNTPs, Taq Polymerase, Dream Taq Green Buffer (Fermentas) / Thermo Cycler (Eppendorf)

Alle RT-PCR Amplifizierungen wurden mit dem Thermo Cycler durchgeführt. Zur Vorbereitung der Ansätze wurde das Reaktionsgemisch, bestehend aus Dream Taq™ Master Mix 1x zusammen mit F/R-Primer 1 µM, *Template-DNA* in ansatzabhängiger Konzentration (siehe Ergebnisteil) und PCR-H₂O auf Eis zubereitet. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Amplifizierung erfolgte standardisiert nach dem unten beschriebenen Schema. Die Analyse der PCR-Produkte wurde am selben Tag vorgenommen.

Phase	Temp [°C]	Dauer [sec]	Anzahl Zyklen	Prozess
Pre-Inkubation	94	120	1	Initiale Denaturierung
Amplifizierung	94	15	40	Denaturierung zum Einzelstrang
	55	20		Primer-Hybridisierung
	72	30		Elongation
	72	60	1	Finale Elongation
Abkühlung	4		1	Abkühlung

Tbl. 13: Amplifizierungsschema der RT-PCR

III.4.2.1.7 DNA - Elektrophorese

Tris-Acetat-EDTA Elektrophoresepuffer (=TAE 50x) (Bio-Rad) / Agarose (Carl Roth) / Ethidiumbromid (Carl Roth) / Gene Ruler 100 bp *DNA-Ladder* (Thermo Fisher Scientific)

Um die amplifizierten DNA-Produkte nachzuweisen wurde eine 1,5% Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde Agarose 1,5% in 1x TAE unter Anwendung von Hitze in der Mikrowelle aufgelöst und mit einer Ethidiumbromid-Lösung 0,1 µg/ml versetzt. DNA-Proben in dem Reaktionsgemisch aus der RT-PCR (siehe oben) wurden zusammen mit einem Standard zur Größenbestimmung auf das Gel aufgetragen. Die Separation erfolgte anschließend im Spannungsfeld von 120 V für 40 min. Die Darstellung der Bandenposition erfolgte über UV-Transluminiszenz und wurde zur Speicherung über eine CCD-Kamera digitalisiert.

III.4.2.1.8 Quantitative RT- PCR

LightCycler® 480 Probes Master Mix (Roche Applied Science) / LightCycler® 480 Universal Probe Library (Roche Applied Science) / LightCycler® 480 96-PCR – Platten (Roche Applied Science) / LightCycler® 480 96-PCR - Platten Klebefolie (Roche Applied Science) / LightCycler® 480 (Roche Applied Science)

Zur Erfassung des Expressionsniveaus einzelner Zielgene wurde die Echtzeit Amplifizierungsmethode (qRT-PCR) mithilfe des LightCycler® 480 Systems verwendet, die auf dem Prinzip der PCR beruht. Bei dieser Methode findet eine Messung der entstandenen Nukleinsäuren bereits während der Amplifizierungsphase statt. Dies bedingt sich durch Fluorochrome die dem Reaktionsansatz beigefügt sind und eingebaut in das zu amplifizierende Gen ein Fluoreszenzsignal generieren, das der Menge des PCR-Produktes proportional ist und in Echtzeit ausgelesen wird. In dieser Arbeit wurde ein System mit Hydrolysen-Sonden (Universal Library Probes) verwendet, die auf dem Prinzip des FRET (Fluorescence resonance energy Transfer) aufbaut. Es handelt sich um kurze Nukleinsäure-Sequenzen, (Okta- / Nonamere) die mit einem Fluoreszin (FMA) am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende gekoppelt sind. Ein Quencher ist ein Molekül, das Anregungsenergie von einem Nachbarmolekül aufnehmen kann und somit dessen Fluoreszenz verhindert. Die so konfigurierten Sonden hybridisieren während der *Annealing-Phase* mit den komplementären Sequenzen auf dem zu amplifizierenden Gen und werden in der Elongationsphase durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq- Polymerase hydrolysiert. Die Freisetzung der Moleküle bewirkt die Aufhebung der Inhibition durch das Quencher-molekül und der Farbstoff entsendet

ein Fluoreszenzsignal. Nach jedem weiteren Zyklus entstehen weitere nicht unterdrückte Fluorochrome, so dass die Intensität des Fluoreszenzsignals der Menge an neu synthetisierter DNA entspricht.

Die qRT-PCR wurde in der Durchführung an den Richtlinien der MIQUE *Guidelines* orientiert. Alle Reaktionsansätze wurden mit dem LightCycler® 480 Probes Master mix unter Zuführung von 1 µg Template DNA, Universal Probe Library Probes, F-Primer / R-Primer und PCR-H₂O unter Ausschluss direkter Lichteinwirkung auf Eis vorbereitet und auf die entsprechenden Platten pipettiert. Für Mengenangaben der Komponenten des Reaktionsgemisches sowie Details zum verwendeten Amplifizierungsschema siehe unten.

Komponente	Konzentration	Volumen [µl]
F-Primer	200 nM/l	0,2
R-Primer	200 nM/l	0,2
Universal Probe Library Probe	100 nM/l	0,2
Light Cycler 480 Probes Master(2x)	1 x	10
Template DNA	1µg	5
PCR H ₂ O	-	4,4
Endvolumen		25

Tbl. 14: Zusammensetzung des Light Cycler Reaktionsgemisches

Phase	Temp [°C]	Dauer [sec]	Anzahl Zyklen	Prozess
Pre-Inkubation	95	300	1	Initiale Denaturierung
Amplifizierung	95	10	45	Denaturierung zum Einzelstrang
	60	30		Primer-Hybridisierung
	72	1		Elongation
Abkühlung	40	30	1	Abkühlung

Tbl .15: Amplifizierungsschema der Real Time RT-PCR

III.4.2.1.9 Auswertung der relativen Quantifizierung

LightCycler™ 480 Software Version 1.5.0.39 (Roche Applied Science) / Microsoft Excel (Microsoft)

Alle gemessenen Zielgene wurden im Rahmen der relativen Quantifizierung zu den Referenzgenen *Ppib* (=Peptidyl-prolyl cis-trans-Isomerase B) und *Rpl13a* (= Ribosomal protein L13A) normalisiert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Anzahl der PCR Produkte in jedem Zyklus gemäß einer Effizienz von 2 verdoppelt wird (E=2 ,100%). Zur

Material und Methoden

internen Qualitätskontrolle wurden bei jedem Versuch NTC (Non Template Controls) eingesetzt und alle Versuche mit technischen Replikaten durchgeführt. Der C_t -Wert (engl. Cycle Threshold) gibt die Zyklenanzahl bis zur Erreichung des Wertes an, an dem sich das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant vom Hintergrundrauschen abhebt. Dieser ist umgekehrt proportional zu der Menge an enthaltener DNA. Hintergrundrauschen und umweltbedingte Verunreinigung der Proben können ein Grund für ein spätes Auftreten des C_t -Wertes sein. Diese Möglichkeit methodischer Störfaktoren wurde bei der Auswertung berücksichtigt und Zielgene mit einer C_t -wirksamen Signaldetektion > 38 Zyklen wurden aus der Wertung ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode, mithilfe der LightCycler® 480 Software Version 1.05.0.39 und Microsoft Excel.

Hierbei wird der C_t -Wert des Zielgens in einem ersten Schritt von dem C_t -Wert des Referenzgens subtrahiert (ΔC_t). In dieser Arbeit wurde dazu das arithmetische Mittel der C_t -Werte beider Referenz Gene *Ppib* / *Rpl13a* verwendet. Zur Darstellung des Verhältnisses der Transkriptmenge der gesuchten Gene in den behandelten Proben (P_1) zu den Kontrollen (P_0) wurden die ΔC_t -Werte der behandelten Proben von dem ΔC_t -Wert der Kontrolle subtrahiert und so der $\Delta\Delta C_t$ -Wert bestimmt. In jenen Versuchen, die mit 2 Kontrollen pro Ansatz konzipiert worden sind, wurde zunächst das arithmetische Mittel der Kontroll ΔC_t -Werte gebildet und davon analog die ΔC_t -Werte der behandelten Proben subtrahiert. Als letzter Schritt wurde der n-fache Expressionsunterschied zwischen den gesuchten Genen und den Kontrollen durch Integration in folgende Formel dargestellt $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Um die Standardabweichung, bedingt durch den technischen Fehler, geringer zu halten wurden die Ergebnisse mit den Replikaten bis auf die dritte Nachkommastelle gemittelt.

$$\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t\left(\frac{(Ppib + Rpl13a)}{2}\right)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(P_0) - \Delta C_t(P_1) / \Delta C_t\left(\frac{(P_0(1)+P_0(2))}{2}\right) - \Delta C_t(P_1)$$

$$\text{Ratio: } 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Abb.3: Analysealgorithmus nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

III.4.2.2 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

III.4.2.2.1 Grundlagen

Zur Validierung des Einflusses von Interferon- β und getrennten Betrachtung der Sca-1⁺ Population innerhalb des Epithelzell-Isolates wurde in Anlehnung an die Expressionsanalyse eine Zell-quantifizierende Untersuchung mittels FACS (engl.: Fluorescence-Activated Cell Sorting) durchgeführt. FACS ist eine auf der Durchflusszytometrie basierende Methode, Zellen einer heterogenen Population nicht nur nach morphologischen und membranmolekularen Eigenschaften zu charakterisieren, sondern diese auch vitalitätserhaltend hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften von den übrigen zu separieren. Das Prinzip der Identifizierung und Trennung beruht auf der Nutzbarmachung optischer, biochemischer, mechanischer sowie elektrostatischer Prinzipien.

Ein solcher Fluss-Sortierer führt einen kontinuierlichen Fluss an in Suspension befindlichen Zellen einer Trägerflüssigkeit. Diese treten in eine Mikroküvette ein, die die Zellen vereinzelt und an dem Einfallsbereich eines Laserstrahls vorbeiführt. Das emittierte Laserlicht durchdringt die Zelle und wird abhängig von ihrer Größe und intrazellulären Heterogenität gebrochen und durch nachgeschaltete Detektoren registriert. Das Vorwärtsstreulicht (engl.: FSC = Forward Scatter) korreliert dabei mit Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (engl.: SSC = Side Scatter) Informationen zur intrazellulären Morphologie wie Größe des Zellkerns, DNA- und Vesikelgehalt einer Zelle enthält.

Zusätzlich zu diesen Parametern werden Fluoreszenzsignale antikörpermarkierter Zellen detektiert. Diese erreichen über ein Filtersystem einen Sensor, der Schwellenwert-abhängig ein Zählereignis registriert. Den Fluoreszenzdetektoren nachgeschaltet ist ein Vibrationskanal, der die Trägerflüssigkeit in kleine Tropfen unterteilt was einer Vereinzlung der Zellen entspricht. Abhängig von den vorher detektierten Fluoreszenz- und Streulicht Eigenschaften erhält der passierende Tropfen eine Ladung und wird bei Verlassen des Kanals im freien Fall anschließend über elektrostatische Wechselwirkung mit einem Magneten in seiner Bahn abgelenkt und in ein von den anderen getrenntes Gefäß sortiert [82].

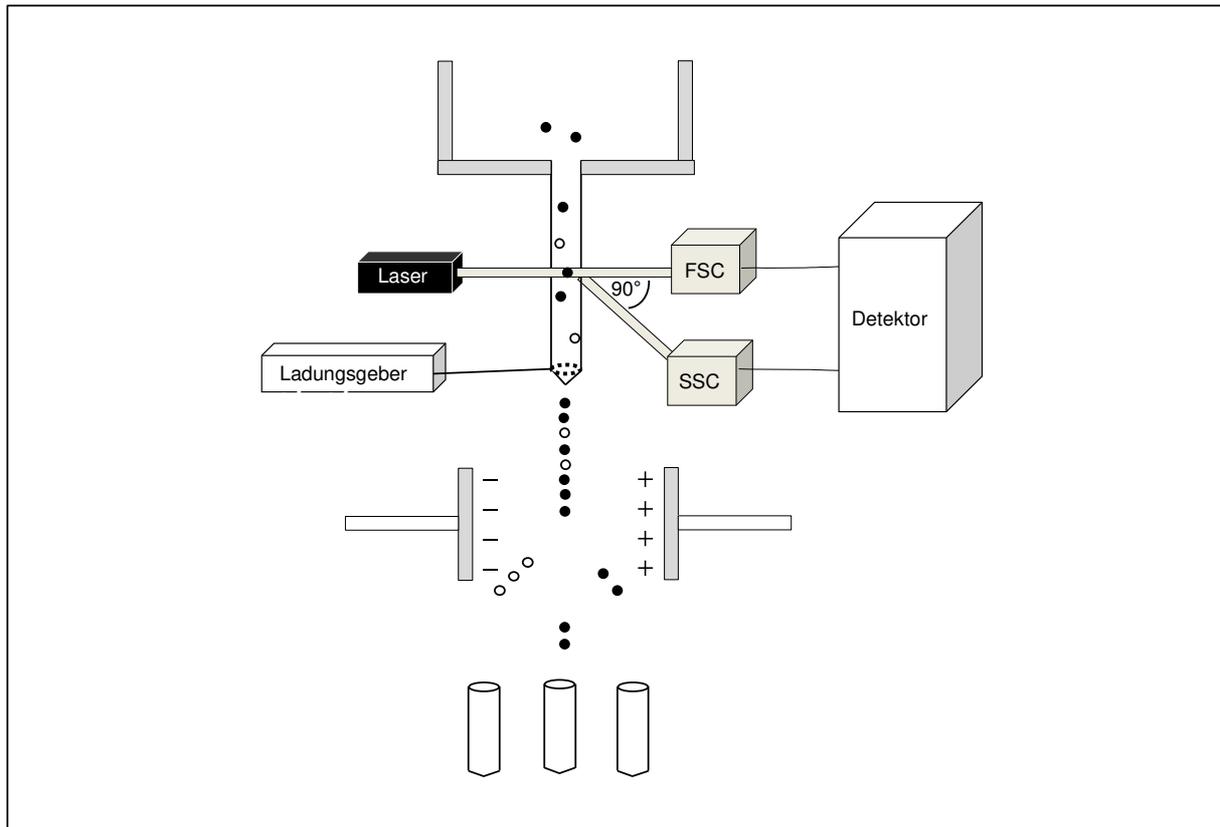


Abb.4: Prinzip der durchflusszytometrischen Zellsortierung (modifiziert nach [21])
(FSC = Forward Scatter), (SSC = Side Scatter)

III.4.2.2 Antikörpermarkierung der Zellen

FACS-Puffer: PBS (PAA) FKS 0,5% (PAA) / Propidiumiodid (Sigma-Aldrich) / Anti -Sca 1- PE-Cy7 (eBioscience) / Anti -Sca-1- Biotin (eBioscience) / Anti -Sca-1- FITC (eBioscience) / FACS Aria (BD) - Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (Klinikum rechts der Isar, München)

Die Markierung der Zellen erfolgte durch Inkubation in FACS-Puffer mit den darin enthaltenen Antikörpern bei RT für 15 min und unter Ausschluss von Licht (Antikörper und entsprechende Verdünnungen (s. **III.1.3**). Dabei wurde ein stöchiometrisches Verhältnis von 2×10^6 Zellen/ml der Färbelösung eingehalten. Anschließend wurden die Zellen 2 x in FACS-Puffer gewaschen und in 200 μ l desselben Reagenz resuspendiert. Es folgte die Zugabe von Propidiumiodid (1:200), einem Chromogen, das die Zellmembran toter Zellen passieren kann und mit der DNA-Doppelhelix interkaliert. So markierte Zellen wurden anschließend während des Sortierprozesses diskriminiert. Die Analyse und Sortierung erfolgte in rascher zeitlicher Folge am FACS Aria in Kooperation mit Dr. Matthias Schiemann, der von dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Klinikums rechts der Isar zur

Durchführung dieser Versuchsreihe zur Verfügung gestellt wurde. Die Durchführung der Fluss-Sortierung erfolgte durch eine technische Hilfskraft. Des Weiteren erfolgten alle vorbereitenden Antikörpermarkierungen der Zellen in Zusammenarbeit mit einer technischen Hilfskraft.

III.4.2.2.3 Gating

FACS DIVA Version 6.1.2 (BD)

Konfiguration und Auswertung des Sortierungsprozesses erfolgte mit der FACS Geräte Software FACS DIVA Version 6.1.2 an einem dem Gerät angeschlossenen Computer. Die Ausgabe der Signale erfolgte durch Darstellung in sog. Streudiagrammen (engl.: Dot-plot) in denen Einzelereignisse unter Verwendung zweier verschiedener Parameter gleichzeitig betrachtet werden können. Die Konfiguration der Quadranten (engl: Gates) wurde zunächst so gewählt, dass alle toten Zellen sowie Zelltrümmer von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Dazu wurde die Funktion von FSC und SSC gebildet. Nachfolgend wurde über ein Histogramm die Partikelgröße (FSC) und Fluoreszenzintensität der Antikörper - markierten Sca-1⁺ Subpopulation graphisch evaluiert und drei Zielbereiche definiert (Gating):

Zielbereich 1: Enthielt alle Sca-1⁺ vereinzelte Zellen

Zielbereich 2: Enthielt alle Sca-1⁺ Doubletten *

Zielbereich 3: Enthielt alle Sca-1⁻ Zellen

Innerhalb des Gates wurden alle Zellen als prozentualer Anteil der Gesamtzählereignisse sowie des übergeordneten Gates ausgegeben. Für die Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurde die Konfiguration und Abfolge der Gates in einem Profil abgelegt und für alle Versuche gleich angewendet. Im Anschluss an die Zellsortierung wurden die Zellen in serumfreiem Medium auf Eis transportiert, in Medium gewaschen, quantifiziert und ansatzabhängig ausgesät.

*(Zählereignis besteht aus einer positiver Zelle und adhärenthem Zellmaterial mit unbekanntem Fluoreszenzeigenschaften)

III.4.3 Zellsphären-Assay der Sca-1⁺ Subpopulation

DMEM:Hams F12 (PAA), B27-Supplement (50x) 2% (Invitrogen), EGF 20 ng/ml (Sigma-Aldrich), FGF 2 10 ng /ml (Sigma-Aldrich) , Heparin 2ug/ml (Sigma-Aldrich), Insulin- Transferrin–Selenium (100x) 1% (Invitrogen) , Penicillin-Streptomycin 1% (PAA) / Costar® Ultra Low Attachment Platten 24 Well (Corning) / Mikroskop Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss) / Interferon- β 1000 u/ml, 100 u/ml, 1 u/ml (Hycult Biotech) / T1 (6 Tage)

Zur Evaluierung der Fähigkeit von Sca-1⁺ Zellen, primäre Zellsphären auszubilden wurde diese Zellfraktion mit der für dieses Epitop negativ sortierten Population des heterogenen Isolates verglichen. Dazu wurden die Zellen zu unterschiedlichen Dichten in adhäsionskontrollierter Umgebung (24 Well Ultra Low Attachment Platten) in serumfreiem Medium ausgesät. Folgende Gruppen wurden definiert, die nach der oben beschriebenen Methodik vorsortiert wurden:

1. Sca-1⁺ vereinzelte Zellen
2. Sca-1⁺ Doubletten
3. Sca-1⁻ Zellen

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt (s. III.2.2.4) und die Zellen jeder der Gruppen 1-3 in einem Konzentrationsgradienten (Ansatz A₁-A₄) in je 500 μ l Medium/Kammer ausgesät, wobei jeder der Ansätze durch 4 Kammern (K₁₋₄) repräsentiert wurde.

Weitere Ansätze wurden für eine Behandlung mit drei unterschiedlich verdünnten Interferon-Lösungen etabliert und die Behandlung bis zum Zeitpunkt der Auszählung im 2-Tage-Intervall wiederholt. Um Verdunstungs- und Wirkverlusten des supplementierten Mediums entgegenzuwirken, wurde den Proben täglich 125 μ l frisches Medium hinzugefügt. Aufgrund des Umfangs dieses Versuchsansatzes wurde zur Gewährleistung einer zügigen Prozessierung der Proben und Minimierung des iatrogenen Zellschadens von einer technischen Hilfskraft assistiert.

Die Auswertung erfolgte am 6. Tag durch lichtmikroskopische Quantifizierung aller bis dahin in Suspension befindlicher Sphären. Die Sphärenzahl in jedem Ansatz errechnete sich durch das Arithmetische Mittel der in den vier Kammern bestimmten Zählereignisse. Gewertet wurden Sphären mit einem Durchmesser von größer 100 μ m. Die Quantifizierung wurde standardisiert doppelt von zwei unabhängigen Personen durchgeführt und die Ergebnisse beider Analysen gemittelt dargestellt. Der Versuch wurde 3mal durchgeführt.

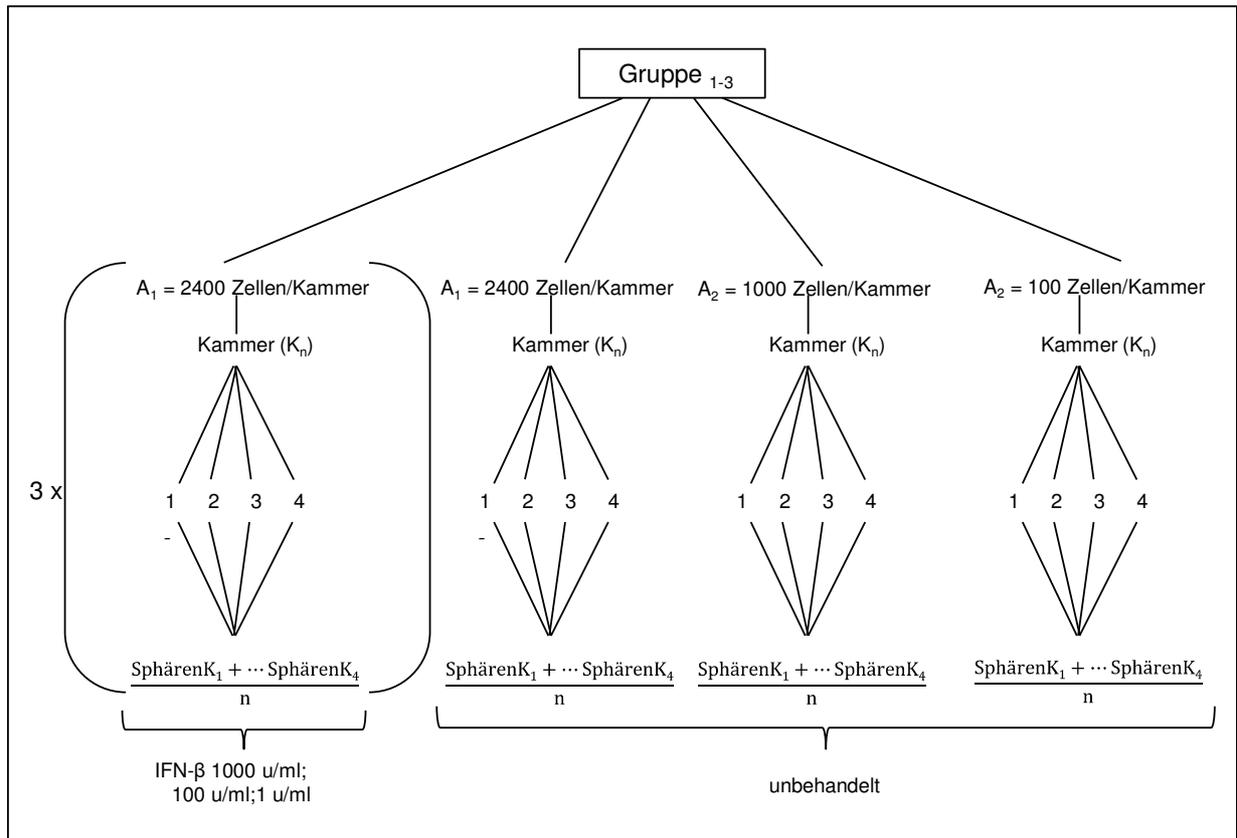


Abb.5: schematischer Versuchsaufbau des Zellsphären-Assay
 (A_n = Ansatz $_n$), (K_n = Kammer (engl.: Well) $_n$)

IV. Ergebnisse

IV.1 Etablierung der pankreatischen Epithelzell-Isolation

IV.1.1 Qualitative Untersuchung primärer Epithelzellen

Die Suche nach einem passenden Zeitpunkt zur Durchführung der in dieser Arbeit getätigten Stimulationsexperimente war bedingt durch zwei Faktoren. Zum einem galt es, funktionelle Artefakte zu vermeiden, die auf einer durch die Isolationsmethode induzierten artifiziellen Stressreaktivität epithelialer Zellen beruhen. Zur Prävention wurde daher bei den hier beschriebenen Experimenten vor Versuchsbeginn eine Latenzzeit eingehalten. Des Weiteren unterliegen primäre Epithelzellen in Kultur einer kurzen Lebensdauer und die zelluläre Zusammensetzung verändert sich im Zeitverlauf zu einem zunehmend heterogenen Phänotyp. Dadurch wird bei Probenerhebung zu späteren Zeitpunkten nach Kulturbeginn die Rückführbarkeit generierter Ergebnisse auf das epitheliale Kompartiment deutlich erschwert. Der folgende Versuch wurde durchgeführt, um eine Latenzzeit zu definieren, die beiden Bedingungen gerecht wird. Dazu wurde die Morphologie des Isolates im Zeitverlauf fotografisch dokumentiert und Markertranskripte, die pankreatischen Populationen zugeschrieben sind (azinär (*Amy*), duktal (*Ca2*, *Cftr*), β -zellulär (*Ins*), stromal (*Vim*), hämatopoetisch (*Ptprc*)) mittels RT-PCR ermittelt (s. **III.4.2.1.6**). Primer (s. **III.1.3**).

Direkt nach der Zellextraktion (s. **III.2.1**) konnte man unter dem Lichtmikroskop eine hohe Zellzahl detektieren, wobei eine Unterscheidung nach morphologischen Gesichtspunkten aufgrund der Dichte nicht möglich war. Der überwiegende Teil der Zellen enthielt zytoplasmatische Granula, die im Strahlengang braun imponierten und lagerten sich zu den für azinäre Zellen typischen beerenförmigen Konglomeraten an. Auffallend war die rasche Abnahme der Zahl vitaler Zellen über den Zeitverlauf, so dass bereits nach 96h ein großer Teil der Zellen abgestorben war (s. **Abb.1a**).

Transkriptuntersuchungen ergaben nach einer Kultivierungszeit von 24h analog dem mikroskopischen Befund eine starke Positivität für azinäre Transkripte (*Amy*⁺) sowie eine schwache Bande als Surrogat für spezifisch duktales Expressionsmuster (*Cftr*⁺). Des Weiteren konnte eine schwach positive Bande für ein Fibroblasten assoziiertes Transkript nachgewiesen werden (*Vim*⁺). Nach 48h zeigte sich ein weiterer duktales Marker positiv (*Ca2*⁺) und es gelang der Nachweis von β -Zellen (*Ins*⁺), die im Verlauf bis 4 Tage nach Isolation kontinuierlich

detektiert werden konnten. Hämatopoetische Zellen konnten nicht nachgewiesen werden (*Ptprc*). Die Markertranskripte für azinäre Zellen zeigten nach 24h ein Intensitätsmaximum und eine stetige Abnahme bis Tag 4, was sich mit der begleitenden lichtmikroskopischen Detektion einer raschen Abnahme der Zellkonglomerate deckte (s. **Abb.1b**). In Zusammenschau der oben beschriebenen Versuchsanforderungen und den hier dargestellten Daten wurde sich daher zur Standardisierung für eine Latenzzeit von 24h vor Versuchsbeginn entschieden.

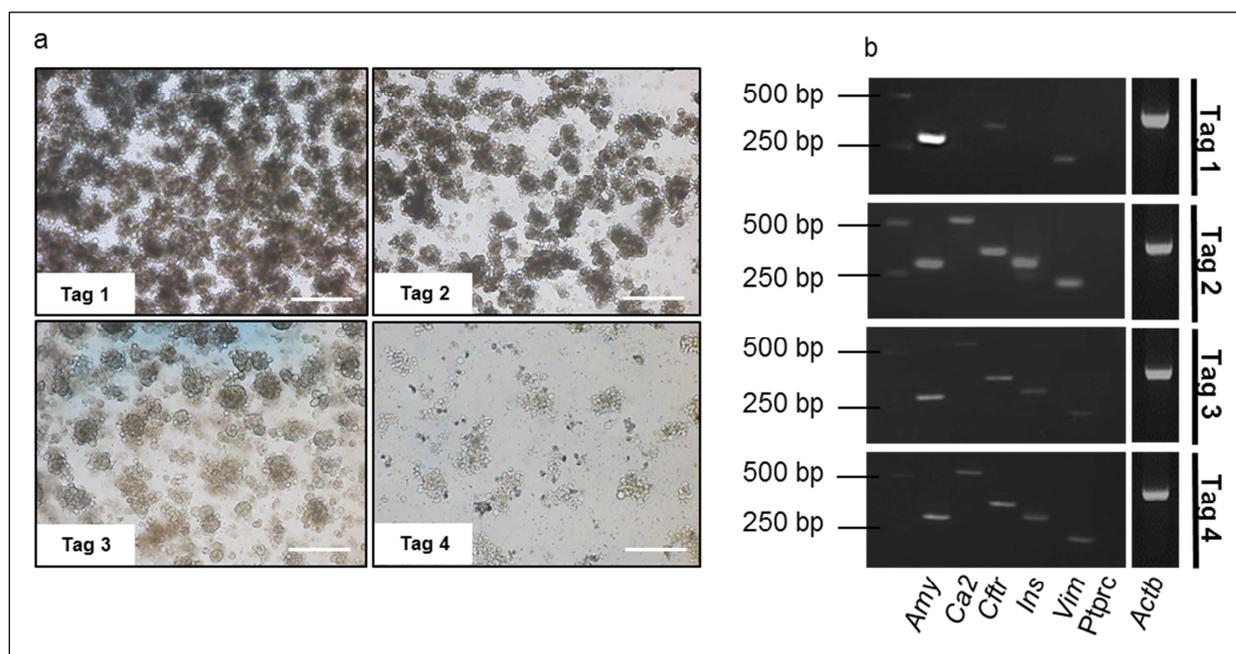


Abb.1: mRNA-Transkriptionsprofil und mikroskopische Dokumentation des Kulturverlaufes primärer Epithelzellen:

(a) Morphologie der kultivierten Epithelzellen vor RNA-Entnahme (Tag 1-4). Maßstab: 100 μ m

(b) Expressionsprofil pankreatischer Markertranskripte im Zeitverlauf. (bp= engl.: base pair(s), *Amy*, *Ca2*, *Cfr*, *Ins*, *Vim*, *Ptprc*, *Housekeeping-Gen: Actb* / 40Zykl. / 500 ng cDNA)

IV.1.2 Funktionelle Untersuchung isolierter Epithelzellen

Als nächstes wurde überprüft, inwieweit die verwendete Isolationsmethode mit Beachtung einer Latenzzeit nicht nur qualitativ, sondern auch funktionell intakte Zellen hervorbringt. Um die Zellintegrität hinsichtlich Rezeptorbindung, Signaltransduktion, intrazellulärer Prozessierung und Umsetzung auf Umweltreize zu untersuchen, wurde die Reaktivität der Zellen auf das CCK-Analogen Caerulein gemessen. Dies stellt ein hinlänglich gut beschriebenes, typisches Reaktionsverhalten dar und bietet so einen guten Vergleichsmaßstab für die funktionelle Nutzbarkeit der verwendeten Isolationsmethode und des Behandlungsansatzes.

IV.1.2.1 Caerulein induzierte Sekretionsantwort digestiver Enzyme und LDH

Untersucht wurde die Amylase-, Lipase-, LDH-Freisetzung azinärer Zellen nach Inkubation in Caerulein Lösungen des physiologischen bis supraphysiologischen Bereichs (1 pM - 100 nM); das Zeitfenster bis zum Nachweis der Sekretionsantwort behandelter und unbehandelter Zellen betrug 30 min. Es folgte die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität [u/ml] aus Proben des Zellmediums (s. **III.3.2.1**).

30 min nach Zugabe der Substanz stellte sich ein steiler Anstieg der Amylase- und Lipase-Aktivität im Zellmedium dar (s. **Abb.2a+b**). Es zeigte sich ein typisch konfigurierter biphasischer Kurvenverlauf mit einem Sekretionsmaximum bei 10 pM und zunehmend niedrigeren Werten, korrelierend mit steigenden Konzentrationen des supraphysiologischen Bereichs. Der Unterschied der maximalen Sekretion zum Basalwert betrug $1,61 \times (\pm 0,139)$ für Amylase und $1,59 \times (\pm 0,131)$ für Lipase: Im Bereich hoher Caerulein-Dosen, der sog. „Sekretionsblockade“ bei 10 nM, war nur noch ein geringer Unterschied von $1,09 \times (\pm 0,069)$ für Amylase und $1,06 \times (\pm 0,097)$ für Lipase nachweisbar. LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, das ausschließlich bei Membrandegeneration apoptotischer und nekrotischer Zellen in die Umgebung freigesetzt wird und stellt so ein Surrogat für zelldegenerative Prozesse dar. Es konnte keine signifikante Erhöhung von LDH im Medium detektiert werden (s. **Abb.2c**).

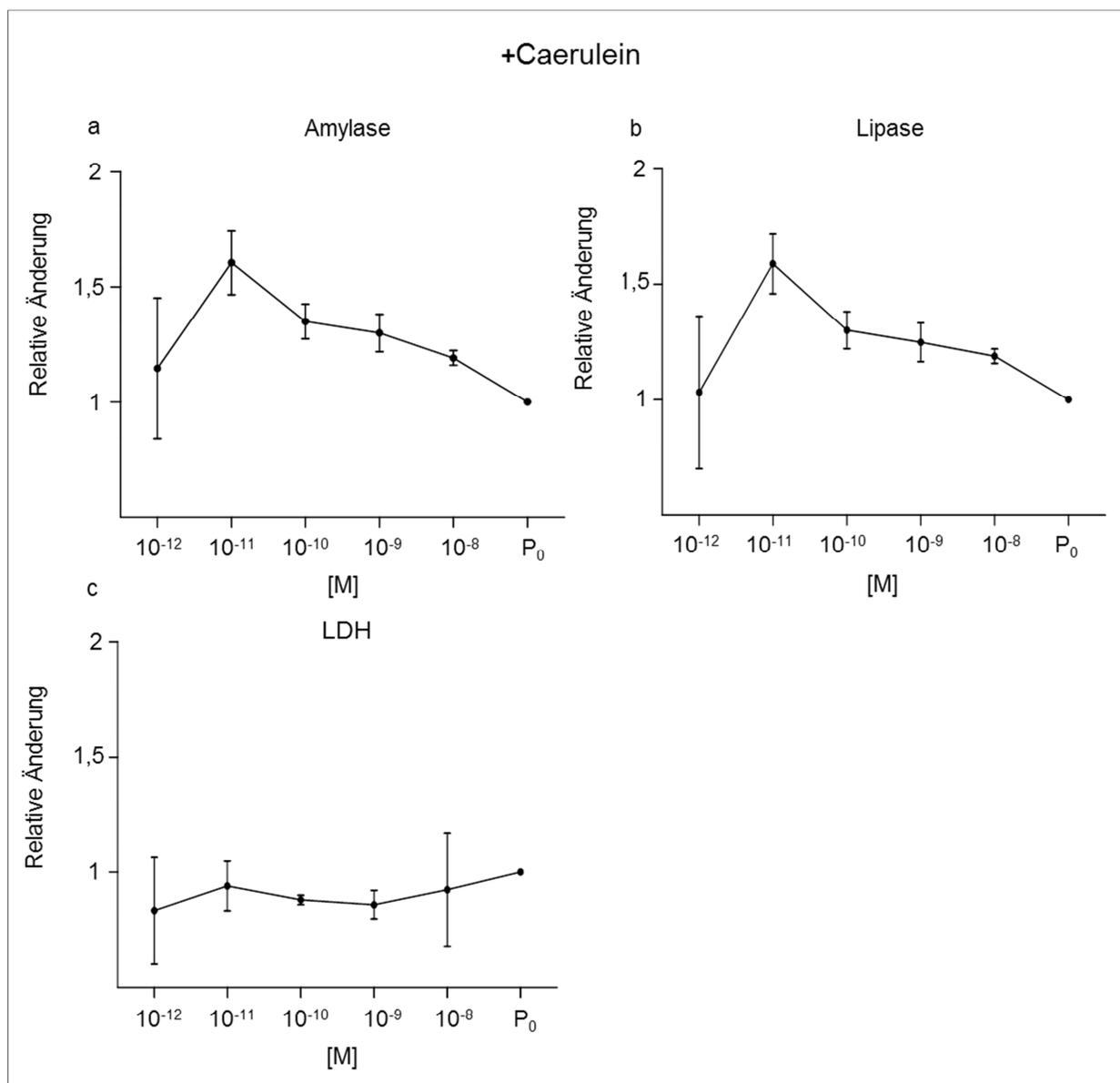


Abb.2: Messung der Amylase-, Lipase- und LDH-Aktivität im Zellmedium

(a/b) Biphasischer Verlauf mit Sekretionsinhibition bei supraphysiologischen Konzentrationen. **(c)** Kein Nachweis erhöhter LDH-Freisetzung nach 30-min Inkubation mit Caerulein. (P_0 = Kontroll-Proben, entnommen bei Behandlungsbeginn, Enzymkonzentrationsmessung in u/ml, Darstellung als ein Vielfaches von P_0).

IV.1.2.2 Caerulein induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine

Ein weiterer Aspekt der funktionellen Evaluation des Epithelzell-Isolates stellt die Untersuchung von Surrogaten der frühen epithelialen Entzündungsantwort (*Il-6*, *Tnf- α* , *Il-1b*) nach Caerulein-Stimulation dar. Dazu wurden isolierte Epithelzellen für 4h mit Caerulein (1 pM / 100nM) behandelt und die mRNA-Expressionslevel behandelter und unbehandelter Proben mittels qRT-PCR-Analyse verglichen (s. **III.3.2.2** / Primer s. **III.1.3**).

Resultierend zeigte sich eine dosisabhängige Korrelation des Expressionsniveaus von *Tnf- α* , *Il-6* und *Il-1b* (s. **Abb.3**). So zeigte sich ein 2,0x (\pm 0,360) Anstieg von *Il-6* und eine 2,39 x (\pm 1,050) Erhöhung der *Tnf- α* Expression bei 100 nM. Die niedrigere als „physiologisch“ ausgewiesene Dosierung (0,1 nM) bewirkt zwar eine signifikante Steigerung der Enzymsekretion (Amylase=60,6% über Basalaktivität; (s. **Abb.2**), hat aber lediglich geringen Effekt auf die Induktion proinflammatorischer Mediatoren. So zeigte sich eine 1,42 x (\pm 0,168) Erhöhung der Basalexpression für den Nachweis von *Il-6* Transkripten, während eine Expressionsinduktion von *Tnf- α* und *Il-1b* ausblieb. Die Reproduzierbarkeit der dosisabhängigen Caerulein-Dependenz auf die Sekretions- und Sezernierungsaktivität azinärer Zellen lieferte Informationen -über die Reagibilität des Zell-Isolates und bestätigte die funktionelle Verwendbarkeit des Versuchsansatzes für die folgenden Behandlungsversuche mit Typ-I-Interferon.

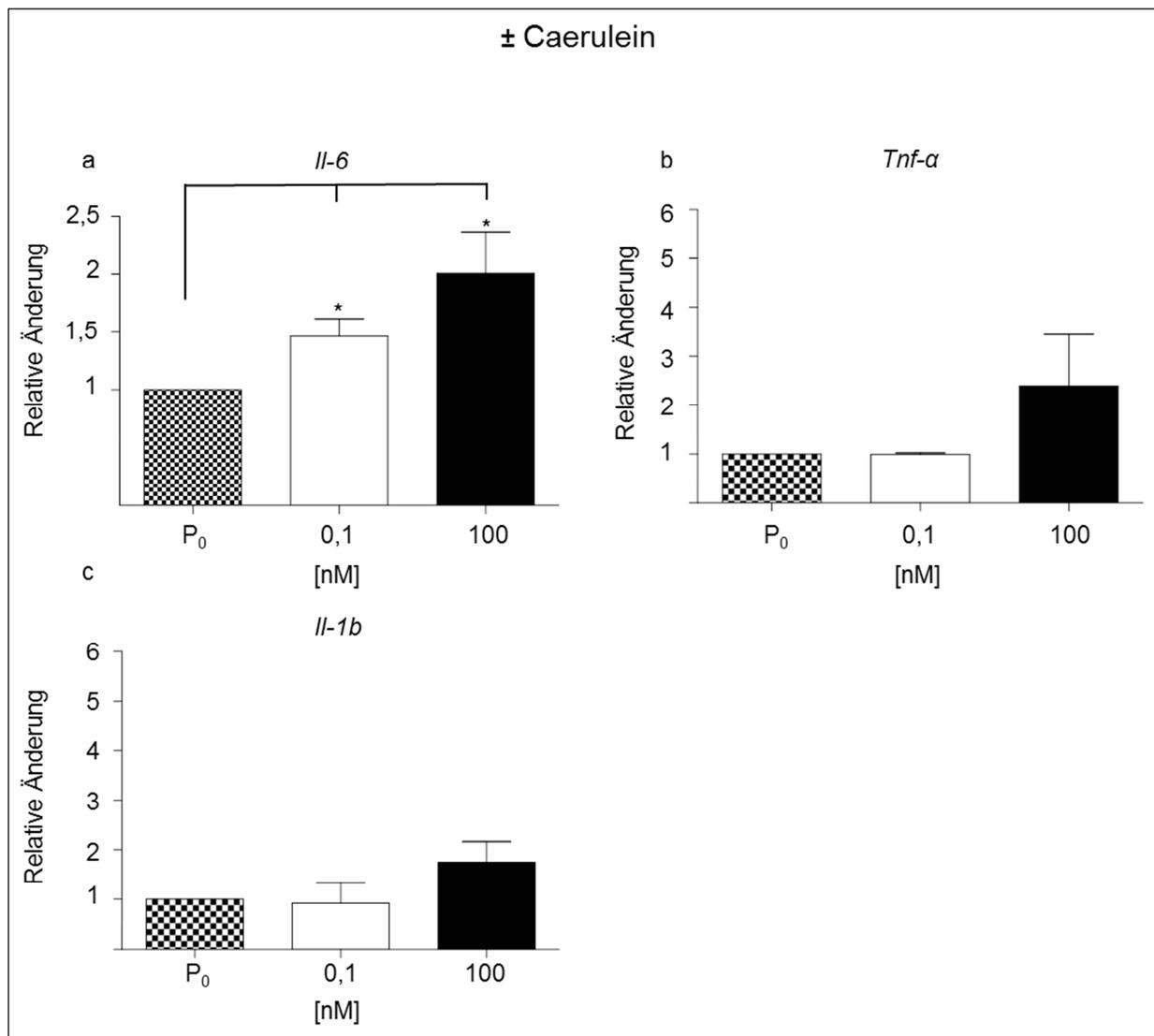


Abb.3: Zytokinexpression epithelialer Zellen nach Caerulein-Stimulation

(a) Signifikanter *Il-6* Expressionsanstieg um 61,3% (100 nM), 41,5% (10 pM). (b) *Tnf-α* Expressionsanstieg um 63% (100 nM). (c) *Il-1b* Expressionsanstieg um 75% (100 nM). (P₀ = Kontroll-Proben entnommen bei Behandlungsbeginn, Darstellung als ein Vielfaches des Expressionsniveaus von P₀, 1 µg cDNA, Einfacher t-Test, *: p<0.05.).

IV.2 Untersuchung pankreatischer Vorläuferzellmarker und die Identifizierung des Oberflächenantigens Sca-1 in Zusammenhang mit Interferon- β

IV.2.1 Interferon- β -induzierte Aktivierung der IFNAR-STAT-Signalkaskade in pankreatischen Epithelzellen

Um die These der Interferon-induzierten Vorläuferzellaktivierung analog den HSC auf pankreatische Epithelzellen anzuwenden und einem prüfenden Ansatz zu unterziehen, mussten zunächst die Existenz und die Aktivierbarkeit des Interferonrezeptor (IFNAR) medierten JAK-Stat 1/2 Signalweges nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Existenz eines epithelialen, durch Interferon getriggerten Aktivierungspfades mit Transkriptionsregulation durch STAT 1/2, wurden dessen Zielgene *Cxcl-10*, *Cxcl-11* in WT- und STAT 1-defizienten Zellen nach Interferon-Stimulation vergleichend quantitativ bestimmt. Des Weiteren wurden die *Il-6* Transkriptionsniveaus bestimmt, um für die folgenden Stimulationsversuche einen möglichen Dosisbereich einzugrenzen, der eine Aktivierung Stress-initiiertes Signaltransduktionswege ausschließt. Dazu wurde das Epithelzell-Isolat von WT und STAT 1^{-/-} Mäusen für 4h mit Interferon- β (1000 u/ml, 500 u/ml, 10 u/ml, 1 u/ml) inkubiert und anschließend eine qRT-PCR Analyse durchgeführt. Resultierend ergab die 4 h-Interferonwirkung eine starke Hochregulation der *Cxcl-10* Transkripte, deren dosisabhängige Vervielfachung eine sigmoidale Annäherung an einen oberen Grenzwert beschreibt, der hier außerhalb der oberen Grenze des Dosispektrums liegt. (s. **Abb.4a**). So steigerte eine Schwellenwertdosis von 10 u/ml die Expression um 3,67 x (\pm 0,498) und die 10-fache Dosis 100 u/ml zeigte einen Anstieg von 56,99 x (\pm 15,162). Der Maximalwert einer 877,49 x Vervielfachung konnte bei der Höchstdosis detektiert werden, unterlag aber einer hohen Variabilität (\pm 502,035). Diese Ergebnisse standen im Gegensatz zu STAT-defizienten Epithelzellen, deren Transkriptlevel für alle eingesetzten Dosen unverändert blieben: 10 u/ml (1,08 x \pm 0,260), 100 u/ml (0,94 x \pm 0,193), 500 u/ml (1,17 x \pm 0,234), 1000 u/ml (1,50 x \pm 0,666). Analog zeigte auch *Cxcl-11* eine dosisabhängige Induktion der Transkription in WT Zellen und ein Ausbleiben der Aktivierung in STAT-defizienten Zellen. Dabei steigerte 1000 u/ml die Transkription um das 139,33 x (\pm 79,831), während in STAT 1^{-/-} Zellen keine signifikante Transkriptionsinduktion zu detektieren war (1,78 x \pm 0,731). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass steigende Dosen auch eine mitreaktive Expression des NF- κ B abhängigen Zytokin *Il-6* bewirken. (s. **Abb.4b**). Diese trat signifikant in Erscheinung bei der eingesetzten Höchstdosis (3,22 x \pm 0,286), während der Wirkungsbereich von 1

u/ml bis 100 u/ml keinen induktiven Effekt aufwies: 1 u/ml ($0,55 \pm 0,186$) bis 100 u/ml ($0,94 \pm 0,186$).

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Interferon-STAT1/2-vermittelte Transduktion auch in epithelialen Zellen aktivierbar ist und eine Interferon-Konzentration von 100 u/ml effektiv Einfluss auf die Genregulation hat, ohne begleitend eine Hochregulation proinflammatorischer Zytokine zu bewirken. In den folgenden Versuchen wurde daher 100 u/ml als obere Zieldosis verwendet.

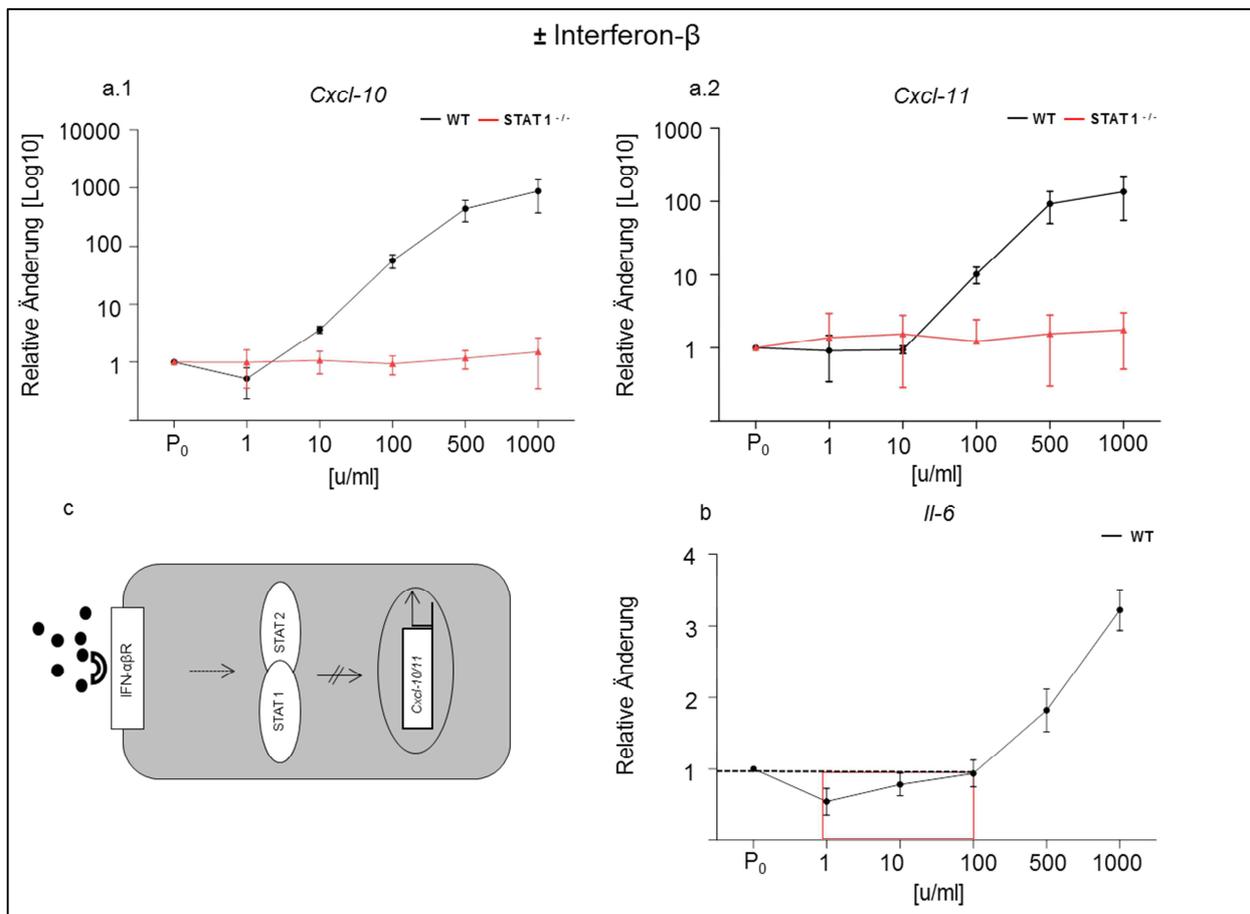


Abb.4: Zytokin- und Chemokin-Expression in Zellen von WT- und STAT 1^{-/-}-Mäusen nach Interferon-Einwirkung

(a.1/a.2) *Cxcl-10* / *Cxcl-11* Transkript-Level in WT und STAT1^{-/-}. **(b)** *Il-6* Expression in WT Epithelzellen. **(c)** Schematische Darstellung der *Cxcl-10* / *Cxcl-11* Induktion durch Aktivierung des IFNAR-JAK-STAT 1/2 Signalweges (vereinfacht). (P₀ = Kontroll-Proben entnommen bei Versuchsbeginn, Darstellung als ein Vielfaches des Expressionsniveaus von P₀, 1 µg cDNA).

IV.2.2 Sca-1 und die Expression weiterer Vorläuferzellmarker im primären Epithelzell-Isolat

Der folgende Versuch diente nun der Untersuchung des Zusammenhanges von Interferon- β und dem Expressionsverhalten von Sca-1 und anderen etablierten Vorläuferzellmarkern (Aldh1a1, Ptf1a, Pdx1, C-kit, C-met, Nestin) im pankreatischen Epithelzell-Isolat. Dazu wurden Epithelzell-Isolate von WT / IFNAR^{-/-} / STAT 1^{-/-} Mäusen für 3 Tage mit Interferon behandelt (100 u/ml, 1 u/ml) und eine quantitative Genexpressionsanalyse durchgeführt. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung des zeitlichen Verlaufes für den Dosisbereich von 1 u/ml verzichtet und sich lediglich auf die Darstellung der Dosis-Wirkrelation nach 48h Inkubationszeit beschränkt. Resultierend ließen sich anhand der Expressionsmuster 3 verschiedene Gruppen definieren.

(1) Markergene ohne kulturabhängige Expressionsinduktion: Keine Kultur assoziierte Zunahme konnten für *Nestin*, *C-met*, Transkripte des *Ptf1a*-Komplexes und Partizipatoren des Notch-Signalweges nachgewiesen werden (s. **Abb.5**). *Nestin* zeigte sogar eine Abnahme der Expression um 0,68 x (\pm 0,148) nach 24h und 0,641 x (\pm 0,173) nach 72h, verglichen mit dem basalen Expressionsniveau. *C-met* zeigte unter Berücksichtigung der Streuung im Verlauf von 48h - 72h eine stabile Expression 1,78 x (\pm 0,876) nach 48h und 1,35 x (\pm 0,313) nach 72h. *Ptf1a* zeigte einen Anstieg um 3,32 x (\pm 1,122) der Expression der Basalwerte nach 24h, allerdings ohne stabilen Nachweis im Zeitfenster von 3 Tagen. 2,06 x (\pm 1,613) nach 48h und 0,88 x (\pm 0,216) am Tag der Auswertung (72h). Auch hier zeigte sich keine signifikante Änderung der untersuchten Gentranskription unter Einfluss der Interferon-Behandlung.

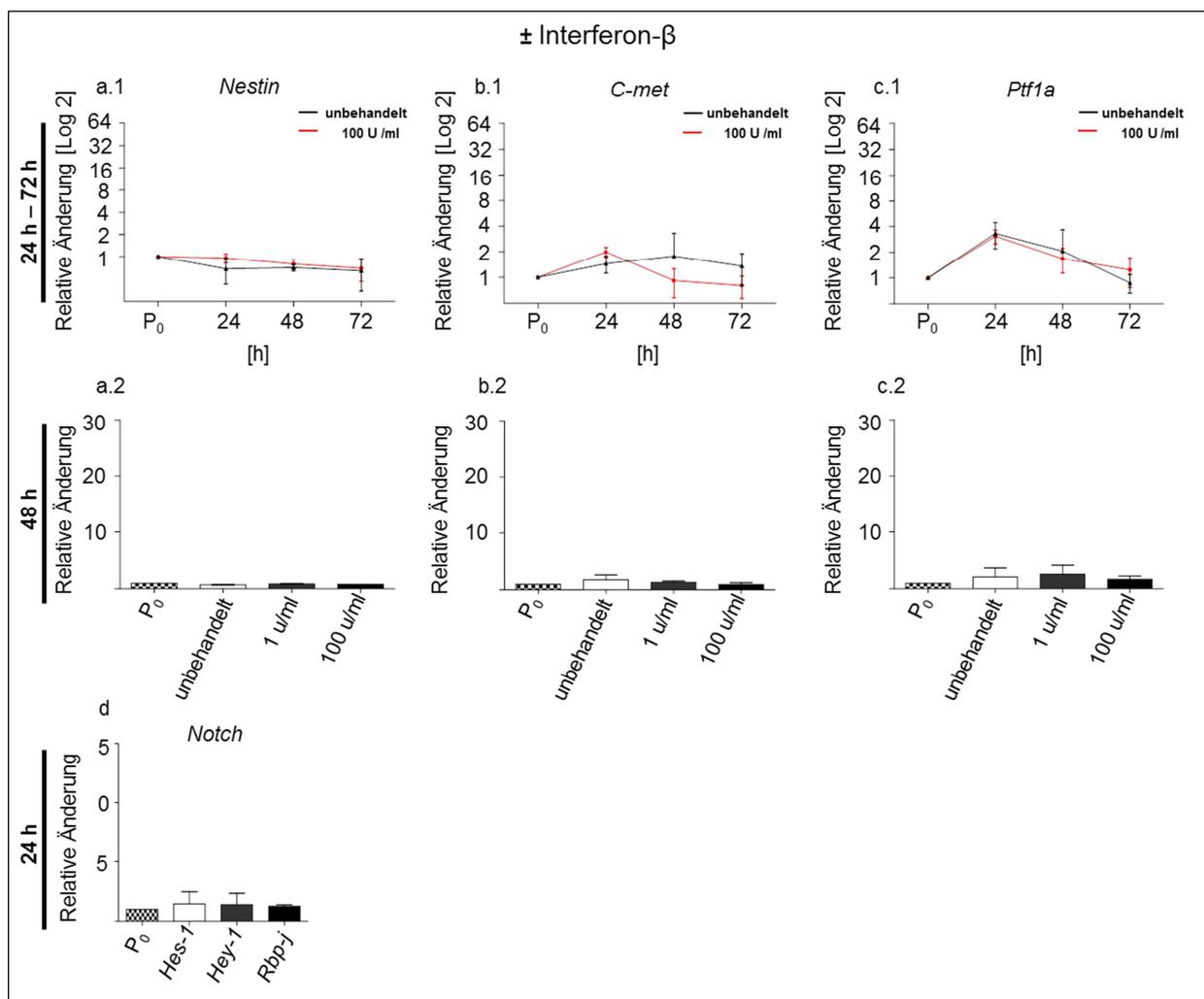


Abb.5: Vorläuferzellmarker ohne Interferon- oder Kulturabhängige Signalamplifizierung (a.1/b.1/c.1) Nestin, C-met und Ptf1a Expressionsprofile aus WT-Zellen mit gleichbleibendem Expressionsniveau in Kulturumgebung ± Interferon (100 u/ml). (a.2/b.2/c.2) Darstellung der Transkripte nach 48h unter Einfluss von Interferon (1 u/ml, 100 u/ml). (d) Mediatoren des Notch-Pathway nach 24h Interferon-Behandlung mit 100 u/ml ohne signifikante Erhöhung der Genaktivität. (P₀ = Kontroll-Proben entnommen bei Versuchsbeginn, Darstellung als ein Vielfaches des Expressionsniveaus von P₀. 1 µg cDNA).

(2) Markergene mit kulturabhängiger Expressionsinduktion: 4 von 7 der hier dargestellten Vorläuferzellmarkern hingegen wiesen eine kulturabhängige Induktion der Genexpression auf. So zeigte sich ein signifikanter Anstieg der *Aldh1a1* Expression 24h nach Beginn der Beobachtung ($6,41 \times \pm 2,427$) (s. **Abb.6a.1**) und von $20,34 \times (\pm 6,034)$ nach 48h (s. **Abb.6a.1+a.2**). Nach 3 Tagen Kultivierung steigerte sich die gemessene Genaktivität auf das $20,48 \times$ der Basalexpression, allerdings unter Auftreten einer hohen Variabilität ($\pm 15,289$). Es konnte für keine der applizierten Interferon-Konzentrationen eine zusätzliche signifikante Induktion der *Aldh1a1*-Transkription nachgewiesen werden. *C-kit* betreffend konnte ebenfalls

Ergebnisse

eine kulturabhängige Signalvermehrung innerhalb des epithelialen Isolates detektiert werden. So stiegen die Amplifikate um das 7,84 x ($\pm 1,810$) des Ausgangswertes nach 48h Inkubation und um das 12,49 x ($\pm 5,588$) nach 3 Tagen. Ein Ansprechen auf die Interferon-Inkubation konnte auch hier nicht eruiert werden 7,84 x ($\pm 1,809$) unbehandelt, vs 7,35 x ($\pm 0,669$) IFN 100 u/ml. *Pdx1* Transkripte zeigten im Inkubationsverlauf eine milde Induktion der Genexpression durch einen 5,36 x ($\pm 2,061$) Anstieg nach einem Tag und 5,07 x ($\pm 1,981$) nach 48h ohne nachweisbare Interferon-Dependenz. Auffällig war die hohe Variabilität der Expressionswerte für manche der untersuchen Transkripte nach 72h Inkubation [*Aldh1a1* 20,48 x ($\pm 15,289$) / c -Kit 12,50 x ($\pm 5,58$)]. Dies könnte auf den durch die Dauer der Kultivierung bedingten Integritätsverlust der Zellen zurückzuführen sein und lässt sich als nicht vorhersehbare, ungeordnet verlaufende Folgen auf die Funktionszustände bzw. Vitalität der untersuchten Zellen interpretieren.

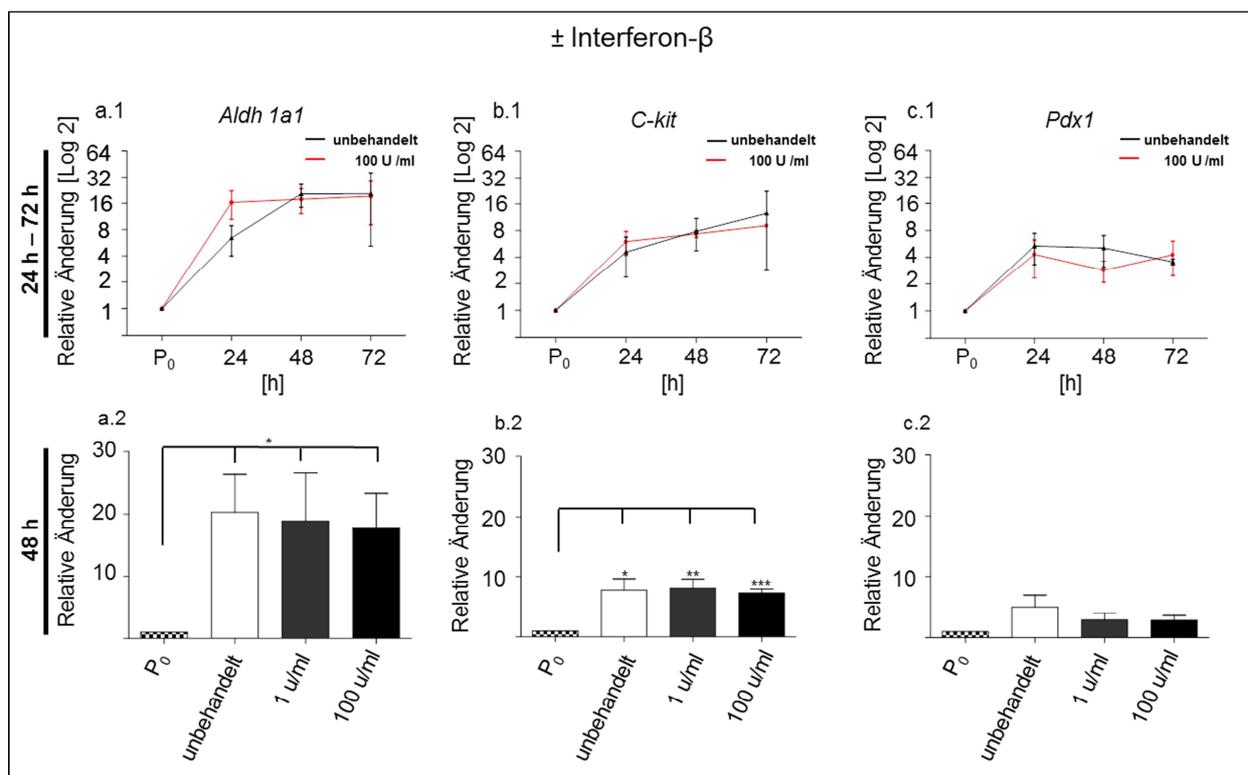


Abb.6: Vorläuferzellmarker mit Kulturabhängiger-Signalamplifizierung während einer dreitägigen Kultivierungszeit

(a.1/b.1/c.1) *Aldh1a1*, *C-kit* und *Pdx1*, untersucht in WT-Zellen, zeigen eine Interferon unabhängige, kulturassozierte Expressionsinduktion. (a.2/b.2/c.2). (P₀ = Kontroll-Proben entnommen bei Versuchsbeginn, Darstellung als ein Vielfaches des Expressionsniveaus von P₀. 1 µg cDNA. Einfacher t-Test, *: p<0.05; **: p<0.01, ***: p<0.001)

(3) Sca-1 Markertranskript mit Anreicherung durch die Kultivierung und während der Behandlung mit Interferon- β : Anders als bei den oben genannten verhielt es sich für Sca-1 Amplifikate. Sca-1 Transkripte wiesen zum Zeitpunkt der Probenerhebungen einen Anstieg an Tag 2 ($4,04 \times \pm 2,743$) und Tag 3 ($4,45 \times \pm 2,200$) / ($3,2 \times$, $P=0,0366$; Mittelwert über 3 Tage) in WT-Proben auf. Hohe Dosen Interferon zeigten eine darüber hinausgehende Induktion der Sca-1 Expression im Vergleich zu dem Zellkollektiv, das mit NaCl behandelt wurde (in **Abb.7** als unbehandelt ausgewiesen) ($6,6 \times$, $P= 0,0421$; 24h) / ($3,4 \times$, $P=0,0283$; Mittelwert über 3 Tage) (s. **Abb.7a**). Zur Überprüfung ob die Interferon abhängige Sca-1 Induktion dabei von dem Regulator Protein STAT 1 vermittelt wird, wurden Zell-Isolate von STAT 1^{-/-} Mäusen (s. **III.1.5**) in den Versuchsansatz integriert. Analog ließ sich auch bei diesen Zellen, die zwar über eine intakte Rezeptorfunktion verfügen aber kein funktionsfähiges STAT 1-Protein exprimierten, eine kulturabhängige Induktion der Sca-1 Expression ($12,7 \times$, $P= 0,0001$; Mittelwert aus 3 Tagen) sowie ein zusätzlicher Anstieg im Kollektiv der Interferon-Behandlung (100 u/ml) im Vergleich zu der Kontrollgruppe feststellen ($3,8 \times$, $P= 0,0029$; 24h) (s. **Abb.7b**). Dies lässt den Schluss zu, dass auch andere regulatorische Faktoren die Sca-1 Transkription bedingen.

In den anschließend untersuchten Kollektiven mit nicht funktionalem IFNAR-Rezeptor (s. **III.1.5**) zeigte sich hingegen keine Interferon-abhängige Sca-1 Amplifizierung. Es bestand kein Unterschied von behandelten (100 u/ml) und unbehandelten Zellproben: Nach 24h Inkubation in der IFNAR^{-/-} Gruppe $3,78 \times$ (Mean, SEM $\pm 3,743$). Auch an Tag 2 und Tag 3 ließ sich keine Expressionsinduktion feststellen und so belief sich der Unterschied im Vergleich zu Kulturbeginn auf $3,17 \times$ (Mean, SEM $\pm 6,414$) nach 48h und $-7,23 \times$ (Mean,SEM $\pm 5,718$) nach 3 Tagen Inkubationszeit (s. **Abb.7c**).

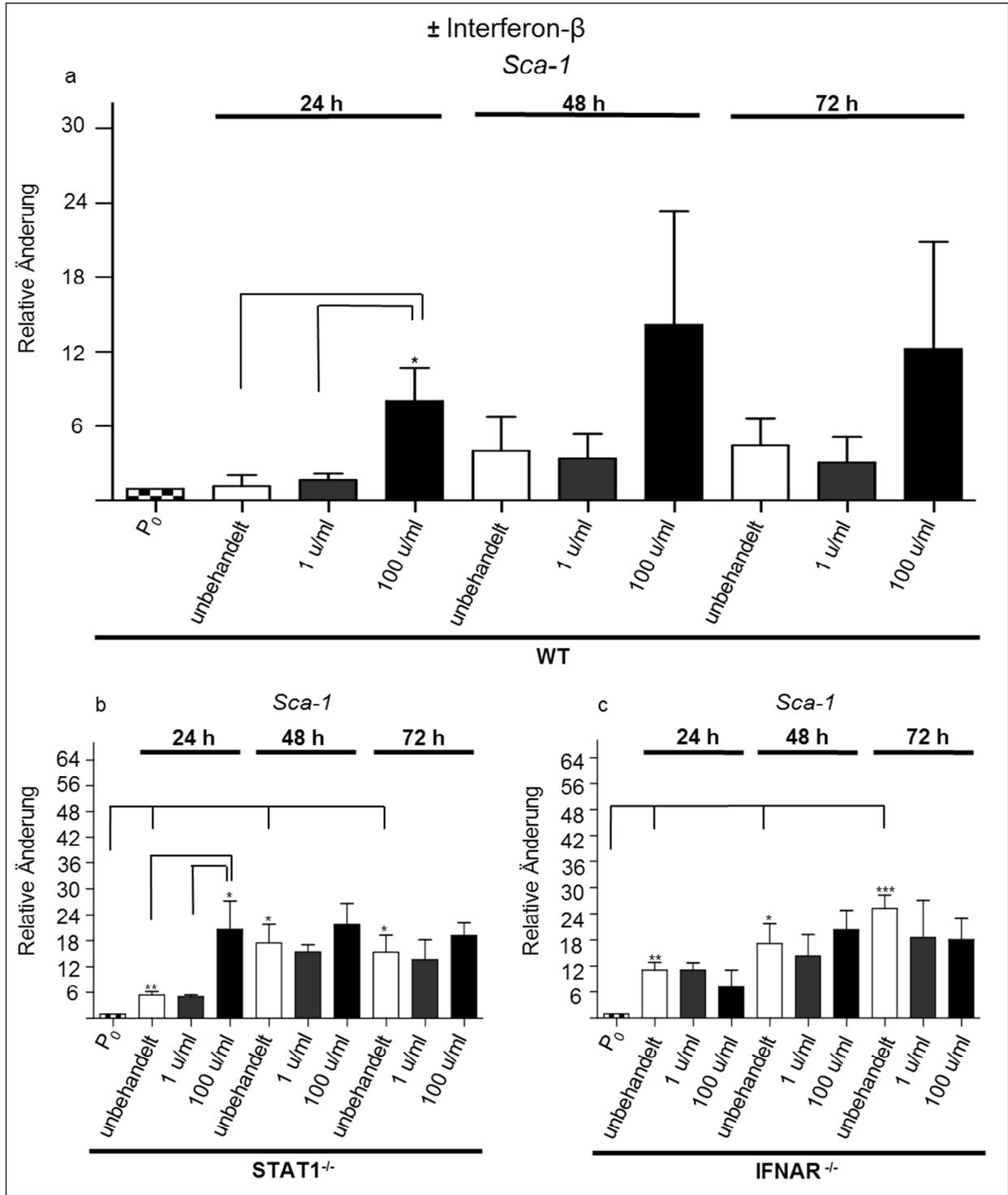


Abb.7: Sca-1 Markertranskripte zeigen einen Interferon-induzierten Anstieg in Epithelzellen mit suffizienter IFNAR-JAK-STAT-Signaltransduktion

(a) Anstieg der Sca-1 Transkripte im Verlauf der Kultivierung und nach Interferon-Behandlung gegenüber unbehandelten Populationen derselben Inkubationszeit ($6.83 \times \pm 3.177$ (24h)). (b) Signifikante Erhöhung der Sca-1 Transkripte in STAT1^{-/-} Populationen durch Kultivierung und nach Interferon-Behandlung gegenüber unbehandelten Populationen derselben Inkubationszeit ($15.20 \times \pm 6.714$ (24h)). (c) Signifikante Erhöhung der Sca-1 Transkripte in IFNAR^{-/-} Populationen durch Kultivierung ohne detektierbare Sensitivität auf Interferon-Stimulation. (P₀ = Kontroll-Proben entnommen bei Versuchsbeginn, Darstellung als ein Vielfaches des Expressionsniveaus von P₀, 1 µg cDNA. Einfacher t-Test, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

IV.2.3 Qualitative Untersuchung primärer Stromazellen

Um das Expressionsverhalten von Sca-1 im epithelialen Kompartiment in Interaktion mit stromalen Zellen zu untersuchen, wie sie bei regenerativen Prozessen beschrieben sind, wurde eine Co-Kultur-Versuchsreihe aus Primärzellen etabliert. Dazu wurden zunächst über eine Modifikation des Isolationsprotokolles für epitheliale Zellen stromale Zellen gewonnen, kultiviert und einer Vorratsbank zugeführt (s. **III.3.2.2**). Zur Überprüfung, dass es sich bei dem Isolat auch um die gewünschten Zellen stromaler Herkunft handelt, wurden in Vorbereitung nach diesem Algorithmus extrahierte Zellen qualitativ charakterisiert. Bildmorphologisch stellten sich die Zellen zu Beginn der Kultivierung Fibroblasten-typisch mit gestrecktem Zellkörper mit Fortsätzen und spindelförmigen-Kernen dar (s. **Abb.8b li. ob.**) Einzelne Kolonien schlossen sich fortlaufend zu größeren Zellverbänden und mit zunehmender Dichte zunächst zu einer strangförmigen und bei hohem Konfluenzgrad (> 95%) zu einer mosaikförmigen geschlossenen Zellpopulation zusammen (s. **Abb.8b re. unt.**). Als interner Standard wurde ein Konfluenzgrad von 90% definiert bis die Zellen der Vorratsbank zugeführt wurden. Dies war bei einer mittleren Kulturzeit von $t_{\text{Kultur}} = 17,78$ Tagen erreicht. Zellen exprimierten über den Messzeitraum (14-22 Tage) stabil mesenchymale Marker ($\alpha\text{-sma}^+$, Vim^+) und wiesen zu diesem Zeitpunkt keine Kontamination von Zellen azinären Ursprungs mehr auf (Amy^-) (s. **Abb.8a**).

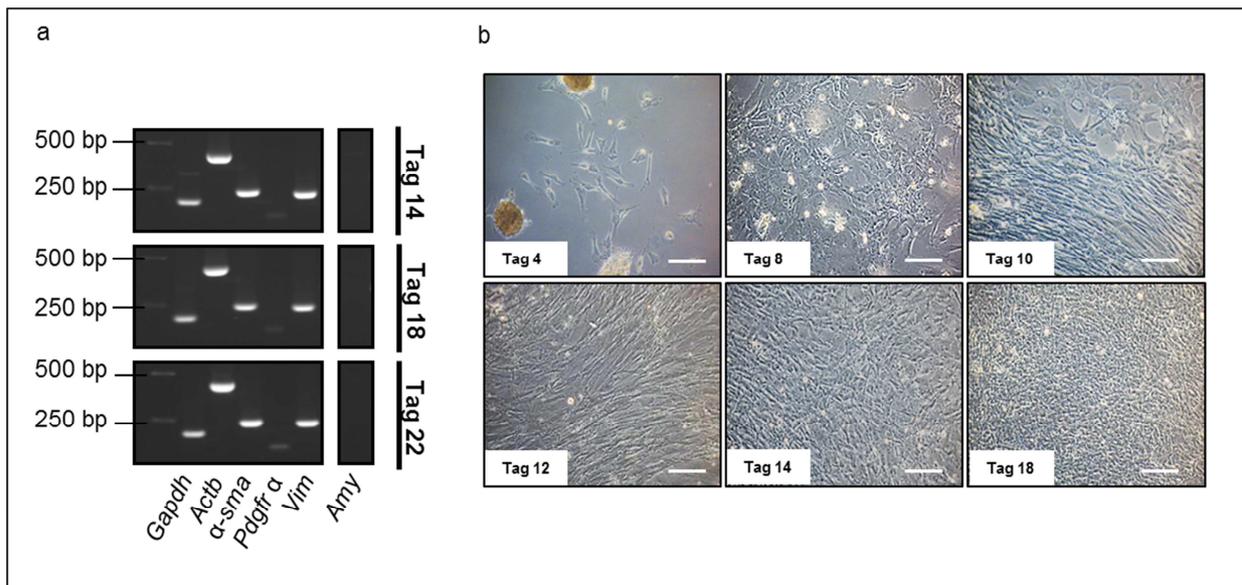


Abb.8: mRNA-Transkriptionsprofil und mikroskopische Dokumentation des Kulturverlaufes primärer Stromazellen

(a) Zellen exprimieren mesenchymale Marker (α -sma⁺, Vim⁺), ohne Nachweis für azinäre Markertranskripte (Amy) im Verlauf von 14-22 Tagen. (α -sma, Pdgfr α , Vim, Amy, Housekeeping-Gen: Gapdh, Actb) / 40Zykl. / 1 μ g cDNA. (b) Stromale Zellen mit adhären Azini 1 Tag nach Entfernung der Suspensions-Zellen (li. ob. Bild). Expandierendes Wachstum stromaler Zellen im Zeitverlauf von 16 Tagen. Maßstab: 50 μ m

IV.2.4 Kultur- und Interferon- β -abhängige Induktion der *Sca-1* Expression primärer Epithelzellen in Co-Kultivierung mit primären Stromazellen

Für die Versuchsreihe in Co-Kultur wurden eine definierte Menge Stromazellen über eine Flüssigkeits-permeable Membran in Verbindung mit epithelialen Zellen gesetzt. Dieses System wurde so gewählt, dass ein Stoffaustausch über das Medium zwischen den Populationen möglich, ein direkter Zell-Zell-Kontakt über die Poren der Membran jedoch inhibiert wurde. Stromale Zellen verfügten zu Versuchsbeginn über eine Konfluenz von ~70%, die zuvor in Vorversuchen ermittelt wurde und nahmen den unteren Bereich der Kammer ein, während das ein Tag zuvor generierte epitheliale Isolat oben lokalisiert wurde (s. III.2.3). Untersucht wurden *Sca-1* Amplifikate nach 72h Kultivierungszeit mit und ohne zusätzliche Interferon-Behandlung. Kongruent zu den Ergebnissen in (IV.2.2) stieg die *Sca-1* Expression auch in den Mono-Kultur-Kontrollgruppen in einem vergleichsweise ähnlichen Ausmaß im Zeitverlauf der Kultivierung ($3,3 \times \pm 1,007$). Auch die epithelialen Zellen der Co-Kultur wiesen eine Expressionsinduktion auf. Interessant ist, dass in den epithelialen Zellen, die mit stromalen Zellen in Co-Kultur inkubiert wurden dabei eine um näherungsweise Faktor 2 gesteigerte Expressionsrate im Vergleich zu den Mono-Kultur Kontrollen vorlag ($7 \times$ versus $3,3 \times$, $P =$

0,025 im unbehandelten Kollektiv, 15,5 x versus 7,6 x , P = 0,0869 im behandelten Kollektiv). Eine zusätzliche Interferon-Behandlung (100 u/ml) bewirkte ebenfalls ein darüber hinaus erhöhtes *Sca-I*- mRNA-Transkript-Niveau in den Mono-/ sowie Co-Kultur Ansätzen, wie schon in dem Zeitverlauf der vorigen Versuchsreihe (s. **IV.2.2**) festgestellt werden konnte. Eine zusätzliche Interferon-Behandlung in Co-Kultur aktivierte die Expression dabei 2,23 x ±1,690 stärker als der vergleichende Ansatz ohne Behandlung (s. **Abb.9**). Auch Stromazellen wiesen detektierbare Level von *Sca-I*-mRNA auf. Dessen Expression zeigte sich allerdings weder durch die Co-Kultur noch die Interferon-Behandlung als induzierbar, sondern in beiden Ansätzen herabreguliert bzw. unverändert. Bei Betrachtung der Daten aus (**IV.2.2**) und (**IV.2.4**) lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die *Sca-I* Genexpression in Suspensionskultur induzierbar ist und Interferon in hohen Dosierungen (100 u/ml) dabei als weiterer Amplifikator der Expression zu bewerten ist (s. **Abb.9b**)

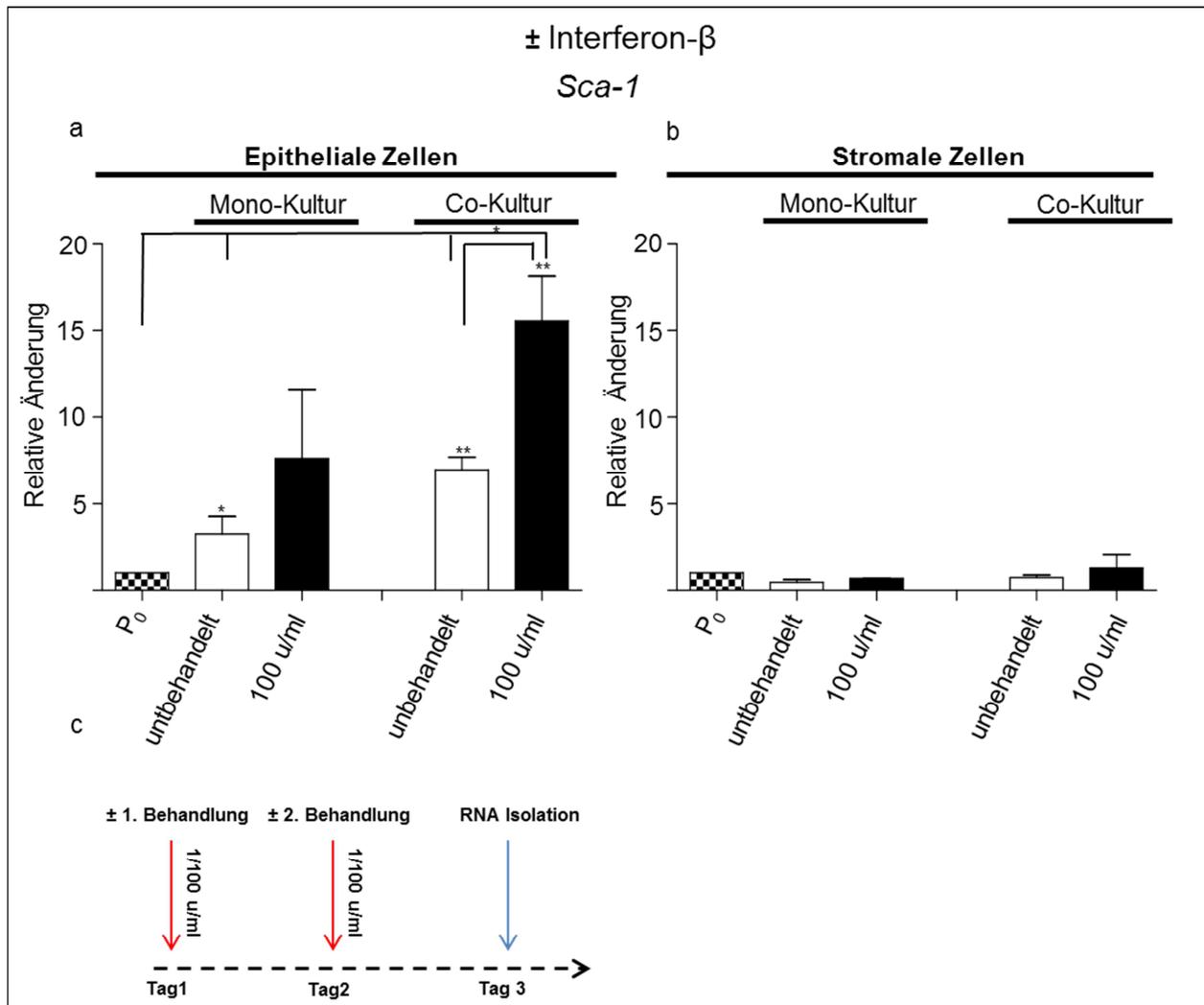


Abb.9: *Sca-1* Signalamplifizierung in Co-Kultivierung mit primären Stromazellen \pm Interferon

(a) WT-Epithelzellen zeigen einen signifikanten Expressionsanstieg in Co-Kultur verglichen mit den isoliert inkubierten Proben ($2,13 \times \pm 0,870$). Eine zusätzliche Interferon-Behandlung in Co-Kultur aktivierte die Expression dabei $2,23 \times \pm 1,690$ stärker als ohne Behandlung. (b) RNA-Proben der Stromazellen ergaben keine Kultur- oder Interferon-abhängige Änderung der *Sca-1* Transkripte. (P_0 = Kontroll-Proben entnommen bei Versuchsbeginn, Darstellung als ein Vielfaches des Expressionsniveaus von P_0 , 1 μ g cDNA. Einfacher t-Test, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$). (c) Schematische Darstellung des Interferon-Behandlungsansatzes.

IV.3 Charakterisierung der Sca-1⁺ Subpopulation

IV.3.1 Separation der Sca-1⁺ Subpopulation aus dem Epithelzell-Isolat

Zur Quantifizierung und weiterführenden Charakterisierung Sca-1 exprimierender Zellen wurde eine FACS Analyse des verwendeten Epithelzell-Isolates durchgeführt (s. **III.2.1** / **III.4.2.2**) und anschließend die Zellpopulation, die das Sca-1 Antigen an ihrer Oberfläche trägt von der übrigen Population separiert.

Die dazu eingesetzten gegen Sca-1 gerichteten Primär- und Sekundär-Antikörper sind der Tabelle (s. **III.1.3**) zu entnehmen, ebenso wie die eingesetzte Konfiguration zur Detektion und Diskrimination der Population (s. **III.4.2.2.3**). Epitheliale Zellen wurden 24h vor Facs Sortierung extrahiert und im Brutschrank inkubiert. Bei der Sortierung wurde weiter differenziert zwischen vereinzelt Zellen, die das Sca-1⁺-Antigen exprimieren und solchen bei denen das Antigen detektiert wurde, die darüber hinaus aber noch mit einer weiteren Zelle mit unbekanntem Sca-1 Status über Bindegewebsbrücken oder Zell-Zell-Kontakten in Verbindung stehen (Doubletten) (s. **Abb.10a**). Interessanterweise fiel der Anteil Sca-1 tragender Zellen gemessen an der Gesamtzellpopulation nur gering aus. Resultierend stellte sich eine distinkte Population mit einem Anteil von 2,97% an der Gesamtmasse lebender Zellen dar, der sich in etwa gleich großen Anteilen aus 1,46 (\pm 0,11) Einzelzellen, und 1,51 (\pm 0,16) Doubletten zusammensetzte (s. **Abb.10a+b**). Dieser Anteil unterlag auch nach mehrmaliger Wiederholung keinen größeren Schwankungen, sondern erwies sich als stabil replizierend nachweisbar. Im Folgenden konnte die so separierte Population zur weiteren Beschreibung kultiviert werden. So gewonnene Zellen in Suspension stellten sich kleiner und mit einem höheren Kern-Zytoplasma-Verhältnis dar, als das Gros der Zellen in der übrigen Population.

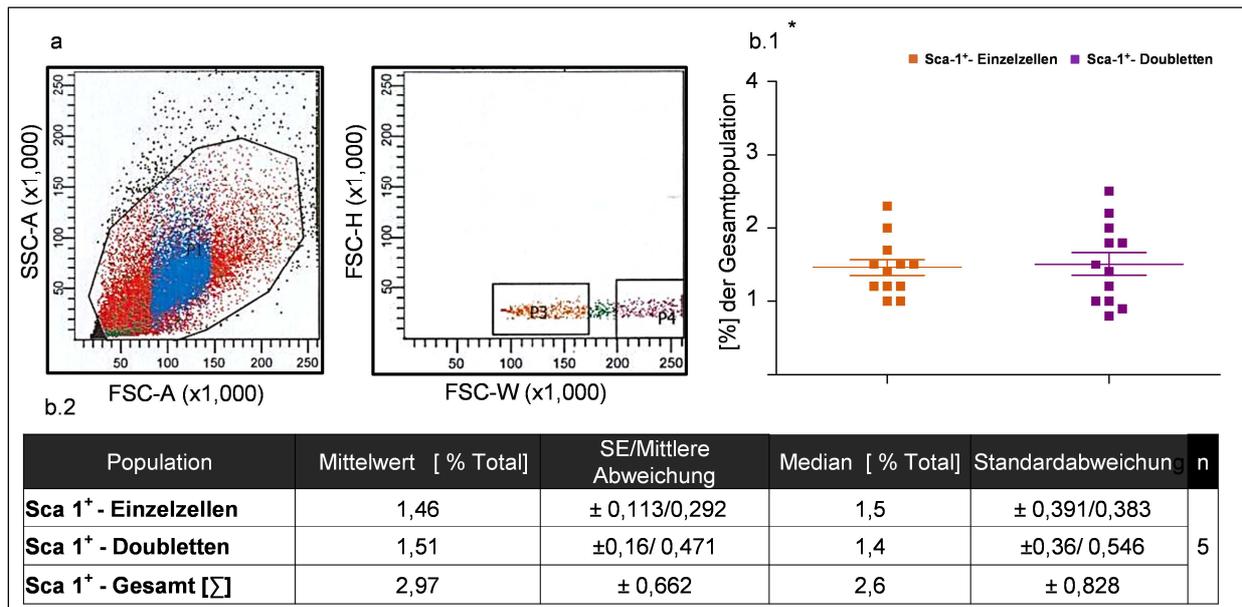


Abb.10: Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von Sca-1⁺ Zellen aus dem primären Epithelzell-Isolat

(a) Diskrimination aller fragmentierten und toten Zellen durch Propidiumiodid (P1) (li. ob.). Darstellung der Sca-1⁺ Zählereignisse mit Diskrimination in Einzelzellen (P3) und Doubletten (P4) (re. ob.). (b.1/2) zeigt eine spezifische Population mit Expression von Sca-1 Oberflächenmarkern, bestehend aus 1,46% Sca-1⁺ Einzelzellen und 1,50% Sca-1⁺ Doubletten. Darstellung im Verhältnis zu der Gesamtpopulation. *: Jeder Punkt entspricht einem getrennten Behandlungsansatz mit Zellmaterial mehrerer Mäuse (Gruppe), die in an gleichen Tagen sortiert wurden (s. n-Werte).

IV.3.2. Kultur-abhängige Zunahme der Sca-1⁺ Expression und Einfluss von Interferon-β auf die Größe der Population

In analoger Weise, wie schon zuvor auf Ebene des Expressionsniveaus als Surrogat für eine *Sca-1* Signalanreicherung festgestellt werden konnte, führte eine verlängerte Kultivierungszeit auch zu einer erhöhten Rate von Zählereignissen mit Sca-1 Diskrimination. Für diese Test-Sequenzen wurde die Kultivierungszeit von 24h auf 48h verlängert, bevor sie mittels Facs sortiert wurden. Innerhalb dieser weiteren 24h in Kultur stieg der Anteil Sca-1 exprimierender Zellen dabei von 1,5% ± 0,11 auf 2,9% ± 0,42, P = 0,0014 gemessen an der Gesamtzahl lebender Zellen (s. **Abb.11a**). Mechanistisch kommt hierbei am wahrscheinlichsten eine Schwellenwert-überschreitende Signalamplifizierung durch vermehrte Expression des Sca-1 Antigens an der Zelloberfläche in Frage. Eine zusätzliche Interferon-Behandlung, gestaffelt in zwei Einzeldosen von einmal 100 u/ml und einmal 50 u/ml über 48 h, ergab einen nicht signifikanten Anstieg von 2,9% ± 0,46 auf 3,9% ± 0,6, P= 0,112) (s. **Abb.11b.1+b.2**) im Vergleich zu den Kontrollproben zu Versuchsbeginn und kann daher nicht eindeutig als Signalanreicherung gewertet werden.

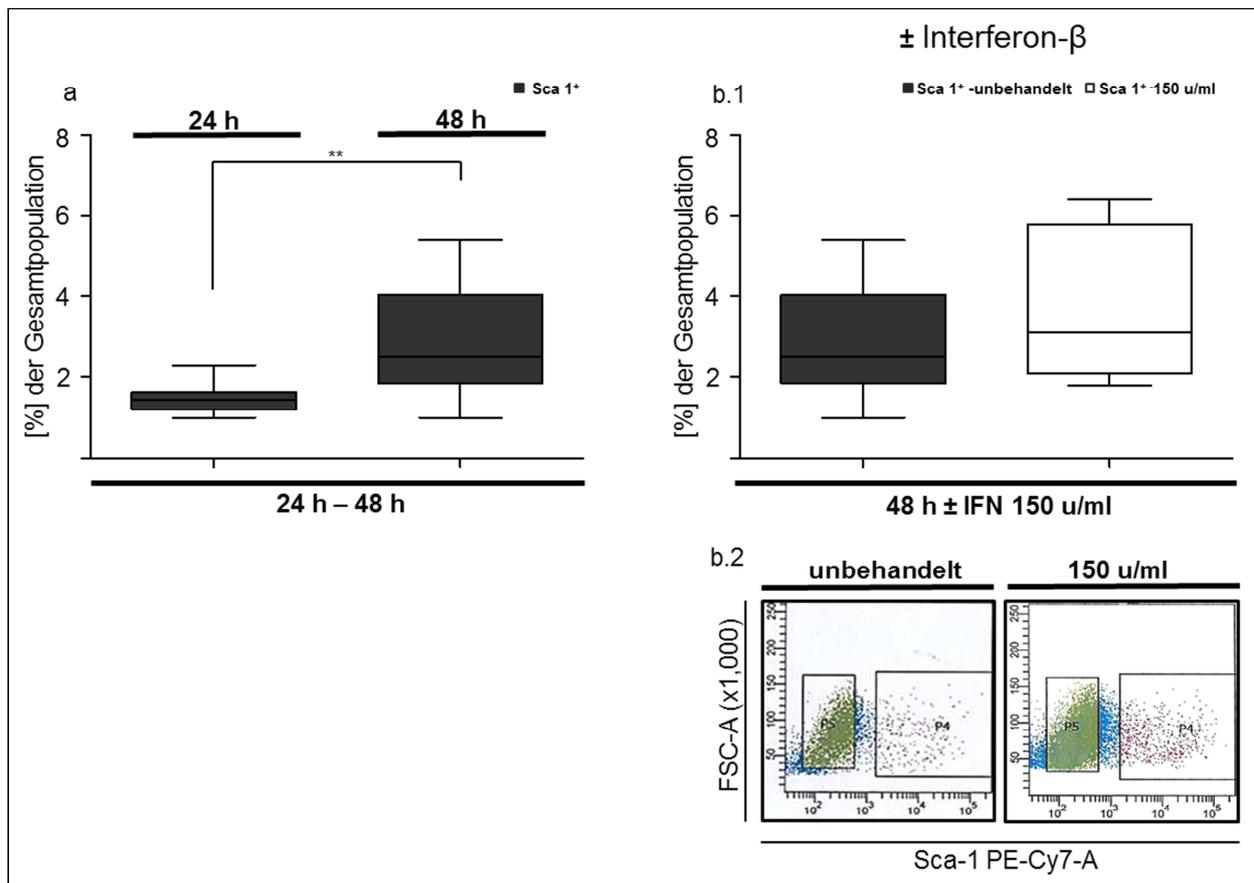


Abb.11: Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von unbehandelten- und mit Interferon präinkubierten Zellen

(a) Der Zellanteil mit Sca-1 Expression innerhalb des Isolates steigt durch Kultivierung von $1.46 \pm 0.113\%$ auf $2.89 \pm 0.462\%$ innerhalb von 24h. (b.1) leichte Zunahme der Zählereignisse Sca-1⁺ Zellen (P4) nach zweimaliger Interferon-Behandlung (insg. 150 u/ml) und 48h Kultivierungszeit (b.2) Repräsentative beispielhafte Darstellung der Sca-1⁺ Populationen in behandelter und unbehandelter Probe. Einfacher t-Test, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

IV.3.3 Fähigkeit zur Bildung primärer Sphären; Einfluss von Interferon auf die Sphärenbildung

Nachdem die Subpopulation Sca-1 tragender Zellen erfolgreich aus dem Gesamtzellexprimat isoliert werden konnte, ermöglichte dies im Folgenden eine selektive Untersuchung der Proliferationsfähigkeit bzw. der Eigenschaft, sich durch klonale Teilung zu replizieren. Um diese Fähigkeit der Selbsterneuerung zu evaluieren, wurde ein Zellsphären-Assay (engl.: Sphere-formation-assay) durchgeführt. Dazu wurden die separierten Zellen nach der FACS-Sortierung für den Transport in PBS anstatt in FBS überführt und anschließend unter Verwendung eines speziellen Progenitor-Mediums (engl.: Serum-free-medium) sowie beschichtetem Zellkultur-Material (Ultra-Low Attachment Plates) zur Adhärenz-Verhinderung

Ergebnisse

kultiviert. Für diesen Ansatz wurden epitheliale Zellen extrahiert, in Sca-1⁺ Einzelzellen, Doubletten und Sca-1⁻ Zellen sortiert und ansatzabhängig in unterschiedlichen Dichten ausgesät (100 Zellen / 1000 Zellen / 2400 Zellen) (s. **III.4.2.2** / **III.4.3**). Bereits nach 3 Tagen konnte lichtmikroskopische Veränderungen in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden. Die das Sca-1 Antigen-tragende (Einzelzellen + Doubletten) Zellkollektive bildeten kugelförmige, die normale Zellgröße überschreitende Zellaggregate mit progredientem Wachstum aus. In ihrer Größe dominierten diese im Vergleich zu dem übrigen Zellbefund das Bild. Innerhalb dieser Strukturen ließen sich Zellgrenzen im Sinne eines Verbandes von morphologisch gleichartigen Zellen ausmachen. In den Sca-1⁻ Zellkollektiven konnte die Anordnung der Zellen in Sphären nur zu einem äußerst geringen Teil nachgewiesen werden und vereinzelte Zellen prägten hier das Bild ohne ersichtliche Proliferationsaktivität oder Größenprogredienz im Zeitverlauf (s.

Abb.12b). 6 Tage nach Versuchsbeginn wurden die Sphären mit einem zur Standardisierung eingesetzten Grenzdurchmesser > 80 µm in allen Fraktionen ausgezählt. Innerhalb des Kollektivs von Sca-1⁺ Einzelzellen zeigte sich bei Wertung aller ausgesäten Dichten ein durchschnittliches Verhältnis von Sphären zu normalen Zellen von (1/424) während im Sca-1⁻ Zellkollektiv lediglich eine Sphäre pro 11.800 gezählten Zellen detektiert werden konnte (1/11.800), P<0,001 (s.

Abb.12a.1). Interessanterweise generierten Sca-1⁺ Doubletten durchschnittlich 9,6 x mehr Sphären als Sca-1⁻ Zellen, aber nur weniger als halb so viele wie in dem Einzelzellkollektiv Sca-1⁺ Zellen nachgewiesen worden sind (1/1128 Zellen), (s.

Abb.12a.1+a.2). Bei Betrachtung dieses Verhältnisses von kultivierten Zellen zu gebildeten Sphären in den eingesetzten Kollektiven zeigt sich ein direktes Abhängigkeitsverhältnis von Sca-1-Oberflächen-Expression und der Fähigkeit Progenitor-typische Zellsphären auszubilden. Daher könnte die Sca-1-Oberflächen-Expression nicht nur ein einzelnes förderndes Kriterium für diese Art der klonalen Teilung darstellen, sondern sogar notwendige Bedingung sein, da Messungenauigkeit, bedingt durch den Versuchsansatz bzw. Unschärfe bei dem Sortierungsprozess nicht auszuschließen ist. Daraus ergab sich im Folgenden die Frage nach dem Stellenwert von Interferon-β auf die Sphärenbildungskapazität, das wie sich in den Vorversuchen bereits herausgestellt hatte (s. **IV.2.2** / **IV.2.4**), ein Amplifikator des Sca-1 Signals darstellt. Entgegen der Erwartung führte eine repetitive Interferon-Behandlung (10, 100, 1000 u/ml, 4 x jeden 2. Tag) nicht zu einer gesteigerten Fähigkeit der Sphärenbildung sondern unterdrückte diese signifikant im Vergleich zu unbehandelten Sca-1⁺ Einzelzellen und Doubletten, in höheren Dosen sogar um mehr als 50% (s.

Abb.12a3). Dieses Ergebnis könnte darauf beruhen, dass bei Anwendung höherer Dosierungen in einem chronischen Ansatz die antiproliferativen Effekte des Interferons überwiegen könnten.

Unter diesen beschriebenen, für Stammzellen definierten Bedingungen in Suspensionskultur ließen sich so gewonnene Sca-1⁺ Zellen über einen längeren Zeitraum am Leben erhalten als das epitheliale Isolat im Vollmedium (s. **III.2.4**) bzw. Sca-1⁻ Zellen unter identischen Bedingungen. So ließen sich die Zellen in dem Verband primärer Sphären über eine chemische Dissoziation (s. **III.2.4.2**) erneut vereinzeln und insgesamt 3 Passagen unterziehen, bis eine Wachstumsstagnation einsetzte (s.

Abb.12c).

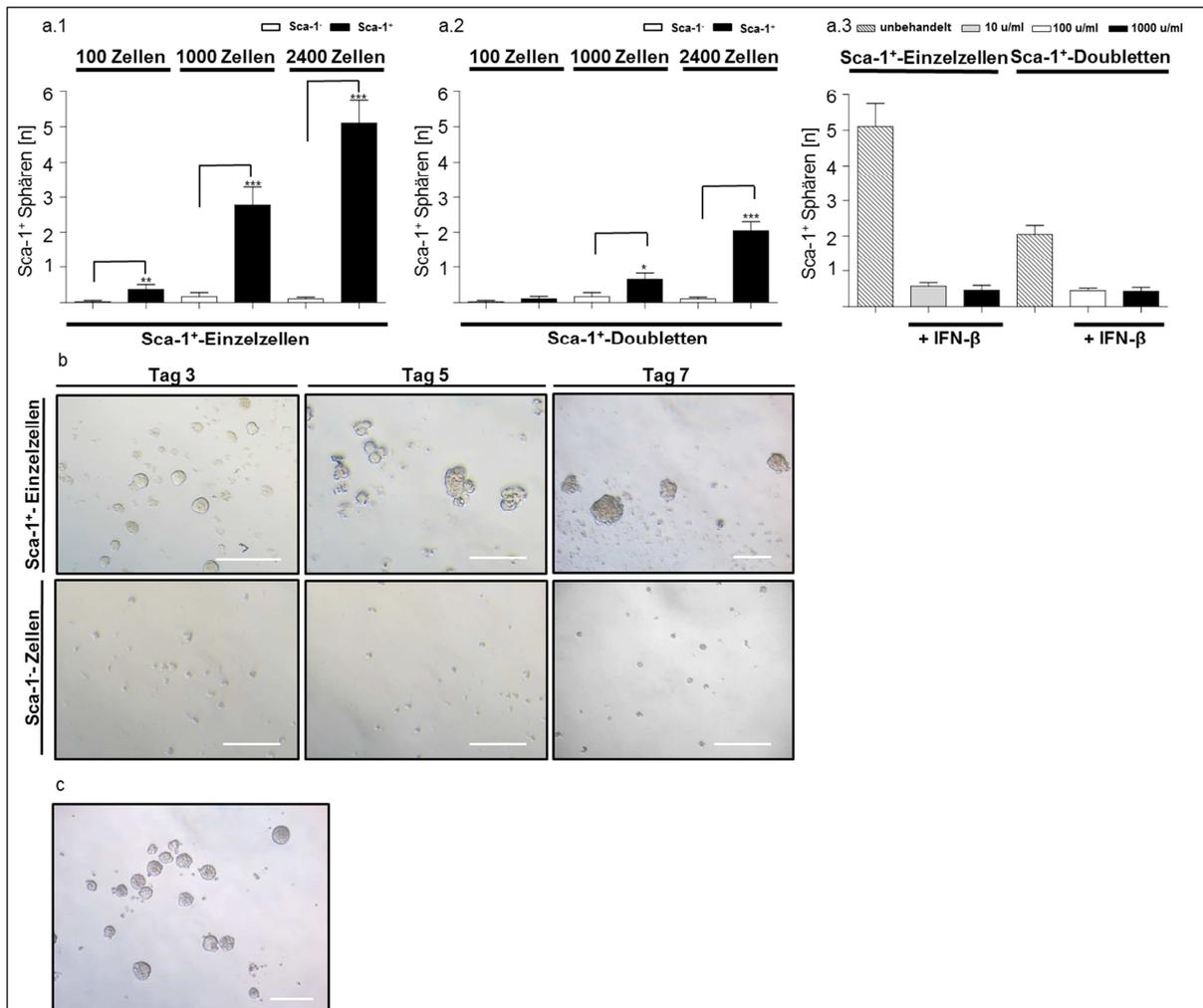


Abb.12: Zellsphären-Assay (engl.: Sphere formation assay)

(**a.1+a.2**) Sca-1⁺-Einzelzellen und Sca-1⁺-Doubletten weisen nach 7-tägiger Kultivierungszeit eine signifikant höhere Fähigkeit auf primäre Zellsphären auszubilden im Vergleich zu Sca-1⁻-Zellen.

(5,1 x ± 0,64 (Sca-1⁺-Einzelzellen, 2400) vs 0,1 x ± 0,054 (Sca-1⁻-Zellen, 2400)). Ergebnisse sind als Mittelwert von 2 unabhängigen Auszählungen verschiedener Personen dargestellt. (**a.3**) Chronische Behandlung mit Interferon-β führt zu einer signifikanten Reduktion der Sphärenausbildung im Sca-1⁺ Kollektiv. Einfacher t-Test, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; (**b**) Mikroskopische Dokumentation des Kulturverlaufes mit sichtbarer Sphärenbildung innerhalb der Sca-1⁺ Subpopulation. Maßstab: 100 µm (**c**) „Tochter-Sphäre“ an Tag 8 nach der Passage. Maßstab: 100 µm

IV.3.4 Sca-1⁺ Zellen in dreidimensionaler Kulturumgebung

Zur weiteren Beurteilung und Charakterisierung der Plastizität Sca-1⁺ exprimierender Zellen wurde eine dreidimensionale Kulturumgebung gewählt (Matrigel) und Zellen darin unter serum-freien Bedingungen kultiviert (s. III.2.4.3). In einem solchen System konnte - gegenüber der Verwendung einer Kulturumgebung in Suspension- die Lebensdauer deutlich verlängert und darüber hinaus Wachstum und Proliferation plastisch erfasst werden. Lichtmikroskopisch dominierend waren im Kulturverlauf dabei größere zellreiche Strukturen, die sich zwei verschiedenen Kategorien zuordnen ließen. Zum einen konnte man asymmetrische, multiple verzweigte tubuläre Strukturen ausmachen, die aus pflastersteinartigen Zellen bestanden (s. Abb.13a.1+a.2). Eine andere häufig beobachtete Konfiguration zeigte kugelförmige hohle Strukturen mit planer Oberflächenbeschaffenheit, die deutlich größer waren als die in Suspensionskultur beobachteten Zellsphären (s. Abb.13b.1+b.2).

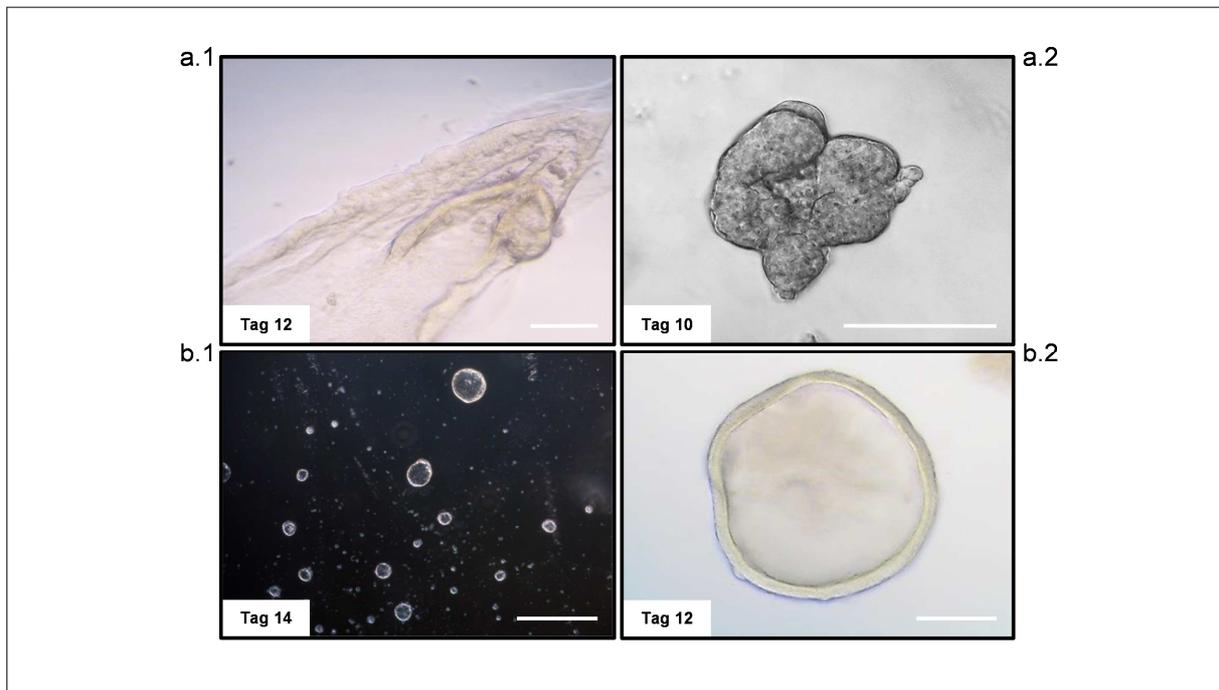


Abb.13: Sca-1⁺ Zellen in dreidimensionaler Kulturumgebung
(a.1+a.2) Tubuläre Strukturen in Matrigel nach einer (li.) 12-tägigen (re.) 10-tägigen Kultivierungszeit.
(b.1+b.2) Kugelförmige hohle Sphären in Matrigel nach einer (li.) 14-tägigen (re.) 12-tägigen Kultivierungszeit. Maßstab: 100 µm

Ergebnisse

Die beobachteten Sphären entwickelten sich über mehrere Wochen (Beobachtungszeitraum: 21 Tage), wobei das Wachstum zunehmend abnahm und nach etwa 10 – 14 Tagen komplett stagnierte, so dass sich weitere Änderungen der Konfiguration und Größe nicht mehr feststellen ließen. In den ersten Tagen nach Beginn der Kultivierung zeigten sich lediglich gehäuft Ansammlungen von Zellen ohne scheinbar geordnete Konfiguration (s. **Abb.14a.1+a.2 Bild li. ob. Pfeile**). Aus diesen entwickelten sich schon früh (1-3 Tage nach Beginn der Kultivierung) kugelförmige oder ellipsoide Strukturen, deren Größe im weiteren Verlauf expandierten aber dabei ihre Konfiguration beibehielten. (s. **Abb.14a.1+a.2**). Manche dieser Sphären in ihrem „reifen Zustand“ enthielten dicht gepackt mehr als 1000 Zellen (s. **Abb.14b**). Versuchsweise wurden einzelne Sphären durch mechanische Herauslösung aus dem Gel und anschließender chemischer Dissoziation (**III.2.4.2**) wieder vereinzelt und erneut in Matrigel kultiviert. Eine solche Passage führte zur Herausbildung von sekundären Sphären, die jedoch nur geringere Durchmesser erreichten (Daten nicht dargestellt)

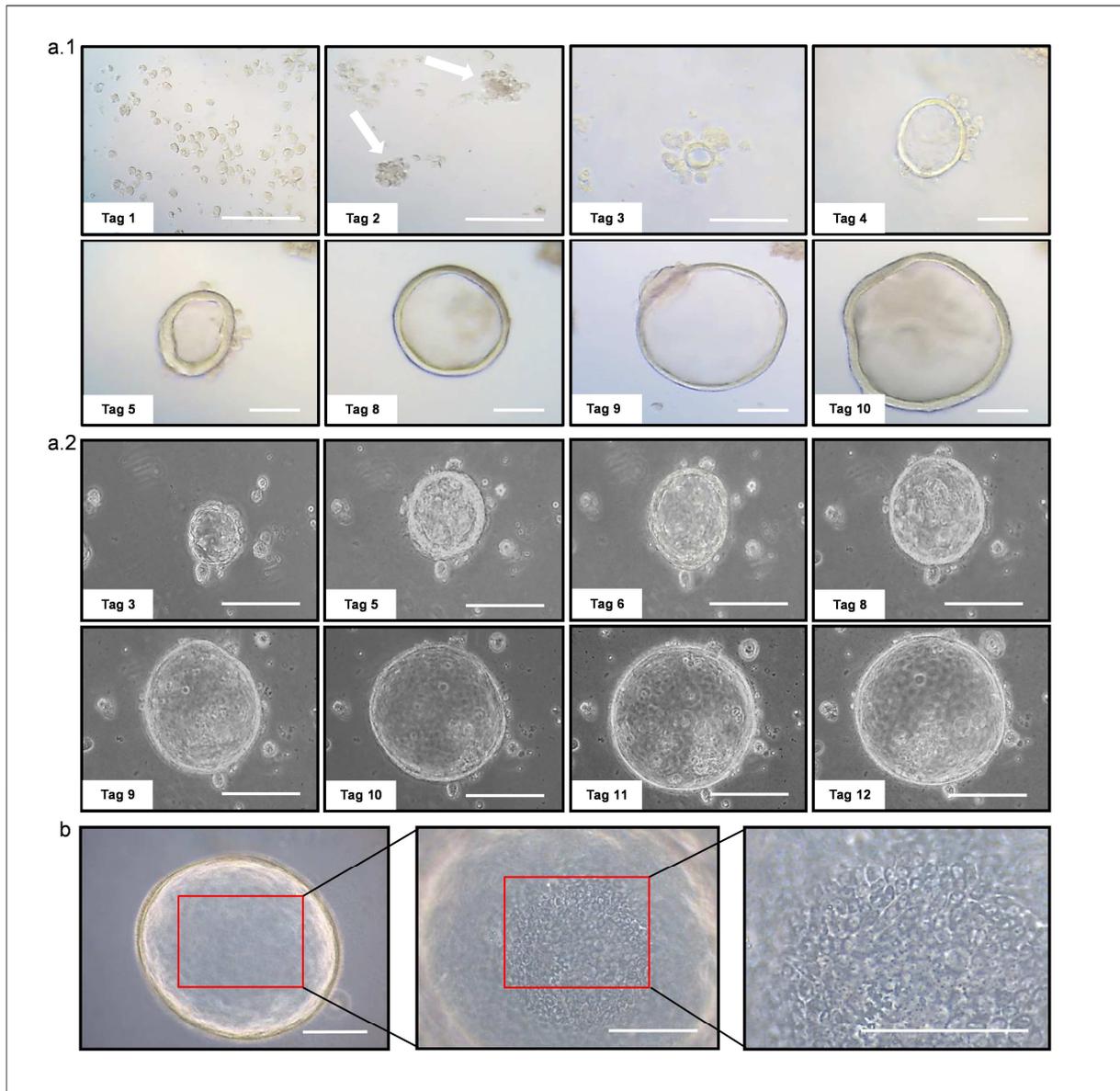


Abb.14: Sca-1⁺ Sphären in dreidimensionaler Kulturumgebung
 (a.1+a.2) Sca-1⁺ Sphärenbildung in Matrigel im Zeitverlauf (a.1) (Tag 1 – Tag 10) (a.2) (Tag 3 – Tag 12). (b) Zellverband innerhalb einer in Matrigel kultivierten Sca-1⁺ Sphäre nach 11 Tagen in Kultur
 Maßstab: 100 µm.

IV.3.5 Immunhistochemische Analysen

Zur weiteren Beschreibung der Eigenschaften des Sca-1⁺ Isolates in dreidimensionaler Kulturumgebung wurden im Folgenden auf mit Matrigel beschichteten Mehrkammer-Objektträgern Immunfluoreszenzstudien durchgeführt (s. III.4.1.4.7). Dazu verwendete primär- und sekundär-Antikörper (s. III.1.3). Gegen Sca-1 gerichtete Antikörper konnten dabei zu frühen Zeitpunkten (Tag 5) in sphärischer Konfiguration nachgewiesen werden (dargestellt in grün), wobei alle sichtbaren sphärenbildenden Zellen das Signal emittierten (s. **Abb.15a**). Nach längerer Kultivierungszeit (Tag 11) in planen Kolonien zeigte hingegen nur ein Teil der beteiligten Zellen eine gegen Sca-1 gerichtete Reaktivität (s. **Abb.15b**). Auch der Vorläuferzellmarker C-kit (dargestellt in rot) konnte bei einem geringeren Teil der Zellen in planer und sphärischer Konfiguration identifiziert werden und wurde in den betroffenen Zellen mit Sca-1 co-exprimiert (dargestellt in orange) (s. **Abb.15a+b**).

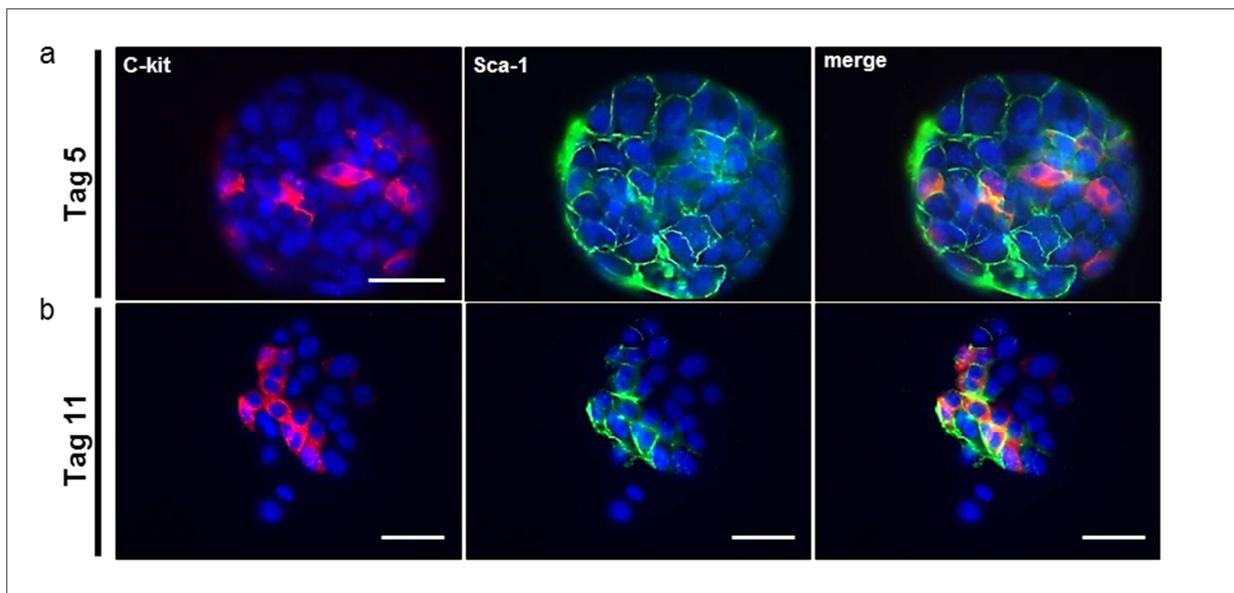


Abb.15: Sca-1⁺ / C-kit Expression in sphärischer und planer Zellstruktur.

(a) Sca-1⁺ und C-kit Expression in sphärischer Konfiguration (Tag 5) in Matrigel (b) Sca-1⁺ und C-kit Expression in planer Zellansammlung (Tag 11) in Matrigel. Maßstab: 50 µm

Eine darüber hinaus gehende Verlängerung der Kultivierungszeit in Matrigel (10 – 17 Tagen) zeigte ein zunehmend heterogenes Bild der zellulären Anordnung und deutliche Unterschiede in der morphologischen Beschaffenheit einzelner Zellen. So konnten Kolonien von pflastersteinartig verdichteten kubischen Zellen mit hohem Kern-Zytoplasma-Verhältnis

detektiert werden (s. **Abb.16a li.**). Die schon unter (**IV.3.4**) beschriebenen, schlauchförmigen Strukturen konnten ebenfalls nachgewiesen werden die sich an ihren Rändern in plane Kolonien fortzusetzen schienen (s. **Abb.16a. Mitte + re. Pfeile**). Andere größere Zellen ordneten sich in weniger dichten Verbänden an und bildeten bilaterale „spike“-ähnliche Fortsätze (s. **Abb.16b / Abb.17a. li. Pfeile**). Ein geringer Anteil dieser Zellen in dichten und lockeren Verbänden exprimierte zudem den neuronalen Vorläuferzellmarker Nestin (s. **Abb.17a+b**).

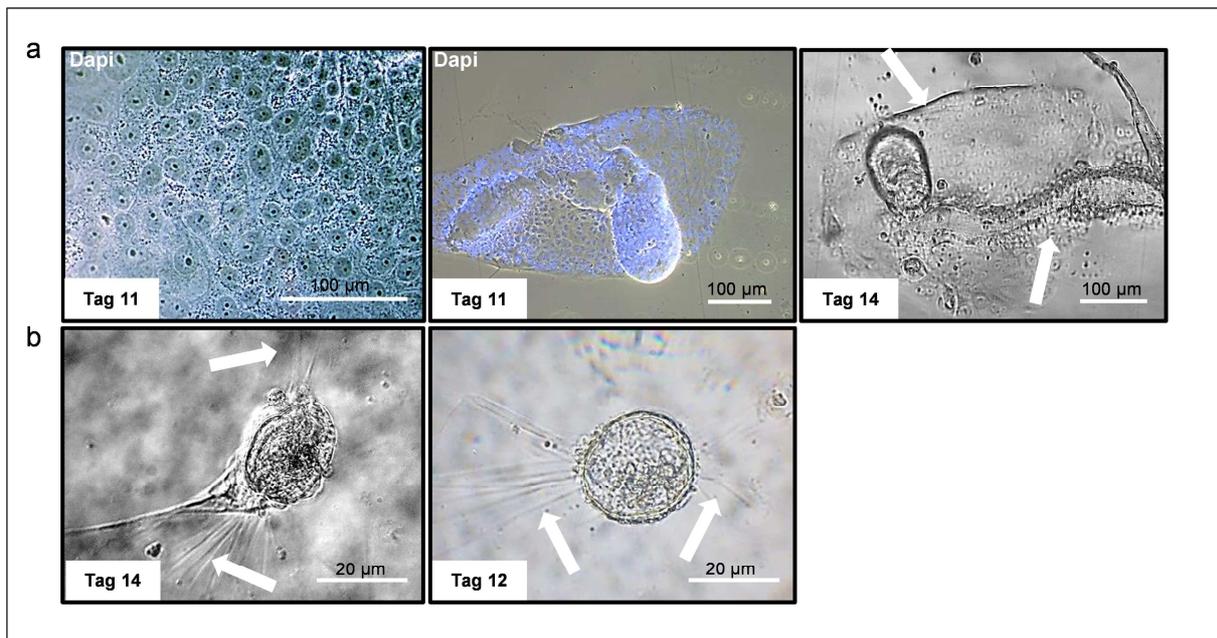


Abb.16: Morphologie von Zellkolonien und einzelnen Zellen nach einer 10-14-tägigen-Kultivierungszeit in Matrigel

(a) verschiedene Zellkolonien nach (li.) 11 Tagen in Kultur, (Mitte) 11 Tagen, (re.) 14 Tagen. (b) Einzelne Zellen mit bilateral angeordneten Fortsätzen (Pfeile), (li.) (14 Tage), (re.) (12 Tage).

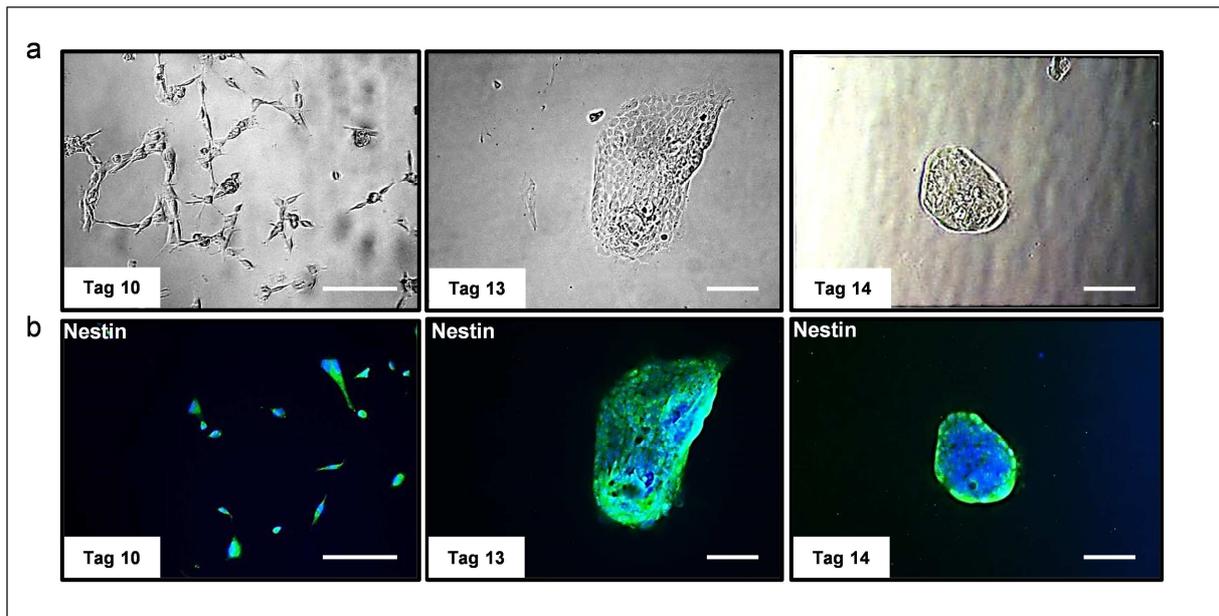


Abb.17: Morphologie und Nestin-Expression Sca-1⁺ Kolonien nach einer 10–14-tägigen Kultivierungszeit

(a) Zellen in vereinzelter Konfiguration (li.) 10 Tage in Kultur und angeordnet in Kolonien (Mitte) 13 Tage in Kultur, (re.) 14 Tage in Kultur. (b) Unter (a) dargestellte Zellen exprimieren den Vorläuferzellmarker Nestin (li.), (Mitte), (re.). Maßstab: 100 µm

Im Weiteren durchgeführte Immunfluoreszenz-Studien von Sca-1⁺ Zellen in Matrigel-Langzeit-Kulturen (10 – 14 Tage) zeigten ein eher heterogenes Bild verschiedener Zelltypen. So exprimierte ein größerer Teil der Kolonien epitheliales E-Cadherin und spezifisch duktales Ck-19. Ein Teil dieser Ck-19⁺ Zellen zeigte dabei auch eine Co-Expression mit dem Sca-1 Antigen (s. **Abb.18a**). Amylase als Marker für exokrine Zellen, die den überwiegenden Teil des Epithelzell-Isolates ausmachen, war zwar auch in Langzeit-Kultur der zuvor nach Sca-1⁺ separierten Zellen nachweisbar, zeigte hingegen keine eindeutig zuzuordnende Sca-1 Co-Expression (s. **Abb.18b. Mitte + re.**). Interessant war der Nachweis des endothelialen Markers Cd 31, der in planen Kulturen sowie schlauchförmigen Strukturen nachgewiesen werden konnte (s. **Abb.18b. li.**)

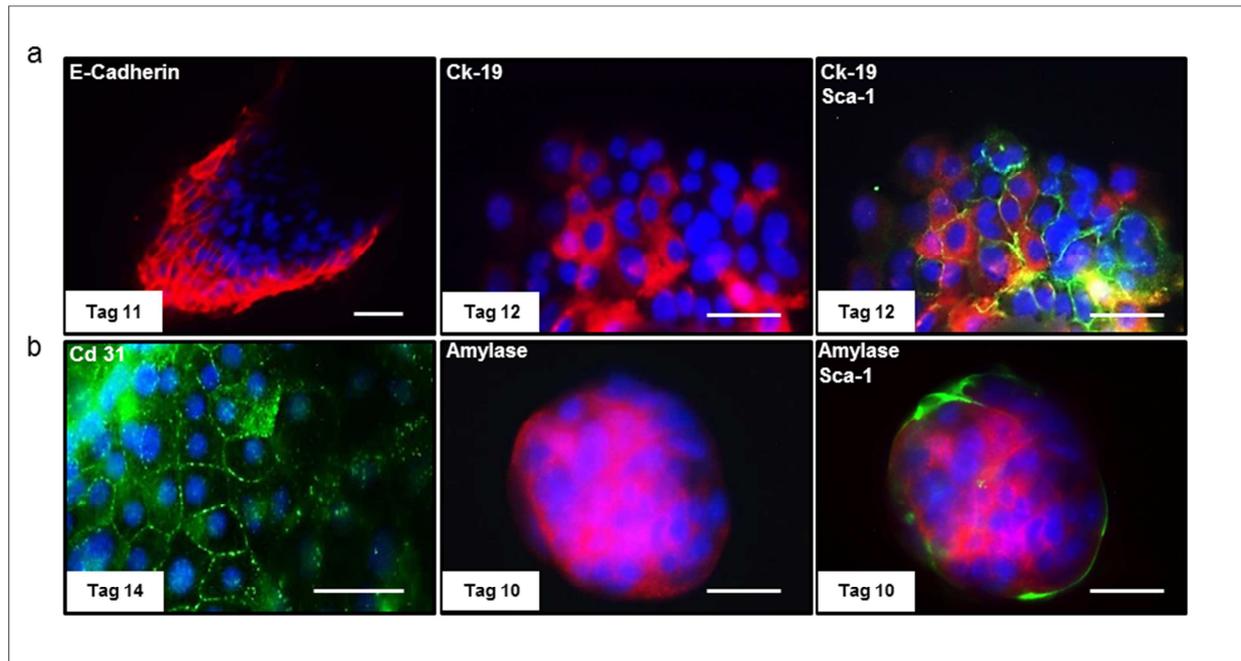


Abb.18: Expression von epithelialen und endothelialen Markern von Sca-1⁺ Kolonien nach einer 10-14-tägigen Kultivierungszeit

(a) (li.) Epitheliales E-Cadherin (Tag 11), (Mitte) Duktales Ck-19 (Tag 12), (re.) Co-Expression von Ck-19 und Sca-1 (Tag12). (b) (li.) Endotheliales Cd-31 (Tag 14), (Mitte) azinäre Amylase (Tag10), (re.) Kein Nachweis für eine Co-Expression von Amylase und Sca-1 (Tag10). Maßstab: 50 µm

Anschließend wurden immunhistochemische Analysen von Paraffinschnitten aus murinem nativem WT-Pankreas durchgeführt. Dies sollte zum einen Sca-1⁺ Zellen im Gewebeverband lokalisieren und zum anderen durch Simultanfärbung mit Antikörper gegen duktales Ck-19 - analog den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenz- eine eventuell bestehende, überlappende Expression nachweisen; Gewebeentnahme und Färbeprotokolle (s. III.4.1). Dazu verwendete Antikörper (s. III.1.3). Sca-1⁺ Zellen (braun) konnten dabei vor allem in peri-azinärem Gewebe und in den sich dort befindenden Interlobarspalten sowie um die Ausführungsgänge herum lokalisiert werden (s. Abb.19b. Mitte + re. Pfeile). Interessanterweise wiesen daneben auch endotheliale Zellen, die das Innere von Blutgefäßen auskleiden eine positive Färbung für Sca-1 auf (s. Abb.19a. Pfeile). Dies bestätigt somit die zuvor in der Immunfluoreszenz erhaltenen Ergebnisse. Ck-19 (rosa) ließ sich erwartungsgemäß spezifisch im isoprismatischen Epithel der Ausführungsgänge detektieren (s. Abb.19a. re. + b. li.). Für eine überlappende Expression von Ck-19 und Sca-1 gab es in Kontrast zu den Beobachtungen in vitro in den Gewebeschnitten keinen Anhalt.

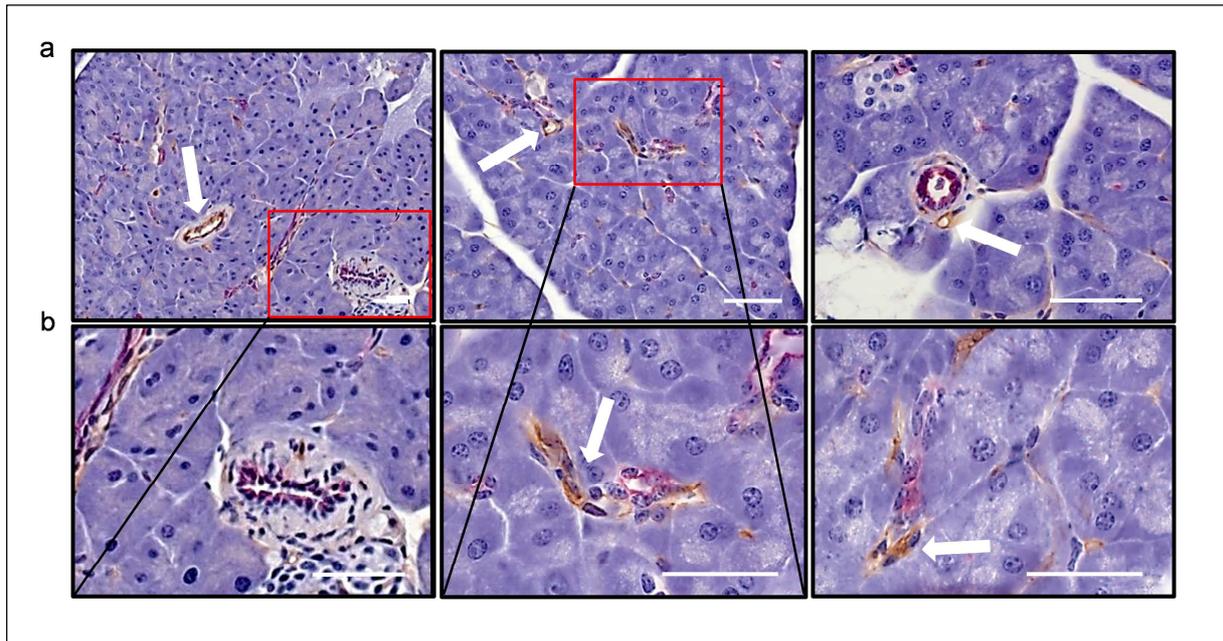


Abb.19: Verteilung von Sca-1 und Ck19 im murinen WT Pankreas

(a) Sca-1 (braun) und Ck19 (rosa) (li.) Sca-1⁺ Signal entlang des Endothels eines Gefäßes, (Mitte) Sca-1⁺ Zellen zwischen den Lobuli, (re.) Sca-1⁺ Zellen radiär angeordnet um duktales Strukturen, Sca-1⁺ Gefäßendothel (b) (li.) isoprismatisches Epithel mit Ck19⁺ Zellen, (Mitte / re.) Sca-1⁺ Zellen in enger Nachbarschaft zu duktales und azinären Zellen. Maßstab: 50 µm

V. Diskussion

V.1 Die epitheliale Primärzell-Kultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Epithelzell-Isolationsverfahren angewendet, mit der Zielsetzung, ein qualitativ reines und funktionell intaktes Epithelzell-Isolat zu generieren. Die Verfahrensweise hierfür basierte auf Protokollen zur Isolation primärer Epithelzellen [2]. Diese Methode hat sich nach der Optimierung einzelner Verfahrensschritte als wissenschaftlicher Standard für die funktionelle Untersuchung primärer pankreatischer Epithelzellen entwickelt und diente auch als Experimentalgrundlage in dieser Arbeit [20, 85, 93, 111, 131]. Zur Überprüfung der Reinheit und der Verwendbarkeit der auf diese Weise extrahierten Zellen wurde im Vorfeld eine qualitative und funktionelle Validierung des Isolates durchgeführt.

V.1.1 Qualitative Charakterisierung:

Die mikroskopische Evaluation des Isolates bestätigte das Bild epithelialer Zellen. Es zeigten sich überwiegend azinäre Zellen mit typischer Granula in den apikalen Zellpartien. Die PCR-Markerprofile bestätigten die Anwesenheit epithelialer Marker (Amy^+ , Ins^+ , $Ca2^+$, $Cftr^+$) und lieferten zugleich den Ausschluss einer Kontamination von immunogenen Zellen zu allen gemessenen Zeitpunkten ($Ptprc^-$) (s. **Abb.1 a+b**). Immunzellen stellen eine beträchtliche Quelle von Chemokinen wie *Cxcl-10* (*Ip-10*) dar [35]. Durch den Ausschluss einer Kontamination durch Immunzellen konnte die in dieser Arbeit untersuchte Interferon-Sensibilität über die Messung des Chemokins *Cxcl-10* den Zellen des epithelialen Kompartiments zugeordnet werden (s. **Abb.4**).

Die Expression des mesenchymalen Markers (*Vim*) konnte bereits ab 24h nach der Zellisolation nachgewiesen werden und Fibroblasten erschienen sichtbar adhärent an den Böden der Polyesterplatten innerhalb derselben Zeitspanne. Hier zeigen sich die methodischen Limitationen der Isolationsmethode, die im Wesentlichen auf einem enzymatischen Verdau des Gewebes mit mechanischer Separation beruht. Eine Fibroblasten-Kontamination kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Um den Einfluss auf die Messergebnisse dabei möglichst gering zu halten, wurden alle Experimente erst nach einer 24-stündigen Latenzzeit und nach Wechsel des Zellkulturmaterials durchgeführt, um so eine Separation der epithelialen Suspensionszellen von den adhärennten Fibroblasten zu erzielen. So bestand darüber hinaus auch die Möglichkeit, eine durch die chemisch-mechanischen Einwirkungen der Isolationsmethode induzierte Stressaktivität, die direkt nach der Stimulation beschrieben ist [42] zunächst abklingen zu lassen.

V.1.2 Funktionelle Charakterisierung:

Stimulationsversuche pankreatischer Zellen mit dem CCK-Analogon Caerulein stellen ein hinlänglich gut beschriebenes Modell dar. In dieser Arbeit wurden diese Stimulationsversuche angewendet, um die funktionelle Integrität der isolierten Zellen zu überprüfen. Dabei wurde auf die in der Literatur beschriebene Dosis-Wirkbeziehung funktionell intakter Zellen geachtet.

Nach Caerulein-Stimulation des Epithelzell-Isolates stellte sich ein biphasischer Kurvenverlauf der Amylase- und Lipase-Sekretion ein, in ähnlicher Konfiguration wie es bei der Erstbeschreibung [87] nachgewiesen werden konnte (s. **Abb.2a+b**). Es ist dabei anzunehmen, dass die verwendeten Agonisten-Konzentrationen *in vitro*, die die Sekretion der digestiven Enzyme bewirkt, keine Rückschlüsse auf die Dosis-Wirkbeziehung *in vivo* zulässt. So wurde beschrieben, dass pankreatische Epithelzellen *ex vivo* in geringerem Ausmaß auf Sekretionsinduktoren reagieren als *in vivo* [64, 118] und dabei etwa zehnfach höhere Konzentrationen als in intaktem Gewebe nötig sind um ähnliche Ergebnisse zu erzielen [1, 118, 131].

Des Weiteren konnte im epithelialen Isolat eine Caerulein induzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie u.a. *Tnf- α* und *Il-6* detektiert werden (s. **Abb.3**). Eine CCK-induzierte NF- κ B abhängige Aktivierung im epithelialen Ratten-Isolat wurde bereits beschrieben [42] und deckt sich quantitativ mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Das Zusammenspiel von Entzündungsmediatoren wie *Il-6*, *Tnf- α* und *Il-1b* stellt eine wichtige Rolle für Beginn und Verlauf der Pankreatitis dar und korreliert mit dem Schweregrad der Entzündungsantwort [7, 8]. Dabei wird der Stellenwert von epithelial-sezernierten Zytokinen in der frühen Initiationsphase der Entzündung diskutiert.

Im Kontext dieser Arbeit konnte anhand der Caerulein-Stimulationsexperimente der funktionelle Zustand der epithelialen Zellen hinsichtlich Rezeptorstatus und Signaltransduktion beurteilt werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Isolationsmethode ein qualitativ verwendbares und funktionell intaktes Experimentalsystem darstellt und dass die so gewonnenen Zellen für die Stimulationsversuche mit Interferon- β verwendet werden konnten.

V.2 Untersuchung pankreatischer Vorläuferzellmarker und die Identifizierung des Oberflächenantigens Sca-1 in Zusammenhang mit Interferon- β

V.2.1 Nachweis der epithelialen JAK-STAT1/2 Signaltransduktion

Vorversuche durch Applikation von Interferon- β zu dem Epithelzell-Isolat mit Messung der JAK-STAT 1/2 abhängigen Zielgene dienten dem Nachweis der Sensitivität auf Interferon sowie der Eingrenzung eines wirksamen Dosisbereiches für die Anwendung in nachfolgenden Stimulationsversuchen.

Dabei ergab die Behandlung des Epithelzell-Isolates mit murinem Interferon- β eine stark dosisabhängige Hochregulation der JAK/STAT abhängigen Chemokine *Cxcl-10* und *Cxcl-11* nach 4h Inkubationszeit. Eine entsprechende Antwort in STAT1^{-/-} Epithelzellen blieb aus (s. **Abb.4a.1+a.2**).

In humanen Gewebeproben chronischer Pankreatitis ist bereits eine Interferon-abhängige Expression diverser Zielgene beschrieben worden [117]. Weiter ist bekannt, dass β -Zellen der Langerhanschen Inseln zu der Signalaufnahme durch Interferon fähig sind; diese führt zur Induktion von Genen antiviraler Proteine sowie weiterer Gene, die an der antiviralen Entzündungsantwort beteiligt sind [53]. In azinären Zellen der Ratte konnte nach Interferon-Behandlung eine Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass die meisten STAT-Proteine mit Ausnahme von STAT4 besonders im epithelialen Kompartiment vorzufinden sind [33].

Durch dieses in-vitro-Experiment konnten Sensibilität und intrazelluläre Signalweitergabe pankreatischer Epithelzellen auf Interferon- β durch Messung spezieller *Target*-Gen-Transkripte nachgewiesen werden. Neben der Existenz des JAK-STAT Signalweges in epithelialen Zellen gibt die ausbleibende Antwort in STAT 1 defizienten Zellen einen Hinweis darauf, dass dessen Aktivierung für die *Cxcl-10/11* Expression ein notwendiges

Kriterium darstellen könnte. Dies könnte über Phosphorylierungsanalysen und unter Einbezug von Knockout-Tieren für weitere Proteine des STAT-Spektrums fortführend evaluiert werden. Auch konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass IFN-Dosen über 100 u/ml eine zur Dosis korrelierende Mitexpression von *Il-6* bewirkte (s. **Abb.4b**). Ob dies im Sinne einer Interferon mediierten-Konvergenz des JAK-STAT und NF- κ B Signalweges zu werten ist, lässt sich nicht abschließend sagen [30]. Da vermutet wurde, dass die Zellintegrität bei zu hohen Dosen unter Aktivierung von Stress-Signalwegen leidet fokussierten wir uns in den Progenitorzell-Stimulationsexperimenten auf einen Dosisbereich, der unterhalb dieser mitreaktiven Co-Expression von *Il-6* blieb.

V.2.2 Expression von Vorläuferzellmarkern und *Sca-1* in Suspensionskultur

Pinho et al. (2011) konnten nachweisen, dass pankreatische Epithelzellen in Suspensionskultur Vorläuferzellmarker exprimieren. Es ist dort beschrieben worden, dass solche Zellen möglicherweise aufgrund des Integritätsverlustes in Suspensionskultur mit Verlust der Zell-Zell-Kontakte eine Art Dedifferenzierungsprozess eingehen, um anschließend regenerative Vorgänge einleiten zu können [96]. Auch wäre denkbar, dass dieser Integritätsverlust in die Expansion eines im adulten Pankreas bereits vorhandenen Progenitorzell-Kompartiments mündet. In dieser Arbeit ließ sich die Messung der Vorläuferzellsurrogate im Epithelzell-Isolat innerhalb des 3-tägigen Beobachtungszeitraumes in 3 Kategorien einordnen:

(1) *Nestin*, *C-met* und *Ptf1a* zeigten weder eine Expressionsinduktion im Kulturverlauf noch eine Reaktion auf die Behandlung mit Interferon- β (s. **Abb.5**). Nestin gilt allgemein als Marker für ektodermale Stammzellen und wird ebenfalls im Pankreas als Marker für eine adulte Population mit Stammzeleigenschaften diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass eine Nestin⁺-Subpopulation über einen Differenzierungsprozess die Fähigkeit erlangte Hormonproduzierende-Eigenschaften auszuüben [97, 100, 113, 143], bzw. in einen intermediären, dedifferenzierten Zustand überzutreten [85].

Die fehlende Anreicherung dieser Transkripte lässt sich möglicherweise auch mit den Ergebnissen einer Studie von 2010 erklären, die die Induktion bestimmter Markergene in Kultur mit der Expansion einer terminal-duktalem / zentroazinären Vorläuferzellpopulation in Verbindung brachte. Dort konnte eine Expressionsinduktion von *Nestin*, *C-met*, *Ptf1a* ausschließlich in einer distinkten epithelialen Subpopulation von stark Aldh1a1⁺ Zellen nachgewiesen werden nicht jedoch im überwiegenden Teil des Isolates. Im Rahmen dieser

Studie wurde diese Eigenschaft als Alleinstellungsmerkmal einer pankreatischen Vorläuferzellpopulation eingestuft [106].

Auch Transkripte der Transkriptionsfaktoren *Hes1*, *Hey1* und *Rbpj* als *Target* des Notch-Signalweges, der im embryonalen Pankreas entscheidend auf die Initiation der Differenzierung in die endokrine und exokrine Zelllinien einwirkt [3], zeigten keine Anreicherung, so dass kein Hinweis besteht, dass dieser Signalweg eine starke Induktion in vitro erfährt.

(2) *Aldh1a1* und *C-kit* hingegen wiesen eine Expressionsinduktion mit zunehmender Anreicherung im Zeitverlauf auf. Auch *Pdx1* zeigte eine moderate Erhöhung der Transkriptlevel (s. **Abb.6**). Auch hier hatte die Applikation von Interferon- β keinen zusätzlich-anreichernden Effekt.

Aldh1a1 wurde bereits in extrapankreatischen Geweben als Tumor-Stammzellmarker charakterisiert [51, 57] und ist als möglicher Vorläuferzellmarker im Pankreas diskutiert worden [106]. Neuere Erkenntnisse schreiben ihm dort die Eigenschaft eines Prognosesurrogates im duktalem Adenokarzinom zu [102]. Immunhistochemische Untersuchungen in WT-Gewebe (Daten nicht gezeigt), sowie neuere Studien weisen hingegen darauf hin, dass *Aldh1a1* in einem Großteil der pankreatischen Zellen exprimiert ist und dass erst das Expressionsniveau mit Vorläuferzeleigenschaften wie der Proliferationsaktivität von Tumorzellen in Korrelation steht [60]. Eine Wertung der *Aldh1a1*-Anreicherung in Suspensionskultur dieser Experimente in einen Zusammenhang mit der Initiation von Zellprozessen mit regenerativer Ausrichtung zu stellen, fällt aufgrund der unklaren Rolle von *Aldh1a1* daher schwer.

Ähnlich verhält es sich mit *Pdx1*, das neben seiner Rolle in der frühen Entwicklung des Pankreas auch zahlreiche Funktionen im Metabolismus von adulten Zellen, vornehmlich β -Zellen, aufweist [17, 36, 107]. Auch hier lässt sich eine Zuordnung von Signalamplifizierung zur Expansion eines Vorläuferzellkompartiments nicht herstellen.

Anders zu werten ist die Anreicherung der Transkripte der Tyrosinkinase *C-kit*. Zahlreiche Studien zielten bislang darauf ab, die *C-kit*-Expression in fetalem und frühem postnatalen Pankreas darzustellen [70]. Daraus resultierte die Annahme, das *C-kit* wie im hämatopoetischen System, spezifisch eine Zellpopulation mit Progenitoreigenschaften markiert, die eine wichtige Rolle in dem Differenzierungsprozess zu β -Zellen spielt [77, 99, 135]. Ähnlich wie in dieser Arbeit konnten Pinho et al. (2011) zeigen, dass *C-kit* zusammen mit Mediatoren des Notch-Pathways in pankreatischen Epithelzellen erhöhte Expressionslevel nach 5-tägiger Kultivierungszeit aufwiesen.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente konnten *C-kit* Transkripte bereits nach 24h nachweisen mit gradueller Vermehrung bis Tag 3 (s. **Abb.6**). Vor dem Hintergrund der bisher angenommenen Spezifität für C-kit als Stammzellmarker, ist es möglich, dass diese Signalanreicherung in Zellen stattfindet, die Vorläuferzeleigenschaften besitzen können. Interessanterweise ist C-kit auf HSC auch mit *Sca-1* assoziiert und gilt in dieser Kombination als spezifischer Oberflächenmarker zur Gewinnung von HSC [90, 137]. Eine Co-Expression in fetalem Pankreasgewebe konnte bereits nachgewiesen werden [81].

(3) Auch Transkripte von *Sca-1* konnten in dieser Arbeit im epithelialen Isolat detektiert und eine kontinuierliche Anreicherung in WT, STAT1^{-/-} und IFNAR^{-/-} Zellen in Kultur im Beobachtungszeitraum von 3 Tagen nachgewiesen werden (s. **Abb.7**). Erhöhte *Sca-1* Expressionslevel konnten auch Pinho et al. (2011) in epithelialen WT-Kulturen an Tag 5 feststellen. Dazu könnten Überlegungen zu dem Zusammenhang der *Sca-1* Signalanreicherung mit Aktivierungsmechanismen von Zellen mit Vorläuferzeleigenschaften beziehungsweise fakultativer Stammzellen angestellt werden. Eine *Sca-1* Hochregulation wurde bereits in vivo bei Gewebeschäden in Speicheldrüse, Skelett- und Herzmuskel nachgewiesen [59, 98, 125], daher könnte ein entsprechender Ansatz auch in inflammatorisch oder neoplastisch verändertem Pankreas vielversprechend sein. So wäre denkbar, dass z.B. bei der viralen Entzündungsantwort Interferone nicht nur zur Induktion des angeborenen Immunsystems führen [53], sondern dieselben Signalwege gleichzeitig regenerative Vorgänge durch Aktivierung von Zellen mit progenitor-ähnlichen Eigenschaften einleiten.

In dieser Arbeit konnte erstmals dargelegt werden, dass auch Interferon- β , appliziert in Epithelzellkulturen von Lin⁻ (*Ptprc*⁻) pankreatischen Epithelzellen, das *Sca-1* Signal zusätzlich zu der Induktion in Suspensionskultur amplifizierte (s. **Abb.7**). Wie bereits unter **(I.3.3)** ausgeführt, ist dieser mechanistische Zusammenhang von aktiviertem JAK-STAT-Signalweg und der *Sca-1* Expression sowie einer konsekutiven proliferationsinduzierenden Wirkung auf die durch Interferon aktivierten Zellen vor allem in Gewebetypen mit hohem Regenerationspotential beschrieben worden [122, 136, 57, 44]. Im pankreatischen Epithelzell-Isolat exprimierten auch IFNAR^{-/-} und STAT1^{-/-} Zellen *Sca-1* vermehrt im Zeitverlauf der Kultur. Zusätzlich appliziertes Interferon hingegen konnte nur die Expression im STAT1^{-/-} Kollektiv nach 24h steigern, währenddessen keine zusätzliche Induktion in dem IFNAR^{-/-} Kollektiv nachzuweisen war. Wichtig in der vergleichenden Beurteilung ist, dass die in das Experiment einbezogenen IFNAR depletierten Mäuse keinen C57/BL6 Hintergrund besaßen sondern A129 Sv/Ev (s. **III.1.5**). Ein stammgleicher *Sca-1*-Expressionsvergleich nach Interferon-Behandlung wäre hier fortführend sinnvoll.

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass sich *Sca-1 downstream* der IFNAR-STAT1-Signalkaskade befindet, aber dass vermutlich darüber hinaus auch andere Signalwege in der Regulation von *Sca-1* beteiligt sein müssen. Neben der Regulation durch Interferon- $\alpha / \beta / \gamma$ konnten, wie bereits unter (I.3.3) erwähnt, auch weitere regulative Faktoren nachgewiesen werden. So wurde z.B. beschrieben, dass die *Tnf- α* Signalaufnahme in angiogenen Tumoren einen inhibierenden Einfluss auf die *Sca-1* Expression besitzt [50, 108].

V.2.3 *Sca-1* Expression in Co-Kultur

Neben Endothelzellen stellt die Interaktion mit anderen stromalen Zellen wie Fibroblasten einen Aspekt des Mikromilieus der Stammzellnische im Knochenmark dar [138]. In einer Studie von Vilne et al. (2013) konnte nachgewiesen werden, dass primäre Fibroblasten in Co-Kultivierung mit *Sca-1*⁺, *C-kit*⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC) deren Eintritt in den Zell-Zyklus und deren Expansion propagierten. Fibroblasten stellen als nicht-Immunzellen eine Hauptquelle für Interferon- α / β dar, die z.B. bei Minderung der Zellintegrität so wie bei der viralen Entzündungsantwort, freigesetzt werden [62, 126]. Auch der embryonalen Differenzierung in eine exokrine und endokrine pankreatische Linie gehen komplexe parakrine Interaktion mit Zellen des Mesenchyms voraus [34]. Um zu untersuchen, ob die *Sca-1* Regulation epithelialer Zellen im Pankreas durch Wechselwirkungen im Mikromilieu stromaler Zellen beeinflusst wird, wurden Co-Kultur-Versuche mit primären murinen Stromazellen etabliert (s. **Abb.9**).

Wie schon im vorhergehenden Experiment festgestellt (s. **Abb.7**), konnte auch hier eine *Sca-1* Expressionsinduktion im epithelialen Kompartiment in Mono- und Co-Kultur Ansätzen nachgewiesen werden. Ebenso wirkte zusätzlich appliziertes Interferon- β in beiden Ansätzen als eigenständiger Induktor der Expression. Dies bestätigte die bereits in (**Abb.7**) dargestellten Ergebnisse zum mechanistischen Zusammenhang von Interferon- β auf die *Sca-1* Expression in pankreatischen Epithelzellen. Zusätzlich ließ sich in epithelialen Zellen in Co-Kultur in behandelten und unbehandelten Proben ein leicht erhöhtes Expressionsniveau gegenüber den Zellen der Mono-Kultur detektieren. Da dieser Unterschied jedoch keine Signifikanz aufwies (P= 0,025 -IFN, P= 0,0869 +IFN), lässt sich daraus allenfalls ein Hinweis auf eine parakrine Interaktion mit Stromazellen ableiten, der in weiteren Experimenten mit Messungen zu anderen Zeitpunkten bestätigt werden müsste.

Zudem zeigte sich, dass *Sca-1* auch in geringem Maß in den (*Vim*⁺, *α -sma*⁺) stromalen Zellen exprimiert wurde. Hier zeigte weder die Kultivierung noch die Interferon-Behandlung eine

zusätzliche Steigerung der Expression. Die Beschreibung, dass Interferon das Sca-1 Signal amplifiziert, ist bislang im Zusammenhang mit der Expansion von Zellen mit regenerativen Eigenschaften in verschiedenen Geweben beschrieben worden [110, 124]. Das Fehlen dieses Zusammenhangs in den hier verwendeten primären Stromazellen und die Existenz dieses Signalweges in Zellen des epithelialen Isolates könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es sich bei der Interferon-*Sca-1* Signalkaskade um einen biochemischen Induktor regenerativer Fähigkeiten bereits ausdifferenzierter pankreatischer Zellen handeln könnte.

V.3. Charakterisierung der Sca-1⁺ Subpopulation

V.3.1 Durchflusszytometrische Verfahren

Gezielte Studien zur Untersuchung von Vorläuferzeleigenschaften sind nur an einer aufgereinigten Population möglich; d.h. das die zu untersuchenden Zellen innerhalb einer Population Alleinstellungsmerkmale aufweisen, anhand deren man sie von den übrigen Zellen separieren kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sca-1⁺ Zellen mittels FACS erfolgreich aus dem pankreatischen Epithelzell-Isolat isoliert werden können. Der Anteil der Sca-1⁺ Zellen, gemessen an dem Gesamtzell-Aufkommen, betrug hierbei 2,97% bestehend aus 1,46% Sca-1⁺ Einzelzellen und 1,51% Doubletten und konnte in diesem Verhältnis in Replikaten stabil nachgewiesen werden (s. **Abb.10**). Dies deckt sich in etwa mit dem Anteil Sca-1⁺ Zellen in der submandibulären Drüse (1,42%) [48], aber stellt eine geringere Fraktion dar als jene bereits unter (**I.3.2**) erwähnten Expressionsprofilen in der Prostata, Mamma und im Myokard.

Daten über den genauen Anteil von Sca-1⁺ Zellen im pankreatischen Epithelzell-Isolat sind bislang nicht verfügbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenschau mit den Ergebnissen ähnlicher Ansätze vermitteln hingegen einen umfassenderen Einblick. So konnten Seaberg et al. (2004) nachweisen, dass etwa 9% Inselzellen und 15% duktales Zellen Sca-1 an ihrer Oberfläche exprimieren. Eine genauere Spezifizierung des Sca-1 Expressionsmusters innerhalb des Isolates bezüglich duktales, azinärer und endokriner Herkunft wäre hier fortführend sinnvoll.

Ebenfalls legen diese Daten dar, dass sich das Sca-1 Signal nicht nur auf mRNA-Ebene in Kultur anreicherte, sondern sich auch die Oberflächenexpression des Antigens steigerte. Eine um 24h verlängerte Kultivierungszeit steigerte den Anteil von Sca-1⁺ Zählereignissen von

1,46% auf 2,89% (s. **Abb.11**). Hierzu können zwei erklärende Überlegungen angestellt werden: (1) Ursprünglich Sca-1⁻ Zellen konvertieren zu Sca-1⁺ Zellen oder (2) Sca-1⁺ Zellen deren Fluoreszenz-Signal sich bislang unter dem Diskriminations-Schwellenwert befand exprimieren nun das Oberflächenprotein Schwellenwert-überschreitend. Unabhängig davon bedeutet diese Signalamplifizierung, dass die oben festgestellte Steigerung der Sca-1 mRNA Transkripte in Suspensionskultur (s. **Abb.7 / Abb.9**) auch zu einem vermehrten Einbau des Sca-1 Antigens in die Zellmembran führt.

Zusätzlich appliziertes Interferon- β (150 u/ml) steigerte den Sca-1⁺ Zell-Anteil auf 3,9%. Da dieses Ergebnis sich nicht stabil replizieren ließ (P= 0,112), wären weitere Experimente mit Modifikation der applizierten Dosis und Variation der Messzeitpunkte zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Interferon- β und der Sca-1 Oberflächenexpression sinnvoll.

V.3.2 Sphären-Bildungskapazität

Ein gängiges Verfahren zur Untersuchung der replikativen Eigenschaften von Vorläuferzellkandidaten ist, zu evaluieren, wie diese Zellen unter definierten Bedingungen klonale Zellsphären ausbilden.

Der in dieser Arbeit angestellte Vergleich der Sphären-Bildungskapazität nach 7 Tagen Kultivierungszeit von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ Zellen, wies eindeutige Unterschiede auf (s. **Abb.12**). So verblieben Sca-1⁻ Zellen in Suspension vereinzelt oder ordneten sich in losen kettenförmigen Verbänden an; auch lichtmikroskopisch konnte eine proliferative Aktivität nicht nachgewiesen werden. Sca-1⁺ Zellen hingegen bildeten Kolonien runder Sphären mit dichtgepackten Zellen aus, die im Verlauf von 7 Tagen an Größe zunahmten. Das Verhältnis von gesäten Zellen zu gebildeten Sphären betrug durchschnittlich 424:1 im Sca-1⁺ Kollektiv zu 11.800:1 im Sca-1⁻ Kollektiv und ließ sich stabil replizieren. Dabei bildeten Sca-1⁺ Einzelzellen doppelt soviel Sphären wie Sca-1⁺ Doubletten und ließen sich durch chemische Dissoziation passagieren.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Beschreibung des Sphären-Bildungspotenzials von Sca-1⁺ Zellen aus extrapancreatischem Gewebe. So zeigten epitheliale Sca-1⁺ Zellen der Brustdrüse ähnliche Sphären-Bildungskapazität unter Serum-freien Bedingungen und reorganisierten Brustdrüsengewebe in vivo [29]. Eine weitere Studie identifizierte die Sca-1 Expression exklusiv in Tumor-Sphären der Mamma, während epitheliale Tumorzellen ohne Sphären-Bildungskapazität auch keine Sca-1 Expression

Diskussion

aufwiesen [38]. In einer Studie über Herzmuskelvorläuferzellen ließen sich ähnliche Beobachtungen anstellen. Sca-1⁺ Zellen bildeten dichte Myosphären aus, während Sca-1 Knockout-Zellen sowie Zellen von Sca-1^{-/-} Mäusen lediglich vereinzelt blieben oder lockere Verbände ausbildeten [94]. Auch eine andere Gruppe wies die Fähigkeit der klonalen Teilung von Sca-1⁺ Herzmuskelzellen nach und zeigte, dass selbst nach 30 Tagen Kultivierungszeit noch 61% der Zellen das Sca-1 Antigen exprimierten [136]. Auch prostatistische Sca-1⁺Cd49f⁺Cd45⁻Cd31⁻Ter119⁻ Zellen waren fähig, über mehrere Generationen Sphären zu bilden und differenzierten sich in tubuläre Strukturen mit basalen und luminalen Zellen bei Retransplantation in vivo [69]. Die gleiche Gruppe identifizierte auch stark steigende Sca-1 Expressionslevel in Tumor Promotions- und Progressions-Modellen [134].

Pankreatisch exprimiertes Sca-1 als Marker für eine epitheliale Zellpopulation mit der Fähigkeit zur klonalen Teilung wurde bislang nur unzureichend bzw. kontrovers diskutiert. Seaberg et al. (2004) konnten keine vermehrte Fähigkeit zur Bildung von Sca-1⁺ Kolonien in vitro nachweisen. Sie stellten fest, dass C-kit dessen Transkriptlevel in dieser Arbeit auch induziert in Kultur nachgewiesen wurde, in einem speziell entwickelten Kultursystem erhöht in Sphären exprimiert wurde [81]. Samuelson et al. (2011) hingegen wiesen in Kolonien unter nicht-Stammzell-typischen Bedingungen eine hohe Proliferationsaktivität von Sca-1⁺ Zellen über mehrere Passagen nach mit der Fähigkeit, geringe Mengen Insulin zu produzieren.

Der Anteil von Sca-1⁺ Zellen wurde wie oben beschrieben, bislang mit 25% im embryonalen Pankreas [81] beziffert. Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben einen Anteil von 1,46% (Einzelzellen) bzw. 2,89% (Einzelzellen und Doubletten) im epithelialen Zell-Isolat adulter Mäuse. Die Fähigkeit dieser Zellen klonale Sphären in vitro auszubilden attribuiert diesen Zellen einen Zustand hoher Plastizität. Ob es sich bei diesem Zelltyp um vollständig differenzierte Zellen handelt, die durch äußere Stimuli einen progenitor-ähnlichen Zustand annehmen können (FSCs), oder eine echte residente Vorläuferzellpopulation beschrieben wird, kann diese Untersuchung nicht abschließend beurteilen. Hierfür wären weiterführende in vivo Charakterisierungen von Sca-1⁺ Zellen unerlässlich.

Ein weiterer interessanter Ansatz für zukünftige In-vitro-Untersuchungen wäre hier auch die Klärung des Zusammenhanges der C-kit und Sca-1 Co-Expression bzw. der C-kit Expression alleine auf die Sphären-Bildungskapazität unter Serum-freien Bedingungen.

V.3.3 Morphologie und Differenzierungsstufen in dreidimensionaler Kulturumgebung

Unter Serum-freien Bedingungen in Matrigel bestätigte sich die schon bereits in Suspensionskultur nachgewiesene ausgeprägte Sphärenbildungskapazität von Sca-1⁺ Zellen ebenso wie die Fähigkeit Kolonien zu bilden, die teilweise in tubulären und planen Strukturen aus den Sphären auswuchsen (s. **Abb.13 / Abb.16**). In Matrigel kultivierte, hohle Sphären wiesen dabei deutlich höhere Durchmesser auf als ihr Äquivalent in Suspensionskultur, mit konstanter Größenzunahme bis zu 14 Tage nach Beginn der Kultivierung (s. **Abb.14**).

Analog zu dieser Feststellung wurde diese Eigenschaft der Sphären- und Kolonienbildung als Differenzierungsstufe auch bei in Matrigel kultivierten Sca-1⁺ Zellen der Prostata beschrieben. Nach Anreicherung und Replantation regenerierten diese dabei duktale Strukturen in vivo [69]. Auch beschrieben ist, dass Sca-1⁺ endotheliale Zellen in Matrigel angiogenetische Eigenschaften aufwiesen [133] und Sca-1⁺/C-kit⁺ Zellen aus Speicheldrüsen-Isolaten sich in Zellen der hepatischen und endokrinen pankreatischen Linie differenzierten [49].

Zell-Isolate dieser Arbeit wurden ausschließlich nach Sca-1 Expression diskriminiert und separiert. Immunfluoreszenzstudien ergaben aber eine Überlappung der Expression die sich sowohl in Sphären als auch in planen Kulturen detektieren ließ. Dabei ließ sich in Sphären C-kit im Vergleich zu Sca-1 nur zu einem geringen Anteil nachweisen (s. **Abb.15**). In den bereits oben genannten Studien zu Myosphären [136] ebenso wie im embryonalen Pankreas [81] konnte eine Überlappung der Expression bereits detektiert werden. Interessanterweise zeigten dabei Sphären früher Kultivierungsphasen (dargestellt an Tag 5 Kulturen) eine hohe, fast homogene Sca-1 Expression während in späteren „Outgrow-Kolonien“ (s. **Abb.15b / Abb.16**) das Sca-1 Antigen nur noch zu gewissen Teilen nachweisbar war. Dies könnte ein Hinweis auf mögliche Differenzierungsprozesse sein, die mit dem Verlust der Sca-1 Expression einhergehen.

Nach längerer Kultivierungszeit (s. **Abb.17**) exprimierten die Zellen aus Sca-1⁺ Isolaten in losen Zellverbänden und dichten Kolonien auch den Stammzellmarker Nestin. Über den Differenzierungsstatus dieser Zellen lässt sich nur mutmaßen. Nestin wird als spezifischer Marker einer multipotenten pankreatischen Vorläuferzellpopulation, wie bereits oben erwähnt, kontrovers diskutiert [26, 54, 63, 68, 80, 143]. So wurden Nestin⁺ Zellen z.B. aus den Langerhanschen Inseln die Eigenschaft zugeschrieben sich in vitro in verschiedene pankreatische Zelltypen differenzieren zu können [143]. Eine andere Studie hingegen weist

eine Nestin Expression exokriner Zellen auch im adulten Pankreas nach [26]. Jüngere Untersuchungen, die erhöhte Nestin Expression nach Gewebeschäden feststellten stützen eher die Hypothese der regenerativen Eigenschaften von epithelialen Nestin⁺ Vorläuferzellen [63]. Doppelt-Immunfluoreszenzstudien von Sca-1 und Nestin im adulten Pankreas sowie in Zell-Isolaten könnten hier den Zusammenhang von Sca-1 und Nestin eingehender beschreiben.

Das zellmorphologisch heterogene Bild von Sca-1⁺ Zellen in Langzeitkulturen (s. **Abb.16 / Abb.17**) spiegelte sich auch auf Expressionsebene wieder. Untersuchte Kolonien exprimierten E-Cadherin, duktales Ck19 und azinäre Amylase (s. **Abb.18**). Auch endotheliales Cd31 konnte nachgewiesen werden. Das Sca-1 Antigen wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr transient exprimiert. Eine Co-Expression von Sca-1 mit duktalem Markertranskripten konnte nachgewiesen werden, während eine überlappende Expression mit azinären Zellen nicht festgestellt wurde.

Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei dieser Zellpopulation in vitro nicht um funktionell intakte Azinuszellen handelt, unabhängig davon ob Sca-1⁺ Zellen in vivo einen azinären Phänotyp ausprägen und über Dedifferenzierungsprozesse ihre azinustypischen Expressionsmuster unterdrücken oder sich in in vitro wieder in diese ausdifferenzieren können. In der submandibulären Drüse wurde die Beobachtung gemacht, dass Sca-1 nach Hauptgangligation vor allem in duktalem, aber nicht in azinären Zellen exprimiert wurde [98]. Eine weitere Studie, die eine pankreatische Vorläuferzellpopulation beschrieb, die u.a. Sca-1 exprimierten, wiesen auf eine terminal duktales bzw. zentroazinäre Lokalisation im Gewebe hin [106]. Wie bereits oben erwähnt wurde, ist auch eine Sca-1⁺ Population im Gefäßendothel beschrieben worden mit Eigenschaften der Neovaskularisation und Ausbildung endothelialer Zellen mit *lineage*-spezifischen Markern [133]. Die Fragen nach Überlappungen in der Expression von Sca-1 und weiterer progenitorassoziierter Markertranskripte wie Aldh1A1, Nestin, Pdx-1, Sox9 sowie der Existenz embryonaler Signalkaskaden wie der Wnt/ β -catenin-Weg in diesen Zellen wären hierbei von weiterführendem Interesse. Im Allgemeinen zielen Studien in dreidimensionaler Kulturumgebung wie Matrigel darauf ab, unter Limitierung des Aggregationsverhaltens und Beweglichkeit der Zellen zu unterscheiden, ob die Sphärenbildung auf klonalem Wachstum oder Multizell-Aggregation beruht [129]. Dennoch zeigt diese Methode auch Einschränkungen: Matrigel enthält als Protein-Sekret aus murinen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkomzellen eine nichtquantifizierbare Menge an Mitogenen. Dies stellt eine Limitierung der Rückführbarkeit generierter Ergebnisse auf Hypothesen molekularer Ebene dar [129].

Daher wurden die Untersuchungen in dreidimensionalen Kultursystemen in dieser Arbeit ausschließlich zur phänomenologischen Beschreibungen von möglichen Differenzierungsstufen verwendet.

V.3.4 Sca-1 und Ck19 Expression im murinen WT-Pankreas

Zur Lokalisierung und Beurteilung der Sca-1 Expression *in vivo*, wurden Gewebsschnitte vom adulten murinen Pankreas angefertigt und immunhistochemisch analysiert. Auf diese Weise detektierte Sca-1⁺ Zellen *in vivo* geben dabei den durchflusszytometrisch bestimmten Anteil an dem Gesamtzell-Aufkommen sehr gut wieder. Das Sca-1 Antigen wird nicht transient azinär oder duktal exprimiert, wie das *Co-Staining* mit CK 19 ergab (s. **Abb.19**).

Sca-1⁺ Zellen befanden sich vor allem in den Interlobärspalten und in enger Nachbarschaft zu duktalem Strukturen. Samuelson et al. (2011) beschrieben bereits ein ähnliches *Staining*-Muster für Ck19 und Sca-1 im murinen Pankreas. Eine direkt überlappende Expression ließ sich in dieser Arbeit jedoch nicht eindeutig belegen.

Interessanterweise zeigten auch endotheliale Zellen ein positives *Staining* und korrelierten somit mit den oben bereits nachgewiesenen Kolonien von Cd31⁺ Zellen im Sca-1⁺ Zell-Isolat. Die Lokalisation von Sca-1⁺ Zellen *in vivo* könnte daher gut mit einem Zellphänotyp mit regenerativem Potential verknüpft werden, die von der Peripherie aus bei Gewebeschäden in die funktionellen Einheiten einwandern können, um durch Proliferation, Replikation und/oder Differenzierung die Gewebshomöostase wieder herzustellen. Die Zusammenschau der Daten, dass Sca-1 neben epithelialer Expression auch in geringeren Umfang in stromalen Zellen transkribiert, sowie im Gefäßendothel lokalisiert werden konnte, lässt auf eine heterogene pankreatische Population schließen. Die phänotypische Expressionsverteilung involviert dabei Sca-1⁺ Zellen aus entodermaler sowie mesodermaler Herkunft.

Bei den in dieser Arbeit charakterisierten pankreatischen epithelialen Sca-1⁺ Zellen handelt es sich um eine distinkte Population von 1,46% lokalisiert in den periazinären Räumen und radiär angeordnet um duktalem Strukturen und den Langerhansschen Inseln. Angereichert in *in-vitro*-Kultursystemen, zeigten Sca-1⁺ Zellen die Fähigkeit klonale Sphären, duktalem Strukturen und morphologisch vielfältige Kolonien auszubilden mit Expression von Nestin, c-kit und Marker-Transkripten der duktalem pankreatischen Linie. Korrespondierend zu der Typ-I-Interferon abhängigen Aktivierung von hämatopoetischen Stammzellen ließ sich Sca-1 auch in pankreatischen Epithelzellen in mono- und Co-Kultur-Ansätzen sowie unter

Diskussion

Behandlung von Interferon- β , anreichern. Zusammenfassend kann man sagen, das diese Population charakterisiert durch ihre hohe Plastizität und Differenzierungspotential sowie der Überlappung von Signalwegen der angeborenen Immunität mit induktiven Signalwegen von Stamm- und Vorläuferzellen, Eigenschaften aufweist die mit einer adulten fakultativen Stammzellpopulation vereinbar wäre.

Da vor allem die funktionellen Untersuchungen hinsichtlich der Plastizität von Sca-1⁺ Zellen ex vivo getätigt wurden und somit in ihrer Aussage limitiert bleiben, wären weiterführende in vivo-Experimente unabdingbar. Hier wäre zum Beispiel der Ansatz denkbar, Sca-1⁺, GFP⁺ Zellen mit Sca-1⁻, GFP⁺ Zellen in inflammatorisch veränderte murine Pankreata einzubringen und die Regenerationsfähigkeit der Populationen zu vergleichen. Ein ähnlicher Ansatz wurde bereits in der Prostata erfolgreich durchgeführt [134].

Vielversprechend sind auch die jüngst und umfassend in vivo nachgewiesenen Ergebnisse zur Regenerationsfähigkeit Sca-1⁺ Zellen im murinen Herzmuskel [125]. Auch wären Sca-1 Expressions- und durchflusszytometrische-Analysen in neoplastisch verändertem Pankreasgewebe denkbar, um Hinweise auf den Stellenwert von pankreatischen Sca-1⁺-Zellen in der Tumorinitiation und Progression zu erhalten. So konnte in prostatistischen Tumor-Progressionsmodellen bereits stark erhöhte Fraktionen von Sca-1⁺ Zellen nachgewiesen werden und Sca-1⁺ Tumorsphären der Mamma zeigten eine ausgeprägte neoplastische Aktivität in vivo im Vergleich zu Sca-1⁻ Tumorzellen [38, 88, 134]. Analoge Versuche zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen Sca-1⁺ Zellen und der Tumorgenese im Pankreas wären denkbar.

VI. Zusammenfassung

Die gezielte Untersuchung von Zellpopulationen mit Vorläuferzeleigenschaften gewann in den letzten Jahren auch in soliden Organen wie dem Pankreas zunehmend an Bedeutung. Hier vor allem mit der Zielsetzung Grundlagen für Zellersatztherapien bei Typ-I-Diabetes zu schaffen sowie neue Erkenntnisse über Initiation und Karzinogenese des duktales Adenokarzinoms (PDAC) zu erlangen: Die Einführung molekularbiologischer Methoden wie FACS, kombiniert mit Assays zur Evaluation von Klonalität und Differenzierungsfähigkeit, stellten hier fortschrittsdefinierende Methoden dar. Im embryonalen Pankreas konnten Pdx1⁺-, Cpa1⁺-, Ngn 3⁺-Zellen bereits Progenitoreigenschaften attribuiert werden. Jüngere Ansätze lieferten Hinweise, dass die hämatopoetischen Stammzellmarker C-kit und Sca-1 vornehmlich in Organen mit exokrinen Kompartimenten von Zellen exprimiert werden, denen regenerative Eigenschaften zugeschrieben wurden. Wenig ist bekannt über Expression, transkriptionelle Regulation und Plastizität von pankreatischen Zellen, die das Sca-1 Antigen exprimieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sca-1 auch von einer distinkten pankreatischen Population von etwa 1,46 % des Epithelzell-Isolats exprimiert wird. Im murinen Gewebeverband residieren diese Zellen vor allem in den Interlobärspalten, in Nachbarschaft zu duktales Strukturen sowie in den periazinären Regionen. Separiert und angereichert in in-vitro-Kultursystemen, zeigten Sca-1⁺ Zellen die Fähigkeit zur Bildung klonaler Sphären sowie Kolonien planer und verzweigt-duktales Morphologien mit Expression von Nestin, C-kit, Cd 31 sowie Markern der exokrinen pankreatischen Linie. Zudem konnte Typ-I-Interferon korrespondierend zu der Aktivierung von hämatopoetischen Stammzellen als regulativer Faktor der Sca-1 Anreicherung auf pankreatischen Zellen in Mono- und Co-Kulturansätzen mit primären stromalen Zellen identifiziert werden. In Zellisolaten von Knockout-Mäusen konnte diese Überlappung von Signalwegen der angeborenen Immunität mit induktiven Signalwegen von Stamm- und Vorläuferzellen dargestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Population durch ihre hohe Plastizität und Differenzierungspotential sowie der regulativen Einflussnahme durch Mediatoren der Entzündungsantwort charakterisiert ist. Sie weist Eigenschaften auf, die mit einer adulten fakultativen Stammzellpopulation vereinbar wären. Die Untersuchung der Expression

Zusammenfassung

weiterer Progenitor-assoziiertes-Markertranskripte wie Aldh1A1, Nestin, Pdx-1, Sox9 und embryonale Signalwege wie der Wnt/ β -catenin-Weg wären obligat für eine ganzheitliche Charakterisierung dieser Zellpopulation Da diese Studien ex vivo getätigt wurden, wären zudem Studien zur Untersuchung des Beitrages von Sca-1 zur Gewebshömeostase in vivo unabdingbar. Folglich wäre auch die Rolle von Sca-1⁺ Zellen in der Genese und Progression von Neoplasien von weiterführendem Interesse.

VII. Literaturverzeichnis:

1. Amsterdam, A. and J. D. Jamieson (1974). "Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. II. Functional characteristics of separated cells." *J Cell Biol* 63(3): 1057-1073.
2. Amsterdam, A., Jamieson, J. D. (1974). "Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. I. Dissociation technique and morphologic characteristics of separated cells." *J Cell Biol* 63(3): 1037-1056.
3. Apelqvist, A., H. Li, L. Sommer, P. Beatus, D. J. Anderson, T. Honjo, M. Hrabe de Angelis, U. Lendahl and H. Edlund (1999). "Notch signalling controls pancreatic cell differentiation." *Nature* 400(6747): 877-881.
4. Bailey, B., J. Fransioli, N. A. Gude, R. Alvarez, Jr., X. Zhang, A. B. Gustafsson and M. A. Sussman (2012). "Sca-1 knockout impairs myocardial and cardiac progenitor cell function." *Circ Res* 111(6): 750-760.
5. Baker, M. (2009). "State of the stem cell." *Nature Reports Stem Cells*, from <http://www.nature.com/stemcells/2009/0910/091022/full/stemcells.2009.132.html>.
6. Bamezai, A. and K. L. Rock (1995). "Overexpressed Ly-6A.2 mediates cell-cell adhesion by binding a ligand expressed on lymphoid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4294-4298.
7. Bhatia, M., M. Brady, S. Shokuchi, S. Christmas, J. P. Neoptolemos and J. Slavin (2000). "Inflammatory mediators in acute pancreatitis." *J Pathol* 190(2): 117-125.
8. Bhatia, M., F. L. Wong, Y. Cao, H. Y. Lau, J. Huang, P. Puneet and L. Chevali (2005). "Pathophysiology of acute pancreatitis." *Pancreatology* 5(2-3): 132-144.
9. Bhushan, A., N. Itoh, S. Kato, J. P. Thiery, P. Czernichow, S. Bellusci and R. Scharfmann (2001). "Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis." *Development* 128(24): 5109-5117.
10. Bjerknes, M. and H. Cheng (1981). "The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse." *Am J Anat* 160(1): 51-63.
11. Blanpain, C. and E. Fuchs (2006). "Epidermal stem cells of the skin." *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 339-373.
12. Bonner-Weir, S., L. A. Baxter, G. T. Schuppin and F. E. Smith (1993). "A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development." *Diabetes* 42(12): 1715-1720.
13. Bonner-Weir, S. and A. Sharma (2002). "Pancreatic stem cells." *J Pathol* 197(4): 519-526.
14. Bonner-Weir, S., M. Taneja, G. C. Weir, K. Tatarkiewicz, K. H. Song, A. Sharma and J. J. O'Neil (2000). "In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7999-8004.
15. Bonner-Weir, S., D. F. Trent and G. C. Weir (1983). "Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release." *J Clin Invest* 71(6): 1544-1553.
16. Bonyadi, M., S. D. Waldman, D. Liu, J. E. Aubin, M. D. Grynbas and W. L. Stanford (2003). "Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5840-5845.

17. Brissova, M., M. Shiota, W. E. Nicholson, M. Gannon, S. M. Knobel, D. W. Piston, C. V. Wright and A. C. Powers (2002). "Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion." *J Biol Chem* 277(13): 11225-11232.
18. Brockenbrough, J. S., G. C. Weir and S. Bonner-Weir (1988). "Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats." *Diabetes* 37(2): 232-236.
19. Burger, P. E., X. Xiong, S. Coetzee, S. N. Salm, D. Moscatelli, K. Goto and E. L. Wilson (2005). "Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(20): 7180-7185.
20. Burnham, D. B., D. J. McChesney, K. C. Thurston and J. A. Williams (1984). "Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro." *J Physiol* 349: 475-482.
21. Campbell, M., Davidson College, Department of Biology. (2001). "Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)." from <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/facs.html>.
22. Cheong J. Lee, J. D., and Diane M. Simeone (2008). "Pancreatic Cancer Stem Cells." *J Clin Oncol* 26.
23. Cornelius, J. G., V. Tchernev, K. J. Kao and A. B. Peck (1997). "In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas." *Horm Metab Res* 29(6): 271-277.
24. De Lisle, R. C. and C. D. Logsdon (1990). "Pancreatic acinar cells in culture: expression of acinar and ductal antigens in a growth-related manner." *Eur J Cell Biol* 51(1): 64-75.
25. Dekel, B., L. Zangi, E. Shezen, S. Reich-Zeliger, S. Eventov-Friedman, H. Katchman, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, G. Rechavi, R. Margalit and Y. Reisner (2006). "Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney." *J Am Soc Nephrol* 17(12): 3300-3314.
26. Delacour, A., V. Nepote, A. Trumpp and P. L. Herrera (2004). "Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages." *Mech Dev* 121(1): 3-14.
27. Dessimoz, J., R. Opoka, J. J. Kordich, A. Grapin-Botton and J. M. Wells (2006). "FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo." *Mech Dev* 123(1): 42-55.
28. Dor, Y. and D. A. Melton (2008). "Facultative endocrine progenitor cells in the adult pancreas." *Cell* 132(2): 183-184.
29. Dou, X., B. Zhang, R. Liu, J. Li, D. Shi, C. Lu, X. Zhu, L. Liao, Z. Du and R. C. Zhao (2012). "Expanding Sca-1(+) mammary stem cell in the presence of oestrogen and growth hormone." *Clin Transl Oncol* 14(6): 444-451.
30. Du, Z., L. Wei, A. Murti, S. R. Pfeffer, M. Fan, C. H. Yang and L. M. Pfeffer (2007). "Non-conventional signal transduction by type 1 interferons: the NF-kappaB pathway." *J Cell Biochem* 102(5): 1087-1094.
31. Epting, C. L., J. E. Lopez, X. Shen, L. Liu, J. Bristow and H. S. Bernstein (2004). "Stem cell antigen-1 is necessary for cell-cycle withdrawal and myoblast differentiation in C2C12 cells." *J Cell Sci* 117(Pt 25): 6185-6195.
32. Folias, A. E., C. Penaranda, A. L. Su, J. A. Bluestone and M. Hebrok (2014). "Aberrant Innate Immune Activation following Tissue Injury Impairs Pancreatic Regeneration." *PLoS One* 9(7): e102125.
33. Gallmeier, E., C. Schafer, P. Moubarak, A. Tietz, I. Plossl, R. Huss, B. Goke and A. C. Wagner (2005). "JAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN-gamma in rat pancreatic acinar cells." *J Cell Physiol* 203(1): 209-216.

34. Ganten, D., Köhrle, J. und J. Adamski (2006). Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. Springer. Google Books: 32-37.
35. Gattass, C. R., L. B. King, A. D. Luster and J. D. Ashwell (1994). "Constitutive expression of interferon gamma-inducible protein 10 in lymphoid organs and inducible expression in T cells and thymocytes." *J Exp Med* 179(4): 1373-1378.
36. Gauthier, B. R., T. Brun, E. J. Sarret, H. Ishihara, O. Schaad, P. Descombes and C. B. Wollheim (2004). "Oligonucleotide microarray analysis reveals PDX1 as an essential regulator of mitochondrial metabolism in rat islets." *J Biol Chem* 279(30): 31121-31130.
37. Gradwohl, G., A. Dierich, M. LeMeur and F. Guillemot (2000). "neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1607-1611.
38. Grange, C., S. Lanzardo, F. Cavallo, G. Camussi and B. Bussolati (2008). "Sca-1 identifies the tumor-initiating cells in mammary tumors of BALB-neuT transgenic mice." *Neoplasia* 10(12): 1433-1443.
39. Grapin-Botton, A. (2005). "Antero-posterior patterning of the vertebrate digestive tract: 40 years after Nicole Le Douarin's PhD thesis." *Int J Dev Biol* 49(2-3): 335-347.
40. Gu, D. and N. Sarvetnick (1993). "Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-g transgenic mice." *Development* 118(1): 33-46.
41. Gu, G., J. Dubauskaite and D. A. Melton (2002). "Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors." *Development* 129(10): 2447-2457.
42. Gukovskaya, A. S., I. Gukovsky, Y. Jung, M. Mouria and S. J. Pandol (2002). "Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis." *J Biol Chem* 277(25): 22595-22604.
43. Guo, T. and M. Hebrok (2009). "Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy." *Endocr Rev* 30(3): 214-227.
44. Hao, E., B. Tyrberg, P. Itkin-Ansari, J. R. Lakey, I. Geron, E. Z. Monosov, M. Barcova, M. Mercola and F. Levine (2006). "Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas." *Nat Med* 12(3): 310-316.
45. Hartner, J. C., C. R. Walkley, J. Lu and S. H. Orkin (2009). "ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling." *Nat Immunol* 10(1): 109-115.
46. Hermann, P. C., S. L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J. W. Ellwart, M. Guba, C. J. Bruns and C. Heeschen (2007). "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." *Cell Stem Cell* 1(3): 313-323.
47. Herrera, P. L. (2000). "Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages." *Development* 127(11): 2317-2322.
48. Hezel, A. F., A. C. Kimmelman, B. Z. Stanger, N. Bardeesy and R. A. Depinho (2006). "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Genes Dev* 20(10): 1218-1249.
49. Hisatomi, Y., K. Okumura, K. Nakamura, S. Matsumoto, A. Satoh, K. Nagano, T. Yamamoto and F. Endo (2004). "Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages." *Hepatology* 39(3): 667-675.
50. Holmes, C. and W. L. Stanford (2007). "Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma." *Stem Cells* 25(6): 1339-1347.
51. Huang, E. H., M. J. Hynes, T. Zhang, C. Ginestier, G. Dontu, H. Appelman, J. Z. Fields, M. S. Wicha and B. M. Boman (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and

- malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis." *Cancer Res* 69(8): 3382-3389.
52. Hughes, C. S., L. M. Postovit and G. A. Lajoie (2010). "Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture." *Proteomics* 10(9): 1886-1890.
53. Hultcrantz, M., M. H. Huhn, M. Wolf, A. Olsson, S. Jacobson, B. R. Williams, O. Korsgren and M. Flodstrom-Tullberg (2007). "Interferons induce an antiviral state in human pancreatic islet cells." *Virology* 367(1): 92-101.
54. Hunziker, E. and M. Stein (2000). "Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans." *Biochem Biophys Res Commun* 271(1): 116-119.
55. Ischenkoa, I., Petrenkob, O. und M. J. Haymana (2014). "Analysis of the tumor-initiating and metastatic capacity of PDX1-positive cells from the adult pancreas." *PNAS* 111(9): 3466.
56. Ito, C. Y., C. Y. Li, A. Bernstein, J. E. Dick and W. L. Stanford (2003). "Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice." *Blood* 101(2): 517-523.
57. Jiang, F., Q. Qiu, A. Khanna, N. W. Todd, J. Deepak, L. Xing, H. Wang, Z. Liu, Y. Su, S. A. Stass and R. L. Katz (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer." *Mol Cancer Res* 7(3): 330-338.
58. Jiang, H., P. H. Patel, A. Kohlmaier, M. O. Grenley, D. G. McEwen and B. A. Edgar (2009). "Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut." *Cell* 137(7): 1343-1355.
59. Kafadar, K. A., L. Yi, Y. Ahmad, L. So, F. Rossi and G. K. Pavlath (2009). "Sca-1 expression is required for efficient remodeling of the extracellular matrix during skeletal muscle regeneration." *Dev Biol* 326(1): 47-59.
60. Kahlert, C., F. Bergmann, J. Beck, T. Welsch, C. Mogler, E. Herpel, S. Dutta, T. Niemietz, M. Koch and J. Weitz (2011). "Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer." *BMC Cancer* 11: 275.
61. Kaiser, S. (Dezember 2004). Untersuchung humaner Stammzellen aus dem adulten Knochenmark und der fetalen Leber. Dr.rer. nat., Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
62. Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." *Immunity* 23(1): 19-28.
63. Kedees, M. H., Y. Guz, P. M. Vuguin, C. Vargas, L. Cui, D. F. Steiner, M. J. Charron and G. Teitelman (2007). "Nestin expression in pancreatic endocrine and exocrine cells of mice lacking glucagon signaling." *Dev Dyn* 236(4): 1126-1133.
64. Kondo, S. and I. Schulz (1976). "Calcium ion uptake in isolated pancreas cells induced by secretagogues." *Biochim Biophys Acta* 419(1): 76-92.
65. Kong, B., C. W. Michalski, M. Erkan, H. Friess and J. Kleeff (2011). "From tissue turnover to the cell of origin for pancreatic cancer." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8(8): 467-472.
66. Krapp, A., M. Knofler, B. Ledermann, K. Burki, C. Berney, N. Zoerkler, O. Hagenbuchle and P. K. Wellauer (1998). "The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas." *Genes Dev* 12(23): 3752-3763.
67. Ku, H. T. (2008). "Minireview: pancreatic progenitor cells--recent studies." *Endocrinology* 149(9): 4312-4316.
68. Lardon, J., I. Rومان and L. Bouwens (2002). "Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells." *Histochem Cell Biol* 117(6): 535-540.

69. Lawson, D. A., L. Xin, R. U. Lukacs, D. Cheng and O. N. Witte (2007). "Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1): 181-186.
70. LeBras, S., P. Czernichow and R. Scharfmann (1998). "A search for tyrosine kinase receptors expressed in the rat embryonic pancreas." *Diabetologia* 41(12): 1474-1481.
71. Lee, J. Y., Z. Qu-Petersen, B. Cao, S. Kimura, R. Jankowski, J. Cummins, A. Usas, C. Gates, P. Robbins, A. Wernig and J. Huard (2000). "Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing." *J Cell Biol* 150(5): 1085-1100.
72. Leeson, T. S. and R. Leeson (1986). "Close association of centroacinar/ductular and insular cells in the rat pancreas." *Histol Histopathol* 1(1): 33-42.
73. Leong, K. G., B. E. Wang, L. Johnson and W. Q. Gao (2008). "Generation of a prostate from a single adult stem cell." *Nature* 456(7223): 804-808.
74. Lewis, P. D. (1968). "Mitotic activity in the primate subependymal layer and the genesis of gliomas." *Nature* 217(5132): 974-975.
75. Lewis, P. D. (1968). "A quantitative study of cell proliferation in the subependymal layer of the adult rat brain." *Exp Neurol* 20(2): 203-207.
76. Li, C., D. G. Heidt, P. Dalerba, C. F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M. F. Clarke and D. M. Simeone (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." *Cancer Res* 67(3): 1030-1037.
77. Li, J., J. Quirt, H. Q. Do, K. Lyte, F. Fellows, C. G. Goodyer and R. Wang (2007). "Expression of c-Kit receptor tyrosine kinase and effect on beta-cell development in the human fetal pancreas." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2): E475-483.
78. Lickert, H., C. Domon, G. Huls, C. Wehrle, I. Duluc, H. Clevers, B. I. Meyer, J. N. Freund and R. Kemler (2000). "Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine." *Development* 127(17): 3805-3813.
79. Liu, S., G. Dontu and M. S. Wicha (2005). "Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis." *Breast Cancer Res* 7(3): 86-95.
80. Lumelsky, N., O. Blondel, P. Laeng, I. Velasco, R. Ravin and R. McKay (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." *Science* 292(5520): 1389-1394.
81. Ma, F., F. Chen, Y. Chi, S. Yang, S. Lu and Z. Han (2012). "Isolation of pancreatic progenitor cells with the surface marker of hematopoietic stem cells." *Int J Endocrinol* 2012: 948683.
82. Macey, M. G., D. Davies (2007). *Flow Cytometry: Principles and Applications*. H. Press: 257-276.
83. Martens, D. J., V. Tropepe and D. van Der Kooy (2000). "Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone." *J Neurosci* 20(3): 1085-1095.
84. Matsuura, K., T. Nagai, N. Nishigaki, T. Oyama, J. Nishi, H. Wada, M. Sano, H. Toko, H. Akazawa, T. Sato, H. Nakaya, H. Kasanuki and I. Komuro (2004). "Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes." *J Biol Chem* 279(12): 11384-11391.
85. Means, A. L., I. M. Meszoely, K. Suzuki, Y. Miyamoto, A. K. Rustgi, R. J. Coffey, Jr., C. V. Wright, D. A. Stoffers and S. D. Leach (2005). "Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates." *Development* 132(16): 3767-3776.
86. Mitchell, P. O., T. Mills, R. S. O'Connor, E. R. Kline, T. Graubert, E. Dzierzak and G. K. Pavlath (2005). "Sca-1 negatively regulates proliferation and differentiation of muscle cells." *Dev Biol* 283(1): 240-252.

87. Morisset, J., J. Wood, T. E. Solomon and L. Larose (1987). "Muscarinic receptors and amylase secretion of rat pancreatic acini during cerulein-induced acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 32(8): 872-877.
88. Mulholland, D. J., L. Xin, A. Morim, D. Lawson, O. Witte and H. Wu (2009). "Lin-Sca-1+CD49^{high} stem/progenitors are tumor-initiating cells in the Pten-null prostate cancer model." *Cancer Res* 69(22): 8555-8562.
89. Murtaugh, L. C., A. C. Law, Y. Dor and D. A. Melton (2005). "Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development." *Development* 132(21): 4663-4674.
90. Okada, S., H. Nakauchi, K. Nagayoshi, S. Nishikawa, Y. Miura and T. Suda (1992). "In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells." *Blood* 80(12): 3044-3050.
91. Oliver-Krasinski, J. M. and D. A. Stoffers (2008). "On the origin of the beta cell." *Genes Dev* 22(15): 1998-2021.
92. Pastrana, E., V. Silva-Vargas and F. Doetsch (2011). "Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells." *Cell Stem Cell* 8(5): 486-498.
93. Peikin, S. R., A. J. Rottman, S. Batzri and J. D. Gardner (1978). "Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas." *Am J Physiol* 235(6): E743-749.
94. Penvose, A. and K. A. Westerman (2012). "Sca-1 is involved in the adhesion of myosphere cells to alphaVbeta3 integrin." *Biol Open* 1(9): 839-847.
95. Pflugh, D. L., S. E. Maher and A. L. Bothwell (2002). "Ly-6 superfamily members Ly-6A/E, Ly-6C, and Ly-6I recognize two potential ligands expressed by B lymphocytes." *J Immunol* 169(9): 5130-5136.
96. Pinho, A. V., I. Rooman, M. Reichert, N. De Medts, L. Bouwens, A. K. Rustgi and F. X. Real (2011). "Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis." *Gut* 60(7): 958-966.
97. Pour, P. (1978). "Islet cells as a component of pancreatic ductal neoplasms. I. Experimental study: ductular cells, including islet cell precursors, as primary progenitor cells of tumors." *Am J Pathol* 90(2): 295-316.
98. Purwanti, N., M. R. Karabasil, S. Matsuo, G. Chen, P. Javkhan, A. Azlina, T. Hasegawa, C. Yao, T. Akamatsu and K. Hosoi (2011). "Induction of Sca-1 via activation of STAT3 system in the duct cells of the mouse submandibular gland by ligation of the main excretory duct." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301(5): G814-824.
99. Rachdi, L., L. El Ghazi, F. Bernex, J. J. Panthier, P. Czernichow and R. Scharfmann (2001). "Expression of the receptor tyrosine kinase KIT in mature beta-cells and in the pancreas in development." *Diabetes* 50(9): 2021-2028.
100. Ramiya, V. K., M. Maraist, K. E. Arfors, D. A. Schatz, A. B. Peck and J. G. Cornelius (2000). "Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells." *Nat Med* 6(3): 278-282.
101. Rane, S. G., J. H. Lee and H. M. Lin (2006). "Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease." *Cytokine Growth Factor Rev* 17(1-2): 107-119.
102. Rasheed, Z. A., J. Yang, Q. Wang, J. Kowalski, I. Freed, C. Murter, S. M. Hong, J. B. Koorstra, N. V. Rajeshkumar, X. He, M. Goggins, C. Iacobuzio-Donahue, D. M. Berman, D. Laheru, A. Jimeno, M. Hidalgo, A. Maitra and W. Matsui (2010). "Prognostic significance of

- tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma." *J Natl Cancer Inst* 102(5): 340-351.
103. Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* 414(6859): 105-111.
104. Rooman, I., Y. Heremans, H. Heimberg and L. Bouwens (2000). "Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro." *Diabetologia* 43(7): 907-914.
105. Rosenberg, L. (1995). "In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells." *Cell Transplant* 4(4): 371-383.
106. Rovira, M., S. G. Scott, A. S. Liss, J. Jensen, S. P. Thayer and S. D. Leach (2010). "Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1): 75-80.
107. Sachdeva, M. M., K. C. Claiborn, C. Khoo, J. Yang, D. N. Groff, R. G. Mirmira and D. A. Stoffers (2009). "Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(45): 19090-19095.
108. Sagi-Assif, O., A. Traister, B. Z. Katz, R. Anavi, M. Eskenasy and I. P. Witz (1996). "TNFalpha and anti-Fas antibodies regulate Ly-6E.1 expression by tumor cells: a possible link between angiogenesis and Ly-6E.1." *Immunol Lett* 54(2-3): 207-213.
109. Samuelson, L., Wright, N. und D.A. Gerber (2011). "Endodermal progenitor cells isolated from mouse pancreas " *Stem Cell Discovery* 1: 44 - 53
110. Sato, T., N. Onai, H. Yoshihara, F. Arai, T. Suda and T. Ohteki (2009). "Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion." *Nat Med* 15(6): 696-700.
111. Schultz, G. S., M. P. Sarras, Jr., G. R. Gunther, B. E. Hull, H. A. Alicea, F. S. Gorelick and J. D. Jamieson (1980). "Guinea pig pancreatic acini prepared with purified collagenase." *Exp Cell Res* 130(1): 49-62.
112. Schwitzgebel, V. M., D. W. Scheel, J. R. Connors, J. Kalamaras, J. E. Lee, D. J. Anderson, L. Sussel, J. D. Johnson and M. S. German (2000). "Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas." *Development* 127(16): 3533-3542.
113. Seaberg, R. M., S. R. Smukler, T. J. Kieffer, G. Enikolopov, Z. Asghar, M. B. Wheeler, G. Korbutt and D. van der Kooy (2004). "Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages." *Nat Biotechnol* 22(9): 1115-1124.
114. Seigel, G. M., L. M. Campbell, M. Narayan and F. Gonzalez-Fernandez (2005). "Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma." *Mol Vis* 11: 729-737.
115. Sharma, A., D. H. Zangen, P. Reitz, M. Taneja, M. E. Lissauer, C. P. Miller, G. C. Weir, J. F. Habener and S. Bonner-Weir (1999). "The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration." *Diabetes* 48(3): 507-513.
116. Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 31-39.
117. Singh, L., D. K. Bakshi, S. Majumdar, R. K. Vasishta, S. K. Arora and J. D. Wig (2007). "Expression of interferon-gamma-inducible protein-10 and its receptor CXCR3 in chronic pancreatitis." *Pancreatology* 7(5-6): 479-490.
118. Singh, M. (1980). "Amylase release from dissociated mouse pancreatic acinar cells stimulated by glucagon: effect of membrane stabilizers." *J Physiol* 309: 81-91.

119. Spangrude, G. J., S. Heimfeld and I. L. Weissman (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." *Science* 241(4861): 58-62.
120. Spence, J. R. and J. M. Wells (2007). "Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells." *Dev Dyn* 236(12): 3218-3227.
121. Suzuki, A., H. Nakauchi and H. Taniguchi (2004). "Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting." *Diabetes* 53(8): 2143-2152.
122. Teta, M., M. M. Rankin, S. Y. Long, G. M. Stein and J. A. Kushner (2007). "Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors." *Dev Cell* 12(5): 817-826.
123. Toma, J. G., M. Akhavan, K. J. Fernandes, F. Barnabe-Heider, A. Sadikot, D. R. Kaplan and F. D. Miller (2001). "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin." *Nat Cell Biol* 3(9): 778-784.
124. Trumpp, A., M. Essers and A. Wilson (2010). "Awakening dormant haematopoietic stem cells." *Nat Rev Immunol* 10(3): 201-209.
125. Uchida, S., P. De Gaspari, S. Kostin, K. Jenniches, A. Kilic, Y. Izumiya, I. Shiojima, K. Grosse Kreymborg, H. Renz, K. Walsh and T. Braun (2013). "Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart." *Stem Cell Reports* 1(5): 397-410.
126. Van Damme, J., M. R. Schaafsma, W. E. Fibbe, J. H. Falkenburg, G. Opdenakker and A. Billiau (1989). "Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection." *Eur J Immunol* 19(1): 163-168.
127. Vilne B., I. R., Eckl C., Bock F., Grziwok S., da Costa Olivia P., Schiemann M., Peschel C., Mewes H.W., Oostendorp A.J. (2013). Connective Tissue Growth Factor (Ctgf/Ccn2) Is a Novel Extrinsic Niche-Derived Regulator Of Hematopoietic Stem Cells. 55th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA
128. Wang, R. N., G. Kloppel and L. Bouwens (1995). "Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats." *Diabetologia* 38(12): 1405-1411.
129. Wang, Y. J., J. M. Bailey, M. Rovira and S. D. Leach (2013). "Sphere-forming assays for assessment of benign and malignant pancreatic stem cells." *Methods Mol Biol* 980: 281-290.
130. Welm, B. E., S. B. Tepera, T. Venezia, T. A. Graubert, J. M. Rosen and M. A. Goodell (2002). "Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population." *Dev Biol* 245(1): 42-56.
131. Williams, J. A., M. Korc and R. L. Dormer (1978). "Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini." *Am J Physiol* 235(5): 517-524.
132. Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." *Nat Rev Immunol* 6(2): 93-106.
133. Xiao, Q., L. Zeng, Z. Zhang, A. Margariti, Z. A. Ali, K. M. Channon, Q. Xu and Y. Hu (2006). "Sca-1+ progenitors derived from embryonic stem cells differentiate into endothelial cells capable of vascular repair after arterial injury." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(10): 2244-2251.
134. Xin, L., D. A. Lawson and O. N. Witte (2005). "The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(19): 6942-6947.
135. Yashpal, N. K., J. Li and R. Wang (2004). "Characterization of c-Kit and nestin expression during islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas." *Dev Dyn* 229(4): 813-825.

136. Ye, J., Boyle, A., und H. Shih, (2012) "Sca-1+ Cardiosphere-Derived Cells Are Enriched for Isl1-Expressing Cardiac Precursors and Improve Cardiac Function after Myocardial Injury." *PLoS One* 7, e30329 DOI: 10.1371/journal.pone.0030329.
137. Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney and D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* 90(12): 5002-5012.
138. Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina and L. Li (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." *Nature* 425(6960): 836-841.
139. Zhao, X., G. Ren, L. Liang, P. Z. Ai, B. Zheng, J. A. Tischfield, Y. Shi and C. Shao (2010). "Brief report: interferon-gamma induces expansion of Lin(-)Sca-1(+)C-Kit(+) Cells." *Stem Cells* 28(1): 122-126.
140. Zhou, Q., J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal and D. A. Melton (2008). "In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells." *Nature* 455(7213): 627-632.
141. Zhou, Q., A. C. Law, J. Rajagopal, W. J. Anderson, P. A. Gray and D. A. Melton (2007). "A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis." *Dev Cell* 13(1): 103-114.
142. Zorn, A. M. and J. M. Wells (2007). "Molecular basis of vertebrate endoderm development." *Int Rev Cytol* 259: 49-111.
143. Zulewski, H., E. J. Abraham, M. J. Gerlach, P. B. Daniel, W. Moritz, B. Muller, M. Vallejo, M. K. Thomas and J. F. Habener (2001). "Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes." *Diabetes* 50(3): 521-533.

VIII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

I. Einleitung

Abbildungen:

- Abb.01: Embryonale Entwicklungsstufen und transkriptionelle Regulation in vivo und in embryonalen Stammzell-Kulturen
Abb.02: Schematische Darstellung der Wirkung von Interferon- α auf die Proliferation von HSC in vivo

II. Material und Methoden

Abbildungen:

- Abb.01: Berechnung der Zellzahl
Abb.02: Schematische Darstellung des Versuchsansatzes in Co-Kultur
Abb.03: Analysealgorithmus nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode
Abb.04: Prinzip der durchflusszytometrischen Zellsortierung
Abb.05: Schematischer Versuchsaufbau des Zellsphären-Assay

Tabellen:

- Tbl.01: Geräte und Verbrauchsmaterialien
Tbl.02: Medien, Reagenzien, Kits
Tbl.03: Antikörper, Primer
Tbl.04: Programme
Tbl.05: Verwendete Mausstämme
Tbl.06: Ansatzabhängige Verdünnungsreihe für Caerulein
Tbl.07: Ansatzabhängige Verdünnungsreihe für Interferon- β
Tbl.08: Inkubationszeiten der HE-Färbung
Tbl.09: Programm der Gewebeprozessierung
Tbl.10: Inkubationszeiten der IHC-Doppelmarkierung
Tbl.11: Inkubationszeiten der IFF-Markierung
Tbl.12: Thermodynamische Grenzwerte für das 3'-Ende der erstellten Sequenzen
Tbl.13: Amplifizierungsschema der RT-PCR
Tbl.14: Zusammensetzung des Light Cycler Reaktionsgemisches

III. Ergebnisse

Abbildungen:

- Abb.01: mRNA-Transkriptionsprofil und mikroskopische Dokumentation des Kulturverlaufes primärer Epithelzellen
Abb.02: Messung der Amylase-, Lipase- und LDH-Aktivität im Zellmedium
Abb.03: Zytokinexpression epithelialer Zellen nach Caerulein-Stimulation

- Abb.04: Zytokin- und Chemokin-Expression in Zellen von WT^{-/-}- und STAT 1^{-/-}-Mäusen nach Interferon-Einwirkung
- Abb.05: Vorläuferzellmarker ohne Interferon- oder Kulturabhängige-Signalamplifizierung
- Abb.06: Vorläuferzellmarker mit Kulturabhängiger-Signalamplifizierung während einer dreitägigen Kultivierungszeit
- Abb.07: Markertranskripte zeigen einen Interferon-induzierten Anstieg in Epithelzellen mit suffizienter IFNAR-JAK-STAT-Signaltransduktion
- Abb.08: mRNA-Transkriptionsprofil und mikroskopische Dokumentation des Kulturverlaufes primärer Stromazellen
- Abb.09: Sca-1 Signalamplifizierung in Co – Kultivierung mit primären Stromazellen ± Interferon
- Abb.10: Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von Sca-1⁺ Zellen aus dem primären Epithelzell-Isolat
- Abb.11: Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von unbehandelten- und mit Interferon präinkubierten Zellen
- Abb.12: Zellsphären-Assay (engl.: sphere formation assay)
- Abb.13: Sca-1⁺ Zellen in dreidimensionaler Kulturumgebung
- Abb.14: Sca-1⁺ Sphären in dreidimensionaler Kulturumgebung
- Abb.15: Sca-1⁺ /C-kit Expression in sphärischer und planer Zellstruktur
- Abb.16: Morphologie von Zellkolonien und einzelnen Zellen nach einer 10 –14-tägigen Kultivierungszeit in Matrigel
- Abb.17: Morphologie und Nestin-Expression Sca-1⁺ Kolonien nach einer 10 – 14-tägigen Kultivierungszeit
- Abb.18: Expression von epithelialen und endothelialen Markern von Sca-1⁺ Kolonien nach einer 10-14-tägigen Kultivierungszeit
- Abb.19: Verteilung von Sca-1 und Ck19 im murinen WT Pankreas

IX. Abkürzungsverzeichnis

-	negativ
+	positiv
-/-	engl.: Double knockout
ΔG	Freie Reaktions-Enthalpie
A ₁	Ansatz 1
<i>α-sma</i>	engl.: Alpha smooth muscle actin
Ak	Antikörper
<i>Aldh1a1</i>	engl.: Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1
<i>Amy</i>	engl.: Amylase
bp	engl.: Base Pair(s)
BSA	engl.: Bovine serum albumin
<i>Ca2</i>	engl.: Carbonanhydrase 2
CCK	Cholecystokinin
CD“X“	engl.: Cluster of differentiation- “X“
CDC	engl.: Center for disease control and prevention
cDNA	engl.: Contemplementary DNA
<i>Cftr</i>	engl.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
<i>Ck-19</i>	engl.: Cytokeratin-19
<i>C-kit</i>	engl.: Tyrosine-proteine kinase Kit
CPA1	engl.: Carboxypeptidase A1
CSC	engl.: Cancer stem cell
C _t -Wert	engl.: Cycle treshold
<i>Cxcl-10 /11</i>	engl.: C-X-C motif chemokine 10/11
<i>Cxcr-4</i>	engl.: Chemokine (C-X-C motif) receptor-4
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
ddH ₂ O	engl.: Double distilled H ₂ O
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Effizienz
EGF	engl.: Epidermal growth factor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm Sarkomzellen
ES	engl.: Embryonic stem cell
ESA	engl.: Epidermal surface antigen
F/R-Primer	engl.: Forward/reverse primer
FACS	engl.: Fluorescence-activated cell sorting
FCS	engl.: Fetal calf serum
FGF	engl.: Fibroblast growth factor
Fox	engl.: Forkhead box
FRET	engl.: Fluorescence resonance energy transfer
FSC	engl.: Forward scatter
FSC	engl.: facultative stemcell
G ₀	engl.: G-zero-phase / resting phase
GAS	engl.: Y-interferon activation site
GFP	engl.: Green fluorescent protein

<i>Hes1</i>	engl.: Hairy and enhancer of split-1
<i>Hey1</i>	engl.: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1
HMG	engl.: High mobility group
HNF	engl.: Hepatocyte nuclear factor
Hox	engl.: Homeobox
HSC	engl.: Hematopoetic stem cell
IFNAR	Interferon- α/β receptor
IFN- α/β	Interferon- α/β
<i>Il-1b</i>	engl.: Interleukin 1b
<i>Il-6</i>	engl.: Interleukin 6
IM1-3	Inkubationsmedium 1-3
<i>Ins</i>	engl.: Insulin
ISC	engl.: Intestinal stem cell
JAK	engl.: Januskinase
K/O	engl.: Knockout
K ₁	Kammer 1
LDH	Laktat Dehydrogenase
LSK	engl.: Lineage-negative (Lin(-)), Sca1-positive, c-kit-negative
mRNA	engl.: Messenger RNA
Mw	engl.: Molecular weight
NF- κ B	engl.: Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Ngn 3	engl.: Neurogenin 3
OD	optische Dichte
P ₀	Kontroll-Probe, entnommen bei Versuchsbeginn
P ₁	Test-Probe, entnommen bei Behandlungs-/ Versuchsende
PBS	engl.: Phosphate buffered saline
pc	lat.: post conceptionem
PCR	Polymeras-Kettenreaktion
PDAC	engl.: Pancreatic ductal adenocarcinoma
<i>Pdx1</i>	engl.: Pancreatic and duodenal homeobox 1
<i>Ppib</i>	engl.: Peptidyl-prolyl cis-trans-Isomerase B
PSC	engl.: Pancreatic stem cell
<i>Ptf1a</i>	engl.: Pancreas specific transcription factor 1a
<i>Ptprc</i>	engl.: Protein tyrosine phosphatase receptor type C
qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
RA	engl.: Retinoic acid
RBPJ	engl.: Recombining binding protein suppressor of hairless
RNA	Ribonukleinsäure
<i>Rpl13a</i>	engl.: Ribosomal protein 13A
rpm	engl.: Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Sca-1	engl.: Stem cell antigen-1
SEM	engl.: Standard error of the mean
SFM	engl.: Serum-free-medium
SSC	engl.: Side scatter
STAT1	engl.: Signal transducers and activators of transcription 1
T ₀	Versuchsbeginn
T ₁	Versuchsende

Abkürzungsverzeichnis

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	engl.: Tris-buffered saline and tween
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	engl.: Transforming growth factor- β
<i>Tnf-α</i>	engl.: Tumor necrosis factor- α
u	engl: Unit
VF	Vergrößerung
Vim	engl.: Vimentin
WT	Wildtyp

Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
m	Meter
m"X"	Milli-"X"
min	Minute
mol	Mol
n"X"	Nano-"X"
p"X"	Pico-"X"
sec	Sekunde
μ "X"	Mikro-"X"

X. Lebenslauf

Personalien

Name: Georg P. L. Leinenkugel
Geburtsdatum: 11.05.1985
Geburtsort: Freiburg im Breisgau
Familienstand: ledig
Wohnort: Stapferstrasse 63, CH-8006 Zürich
E-Mail: g.leinenkugel@web.de

Berufstätigkeit

seit 03/2017 Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin des Universitätsspitals Zürich, Chefarzt: Prof. Dr. E. Battegay

02/2014 – 12/2016 Assistenzarzt der Medizinischen Klinik des Seespital Horgen, Chefarztin: Dr. Barbara Federspiel

Ausbildung

08/2008-11/2013 **Studium der Humanmedizin**, Technische Universität München
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08/2006-08/2008 **Studium der Humanmedizin**, Semmelweis Universität Budapest
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08/1996-06/2005 Kolleg St. Sebastian Stegen

08/1992-08/1996 Grundschule Kirchzarten

XI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen herzlich danken, die mir die Promotion und dieses Studium ermöglicht und mich auf diesem Weg begleitet haben:

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater PD. Dr. Christoph Michalski und Prof. Dr. Jörg Kleeff für die Vergabe des interessanten Themas und die Ermöglichung der Promotion in der Pankreasforschungsgruppe der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar.

PD Dr. Christoph Michalski begleitete meine Arbeit mit fachlichem Rat und bot ein Umfeld mit vielen Möglichkeiten der fachlichen und persönlichen Weiterentwicklung. Er ließ mir in der Konzeption der Experimente auch bei erhöhtem finanziellem Aufwand stets meinen Freiraum. Herzlichen Dank für das in mich gesetzte Vertrauen und die fortdauernd kompetente und fürsorgliche Betreuung.

Ebenso danken möchte ich auch Dr. Susanne Raulefs und Dr. Bo Kong, PhD. für ihre exzellente fachliche Betreuung und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für jegliche Probleme bei der Durchführung der Experimente hatten. Ihre Hilfe bei der Interpretation der Daten und ihre ansteckende wissenschaftliche Begeisterung waren besonders während Durststrecken für mich sehr motivierend.

Des Weiteren bedanke ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Entzündung und Karzinogenese“ für die nette, humorvolle und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei Nadja Maeritz für die Einarbeitung in die Immunhistochemie und Katharina Miller für die Kooperation im Rahmen der Stammzellassays, Dr. Simon Rieder und Patrick Winterhalter für die Einarbeitung in die Isolations und PCR-Analysemethoden und Dr. Ivane Abiatari für die Einführung in die Proteanalytik.

Ich danke auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Klinische Chemie und dem Institut für medizinische Mikrobiologie des Klinikums rechts der Isar für die Kooperation in der Durchführung von ELISA- und FACS-Analysen,

den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „ Immunsuppression und postoperative Sepsis“ um Prof. Holzmann für die Bereitstellung ihrer Untersuchungseinheiten zur PCR-Analyse.

Den Mitarbeitern des Steh-Cafes in der Prinzregentenstraße und der IO-Lounge für mäßigen Kaffee, aber blendende Gesellschaft während langer Inkubationszeiten oder anderer technischer Pausen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für die von Herzen kommende moralische Unterstützung und die finanzielle Absicherung. Ohne meine Eltern hätte diese Arbeit niemals gelingen können. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.