



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



Chirurgische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

Charakterisierung einer perizytären Zellpopulation im Pankreas und in
der Pankreatitis

Verena Barchfeld

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

Vorsitzender: Univ. – Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: apl. Prof. Dr. J. H. Kleeff

Univ. – Prof. Dr. H. Friess

Die Dissertation wurde am 26.03.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.11.2015 angenommen.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Das Pankreas.....	2
1.2 Die Zellen des exokrinen Pankreas und ihre Pathologien	2
1.3 Pankreatitis und Regeneration	5
1.4 Perizyten	7
1.5 Mesenchymale Stammzellen.....	13
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Laborgeräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	21
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.4 Medien.....	24
2.1.5 Antikörper	24
2.1.6 Pufferlösungen.....	25
2.1.7 Biologisches Material.....	27
2.2 Methoden	27
2.2.1 HE-Färbung	27
2.2.2 <i>In-situ</i> -Immunlokalisation	28
2.2.3 Durchflusszytometrie	31
2.2.4 Zellsorter.....	35
2.2.5 Magnetisches Sorten	37
2.2.6 Zellkultur	39
2.2.7 Induktion einer sterilen Inflammation im Pankreas	40
3 Ergebnisse	43
3.1 Lokalisation und Morphologie von Perizyten im murinen Pankreas	43

3.2	Expression von mesenchymalen Stammzellmarkern auf pankreatischen Perizyten in der Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie	48
3.3	Isolation und Kulturbeobachtungen von pankreatischen Perizyten	55
3.4	Verhalten von pankreatischen Perizyten während einer sterilen Inflammation.....	64
4	Diskussion.....	75
4.1	Pankreatische Perizyten liegen typischerweise perivaskulär und zeigen eine typische Morphologie.....	75
4.2	Pankreatische Perizyten exprimieren mesenchymale Stammzellmarker und Sca-1	76
4.3	Die Isolation von pankreatischen Perizyten ist mittels magnetischem Sorten möglich	78
4.4	Nach steriler Inflammation steigt der prozentuale Anteil pankreatischer Perizyten und mesenchymaler Stammzellen.....	80
4.5	Ausblick.....	83
5	Zusammenfassung	84
	Literaturverzeichnis	85
	Abbildungsverzeichnis.....	96
	Tabellenverzeichnis	101
	Anhang.....	102
A1	Durchflusszytometrie: Anteile der Perizyten- und mesenchymale Stammzellemarker im murinen Pankreas in %.....	102
A2	Durchflusszytometrie: Anteile der Perizyten- und mesenchymale Stammzellemarker in der Pankreatitis in %.....	102
	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumin Fraktion V)
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
g	Gramm
h	<i>hour</i> (Stunde)
MACS	<i>Magnetic activated cell sorter</i>
mg	Milligramm
Min	Minute
MSC	<i>Mesenchymale Stem Cell</i> (Mesenchymale Stammzelle)
PBS	<i>Phosphate – buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
Rpm	<i>Rounds per Minute</i> (Runden pro Minute)
Sek	Sekunde
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
NaCl	Natrium-Chlorid
CCK	Cholecystokinin
S.	Seite
αSMA	<i>alpha-Smooth-Muscle-Actin</i>
NG2	Neural glial Antigen 2
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated-molecular pattern</i>

1 Einleitung

Das Pankreas ist ein Organ, welches Quelle schwerwiegender Erkrankungen ist, die häufig nur symptomatisch therapierbar sind. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit Zellen, die eventuell in der Zukunft neue Ansatzpunkte für Therapiemöglichkeiten der pankreatischen Erkrankungen darstellen könnten.

Erkrankungen des Pankreas gehen oft mit einer deutlich erhöhten Mortalität einher (Malevezzi et al., 2013), (Banks, Freeman and The Practise Parameters Committee of the American College of Gastroenterology, 2006). Das Pankreas war 2009 in der EU das Organ mit den vierthäufigsten zum Tode führenden Tumoren und das einzige mit schwerwiegenden Tumorerkrankungen, bei denen keine Verbesserung der Rate für die nächsten Jahre vorhergesagt wird (Malevezzi et al., 2013). Darüber hinaus besitzt das duktales Pankreaskarzinom eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5% (Kong et al., 2011). Auch für die akute Pankreatitis, bei der es zu bis zu 100 Erkrankung pro 100.000 Personen im Jahr kommen kann (Petersen, Gerasimenko and Gerasimenko, 2011) und die in 10-20 % der Fälle eine systemische Entzündungsreaktion hervorruft (Banks, Freeman and The Practise Parameters Committee of the American College of Gastroenterology, 2006), gibt es bisher noch keine spezifische Therapie (Petersen, Gerasimenko and Gerasimenko, 2011).

Um neue erfolgsversprechende Therapien zu entwickeln, wurde in den letzten Jahren unter anderem ein großes Augenmerk auf Vorläufer- und mesenchymale Stammzellen (Kong et al., 2011) (S. 467), (Kassem, Kristiansen and Abdallah, 2004) (S. 211), (Yanger and Stanger, 2010) (S. 525) und auf Perizyten (Bagley et al., 2006) (S. 163), (Song et al., 2005) (S. 877) gerichtet. Bereits seit einiger Zeit ist bekannt, dass Perizyten im Tumor eine wichtige funktionelle Rolle zuzuordnen ist (Bagley et al., 2006) (S. 163), (Song et al., 2005) (S. 877) und es wurde erfolgreich versucht mit Hilfe ihrer Eigenschaften Tumorstadium im murinen Pankreas zu reduzieren (Song et al., 2005) (S. 877). Neuere Studien berichten über Perizyten, die das Immunsystem initiieren und somit einen Ansatzpunkt für Entzündungstherapien darstellen könnten (Stark et al., 2013) (S. 50). Außerdem wird ihre Rolle in der regenerativen Medizin für vielfältige Gewebe diskutiert (Crisan et al., 2012) (S. 2851), (Farrington-Rock et al., 2004) (S. 2226).

In diesem Kapitel wird zunächst das Organ Pankreas mit seinen speziellen Zellen und deren Pathologien näher vorgestellt. Dabei wird im Besonderen auf die perivaskulären Zellen und mesenchymalen Stammzellen eingegangen. Anschließend daran wird die Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit erläutert.

1.1 Das Pankreas

Das Pankreas ist eine Drüse, welche einen Enzyme enthaltenden Verdauungssaft produziert (Lüllmann-Rauch, 2006) (S. 402). Werden diese Enzyme im Organ selbst aktiviert, kann es durch eine Selbstverdauung zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung kommen (Lüllmann-Rauch, 2006) (S. 405).

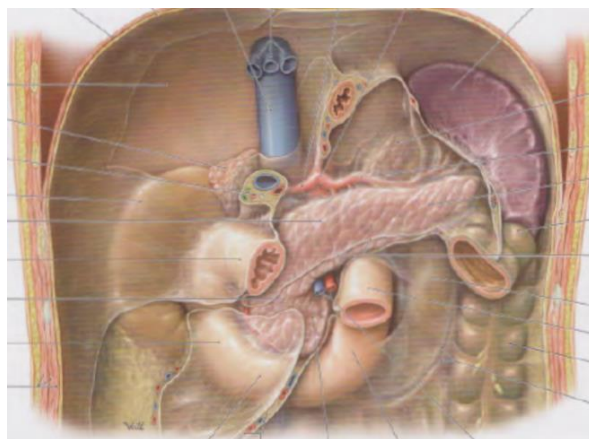
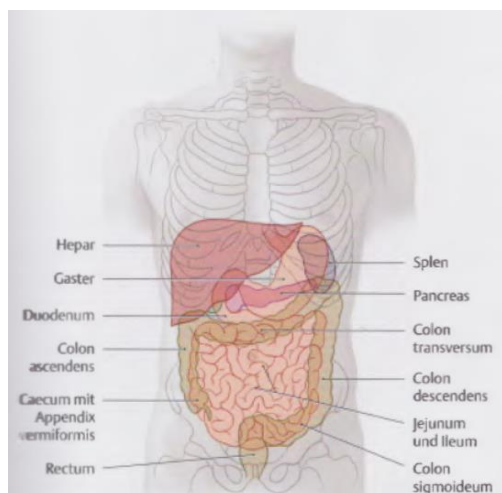


Abbildung 1.1 Übersichtsdarstellung der Lage des Pankreas und Pankreas im Situs im Verhältnis zu den Nachbarorganen Duodenum und Milz (Schünke et al., 2005) (S.151 und S. 215)

Die Drüse setzt sich aus vielen einzelnen Läppchen zusammen, welche in eine Bindegewebsschicht eingebettet sind. Es wird zwischen einem endokrinen und einem exokrinen Anteil unterschieden. Der endokrine Anteil wird histologisch von den Langerhans-Inseln repräsentiert, welche die Hormone Insulin, Glukagon, Somatostatin und das pankreatische Polypeptid bilden. Diese regulieren unter anderem den Kohlenhydratstoffwechsel, haben aber auch Einfluss auf den exokrinen Anteil des Pankreas (Welsch, 2005) (S. 403).

1.2 Die Zellen des exokrinen Pankreas und ihre Pathologien

Azinuszellen, zentroazinäre Zellen, Schaltstücke und duktale Zellen

Das exokrine Pankreas besteht aus den Azinuszellen, die Endstücke der Drüse sind. Dort werden die Pankreasenzyme synthetisiert und in das angrenzende Schaltstück sezerniert (Abbildung 1.2, a). Die Pankreasenzyme spalten Stärke (Amylase), Fett (Lipase, Phospholipase A), sowie Peptide (Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidase, Aminopeptidase, Elastase) (Welsch, 2005) (S.403). Einige Enzyme werden als inaktive Vorstufen abgegeben, welche erst im Zusammenspiel

mit anderen Enzymen im Duodenum aktiviert werden (Lüllmann-Rauch, 2006) (S.404). So wird eine Selbstverdauung des Organs im physiologischen Zustand verhindert. Das Hormon Cholezystokinin, welches im Duodenum und Jejunum produziert wird, kann die Produktion der Verdauungsenzyme stimulieren (Welsch, 2005) (S.403).

Weitere Zellen sind zentroazinäre Zellen, Schaltstücke und duktale Zellen, die den Verdauungssaft in den Zwölffingerdarm drainieren (Lüllmann-Rauch, 2006) (S.404-405).

Bindegewebe, Stellatum Zellen

Die Azini werden durch Bindegewebe in Lappen und Läppchen unterteilt (Abbildung 1.2, d). Dieses Bindegewebe, welches zwischen Drüsenläppchen verläuft, führt die größeren Ausführungsgänge, sowie Nerven und Gefäße, welche die Zellen des Organs innervieren und mit Blut versorgen (Lüllmann-Rauch, 2006) (S.403). Neben den zum Bindegewebe gehörenden Fibroblasten, welche zur Bildung der extrazellulären Matrix beitragen (Lüllmann-Rauch, 2006) (S.114), finden sich auch sogenannte Stellatum- Zellen periazinär, perivaskulär und periduktal im Gewebe. Diese noch nicht allzu lange bekannten Zellen stehen mit der in der Pankreatitis entstehenden Fibrose im Zusammenhang und spielen auch im Tumor eine unterstützende Rolle in dessen Proliferation (Omary et al., 2007) (S.50, 53-54).

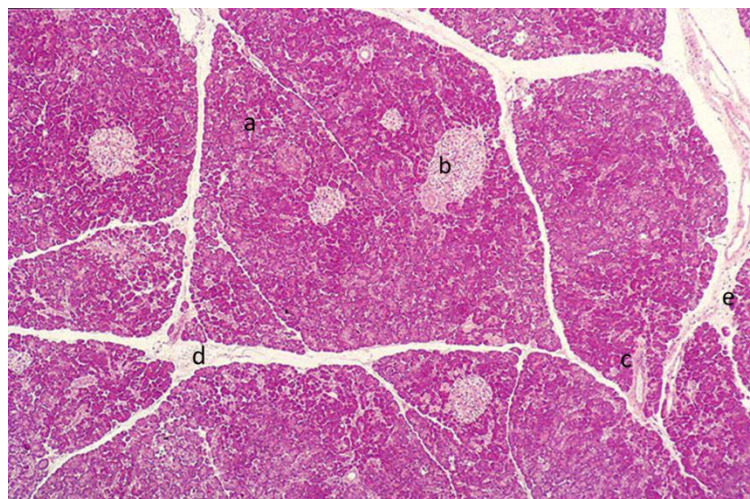


Abbildung 1.2 Histologie des Pankreas (frei nach (Barthels, 2011)

a: Läppchen mit Azini, b: Langerhans-Insel, c: Ausführungsgang, d: Bindegewebe, e: Gefäß im periazinären Bindegewebe

Gefäße

Die Gefäßversorgung des Pankreas wird über zahlreiche Seitenäste gewährleistet. Die aus der Hauptschlagader entspringenden Gefäße Truncus coeliacus und Arteria

mesenterica superior geben jeweils Seitenäste (über die A. pancreaticoduodenalis superior, die A. splenica und die A. pancreaticoduodenalis inferior) zum Pankreas ab (Schünke et al., 2005) (S. 267). Aus sich verzweigenden Arterien werden Arteriolen, diese wiederum zu Kapillaren, auf die wiederum Venolen folgen und Venen, die zum Herzen zurückführen, siehe Abbildung 1.2, e. Die Kapillaren, welche den Ort des Gasaustausches darstellen, bestehen aus Endothelzellen, einer Basallamina und Perizyten. Die Endothelzellen bilden die Grenze zwischen dem Intravasalraum und den tieferen Wandschichten. Sie kleiden das Gefäß lückenlos von innen aus und verhindern so unter anderem die Adhäsion von Blutzellen. Außerdem regulieren sie die Durchwanderung des Gefäßes von Entzündungszellen (Lüllmann-Rauch, 2006) (S. 237, 241, 246). Je nach Organ erfüllen die Endothelzellen zusätzlich verschiedene Rollen. Hier seien nur einige, wie die Blut-Hirn-Schranke als Beispiel erwähnt, bei der die Zellen durch sogenannte *tight junctions* eng verbunden sind, wohingegen beispielsweise die Endothelzellen in der Niere fenestriert und damit viel durchlässiger angelegt sind. Zur Identifizierung dieser Zellen im Gewebe können verschiedene Marker verwendet werden. Wie die Endothelzellen an sich sind diese jedoch auch sehr heterogen exprimiert (Cines et al., 1998) (S. 3531). Marker, die zur Identifikation von Endothelzellen verwendet werden sind zum Beispiel VE-Cadherin, von Willebrand factor (vWF), CD34 oder CD31 (Abbildung 1.4) (Cines et al., 1998) (S. 3530-3531) (Pusztaszeri, Seelentag and Bosman, 2006) (S. 385). CD31, auch bekannt als *Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1* (PECAM-1), ist ein transmembranäres Glykoprotein, welches in der Entzündung eine Rolle in der Migration der Entzündungszellen besitzt (Pusztaszeri, Seelentag and Bosman, 2006) (S. 386). In den Endothelzellen wird CD31 im Bereich der *tight junctions* exprimiert (Rijcken et al., 2007) (S. 446), es sitzt aber auch auf Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Pusztaszeri, Seelentag and Bosman, 2006) (S. 386). Da es als ein etablierter Marker für Endothelzellen gilt (Pusztaszeri, Seelentag and Bosman, 2006) (S. 393), wurde es in dieser Arbeit zu deren Identifikation verwendet.

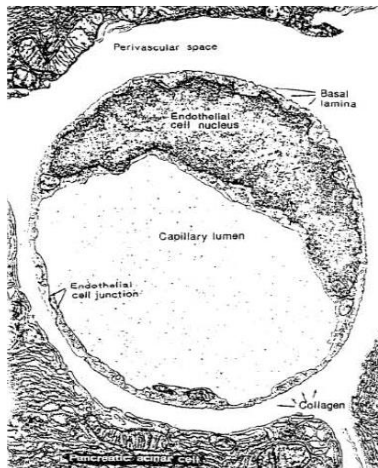


Abbildung 1.3 Kapilläre Endothelzellen eines Meerschweinchen-Pankreas in elektronenmikroskopischer Aufnahme (Cines et al., 1998) (S. 3531)

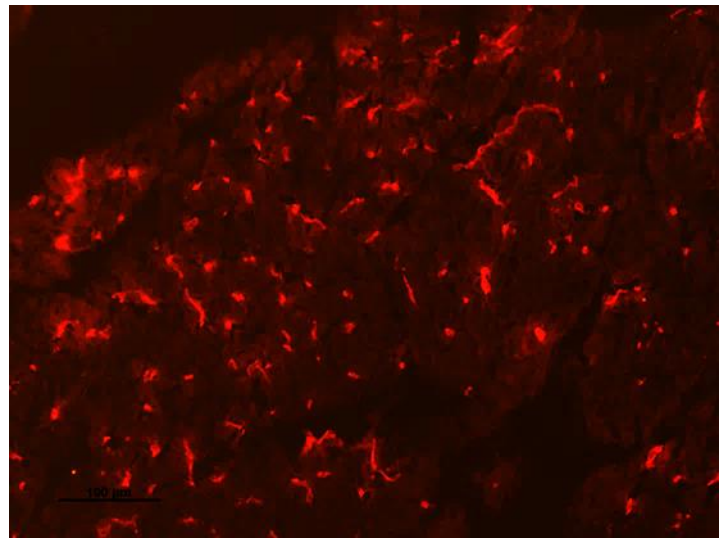


Abbildung 1.4 Immunfluoreszenz von CD31+ Endothelzellen im Pankreas

Nur durch eine Basallamina getrennt, sitzen den Endothelzellen von der intraluminal abgewandten Seite die Perizyten auf (Lüllmann-Rauch, 2006) (S. 246-247). Diese sollen im Folgenden genauer besprochen werden (1.4).

1.3 Pankreatitis und Regeneration

Entzündung ist die Reaktion des Körpers auf eine Schädigung des Gewebes. Diese kann durch Erreger oder unbelebte Noxen hervorgerufen werden (Thomas, 2006) (S.19). Im Pankreas handelt es sich meistens um eine sterile, nicht von Erregern induzierte Entzündung, die durch die pathologische Aktivierung der Verdauungsenzyme in den Azinuszellen selbst hervorgerufen wird. Diese sogenannte akute Pankreatitis wird vor allem durch einen Stau der Verdauungssäfte auf Grund von Gallensteinen oder durch exzessiven Alkoholgenuss hervorgerufen. Dies betrifft bis zu 100 pro 100.000 Einwohner im Jahr, wovon ca. 5% der Fälle tödlich enden (Petersen, Gerasimenko, & Gerasimenko, 2011) (S.1). Physiologischer Weise führen durch den Neurotransmitter Acetylcholin und das Hormon Cholezystokinin getriggerte intrazelluläre Calcium-Spikes am apikalen Pol der Zelle zur Exozytose und damit zum Abtransport der Verdauungsproenzyme. Im Fall der akuten Pankreatitis herrscht ein durch verschiedene Noxen ausgelöster generalisierter stark erhöhter Calciumspiegel im Zytosol der Zelle, welcher zu einer intrazellulären Aktivierung der Enzyme führt (Petersen, Gerasimenko, & Gerasimenko, 2011) (S.2). Die Aktivierung eines Calcium-bindenden Proteins,

Calmodulin, stellt einen Therapieansatz zur Behandlung der alkoholinduzierten Pankreatitis dar (S.4).

Die Regeneration eines Gewebes wird als Prozess beschrieben, bei dem neue Zellen entstehen um die Zellen zu ersetzen, welche bei einem Gewebsschaden untergegangen sind. Diese Ersatzzellen können durch Replikation ansässiger differenzierter Zellen oder durch Differenzierung von Stammzellen entstehen (Yanger and Stanger, 2011) (S.521).

In der Leber sind diese Mechanismen schon weitgehend erforscht. So entsteht nach Leberteilresektion ein kompletter Wiederaufbau des abgetrennten Gewebes durch Replikation differenzierter Leberzellen. Als Folge einer Intoxikation zeigt sich dagegen eine Regeneration durch sogenannte „ovale Zellen“, welche sich als duktale Zellen darstellen und bei Zellschaden in die Lobuli auswandern, um die dort untergegangenen Zellen zu ersetzen.

Anders als in der Leber beobachtet man im Pankreas nach einer Teilentfernung des Organs selten das Auftreten von kompensierendem, neu entstandenem Gewebe (Yanger and Stanger, 2011) (S.524-525). Wenn aber durch einen intrinsisch gegebenen Gewebsschaden, wie bei einer akuten Pankreatitis ein direkter Zellschaden der Azinuszellen entsteht, ist der Pankreas typischerweise in der Lage, sich von dieser Schädigung zu erholen und wieder eine normale Funktion zurück zu erlangen. Dieser Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass die Regeneration der Azinuszellen durch Stammzellen oder Vorläuferzellen initiiert wird (Yanger and Stanger, 2011) (S.525). Hierzu finden sich verschiedene Annahmen. Da (Jensen et al., 2005) zeigen konnte, dass überlebende Azinuszellen nach Inflammation Gene von undifferenzierten pankreatischen Vorläuferzellen wie PdX1 und Notch induzieren, halten sie eine Dedifferenzierung der Azinuszellen für wahrscheinlich (S. 728). Zusätzlich sprechen ihre Daten für eine Initiierung dieser durch mesenchymale Zellen (S.739). Dass pankreatische Vorläuferzellen auch aus Fettgewebe gewonnenen mesenchymalen Stammzellen entstehen können und diese sich sowohl in endokrine wie auch exokrine Zellen differenzieren können, zeigte die Gruppe um Jing Li (Li et al., 2013) (S.1576). (Rovira et al., 2010) (S.75) zeigt, dass zentroazinäre Zellen ebenfalls das Potenzial besitzen sich in exokrine und endokrine Zellen zu differenzieren. Ein weiterer Ansatz wird beim Betrachten des endokrinen Kompartimentes deutlich. Hier wurde gezeigt, dass aus dem dukталen Teil des Pankreas Ngn3+ Vorläufer für beta-Zellen hervor gehen (Xu et al., 2008) (S.197).

1.4 Perizyten

Perizyten („peri“- um herum) betten die Endothelzellschicht der Gefäße ein. Viele ihrer Funktionen ergeben sich durch diese Lage. Jedoch wurden besonders in den letzten Jahren neue Eigenschaften der Perizyten entdeckt, welche im Folgenden näher beschrieben werden. Zuerst einmal werden aber die morphologischen Charakteristika dieser perivaskulären Zellen besprochen.

Die Herkunft der Perizyten ist noch nicht eindeutig geklärt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass sie von Bindegewebszellen abstammen, zu den embryonalen Gefäßrohren wandern und sich beim Kontakt mit deren Oberfläche darauf ausbreiten und ausstrecken (Clark and Clark, 1925) (S.261). Im Gegensatz dazu zeigt sich im zentralen Nervensystem eine Entwicklung der Perizyten und glatter Muskelzellen aus den Zellen des Neuralrohrs (Korn, Christ and Kurz, 2002) (S.83). Andere Annahmen beschreiben, dass sich die Perizyten der Bauchhöhlenorgane aus Mesothel über epithelial-mesenchymale Umwandlung entwickeln (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.195), was somit auch für die pankreatischen Perizyten gelten würde.

Perizyten kommen an den Gefäßen der Mikrozirkulation, genauer gesagt an Arteriolen, Venolen und Kapillaren vor (Sims, 2000) (S. 842). In manchen Geweben erfüllen sie durch diese perivaskuläre Lage besondere Rollen, wie zum Beispiel im zentralen Nervensystem, wo sie zur Blut-Hirnschranke beitragen. In der Niere sind sie als Mesangiumzellen an der Ultrafiltration beteiligt und in der Leber stellen sie Ito-Zellen, Grenzstrukturen zwischen Leberparenchym und den Sinusioden der Gefäße, dar (Bergers and Song, 2005) (S.455-456).



Abbildung 1.5 Perizyt einer Kapillare (Anatomisches Institut, n.d.)

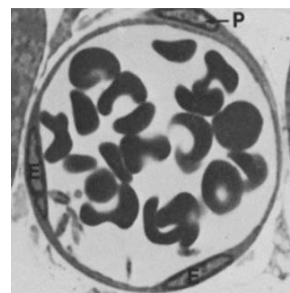


Abbildung 1.6 Perizyt im Muskelgewebe, Gefäßquerschnitt mit erythrozytengefülltem Lumen, P=Perizyt, E= Endothelzelle (Sims, 1986)(S.155)

Wie in Abbildung 1.5 zu sehen, besitzt ein Perizyt einen ellipsoid bis runden Zellkörper, von welchem sich viele Zellfortsätze am Endothelrohr entlang strecken. Der Zellkörper von Perizyten misst zwischen 5-10 μm Durchmesser. Die vom

Zellkörper in Längsrichtung ausgehenden Primärfortsätze geben Sekundärfortsätze ab, welche um das Gefäß herumgreifen. Darüber hinaus ist es Kapillarperizyten möglich, ihre Fortsätze durch umliegendes Gewebe hindurch zu andern Kapillaren hin zu strecken und dort Sekundärfortsätze anzulegen.

Je nach Lage der Perizyten gibt es einige Unterschiede, wie in Abbildung 1.7 von (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) sehr übersichtlich dargestellt wird. Von Arteriolen in Richtung Kapillaren ausgehend, werden die Querfortsätze immer kleiner, dünner und rücken näher zusammen, der Zellkörper streckt sich in Längsrichtung. Präkapillär reichen die Fortsätze weit um das Gefäß herum, in den Kapillaren umfassen sie nur noch die Hälfte des Durchmessers, siehe Abbildung 1.6. In den postkapillaren Venen werden die Sekundärfortsätze weniger häufig ausgebildet, sind verbreitert und unregelmäßiger. Hier umfassen sie das Gefäß wieder nahezu vollständig (Zimmermann, 1923) (S.79-85).

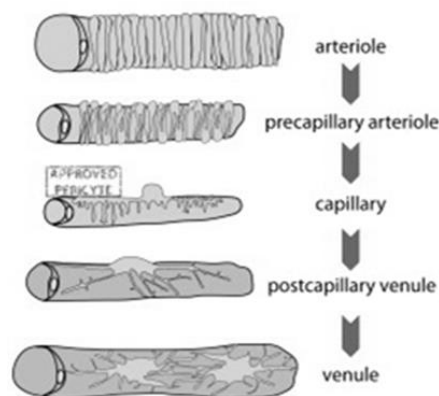


Abbildung 1.7 Morphologie der Perizyten in verschiedenen Lokalisationen (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.194)

Perizyten sind von einer Basallamina komplett umschlossen, welche sie sich mit den Endothelzellen teilen (Sims, 1986) (S.160), und somit von Fibroblasten unterschieden werden können (Nehls, Denzer and Drenckhahn, 1992) (S.473). Dass Perizyten in der Lage sind Kollagen selbst zu produzieren und damit eine Gemeinsamkeit mit glatten Muskelzellen besitzen, wurde von (Cohen, Frank and Khalifa, 1980) gezeigt (S.93). Der Übergang von glatten Muskelzellen in Perizyten wird durch Verzweigungen definiert, welche glatten Muskelzellen an den größeren Arteriolen entwickeln. Diese ersten Übergangszellen werden auch als intermediäre Zellen bezeichnet (Sims, 1986) (S.161).

Intrazellulär besitzen Perizyten muskuläre Aktine, eine weitere strukturelle Ähnlichkeit mit glatten Muskelzellen, die hinweisend darauf sein kann, dass Perizyten die Kontraktion und damit den Blutdruck von Mikrogefäßen beeinflussen (Herman and D'Amore, 1985) (S.51).

Perizyten stehen mit Endothelzellen in bedeutendem Zusammenhang hinsichtlich ihrer Lage, aber auch im Bezug auf Funktion und Pathophysiologie. Je nach Organ und Lokalisation sind die Endothelzellen verschieden stark von Perizyten bedeckt, es werden Endothel-Perizyten-Grenzflächen von 11-76% pro Endothelzelle beschrieben (Sims, 1986) (S.165). Dies ist zum einen durch die verschiedenen funktionell entwickelten Barrierefunktionen der Kapillaren zurückzuführen (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.195). Zum anderen wurde festgestellt, dass in kaudaleren Körperregionen eine höhere Perizyten-dichte zu finden ist. Man vermutet eine Reaktion der Zellen auf den erhöhten hydrostatischen Druck im Gefäß (Sims et al., 1994) (S.233, 236, 237).

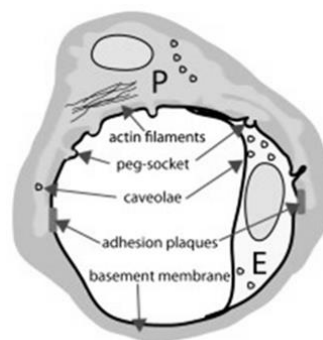


Abbildung 1.8 Perizyten-Endothelzell-Interaktion (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.194)

Es gibt verschiedene Kontakte zwischen Perizyten und Endothelzellen, die je nach Gewebe mehr oder minder ausgeprägt sein können. Die größte Kontaktfläche ist jedoch durch eine Basalmembran abgegrenzt, wie in Abbildung 1.8 gezeigt. Unterbrochen wird diese zum Beispiel durch *peg socket*-Kontakte, bei der sich Zytoplasma-Ausläufer der Perizyten in die Membran der Endothelzellen vorstülpen. Außerdem verbinden die Zellen Adhäsionsmoleküle, bei denen Mikrofilamente in Perizyten-Plasmamembran und auf der Gegenseite in Endothel-Zytoplasma verankert sind. Das Vorhandensein von *Gap junctions* ist noch nicht vollständig geklärt (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.194).

Wenn man sich nicht der Elektronenmikroskopie bedient, um Perizyten im Gewebe sichtbar zu machen, ist es besonders relevant ihre Oberflächen- und Strukturproteine zu kennen, welche als Erkennungsmarker verwendet werden können. Es wird in der Literatur häufig darauf hingewiesen, dass noch kein spezifischer Perizytenmarker bekannt ist (Gerhardt and Betsholtz, 2003) (S.18), (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.195). Die zahlreichen unspezifischen Marker werden abhängig von Lokalisation und Entwicklungsstand der Zellen exprimiert (Gerhardt and Betsholtz, 2003) (S.18). Deshalb empfiehlt es sich, mehrere Marker zu kombinieren oder

Endothelzellen zusätzlich zu markieren (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.195). Häufig in der Literatur verwendete Marker sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Marker	Morphologie + Expression + Funktion	Literatur
NG2	Das Transmembranprotein (Fukushi, Makagiansar and Stallcup, 2004) (S.3580) ist exprimiert in Oligodendrozyten-, Muskel-, Knochen- und Knorpelvorstufen (Stallcup, 2001) (S.423), sowie in perivaskuläre Zellen entlang von Arteriolen und Kapillaren, nicht an Venulen nach den Postkapillaren, nicht an Endothelzellen, reife und unreife glatte Muskelzellen, Ko-Färbung mit α SMA (Murfee, Skalak and Peirce, 2005) (S.156-157). Die Bindung von NG2 an Endothelzellen stimuliert deren Motilität und Gefäßneubildung (Fukushi, Makagiansar and Stallcup, 2004) (S.3589).	(Song et al., 2005) (Crisan et al., 2008) (Stark et al., 2013) (Mogensen et al., 2011) (Franco et al., 2011) (Bagley et al., 2006) (Maier et al., 2010) (Carlotti et al., 2010) (Tigges, Komatsu and Stallcup, 2013) (Corselli et al., 2012)
PDGFRβ	<i>Platelet – derived growth factor β</i> ist ein Oberflächenrezeptor, welcher auf sich entwickelnden Perizyten und glatten Muskelzellen zu finden ist (Hallström et al., 1999) (S.3047-3048). Der unter anderem von Endothelzellen gebildete PDGF-B (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.197-198), induziert durch Bindung am PDGFR- β eine Proliferation und Migration der Perizyten (Lindahl et al., 1997) (S.244).	(Song et al., 2005) (Mogensen et al., 2011; Maier et al., 2010) (Carlotti et al., 2010) (Tigges, Komatsu and Stallcup, 2013)
αSMA	α -Aktine sind globuläre Proteine, die in der Muskulatur vorkommen und die zusammengelagert mit Motorproteinen (Myosinen) Zellkontraktionen hervorrufen können (Lüllmann-Rauch, 2006)(S.19,22-23). Sie kommen in glatten Muskelzellen und einigen Perizytengruppen vor (Nehls and Drenckhahn, 1991) (S.153), jedoch nicht in kapillärer Position (Crisan et al., 2008) (S.302), (Nehls, Denzer and Drenckhahn, 1992)(S.473). Es wird vermutet, dass dies durch einen Gradienten des hydrostatischen Drucks zurück zu führen ist (Nehls and Drenckhahn, 1991) (S.153-154).	(Song et al., 2005) (Farrington-Rock et al., 2004) (Morikawa et al., 2002) (Crisan et al., 2008) (Doherty et al., 1998) (Mogensen et al., 2011) (Bagley et al., 2006) (Maier et al., 2010) (Carlotti et al., 2010) (Tigges, Komatsu and Stallcup, 2013)
CD146	CD146, auch Mel-Cam, gehört zu der Gruppe der Immunglobulin-Gene und ist ein membranöses Glykoprotein, welches in zahlreichen embryonalen, wie auch adulten Geweben exprimiert wird (z.B. Endothel, glattem Muskel,	(Crisan et al., 2008) (Maier et al., 2010) (Carlotti et al., 2010) (Tigges, Komatsu and Stallcup, 2013)

Schwann Zellen, Ganglion Zellen, Myofibroblasten, sowie in Melanomen). Funktionell gehört es zu den Adhäsionsmolekülen und trägt somit zur Zell-Interaktion bei (Shih, 1999) (S.4-6). CD146 wird von kapillären Endothelzellen exprimiert, jedoch nicht von Endothelzellen der Mikrogefäße und zeigt sich auch, im Gegensatz zu NG2, an Venulen (Crisan et al., 2008) (S.302). (Corselli et al., 2012)

Tabelle 1.1 Perizytenmarker

Funktionell wurden den Perizyten in den vergangenen Jahren immer mehr Eigenschaften zugesprochen. In ihrer Rolle als perivaskuläre Zellen stabilisieren sie die Gefäße der Mikrozirkulation (Bergers and Song, 2005) (S.457). Dies spielt besonders in der Angiogenese eine wichtige Rolle, in welcher Perizyten durch Anführen der Wachstumsfront und Überbrückung von zwei gegenüberliegenden Endothelzellrohren eine Art Wegweiser Funktion für die einsprossenden Gefäßzellen übernehmen (Nehls, Denzer and Drenckhahn, 1992) (S.469, 473). Perizyten haben außerdem die Fähigkeit, das Wachstum der Endothelzellen zu beeinflussen (Orlidge and D'Amore, 1987) (S.1460). Zusätzlich gibt es Faktoren, die dafür sprechen, dass Perizyten den Blutdruck durch Gefäßkontraktion regulieren können (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.202). Während pathologischer Geschehnisse werden weitere Rollen der Perizyten deutlich: So ist es zum Beispiel möglich, dass Perizyten die Produktion von Fibrose im Gewebe durch ihre Umwandlung in Myofibroblasten fördern (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.204).

Auch die Rolle der Perizyten im Tumorgewebe und deren Ansatzpunkte zur Therapie sind seit einigen Jahren Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Während die Behandlung von Tumoren durch Hemmung der Gefäßneubildung mit Hilfe von Antikörper gegen den vaskulären Endothelzell-Wachstumsfaktor (VEGF) schon praktiziert wird (Kerbel, 2008) (S.2039), wird nun mehr Aufmerksamkeit auf die Bedeutung der Perizyten gelenkt. Da Perizyten Endothelzellen vor der Apoptose schützen können, indem sie in diesen eine autokrine VEGF Produktion auslösen, sollen nun auch Perizyten im Tumorgewebe medikamentös angegriffen werden, um ihre Wirkung auf die Endothelzellen abzuschwächen und somit die Endothelzellen angreifbarer zu machen (Franco et al., 2011) (S.2916). Im tumorveränderten Gewebe zeigen die Perizyten ein anderes Expressionsmuster und ihre Morphologie ist verändert; sie sind nur noch locker mit den Endothelzellen und der gemeinsamen Basalmembran verbunden (Morikawa et al., 2002) (S.996). Trotzdem ist es den veränderten Perizyten möglich, auch im Tumor die Gefäßfunktion ausreichend aufrecht zu erhalten, zum Beispiel über VEGF. Damit nun eine Anti-VEGF – Therapie

besser wirken kann, wird es für sinnvoll gehalten, die Perizyten im Tumor auszuschalten (Song et al., 2005) (S.877). Dies ist möglich, indem der PDGFR- β über einen selektiven Kinase Inhibitor (SU6668) blockiert wird. Dadurch kommt es über die Lösung des Perizyten-Endothelzell-Kontakts zur Destabilisierung der Gefäße. Bei Untersuchung solcher Modelle wurden weniger Gefäße und eine Hemmung des Tumorwachstums beobachtet (Bergers et al., 2003) (S.1287, 1290, 1291). Somit gelten Perizyten auch als neuer Angriffspunkt in der Tumorthherapie (Bagley et al., 2006) (S.163).

Im Folgenden wird nun näher auf die Rolle von Perizyten in der Entzündung eingegangen. Das darauffolgende Kapitel über mesenchymale Stammzellen beschäftigt sich außerdem mit der möglichen Rolle der Perizyten als mesenchymale Vorläuferzellen.

Die Rolle der Perizyten in der Entzündung

Während die Rolle der Endothelzellen in der Entzündungskaskade zum großen Teil verstanden ist (Stark et al., 2013) (S.41), war die Bedeutung der Perizyten bis vor einigen Jahren noch weitgehend unerforscht (Proebstl et al., 2012) (S.1219-1220).

Je nach Lokalisation erfüllen die Perizyten verschiedene Aufgaben. An den postkapillären Venulen (NG2-) beschleunigen sie die Migration von neutrophilen Granulozyten ins entzündete Gewebe mit Hilfe eines interzellulären Adhäsionsmoleküls (I-CAM-1). Zusätzlich sind sie in der Lage, ihre Form zu ändern und somit vergrößerte Zwischenräume zu schaffen, um den Austritt der Immunzellen aus dem Gefäß zu ermöglichen, siehe Abbildung 1.9.

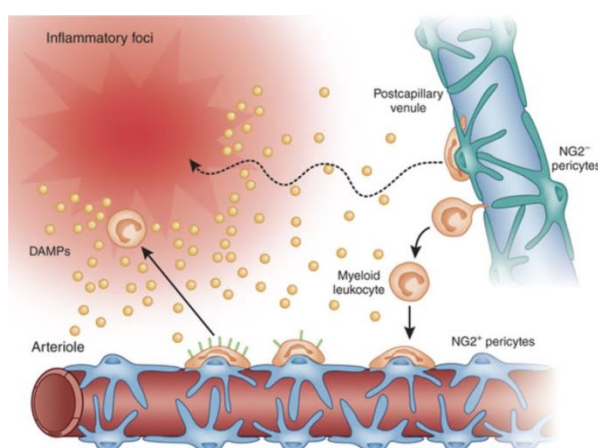


Abbildung 1.9 Rolle der Perizyten im entzündlichen Gewebe (Alon and Nourshargh, 2013) (S. 15)

Perizyten der Arteriolen und Kapillaren (NG2+) locken die nun aus dem Gefäß ausgetretenen, sich im interstitiellen Gewebe befindlichen Neutrophilen und Makrophagen durch Botenstoffe wie den MIF (*Macrophage-migration-inhibitory*

factor) an. Der MIF hat nicht nur chemotaktische, sondern auch antiapoptotische Eigenschaften, wodurch das Überleben der Immunzellen verlängert werden kann. Es kommt mit Hilfe von ICAM-1 außerdem zu einer Anhaftung der Leukozyten an den Perizyten, woraus eine verbesserte Navigation der Immunzellen im entzündeten Gewebe entsteht, wie in Abbildung 1.9 dargestellt. Initiiert werden die Perizyten über Rezeptoren (*Toll-like-Rezeptoren*, Rezeptoren für PAMPs und DAMPs), welche Entzündungsmuster im Gewebe erkennen.

Perizyten stellen somit auch in der Entzündung einen erfolgsversprechenden Angriffspunkt dar (Stark et al., 2013) (S.42,47,49,50).

1.5 Mesenchymale Stammzellen

Stammzellen werden als undifferenzierte Zellen beschrieben, welche im Stande sind zu proliferieren, sich selbst zu erhalten, eine große Anzahl an differenzierten funktionellen Zellen hervorzubringen und Gewebe nach einem Schaden somit wieder zu regenerieren (Potten and Loeffler, 1990) (S.1002).

Mesenchymale Stammzellen im engeren Sinne sind seltene, nicht-hämatopoetische Stromazellen. Zuerst beschrieben wurden sie von Friedenstein et al 1970 im Knochenmark, bei der sie sich als geringe (ca. 1: 10 000), heterogene Population von Plastik-adhärenenten Zellen in Kultur abzeichneten. Die zu proliferieren beginnenden Zellen ähnelten durch die von ihnen gebildeten runden Kolonien Fibroblasten, woraufhin sie zunächst als *Colony Forming Unit-fibroblasts* (CFU-f) bezeichnet wurden. Die Menge der CFU-f Zellen war dabei abhängig von Alter und Gesundheitszustand des Spenders. Schon damals erkannte man ihre Fähigkeit sich in verschiedenste mesenchymale Zellen differenzieren zu können (Augello , Kurth and De Bari, 2010) (S.121).

Die Herkunft der Zellen ist noch nicht vollständig geklärt (Augello , Kurth and De Bari, 2010) (S.121). Auf die mögliche Rolle der Perizyten als mesenchymale Stammzellen und deren perivaskuläre Nische wird ab S.16 eingegangen.

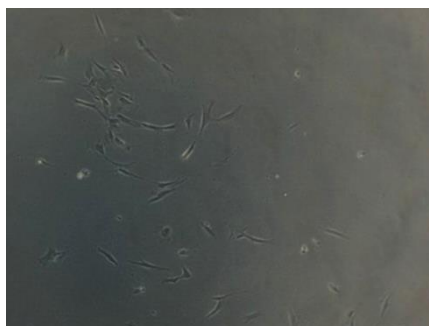


Abbildung 1.10 Mesenchymale Stammzellen in vitro (Kusche, 2011)

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) werden als fusiform und fibroblasten-ähnlich beschrieben (Kassem , Kristiansen and Abdallah , 2004) (S.210), siehe auch Abbildung 1.10, deren Verdoppelungszeit bei ungefähr 24 Stunden liegt (Hass and Otte, 2012) (S.1). Da es auch für MSCs keine spezifischen Marker gibt (Augello , Kurth and De Bari, 2010) (S.121), sind von dem *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* der *International Society for Cellular Therapy* folgende minimale Kriterien zur Definition von humanen MSCs festgelegt worden:

- Plastik-Adhärenz unter Standard-Kultur-Bedingungen
- CD105+CD73+CD90+ und CD45-CD34- CD14/CD11b-CD79α/CD19- HLA-DR- im FACS
- Differenzierungspotenzial in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten

(Dominici et al., 2006) (S.315).

Marker	Morphologie + Expression+Funktion	Literatur
CD90	CD 90, auch bekannt als Thy-1 oder MAb AS02, ist ein kleines, stark glykosiliertes GPI-Ankerprotein der Zellmembranoberfläche (Mansour Haeryfar and Hoskin, 2004) (S.3581). Es wird auf murinen Thymozyten, peripheren T-Zellen (Mansour Haeryfar and Hoskin, 2004) (S.3581), aktivierten Endothelzellen (Wandel et al., 2012)(S.1442), Fibroblasten (Saalbach et al., 1997) (S.593), hämatopoetischen Stammzellen (Deszö et al., 2007) (S.1529), Neuronen, Ganglionzellen der Retina, Mesangiumzellen, vaskulären Perizyten (Bradley, Ramirez and Hagood, 2009) (S.263) und mesenchymalen Stammzellen (Dominici et al., 2006) (S.315) exprimiert. Das Protein spielt eine Rolle in T-Lymphozyten-Aktivierung (Mansour Haeryfar and Hoskin, 2004) (S.3581), Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten auf aktivierten Endothelzellen (Bradley, Ramirez and Hagood, 2009) (S.260), Leukozyten-Rekrutierung während der Inflammation und als Rezeptor auf Endothelzellen (Wandel et al., 2012) (S.1442) und möglicherweise auch in Zellwachstum, Apoptose, Differenzierung, Migration und Angiogenese (Wen et al., 2013) (S.1).	(Crisan et al., 2008), (Tigges, Komatsu and Stallcup, 2013) (Maier et al., 2010) (Carlotti et al., 2010) (Corselli et al., 2012)
CD105	Auch Endoglin ist ein Zelloberflächenrezeptor für die TGFβ-	(Crisan et al., 2008)

	Superfamilie, wird unter anderem exprimiert auf Endothel, glatten Muskelzellen, Stromazellen, mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen und einigen Leukozyten. CD105 trägt zur Gefäßhomöostase, Hämatopoese, Angiogenese und kardiovaskulärer Entwicklung bei (Kapur, Morine and Letarte, 2013)(S.195-197).	(Carlotti et al., 2010) (Corselli et al., 2012)
CD73	CD73 ist ein GPI-Membranprotein, eine Ecto5'Nukleotidase, findet sich auf T-Zellen, Stromazellen des Knochenmarkes, Epithelzellen des Thymus, humanen B-Zellen und myeloiden Zellen. CD73 kann Inflammation verringern (Regateiro, Cobbold and Waldmann, 2012) (S.2-3). Es spielt unter anderem eine Rolle im Flüssigkeittransport der Mukosa, Regulation von epithelialer und endothelialer Permeabilität, Hypoxie und Entzündungsreaktion. (Colgan et al., 2006) (S.352, 355).	(Crisan et al., 2008) (Carlotti et al., 2010) (Tigges, Komatsu and Stallcup, 2013) (Corselli et al., 2012)
Sca-1	Sca-1 (<i>stem cell antigen 1</i>) oder Ly-6A ist ein Membranglycoprotein, welches auf adulten hämatopoetischen murinen Stammzellen (Ma et al., 2002) (S.514), murinen mesenchymalen Stammzellen (Houlihan et al., 2012) (S.2103), sowie in Sinus-Endothelzellen der Leber gefunden wird (Luna, Paez and Cardier, 2004) (S.528). Studien beschreiben Sca-1 unter anderem als Regulator der T-Zell – Proliferation und Differenzierung (Henderson, Kamdar and Bamezai, 2002) (S.119).	(Tigges, Komatsu and Stallcup, 2013)

Tabelle 1.2 Mesenchymale Stammzellmarker

Das Differenzierungspotenzial der MSCs geht jedoch noch darüber hinaus. Als Stammzellen für mesenchymale Gewebe können sie sich in Knochen, Knorpel, Muskel und Fettgewebe differenzieren. Zusätzlich gibt es Studien, die noch weitere Potenziale herausgearbeitet haben (Augello , Kurth and De Bari, 2010) (S. 121,123). (Black and Woodbary, 2001) zeigten die Umwandlung von MSCs aus Ratten- und Humangewebe in Neurone (S. 632). Eine andere Arbeitsgruppe entdeckte sogar Eigenschaften von viszeralem Mesoderm und Endoderm von in Kultur genommenen MSCs und bezeichnet sie als multipotente adulte Progenitorzellen (Jiang et al., 2002) (S.41). Darüber hinaus zeigen sich Unterschiede im Differenzierungspotenzial der MSC Populationen je nach Gewebe und Organismus (Augello , Kurth and De Bari, 2010) (S.122).

Es stellt sich nun die Frage, welche Funktionen diese Zellen übernehmen können. Zum einen wandern sie in pathologisch verändertes Gewebe, wie zum Beispiel nach einem Myokardinfarkt ins geschädigte Myokard (Schenk et al., 2007) (S.247) oder zum Ort eines Knochenschadens, wie von (Kitaori et al., 2009) (S.821) beschrieben. Dabei werden Rekrutierungsfaktoren wie der *Stromal Cell Derived Factor -1* oder das *Monocyte – Chemotactic Protein 3* diskutiert. Die Gruppe um Sasaki (Sasaki et al., 2008) konnte nachweisen, dass MSCs zu Hautwunden rekrutiert werden und durch Transdifferenzierung am Wundheilungsprozess teilnehmen. Hierbei spielt das von Keratinozyten produzierte SLC/CCL21 eine chemotaktische Rolle (S. 2584-2585). Durch den Austausch von miRNAs sind sie in der Lage mit den geschädigten Nachbarzellen zu kommunizieren (Hass and Otte, 2012) (S.3). Auch in der Angiogenese spielen MSCs durch Interaktion mit Endothelzellen eine Rolle (Kachgal and Putnam, 2011) (S.47). In der Immunmodulation können MSCs durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit Immunzellen unter anderem die T-Zell-Aktivität verringern.

Für die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen im Rahmen einer medizinischen Therapie wurden bereits viele Ansätze gefunden. Es wurden aus dem Knochenmark entnommene Zellen *in vitro* vermehrt und in Knochendefekte eingesetzt, so dass die Funktion der Extremität wieder hergestellt werden konnte (Quarto et al., 2001) (S.385-386). Bei systemischen Erkrankungen wie Autoimmun-Enzephalomyelitis konnte im Tiermodell durch intravenöse Gabe von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe die Immunreaktion verringert und neuroregenerative Prozesse induziert werden (Constantin et al., 2009) (S.2624). Bei Kindern mit Osteogenesis imperfecta konnte durch Gabe von allogenen mesenchymalen Stammzelleinfusionen die Wachstumsgeschwindigkeit im Gegensatz zu einer Vergleichsgruppe bis zu 94% gesteigert werden (Horwitz et al., 2002) (S. 8935). Zusätzlich zu diesen lokalen und systemischen Therapien könnten mesenchymale Stammzellen in der Gentherapie Verwendung finden, da sie eine hohe Proliferationsrate besitzen und sich außerdem als hypoimmunogen erwiesen haben (Kassem, Kristiansen and Abdallah, 2004) (S.209, 212). MSCs stellen zudem eine geeignete Quelle für das sogenannte *tissue engineering* dar. Dabei werden Zellen des Patienten *in vitro* differenziert und die daraus gewonnenen Gewebestücke in den Defekt zurückverpflanzt (Kassem, Kristiansen and Abdallah, 2004) (S. 212). Durch ihre gute Verfügbarkeit im Knochenmark und eine hohe Teilungsrate eignen sich MSCs gut für diese Art von Therapie (Bianco and Robey, 2001) (S.121).

Perizyten als mesenchymale Stammzellen

Crisan et al. zeigten 2008 in einer großen Studie, dass CD146+CD34-CD45-CD56-perivaskuläre Zellen aus vielen humanen Organen wie Skelettmuskel, Fettgewebe,

Plazenta, Pankreas Myogenität besitzen. In Kultur sowie im lebenden Organismus sind sie in der Lage, myotubuläre Strukturen zu bilden, ohne myogene Zellmarker zu besitzen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese Zellen ihre Perizytenmarker (NG2, CD146, α SMA) in Kultur weiterhin und zusätzlich MSC Marker wie CD44, CD73, CD90 und CD105 aufwiesen. Die Zellen waren in der Lage, sich in Chondrozyten, Adipozyten sowie in Osteozyten zu differenzieren. Zusätzlich dazu wurde an Hand von einem Chemotaxis Versuch dargestellt, dass perivaskuläre Zellen von Pepsin und Papain angedauter extrazellulärer Matrix zur Migration angeregt werden. Anhand von FACS – Analysen konnte ebenfalls die Expression von den oben genannten MSC Markern auf CD146+ Zellen in vivo nachgewiesen werden (Crisan et al., 2008) (S.302, 304-306,308-310). Dies unterstützte und erweiterte Studien von (Doherty et al., 1998) und (Farrington-Rock et al., 2004), welche bereits viel früher Perizyten die Fähigkeit zuschrieben, Knochen, Knorpel und fibröse Gewebe bilden zu können ((Doherty et al., 1998) (S.835), sich in Fettzellen zu differenzieren und sie somit als multipotente Vorläuferzellen zu identifizierten (Farrington-Rock et al., 2004) (S.2231, 2226). Damit unterscheiden sich die Fähigkeiten der Perizyten von denen der Fibroblasten, welche bereits weiter entwickelt sind und damit weniger Differenzierungsmöglichkeiten besitzen (Covas et al., 2008) (S.642). Abbildung 1.11 gibt hierzu einen Überblick.

Bei experimentell ausgelöstem Myokardinfarkt in murinen Herzen wurde an Hand von Echokardiografie nachgewiesen, dass die Herzfunktion durch transplantierte CD146^{high}+CD34-CD45-CD56- Zellen signifikant verbessert werden kann. Dies erfolgt durch verringerte Entzündungsreaktion und weniger ausgeprägte Narbenbildung, jedoch weniger durch die Differenzierung der Zellen in Muskelzellen selbst (Chen et al., 2013) (S.305).

Ob alle mesenchymalen Stammzellen Perizyten sind, hielt (Caplan, 2008) für möglich, schloss aber aus, dass alle Perizyten auch MSCs sein könnten. Jedoch zeigten (Crisan et al., 2012), dass auch Adventitia – Zellen, welche die äußerste Gefäßwand bilden MSC-Marker wie CD73, CD90 und CD105 exprimieren (S.2852).

Obwohl die Herkunft der MSCs nun genauer beschrieben werden kann, bleibt die Frage, ob Perizyten in der Entwicklung von normalem Gewebe vor oder nach der Geburt oder während Gewebswiederherstellung und Regeneration aktiviert werden, weitgehend ungeklärt (Crisan et al., 2009) (S.122). Hinweise darauf, dass Perizyten auch auf natürliche Weise an der Regeneration von verletztem Gewebe beteiligt sind, finden sich unter anderem bei (Birbrair et al., 2013). Hier werden zwei Arten von Perizyten beschrieben, zum einen Nestin-NG2+, sowie Nestin+NG2+. Der erste Typ trägt nach einem Muskelschaden zur Akkumulierung von Fett bei, während der

zweite Typ an der Bildung von neuen Muskelzellen beteiligt ist (S.2298). Ebenfalls beschrieben wurde, dass in postnatalem Gewebe, welches akut oder chronisch geschädigt ist, Perizyten verstärkt mit Myofibrillen fusionieren und somit zum Wachstum und zur Regeneration des Muskelgewebes beitragen (Dellavalle et al., 2011) (S.499).

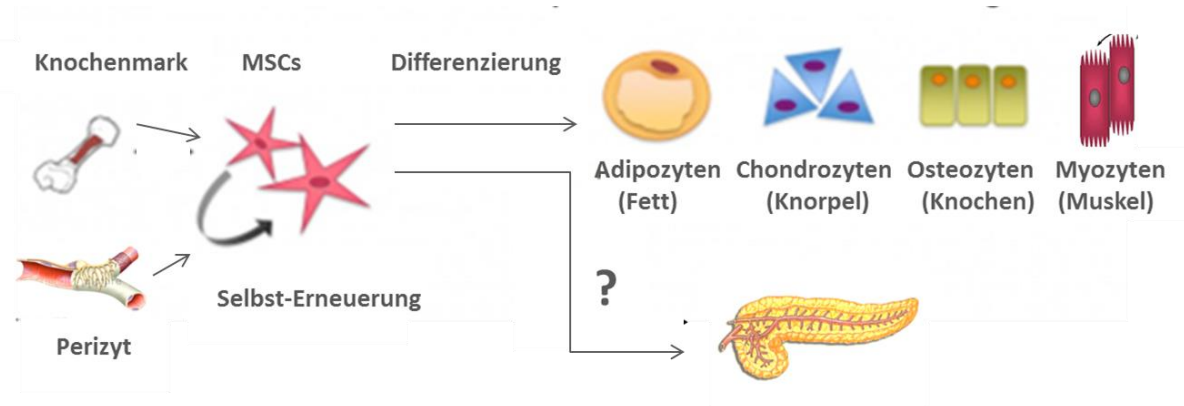


Abbildung 1.11 Differenzierung von Perizyten und mesenchymalen Stammzellen, modifiziert nach (Nogués and Creane, 2012)¹

Zusammenfassend werden Perizyten als Zellen beschrieben, welche sich durch einen bestimmten Reiz von der Gefäßwand lösen, zum Ort des Zellschadens wandern, dort proliferieren und die geschädigten Zellen ersetzen (Choi et al., 2012) (S.4469).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle von Perizyten mit mesenchymalen Stammzellpotenzial im Pankreas ist weitgehend ungeklärt. Wie in 1.5 beschrieben, gibt es eine hohe Evidenz dafür, dass es sich bei Perizyten in zahlreichen Geweben um Zellen handelt, die in der Lage sind bei einem Gewebeschaden die Regeneration des Gewebes voranzutreiben. Da im Pankreas noch nicht vollständig geklärt ist, auf welchem Wege sich die Drüse nach einer akuten Entzündung wieder regeneriert, vermuteten wir, dass Perizyten mit mesenchymalen Stammzellcharakteristika dazu beitragen könnten. Auf Grund der geringen Informationen über Perizyten im exokrinen Teil des Pankreas sollten diese Zellen zunächst charakterisiert werden. Begonnen werden sollte mit der Etablierung von Antikörpern –Färbungen gegen Perizyten, sowie von mesenchymalen Stammzellen. Um die Lage näher beschreiben zu können, sollten Doppelfärbungen durchgeführt werden. Zur genaueren Quantifizierung der Perizyten und mesenchymalen Stammzellen entschied man sich zur Anfertigung einer

¹ (Geisler, 2010) (John, 2005) (Wittel, 2013)

Durchflusszytometrie – Analyse des Pankreas. Da in Zukunft auch funktionelle in vitro Versuche durchgeführt werden sollen, war ein weiteres Ziel die Isolierung der Perizyten aus pankreatischem Gewebe.

Um die Perizyten im Stadium der akuten Pankreatitis zunächst quantifizieren zu können, sollte eine sterile Entzündung im murinen Pankreas hervorgerufen werden und durch FACS – Analyse und Immunfluoreszenz-Bilder evaluiert werden, ob und auf welche Weise sich die Perizyten und im speziellen Perizyten, welche mesenchymale Marker exprimieren, während der Entzündungs- und Regenerationsphase verändern.

Im nachfolgenden Kapitel werden die dazu verwendeten Methoden näher beschrieben.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Autoklave VX-75	Systemec, Wetzlar
CyAn ADP Analyzer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Cyto-Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Digital-Kamera PowerShot A640	Canon, Krefeld
Einbettstation EG1160	Leica Microsystems, Wetzlar
FACS Aria	BD Bioscience, San Jose CA (USA)
Gefrierschrank Hera freeze -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Glaswaren	Vitlab, Großostheim
Hera Cell 150 Wärmeschrank	Thermo Fisher Scientific Waltham MA (USA)
Hera Safe Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Waltham MA (USA)
Ice-Flaker AF100	Scotsman, Vernon Hills IL (USA)
Kryostat CM3050S	Leica Microsystems, Wetzlar
Kryo-Tank	Chart Industries, Cleveland OH (USA)
Kühlplatte COP30	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Kühlschrank -20 °C	Siemens, München
Kühlschrank active soft -20 °C	Snaige, Alytus (LT)
Kühlschrank Comfort 4 °C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Kühlschrank exquisit 4 °C	GGV, Kaarst
Kühlschrank Premium -20 °C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Kühlschrank profi line 4 °C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Luftstromschrank Uni Protect	Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel
Magnetrührer	IKA, Staufen
Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Oberkochen

Mikroskop DME	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotom Klängen 819	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotom RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrowelle	Siemens, München
Multi Stand MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Multifuge 3SR+ Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pinsel pro natura 3	Brunnen, Heilbronn
Pinsel	Leica, Nussloch
Pipetboy	Integra Bioscience GmbH, Fernwald
Pipetten peQpette	Peqlab, Erlangen
Research Pipette	Eppendorf, Hamburg
Rotator-Mixer	Greiner-Labortechnik, Frickenhausen
Rothilabo-Magnetstäbchen	Carl Roth, Karlsruhe
Vakuum Gewebeprozessor ASP200S	Leica Microsystems, Wetzlar
Vortex Mixer	Neo Lab, Heidelberg
Waage A120S	Sartorius, Elk Grove IL (USA)
Wärmeschrank 37 °C Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Wasserbad GFL 1052	Julabo, Seelbach
Wasserbad Lauda	Lauda, Königshofen
Wasserfilter-System MilliQ Advantage	Millipore, Schwallbach
Wecker	Carl Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Chamber Slide System 4 well	Lab Tek NUNC, Rochester NY (USA)
Dako Pen	Dako, Glostrup (DK)
Einbett-Kassetten	Carl Roth, Karlsruhe
Einmal-Wägeschalen Rotilabo	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegskalpell feather	Pfm medical Köln

Eppendorfgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon 5ml Round Bottom	BD Bioscience, San Jose CA (USA)
Falcons 15,50 ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Gewebekulturplatten 6, 96 well	Greiner bio one, Frickenhausen
Histowachs	Merck, Darmstadt
Insulinspritzen Micro-Fine	BD Falcon, Franklin Lakes NJ (USA)
Kryo-Tubes	Greiner bio one, Frickenhausen
LS Seperator Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Marker	Marienfield, Lauda-Königshofen
Menzel-Gläser	Thermo Scientific, Waltham MA (USA)
Microplate 96 well	Greiner bio one, Frickenhausen
Multiwell 48 well	BD Falcon, Franklin Lakes NJ (USA)
Omnifix F 1 ml	B-Braun, Melsungen
Parafilm“M“	Pechiney Packiging, Chicago IL (USA)
Pipettenspitzen Tip one	Starlab, Hamburg
Professional Precision Wipes	Kimtech Science, Roswell GA (USA)
Sempercare premium Handschuhe	Sempermed, Wien
Serologische Pipetten 5,10,25,50 ml	Cellstar, Greiner bio one, Frickenhausen
Spritzen 5,10 ml	B-Braun, Melsungen
Superfrost Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
Syringe Filcon, 30 µm, cup type	BD Bioscience, San Jose CA (USA)
Syringe Filter 0,2 µm	Thermo Scientific Waltham MA (USA)
Tissue Tek O.C.T Compound	Sakura, Alphen aan den Rijn (NL)
Tubes 1,5, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Tücher	Satino
VWR Lab Marker	VWR Scientific, San Francisco CA (USA)
Zellfilter 100 µm	BD Falcon, Franklin Lakes NJ (USA)
Zellkultur Petri-Schalen	Greiner bio one, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Albumin Fraktion V proteasefrei	Carl Roth, Karlsruhe
Caerulein	Sigma-Aldrich, St. Louis MO (USA)
Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe
D-(+)-Glucose, wasserfrei, ≥ 99,5%	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin	
Ethanol 100 %, 96 %, 70 %, 50 %	Krankenhausapotheke, MRI
Fetal Bovin Serum	Sigma-Aldrich, St Louis MO (USA)
Fluoro-Mount with Dapi	Dianova, Hamburg
Flüssigstickstoff	Krankenhaus MRI
Flüssigstickstoff	TMG Sol Group, Gersthofen
Gelatin Solution 2 % in H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis MO (USA)
Goat Serum	Dako, Glostrup (DK)
H ₂ O ₂	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HCl 5N Salzsäure	Krankenhausapotheke MRI
Immersionol 518 F	Carl Zeiss, Oberkochen
Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf
Kollagenase IV	Sigma-Aldrich, St. Louis MO (USA)
Liquid DAB+Sub. Chromogen System	Dako, Carpinteria CA (USA)
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Mounting Medium Vecta Mount	Vector Laboratories, Burlingame CA (USA)
NaOH 5N Natronlauge	Krankenhausapotheke MRI
Natrium-Chlorid 0,9%	Braun, Melsungen
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Krankenhausapotheke MRI
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe

Tris Base, Trizma base	Sigma-Aldrich, St. Louis MO (USA)
Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco Invitrogen, Auckland (NZ)
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Zinc-Formalin-Fixativ	Sigma Life Science, St. Louis MO (USA)

2.1.4 Medien

DMEM <i>High Glucose</i>	PAA, Pasching (A)
Dulbecco's 1x PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
<i>Endothelial Growth Medium 2</i>	Promo Cell, Heidelberg
Häm's F12	PAA, Pasching (A)
Penicillin-Streptomycin in NaCl	Sigma-Aldrich, St Louis MO (USA)
<i>Pericyte Growth Medium</i>	Promo Cell, Heidelberg

Medium für adhärenzte Perizyten

DMEM *high glucose* + 20% FCS

Medien zur Perizytenisolierung

25 mg Kollagenase IV+5 ml FCS+20 ml PBS

10 ml FCS+40 ml PBS

2.1.5 Antikörper

AlexaFlour 488 <i>chicken</i> anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L) A21441	Invitrogen life technologies, Darmstadt
AlexaFlour 594 <i>chicken</i> anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L) A21442	Invitrogen life technologies, Darmstadt
AlexaFlour 594 <i>donkey</i> anti- <i>goat</i> IgG (H+L) A11058	Invitrogen life technologies, Darmstadt
AlexaFlour 594 <i>goat</i> anti- <i>rat</i> IgG (H+L) A11007	Invitrogen life technologies, Darmstadt
AlexaFlour488 <i>donkey</i> anti- <i>mouse</i> IgG(H+L) A21202	Invitrogen life technologies,Darmstadt

Anti - Endoglin, <i>rat</i>	Santa Cruz Biotechnology
Anti-AN2 Micro Beads <i>human, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-CD146 FITC	Ebioscience, San Diego CA (USA)
Anti-CD146, <i>mouse</i>	Abcam, Cambridge (UK)
Anti-CD31, <i>rat</i>	Dianova, Hamburg
Anti-CD90/Thy-1, <i>rat</i>	Abcam, Cambridge (UK)
Anti-Human Smooth Muscle Actin	Dako, Glostrup (DK)
Anti-Mouse CD105 PE	Ebioscience, San Diego CA (USA)
Anti-Mouse CD31 APC	Ebioscience, San Diego CA(USA)
Anti-Mouse CD31 PE-Cy7	Ebioscience, San Diego CA (USA)
Anti-Mouse CD45 PE Cy 5,5	Ebioscience, San Diego CA (USA)
Anti-Mouse Sca-1, <i>rat</i>	Abcam, Cambridge(UK)
Anti-NG2, <i>rabbit</i>	Millipore, Billerica MA (USA)
Anti-Sca-1 PE Cy 7	Ebioscience, San Diego CA (USA)
Pacific Blue <i>goat</i>	
anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L) P10994	Invitrogen life technologies, Darmstadt
EnVision+System-HRP <i>labelled</i> Polymer α -rb	Dako, Glostrup (DK)
Propidiumiodid	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.6 Pufferlösungen

10 x TBS

H ₂ O	800 ml
Tris Base	12,1 g
NaCl	85,0 g

pH 7,4 mit HCl einstellen und auf 1000 ml auffüllen

1x TBS

10x TBS	100 ml
H ₂ O	900 ml

TBST 0,01 %

1xTBS	1000 ml
Tween 20	1 ml

TBST 0,05 %

H ₂ O	1000 ml
TBST	500 µl

TBST 0,005 %

H ₂ O	1000 ml
TBST	50 µl

20x Citratpuffer

H ₂ O	300 ml
Citronensäure	21,0 g

pH 6,0 mit NaOH einstellen und auf 500 ml auffüllen

1x Citratpuffer

20x Citratpuffer	25 ml
H ₂ O	475 ml

5% BSA

Albumin Fraktion	0,5 g
TBS	10 ml

FACS-Puffer

PBS	20 ml
FCS	100 µl
EDTA 0,2 M	100 µl

MACS-Puffer

PBS	50 ml
FCS	2,5 ml
EDTA 0,2 M	100 µl

2.1.7 Biologisches Material

C57BL/6J, 8 Wochen alt, weiblich, Charles River

2.2 Methoden**2.2.1 HE-Färbung****Allgemeine Erläuterung der HE-Färbung**

Zur Analyse von Gewebe verwendet man häufig eine Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE). Bei dieser werden die basophilen Bestandteile (Zellkern) vom Hämatoxylin blau und die eosinophilen Bestandteile (Zytoplasma) der Zelle rötlich mit Hilfe des Eosins eingefärbt. Dadurch lassen sich die Zellen im Physiologischen wie im Pathologischen besonders gut darstellen und verschiedene Gewebe untereinander vergleichen.

HE-Färbung

4% PFA
TBS
Hämalaun
Eosin
70%,96%,100% Ethanol
Roticlear

Zur HE-Färbung der Gewebsschnitte (siehe 2.2.2) werden diese zuerst mit 4% PFA über 7 min behandelt und anschließend zweimal je 3 min mit TBS-Puffer gewaschen. Die Färbung mit Hämalaun sollte nicht länger als 30 Sek. dauern. Danach werden die Schnitte unter laufendem Leitungswasser für 5 min gespült. Daraufhin erfolgt für

2-5 Sek. die Färbung mit Eosin, woraufhin das Gewebe kurz in E-Wasser und anschließend in 70% EtOH geschwenkt wird. Zur weiteren Dehydratation des Gewebes wird dieses für 30 Sek. in 96% EtOH und dann dreimal für je 2 min in 100% EtOH entwässert. Zum Abschluss erfolgt ein dreifaches Roti-Clear – Bad für je 5 min. Zum Eindeckeln der Schnitte wird *Mounting Medium* verwendet.

2.2.2 In-situ-Immunlokalisation

Allgemeine Erläuterung der In-situ-Immunlokalisation

Die In-situ-Immunlokalisation bezeichnet eine Zellmarkierung, die auf die Sichtbarmachung von einer Antigen-Antikörper-Bindung im Gewebeverband von Zellen basiert. Dies kann durch ein, an den Antikörper gebundenes Enzym passieren, welches ein Substrat in einen Farbstoff umwandelt, welcher dann wiederum im Mikroskop erkannt werden kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von an Fluorochrome gebundene Antikörper, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Auf die verschiedenen Vorbehandlungen des Gewebes und worauf bei den Färbungen besonders geachtet werden muss, wird im Folgenden eingegangen.

Gewebsgewinnung

C57BL/6J, 8 Wochen alt, weiblich, Charles River
Isofluran
70 % Ethanol
PBS

Für immunhistologische Färbungen des murinen Pankreas wurde zuerst das Gewebe gewonnen. Dazu wurden die Wildtyp-Mäuse in einem Glas mit Isofluran betäubt und danach durch Genickbruch getötet. Um eine bakterielle Besiedlung zu vermeiden wurden sie mit 70 % Ethanol besprüht und zur Gewebsentnahme fixiert. Das Pankreas der Mäuse befindet sich intraperitoneal und ist am einfachsten an Hand der Milz aufzufinden, an der er bindegewebig fixiert ist. Durch leichtes Ziehen an der Milz wurde das Pankreas aufgespannt und nun vorsichtig von den umliegenden Organen frei präpariert. Danach wurde es von der Milz abgetrennt. Abschließend wurde das Pankreas in PBS auf Eis gewaschen.

Gefrierschnitte

Tissue tek®

Um Gefrierschnitte herzustellen, wurde das Pankreas direkt nach dem Waschen in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurde es bis zur Aufbereitung in einem -80 °C kalten Gefrierschrank gelagert.

Um Schnitte herzustellen, wurde das Gewebe auf Trockeneis gelagert zum Kryotom transportiert und dort mit Tissue tek® auf einem Probenhalter fixiert, der in das Kryotom eingespannt wurde. Die Kühltemperatur des Kryotoms betrug ca. -27 °C und die Temperatur des Objektträgers ca. -21°C. Das in einer Dicke von 5-7 µm geschnittene Gewebe wurde durch Berührung eines zimmerwarmen Objektträgers auf diesen aufgezogen. Nach kurzem Antrocknen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte sofort weiterverarbeitet oder erneut bei -80 °C gefroren.

Immunhistochemie

PFA 4 %
H₂O₂ in PBS
1x TBS
5 % BSA in TBS
Anti-NG2
0,005 % TBST
Dako En Vision + System –HRP
DAB + Substrat chromogen
Hämalaun
Roti Mount aqua

Objektträger aus dem -80 °C Gefrierschrank wurden aufgetaut und kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Um die Flüssigkeit auf dem Gewebe zu halten, wurde dieses mit einem Fettstift umrandet. Anschließend wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer platziert und für 10 min mit 4 % PFA (hergestellt aus 8 % PFA und TBS im Verhältnis 1:1) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Objektträger 2x für 3 min in TBS gewaschen und in der Feuchtkammer mit 3 % H₂O₂ (hergestellt aus 30 % H₂O₂ und PBS im Verhältnis 1:10) behandelt, um endogene Peroxidasen zu sättigen. Nach 10 min wurden die Objektträger 3x mit TBS für je 3 min gewaschen. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungen wurde 5 % BSA in TBS verwendet, welches für 1 h bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert wurde. Nach einer Stunde wurde die Blockierlösung abgeklopft und der erste Antikörper (Anti-NG2, *rabbit*, Verdünnung 1:200 in 5 % BSA) über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Objektträger mit 0,005 % TBST gespült und für 3x 5 min auf einer Rüttelplatte gewaschen. Der 2. Antikörper, welcher mit einer *Horse-radish*-Peroxidase (HRP) gekoppelt war (Dako En Vision + System – HRP, anti-mouse) wurde anschließend für 1 Stunde inkubiert. Daraufhin wurden die Objektträger erneut gewaschen: 1x in 0,05 % TBST und dann 2x in TBS für je 3 min. Hieran schloss sich die Farbreaktion an, bei der eine DAB + Substrat-chromogen Lösung auf das Gewebe pipettiert wurde. Die Farbreaktion wurde bei ca. 2 min gestoppt, in dem die Objektträger in eine Kammer mit Wasser gestellt wurden. Um eine Kernfärbung zu erhalten, wurden die Objektträger nun für 25 sek in Hämalaun gefärbt und danach für

5 min in Leitungswasser gespült. Abschließend wurden die Objektträger mit *Roti Mount Aqua* eingedeckelt.

Immunfluoreszenz

PFA 4 %

1x TBS

5 % BSA in TBS

Anti-NG2 / Anti-CD31 / Anti-CD90 / Anti-CD105 / Anti-Sca1 / α SMA

0,05 % TBST

Anti-rabbit 488, Anti-rat 594, Anti-mouse 488

Mounting Medium + Dapi

Objektträger aus dem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefrierschrank wurden aufgetaut und kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Um die Flüssigkeit auf dem Gewebe zu halten, wurde dieses mit einem Fettstift umrandet oder jede Reagenz mit Parafilm abgedeckt. Anschließend wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer platziert und für 7-10 min mit 4 % PFA (hergestellt aus 8 % PFA und TBS im Verhältnis 1:1) bei Raumtemperatur fixiert. Die Objektträger wurden dann 2x für 3min in TBS gewaschen und in der Feuchtkammer mit 5 % BSA in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Blockierlösung abgeklopft und der erste Antikörper (Anti-NG2, rabbit, Verdünnung 1:200; Anti-CD31, Verdünnung 1:20, Anti-CD90, Verdünnung 1:50; Anti-CD105, Verdünnung 1:200; Anti-Sca-1, Verdünnung 1:50; Anti- α SMA, Verdünnung 1: 500, in 5% BSA) über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Feuchtkammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Objektträger 1x 5 min in 0,05 % TBST und dann 2x 3 min in TBS auf einer Rüttelplatte gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der mit einer Fluoreszenz gekoppelt war. Verwendet wurden verschiedene, zum Organismus in dem der erste Antikörper produziert wurde, passende Antikörper, siehe 2.1.5. in den Konzentrationen 1:500, 1:1000, 1:2000. Nach einer einstündigen Inkubationsphase wurde das Gewebe erneut gewaschen: 5 min mit 0,05 % TBST, dann 2x ebenfalls 5 min mit TBS. Abschließend wurde der Objektträger getrocknet und das Gewebe mit Mounting Medium mit Dapi eingedeckelt, um die Zellkerne anzufärben. Danach wurden die Objektträger bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zur Kontrolle wurde ein Objektträger mitgefärbt, der anstatt mit dem ersten Antikörper nur mit Blockierreagenz inkubiert wurde. So konnte die alleinige Wirkung des zweiten Antikörpers überprüft werden, um unspezifische Bindungen von spezifischen Bindungen zu unterscheiden.

Doppelfärbungen

PFA 4 %
1x TBS
5 % BSA in TBS
Anti-NG2 / Anti-CD31 / Anti-CD90 / Anti-CD105 / Anti-Sca1
0,05 % TBST
Anti-rabbit 488, Anti-rat 594
Mounting Medium + Dapi

Für Doppelfärbungen wurde dasselbe Protokoll verwendet, welches unter Immunfluoreszenz zu finden ist.

Um die Doppelfärbung zu erzielen wurden jedoch anstatt eines ersten Antikörpers zwei Antikörper eingesetzt, so auch bei den zweiten Antikörpern. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Antikörper aus verschiedenen Organismen stammen.

Mikroskopieren

Nach der Färbung wurden die Gewebe unter einem Fluoreszenzmikroskop mit dem Programm Axio Vision SE64 angeschaut und in verschiedenen Vergrößerungen fotografiert.

Um Doppelfärbungen darzustellen, wurde die Funktion „*Multidimensional Acquisition*“ verwendet, die es ermöglicht, verschiedene Fluoreszenzen übereinander zu legen.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Allgemeine Erläuterung der Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer, auch FACS (Fluorescence activated cell sorter) genannt, ermöglicht die Analyse von Zellen in Suspension hinsichtlich ihrer Größe und Granularität. Sollen auch noch einzelne Oberflächenantigene untersucht werden, ist eine Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern möglich.

Abbildung 2.1 zeigt ein vereinfachtes Schema eines Durchflusszytometers.

Das Prinzip der Zellanalyse beruht auf einem Laser, welcher durch die Aussendung von monochromatischem Licht einerseits die Lichtstreuung detektiert, die bei dem Auftreffen auf die eingelesenen Zellen erfolgt und andererseits Fluorochrome Lichtenergie absorbieren lässt, welche diese dann in einer höheren Wellenlänge wieder emittieren. Im Durchflusszytometer werden die Zellen in einem laminaren Strom einzeln am Laser vorbei geleitet. Die von der Zelle aus nach vorn abgelenkten Laserstrahlen, man nennt sie auch *Forwardscatter*, lassen Angabe zur Zellgröße zu. Die im rechten Winkel abgelenkten Laserstrahlen, *Sidescatter*, lassen auf die Granularität der Zelle schließen. Die von den Fluorochromen emittierten Wellen

werden anhand von Spiegeln weitergeleitet und durch Filter werden deren Wellenlängen selektiert, die dann bei Durchdringen des passenden Filters ein Signal auslösen, welches der Computer auf das Signal einer bestimmten Fluoreszenz entcodiert und sichtbar macht. Leider bestehen zwischen den Fluorochromen spektrale Überlappungsbereiche der Emissionen. Dieses Problem lässt sich durch gute Filter minimieren, jedoch ist es trotzdem notwendig, die verschiedenen Fluoreszenzen vor der Messung am Computer anhand von Einzelfärbungen zu kompensieren. Nur so kann bei Mehrfachfärbungen ein Signal als spezifisch gewertet werden.

Ein sogenannter Dot-Plot einer Durchflusszytometrie könnte folgendermaßen aussehen:

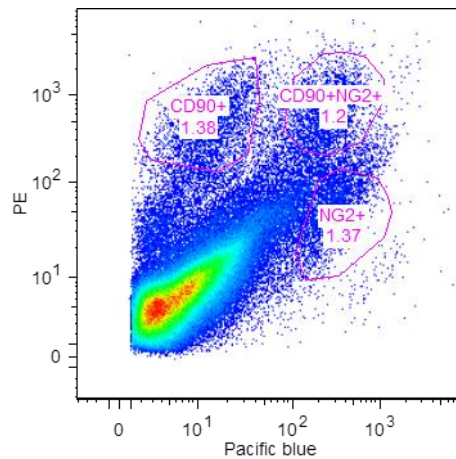


Abbildung 2.1 Beispiel Dot Plot

Jeder Punkt steht dabei für eine Zelle. Sind auf den Achsen, wie hier im Beispiel, die verschiedenen Fluoreszenzen in ihrer Intensität aufgetragen, so kann man den Plot grob in vier Quadranten aufteilen. Die Zellen links unten sind für beide Marker negativ, die Zellen im oberen rechten Quadranten für beide Marker positiv dargestellt. Links oben und rechts unten sind sie für je einen der Marker positiv. (Luttmann et al., 2009).

Im Folgenden Protokoll wird die Methode Durchflusszytometrie noch ausführlicher erläutert.

Gewebsgewinnung

C57BL/6J / STOCK Tg (Cspg4-DsRed.T1)1Akik/J

Isofluran

70 % Ethanol

PBS

PBS+25 %FCS+0,1 %Collagenase IV

PBS+25 %FCS

Um Zellen für die Durchflusszytometrie, das Zellsorten oder das magnetische Sorten aus dem murinen Pankreas zu gewinnen, wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll in Kooperation mit Mihaela Crisan verwendet.

Zunächst wurden die (C57BL/6J oder STOCK Tg (Cspg4-DsRed.T1)1Akik/J) Mäuse in einem Glas mit Isofluran betäubt und dann durch Genickbruch getötet. Zur Vermeidung einer bakteriellen Besiedlung wurden die Mäuse mit 70 % Ethanol abgesprüht und fixiert. Die Entnahme des Pankreas erfolgte wie in 2.2.2 „Gewebe Gewinnung“ erläutert. Nachdem das Pankreas in sterilem PBS auf Eis kurz gewaschen wurde, erfolgte eine Überführung des Gewebes in eine weitere Petrischale, in dieser das Pankreas zwischen zwei Klingen zerkleinert wurde. Nun wurde das Andauungsmedium (PBS+25 %FCS+0,1 % Collagenase IV) dazugegeben und alles in ein 50 ml Falcon aufgenommen. Das Gewebe wurde anschließend auf einem Rotator-Mixer für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das nun angedaute Gewebe in eine Petrischale gegeben und dort zwischen zwei Objektträgern leicht zerdrückt, bis nur noch winzige Gewebstücke in einer Zellsuspension übrig blieben. Diese wurde nun in einer serologischen Pipette aufgenommen und durch einen 100 µm Filter in ein weiteres Falcon gedrückt. Um möglichst viele Zellen zu überführen, wurde außerdem die Petrischale, wie auch der Filter mit ca. 10 ml Spüllösung (PBS+25 %FCS) gespült und ebenfalls in das Falcon übernommen. Diese Suspension wurde nun bei 1200 rpm, 4 °C für 7-10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in FACS bzw. MACS – Puffer aufgenommen und mit Antikörpern weiterbehandelt.

Färbung der Zellen zur Durchflusszytometrie

PBS+0,5 %FCS+0,5 % 0,2 M EDTA

Anti-CD105, Anti-CD90, Anti-PDGFRbeta, Anti-NG2

Anti-rabbit-Pacific blue, Anti-rat-PE, Anti-CD146-FITC, Anti-Sca-1-PE-Cy7

Das Zellpellet wurde je nach Gewebemenge in ca. 4 ml FACS-Puffer (PBS+0,5 %FCS+0,5 % 0,2 M EDTA) aufgenommen. Danach wurden Proben zu je 100 µl für die verschiedenen Antikörper entnommen, um später am Durchflusszytometer die Fluoreszenzen einzeln einzustellen. Des Weiteren wurde eine Probe von 100 µl zur Seite gestellt bzw auf Eis gelagert, welche nicht gefärbt wurde. Diese wurde ebenfalls später zur Einstellung des Durchflusszytometers benötigt. Der Rest der Zellsuspension war nun die eigentlich zu bestimmende Probe und wird im Folgenden als *Sample* bezeichnet. Zu den Fluoreszenzproben wurde nun je 1 µl des ersten Antikörpers hinzugefügt (Anti-CD105, Anti-CD90, Anti-PDGFRbeta, Anti-NG2); zu dem *Sample* wurden 10 µl der oben genannten Antikörper hinzugefügt. Da die Durchflusszytometrie in mehreren Durchgängen

ausgeführt wurde, wurden der Übersicht wegen und um Wechselwirkungen der Fluoreszenzen zu minimieren, höchstens vier der oben genannten Antikörper zusammen in einem *Sample* verwendet. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 4 °C inkubiert.

Für die Analyse wurden die Antikörper folgendermaßen mit Fluoreszenzen gekoppelt
Tabelle 2.1:

NG2	Pacific blue, max. 455 nm
CD90	PE, max. 575 nm
CD105	PE, max. 575 nm
Sca-1	PE-Cy7, max. 660 nm
CD31	APC, max. 774 nm

Tabelle 2.1 Darstellung der Antikörper mit deren gekoppelter Fluoreszenz und deren Emissionsmaximums

Auf die Inkubation folgte ein Zentrifugationsschritt mit 1200 rpm bei 4 °C für 3 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in FACS-Puffer aufgenommen. Nun folgte eine Inkubation mit den zweiten, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern (Anti-rabbit-Pacific blue, Anti-rat-PE, Anti-CD146-FITC, Anti-Sca-1-PE-Cy7), ebenfalls für 20 min bei 4 °C im Dunkeln. Diesem Schritt fügte sich eine weitere Zentrifugation 1200 rpm, 4 °C, 3 min an. Nun wurde das Pellet in einem angemessenen Volumen aufgenommen und bis zum FACSen auf Eis im Dunkeln aufbewahrt.

Direkt vor dem FACSen der Probe, wurde sie zunächst durch einen Filcon 30 µm gefiltert, um ein Verstopfen des Gerätes zu verhindern. Außerdem wurde die Probe kurz gevortext, damit sich die unten abgesetzten Zellen wieder mit der Suspension vermischten.

FACS Analyse

Um die Voreinstellungen vorzunehmen, wurde nun zuerst die Probe mit den ungefärbten Zellen von der Maschine eingelesen. Anhand von *Forward –und Side-Scatter* wurde die Population geeignet im Graphen positioniert. Zusätzlich wurden die einzelnen Farbproben eingelesen und deren Intensität so eingestellt, dass zwar eine Population zu erkennen ist, diese aber nicht so hoch eingestellt wurde, dass sie in das Spektrum der anderen Farben deutlich hineinstrahlt.

Nachdem alle Voreinstellungen beendet waren, wurden von dem Sample circa 200.000 Zellen eingelesen.

Die Ergebnisse wurden später im „Flow-Jow-Programm“ aufgearbeitet.

2.2.4 Zellsorter

Um Perizyten für eine Kultur zu gewinnen, wurde ein Zellsorter verwendet.

Allgemeine Methodik des Zellsortens

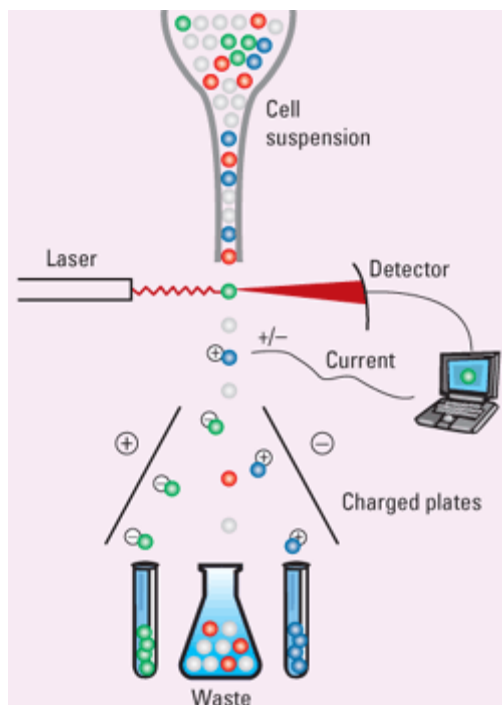


Abbildung 2.2 Zellsorter

Ein Zellsorter ist ein Durchflusszytometer mit der zusätzlichen Funktion, die gewünschte Population nach dem Analysieren auch noch herauszugeben. Er gibt damit die Möglichkeit spezielle Zellen aus einer Masse herauszufinden und später weiterzuverarbeiten.

Nachdem der Computer die Zellen, welche ein bestimmtes Merkmal (Fluoreszenzmarkierung, Größe, Granularität) tragen, erkannt hat, gibt er ein Signal an den Sorter, diese zu markieren, indem sie mit einer negativen oder positiven Ladung versehen werden. Dies ist möglich, da ein Zellsorter die Eigenschaft besitzt, durch Vibration den Flüssigkeitsstrom zu unterbrechen und so wird jede Zelle in ein Wasser Tröpfchen eingehüllt, welches nun positiv oder negativ geladen werden kann. Um nun diese geladenen Zellen zu trennen, befindet sich nachfolgend ein elektrostatisches Feld, welches die Zellen in verschiedene Richtungen ablenkt und

so in verschiedene Röhren sortiert. Ungeladene Zellen können nicht weiterverwendet werden (Luttmann et al., 2009).

Gewebsgewinnung

C57BL/6J / STOCK Tg (Cspg4-DsRed.T1)1Aki/J
Isofluran
70 % Ethanol
PBS
PBS+25 %FCS+0,1 %Collagenase IV
PBS+25 %FCS

Die Gewinnung des Gewebes für den Zellsortierer erfolgte wie in 2.2.3, allerdings wurde besonders auf Sterilität geachtet, da die Zellen danach in Kultur aufgenommen werden sollten. Die Gewebeaufbereitung erfolgte daher unter der Sterilbank.

Färbung

CD 146-FITC, CD31-PE-Cy7, CD45-PE-Cy5.5
PBS+0,5 %FCS+0,5 % 0,2 M EDTA
Propidiumiodid

Um Perizyten zu gewinnen, die einen mesenchymalen Marker tragen, wurde folgendes Set verwendet, welches von Mihaela Crisan, übernommen wurde: CD146-FITC, CD31-PE-Cy7, CD45-PE-Cy5,5. Da alle Antikörper in bereits gekoppelter Form vorlagen, musste nur ein Färbeschritt durchgeführt werden. Das Gewebe wurde 10-20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend bei 1200 rpm, 4 °C für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer angemessenen Menge an FACS-Puffer (PBS+0,5 %FCS+0,5 % 0,2 M EDTA) aufgenommen. Anschließend wurde 1 µl des Markers Propidiumiodid hinzugefügt, welcher tote Zellen durch Interaktion mit deren DNA markiert. Diese Zellen konnten nun während des Sort-Vorgangs herausgefiltert werden und wurden nicht mit in die Kultur aufgenommen.

Die Zellen wurden bis zum Sort-Vorgang auf Eis und im Dunkeln gelagert.

Sorten

Endothelial Growth Medium 2
PBS+0,5 %FCS+0,5 % 0,2 M EDTA

Um Zellverklumpungen zu vermeiden, erfolgte vor dem Sort ein erneuter Filterschritt (Filcon 30 µm). Das *Sample* wurde durch einen sterilisierten Filter pipettiert, um eine bakterielle Besiedlung zu vermeiden. Der Sortvorgang selbst erfolgte in Kooperation mit Dr. Mathias Schiemann vom Mikrobiologischen Institut der TU München. Hierbei wurden die Einstellungen ähnlich denen der Durchflusszytometrie vorgenommen.

Zusätzlich musste das Set bestimmt werden, welches heraussortiert werden sollte, um in Kultur genommen zu werden. Dieses wurde wie folgt ausgewählt:

Set 1: CD 146+ CD 31 – CD 45 –

Als Kontrolle wurde ein weiteres Set bestimmt:

Set 2 (Kontrolle): CD 146 – CD 31 – CD 45 –

Die Zellen wurden nach dem Sort in Medium (Endothelial Growth Medium 2) gelagert.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

2.2.5 Magnetisches Sorten

Allgemeine Erläuterung des magnetischen Sortens

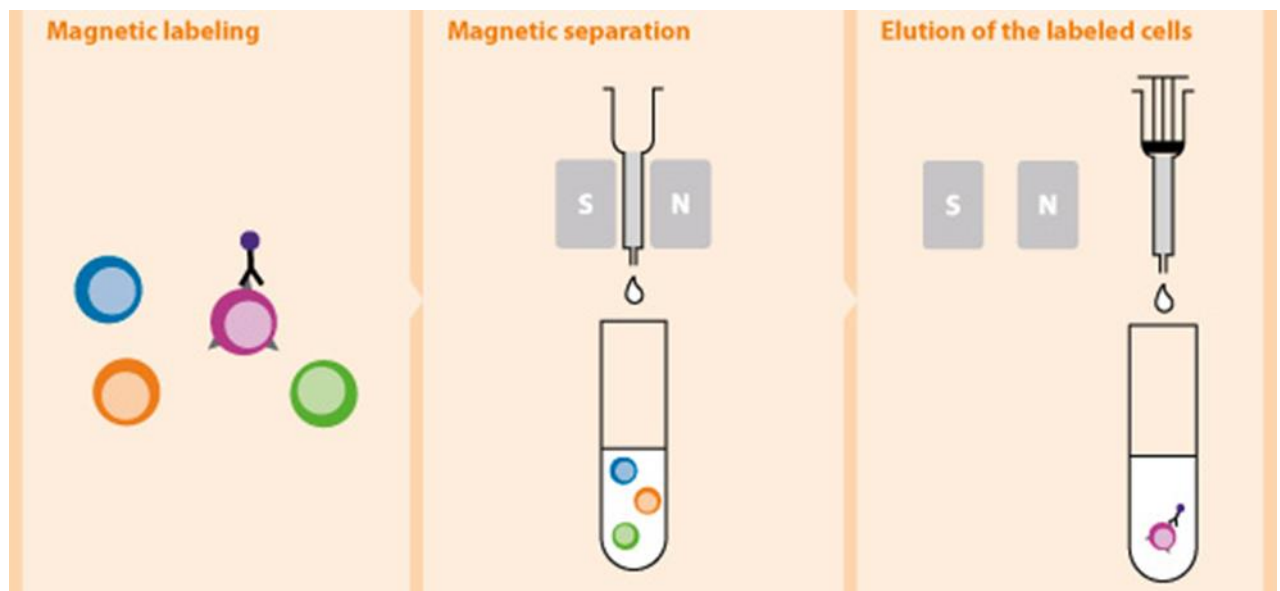


Abbildung 2.3 Magnetisches Sorten (Biotec, 2013)

In Abbildung 2.3 wird das Prinzip des magnetischen Sortens erklärt. Ausgangsmaterial ist eine Zellsuspension, die unter anderem die zu separierenden Zellen enthält. Zuerst werden die zu isolierenden Zellen mit einem passenden Antikörper markiert. Dieser Antikörper ist an ein magnetisches Teilchen gekoppelt. Im zweiten Schritt wird die Zellsuspension mit den Antikörper-markierten Zellen auf eine Säule gegeben, welche sich in einem magnetischen Feld befindet. Die mit dem Antikörper markierten Zellen werden somit in der Säule durch die magnetischen Kräfte festgehalten, wohingegen die nicht markierten Zellen in einem darunter stehenden Röhrchen aufgefangen werden. Diese Zellen können als Negativ-Kontrolle verwendet werden. Nachdem die Säule nun mehrere Male gewaschen wurde, um möglichst viele nicht gebundene Zellen zu entfernen, wird darunter ein

frisches Röhrchen platziert und die Säule mitsamt dem Röhrchen aus dem Magnetfeld entfernt. Nun wird die Säule erneut gespült und aufgrund der nun nicht mehr vorhandenen magnetischen Kräfte werden die Antikörper gebundenen Zellen in das Röhrchen gespült. Diese können nun weiter verwendet werden.

Gewebsgewinnung

C57BL/6J / STOCK Tg (Cspg4-DsRed.T1)1Aki/J

Isofluran

X% Ethanol

PBS

PBS+25 %FCS+0,1 %Collagenase IV

PBS+25 %FCS

PBS+5 %FCS+0,5 % 0,2 M EDTA

Die Gewinnung des Gewebes für das magnetische Sorten erfolgte wie in 2.2.2, allerdings wurden die Schritte nach Gewebentnahme unter der Sterilbank durchgeführt, da die Zellen im Folgenden in Kultur aufgenommen werden sollten. Daher war eine bakterielle Besiedlung zu vermeiden. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation in MACS-Puffer (50 ml PBS, 2,5 ml FCS, 100 µl 0,2 M EDTA) aufgenommen.

Magnetische Koppelung

Anti-ANG-2

PBS+5 %FCS+0,5 % 0,2 M EDTA

Um aus der Zellsuspension Perizyten zu gewinnen, wurde diese mit 10 µl Antikörper (Anti-ANG-2), welcher mit magnetischen *Beads* gekoppelt war, für 30 min bei 4°C inkubiert. Um die nicht-gebundenen Antikörper wieder zu entfernen, wurde die Suspension mit 20 ml MACS – Puffer für 5 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen.

Magnetisches Sorten

70 % Ethanol

PBS+5 %FCS+0,5 % 0,2 M EDTA

Endothelial Cell Growth Medium 2

Da eine große Zellmenge isoliert wurde, wurden LS Columns verwendet. Alle Geräte wurden mit 70 % Ethanol besprüht und unter der Sterilbank vorbereitet. Die Säule wurde zusammen mit dem Magneten (*MidiMacs-Seperator*) an der Magnetplatte (*MultiStand*) befestigt, siehe Abbildung 2.4. Darunter wurde ein 15 ml Falcon platziert.



Abbildung 2.4 MidiMacs-Separator mit Column in MultiStand (Biotec, 2013)

Zunächst wurde die Säule vorbereitet, indem sie mit Macs-Puffer gespült wurde. Danach wurde die durch einen 30 μm Filter pipettierte Zellsuspension auf die Säule gegeben und die Zellen wanderten durch den Magneten in das Falcon. Nun wurden die restlichen, nicht an den Magneten gebundenen Zellen, durch dreimaliges Waschen mit je 3 ml Macs-Puffer aus der Säule entfernt. Einige Zellen aus dem Falcon wurden als Negativ – Kontrolle weiterverwendet. Anschließend wurde ein neues Falcon unter der Säule platziert und diese vom Magneten getrennt. Jetzt erfolgte die Spülung der Säule mit 2 ml MACS-Puffer. Diese, wie auch die AN2-negativen Zellen, wurden nun noch einmal bei 1200 rpm für 3 min bei 4 °C zentrifugiert und in *Endothelial Cell Growth Medium 2* aufgenommen. Die gewonnenen Zellen wurden in Kultur aufgenommen.

2.2.6 Zellkultur

0,1 % Gelatin Lösung
Endothelial Growth Medium 2
DMEM high glucose+ 20 % FCS

Die gesorteten und gemacsten Zellen wurden in Kultur genommen, um die isolierten Perizyten zu charakterisieren.

Dazu wurden zunächst Platten (96 well, 48 well, 4 well) mit 0,1 % Gelatin-Lösung unter der Sterilbank beschichtet. Diese wurden für einige Zeit zum Trocknen unter der Sterilbank belassen und kurz vor der Aussäung wurde die restliche Flüssigkeit abgesaugt.

Die Zellen wurden für eine Woche mit Endothelzell-Wachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert.

Bei den gemacsten Zellen wurde bereits am Tag 1 ein Teil des Mediums vorsichtig abgenommen und frisches Medium auf die verbleibenden Zellen gegeben, da sich

häufig zu viele Zellen in einem *well* befanden. An Tag 3 wurde das Medium vollständig abgenommen und die bereits adhärennten Zellen vorsichtig mit Medium gewaschen. Danach wurden frisches Medium auf die Zellen gegeben und diese wieder im Inkubator gelagert. In den ersten Tagen wurde das Medium jeden Tag gewechselt.

Färbung der gemachten Zellen

PBS
PFA 4 %
1x TBS
5 % BSA in TBS
Anti-NG2 / Anti-CD31 / Anti-CD90 / Anti-Sca1/Anti- α SMA
Anti-rabbit 488, Anti-rat 594, Anti-mouse 488
Mounting Medium + Dapi

Bei der Färbung der Zellen wurde ähnlich wie bei den Gewebsschnitten vorgegangen. Zunächst wurden die Zellen jedoch zweimal für 3 min mit PBS gewaschen. Danach wurden sie 7 min mit 4% PFA fixiert, welches darauffolgend mit TBS wieder herunter gewaschen wurde (2x 3 min). Anschließend erfolgte die Blockierung mit 5% BSA über 45 min. Die Antikörper, welche im Folgenden auf die Zellen gegeben wurden, wurden wie folgt verdünnt: Anti-NG2 1:500, Anti-CD90 1:100, Anti- α SMA 1:1000, Anti-CD31 1:100 und Anti-Sca-1 1:100. Auch hier wurden die Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellen mit TBS für 3x 3 min mit TBS gewaschen. Der passende sekundäre Antikörper (Anti-rabbit 1:1000, Anti-rat 1:1000, Anti-mouse 1:2000) wurde bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert und anschließend ebenfalls 3x 3 min herunter gewaschen. Die Objektträger wurden von den Kammern getrennt und mit Mounting Medium + Dapi eingedeckelt.

Um die Ergebnisse zu dokumentieren, wurden die Objektträger mikroskopiert und fotografiert.

2.2.7 Induktion einer sterilen Inflammation im Pankreas

Allgemeine Erläuterung zur Induktion einer sterilen Pankreatitis

Um die Auswirkungen einer Pankreatitis auf das Gewebe beurteilen zu können, muss zunächst einmal eine Entzündung im Pankreas kontrolliert ausgelöst werden. Ein Ansatzpunkt ist das subkutane Spritzen von dem Cholezystokinin (CCK)-Analogon Caerulein. CCK wird aus dem Dünndarm freigesetzt und regt die Produktion von Pankreasenzymen an (Welsch, 2005) (S. 403). Obwohl Caerulein ein Analogon von CCK ist, wirkt es an den niedrig-affinen CCK-Rezeptoren als

Antagonist, welches die hemmende Wirkung von CCK auf die Sekretion von Verdauungsenzymen an diesen Rezeptoren aufhebt. Somit induziert Caerulein indirekt eine vermehrte Sekretion dieser Enzyme (Saluja et al., 1989) (S.8968). Dadurch werden verschiedene Mechanismen in Gang gesetzt, wie zum Beispiel die intrazelluläre Aktivierung von Trypsinogen und die Aktivierung von NFκB. Dies führt wiederum zu Zellschäden und letztendlich zur Entstehung einer akuten Pankreatitis (Singh et al., 2001).

Somit zählt die parenterale Gabe von Caerulein zu einer der gängigen Methoden zur Induktion einer sterilen akuten Pankreatitis in Mäusen (Pandol et al., 2007).

Durchführung

Um die Veränderung des Pankreas und im Besonderen die der Perizyten während der Entzündungsphase beobachten zu können, wurde ein Protokoll zur Induktion einer Pankreatitis verwendet, welches im Labor bereits etabliert war.

Dabei wurden die Mäuse, in diesem Fall C57BL/6J-Mäuse, in zwei Gruppen eingeteilt. Ein Gruppe erhielt über 2 Tage pro Tag je 8 Injektionen mit 100 µl Caerulein Lösung (20 µg / ml) im Abstand von 60 min. Die Kontrollgruppe erhielt anstatt der Caerulein Lösung eine Natrium-Chlorid Lösung zur gleichen Zeit. Zu Beginn des Experiments wurde den Mäusen Temgesic zur Analgesie gespritzt.

Um die verschiedenen Stadien der Entzündung beobachten zu können wurden nun in diesem Fall je eine Maus der Caerulein-Gruppe und eine Maus der NaCl-Gruppe nach ca. 16/27 Stunden getötet, sowie je eine Maus jeder Gruppe nach ca. 42/48 Stunden, siehe Abbildung 2.5.. Nachdem die Zellen zur Durchflusszytometrie vorbereitet wurden, siehe 2.2.3, erfolgte die Färbung mit Anti - CD31, um einen Referenzwert zu NG2 zu erhalten. Danach wurde wie in 2.2.3 beschrieben, fortgefahren.

Um das entzündliche Gewebe auch in der Immunfluoreszenz näher zu beurteilen, wurde das gleiche Entzündungsprotokoll auf C57BL/6J-Mäuse angewandt. Die Durchführung der Immunfluoreszenz ist in 2.2.2 näher beschrieben.

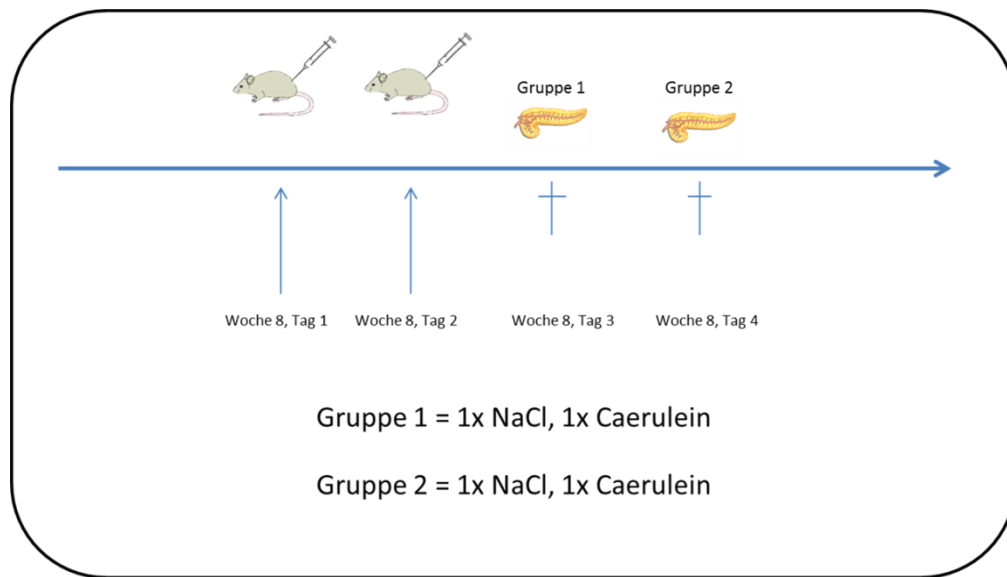


Abbildung 2.5 Induktion einer sterilen Pankreatitis in Mäusen mit Caerulein

3 Ergebnisse

Um einen Überblick über die Lokalisation und Morphologie der Perizyten im Pankreasgewebe zu bekommen, wurden zu allererst immunhistochemische Färbungen angefertigt. Diese wurden darauffolgend durch Immunfluoreszenzfärbungen ergänzt, um anschließend Doppelfärbungen mit mesenchymalen Stammzellmarkern durchführen zu können. Um die Doppelexpression von Perizyten- und mesenchymalen Markern auf den Zellen weiter zu quantifizieren, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Zur Beobachtung des Verhaltens der pankreatischen Perizyten während der Entzündungsphasen, wurde bei Wildtyp-Mäusen eine akute Pankreatitis induziert. Anschließend wurde, um Veränderungen der Populationen zu erkennen, eine weitere Durchflusszytometrie durchgeführt. Zur genaueren Beschreibung dieser wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von dem entzündlichem Gewebe angefertigt. Abschließend wurde die Isolation von Perizyten aus murinem Pankreas etabliert, um in weiteren Arbeiten in vitro-Experimente durchführen zu können.

3.1 Lokalisation und Morphologie von Perizyten im murinen Pankreas

Begonnen wurde mit der Lokalisierung der Perizyten im Pankreas. Dazu bot sich eine Immunhistochemie an, da so die Struktur und die Morphologie gut im Gewebeszusammenhang beurteilt werden können. Als Marker für Perizyten wurde NG2 verwendet (siehe Tabelle 1.1). Zur Positivkontrolle wurde Gehirngewebe verwendet.

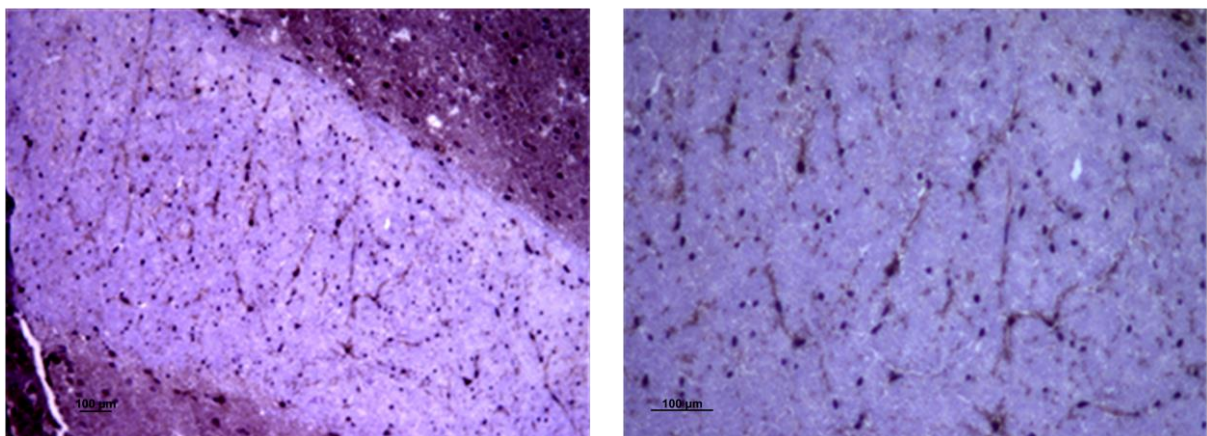


Abbildung 3.1 Immunhistochemische Färbung mit der Darstellung von NG2+ Zellen im murinen Gehirn, Vergrößerung 100x, 200x

In Abbildung 3.1 kann die typische Struktur der Perizyten im Gehirn erkannt werden. Es zeigen sich langgestreckte Zellen mit Fortsätzen und einem rundlichen Zellkörper. Im Übersichtsbild ist zu erkennen, dass sich im Gehirn besonders viele Perizyten ansiedeln.

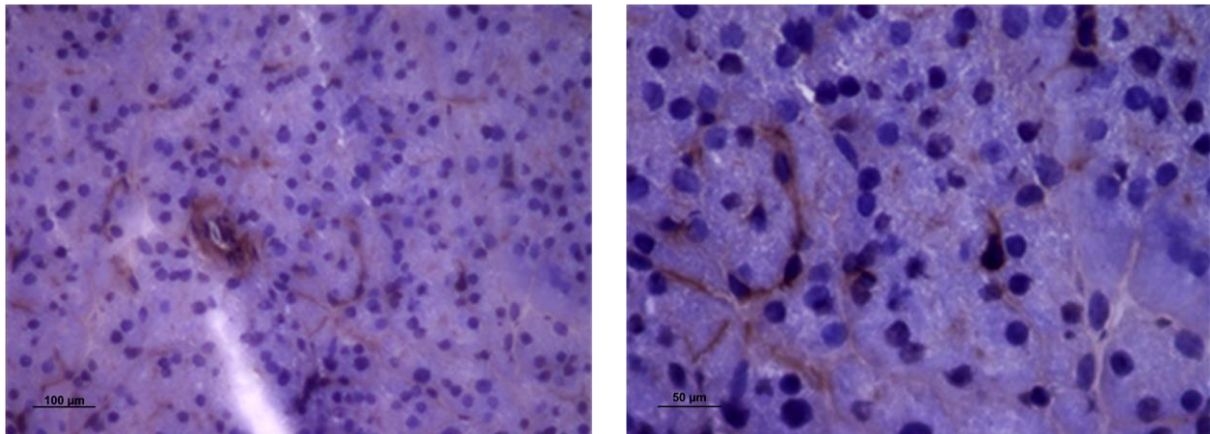


Abbildung 3.2 Immunhistochemische Färbung mit Darstellung von NG2+ Zellen im murinen Pankreas, Vergrößerung 200x, 400x

Im Pankreas zeigt sich eine ähnliche Struktur der Perizyten, siehe Abbildung 3.2. Auch hier erkennt man die langen Zellfortsätze, sowie vereinzelte rundliche Zellkörper. Häufig sind auch Fortsätze ohne dazugehörige Zellkerne zu erkennen. Zusätzlich zu den einzeln angeordneten Perizyten kann man Zellverbände mit einem Lumen finden, welches gleich von mehreren Zellen umschlossen wird. Die Zellkerne der Perizyten ähneln denen der umliegenden Azinuszellen, sind jedoch verglichen mit diesen etwas länglicher. Im Vergleich zum zerebralen Gewebe erscheinen die Perizyten im Pankreas etwas seltener. Während eine Großzahl der Perizyten im Gehirngewebe einer gemeinsamen Ausrichtung folgen, erkennt man im Pankreas keine besondere Lage, die Zellen scheinen relativ gleichmäßig, aber verschiedenartig angeordnet im Gewebe zu liegen.

Um die Koexpression von NG2 und mesenchymalen Stammzellmarkern auf den Zellen nachzuweisen, wurde mit Immunfluoreszenzfärbungen fortgefahren, da mit dieser Methode Doppelfärbung gut durchzuführen sind. Zuerst einmal wurde der Perizytenmarker NG2 in der Immunfluoreszenz etabliert.

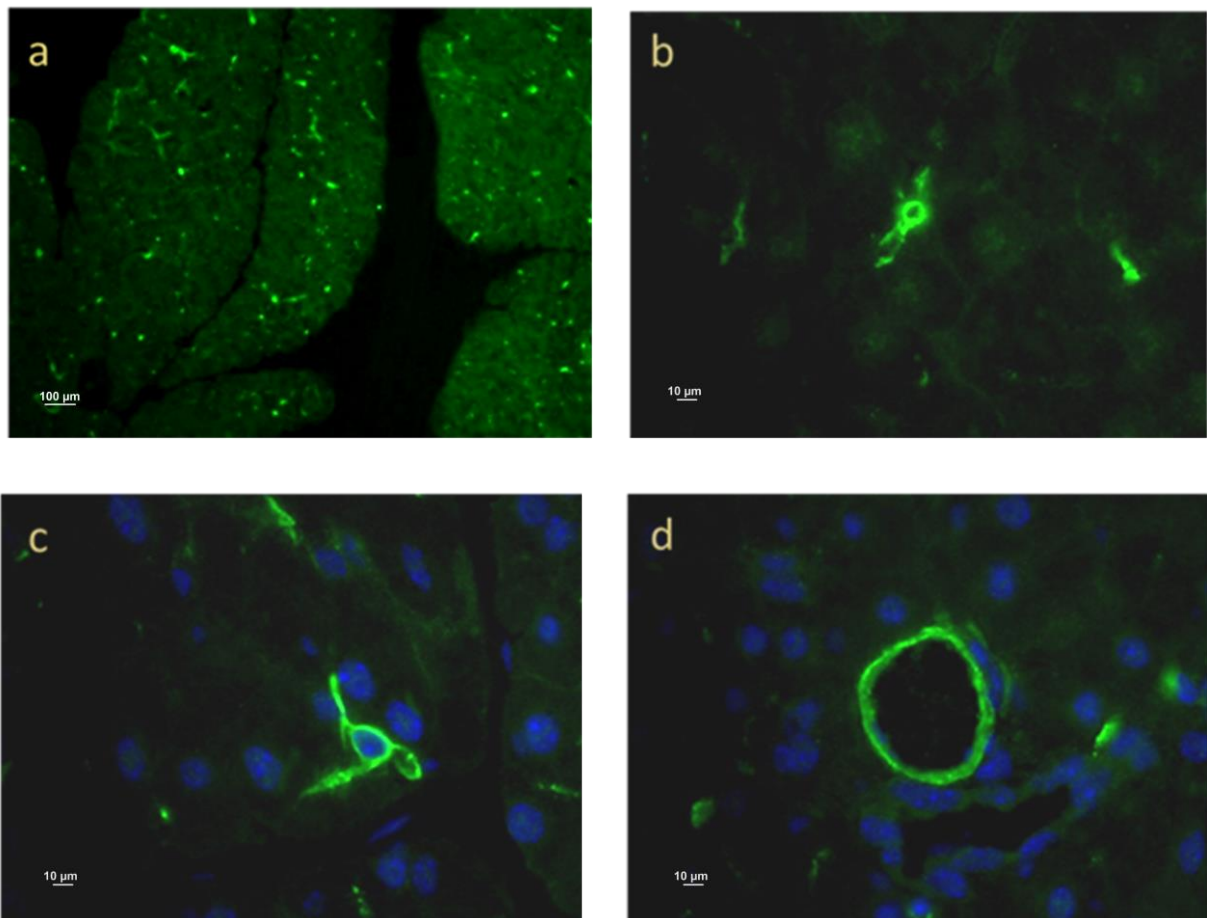


Abbildung 3.3 Immunfluoreszenzfärbung von NG2+ Zellen im murinen Pankreas, a)100fach, b)630fach, c)630fach, d)630fach vergrößert. Der Anti-NG2 Antikörper wurde mit einer grünen Fluoreszenz (488 nm) gekoppelt. In blau wurde eine Dapi-Färbung hinzugefügt, welche die Zellkerne sichtbar macht.

In der Immunfluoreszenz wird die Struktur der NG2 positiven Zellen (NG2+) sichtbar. In Abbildung 3.3 sieht man in der Übersichtsvergrößerung Abbildung 3.3a) die Verteilung der NG2+ Perizyten im Pankreas. Auch hier erkennt man eine relativ gleichmäßige Verteilung äquivalent zu der immunhistochemischen Färbung (siehe Abbildung 3.2) der Zellen im Gewebe. Eine besondere Ausrichtung der Ausläufer ist nicht zu erkennen.

Abbildung 3.3b), sowie Abbildung 3.3c) zeigen einen einzelnen Perizyten mit mehreren Fortsätzen, welche sich zwischen die umliegenden Zellen erstrecken. Der in c) dargestellte Zellkern wird von einem rundlichen Zellkörper umgeben. Abbildung 3.3d) zeigt Perizyten im Zellverband. Es sind mehrere Zellkerne zu sehen, die zu verschiedenen Perizyten gehören zu scheinen. In der Mitte befindet sich ein Lumen. Neben diesem Verband ist ein weiteres Lumen zu sehen, welches jedoch nicht von NG2+ Zellen umgeben wird. In diesen Abbildungen sind zusätzlich viele vereinzelte

positive Signale zu erkennen, bei welchen es sich um quer angeschnittene Zellfortsätze der Perizyten handeln könnte.

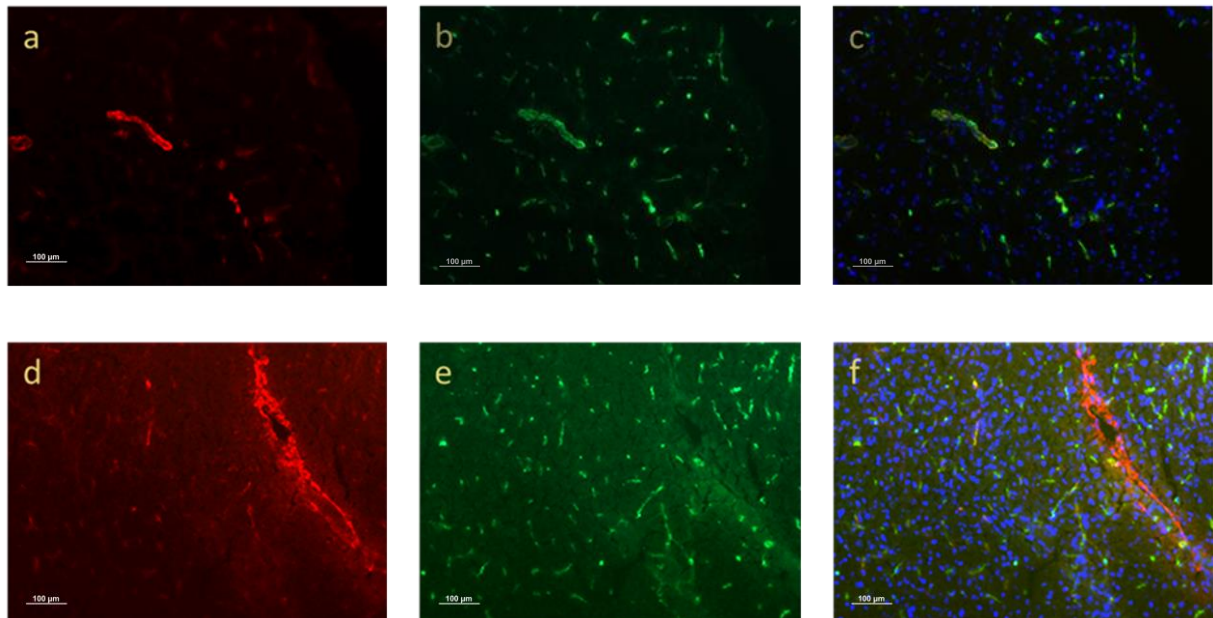


Abbildung 3.4 Immunfluoreszenz - Doppelfärbung von NG2+ (488nm, grün) und α SMA+ (594nm, rot), Perizyten im murinen Pankreas, die Zellkerne sind durch Dapi-Färbung dargestellt, Vergrößerung 200x

Zur genaueren Beschreibung der Perizyten wurde ein weiterer Perizytenmarker, α SMA, verwendet, welcher zusätzlich die Perizyten an Venulen detektiert, vergleiche Tabelle 1.1. Man erkennt in Abbildung 3.4, dass viele Perizyten, besonders dort, wo nur vereinzelte Zellen angefärbt sind, NG2+, aber α SMA- sind. Die Abbildungen a)-c) zeigen Zellen, welche α SMA+ NG2+, also doppelpositiv für beide Perizytenmarker sind. Die Abbildungen d)-f) demonstrieren die Spezifität von α SMA für venöse Gefäße, welche nicht NG2+ erscheinen. Insgesamt lässt sich sagen, dass deutlich weniger Zellen α SMA+ sind, weshalb die nachfolgenden Färbungen überwiegend mit NG2 als Perizytenmarker durchgeführt wurden. So kann eine größere Anzahl an Zellen detektiert werden, auch wenn zu bemerken ist, dass es sich immer um arteriell oder kapillär gelegene Perizyten handelt.

Um die relative Lage der Perizyten in Bezug auf Gefäße zu überprüfen, wurde eine NG2/CD31-Doppelfärbung durchgeführt. CD31 ist ein Marker für endotheliale Zellen, welche die innerste Schicht eines Gefäßes bilden, siehe 1.2 Gefäße.

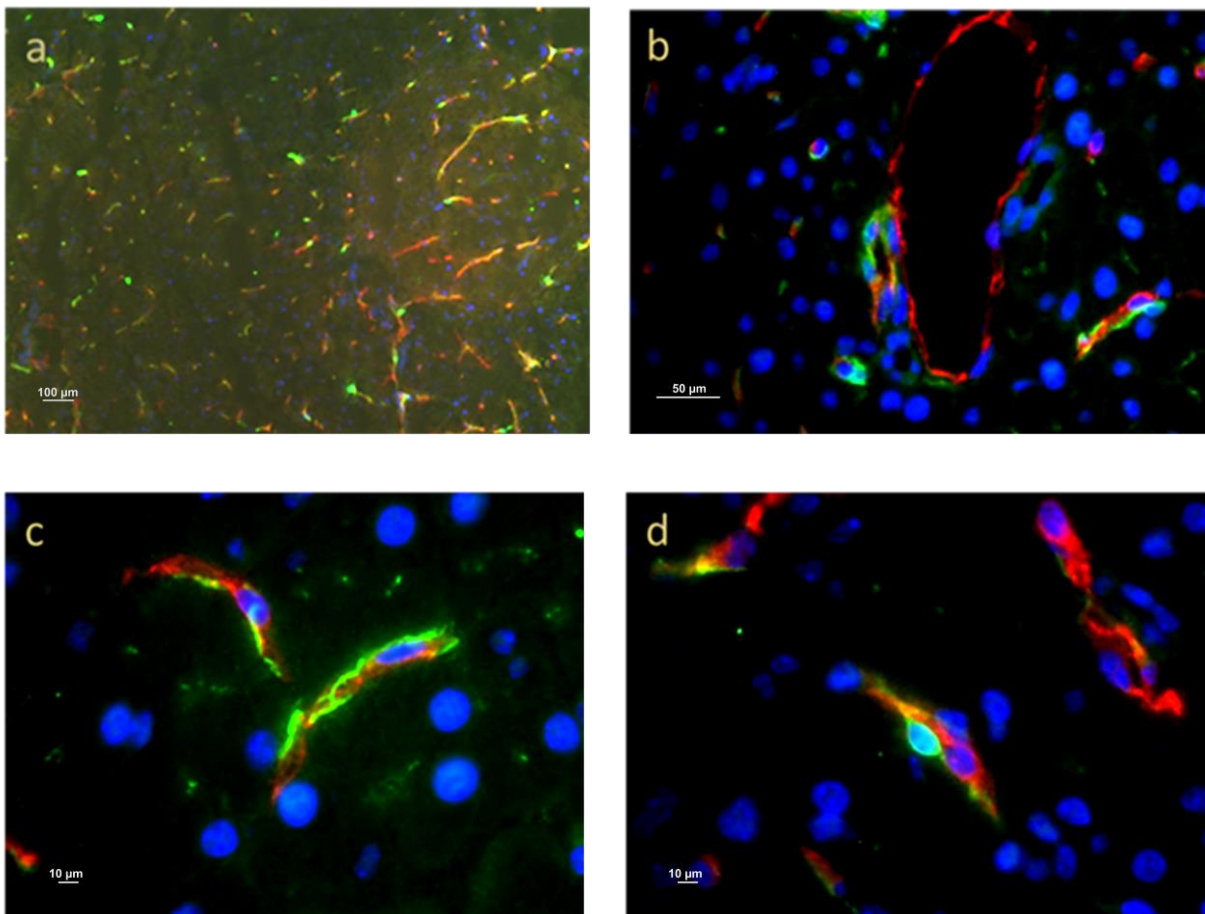


Abbildung 3.5 Immunfluoreszenzfärbung mit Darstellung von NG2+ und CD31+ Zellen im murinen Pankreas, a)100fach, b)400fach, c)630fach, d)630fach vergrößert, NG2 ist in grün (488nm) , CD31 in rot (594nm), Zellkerne durch Dapi – Färbung blau dargestellt

Abbildung 3.5 zeigt in der Übersichtsaufnahme a) CD31+ Zellen und NG2+ Zellen im murinen Pankreasgewebe. Man erkennt eine ähnliche Verteilung der Signale. In b) sind Gruppen von Perizyten und Endothelzellen dargestellt, welche um Lumen herumgruppiert sind. Während CD31+ Zellen die Begrenzung zum größeren und kleineren Lumen darstellen, sind die NG2+ Zellen nur um das kleinere Lumen herumgelegt zu sehen. Außerdem sind NG2+ und CD31+ Zellen unabhängig von Lumen im Gewebe zu sehen. Der enge Kontakt dieser Zellen ist in Abbildung 3.5c) zu erkennen. CD31+ und NG2+ Zellen liegen einander auf und die Ausläufer der NG2+ Zelle umranken die der CD31+ Zelle. In Abbildung 3.5d) zeigt sich, dass eine NG2+ Zelle gleich zwei CD31+ Zellen aufgelagert ist und über ihre Ausläufer mit beiden in Kontakt tritt. Zu allen Bildern lässt sich sagen, dass, wie oben beschrieben, zwar CD31+ Zellen zu finden sind, in deren unmittelbarer Angrenzungen keine NG2+ Zellen liegen, wie in Abbildung a). Jedoch sind im Umkehrschluss keine NG2+ Zellen ohne anliegende CD31+Zellen zu sehen. Zwar sind manchmal angeschnittene

Perizyten ohne Endothelzellkontakt zu erkennen, jedoch keine komplette Zelle mit Zellkern, welche nicht mit Endothelzellen in Kontakt tritt.

3.2 Expression von mesenchymalen Stammzellmarkern auf pankreatischen Perizyten in der Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie

Um zu überprüfen, ob die NG2+ Perizyten im Pankreas mesenchymale Marker exprimieren und wo im Gewebe diese doppelpositiven Zellen zu finden sind, wurden Immunfluoreszenz – Doppel- Färbungen durchgeführt. Somit sollte es möglich sein, Aussagen über Lage und Morphologie dieser Zellen zu treffen. Zusätzlich wurden Durchflusszytometrie – Analysen erstellt, um Informationen über deren Menge und Verhältnis zu den einzelpositiven Zellen zu erlangen.

Abbildung 3.6 zeigt Doppelfärbungen von NG2+ Zellen mit dem mesenchymalen Marker CD90 (siehe Tabelle 1.1). In der 20-fachen Vergrößerung (Zeile a) des Gewebes erkennt man, dass sowohl Kapillarperizyten als auch Perizyten an den Arteriolen CD90 positive Signale (erscheint im Bild gelb) zeigen. Im Bild zeigen sich mehr NG2+ als CD90+ Zellen. Während das NG2 Protein einen Großteil der Zelloberfläche besetzt, findet man CD90+ Signale eher punktuell. In unmittelbarer Nähe größerer Gefäße zeigt sich jedoch, wie in Abbildung 3.6 b), auch eine eher flächige Ausbreitung von CD90. Besonders auffällig ist in dieser Bildreihe, dass sich nur an einigen der dargestellten Gefäße CD90+NG2+ Zellen befinden. Es finden sich außerdem ausschließlich CD90+ Gefäßwände, sowie ausschließlich NG2+ Gefäßwände. Die Expression des NG2 scheint strikt auf die Gefäße begrenzt, wohingegen CD90 auch im Gewebe, welches die Gefäße umschließt zu finden ist. Besonders detailliert sind die doppelpositiven Zellen in der 100-fachen Vergrößerung dargestellt. Die Bildreihe c) zeigt einen kapillären Perizyten, welcher den mesenchymalen Marker CD90 exprimiert. In d) ist dargestellt, dass sich neben doppelpositiven Zellen auch NG2+ CD90- Zellen in direkter Nachbarschaft befinden.

Als weiterer mesenchymaler Marker wurde CD105/Endoglin (siehe Tabelle 1.1) verwendet, siehe Abbildung 3.7. Da CD105 zusätzlich ein Marker von Endothelzellen ist, muss besonders darauf geachtet werden, ob wirklich ein- und dieselbe Zelle beide Marker exprimiert und nicht die benachbarte Endothelzelle Träger des Endoglin-Antigens ist. Anders als bei der vorherigen Färbung sind in Übersichtsfärbung a) mehr Zellen zu finden, welche den mesenchymalen Stammzellmarker besitzen. Hier erkennt man zunächst nur doppelpositive Zellen im Bereich der größeren Gefäße. Deutlicher dargestellt ist dies in der 400-fachen

Vergrößerung, Bilderreihe b). Hier erkennt man jedoch auch in der oberen linken Ecke des Bildes doppelpositive Zellen, welche nicht Teil eines größeren Gefäßverbundes sind. Abbildung 3.7c) zeigt vier Zellen, bei denen es sich bei den zwei unterhalb liegenden vermutlich um kapilläre NG2+CD90+ Zellen handelt.

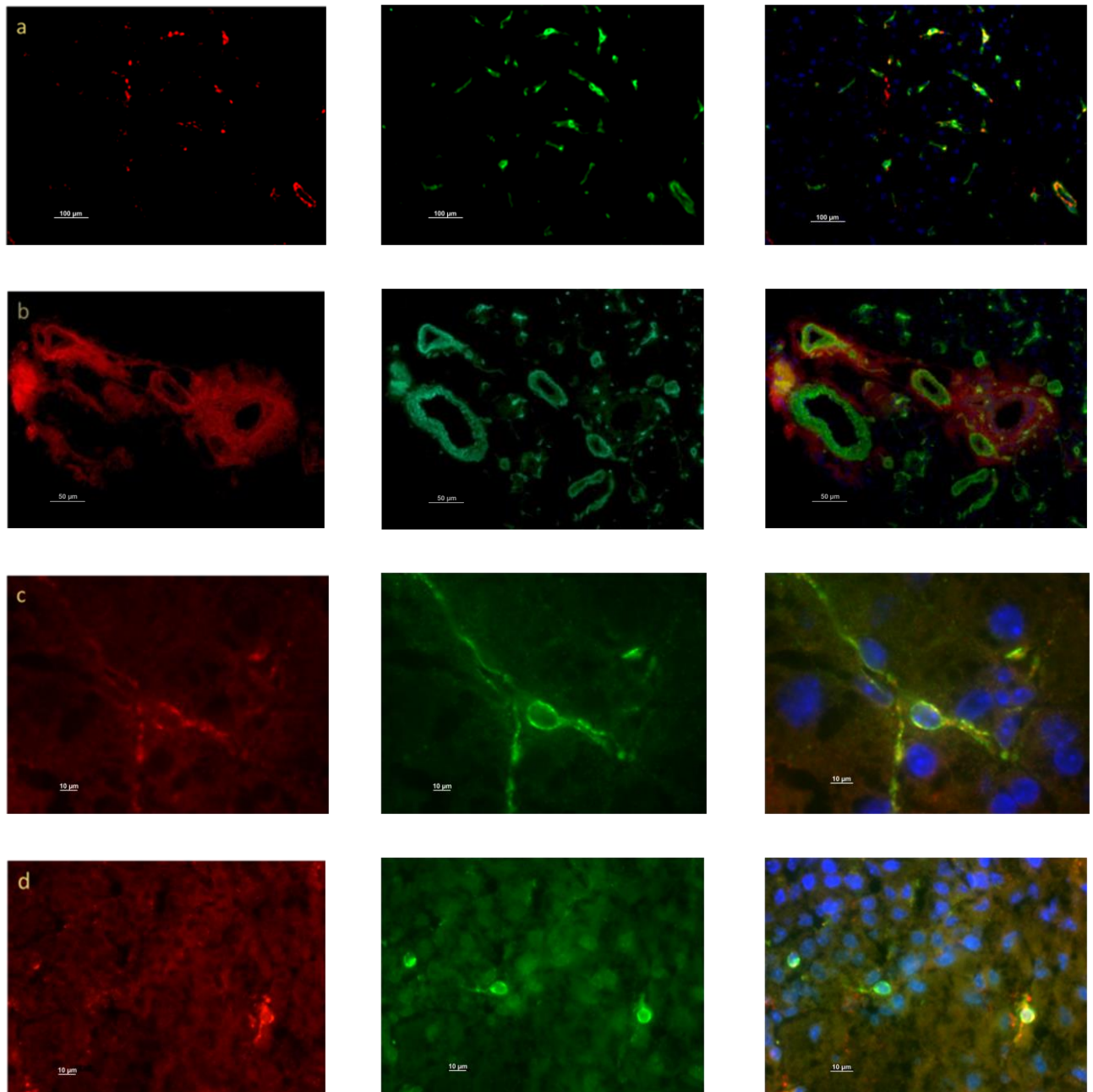


Abbildung 3.6 Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigt die Expression von CD90 in rot (594nm) auf NG2+ Perizyten in grün (488nm) im murinen Pankreas, Kernfärbung Dapi (blau) 200x, 400x, 1000x, 10000x

Da die Darstellung von CD90+NG2+ Zellen sich als geeigneter herausstellte, um mesenchymale Marker mit Perizytenmarker darzustellen, wird diese Kombination in den folgenden Experimenten bevorzugt eingesetzt.

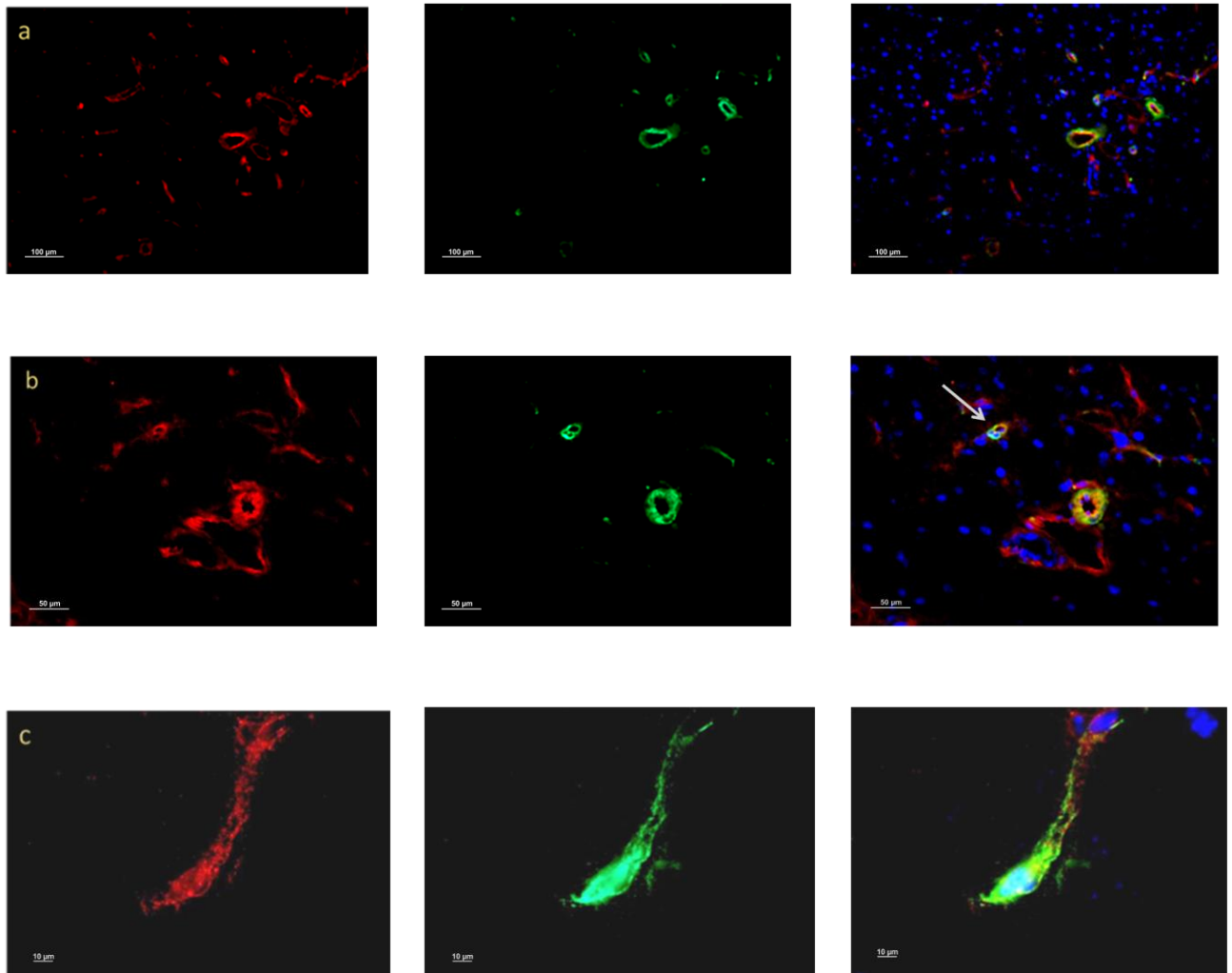


Abbildung 3.7 Expression von CD105+ (rot) auf NG2+ (grün) Perizyten im murinen Pankreas, Kernfärbung Dapi (blau) 200x,400x,1000x

Um zu evaluieren, ob pankreatische Perizyten auch Stammzellmarker exprimieren, welche nicht ausschließlich mit mesenchymalen Stammzellen assoziiert sind, wurde eine Färbung mit dem Sca-1 Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 gezeigt. Dass es auch doppelt positive Zellen für Sca-1 und NG2 gibt, ist besonders gut in Abbildung 3.8b) zu erkennen. Auch Sca-1+ Zellen zeigen eine Expression in Kombination mit NG2+ Zellen sowohl an Arteriolen wie an Kapillarperizyten. Es scheint, als handele es sich bei doppelpositiven Zellen häufiger um lumenassoziierte Zellen als bei Zellen die mesenchymale Stammzellmarker exprimieren. Im Vergleich zu diesen finden sich weniger doppelpositive Zellen. Wie auch in der Färbung der mesenchymalen Zellen finden sich neben den

doppeltpositiven viele einfach Sca-1+ Zellen. Diese sind relativ gleichmäßig im Gewebe verteilt. Es finden sich zusätzlich NG2+-Zellen und direkt benachbarte Sca-1+ Zellen (Daten nicht dargestellt).

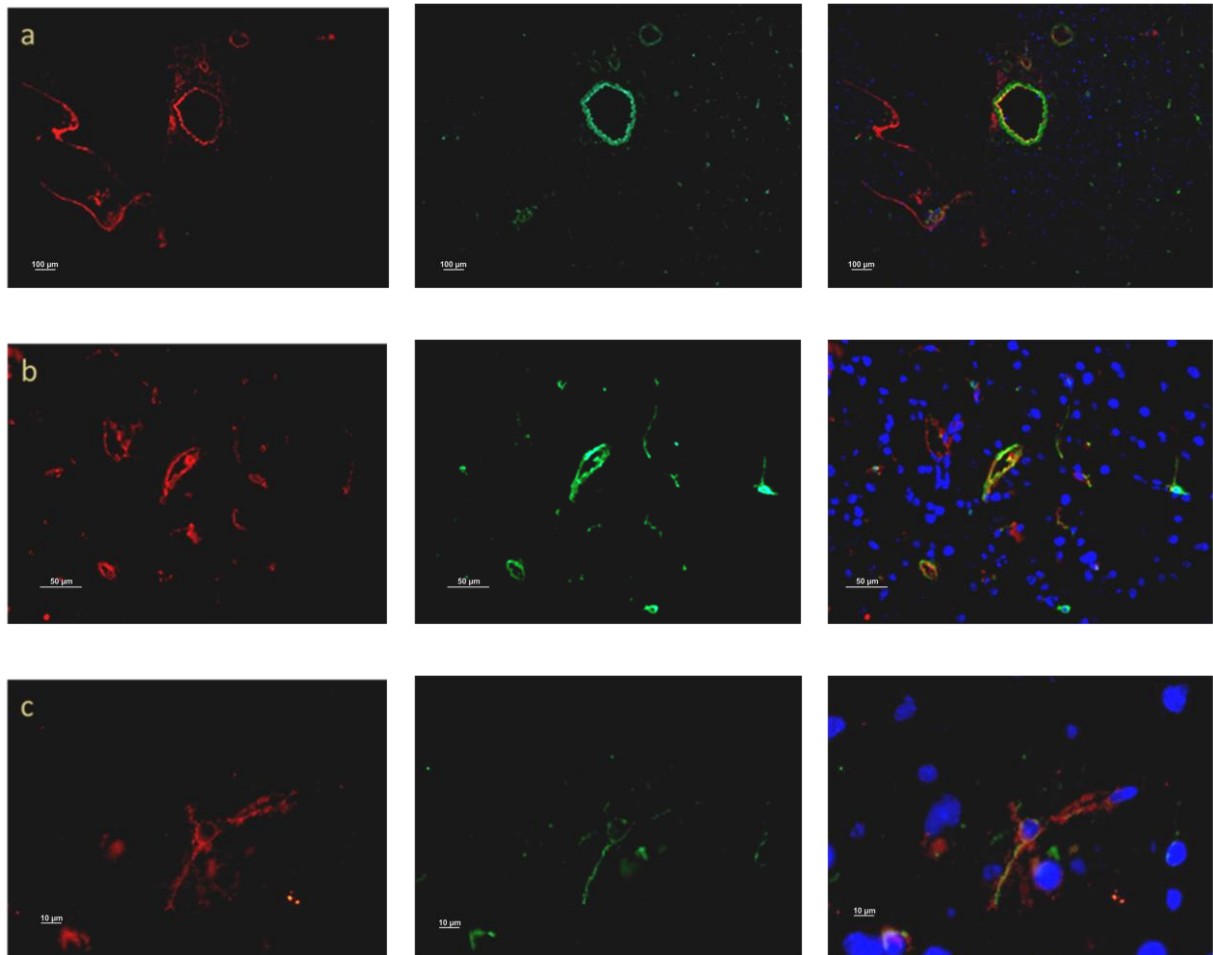


Abbildung 3.8 Expression von Sca-1 (rot) auf NG2+ (grün) Perizyten im murinen Pankreas, Kernfärbung Dapi (blau) 100x, 400x, 1000x Vergrößerung

Um die Expression von mesenchymalen Markern auf NG2+ Zellen zu validieren und des Weiteren Aussagen über deren Häufigkeit in gesundem Gewebe machen zu können, wurden frisch isolierte Zellen in der Durchflusszytometrie auf Perizyten- und mesenchymale Stammzellmarker untersucht (Methode siehe 2.2.3).

Zunächst wurde die Population der zu messenden Zellen an Hand einer ungefärbten Probe eingestellt, siehe Abbildung 3.9.

Zur Einstellung der einzelnen Fluoreszenzmarker wurde der Antikörper CD31 mit allen vier unterschiedlichen Fluoreszenzen (APC, pacific blue, PE, PE-Cy7) gekoppelt. Die Grenze für ein positives Signal wurde bei 10^2 gesetzt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Signale im Gate der anderen Fluoreszenzen nur verschwindend gering ansteigen, siehe Abbildung 3.10.

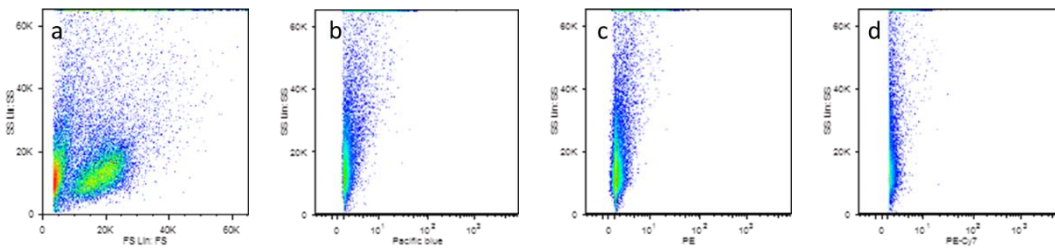


Abbildung 3.9 Die hier dargestellten Durchflusszytometrie-Bilder zeigen die Messung der ungefärbten Probe aufgetragen nach Größe und Granularität in a) und auf alle verwendeten Fluoreszenzen (b, c, d). Man erkennt in jeder Fluoreszenz kaum positive Signale jenseits von 10^2

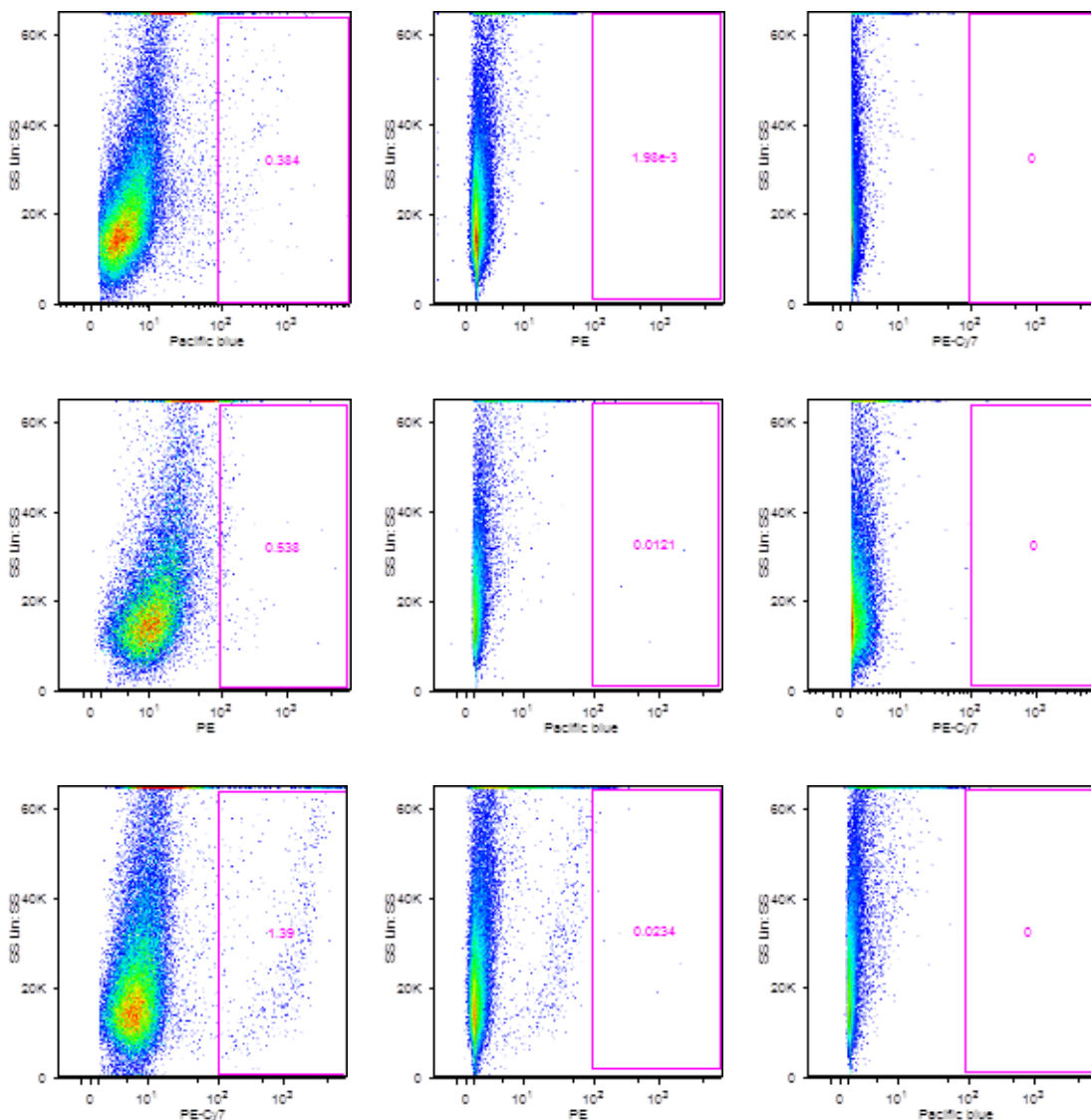


Abbildung 3.10 In dieser Abbildung sind die einzeln gefärbten Proben abgebildet. Das erste Bild der Zeile zeigt jeweils die gefärbte Fluoreszenz, die weiteren Bilder zeigen die Signale der nicht in dieser Probe vorhandenen Fluoreszenzen.

In Abbildung 3.10 zeigt sich, dass die Fluoreszenzen spezifisch dargestellt werden können, da sie in den anderen Wellenlängenbereichen keine oder nur sehr geringe Signale im Bereich von $< 0,025$ erzeugen.

Die Koppelung der Antikörper an die jeweiligen Fluoreszenzen ist in 2.2.3 erläutert.

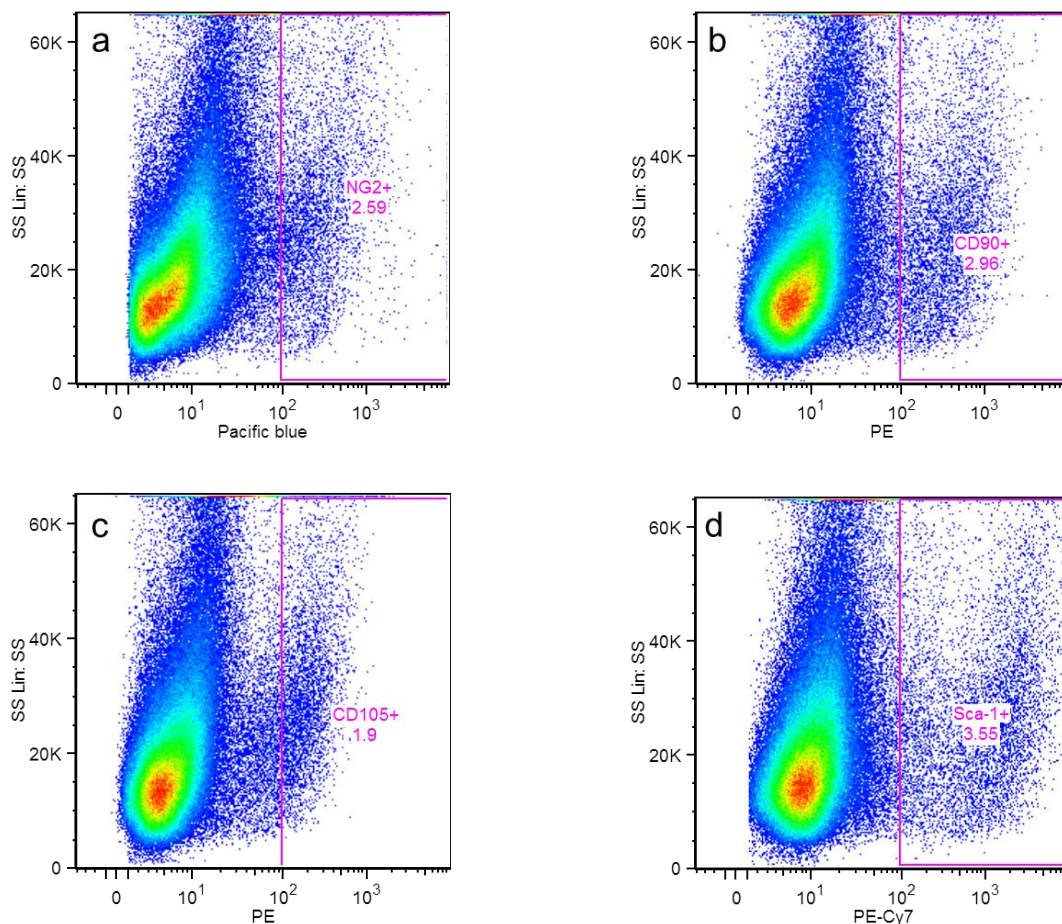


Abbildung 3.11 Diese Abbildung zeigt die einzelnen Populationen der untersuchten Zellen dargestellt in einem Pseudocolor-Blot: a) NG2+-pacific blue (2,59%), b) CD90+-PE(2,96%), c) CD105+-PE (1,9%), d) Sca-1+-PE-Cy7 (3,55%).

Die Durchflusszytometrie, siehe Abbildung 3.11, zeigt zunächst die prozentuale Anzahl der für die jeweiligen Antikörper positiven Zellen im pankreatischen Gewebe. Die NG2+ Zellen fanden sich mit 2,59-3,37% und einem Mittelwert von 2,87% (siehe Anhang A1). Da die Verwendung von vielen verschiedenen Fluoreszenzen die Wahrscheinlichkeit von Messfehlern durch Wechselwirkung der Fluoreszenzen untereinander erhöht, wurden die CD105+ Zellen in einer gesonderten Probe mit NG2+Zellen gemessen. Die Population der NG2+-Zellen in dieser Probe wich mit 1,77% etwas von der Population in der ersten Probe ab. Die prozentualen Werte der mesenchymalen Stammzellmarker variierten stärker, je nach Messung und ergaben

Mittelwerte von 3,39% CD90+ Zellen und 1,36% CD105+ Zellen. Sca-1+ Zellen machten im Mittel 3,85 % der gefacsten Zellen aus.

Um zu validieren ob Perizyten auch Träger von mesenchymalen Markern sind, wurden die NG2+ Signale mit denen der mesenchymalen Stammzellen korreliert. Abbildung 3.12 zeigt die Plots der unterschiedlichen Marker. Für alle dargestellten mesenchymalen Marker ergeben sich doppelt positive Zellpopulationen. CD90+NG2+ Zellen sind zu ca. 1,34% in der Probe vorhanden (Mittelwert aller Messungen: 1,81 %). In etwa der gleiche Anteil ergibt sich bei den einzeln positiven Zellen, siehe Abbildung 3.12a). Deutlich weniger doppelt positive Zellen finden sich von der CD105+NG2+ Population, 0,84% der Zellen zeigen beide Marker, siehe Abbildung 3.12b). Diese Probe enthält insgesamt kleinere Populationen an Perizyten und Zellen mit dem mesenchymalen Marker CD105. Hier ergibt sich ebenfalls ein ähnlicher Anteil einzeln und doppelt – positiven Zellen.

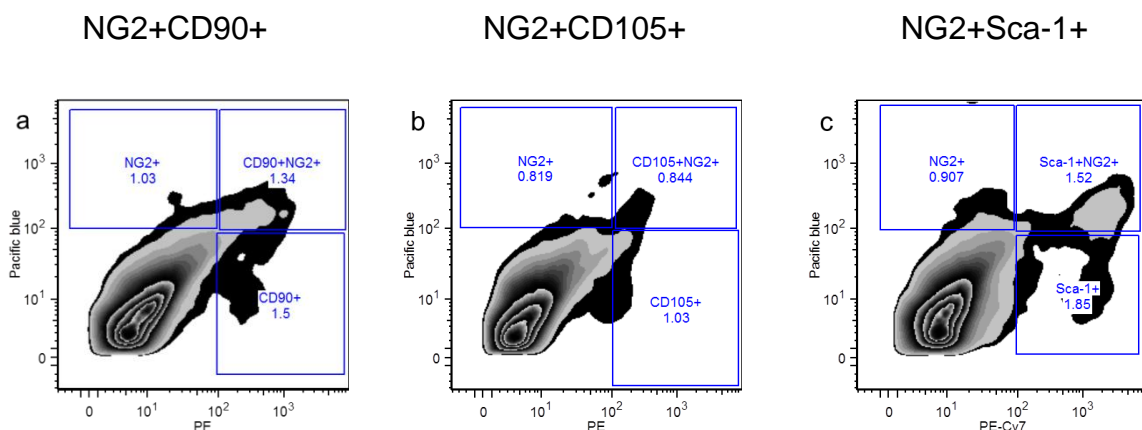


Abbildung 3.12 Durchflusszytometrische Analyse, Doppelexpression von Perizytenmarkern und mesenchymalen Markern auf pankreatischen Zellen, die Ergebnisse sind in Zebra Plots dargestellt. a) zeigt die Expression von NG2+ und CD90+ Zellen, es zeigt sich eine Doppelexpression von etwa 1,34%, b) zeigt die Expression von NG2+ und CD105+ Zellen, hier besteht eine Doppelexpression von ca. 0,84%, c) zeigt die Expression von NG2+ und Sca-1 + Zellen, eine Doppelexpression besteht bei ca. 1,52% der gesamten Zellen

Für die Korrelation von dem Stammzellmarker Sca-1 und NG2 zeigten sich folgende Ergebnisse: 1,52% doppelt positive Zellen (Mittelwert aller Messungen: 1,69%). Hier weichen die Werte der einzeln positiven Zellen etwas ab. Es zeigen sich mehr Sca-1+NG2- Zellen und weniger NG2+Sca-1-Zellen als doppeltpositive Zellen.

Die Ergebnisse sprechen somit für Perizytenpopulationen, welche mesenchymale und Stammzellmarker exprimieren. Ob die NG2+MSC+ Populationen auch gleichzeitig für den Stammzellmarker Sca-1 positiv sind zeigt Abbildung 3.13. Hier wurde die doppeltpositive Zellfraktion (NG2+MSC+) gegen einen weiteren, in der Probe gefärbten Stammzellmarker aufgetragen.

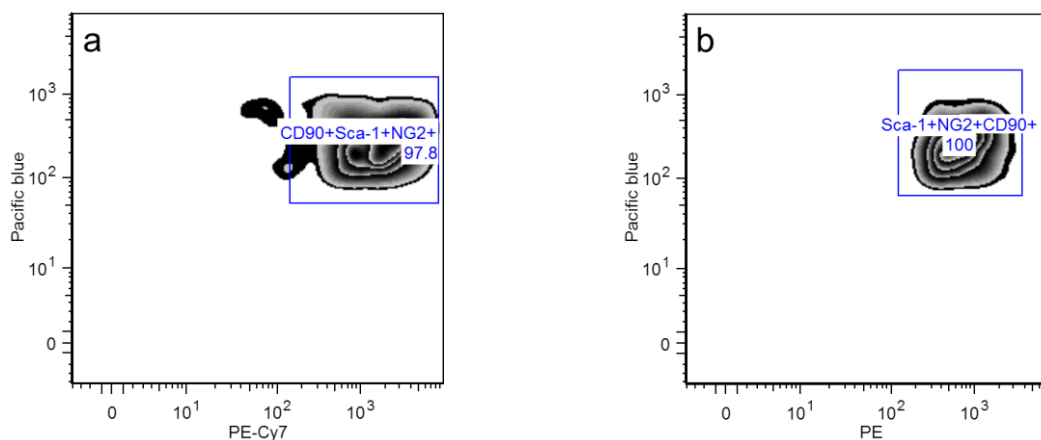


Abbildung 3.13 Durchflusszytometrie von murinen Pankreazellen. Darstellung von a) NG2+CD90+ Zellen im Bezug auf Sca-1+ Zellen und b) NG2+Sca-1+Zellen im Bezug auf CD90+ Zellen

Die Analyse zeigt, dass Zellen, welche NG2+CD90+ sind, zu über 97% auch das Sca-1 Antigen tragen. Im Umkehrschluss zeigt sich ein ähnliches Bild: Sca-1+NG2+ Zellen sind laut dieser Daten sogar zu 100% CD90+.

3.3 Isolation und Kulturbeobachtungen von pankreatischen Perizyten

Zu Beginn wurde versucht, NG2+Zellen mit mesenchymalen Markern an Hand eines Zellsorters zu isolieren, siehe Kapitel 2.2.4. Leider konnten nur sehr wenig vitale Zellen herausgesortet werden. Diese Zellen schienen zusätzlich nicht sehr lange in Kultur zu überleben. Auch die Erhöhung des Probenmaterials änderte wenig an der Anzahl der Zellen und deren Überlebensfähigkeit in Kultur. Ähnliches war mit einem neuen Protokoll zu beobachten, welches uns in Kooperation mit Dr. Crisan zur Verfügung gestellt wurde und nach unseren Vorstellungen leicht abgewandelt wurde. Lediglich sehr wenige Zellen überlebten den Sort und eine kaum nachweisbare Anzahl haftete sich an, siehe Abbildung 3.15.

Sort 1 NG2+	5,7% der Zellen	
Sort 1 CD146+CD45-CD31-	0,2% der Zellen	$m = 0,93\%$
Sort 2 CD146+CD45-CD31-	2,6% der Zellen	$M = 0,2\%$
Sort 3 CD146+CD45-CD31-	0,0% der Zellen	

Tabelle 3.1 Sort Daten, Anzahl der NG2+ und CD146+CD45-CD31- Zellen aus einer Zellsuspension eines murinen Pankreas

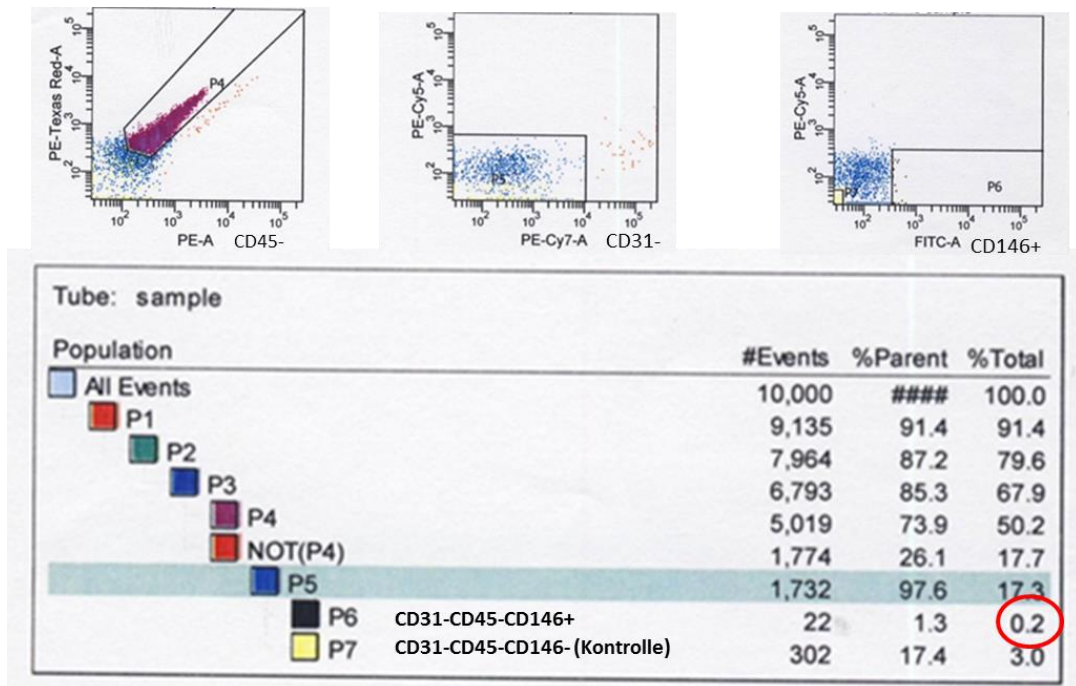


Abbildung 3.14 Sort von CD45-CD31-CD146+ Zellen (0,2%)

Innerhalb der Versuchsreihe wurde die Anzahl der Pankreata verändert, um mehr Zellen für die Isolation zu gewinnen. Daher wird die gewonnene Zellzahl in der Tabelle in Prozent aller gesorteten Zellen angegeben.

Die Anzahl der CD146+CD45-CD31- Zellen variiert in dieser Versuchsreihe von 0%-2,6%. Der Median liegt hierbei bei 0,2%, der Mittelwert weicht mit 0,93 % davon ab.

Da diese Methode zur Isolierung von Perizyten mit mesenchymalen Markern sich, wie oben bereits beschrieben, nicht zur Kultivierung dieser eignete, wurde ein weiteres Verfahren angewendet. Mit der Methode des magnetischen Sorten (Siehe 2.2.5) wurde versucht, NG2+ (Antikörper gegen AN2, entspricht NG2) Perizyten zu isolieren, ihr Kulturverhalten zu beobachten und die Ausprägung durch mesenchymale Marker anschließend durch Immunfluoreszenz – Färbung zu überprüfen.

Hierbei ließ sich mehr Zellmaterial gewinnen. Am ersten Tag nach Isolation waren keine adhärenen Zellen zu erkennen. Besonders in der NG2+ Population waren sphärische Zellgruppen mit unterschiedlichen Anzahlen an Zellen zu beobachten. Die Zellen imponierten groß in Bezug auf Erythrozyten, waren gleichmäßig rund und hell.

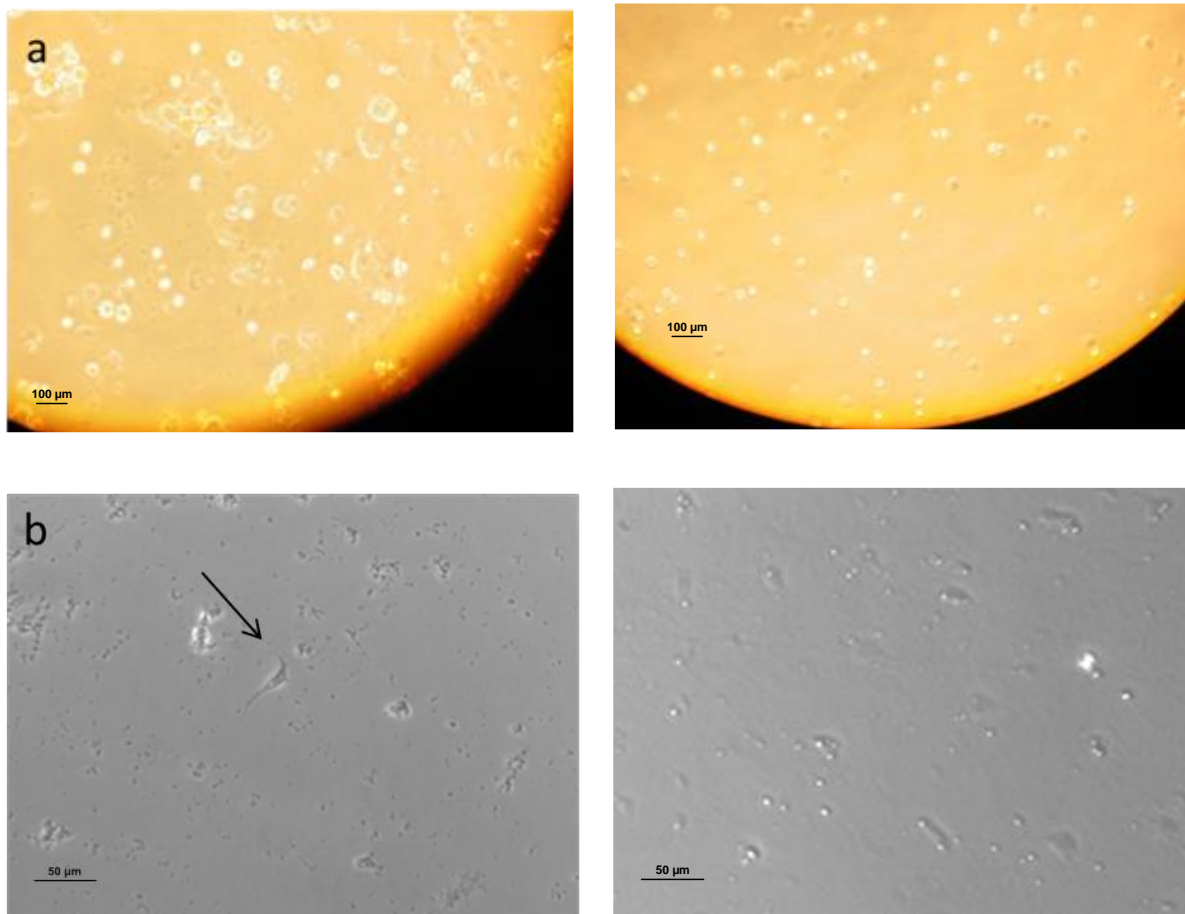


Abbildung 3.15 Gesortete Zellen an a) Tag 0, oben, links CD146+CD31-CD45-(2,6%)-, rechts CD146-CD31-CD45- (7,8%) b) Tag 6, links CD146+, rechts CD146-

Am 3. Tag nach der Isolation (siehe Abbildung 3.16) fanden sich adhärenente Zellen in der NG2+ Population. Die Zellen zeigen unterschiedliche Morphologie. Ein Teil der Zellen ist eher länglich, ein anderer Teil dreieckig bis rundlich. Jedoch erstrecken sich von allen dieser Zellen Ausläufer in etwa im rechten Winkel vom Zellkern in verschiedene Richtungen. Pro Zelle kann man bis zu vier Ausläufer erkennen. Noch berühren sich die Zellen nicht. An Tag 10 erkennt man bereits eine deutliche Vermehrung der Zellen. Ihre Ausläufer haben sich verlängert, sie wirken insgesamt etwas in die Länge gezogen. Die Ausläufer erstrecken sich in Richtung Nachbarzellen. Am Tag 25 erkennt man, dass sich die Zellen zu Gruppen organisiert haben und sich mit ihren Ausläufern untereinander vernetzten. Abbildung 3.17 zeigt die dazugehörige Negativkontrolle zu den entsprechenden Zeitpunkten. Es sind bereits am dritten Tag kaum mehr lebende Zellen zu erkennen, keine dieser Zellen hat sich an der Unterfläche angehaftet. Am 9. Tag ist nur noch totes Zellmaterial zu sehen, während an Tag 25 keine Zellen mehr zu sehen sind.

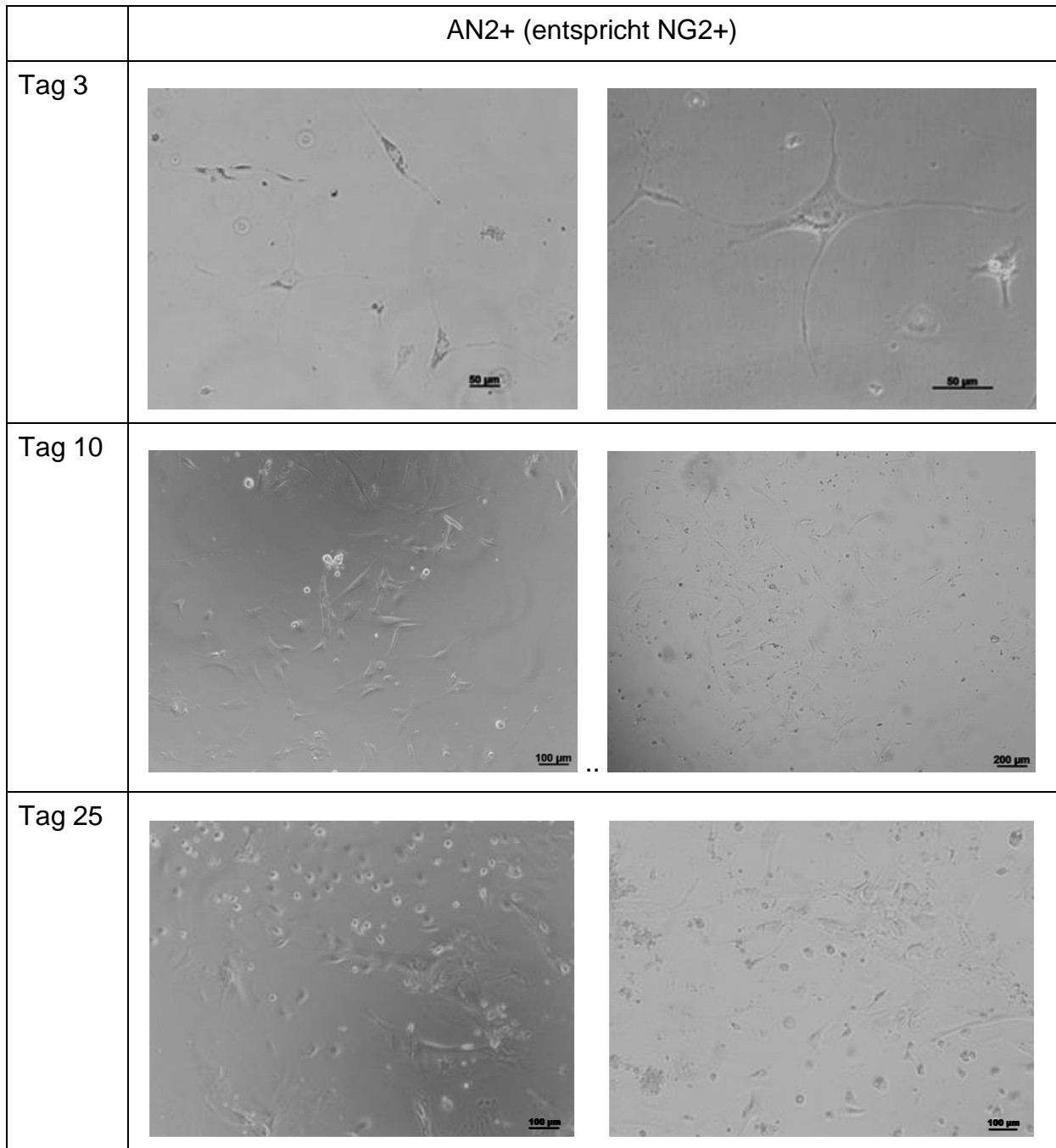


Abbildung 3.16 AN2+ Zellen nach MACS-Isolation auf Gelatine-überzogenen Well-plates an Tag 3, Tag 10 und Tag 25

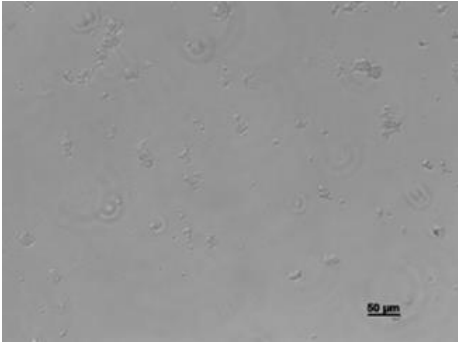
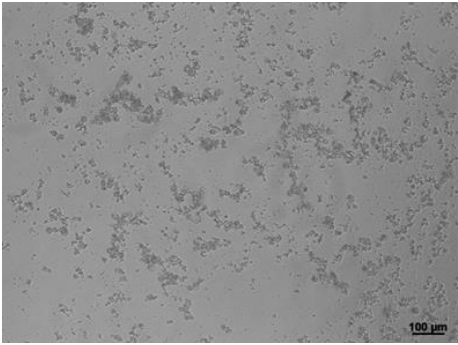

	AN2- (entspricht NG2-)
Tag 3	 Micrograph showing AN2 cells on a gelatin-coated well plate at Day 3. The cells are sparse and appear as small, rounded structures. A scale bar in the bottom right corner indicates 50 µm.
Tag 10	 Micrograph showing AN2 cells on a gelatin-coated well plate at Day 10. The cells are more numerous and densely packed compared to Day 3. A scale bar in the bottom right corner indicates 100 µm.
Tag 25	 Micrograph showing AN2 cells on a gelatin-coated well plate at Day 25. The cells are very dense and form a confluent layer. A scale bar in the bottom right corner indicates 100 µm.

Abbildung 3.17 AN2- Zellen nach MACS Isolation auf Gelatine überzogenen Well-plates an Tag 3, Tag 10 und Tag 25

Um zu validieren, ob es sich bei den oben gezeigten Zellen tatsächlich um Perizyten handelt, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung dieser Zellen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19 zu sehen:

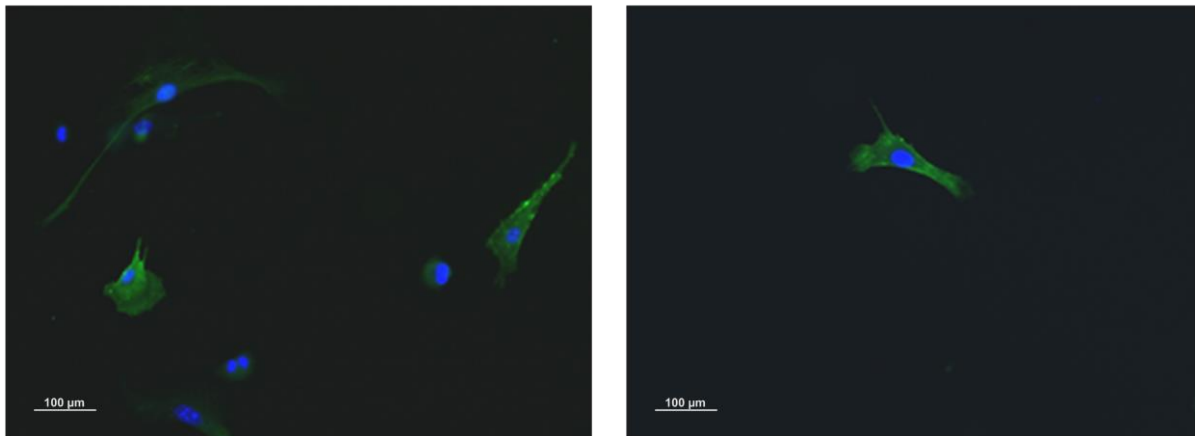


Abbildung 3.18 Immunfluoreszenz von isolierten AN2+ Zellen, NG2+ Zellen sind in grün (488nm) dargestellt, Kernfärbung mit Dapi

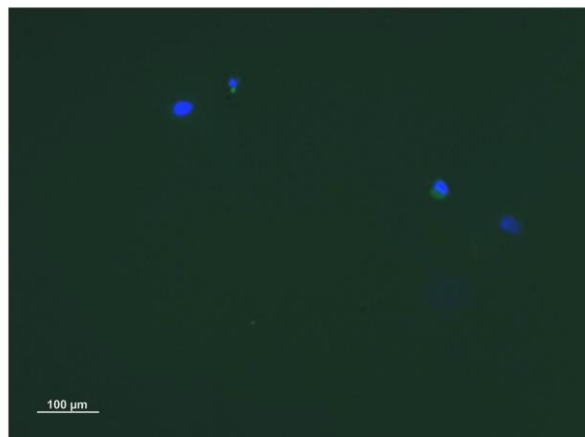


Abbildung 3.19 Immunfluoreszenz von isolierten AN2- Zellen, NG2+ Zellen sind in grün (488nm) dargestellt, Kernfärbung mit Dapi

Die AN2+ Zellen (siehe Abbildung 3.18) können durch den Marker NG2 angefärbt werden und zeigen eine ähnliche, etwas zusammengeschrumpfte Morphologie ähnlich der Zellen in Kultur (vergleiche Abbildung 3.16). Einige Zellen zeigen ein schwächeres Signal und kaum vorhandenes Zytoplasma. In der Population der AN2-Zellen (siehe Abbildung 3.19) ist kein positives Signal für NG2 zu erkennen. Es befinden sich jedoch Zellen im Bild, was an den angefärbten Kernen zu erkennen ist.

Ob nun diese isolierten Zellen auch die mesenchymalen Marker exprimieren, welche im Gewebe in Kombination mit NG2+ Perizyten zu finden waren, wurde nach einem weiteren magnetischen Sort-Vorgang durch eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung (siehe Abbildung 3.20-Abbildung 3.24) untersucht. Jedoch zeigten sich diesmal auch NG2+ Zellen in der AN2-Population (Daten nicht aufgeführt). Wie auch in der Immunfluoreszenz im Gewebe, wurden die mesenchymalen Antikörper CD90, CD105 und Sca-1 verwendet.

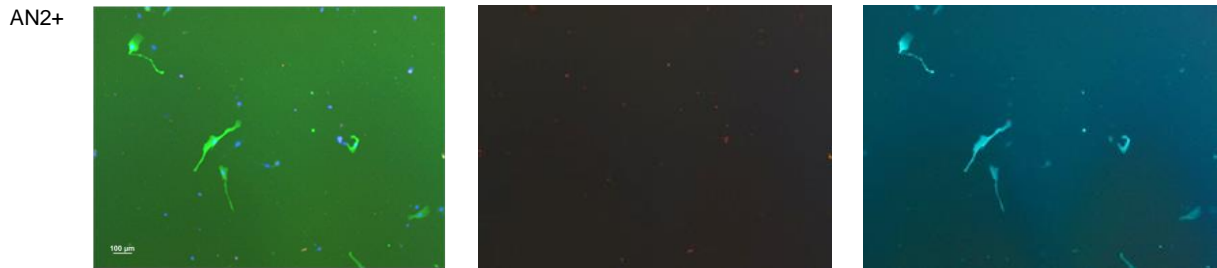


Abbildung 3.20 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, NG2+ in grün (488nm), CD31+ in rot (594nm) und Zellkerne in Dapi (blau)dargestellte Zellen in 100facher Vergrößerung,

Abbildung 3.20 zeigt die isolierten Zellen gefärbt mit einem Antikörper gegen Perizyten, in diesem Fall NG2 und den Endothelzellmarker CD31. Etwa die Hälfte der Zellen, bestimmt an den mit Dapi eingefärbten Zellkernen, zeigt ein positives Signal für NG2. Außer ein paar Verunreinigungen ist in der CD31 – Färbung keine für den Marker positive Zelle zu erkennen.

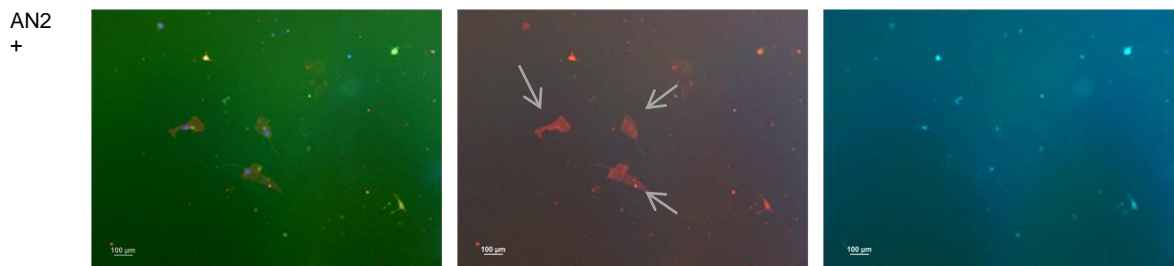


Abbildung 3.21 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, α SMA+ in grün (488nm) und CD90+ in rot (594nm) (Pfeile) dargestellte Zellen und Zellkerne in Dapi (blau) in 100facher Vergrößerung

Anstelle von NG2 wurde in Abbildung 3.21 der Perizytenmarker α SMA verwendet. Anders als bei NG2 zeigen die Zellen keine Antigene für diesen Marker. Jedoch sind einige der Zellen positiv für den zweiten hier verwendeten Marker CD90, welcher Antigene auf mesenchymalen Stammzellen bindet. Es zeigen sich ca. 50% der Zellen CD90 positiv.

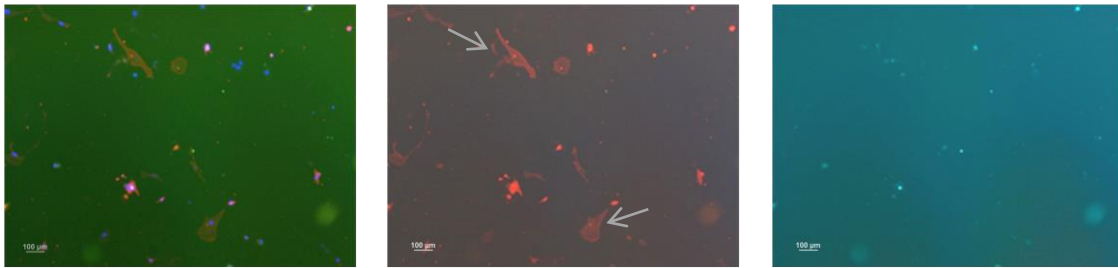


Abbildung 3.22 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, α SMA+ in grün (488nm) und Sca-1+ in rot (594nm) (Pfeile) dargestellte Zellen und Zellkerne in Dapi (blau) in 100facher Vergrößerung

Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Doppelfärbung mit dem Stammzellmarker Sca-1 und dem Perizytenmarker α SMA, Abbildung 3.22. Auch in dieser Färbung zeigen die Zellen keine Expression von α SMA, wohingegen etwa die Hälfte der Zellen Sca-1+ ist.

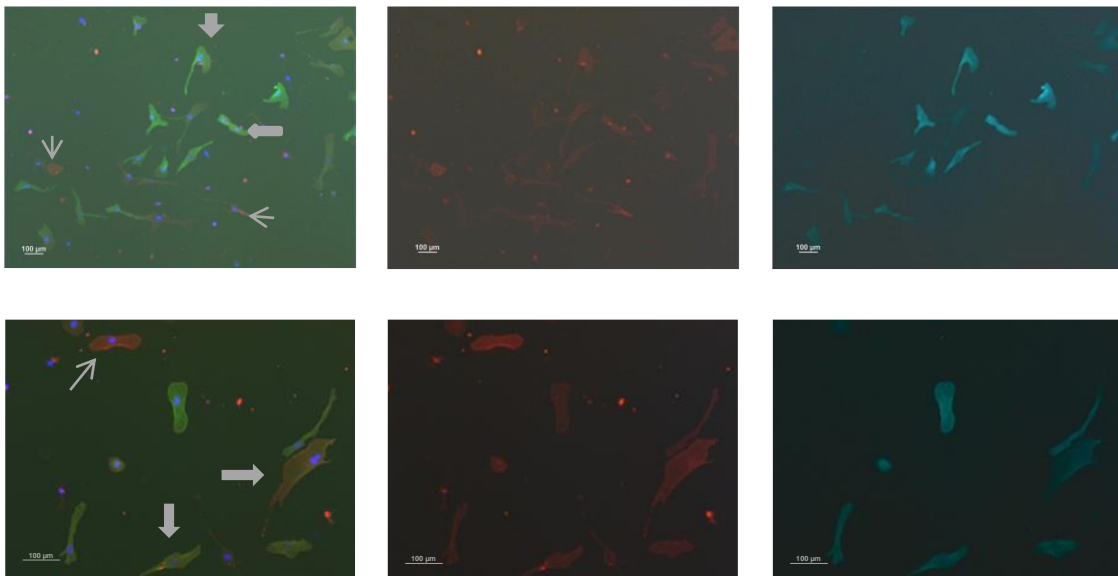


Abbildung 3.23 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, NG2+ in grün (488nm) und CD90+ in rot (594nm) dargestellte Zellen und Zellkerne in Dapi (blau) in 100facher und 200facher Vergrößerung

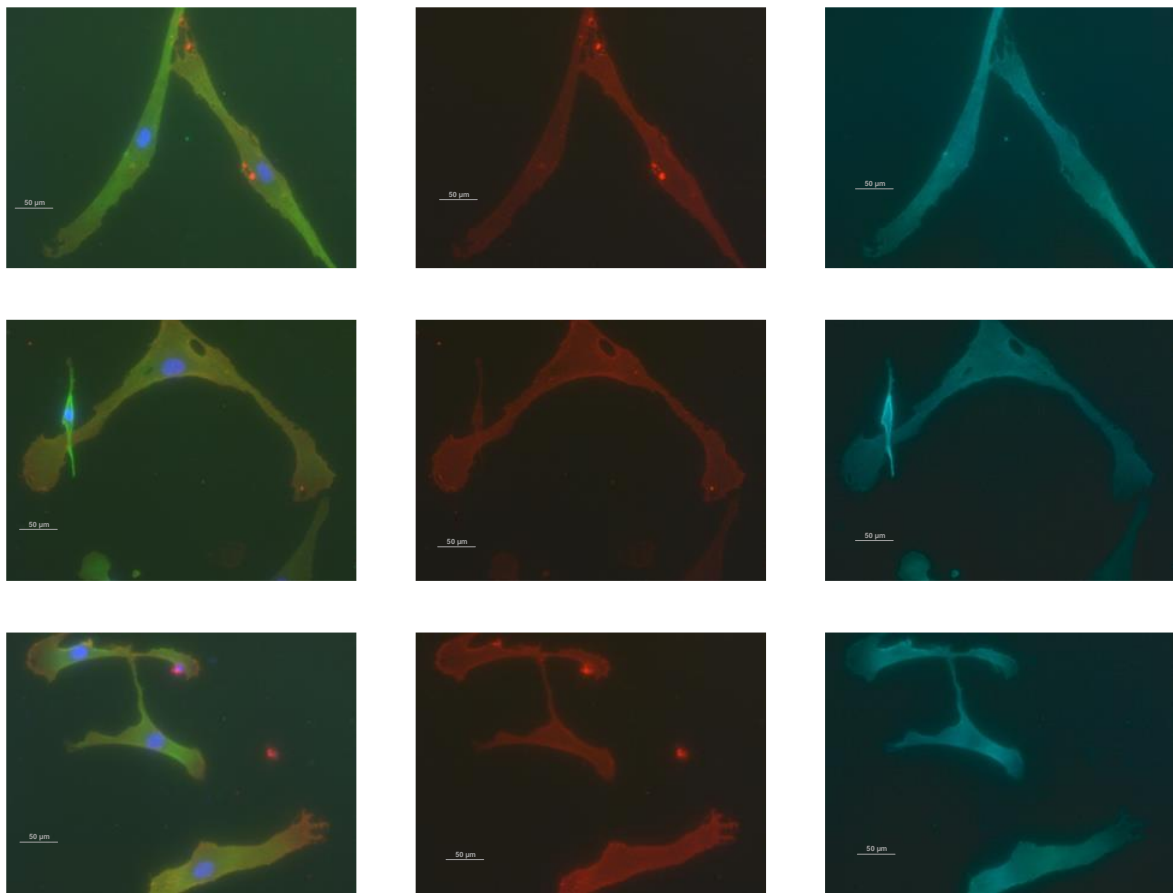


Abbildung 3.24 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, NG2+ in grün (488nm) und CD90+ in rot (594nm) dargestellte Zellen und Zellkerne in Dapi (blau) in 400facher Vergrößerung

In Abbildung 3.23 ist die Expression von CD90 und NG2 dargestellt. Es zeigen sich zahlreiche doppelpositive Zellen (siehe Blockpfeile) sowie einzelpositive Zellen (siehe Pfeile) beider Marker. Besonders auffällig ist die unterschiedliche Morphologie der Zellen und ihre unterschiedlich starke Expression. Kleinere, kompaktere Zellen scheinen eine stärkere Expression zu zeigen als größere, flächige Zellen. Die Morphologie scheint unabhängig von der Marker -Expression zu sein. Es finden sich rundliche, langgestreckte und teilweise dreiecksförmige Zellen, welche zum Teil Kontakte zwischen einander ausbilden. Diese Zellkontakte sind in Abbildung 3.24 vergrößert dargestellt. Diese Kontakte können zwischen zwei oder mehreren Zellen ausgebildet werden. Zellgruppen, wie in den Kulturbildern (vergleiche Abbildung 3.16) dargestellt sind in den Immunfluoreszenzfärbungen nicht mehr zu erkennen.

3.4 Verhalten von pankreatischen Perizyten während einer sterilen Inflammation

Um das Verhalten von pankreatischen Perizyten während einer sterilen Inflammation untersuchen zu können, wurde zunächst nach dem oben beschriebenen Protokoll in Kapitel 2.2.7 eine sterile Entzündung mittels Caerulein im murinen Pankreas induziert. Um zu überprüfen, ob eine Inflammation stattgefunden hat, wurden HE-Färbungen von den entnommenen Proben angefertigt.

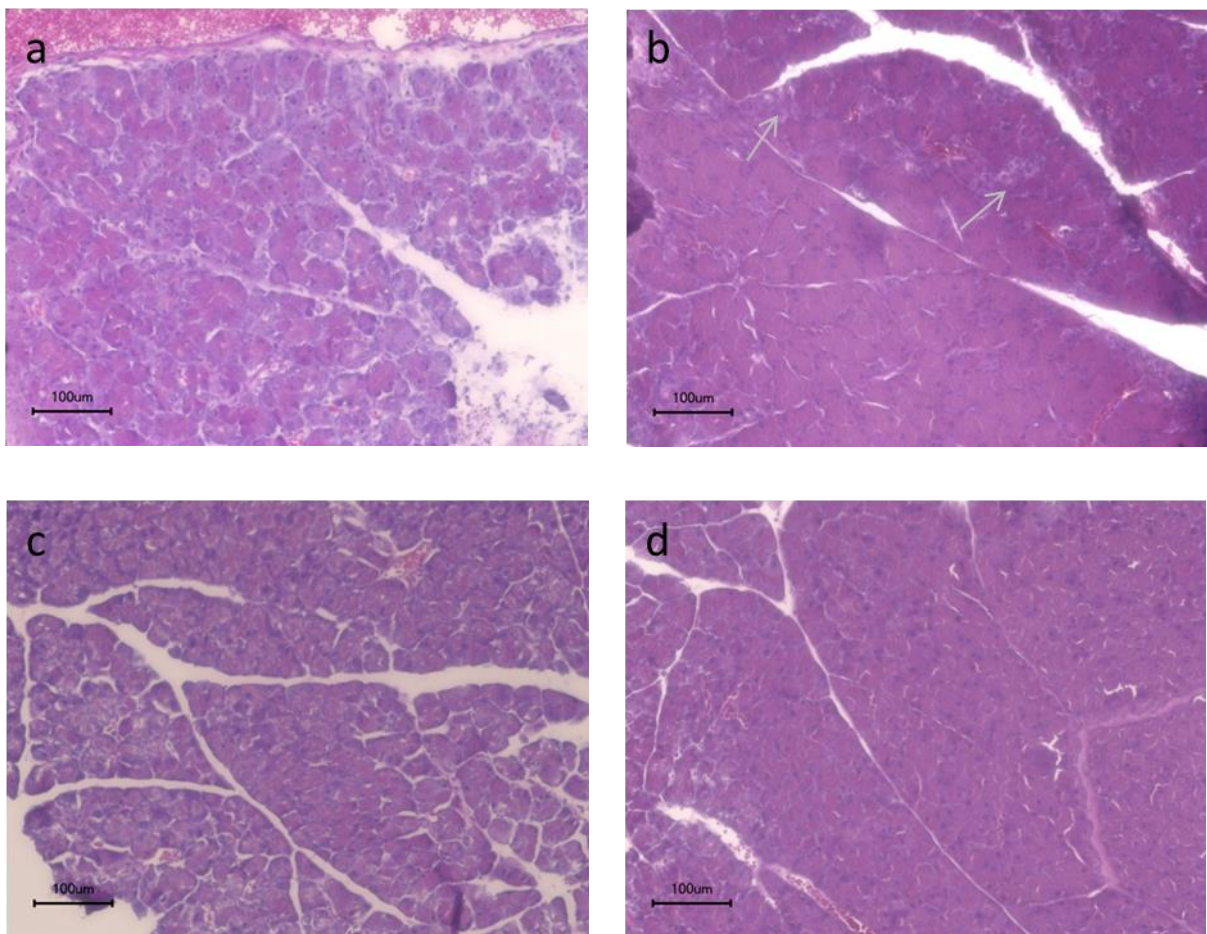


Abbildung 3.25 HE Färbung von a) murinem Pankreas, 16h post Caerulein-Injektion, b) murinem Pankreas, 42h post Caerulein-Injektion, c) murinem Pankreas, Kontrolle, 16h post NaCl-Injektion, d) murinem Pankreas, Kontrolle, 42h post NaCl-Injektion

Während in Abbildung 3.25 c) und Abbildung 3.25 d) eine weitgehend physiologische Histologie des Pankreas zu sehen ist, zeigt sich in Abbildung 3.25 a) das typisch für eine akute Pankreatitis aufgelockerte Gewebe zum Teil mit leichtem Gewebsödem und Fettgewebsnekrose am rechten unteren Bildrand. In Abbildung 3.25 b) ist kein Ödem mehr zu erkennen, aber es fallen besonders im oberen Läppchen Nester mit Immunzellen ins Auge.

Um die Veränderung von Perizyten und solchen Perizyten, welche mesenchymale Stammzellmarker tragen, während einer Entzündungsreaktion im Pankreas näher zu untersuchen, wurde eine Durchflusszytometrie des mit und ohne Caerulein behandelten murinen Pankreasgewebe durchgeführt.

Zunächst wurde der Perizytenmarker NG2 und der Endothelzellmarker CD31 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in der Entzündung untersucht.

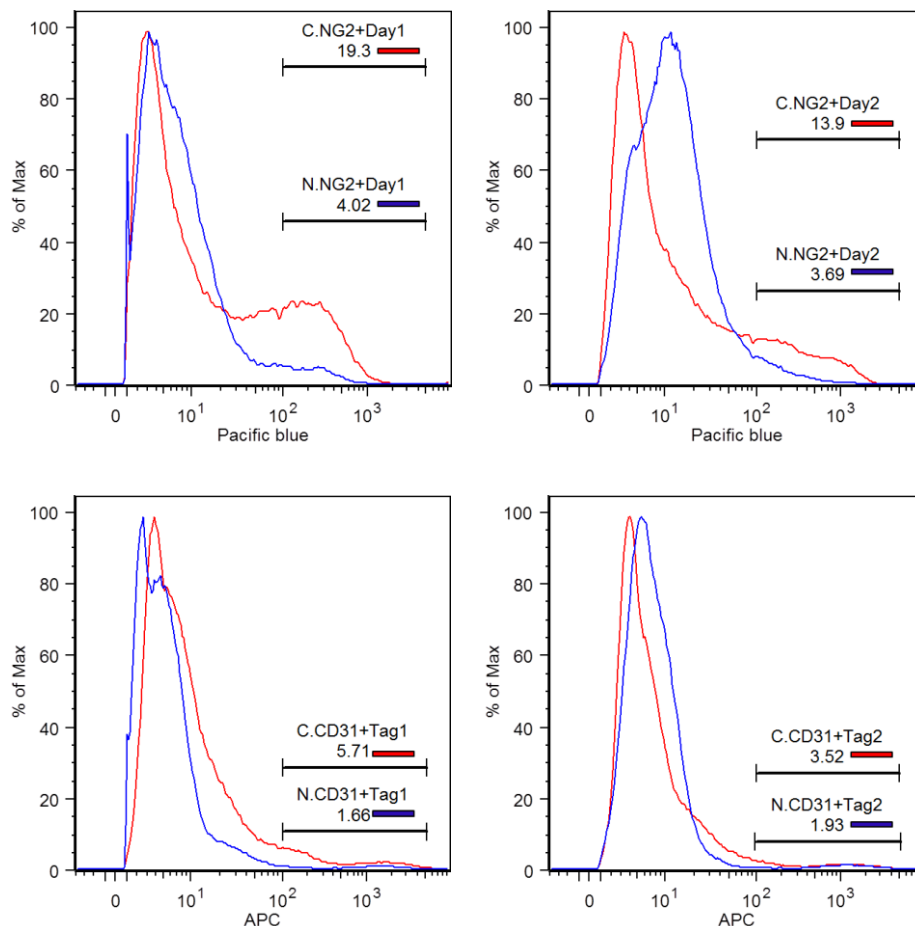


Abbildung 3.26 Durchflusszytometrie von murinen Pankreata, welche über zwei Tage mit Caerulein (C) oder NaCl (N) behandelt wurden. Darstellung von NG2+-pacific blue (a+b) und CD31+-APC (c+d) Zellen in % ein und zwei Tage post injectionem. Eingelesene Zellen Tag 1 (C):228297, (N):199617, Tag 2 (C):234332, (N):295535

Die Abbildung 3.26 zeigt die prozentuale Anzahl von NG2+ Perizyten und CD31+ Endothelzellen im Pankreas während einer sterilen Entzündung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Marker CD31 wird hier zur Referenzbestimmung eingesetzt. Beide Marker steigen in der postentzündlichen Phase an. Die CD31+ Zellen im Caerulein-behandelten Gewebe haben sich um den Faktor 3,44 vermehrt, während der Wert der NG2+ Zellen sich sogar um den Faktor 4,8 gesteigert, sich die Zellen also beinahe verfünffacht haben. Am zweiten Tag nach Caerulein-Injektion sind immer noch deutlich mehr CD31+ und NG2+ Zellen im Caerulein-behandelten

Gewebe zu finden, jedoch ist der Wert wieder etwas gesunken. Es zeigen sich etwa verdoppelte Werte für CD31+ Zellen (Änderung um den Faktor 1,82) und die NG2+ Zellen erhöht um den Faktor 3,77. Insgesamt zeigt sich für die mit NaCl behandelten pankreatischen Zellen ein relativ einheitlicher Wert je nach Marker und ein deutlich davon abweichender Wert für die mit Caerulein behandelten pankreatischen Zellen. Die Werte der NG2+ Zellen sind jedoch in weitaus höherem Maße vom Ausgangswert der Kontrollen abweichend, als die der CD31+ Zellen. Die Änderung der Prozentanteile zeigt sich statistisch signifikant für NG2+ Zellen an beiden Tagen nach der Inflammation, sowie für CD31+Zellen am Tag 1 (siehe Anhang A2).

Durch eine weitere Untersuchung sollte nun ermittelt werden, ob sich auch der Anteil der NG2+MSC+ Zellen während der Entzündung verändert. Bei dieser ist zu beachten, dass diese Ergebnisse nur auf einer Versuchsreihe begründet und damit nicht sicher anzunehmen sind. Zuerst wurde die Anzahl der CD90+ und Sca-1+ Zellen in den Caerulein und NaCl behandelten Mäusen bestimmt.

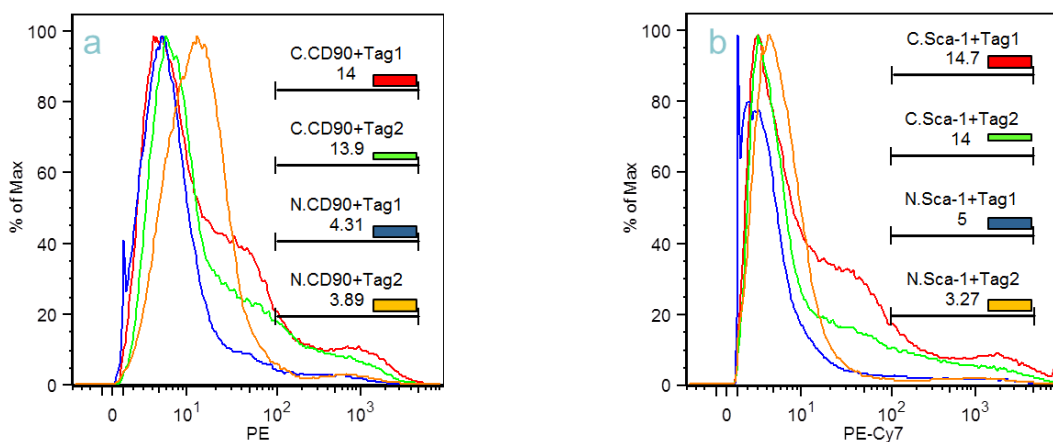


Abbildung 3.27 Durchflusszytometrie von murinen Pankreata, welche zwei Tage lang mit Caerulein (C) oder NaCl (N) behandelt wurden. Darstellung von CD90+-PE (a) und Sca-1+-PE-Cy7 (b) Zellen in % am Tag 1 und 2 post injectionem. Eingeleseene Zellen Tag 1 (C):228297, (N):199617, Tag 2 (C):234332, (N)295535.

Wie in Abbildung 3.27 zu sehen, steigen auch die Marker für mesenchymale und Stammzellen in der postentzündlichen Phase im murinen Pankreas an. Anders als bei den NG2+ und CD31+ Zellen fallen die Werte für CD90+ und Sca-1+ Zellen am zweiten Tag nach Caerulein-Behandlung jedoch nicht ab. Untereinander verglichen zeigen beide Marker etwa die gleichen Prozentzahlen an Zellen. Ähnliches gilt für die Zellen der nur mit NaCl behandelten Mäuse. Hierbei sind die Werte jedoch etwas breiter gestreut. Im Vergleich der Gewebe mit und ohne Entzündung zeigt sich für CD90 an Tag eins eine Vermehrung der Zellen um Faktor 3,25, an Tag zwei eine Steigerung auf Faktor 3,57. Ähnliches ist bei Sca-1 zu beobachten, zuerst ein

Anstieg um Faktor 2,94, am zweiten Tag post injectionem haben die Zellen mit Faktor 4,28 im Vergleich zu den Werten der NaCl behandelten Mäusen gesteigert. Damit zeigt sich ein geringerer Anstieg der Zellen verglichen mit den NG2+ Zellen. Die Änderung ist hier jedoch in beiden Fällen ebenfalls statistisch signifikant (siehe Anhang A2). Im Vergleich zu den CD31+ Zellen zeigt sich am ersten Tag ein leicht verringerter Anstieg der Zellzahl. Am zweiten Tag zeigt sich hier jedoch kein Abfall, die Prozentzahlen bleiben nahezu gleich.

Ob auch die doppelpositiven Zellen in ähnlichem Maße angestiegen sind, sollte zusätzlich untersucht werden. Dazu wurden Plots angefertigt, welche NG2+ und CD90+ sowie Sca-1+ Zellen zueinander korrelieren, siehe Abbildung 3.28.

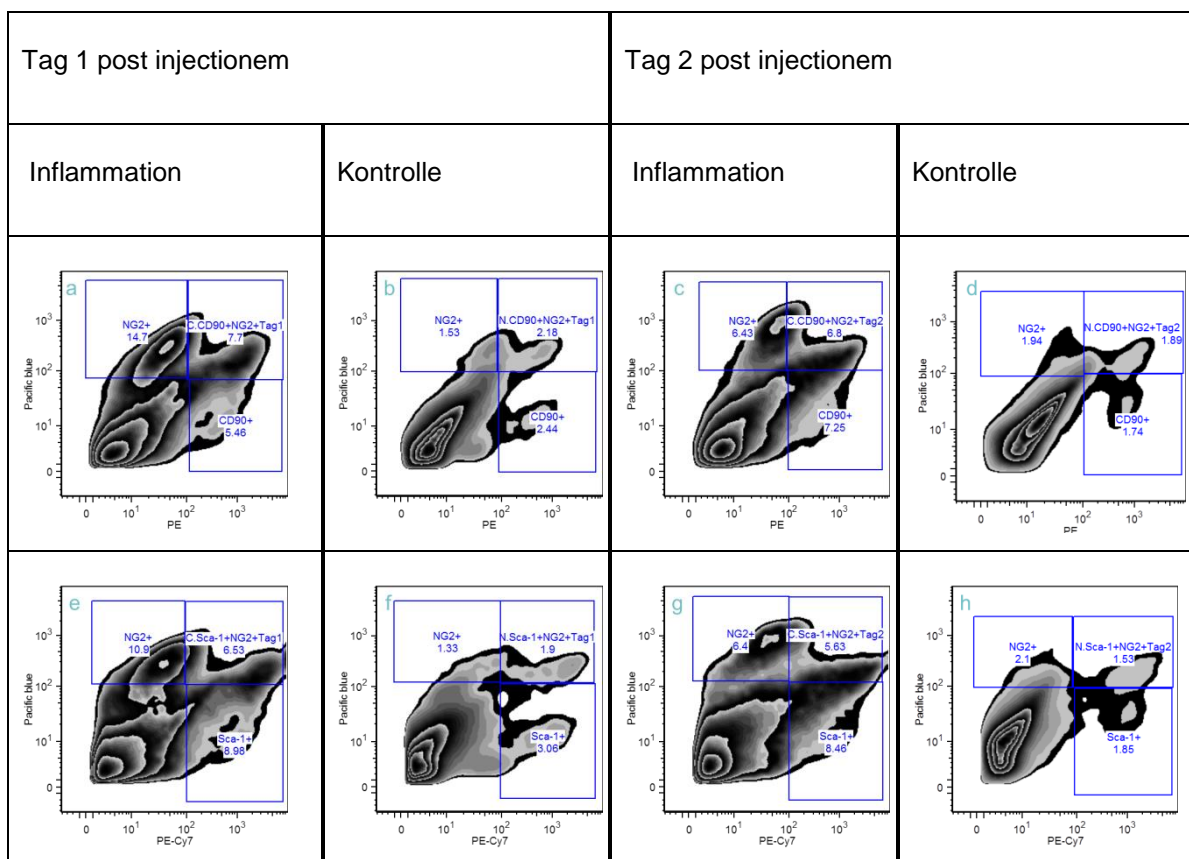


Abbildung 3.28 Durchflusszytometrie von murinen Pankreata, welche zwei Tage lang mit Caerulein (C) oder NaCl (N) behandelt wurden. Darstellung von CD90+NG2+ (a-d) und Sca-1+NG2+ (e-h) Zellen in % an den Tagen 1 und 2 post injectionem. Eingelesene Zellen Tag 1 (C):228.297, (N):199617, Tag 2 (C):234332, (N)295535.

Auch in dieser Abbildung zeigt sich ein ähnliches Bild der beiden Marker CD90 und Sca-1. Am ersten Tag post injectionem haben sich die doppelpositiven Populationen um dem Faktor 3,53 (CD90+NG2+) und dem Faktor 3,44 (Sca-1+NG2+) vervielfacht. Am zweiten Tag sind die Faktoren mit 3,60 bei den CD90+NG2+ Zellen und 3,63 bei den Sca-1+NG2+ Zellen noch etwas weiter gestiegen. Die Anstiege der

doppeltpositiven Zellen sind ebenfalls statistisch signifikant. Interessanterweise zeigen die Daten, dass die doppeltpositiven Populationen zwar ansteigen, jedoch eher im Bereich des Anstiegs der mesenchymalen Marker und nicht derart hoch, wie die NG2+ Population. Ebenfalls ist zu bemerken, dass zusätzlich auch die einfachpositiven mesenchymalen Stammzellen ansteigen. Der Anteil der doppeltpositiven Zellen zu den einfach positiven NG2+Perizyten ist am ersten Tag post injectionem noch wesentlich geringer in der Caerulein Gruppe als in der NaCl Gruppe, wie dargestellt in Tabelle 3.2.

		CD90+NG2+/NG2+	Sca-1+NG2+/NG2+
Tag 1	NaCl	59%	59%
	Caerulein	34%	37%
Tag 2	NaCl	49%	42%
	Caerulein	51%	47%

Tabelle 3.2 Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen, welche Stammzellmarker und Perizytenmarker exprimieren im Bezug auf alle Zellen die Perizytenmarker exprimieren ein und zwei Tage nach Caerulein oder NaCl – Behandlung, erhoben mit Hilfe von Durchflusszytometrie-Daten

Am zweiten Tag verschieben sich die Werte jedoch. Während die Werte in der NaCl Gruppe in der Messung etwas geringer ausfallen, zeigt sich in der Caerulein – Gruppe eine deutliche Vermehrung der doppeltpositiven Zellen. Auch hier zeigt sich wieder ein einheitliches Bild bei CD90+ und Sca-1+ Zellen. Die Werte nach Inflammation sind statistisch signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe, mit Ausnahme des Wertes der CD90+NG2+ Zellen, welcher sich grenzwertig nicht mehr signifikant kleiner darstellt.

So sind also am ersten Tag post injectionem zwar mehr NG2+ Zellen im Gewebe, diese besitzen aber prozentual weniger mesenchymale Marker. Am zweiten Tag post injectionem verschiebt sich das Verhältnis mehr in Richtung der doppeltpositive Zellen. Dennoch zeigt sich noch keine deutliche Steigerung im Vergleich zu den Ausgangswerten der NaCl – Gruppe.

Zusammenfassend zeigte dieses Experiment einen deutlichen Anstieg von CD31+, NG2+, CD90+ und Sca-1+ Zellen nach Caerulein-Behandlung im Vergleich zur mit NaCl behandelten Kontrollgruppe. Am weitaus deutlichsten war der Anstieg der NG2+ Zellen. Außerdem zeigte sich ein Anstieg der Zellen, welche doppeltpositiv für NG2 und CD90/Sca-1 waren.

Ob diese Veränderungen während der Entzündungsphase auch im Gewebe sichtbar sind und ob sich die Position oder Gruppierung der Zellen verändert, wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung in mit Caerulein und NaCl behandeltem Gewebe untersucht.

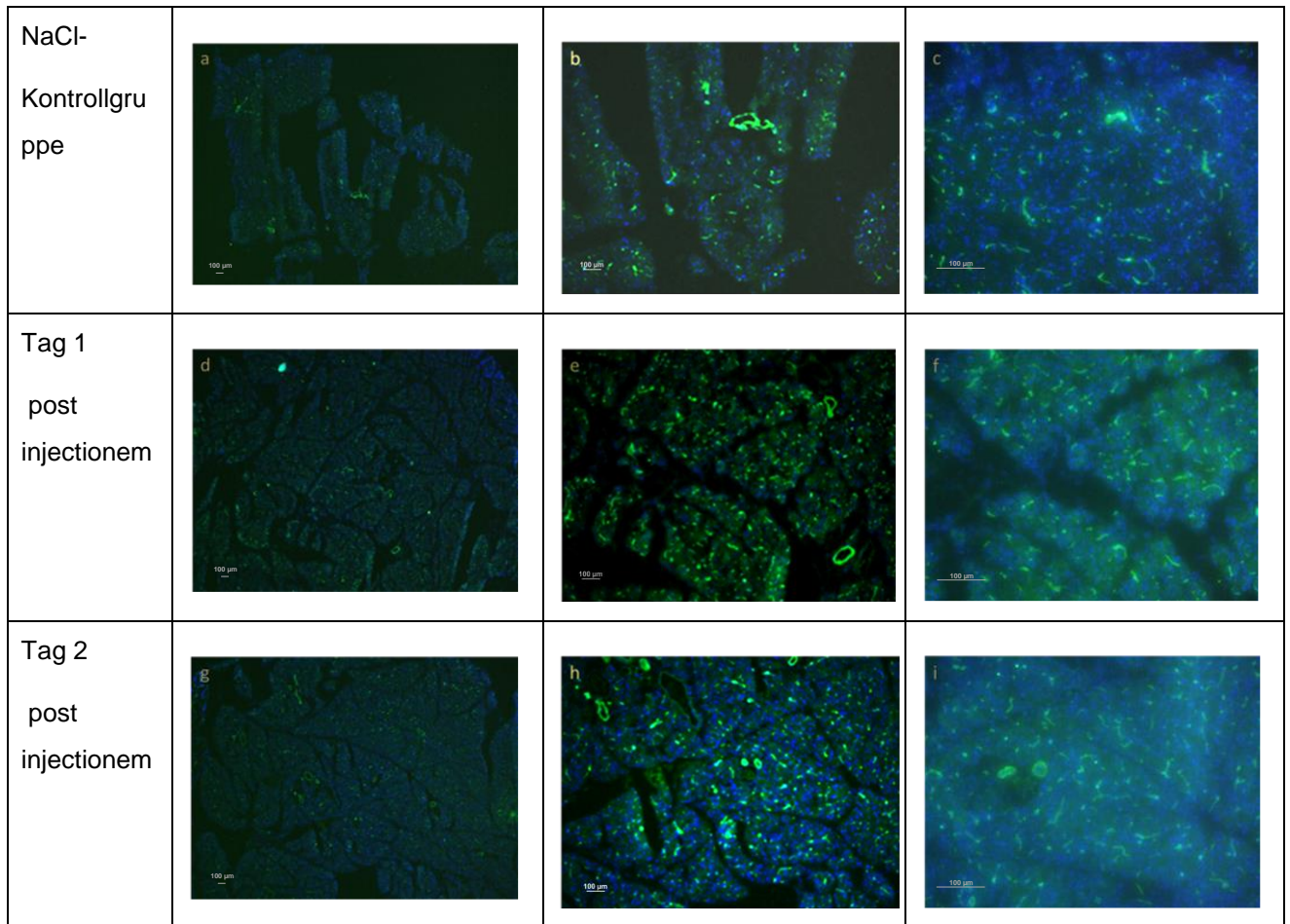


Tabelle 3.3 Immunfluoreszenzfärbung von NG2+ Zellen in grün (488nm) in murinem Pankreasgewebe, welches aus mit Caerulein oder NaCl behandelten Mäusen stammt. Gezeigt wird in a)+b)+c) das NaCl behandelte Kontrollgewebe und das entzündliche Gewebe am Tag 1 in d)+e)+f) und 2 in g)+h)+i) nach Injektion in 40facher (a,d,g), 100facher (b,e,h) und 200facher (c,f,i) Vergrößerung. Kernfärbung mit Dapi (blau)

Tabelle 3.3 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung des entzündlichen Gewebes am Tag eins und zwei post injectionem, sowie eine Kontrollfärbung des mit NaCl behandelten Gewebes. Beim Vergleich der NG2-Färbung in der Caerulein-Gruppe mit der Kontrollgruppe oder anderen Färbungen im unbehandelten Gewebe, siehe zum Beispiel Abbildung 3.3a) oder Abbildung 3.4e), wird deutlich, dass NG2+ Zellen in der Inflammation stark vermehrt sind. Besonders deutlich wird dies in der 100fachen Vergrößerung (siehe Tabelle 3.3b), e), h)). In dieser Vergrößerung scheint die Vermehrung der NG2+ Zellen am Tag 1 am ausgeprägtesten, in der 200fachen Vergrößerung ist dies weniger deutlich zu sehen. In diesen Abbildungen sind keine

neuen Zellformationen zu erkennen, es scheinen sich allgemein mehr positive Zellen im Gewebe zu befinden.

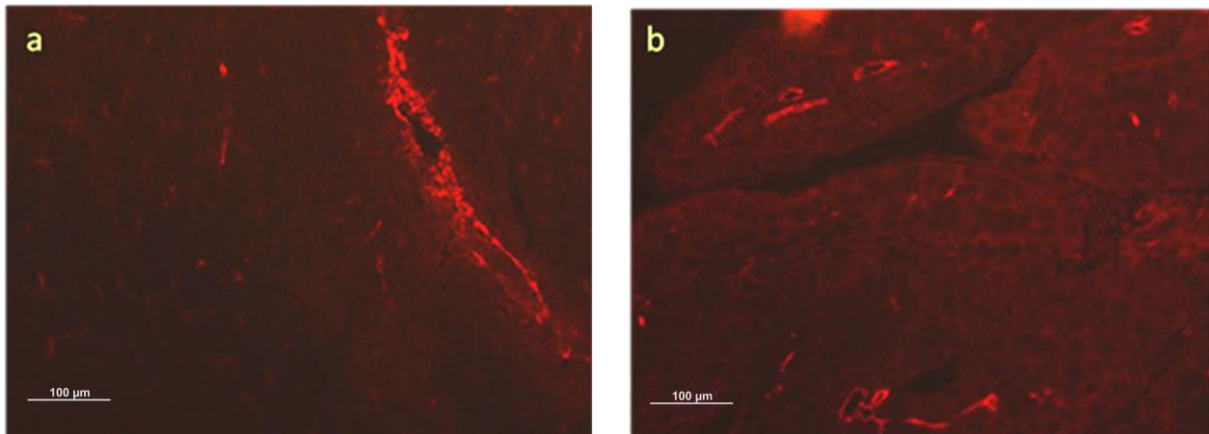


Abbildung 3.29 Immunfluoreszenz von α SMA+ Zellen in a) unbehandeltem murinen Pankreasgewebe, 200fach vergrößert und b) Tag 1 nach Caerulein-Injektion murinem Pankreasgewebe, 200fach vergrößert

Anders als in der oben gezeigten Färbung mit NG2 scheinen sich die α SMA+ Zellen nach einer Entzündungsreaktion nicht zu verändern, siehe Abbildung 3.29. Zu erkennen sind in a) und b) sowohl einzelne Zellen als auch Zellformationen um die Gefäße herum, es zeigt sich jedoch keine deutliche Vermehrung der α SMA+ Zellen, sowie keine neue Anordnung dieser Zellen.

In weiteren Versuchen wurde jedoch eine neue Formation der Zellen erkennbar. Einige Beispiele sind in Abbildung 3.30 und Abbildung 3.31 dargestellt.

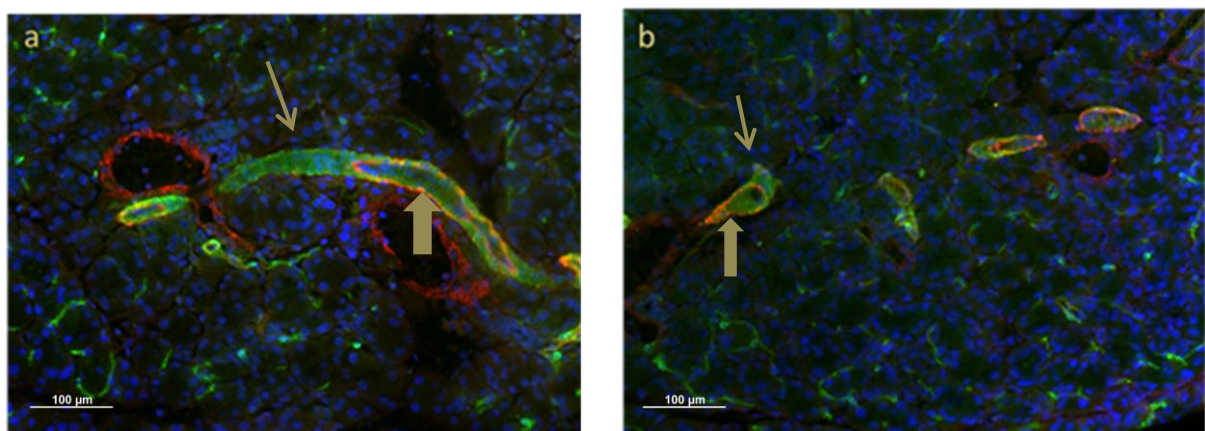


Abbildung 3.30 Immunfluoreszenzfärbung von murinem Pankreasgewebe am ersten Tag post Caerulein injectionem. Darstellung von NG2+ Zellen in grün (488nm) und α SMA+ Zellen in rot (594nm), Kernfärbung mit Dapi (blau), 200fache Vergrößerung

Abbildung 3.30 zeigt eine Doppelfärbung von NG2+ und α SMA+ Zellen am ersten Tag nach Caerulein-Behandlung. Zum einen erkennt man die typische Aufteilung der Marker, α SMA an den Venulen und NG2 an den Arteriolen und Kapillaren. Zum anderen fällt auch die besondere Struktur der NG2+ Zellen auf. Anstatt wie im unbehandelten Gewebe nur eine Gefäßwandschicht auszukleiden, scheint es als schlängelten sich die Perizyten in vielen Lagen um die Arteriolen. In a) und b) sind diese Strukturen zum Teil angeschnitten (siehe Pfeile) und es zeigen sich in deren Inneren zum Teil α SMA+ Anteile (siehe Blockpfeile und vergleiche Abbildung 3.4c). Zu sehen ist eine ähnliche Formation in physiologischem Pankreasgewebe, welche jedoch wesentlich geringer ausgeprägt ist. Auch diese Abbildung spricht eher nicht für die Vermehrung von α SMA+ Zellen entlang der Venulen.

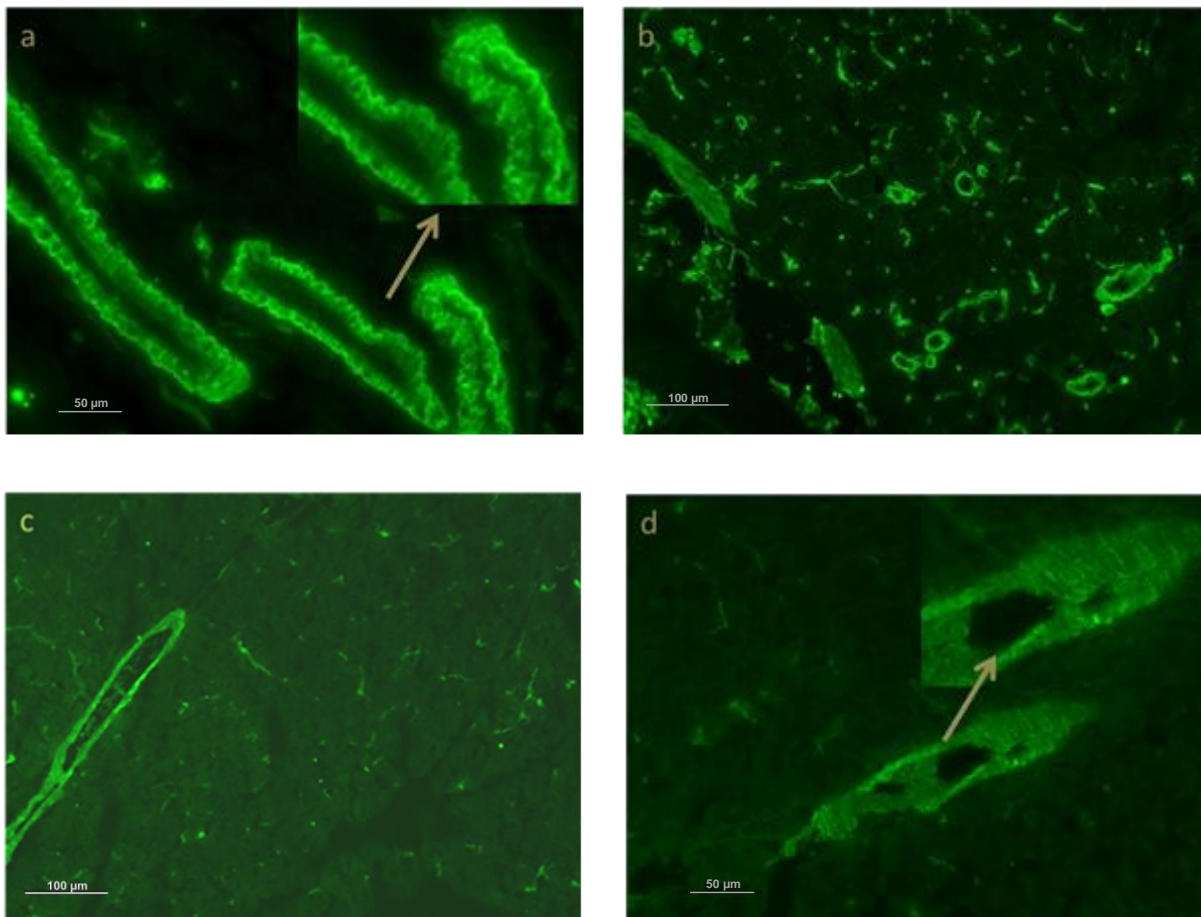


Abbildung 3.31 Immunfluoreszenzfärbung von murinem Pankreasgewebe am ersten (a) und zweiten (b) Tag post injectionem, Darstellung von NG2+ Zellen in grün (488nm) in 400facher (a) und 200facher (b) Vergrößerung, Referenz von mit NaCl behandelten Mäusen in c) 200facher und d) 400facher Vergrößerung

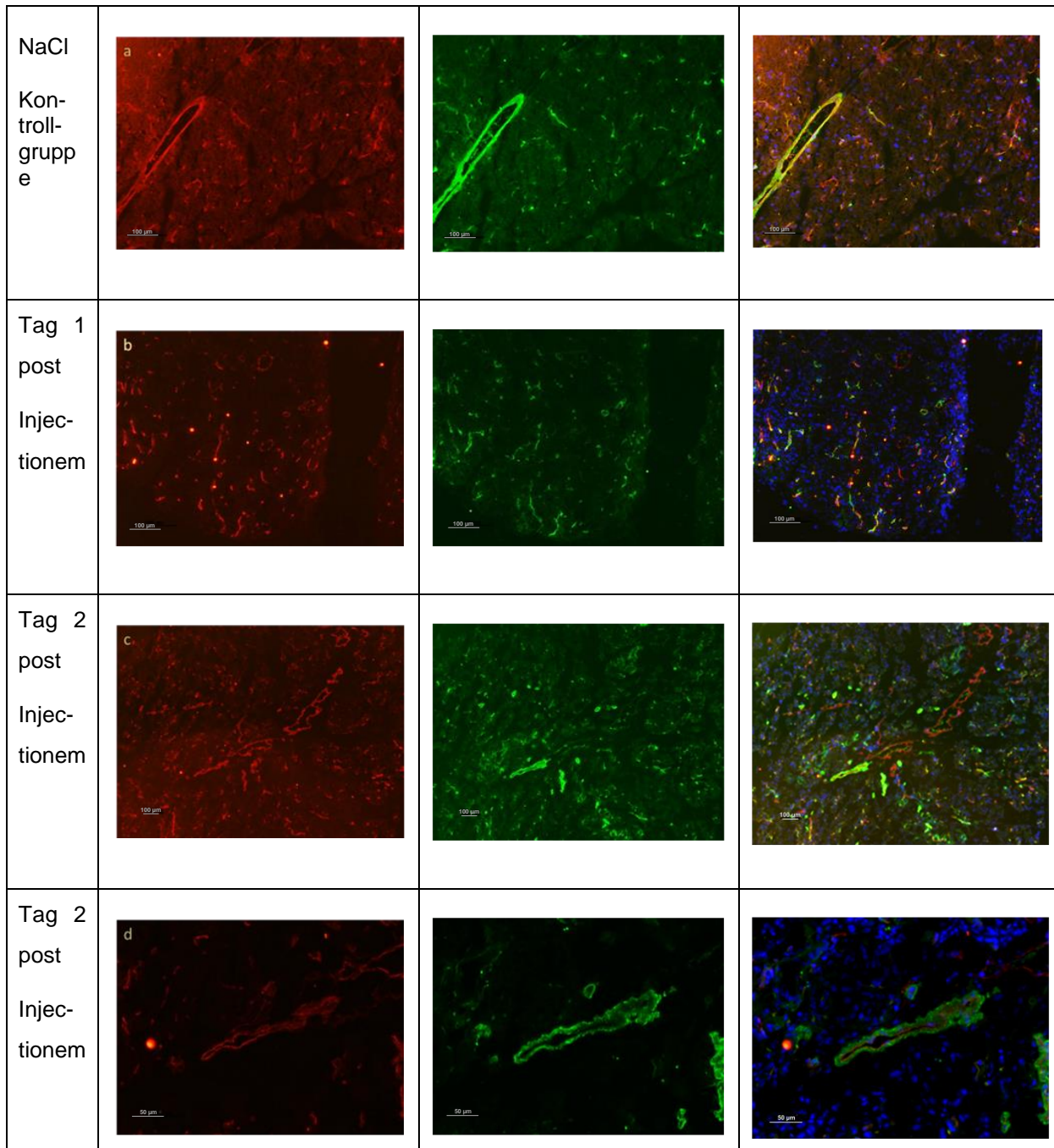


Tabelle 3.4 Immunfluoreszenz von murinen Pankreasgewebe, Doppelfärbung mit dem Endothelzellmarker CD31 in rot (594nm) und dem Perizytenmarker NG2 in grün (488nm), Kernfärbung mit Dapi (blau). Im Vergleich a) Kontrollgruppe mit NaCl in 200facher Vergrößerung b) erster Tag post injectionem mit Caerulein in 200facher Vergrößerung c+d) zweiter Tag post injectionem mit Caerulein in 100facher und 400facher Vergrößerung

Ein ähnliches Bild zeigt sich in Abbildung 3.31a) und b). Auch hier sind vor allem NG2+ Zellen der Arteriolen zu sehen. Viele größere Gefäße in unmittelbarer Nachbarschaft weisen diese Strukturen auf. In c) und d) sind ähnliche Strukturen in Gewebe dargestellt, welches nicht mit Caerulein behandelt wurde. In den eingefärbten Gewebsschnitten sind in den postinflammatorischen Geweben deutlich mehr dieser Strukturen zu finden. Im Vergleich zu c) und d) zeigt sich eine

aufgelockerte Struktur der Perizyten, so dass dunkle Zwischenräume zwischen den Zellen erkennbar werden.

Ob ähnliche Strukturen auch von Endothelzellen oder Zellen mit mesenchymalen Stammzellmarkern gebildet werden und ob die Position der Perizyten in dem Bezug auf diese Zellen sich verändert, wurde anhand von bereits etablierten Doppelfärbungen mit CD31 und CD90 untersucht.

Tabelle 3.4 zeigt die Veränderungen der Endothelzellen nach der Caeruleinbehandlung. Es zeigt sich eine Vermehrung der CD31+ Zellen, die besonders am zweiten Tag nach Injektion deutlich wird. Der Bezug zu den Perizyten scheint sich nicht zu ändern. Es besteht auch im postentzündlichen Gewebe ein direkter Kontakt zwischen CD31+ und NG2+ Zellen. Auch diese Schnitte zeigen die veränderte Gefäßstruktur der Kapillaren. Jedoch scheint die Endothelzellschicht nicht verbreitert oder in ihrer Struktur aufgelockert. Insgesamt lässt sich beobachten, dass die Lumen der Gefäße der mit Caerulein-behandelten Gewebe unregelmäßiger erscheinen, wie die der Kontrollgruppe.

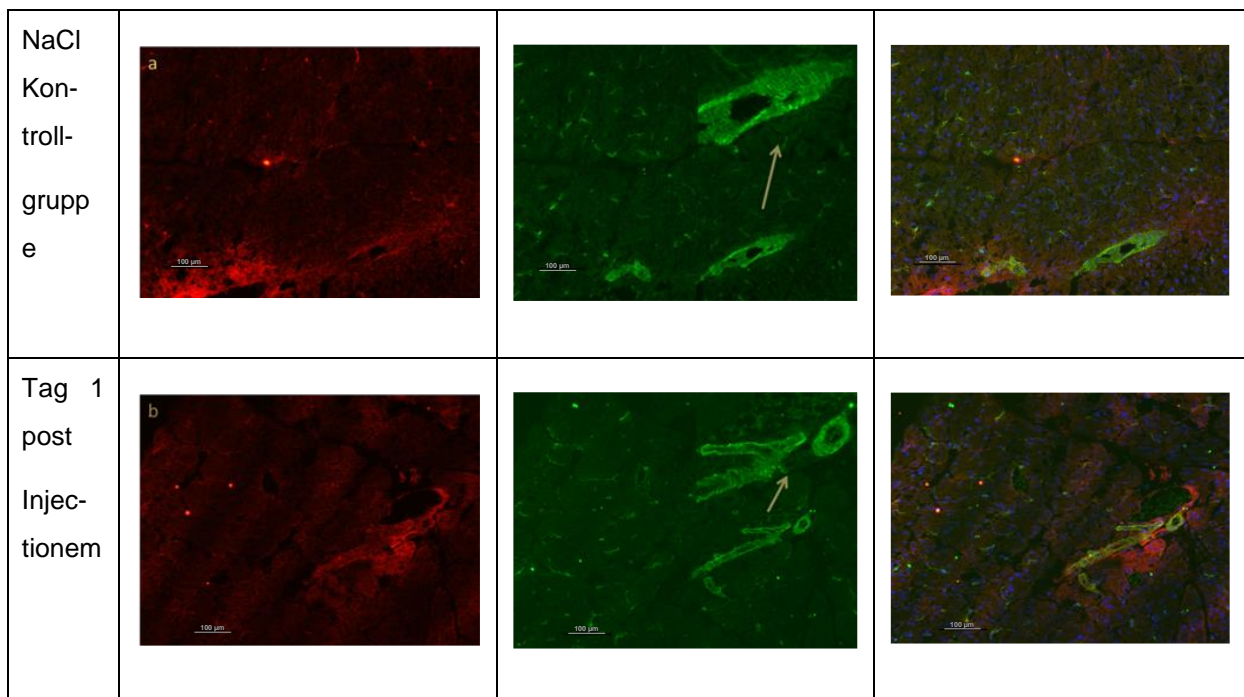


Tabelle 3.5 Immunfluoreszenz von murinen Pankreasgewebe am ersten Tag post injectionem mit Caerulein b) in 200facher Vergrößerung und mit NaCl Kontrollgruppe a) in 200facher Vergrößerung. Doppelfärbung mit CD90 in rot (594nm) und NG2 in grün (488nm), Kernfärbung mit Dapi (blau).

Die Veränderung der CD90+ Zellen nach der Entzündungsphase ist in Tabelle 3.5 dargestellt. Es fällt weder eine besondere Vermehrung der CD90+ Zellen auf, noch sind mehr CD90+NG2+ Zellen zu sehen. Zu sehen ist aber auch in diesen Bildern der Unterschied zwischen den Perizyten der Arteriolen im Kontrollgewebe und denen

im Caerulein-behandelten Gewebe. Während die Gefäßwand ein zwar streifiges aber doch flächiges Bild im Kontrollgewebe aufweist, ist die des postinflammatorischen Gewebes eher aufgeweitet und es werden kleine Lücken zwischen den Ausläufern sichtbar.

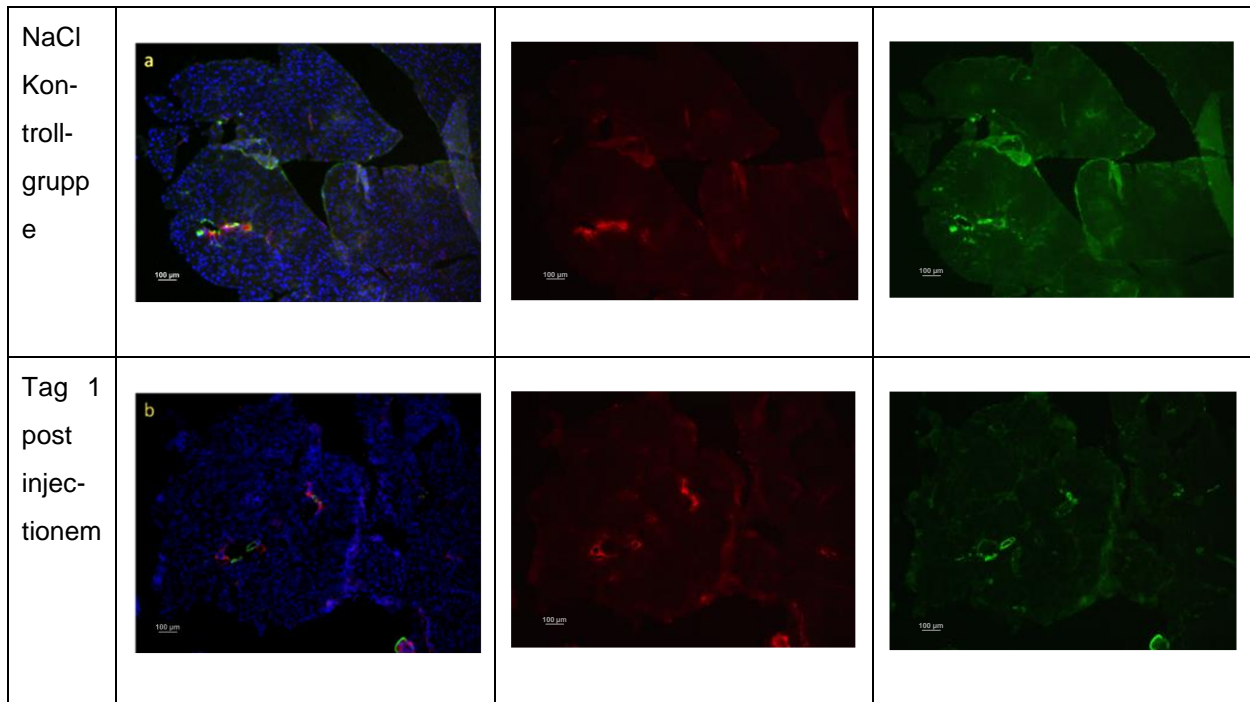


Tabelle 3.6 Immunfluoreszenzfärbung von murinen Pankreasgewebe in 100facher Vergrößerung am Tag eins nach induzierter Inflammation b) und in einer NaCl Kontrollgruppe a). Darstellung von CD90+ in rot (594 nm) und α SMA+ Zellen in grün (488 nm).

Um zu sehen, ob die Perizyten der Venulen nach induzierter Inflammation verstärkt mesenchymale Marker exprimieren, wurde noch eine weitere Immunfluoreszenzfärbung mit CD90 und α SMA durchgeführt. Wie in Tabelle 3.6 gezeigt, sind jedoch auch an den Venulen nicht mehr doppelt positive Zellen zu finden.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse im Zusammenhang mit dem bisherigen Stand der Wissenschaft diskutiert.

4 Diskussion

In zahlreichen Organen wie Herz, Knochen und Muskel konnte bereits das mesenchymale Stammzellpotenzial der Perizyten als ein Faktor für Regeneration des Gewebes beobachtet werden ((Birbrair et al., 2013) (S.2298), (Dellavalle et al., 2011) (S.499), (Chen et al., 2013) (S.305) (Farrington-Rock et al., 2004) (S.2229)). Ob Perizyten in der Regeneration des Pankreas eine Rolle spielen könnten, war Inhalt dieser Arbeit. Da jedoch wenig über Perizyten im Pankreas allgemein bekannt ist, sollten diese zunächst charakterisiert werden, um dann anschließend im sich regenerierenden Pankreas untersucht werden zu können.

4.1 Pankreatische Perizyten liegen typischerweise perivaskulär und zeigen eine typische Morphologie

Im Kapitel 3.1 wird die Lokalisation und Morphologie von Perizyten im murinen Pankreas beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Perizyten im Pankreasgewebe verteilt liegen und dass keine spezielle Ausrichtung der Zellausläufer zu erkennen ist. Sie weisen im pankreatischen Gewebe eine vergleichbare Struktur auf, wie in der Literatur unter anderen bei (Zimmermann, 1923) (S.79-85) beschrieben. In der Immunhistochemie im Paraffingewebe sind die Zellen klarer darstellbar und besser im Gewebeszusammenhang einzuordnen, leider war jedoch eine gute Färbung mit dem NG2 – Antikörper im Paraffingewebe nicht möglich. Im Kryogewebe sind sie einzeln, sowie im Gewebsverbund darstellbar. Die Verwendung des Markers NG2 schließt nur Perizyten an den Arteriolen und Kapillaren mit ein, Perizyten an Venulen werden durch diesen Marker nicht angefärbt (Murfee, Skalak and Peirce, 2005) (S.156/157). Dies lässt sich auch im Pankreas beobachten, genauso wie die Möglichkeit Perizyten an den Venulen mit dem Marker α SMA sichtbar zu machen, bereits beschrieben durch (Nehls and Drenckhahn, 1991) (S.153). Es war nicht möglich, den Marker CD146 in der Immunfluoreszenz im murinen Gewebe zu etablieren, welcher beide Gruppen an Perizyten mit einschließen würde. Jedoch besitzt er gleichzeitig den Nachteil ebenfalls von kapillären Endothelzellen exprimiert zu werden. Daher wurde in dieser Arbeit der Marker NG2 verwendet, um Perizyten sichtbar zu machen. Somit handelt es sich bei den Beobachtungen meistens nur um Perizyten der Arteriolen und Kapillaren. Ob die Aussagen auch für Perizyten an Venulen gelten, müsste durch Versuche mit anderen Markern, wie α SMA in weiteren Untersuchungen validiert werden.

Die Verteilung der Zellen und ihre unmittelbarer Nähe zur Blutbahn macht Perizyten zu gut ansteuerbaren Zellen, welche ihre Wirkung schnell über das gesamte Gewebe entfalten könnten.

Die Gegenfärbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 weisen darauf hin, dass sich im Pankreas lediglich NG2+ Perizyten in unmittelbarer Nähe zu Gefäßen befinden. Die Färbungen weisen auf eine hohe Perizyten-Endothelzelldichte hin. Dennoch lässt sich über die genaue Dichte in Schnitten kaum eine Aussage treffen, da lediglich Ausläufer angeschnitten sein können, deren dazugehörige Zelle mit ihren übrigen Ausläufern noch viele weitere Endothelzellen umschlingen. Die Grenzfläche der Perizyten mit Endothelzellen im Pankreas erscheint den Färbungen nach zu urteilen deutlich unter 50%. In der Literatur finden sich keine Aussagen darüber, allerdings beträgt die Grenzfläche in menschlichem Skelettmuskel 24% und im Mesenterium (kapillär, im Froschgewebe) 49% (Sims, 1986) (S.165).

4.2 Pankreatische Perizyten exprimieren mesenchymale Stammzellmarker und Sca-1

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass NG2+ Perizyten mesenchymale Stammzellmarker *in vivo* exprimieren. Anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen im murinen Gewebe wird eine Doppelsexpression der Marker NG2 und CD90, sowie NG2 und Sca-1 und bedingt auch NG2 und CD105 auf perivaskulären Zellen gezeigt. Es handelt sich dabei sowohl um Perizyten der Arteriolen als auch um kapilläre Perizyten. Die direkt angrenzenden Endothelzellen erschweren eine Aussage, da sie zum Teil ebenfalls mesenchymale Marker auf ihrer Zelloberfläche tragen. Unseren Ergebnissen nach gibt es verschiedene Populationen der NG2+ Perizyten. Nicht alle tragen mesenchymale Marker auf ihrer Oberfläche. Es konnten NG2+CD90+, NG2+CD90-, sowie NG2+Sca-1+ und NG2+Sca-1- Zellen beschrieben werden. Die Doppelsexpression von NG2+CD105+ Zellen konnte nicht eindeutig in der Immunfluoreszenz dargestellt werden, da es sich nie sicher um Doppelsexpressionen einer Zelle, sondern auch um die Überstrahlung der positiven benachbarten Endothelzellen handeln könnte. Die Populationen der doppeltpositiven Zellen für Perizyten und mesenchymale Stammzellen sind jedoch nicht, wie zu Beginn vermutet, an eine spezielle Gefäßstruktur gebunden, sondern zeigen sich sowohl an kapillären Gefäßen wie auch an Arteriolen. Das CD90+ Signal zeigt sich besonders im Bereich mittelgroßer Gefäße, weniger jedoch in der am Endothel anliegenden Perizyten-schicht, sondern in besonders hoher Expression im Randbereich um die Gefäße herum. (Corselli et al., 2012) beschrieb bereits die Expression von mesenchymalen Markern, wie CD90, auf Zellen der Adventitia im humanen Fettgewebe (S.1306). Die in dieser Arbeit dargestellten Färbungen zeigen ähnliche Ergebnisse der CD90 Färbungen und proklamieren Adventitia-Gefäß-Zellen

als Perizytenvorläufer (S.1307). CD90+ Zellen und weitere mesenchymale Stammzellen an duktalem Epithelzellen wurden bereits durch (Seeberger et al., 2006) (S.142, 146) beschrieben. Auch die in Abbildung 3.6 dargestellten Färbungen zeigen zusätzlich zu den doppelpositiven Signalen mit Perizyten und denen mit Zellen der Adventitia Signale an den Epithelzellen der Dukti.

Für Sca-1+NG2- Zellen ergibt sich ebenfalls aus unseren Immunfluoreszenzfärbungen und bereits veröffentlichten Arbeiten eine Lokalisation dieser Zellen in der Adventitia (Passman et al., 2008) (S.9351).

Somit wird eine multilokuläre Verteilung der mesenchymalen Stammzellen im Pankreas deutlich. Nicht alle NG2+ Perizyten besitzen mesenchymale Marker, aber auch nicht alle mesenchymalen Marker sind auf Perizyten zu finden.

Um die Doppelsexpression zu validieren und genauere Aussagen über die Anzahl der Perizyten, welche mesenchymalen Stammzellmarkern besitzen machen zu können, wurde eine Durchflusszytometrie von murinen Pankreata durchgeführt. Arbeiten von (Crisan et al., 2008) zeigten bereits, dass Perizyten in vielen humanen Organen mesenchymale Marker besitzen. Für fetales Pankreasgewebe zeigten sich 1,4 %, in adultem Gewebe dagegen nur 0,65% (S.302). Das Set der gesorteten Zellen war jedoch mit CD146+CD34-CD45-CD56- Zellen spezifischer gewählt. (Carlotti et al., 2010) (S. 166) untersuchten pankreatische Inselzellen und entdeckten, dass 2% dieser Zellen CD90+CD105+ sind. Unsere Untersuchungen an Hand von Durchflusszytometrie-Analysen zeigen im Mittel Populationen von 2,1% NG2+ Zellen im murinen Pankreas. Verglichen mit den Immunfluoreszenzfärbungen scheint 2% ein realistischer Wert für NG2+Perizyten des Pankreas zu sein. Für mesenchymale Marker positive Zellen wurden im Mittel Werte von 2% für CD90+, 1,36% für CD105 und 3,91% für Sca-1+ Zellen gemessen. Diese Werte liegen damit deutlich über den von (Crisan et al., 2008) gemessenen Werten, wobei die verschiedenen Marker verschiedene Populationen von Zellen bestimmen. Auffällig ist, dass der Wert für CD105+ Zellen allein an Hand der Immunfluoreszenzfärbungen hätte deutlich höher ausfallen sollen. Die unterschiedlichen Mengen der Zellpopulation könnten zum Beispiel damit zusammenhängen, dass für die FACS-Analyse die Zellen eine Stunde mit Kollagenase IV behandelt werden. Diese ist besonders wichtig, um die Basalmembran zwischen Perizyten und Endothelzellen zu verdauen, welche von Kollagen IV gebildet wird (Khoshnoodi, Pedchenko and Hudson, 2008) (S.357), um keine falsch positiven Werte durch noch an den Perizyten verbundene Endothelzellen zu erzielen. Der Nachteil liegt darin, dass die Kollagenase im Stande sein kann Antigene der Zelloberfläche wie CD105 anzudauen und so zu verändern, dass sie nicht mehr vom Antikörper gebunden werden. Für Zellen, welche für

Perizytenmarker und mesenchymale Stammzellmarker doppelt positiv waren, ergaben sich folgende Werte: NG2+CD90+ 1,34%, NG2+CD105+ 0,84% und NG2+Sca-1+ 1,52%. Die Werte sind nur als ungefähre Werte anzunehmen, da man bei der FACS-Analyse ab einer bestimmten Signalstärke die Zellen subjektiverweise als positive Zellen wertet. Um alle Populationen gut miteinander vergleichen zu können, wurde dieser Wert nach Einstellung der Einzelfarben bei 10^2 gewählt. Dennoch erkennt man, dass sich die Populationen im Graphen nicht strikt entlang dieses Wertes gruppieren. So können leichte Beurteilungsfehler entstehen. Auch in der Durchflusszytometrie zeigen sich Populationen, die nur den Perizytenmarker NG2, nur einen der mesenchymalen Marker, oder sowohl Perizytenmarker als auch mesenchymalen Marker exprimieren. Interessanterweise kam es bei den Messungen der NG2+CD105+ Populationen immer zu einem deutlich niedrigeren NG2 – Wert (\approx 0,5%). Da auch die CD105+ Population im Vergleich zur Immunfluoreszenzfärbung verringert scheint, könnte dies für eine Wechselwirkung der Antikörper an den gegenseitigen Antigenen sprechen.

Interessanterweise exprimiert die CD90+NG2+ Population fast zu 100% auch das Stem cell antigen-1. Dasselbe gilt im Umkehrschluss auch für die Sca-1+NG2+ Population im Bezug auf CD90. Dies könnte Anhalt zu der Annahme geben, dass es zwei Perizytenpopulationen (oder mehr) gibt. Eine, welche nur Perizytenmarker exprimiert und keine Stammzellfunktion hat und eine weitere, welche die Funktion einer mesenchymalen Stammzelle hat und deren Marker exprimiert. Die Frage, ob alle Perizyten mesenchymale Stammzellen sind oder umgekehrt, wurde bereits von (Caplan, 2008) diskutiert. Übereinstimmend hält er nicht alle Perizyten für mesenchymale Stammzellen (S.229), er vermutet jedoch, alle mesenchymalen Stammzellen könnten Perizyten sein (S.230). Auf Grund der oben aufgeführten Ergebnisse dieser Arbeit und im Besonderen auch die Erkenntnisse, dass Zellen der Adventitia ebenfalls mesenchymale Marker und keine Perizytenmarker exprimieren (Corselli et al., 2012) (S. 1304), lässt eher auf verschiedene Populationen von mesenchymalen Stammzellen schließen.

Darauf, ob diese Eigenschaft der Perizyten eine Rolle in der Regeneration des Pankreas spielen könnte, wird in Kapitel 4.4 weiter eingegangen.

4.3 Die Isolation von pankreatischen Perizyten ist mittels magnetischem Sorten möglich

Zur speziellen Untersuchung an Perizyten mit mesenchymalen Markern sollte in unserem Labor eine Methode zur Isolation von diesen Zellen entwickelt werden.

In der Literatur sind bereits viele Protokolle zur Isolation von Perizyten aufgeführt. Besonders ergiebig scheint die Isolation von Perizyten aus der Retina, da dort eine besonders hohe Perizyten-dichte vorherrscht (Bryan and D'Amore, 2008) (S. 319). Des Weiteren werden zum Beispiel Isolationen aus Skelettmuskel (Mogensen et al., 2011) (S.414-415) und Hirngewebe (Tigges et al., 2012) (S.75) beschrieben. Die Methoden zeigen die Isolation der Zellen ohne Verwendung von speziellen Markern, allein durch Auftrennung der Zellen mit Hilfe von Enzymen, Zentrifugation, Filtration und Verwendung spezieller Medien. Die Schwierigkeit der Isolation von Perizyten aus dem Pankreas ergibt sich aus der Eigenschaft des Organs Verdauungsenzyme zu bilden, welche bei der Zerkleinerung des Gewebes freigesetzt werden und Zellen sowie Oberflächenmoleküle andauern können. Da in unserem Labor bereits eine Methode zur Isolation von Azinuszellen etabliert war, wurde zunächst unter Abwandlung dieses Protokolls mit Hilfe von Perizytenwachstumsmedium eine Perizytenisolation versucht (Daten nicht dargestellt). Da dies ohne Erfolg war, wurde eine etwas spezifischere Methode unter zur Hilfenahme eines Sortergerätes und Antikörpern gegen NG2 versucht. Auch mit dieser Methode zeigte sich keine Anhaftung von perizytenähnlichen Zellen in Kultur. Mit Hilfe von Dr. Mihaela Crisan, welche erfolgreich Perizyten isoliert hat (Crisan et al., 2008) (S.302), konnte ein neues Protokoll angewendet werden. Durch Kollagenase IV war es nun möglich, Perizyten von Endothelzellen zu trennen und dank Gelatin-überzogenen Platten war es den Zellen besser möglich, sich an die Oberfläche der Petrischale zu haften. Das von Crisan vorgeschlagene Set von CD146+CD45-CD31- bezog sich zusätzlich auf Perizyten mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften durch den Marker CD146. Trotz vieler Versuche war es uns nicht gelungen eine größere Menge dieser Zellen herauszusortieren und diese in Kultur zum Anheften zu bringen. Die Anteile an den Gesamtzellen variierten mit 0%-2,6% außerdem stark, waren jedoch ungefähr im gleichen Bereich, wie bei (Crisan et al., 2008) (S.302) mit 1,4% (fetaler Pankreas) und 0,65% (adulte Pankreas) beschrieben. Die geringe Menge der gesortierten Zellen und die autodigestiven Eigenschaften könnten Grund für das Versagen dieses Protokolls sein. Ähnlich wie bei (Mogensen et al., 2011) (S.415) beschrieben, versuchten wir die Methode des magnetischen Sortens mit einem neuen, noch nicht im offiziellen Verkauf angebotenen AN2 (NG2) Antikörper. Die Methode eignete sich mit Abstand am besten zur Isolation von pankreatischen Perizyten. Es konnten größere Mengen an Zellen isoliert werden. Jedoch zeigten sich bei manchen Versuchen auch perizytenähnliche Zellen in der Negativkontrolle und Verunreinigungen durch andere Zellen in der Positivkontrolle, was dieses Verfahren zu einem nicht sehr spezifischen und sensitiven macht. Dennoch konnte nach Kultivierung dieser Zellen über einige Tage in speziellem Wachstumsmedium durch

Färbungen gezeigt werden, dass es sich im Verlauf um eine annähernd reine Perizyten und MSC-Populationen handelt. Somit ergab sich eine erfolgreiche Isolation von Perizyten durch Sorten mit *magnetic beads* und weitere Selektion mit Hilfe von speziellem Wachstumsmedium. In Kultur konnte gezeigt werden, dass es sich um Perizyten ohne Endothelzellverunreinigung handelt, da die Immunfluoreszenzfärbung für CD31 kein Signal zeigte. Interessanterweise konnten auch keine Zellen kultiviert werden, welche den Marker α SMA exprimieren. In der Literatur wird jedoch von isolierten und kultivierten α SMA+ Zellen berichtet (Mogensen et al., 2011) (S.418). Dies könnte bedeuten, dass bei unserer Isolation lediglich kapilläre Perizyten isoliert werden konnte, welche den Marker nicht exprimieren (siehe Tabelle 1.1). Wir konnten eine in einer Färbung mit dem Perizytenmarker NG2 und dem mesenchymalen Stammzellmarker CD90 ähnliche Verteilung bei den isolierten Zellen zeigen, wie in der Durchflusszytometrie. Es zeigten sich sowohl einfach positive Zellen beider Marker, sowie doppeltpositive Zellen für NG2 und CD90. Etwa ein Drittel der isolierten Zellen war doppelpositiv für beide Marker, die anderen Drittel waren je einfach positiv für NG2 oder CD90. Die NG2- Zellen sprechen entweder für einen Verlust des Markers in vitro oder könnten auch auf eine unspezifische Isolation hindeuten.

Die isolierte Perizytenpopulation zeigte außerdem Sca-1+ Zellen. Es handelt sich in etwa um eine ähnlich große Population wie die der CD90+ Zellen. In weiteren Versuchen könnte eine Doppelfärbung der isolierten Zellen mit Sca-1+NG2+ und Sca-1+CD90+ Zellen durchgeführt werden.

Zwar zeigt die von uns isolierte Population mesenchymale Marker, es handelt sich jedoch nicht um eine reine Population von mesenchymalen Stammzellen mit Perizytenmarker. Dazu könnte in weiteren Versuchen eine größere Population dieser Zellen kultiviert werden und anschließend auf ein Set wie NG2+CD90+CD105+CD73+/Sca-1+ Zellen gesortet werden. Diese Zellen könnten für Untersuchungen der Pankreasregeneration verwendet werden. Diese Thematik wird im anschließenden Kapitel 4.4 näher beschrieben.

4.4 Nach steriler Inflammation steigt der prozentuale Anteil pankreatischer Perizyten und mesenchymaler Stammzellen

Über die Möglichkeiten des Pankreas, sich nach einem Gewebsschaden, wie zum Beispiel einer akuten Entzündungsreaktion, wieder zu regenerieren, sind vor allem in den letzten Jahren viele Theorien untersucht worden. Es ist bereits bekannt, dass β -Zellen der Langerhans'schen Inseln sich nach Schaden durch Replikation wiederherstellen können. Außerdem können diese Zellen durch duktale Zellen,

welche Ngn3+ sind, ersetzt werden (Yanger and Stanger, 2011) (S.522). Für den exokrinen Teil des Pankreas konnten (Jensen et al., 2005) zeigen, dass Azinuszellen nach einer induzierten Pankreatitis ihr exogenes Gen-Programm unterdrücken und Gene von undifferenzierten Markern anschalten können. Dies würde für eine azinäre Dedifferenzierung sprechen (S. 728). Eine andere Studie berichtet von Vorläuferzellmarker exprimierenden zentroazinären Zellen, welche nach Isolation in vitro zu spontaner endo- und exokrinen Differenzierung fähig sind (Rovira et al., 2010) (S.75).

Noch ist dieser Prozess jedoch nicht bis ins Detail verstanden (Yanger and Stanger, 2011) (S.525). Wir stellten uns die Frage, ob auch Perizyten mit mesenchymalen Stammzellmarkern in diesem Prozess eine Rolle spielen könnten. Daher sollte in dieser Arbeit charakterisiert werden, in wie fern sich Perizyten und Perizyten mit mesenchymalen Stammzellmarkern nach einer sterilen Inflammation im murinen Pankreas verändern. In der Durchflusszytometrie konnten wir einen fünffachen Anstieg von NG2+ Zellen am ersten Tag nach Caerulein-induzierter Pankreatitis verzeichnen. Der Anteil dieser Zellen war am zweiten Tag auf nur noch ein Vierfaches des Kontrollwertes gesunken. Zellen mit dem mesenchymalen Stammzellmarker CD90 und dem Stammzellmarker Sca-1 verdreifachten sich und zeigten relativ konstante Anteile über beide Tage post injectionem. Ähnlich verhielt es sich mit den doppelpositiven Zellen (NG2+CD90+ oder NG2+Sca-1+). Diese stiegen nach der induzierten Entzündung auf ihren 3,5fachen Anteil im Vergleich zur Kontrollgruppe an, am zweiten Tag zeigte sich noch einen leichte Steigerung. Diese Steigerung beruht jedoch nur auf den Abfall der doppelpositiven Zellen in der Kontrollgruppe. Allein in Bezug auf den Anteil der Zellen fällt die Population der doppelpositiven am zweiten Tag eher leicht ab. Die Frage, ob in der Post-Inflammationsphase die Perizyten verstärkt mesenchymale Marker exprimieren und sich das Gleichgewicht somit hin zu der Stammzellen verschiebt, kann so nur bedingt beantwortet werden. Da ca. die Hälfte aller NG2+Zellen mesenchymale Marker besitzen, kann es sein, dass durch die extreme Vermehrung der NG2+ Perizyten im Allgemeinen auch der Anteil der MSC+NG2+ Zellen mit ansteigt. Fallen die Anteile der Perizyten wieder, so fallen auch diese doppelpositiven Anteile.

Daher wurde der Anteil der MSC+NG2+ Zellen an denen aller NG2+ Zellen berechnet. Hier zeigt sich am ersten Tag nach Inflammation ein reduzierter Anteil dieser Zellen gegenüber der Kontrollgruppe. Dies bedeutet, dass zumindest zu Beginn der Regenerationsphase mehr Perizyten ohne mesenchymale Marker entstehen als Doppelpositive. Am zweiten Tag steigt der Quotient zu Gunsten der doppelpositiven Zellen. Dies könnte zum einen dafür sprechen, dass auf den neu gebildeten NG2+ Perizyten mesenchymale Marker exprimiert werden. Andererseits

kann es auch für einen Rückgang der einfach-positiven NG2 Zellen sprechen. Die zweite Annahme wird durch den Verlust der NG2+ Zellen am zweiten Tag gestützt. Dies würde jedoch gleichzeitig bedeuten, dass die doppeltpositiven im Vergleich zu den rein NG2+ weiterhin bestehen. Dennoch ist es möglich, dass die verbleibenden Zellen beginnen mesenchymale Marker zu exprimieren. Um sichere Aussagen treffen zu können, sollte diese Versuchsreihe auf Grund der erhöhten Fehlerwahrscheinlichkeit bei nur einmaliger Durchführung wiederholt werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass murine pankreasansässige mesenchymale Stromazellen zur Regeneration des Organs beitragen können (Gopurappilly, Bhat and Bhonde, 2013) (S. 2240). Diese Arbeit beschreibt eine Population von unter anderem Sca-1+ und CD90+ Zellen aus dem Pankreas, welche in vitro zu Inselzellneogenese fähig waren. Ob dies auch für Azinuszellen zutrifft und ob dies der physiologische Weg ist, um diese pankreatischen Zellen wieder herzustellen, müsste nun in weiterführenden Experimenten untersucht werden, siehe 4.5.

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen ebenfalls einen Anstieg von NG2+ Zellen. Es könnte sich zwar hierbei um andere Zellen handeln, welche in der post – Entzündungsphase das Antigen NG2 exprimieren. Durch die typische Morphologie und Lage handelt es sich aber am ehesten um eine Vermehrung der kapillären Perizyten. Eine Vermehrung der α SMA+ Zellen konnte in der Immunfluoreszenzfärbung nicht beobachtet werden. Dies spricht ebenfalls für eine Vermehrung der kapillären Perizyten. Die veränderte Morphologie der Perizyten an den Arteriolen lässt sich durch die strukturelle Veränderung der Gefäße während der Entzündungsreaktion beschreiben. Die Gefäße dilatieren und die Verbindungen zwischen den Endothelzellen beginnen sich zur Durchwanderung der Entzündungszellen voneinander zu lösen (Pober and Sessa, 2007) (S.806). Interessanterweise passiert dies, wie in der Literatur zuvor beschrieben (Wang et al., 2012) (S.1) verstärkt an Venulen und weniger an Arteriolen, an denen NG2+ Zellen sitzen. Ob die Strukturveränderung somit auf ein anderes Phänomen zurückzuführen ist, kann nicht eindeutig geklärt werden. Welche Rolle NG2+ Perizyten während einer Entzündung einnehmen, wird von (Stark et al., 2013) beschrieben. Die Arbeit schreibt Perizyten eine leukozytenaktivierende und instruierende Funktion zu (S.41). Ob es sich dabei um Perizyten mit oder ohne mesenchymale Marker handelt, wird in dieser Arbeit nicht beschrieben. So könnte es hypothetischer Weise Perizyten der Immunmodulation und Perizyten der Regeneration geben. Ob sich die Perizyten, welche an der Immunmodulation beteiligt sind, auf Grund dessen stark vermehren und ob dies der Grund für ihre Strukturänderung ist, sollte ebenfalls in weiteren Studien beobachtet werden. Eine Diffusion der Perizyten von den Gefäßen zur

Dedifferenzierung dieser konnte in den ersten zwei Tagen post injectionem nicht beobachtet werden.

4.5 Ausblick

Diese Arbeit schafft die Grundlagen zur Forschung an mesenchymalen Stammzellmarkern tragenden Perizyten und in ihrer Rolle in der Pankreatitis und Regeneration des Pankreas. Sie beschreibt eine quantitative und qualitative Veränderung der NG2+/NG2+MSC+ Zellen. Um weitere Erkenntnisse zu sammeln, wäre es notwendig Perizyten über einen längeren Zeitraum nach der Entzündungsphase zu beobachten. Weiterführend sollten ausführlichere Durchflusszytometrie – Analysen prüfen, in wie weit auch andere mesenchymale Marker wie CD73 oder CD105 und die Kombination dieser sich auf den NG2+ Zellen nach einer Entzündungsreaktion zeigen. Außerdem könnte es von Interesse sein zu untersuchen, woher die erhöhte Perizytenpopulation stammt. Ob diese aus dem Knochenmark oder aus den pankreasstämmigen Zellen selbst entstehen, könnte durch einen GFP-Transplantationsversuch geklärt werden.

Um die Differenzierungsmöglichkeit der pankreatischen NG2+/MSC+ Zellen zu evaluieren, sollten die isolierten Perizyten in Kultur expandiert und auf mesenchymale Stammzellmarker wie CD90, CD105, CD73 und Sca-1 gesortet werden. Diese Population könnte nun in Kultur näher charakterisiert werden und zur Differenzierung angeregt werden.

Sollte sich herausstellen, dass Perizyten des Pankreas in der Lage wären die Bildung von neuen Azinuszellen zu unterstützen oder sich gar selbst in diese zu differenzieren, könnte Therapien wie *Tissue Engineering* oder Stimulation dieser Zellen post inflammationem daraus abgeleitet werden.

Perizyten im Pankreas stellen eine noch relativ unerforschte Zellpopulation dar, welche durch ihre neuen Eigenschaften und ihr Differenzierungspotenzial im Rahmen von Entzündung und Regeneration des Organs sowie in der Tumorgenese einen guten Ansatzpunkt für Therapien geben könnte.

5 Zusammenfassung

Perizyten erfüllen in ihrer Rolle als Stabilisatoren der Gefäße, Blutdruckregulatoren, Angiogenese und Endothelzellmodulation bereits wichtige Aufgaben in allen Organen des Körpers. Ihre Fähigkeit zur Immunmodulation und ihre Expression von mesenchymalen Stammzellmarkern machte sie in den letzten Jahren zu wieder neu entdeckten Zellen, welche somit auch Einfluss auf Entzündungen und Regeneration im Gewebe nehmen könnten. Diese Arbeit beschäftigt sich mit Perizyten im Pankreas. Zunächst wurde durch Immunfluoreszenzfärbung die perivaskuläre Lage der Zellen bestimmt. Auch im murinen Pankreas wurde eine Expression der mesenchymalen Marker CD90, CD105 und Sca-1 auf NG2+ Perizyten nachgewiesen. An Hand von Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil dieser Zellen im Pankreas bestimmt und die Doppelexpression der oben genannten Marker bestätigt. Mit Hilfe von magnetischem Sortieren konnten wir eine Methode zur Isolation von pankreatischen Perizyten entwickeln, welche für weiterführende Experimente angepasst und verwendet wurde. Um daraufhin die Perizyten im post inflammatorischen Gewebe näher zu charakterisieren, wurde mit Hilfe von Caerulein eine Pankreatitis in Wildtyp-Mäusen induziert. FACS-Analysen zeigten einen enormen Anstieg auf das Fünffache des Ausgangswertes für Perizyten. Auch die Populationen der NG2+/MSC+ Zellen stiegen deutlich an. Zusätzliche Färbungen im Gewebe konnte diese Vermehrung sichtbar machen, dennoch konnte keine Umverteilung dieser Zellen erkannt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass Perizyten im post inflammatorischen Gewebe eine wichtige Rolle spielen, da ihre Anzahl deutlich hochreguliert wird. Diese Daten unterstützen die wichtige Funktion der Perizyten als mesenchymale Stammzellen und in der Inflammation. Außerdem könnten sie einen Hinweis auf eine Rolle der Perizyten in der Regeneration des Pankreasgewebes darstellen.

Literaturverzeichnis

Alon, R. & Nourshargh, S. Learning in motion: pericytes instruct migrating innate leukocytes. *Nat. Immunol.* 14, 14-15 (2013).

Anatomisches Institut, U.B. *Perizyten*, [Online], Available: http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/kardio/popup_kardio/perizyt.php [26 Aug 2013].

Armulik, A., Genove, G. & Betsholtz, C. Pericytes: Developmental, Physiological and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell.* 21, 193-214 (2011).

Augello, A., Kurth, T.B. & De Bari, C. Mesenchymal Stem Cells: A Perspective from in vitro cultures to in vivo Migration and Niches. *Eur Cell Mater.* 20, 121-133 (2010).

Badiavas, E.V. & Falanga, V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch. Dermatol.* 139, 510-516 (2003).

Bagley, R.G., Rouleau, C., Morgenbesser, S.D., Weber, W., Cook, B.P., Shankara, S., Madden, S.L. & Teicher, B.A. Pericytes from human non - small lung carcinomas: An attractive target for anti-angiogenic therapy. *Microvasc. Res.* 71, 163-174 (2006).

Banks, P.A., Freeman, M.L. & The Practise Parameters Committee of the American College of Gastroenterology Practice Guidelines in Acute Pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 2379-2400 (2006).

Barthels, P.D.H. (2011) *Medizinische Hochschule Hannover - Mikroskopische Anatomie*, [Online], Available: www.mh-hannover.de/19189.html [16.7.13 Juli 2013].

Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* 4, 452-464 (2005).

Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E. & Hanahan, D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 111, 1287-1295 (2003).

Bianco, P. & Robey, P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 414, 118-121 (2001).

Biotec, M. (2013) *MACS-Cell-Separation*, 3 Mar, [Online], Available: <https://www.miltenyibiotec.com/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/MACS-Technology/Basic-principle.aspx>.

Biotec, M. (2013) *MidiMACS-Separator and Starting Kits*, 3 Mar, [Online], Available: <https://www.miltenyibiotec.com/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/Manual-cell-separation/Separators/MidiMACS-Separator-and-Starting-Kits.aspx>.

- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.M., Messi, M.L., Enikolopov, G.N., Mintz, A. & Delbono, O. Role of Pericytes in Skeletal Muscle Regeneration and Fat Accumulation. *Stem Cells Dev.* 22, 2298-2314 (2013).
- Black, I.B. & Woodbary, D. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol. Dis.* 27, 632-636 (2001).
- Bordon, Y. Pericytes - route planners. *Nat. Rev. Immunol.* 13(2013).
- Bordon, Y. Pericytes-route planners. *Nature Immunol.* 13(2013).
- Bradley, J.E., Ramirez, G. & Hagood, S. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors.* 35, 258-265 (2009).
- Bryan, B.B. & D'Amore, P.A. Pericyte isolation and use in endothelial/pericyte coculture models. *Methods in Enzymology.* 443, 315-331 (2008).
- Caplan, A.I. All MSCs are Pericytes? *Cell Stem Cell.* 3, 229-230 (2008).
- Carlotti, F., Zaldumbide, A., Loomans, C.J., van Rossenberg, E., Engelse, M., Koning, E.J. & Hoeben, R.C. Isolated human islets contain a distinct population of mesenchymal stem cells. *Islets.* 2, 164-173 (2010).
- Chen, C.-W., Okada, M., Proto, J.D., Gao, X., Sekiya, N., Beckman, S.A., Corselli, M., Crisan, M., Saparov, A., Tobita, K., Péault, B. & Huard, J. Human Pericytes for Ischemic Heart Repair. *Stem Cells.* 31, 305-316 (2013).
- Choi, M.-Y., Kim, H.-I., Yang, Y.-I., Kim, J., Jang, S.H., Park, C.M., Jang, W.H., Youn, Y.-C., Cheong, S.-H., Choi, C.-S. & Kim, D.K. The isolation and in situ identification of MSCs residing in loose connective tissues using a niche - preserving organ culture system. *Biomater.* 33, 4469-4479 (2012).
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmermann, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.-M. & Stern, D.M. Endothelial cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood.* 91, 3527-3561 (1998).
- Clark, E.R. & Clark, E.L. The Development of Adventitial (Rouget) Cells on the Blood capillaries of Amphibian Larvae. *Am. J. Anat.* 35, 239-264 (1925).
- Cohen, M.P., Frank, R.N. & Khalifa, A.A. Collagen production by cultured retinal capillary pericytes. *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.* 19, 90-94 (1980).
- Colgan, P., Eltzschig, H.K., Eckle, T. & Thompson, L.F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purenergic Signal.* 2, 351-360 (2006).

Constantin , G., Marconi, S., Rossi, B., Angiari, S., Calderan, L., Anghileri, E., Gini, B., Bach, S.D., Martinello, M., Bifari, F., Galiè, M., Turano, E., Budui, S., Sbarbati, A., Krampera, M. & Bonetti, B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells*. 27, 2624-2635 (2009).

Corselli, M., Chen, C.-W., Sun, B., Yap, S., Rubin, P. & Péault, B. The Tunica Adventitia of Human Arteries and Veins As a Source of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 21, 1299-1308 (2012).

Covas, D.T., Panepucci, R.A., Fontes, A.M., Silva, W.A.J., Orellana, M.D., Freitas, M.C., Neder, L., Santos, A.R.D., Peres, L.C., Jamur, M.C. & Zago, M.A. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol*. 36, 642-654 (2008).

Crisan, M., Chen, C.-W., Corselli, M., Andriolo, G., Lazzari, L. & Péault, B. Perivascular Multipotent Progenitor Cells in Human Organs. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1176, 118-123 (2009).

Crisan, M., Corselli, M., Chen, W.C.W. & Péault, B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J. Cell. Mol. Med*. 16, 2851-2860 (2012).

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badylak, S., Bühring, H.-J., Jacobino, J.-P., Lazzari, L., Huard, J. et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. 3, 301-313 (2008).

Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S. & Cossu, G. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun*. 2, 499 (2011).

Deszö, K., Jelnes, P., Laszlo, V., Baghy, C., Bödör, C., Paku, S., Tygstrup, N., Bisgaard, A.C. & Nagy, P. Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-liver mediated regeneration. *Am. J. Pathol*. 171, 1529-1537 (2007).

Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Varela, H., Rancel, N. & Valladares, F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopath*. 6, 269-286 (1991).

Doherty, M.J., Ashton, A., Walsh, S., Beresford, J.N., Grant, M.E. & Canfield, A.E. Vascular Pericytes Express Osteogenic Potential in Vitro and in Vivo. *J. Bone Miner. Res.* 13, 828838 (1998).

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J. & Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8, 315-317 (2006).

Farrington-Rock, C., Crofts, N.J., Doherty, M.J., Ashton, B.A. & Griffin-Jones, C. Chondrogenic and Adipogenic Potential of Microvascular Pericytes. *J Am Heart Assoc.* 110, 2226-2232 (2004).

Foygel, K., Wang, H., Machtaler, S., Lutz, A.M., Chen, R., Pysz, M., Lowe, A.W., Tian, L., Carrigan, T., Brentnall, T.A. & Willmann, J.K. Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice by Ultrasound Imaging of Thymocyte Differentiation Antigen 1. *Gastroenterol.* 145, 885-894 (2013).

Franco, M., Roswall, P., Cortez, E., Hanahan, D. & Pietras, K. Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-q expression. *Blood.* 118, 2906-2917 (2011).

Fukushi, J.-i., Makagiansar, I.T. & Stallcup, W.B. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin - 3 and alpha 3 beta 1 integrin. *Mol. Biol. Cell.* 15, 3580-3590 (2004).

Geisler, F. (2010) *DocCheck Pictures*, 24 Dezember, [Online], Available: <http://pictures.doccheck.com/de/photos/54911/10285/blutkapillare-mit-perizyt/> [03 Oktober 2013].

Gerhardt, H. & Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314, 15-23 (2003).

Gerhardt, H. & Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314, 15-23 (2003).

Gopurappilly, R., Bhat, V. & Bhonde, R. Pancreatic Tissue Resident Mesenchymal Stromal Cell (MSC)-Like Cells as a Source of In Vitro Islet Neogenesis. *J. Cell. Biochem.* 114, 2240-2247 (2013).

Hallström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Role of PDGF-B and PDGF-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 126, 3047-3055 (1999).

- Hass, R. & Otte, A. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Commun Signal*. 10(2012).
- Henderson, S.C., Kamdar, M.M. & Bamezai, A. Ly-6A.2 Expression regulates Antigen-specific CD4+T Cell Proliferation and Cytokine Production. *J. Immunol*. 168, 118-126 (2002).
- Herman, I.M. & D'Amore, P.A. Microvascular Pericytes Contain Muscle and Nonmuscle Actins. *J. Cell Biol*. 101, 43-52 (1985).
- Hess, D., Li, L., Martin, M., Sakano, S., Hill, D., Strutt, B., Thyssen, S., Gray, D.A. & Bhatia, M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nature biotechnology*. 21, 763-770 (2003).
- Hirschi, K.K. & D'Amore, P.A. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res*. 32, 687-698 (1996).
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L. & Hofmann, T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Nat. Acad. Sci*. 99, 8932-8937 (2002).
- Houlihan, D.D., Mabuchi, Y., Morikawa, S., Niibe, K., Araki, D., Suzuki, S., Okano, H. & Matsuzaki, Y. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR β . *Nat. Protoc*. 7, 2103-2111 (2012).
- Jensen, J.N., Cameron, E., Garay, M.V.R., Starkey, W., Gianani, R. & Jensen, J. Recapitulation of Elements of Embryonic Development in Adult Mouse Pancreatic Regeneration. *Gastroenterol*. 128, 728-741 (2005).
- Jensen, J.N., Cameron, E., Garay, M.V., Starkey, T.W., Gianani, R. & Jensen, J. Recapitulation of Elements of Embryonic Development in Adult Mouse Pancreatic Regeneration. *Gastroenterology*. 728-741, 128 (2005).
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. & Verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418, 41-49 (2002).
- John, M. (2005) *HU Berlin*, 05 Januar, [Online], Available: <http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/john-matthias-2002-04-23/HTML/chapter8.html> [03 Oktober 2013].
- Kachgal, S. & Putnam, A.J. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis*. 14, 47-59 (2011).

Kapur, N.K., Morine, K.J. & Letarte, M. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc. Health Risk Manag.* 9, 195-206 (2013).

Kassem, M., Kristiansen, M. & Abdallah, B.M. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 209-214 (2004).

Kassem, M., Kristiansen, M. & Abdallah, B.M. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 95, 209-214 (2004).

Kerbel, R.S. Tumor Angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 358, 2039-2049 (2008).

Khoshnoodi, J., Pedchenko, V. & Hudson, B.G. Mammalian Collagen IV. *Micorsc. Res. Tech.* 71, 357-370 (2008).

Kitaori, T., Ito, H., Schwarz, E.M., Tsutsumi, R., Yoshitomi, H., Oishi, S., Nakano, M., Fujii, N., Nagasawa, T. & Nakamura, T. Stromal cell derived factor 1/CXCR4 signalling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum.* 60, 813-823 (2009).

Kong, B., Michalski, C., Erkan, M., Friess, H. & Kleeff, J. From tissue turnover to the cell of origin for pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 467-472 (2011).

Korn, J., Christ, B. & Kurz, H. Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells. *J. Comp. Neurol.* 442, 78-88 (2002).

Kusche, C. (2011) *Optimierung der Isolierung muriner mesenchymaler Stammzellen*, 16 Dezember, [Online], Available: <http://www.uniklinikum-dresden.de/das-klinikum/kliniken-polikliniken-institute/ort/forschung/experimentelle-forschung/projekte/optimierung-der-isolierung-muriner-mesenchymaler-stammzellen> [1 Oktober 2013].

Lindahl, P., Johansson, B.R., Levéen, P. & Betsholtz, C. Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B - Deficient Mice. *Science.* 277, 242-245 (1997).

Li, J., Zhu, L., Qu, X., Li, J., Lin, R., Liao, L., Wang, J., Wang, S., Xu, Q. & Zhao, R.C. Stepwise differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Toward Definitive Endoderm and Pancreatic Progenitor Cells by Mimicking Pancreatic Development in Vitro. *Stem Cells and Development.* 1576-1587, 22 (2013).

Lüllmann-Rauch, R. "Taschenlehrbuch Histologie" Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, 2. Auflage.

- Luna, G., Paez, J. & Cardier, J.E. Expression of the hematopoietic stem cell antigen Sca-1 (LY-6A/E) in Liver Sinusoidal Endothelial Cells: Possible Function of Sca-1 in Endothelial Cells. *Stem cells Dev.* 13, 528-535 (2004).
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. "Der Experimentator: Immunologie" Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009, 3. Auflage.
- Maier, C.L., Shepherd, B.R., Yi, T. & Pober, J.S. Explant Outgrowth, Propagation and Characterization of Human Pericytes. *Microcirculation.* 17, 367-380 (2010).
- Malevezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C. & Negri, E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann. Oncol.* 24, 792-800 (2013).
- Mansour Haeryfar, S.M. & Hoskin, D.W. Thy-1: More than a Mouse Pan-T Cell Marker. *J. Immunol.* 173, 3581-3588 (2004).
- Ma, X., Robin, C., Ottersbach, K. & Dzierzak, E. The Ly-6A (Sca-1) GFP Transgene is expressed in a adult mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells.* 20, 514-521 (2002).
- Mogensen, C., Bergner, B., Wallner, S., Ritter, A., d'Avis, S., Ninichuk, V., Kameritsch, P., Gloe, T., Nagel, W. & Pohl, U. Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle. *Acta Physiol.* 201, 413-426 (2011).
- Mogensen, C., Bergner, B., Wallner, S., Ritter, A., d'Avis, S., Ninichuk, V., Kameritsch, P., Gloe, T., Nagel, W. & Pohl, U. Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle. *Acta Physiol.* 201, 413-426 (2011).
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K. & McDonald, D.M. Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am. J. Pathol.* 160, 985-1000 (2002).
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K. & McDonald, D.M. Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am. J. Pathol.* 160, 985-1000 (2002).
- Mülhardt, C. "Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics" Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009, 6. Auflage.
- Murfee, W.L., Skalak, C. & Peirce, S.M. Differential Arterial/Venous Expression of NG2 Proteoglycan in Perivascular Cells Along Microvessels: Identifying a Venule-Specific Phenotype. *Microcirculation.* 12, 151-160 (2005).

- Nehls, V., Denzer, K. & Drenckhahn, D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* 270, 469-474 (1992).
- Nehls, V. & Drenckhahn, D. Heterogeneity of Microvascular Pericytes for Smooth Muscle Type Alpha-Actin. *J. Cell Biol.* 113, 147-154 (1991).
- Nogués, C.S. & Creane, M. (2012) *Eurostemcell*, 20 Juni, [Online], Available: <http://www.eurostemcell.org/factsheet/mesenchymal-stem-cells-other-bone-marrow-stem-cells> [03 Oktober 2013].
- Omary, M.B., Lugea, A., Lowe, A.W. & Pandol, S.J. The pancreatic stellate cell: A star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest.* 117, 50-59 (2007).
- Orlidge, A. & D'Amore, P.A. Inhibition of Capillary Endothelial Cell Growth by Pericytes and Smooth Muscle Cells. *J. Cell Biol.* 105, 1455-1462 (1987).
- Pandol, S.J., Saluja, A.K., Imrie, C.W. & Banks, P.A. Acute Pancreatitis: Bench to the Bedside. *Gastroenterology.* 133, 1056.e1-1056.e25 (2007).
- Passman, J.N., Dong, X.R., Wu, S.-P., Maguire, C.T., Hogan, K.A., Bautch, V.L. & Majesky, M.W. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9349-9354 (2008).
- Petersen, O.H., Gerasimenko, O.V. & Gerasimenko, J.V. Pathobiology of acute pancreatitis: focus on intracellular calcium and calmodulin. *F1000 Med Rep.* 3(2011).
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. & Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284, 143-147 (1999).
- Pober, J.S. & Sessa, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Rev. Immunol.* 7, 803-815 (2007).
- Potten, C.S. & Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 110, 1001-1020 (1990).
- Proebstl, D., Voisin, M.-B., Woodfin, A., Whiteford, J., D'Acquisto, F., Jones, G.E., Rowe, D. & Nourshargh, S. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular wall in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 1219-1234 (2012).
- Pusztaszeri, M.P., Seelentag, W. & Bosman, F.T. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 385-395 (2006).

- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E. & Marcacci, M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New Engl.J. Med.* 344, 385-386 (2001).
- Regateiro, F.S., Cobbold, S.P. & Waldmann, H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin. Exp. Immunol.* 71, 1-7 (2012).
- Ribatti, D., Nico, B. & Crivellato, E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 261-268 (2011).
- Rijcken, E., Mennigen, R.B., Schaefer, S.D., Laukoetter, M.G., Anthoni, C., Spiegel, H.-U., Bruewer, M., Senninger, N. & Krieglstein, C.F. PECAM-1 (CD 31) mediates transendothelial leukocyte migration in experimental colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, 446-452 (2007).
- Rovira, M., Scott, S.-G., Liss, A.S., Jensen, J., Thayer, S.P. & Leach, S.D. Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas. *Dev. Biol.* 107, 75-80 (2010).
- Saalbach, A., Aust, G., Haustein, U.F., Herrmann, K. & Anderegg, U. The fibroblast specific AS02: a novel tool of detection and elimination of human fibroblasts. *Cell Tissue Res.* 290, 593-599 (1997).
- Saluja, A.K., Saluja, M., Printz, H., Zaverinik, A., Sengupta, A. & Steer, M.L. Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 8968-8971 (1989).
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D. & Shimizu, H. Mesenchymal stem cells are recruited into wound skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* 180, 2581-2587 (2008).
- Schenk, S., Mal, N., Finan, A., Zhang, M., Kiedrowski, M., Popvic, Z., McCarthy, P.M. & Penn, M.S. Monocyte Chemoattractant Protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells.* 25, 245-251 (2007).
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. & Wesker, K. "Prometheus, LernAtlas der Anatomie, Hals und Innere Organe" Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2005, 1. Auflage.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. & Wesker, K. "Prometheus, LernAtlas der Anatomie: Hals und Innere Organe" Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2005, 1. Auflage.
- Seeberger, K.L., Dufour, J.M., Shapiro, A.M.J., Lakey, J.R., Rajotte, V. & Korbitt, G.S. Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab. Invest.* 86, 141-153 (2006).

- Shih, I.-M. The Role of CD146 (Mel-Cam) in Biology and Pathology. *J. Pathol.* 189, 4-11 (1999).
- Sims, D.E. The Pericyte - A Review. *Tissue Cell.* 18, 153-174 (1986).
- Sims, D.E. Diversity within pericytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 842-846 (2000).
- Sims, D., Horne, M.M., Creighan, M. & Donald, A. Heterogeneity of Pericyte Populations in Equine Skeletal Muscle and Dermal Microvessels: A Quantitative Study. *Anat. Histol. Embryol.* 23, 232-238 (1994).
- Singh, V.P., Saluja, A.K., Bhagat, L., van Acker, G.J.D., Song, A.M., Soltoff, S.P., Cantley, L.C. & Steer, M.L. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* 108, 1387-1394 (2001).
- Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z. & Gabriele, B. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat. Cell Biol.* 7, 870-879 (2005).
- Stallcup, W.B. The NG2 proteoglycan: Past insights and future prospects. *J. Neurocytol.* 31, 423-435 (2001).
- Stark, K., Annkathrin, E., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Brühl, M.-L., Gärtner, F., Khandoga, A.G., Legate, K.R., Pless, R., Hepper, I., Lauber, K., Walzog, B. & Massberg, S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat. Immunol.* 14, 41-51 (2013).
- Thomas, C. "Histopathologie" Schattauer Verlag, Stuttgart, 2006, 14. Auflage.
- Tigges, U., Komatsu, M. & Stallcup, W.B. Adventitial Pericyte Progenitor/Mesenchymal Stem cells participate in the restenotic response to arterial injury. *J. Vasc. Res.* 50, 134-144 (2013).
- Tigges, U., Welser-Alves, J.V., Boroujerdi, A. & Milner, R. A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvasc. Res.* 84, 74-80 (2012).
- Wandel, E., Saalbach, A., Sittig, D., Gebhardt, C. & Aust, G. Thy-1 (CD90) is an interacting partner for CD97 on activated endothelial cells. *J. Immunol.* 188, 1442-1450 (2012).
- Wang, S., Cao, C., Chen, Z., Bankaitis, V., Tzima, E., Sheibani, N. & Burridge, K. Pericytes Regulate Vascular Basement Membrane Remodeling and Govern Neutrophil Extravasation during Inflammation. *PLoS ONE.* 7, 1-21 (2012).

Welsch, U. "Lehrbuch Histologie" Urban&Fischer Verlag für Elsevier, München, 2005, 2. Auflage.

Wen, H.-C., Kao, C., Hsu, R.-C., Huo, Y.-N., Ting, P.-C., Chen, L.-C., Hsu, S.-P., Juan, S.-H. & Lee, W.-S. Thy-1 induced migration inhibition in vascular endothelial cells through reducing the Rho-A activity. *Plos one*. 8, 1-10 (2013).

Wittel, P.D.m.U. (2013) *Internationales Pankreaskarzinomzentrum*, [Online], Available: <http://www.pankreas-karzinom-zentrum.de/bauchspeicheldruese-pankreas/bauchspeicheldruese-pankreas-organ.html> [03 Oktober 2013].

Xu, X., D'Hoker, J., Stangé, G., Bonn , S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Casteele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D., Bouwens, L., Scharfmann, R., Gradwohl, G. & Heimberg, H. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*. 132, 197-207 (2008).

Yanger, K. & Stanger, B.Z. Facultative Stem Cells in Liver and Pancreas: Fact and Fancy. *Dev. Dyn*. 240, 521-529 (2010).

Yanger, K. & Stanger, B.Z. Facultative Stem Cells in Liver and Pancreas: Fact and Fancy. *Dev. Dyn*. 240, 521-529 (2011).

Zhang, Y., Daquinag, A.C., Amaya-Manzanares, F., Sirin, O., Tseng, C. & Kolonin, M.G. Stromal Progenitor Cells from Endogenous Adipose Tissue Contribute to Pericytes and Adipocytes That Populate the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*. 72, 5198-5208 (2012).

Zimmerlin, L., Donnenberg, V.S., Rubin, J.P. & Donnenberg, A.D. Mesenchymal Markers on Human Adipose Stem/Progenitor Cells. *Cytometry A*. 83A, 134-140 (2012).

Zimmermann, K.W. Der feinere Bau der Blutcapillaren. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. 68, 29-109 (1923).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Übersichtsdarstellung der Lage des Pankreas und Pankreas im Situs im Verhältnis zu den Nachbarorganen Duodenum und Milz (Schünke et al., 2005) (S.151 und S. 215)	2
Abbildung 1.2	Histologie des Pankreas (frei nach (Barthels, 2011) a: Lappchen mit Azini, b: Langerhans-Insel, c: Ausführungsgang, d: Bindegewebe, e:Gefäß im periazinären Bindegewebe	3
Abbildung 1.3	Kapilläre Endothelzellen eines Meerschweinchen-Pankreas in elektronenmikroskopischer Aufnahme (Cines et al., 1998) (S. 3531)	5
Abbildung 1.4	Immunfluoreszenz von CD31+ Endothelzellen im Pankreas	5
Abbildung 1.5	Perizyt einer Kapillare (Anatomisches Institut, n.d.)	7
Abbildung 1.6	Perizyt im Muskelgewebe, Gefäßquerschnitt mit erythrozytengefülltem Lumen, P=Perizyt, E= Endothelzelle (Sims, 1986)(S.155)	7
Abbildung 1.7	Morphologie der Perizyten in verschiedenen Lokalisationen (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.194)	8
Abbildung 1.8	Perizyten-Endothelzell-Interaktion (Armulik, Genove and Betsholtz, 2011) (S.194)	9
Abbildung 1.9	Rolle der Perizyten im entzündlichen Gewebe (Alon and Nourshargh, 2013) (S.15)	12
Abbildung 1.10	Mesenchymale Stammzellen in vitro (Kusche, 2011)	13
Abbildung 1.11	Differenzierung von Perizyten und mesenchymalen Stammzellen, modifiziert nach (Nogués and Creane, 2012)	18
Abbildung 2.1	Beispiel Dot Plot	32
Abbildung 2.2	Zellsorter	35
Abbildung 2.3	Magnetisches Sorten (Biotec, 2013)	37
Abbildung 2.4	MidiMacs-Seperator mit Column in MultiStand (Biotec, 2013)	39
Abbildung 2.5	Induktion einer sterilen Pankreatitis in Mäusen mit Caerulein	42
Abbildung 3.1	Immunhistochemische Färbung mit der Darstellung von NG2+ Zellen im murinen Gehirn, Vergrößerung 100x, 200x	43
Abbildung 3.2	Immunhistochemische Färbung mit Darstellung von NG2+ Zellen im murinen Pankreas, Vergrößerung 200x, 400x	44

- Abbildung 3.3 Immunfluoreszenzfärbung von NG2+ Zellen im murinen Pankreas, a)100fach, b)630fach, c)630fach, d)630fach vergrößert. Der Anti-NG2 Antikörper wurde mit einer grünen Fluoreszenz (488 nm) gekoppelt. In blau wurde eine Dapi-Färbung hinzugefügt, welche die Zellkerne sichtbar macht. 45
- Abbildung 3.4 Immunfluoreszenz - Doppelfärbung von NG2+ (488nm, grün) und α SMA+ (594nm, rot), Perizyten im murinen Pankreas, die Zellkerne sind durch Dapi-Färbung dargestellt, Vergrößerung 200x 46
- Abbildung 3.5 Immunfluoreszenzfärbung mit Darstellung von NG2+ und CD31+ Zellen im murinen Pankreas, a)100fach, b)400fach, c)630fach, d)630fach vergrößert, NG2 ist in grün (488nm) , CD31 in rot (594nm), Zellkerne durch Dapi – Färbung blau dargestellt 47
- Abbildung 3.6 Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigt die Expression von CD90 in rot (594nm) auf NG2+ Perizyten in grün (488nm) im murinen Pankreas, Kernfärbung Dapi (blau) 200x,400x, 1000x,1000x 49
- Abbildung 3.7 Expression von CD105+ (rot) auf NG2+ (grün) Perizyten im murinen Pankreas, Kernfärbung Dapi (blau) 200x,400x,1000x 50
- Abbildung 3.8 Expression von Sca-1 (rot) auf NG2+ (grün) Perizyten im murinen Pankreas, Kernfärbung Dapi (blau) 100x, 400x, 1000x Vergrößerung 51
- Abbildung 3.9 Die hier dargestellten Durchflusszytometrie-Bilder zeigen die Messung der ungefärbten Probe aufgetragen nach Größe und Granularität in a) und auf alle verwendeten Fluoreszenzen)-d). Man erkennt in jeder Fluoreszenz kaum positive Signale jenseits von 10^2 52
- Abbildung 3.10 In dieser Abbildung sind die einzeln gefärbten Proben abgebildet. Das erste Bild der Zeile zeigt jeweils die gefärbte Fluoreszenz, die weiteren Bilder zeigen die Signale der nicht in dieser Probe vorhandenen Fluoreszenzen. 52
- Abbildung 3.11 Diese Abbildung zeigt die einzelnen Populationen der untersuchten Zellen dargestellt in einem Pseudocolor-Blot: a) NG2+-pacific blue (2,59%), b) CD90+-PE(2,96%), c) CD105+-PE (1,9%), d) Sca-1+-PE-Cy7 (3,55%). 53

Abbildung 3.12	Durchflusszytometrische Analyse, Doppelexpression von Perizytenmarkern und mesenchymalen Markern auf pankreatischen Zellen, die Ergebnisse sind in Zebra Plots dargestellt. a) zeigt die Expression von NG2+ und CD90+ Zellen, es zeigt sich eine Doppelexpression von etwa 1,34%, b) zeigt die Expression von NG2+ und CD105+ Zellen, hier besteht eine Doppelexpression von ca. 0,84%, c) zeigt die Expression von NG2+ und Sca-1 + Zellen, eine Doppelexpression besteht bei ca. 1,52% der gesamten Zellen	54
Abbildung 3.13	Durchflusszytometrie von murinen Pankreaszellen. Darstellung von a) NG2+CD90+ Zellen im Bezug auf Sca-1+ Zellen und b) NG2+Sca-1+Zellen im Bezug auf CD90+ Zellen	55
Abbildung 3.14	Sort von CD45-CD31-CD146+ Zellen (0,2%)	56
Abbildung 3.15	Gesortete Zellen an a) Tag 0, oben, links CD146+CD31-CD45-(2,6%)-, rechts CD146-CD31-CD45- (7,8%) b) Tag 6, links CD146+, rechts CD146-	57
Abbildung 3.16	AN2+ Zellen nach MACS-Isolation auf Gelatine-überzogenen Well-plates an Tag 3, Tag 10 und Tag 25	58
Abbildung 3.17	AN2- Zellen nach MACS Isolation auf Gelatine überzogenen Well-plates an Tag 3, Tag 10 und Tag 25	59
Abbildung 3.18	Immunfluoreszenz von isolierten AN2+ Zellen, NG2+ Zellen sind in grün (488nm) dargestellt, Kernfärbung mit Dapi	60
Abbildung 3.19	Immunfluoreszenz von isolierten AN2- Zellen, NG2+ Zellen sind in grün (488nm) dargestellt, Kernfärbung mit Dapi	60
Abbildung 3.20	Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, NG2+ in grün (488nm), CD31+ in rot (594nm) und Zellkerne in Dapi (blau)dargestellte Zellen in 100facher Vergrößerung,	61
Abbildung 3.21	Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, αSMA+ in grün (488nm) und CD90+ in rot (594nm) (Pfeile) dargestellte Zellen und Zellkerne in Dapi (blau) in 100facher Vergrößerung	61
Abbildung 3.22	Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, αSMA+ in grün (488nm) und Sca-1+ in rot (594nm) (Pfeile) dargestellte Zellen und Zellkerne in Dapi (blau) in 100facher Vergrößerung	62

- Abbildung 3.23 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, NG2+ in grün (488nm) und CD90+ in rot (594nm) dargestellte Zellen und Zellkerne in Dapi (blau) in 100facher und 200facher Vergrößerung 62
- Abbildung 3.24 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten AN2+ Zellen, NG2+ in grün (488nm) und CD90+ in rot (594nm) dargestellte Zellen und Zellkerne in Dapi (blau) in 400facher Vergrößerung 63
- Abbildung 3.25 HE Färbung von a) murinem Pankreas, 16h post Caerulein-Injektion, b) murinem Pankreas, 42h post Caerulein-Injektion, c) murinem Pankreas, Kontrolle, 16h post NaCl-Injektion, d) murinem Pankreas, Kontrolle, 42h post NaCl-Injektion 64
- Abbildung 3.26 Durchflusszytometrie von murinen Pankreata, welche über zwei Tage mit Caerulein (C) oder NaCl (N) behandelt wurden. Darstellung von NG+-pacific blue(a+b) und CD31+-APC(c+d) Zellen in % ein und zwei Tage post injectionem. Eingelesene Zellen Tag 1 (C):228297, (N):199617, Tag 2 (C):234332, (N)295535 65
- Abbildung 3.27 Durchflusszytometrie von murinen Pankreata, welche zwei Tage lang mit Caerulein (C) oder NaCl (N) behandelt wurden. Darstellung von CD90+-PE (a) und Sca-1+-PE-Cy7 (b) Zellen in % am Tag 1 und 2 post injectionem. Eingelesene Zellen Tag 1 (C):228297, (N):199617, Tag 2 (C):234332, (N)295535. 66
- Abbildung 3.28 Durchflusszytometrie von murinen Pankreata, welche zwei Tage lang mit Caerulein (C) oder NaCl (N) behandelt wurden. Darstellung von CD90+NG2+ (a-d) und Sca-1+NG2+ (e-h) Zellen in % an den Tagen 1 und 2 post injectionem. Eingelesene Zellen Tag 1 (C):228.297, (N):199617, Tag 2 (C):234332, (N)295535. 67
- Abbildung 3.29 Immunfluoreszenz von α SMA+ Zellen in a) unbehandeltem murinen Pankreasgewebe, 200fach vergrößert und b) Tag 1 nach Caerulein-Injektion murinem Pankreasgewebe, 200fach vergrößert 70

-
- Abbildung 3.30 Immunfluoreszenzfärbung von murinen Pankreasgewebe am ersten Tag post Caerulein injectionem. Darstellung von NG2+ Zellen in grün (488nm) und α SMA+ Zellen in rot (594nm), Kernfärbung mit Dapi (blau), 200fache Vergrößerung 70
- Abbildung 3.31 Immunfluoreszenzfärbung von murinem Pankreasgewebe am ersten (a) und zweiten (b) Tag post injectionem, Darstellung von NG2+ Zellen in grün (488nm) in 400facher (a) und 200facher (b) Vergrößerung, Referenz von mit NaCl behandelten Mäusen in c) 200facher und d) 400facher Vergrößerung 71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Perizytenmarker	11
Tabelle 1.2	Mesenchymale Stammzellmarker	15
Tabelle 2.1	Darstellung der Antikörper mit deren gekoppelter Fluoreszenz und deren Emissionsmaximums	34
Tabelle 3.1	Sort Daten, Anzahl der NG2+ und CD146+CD45-CD31- Zellen aus einer Zellsuspension eines murinen Pankreas	55
Tabelle 3.2	Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen, welche Stammzellmarker und Perizytenmarker exprimieren im Bezug auf alle Zellen die Perizytenmarker exprimieren ein und zwei Tage nach Caerulein oder NaCl – Behandlung, erhoben mit Hilfe von Durchflusszytometrie-Daten	68
Tabelle 3.3	Immunfluoreszenzfärbung von NG2+ Zellen in grün (488nm) in murinem Pankreasgewebe, welches aus mit Caerulein oder NaCl behandelten Mäusen stammt. Gezeigt wird in a)+b)+c) das NaCl behandelte Kontrollgewebe und das entzündliche Gewebe am Tag 1 in d)+e)+f) und 2 in g)+h)+i) nach Injektion in 40facher (a,d,g), 100facher (b,e,h) und 200facher (c,f,i) Vergrößerung. Kernfärbung mit Dapi (blau)	69
Tabelle 3.4	Immunfluoreszenz von murinen Pankreasgewebe, Doppelfärbung mit dem Endothelzellmarker CD31 in rot (594nm) und dem Perizytenmarker NG2 in grün (488nm), Kernfärbung mit Dapi (blau). Im Vergleich a) Kontrollgruppe mit NaCl in 200facher Vergrößerung b) erster Tag post injectionem mit Caerulein in 200facher Vergrößerung c+d) zweiter Tag post injectionem mit Caerulein in 100facher und 400facher Vergrößerung	72
Tabelle 3.5	Immunfluoreszenz von murinen Pankreasgewebe am ersten Tag post injectionem mit Caerulein b) in 200facher Vergrößerung und mit NaCl Kontrollgruppe a) in 200facher Vergrößerung. Doppelfärbung mit CD90 in rot (594nm) und NG2 in grün (488nm), Kernfärbung mit Dapi (blau).	73
Tabelle 3.6	Immunfluoreszenzfärbung von murinen Pankreasgewebe in 100facher Vergrößerung am Tag eins nach induzierter Inflammation b) und in einer NaCl Kontrollgruppe a). Darstellung von CD90+ in rot (594 nm)und α SMA+ Zellen in grün (488 nm).	74

Anhang

A1 Durchflusszytometrie: Anteile der Perizyten- und mesenchymale Stammzellemarker im murinen Pankreas in %

Messung in %	NG2+	CD90+	Sca-1+	NG2+CD90+	NG2+Sca-1+
Messung 1	3,37	4,15	4,71	2,11	2,07
Messung 2	2,65	3,06	3,29	1,97	1,48
Messung 3	2,59	2,96	3,55	1,34	1,52
Mittelwert	2,87	3,39	3,85	1,81	1,69
Standardabweichung	0,35	0,54	0,62	0,33	0,27

A2 Durchflusszytometrie: Anteile der Perizyten- und mesenchymale Stammzellemarker in der Pankreatitis in %

	NG2+	CD31	CD90+	Sca-1+	NG2+ CD90+	NG2+ Sca-1+	NG2+CD90+ /NG2+	NG2+Sca-1+ /NG2+
Tag1	19,30	5,71	14,00	14,70	7,70	6,53	0,34	0,37
Tag2	13,90	1,93	13,90	14,00	6,80	5,63	0,51	0,47
Kontrolle Mittelwert	2,87	1,79	3,39	3,85	1,81	1,69	0,63	0,59
Kontrolle Standard- abweichung	0,35	0,14	0,54	0,62	0,33	0,27	0,09	0,02
Obergrenze 99,7% Intervall	3,93	2,21	5,01	5,70	2,81	2,50	0,91	0,65
Untergrenze 99,7% Intervall	1,81	1,37	1,77	2,00	0,80	0,88	0,35	0,52

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Jörg Kleeff und PD Christoph Michalski, welche mir die Möglichkeit gaben mich mit diesem spannenden Thema auseinandersetzen zu dürfen. Sie waren jederzeit ansprechbar, haben kritisch hinterfragt, ihren Enthusiasmus die wissenschaftliche Forschung betreffend auf mich überspringen lassen und haben mir zudem jede Freiheit der eigenen Gestaltung der Arbeit gelassen.

Eine außerordentliche Stütze und Motivation war meine Betreuerin Dr. rer. Nat. Susanne Raulefs, die mich immer wieder aufbaute, auf Fragen und Zweifel meinerseits ein ging und mich gleichzeitig alle meine Ideen umsetzen ließ. Dafür möchte ich ihr ganz besonders danken.

Genauso wichtig waren jedoch alle Mitarbeiter und Mitdoktoranden der AG Kleeff und AG Erkan, die immer ein aufmunterndes Wort oder methodische Hilfestellung parat hatten. Besonders möchte ich Nadja Märitz und Ivonne Regel danken, welche stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatten.

Für die Möglichkeit den Sorter sowie die Durchflusszytometer ihres Labors zu nutzen bedanke ich mich sehr bei den Kollegen Dr. Mathias Schiemann und Lynette Henkel vom Mikrobiologischen Institut der TU München.

Herausragende Hilfsbereitschaft wurde mir von Mihaela Crisan, einer Wissenschaftlerin, die sich ebenfalls intensiv mit perizytären Zellen befasst hat, entgegen gebracht. Ohne sie wäre ich an vielen Stellen dieses Projektes sicher nicht weitergekommen.

Mein Durchhaltevermögen verdanke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mir immer gezeigt haben, dass nahezu alles möglich sein kann, wenn man nicht aufgibt. Dafür, dass sie mir die Möglichkeit geben meine Ziele zu verfolgen, bin ich sehr dankbar.

Doch am meisten hat sicherlich mein Freund, Dennis Atabay, mit mir gelitten und alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit aufgefangen. Ohne seinen festen Glauben an mich hätte ich diese Arbeit vielleicht nie beendet.