

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Abteilung für Gastroenterologie

Charakterisierung von zwei pankreatischen Stellate-Zelllinien der Ratte

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Carsten Wilhelm Behrendt, geb. am 25.05.1977 in Pasewalk
aus Schwerin

eingereicht am 02.09.2008

verteidigt am 28.10.2009

Dekan: Prof. Dr.med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Emmrich, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ernst Klar, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk, Universität Magdeburg

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. J. Emmrich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, sowie für die intensive Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Frau Dr. G. Sparmann für die umfassende und kontinuierliche Beratung bei den experimentellen Arbeiten.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des experimentellen Forschungslabor der Gastroenterologie.

Besonderer Dank gilt meiner Ehefrau Inga, meinen Eltern sowie meinem Bruder Rüdiger, die durch ihre stetige und umfassende Unterstützung entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einführung | 5 |
| 1.1 | Zielsetzung der Arbeit | 5 |
| 1.2 | Historische Betrachtungen | 6 |
| 1.3 | Die chronische Pankreatitis | 7 |
| 1.3.1 | Definition | 7 |
| 1.3.2 | Klassifikation akuter und chronischer Pankreatitiden | 7 |
| 1.3.3 | Diagnostik | 8 |
| 1.3.4 | Verlauf und Prognose chronischer Pankreatitiden | 11 |
| 1.3.5 | Therapeutische Ansätze | 12 |
| 1.4 | Pathogenese der chronischen Pankreatitis | 14 |
| 1.4.1 | Die alkoholinduzierte chronische Pankreatitis | 14 |
| 1.4.2 | Pathophysiologie der alkoholinduzierten chronischen Pankreatitis | 15 |
| 1.4.3 | weitere Ursachen der chronischen Pankreatitis | 16 |
| 1.5 | Pankreatische Stellate-Zellen | 18 |
| 1.6 | Etablierung von Zelllinien | 18 |
| 1.6.1 | Vorteile | 18 |
| 1.1.1 | Probleme | 19 |
| 2 | Material und Methoden | 20 |
| 2.1 | Verwendete Materialien | 20 |
| 2.2 | Versuchstiere | 23 |
| 2.3 | Zellkulturen | 23 |
| 2.3.1 | Zellbiologische Verfahren | 24 |
| 2.3.2 | Gewinnung und Immortalisierung von Stellate-Zellen | 25 |
| 2.4 | Immunfluoreszenzfärbung | 25 |
| 2.5 | Proliferationsmessungen | 26 |
| 2.6 | Quantitativer Zytokinnachweis | 27 |
| 2.7 | Statistische Auswertung | 28 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3 | Ergebnisse | 29 |
| 3.1 | Nachweis von Stellate-Zellmarkern in der Immunfluoreszenz | 29 |
| 3.1.1 | Vimentin | 29 |
| 3.1.2 | α -SMA | 29 |
| 3.1.3 | Desmin | 30 |
| 3.1.4 | GFAP | 30 |
| 3.2 | Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Proliferation | 34 |
| 3.2.1 | PDGF | 34 |
| 3.2.1.1 | PDGF-Antikörper (BB) unter PDGF-Stimulation | 35 |
| 3.2.1.2 | PDGF-Antikörper (BB) ohne PDGF-Stimulation | 36 |
| 3.2.2 | bFGF | 36 |
| 3.3 | Einfluss von Retinoiden auf die Proliferation | 38 |
| 3.3.1 | Retinol | 38 |
| 3.3.2 | All-trans Retinoat | 40 |
| 3.3.3 | 9-cis Retinoat | 41 |
| 3.4 | Zytokinnachweise | 42 |
| 3.5 | Expression von TGF- β 1 | 42 |
| 3.6 | Expression von IL-1 β | 43 |
| 3.7 | Expression von IL-6 | 44 |
| | | |
| 4 | Diskussion | 45 |
| 4.1 | Physiologie der Stellate-Zellen | 45 |
| 4.2 | SV-40 Large-T-Antigen Infektion | 46 |
| 4.3 | Immunfluoreszenzmarkierung | 47 |
| 4.4 | Einfluss von Mediatoren auf die Proliferation | 49 |
| 4.4.1 | Beeinflussung der Proliferation durch PDGF und bFGF | 49 |
| 4.4.2 | Beeinflussung der Proliferation durch Retinol, all-trans Retinoat und 9-cis Retinol | 51 |
| 4.5 | Zytokinexpression | 54 |
| 4.6 | Etablierung pankreatischer Stellate-Zelllinien | 57 |
| | | |
| 5 | Zusammenfassung und Thesen | 59 |

| | | |
|----------|------------------------------|-----------|
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 64 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 66 |
| 8 | Anlagen | 75 |
| 8.1 | Selbständigkeitserklärung | |
| 8.2 | Lebenslauf | |

1. Einführung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Der chronischen Pankreatitis (cP) liegt eine Entzündungsreaktion im Pankreas zugrunde, die zur Destruktion des Parenchyms und zur Fibrose des Organs führt. Die Folgen sind sowohl eine exokrine als auch eine endokrine Insuffizienz.

Da die für das Krankheitsbild typische Fibrose wesentlich den Verlauf und die Komplikationen der cP bestimmt, stehen Untersuchungen zu den molekularen und zellbiologischen Mechanismen der Fibrogenese im Mittelpunkt des Interesses.

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass die pankreatischen Stellate-Zellen (PSZ) als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix eine Schlüsselstellung bei der Entwicklung der Fibrose einnehmen. Die Beeinflussung dieser spezialisierten Fibroblastenpopulation im Pankreas bildet daher die Grundlage für die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung der Fibrose und damit auch der cP.

Untersuchungen an humanen pankreatischen Stellate-Zellen sind wegen des begrenzt zur Verfügung stehenden Materials nur in eingeschränktem Maße möglich. Daher muss auf tierexperimentelle Untersuchungen zurückgegriffen werden. Primäre Stellate-Zellen der Ratte können zwar wiederholt gewonnen werden, sind dann aber hinsichtlich Reinheit, Qualität und einzelner Eigenschaften heterogen. Daher ist es sinnvoll, zunächst Untersuchungen an immortalisierten Zellen durchzuführen und die Ergebnisse dann an primären Zellen zu bestätigen. Ausgehend von diesen Erwägungen wurden im gastroenterologischen Forschungslabor der Universität Rostock zwei immortalisierte pankreatische Stellate-Zelllinien der Lewis-Ratte etabliert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, diese zwei Zelllinien zu charakterisieren und mit primären Stellate-Zellen in Hinblick auf Markerexpression, Wachstumseigenschaften und der Sensitivität gegenüber Mediatoren zu vergleichen. Im Ergebnis der Arbeit kann formuliert werden, ob beide Zelllinien künftig als Modell für Untersuchungen an Stellate-Zellen dienen können. Außerdem werden die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich der Etablierung immortalisierter Stellate-Zelllinien dargestellt und diskutiert.

1.2. Historische Betrachtungen

Bereits in der frühen Menschheitsgeschichte ist das Pankreas als eigenständiges Organ erkannt worden. Als solches beschrieben wurde der so genannte „Finger der Leber“ (derart im babylonischen Talmud von Priestern benannt) erstmals von den Griechen ¹.

Mediziner des Altertums wie Hippokrates, Herophilos, Erasistratos und Galen beschäftigten sich zwar mit diesem Organ, konnten ihm aber noch keine Funktion zuordnen. Schließlich prägte Rufus von Ephesos (ca. 100 v. Chr.) den heutigen Namen „Pankreas“ (griechisch *Pan* = alles und *kreas* = Fleisch) ².

Erst nachdem 1642 der große Pankreasgang (*Ductus pancreaticus major*) beschrieben worden war, gewann das Organ wieder an Bedeutung in der Medizin. Wissenschaftler wie F. Sylvius, R. de Graaf von Delft, J.C. Brunner und J. Bohn beschrieben Mitte bis Ende des 18. Jahrhunderts an Hunden den funktionellen Zusammenhang des Pankreas mit der Verdauung. ³

T. Crawley postulierte 1788 erstmals eine Verbindung zwischen pankreatischer und diabetischer Erkrankung ⁴. Zwölf Jahre später führte die drüsenartige Struktur des Organs S. Sommering zur Bezeichnung „Bauchspeicheldrüse“. Anfang des 19. Jahrhunderts wurden die ersten Enzyme, Trypsin und Lipase, im pankreatischen Sekret entdeckt. C. Bernard vereinigte 1856 in Paris die bisherigen Konzepte von J. N. Eberle (1834) und G.G. Valentin (1844). Dabei zeigte er die Emulgierung fettiger Speisen, die Spaltung in Glycerin und Fettsäuren, die Umwandlung von Stärke in Zucker und eine proteolytische Wirkung durch den Pankreassaft.

Die Forschung nahm einen schnelleren Verlauf, als F. Witte 1873 in Rostock Pepsin als Präparat auf den Markt brachte. Weiterhin beschrieb T. Langhans 1869 die Unterschiede zwischen exokrinem und endokrinem Pankreas, während W. Kühne 1882 über die Inselzellen als Gruppierung von stark durchblutetem Gewebe innerhalb des Pankreas berichtete. Bahnbrechende Ergebnisse erzielte I. P. Pawlow Anfang des 20. Jahrhunderts mit seinem berühmten Hunderversuch, bei dem er die externe Regulation der Pankreassekretion und die Enterokinase entdeckte. L. Dolinski beschrieb erstmals die duodenal stimulierte Sekretion. Darüber hinaus entwickelten W. M. Bayliss und E. H. Starling das Konzept der hormonalen Steuerung des Organs ⁵.

Recht spät wurden dem Organ auch Krankheitsbilder zugeordnet. Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben N. Friedreich und H. Claessen einen Zusammenhang zwischen der Pankreatitis und der Alkoholaufnahme. Im Jahre 1889 definierte R. Fitz die Symptome der Pankreatitis und kategorisierte sie in gangränöse, hämorrhagische und eitrige Verläufe. Es folgte die

Beschreibung E. L. Opies, der 1901 erstmals die Auslösung einer akuten Pankreatitis durch einen Gallenstein in der Papilla Vateri beobachtete.⁶

H. Chiari stellte 1896 die Hypothese auf, dass die Pankreatitis Folge einer Selbstverdauung des Organs ist⁷.

1.3 Die chronische Pankreatitis

1.3.1 Definition

Die chronische Pankreatitis ist eine persistierende oder intermittierende Entzündungsreaktion verbunden mit der Destruktion des Parenchyms und der Entwicklung einer ausgedehnten Organfibrose⁸.

Die Inzidenz (Zeitraum 1988-95) einer cP liegt in Deutschland bei 6,4/100 000 Einwohnern pro Jahr. Beachtenswert ist hierbei, dass die Häufigkeit in den Industrienationen in den letzten fünfzig Jahren zugenommen hat⁹.

Klinisch ist die cP durch abdominale Schmerzen im mittleren Oberbauch gekennzeichnet. In fünf bis zehn Prozent der Fälle verläuft sie jedoch schmerzlos. Als Ausdruck der exokrinen Insuffizienz kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Steatorrhoe. Die Beeinträchtigung des endokrinen Pankreas mit der Klinik eines pankreopriven Diabetes mellitus ist im Allgemeinen eine relativ späte Komplikation der Erkrankung⁹.

1.3.2 Klassifikationen akuter und chronischer Pankreatitiden

In den letzten Jahrzehnten wurde versucht, die Einteilung der Pankreatitiden zu vereinheitlichen und zu präzisieren, woraus folgende Formulierungen resultierten.

Cambridge Klassifikation (1984):

Hier wurde zwischen chronischer und akuter Pankreatitis unterschieden. Die akute Pankreatitis könne rezidivierend auftreten. Ein Übergang in eine chronische Pankreatitis sei nach Anzahl der Rezidive und deren organischer Veränderung nicht klar definiert¹⁰.

Es wurde eine Unterteilung in vier Schweregrade der chronischen Pankreatitis vorgenommen:

- Grad I: 3 oder weniger Seitenäste des Pankreas sind durch die Erkrankung betroffen, der Hauptgang stellt sich normal dar
- Grad II: mehr als 3 Seitengänge sind betroffen, bei normalem Hauptgang
- Grad III: zusätzlich zu Grad II tritt eine Stenose oder Dilatation des Hauptganges auf
- Grad IV: zusätzlich zu Grad III sind Obstruktionen, Zysten und Verkalkungen im Pankreas nachzuweisen

Marseille-Rom Klassifikation (1984):

Hier herrschte ein Konsens darüber, dass die morphologischen Schäden einer akuten Pankreatitis reversibel sind. Es wurde eine Einigung darüber erzielt, dass eine akute Pankreatitis in eine chronische übergehen kann, wenn Nekrosen den Hauptgang einbeziehen, und sich eine Stenose entwickelt, die zu weiteren Nekrosen führt.

Die Pankreatitis wurde unterschieden in eine akute, eine chronische und eine chronisch-obstruktive Form, wobei die chronische Form zusätzlich nach dem Vorhandensein von Fibrosen, Nekrosen und Calculi spezifiziert wird.

Atlanta Klassifikation (1992):

In Atlanta wurde die Klassifikation von Marseille um eine Differenzierung der akuten Pankreatitis erweitert. Diese wurde zusätzlich spezifiziert in eine milde und eine schwere Verlaufsform, mit oder ohne Vorhandensein einer Infektion.

1.3.3 Diagnostik

In den ersten Jahren des Krankheitsverlaufes kann die Diagnose durch uncharakteristische Symptome erschwert werden. Generell steht die Schmerzsymptomatik im Vordergrund. In der Regel wird die Diagnose während eines akuten Schubes einer Pankreatitis gestellt.

Labordiagnostik: Die Labordiagnostik spielt eine untergeordnete Rolle und ist nur für den Nachweis eines akuten Schubes und seines Verlaufes sinnvoll. Im Labor sind Serumveränderungen nachweisbar, die der akuten Pankreatitis gleichen. Dabei ist eine Erhöhung der Serumlipase und der α -amylase sowie des CRP zu beobachten. Bei fortschreitender Atrophie des Pankreas und Ersatz des Parenchyms durch Bindegewebe fehlt das Gewebe für schwere, nekrotisierend verlaufende Schübe. Dementsprechend werden nur geringe oder keine Erhöhungen der Pankreasenzyme im Serum beobachtet.¹¹

Bei Behinderung des Galleabflusses lässt sich im Serum eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase, der γ -GT und des Bilirubins als Ausdruck der Cholestase nachweisen.

Die mäßige Erhöhung des Serumwertes des Tumormarkers CA 19-9 erlaubt keine sichere Differentialdiagnose zwischen Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis.

Im weiteren Verlauf der chronischen Pankreatitis erkranken die Patienten an einem Diabetes mellitus mit den typischen Zeichen.

Funktionsdiagnostik: Hier werden indirekte von direkten Funktionstests unterschieden. Der sicherste direkte Test der Pankreasinsuffizienz ist der Sekretin-Cholezystokinin-Test. Unter radiologischer Kontrolle wird eine Sonde im Duodenum platziert und das Pankreassekret nach intravenöser Stimulation mit synthetischem Sekretin und dem Cholezystokininanalogen Ceruletid abgesaugt. Der Test ist kostenintensiv und belastet den Patienten. Er ist nur in einzelnen Zentren verfügbar.

Ein weiterer direkter Test ist die Bestimmung der Fettausscheidung. Dieser Test setzt eine bilanzierte Fettzufuhr und eine Stuhlfettbestimmung voraus, die nur noch in wenigen Laboratorien erfolgt. Aus diesem Grund werden vorwiegend indirekte Funktionstests angewendet.

Im Wesentlichen handelt es sich dabei um die Bestimmung der Elastase im Stuhl und den Pankreolauryl-Test (der kinetische Chymotrypsintest ist nicht mehr erhältlich). Die Verfahren sind zwar bei fortgeschrittener Erkrankung recht zuverlässig, die Erkrankung ist jedoch dann meist aufgrund der klinischen Befunde so offensichtlich, dass sich ein Funktionstest erübrigt. Die Wertigkeit des Testverfahrens ist bei milder bis mäßiger cP umstritten. Die Daten einer publizierten Metaanalyse bestätigen den geringen Voraussagewert¹².

Morphologische Diagnostik: Das Standardverfahren bei Verdacht auf eine cP ist die transabdominelle Sonographie, da sie einfach durchzuführen, überall einsetzbar und nicht invasiv ist. Dabei hängt die Aussagekraft der Untersuchung in erster Linie von der Erfahrung des Untersuchers ab. Sichere Zeichen der cP sind Verkalkungen, Kaliberschwankungen im Gangsystem und Pseudozysten. Komplikationen der Pankreatitis, wie Gallengangsobstruktionen, Duodenalobstruktionen und obstruierende Konkremente, können dargestellt werden.

Vorteilhaft ist bei der Computertomographie (CT) die übersichtliche Darstellung des Organs. Initialstadien sind allerdings schwieriger nachzuweisen, so dass in der Frühphase häufig ein normaler CT-Befund vorliegt¹³.

Der Goldstandard zum Nachweis einer chronischen Pankreatitis ist die Darstellung des Pankreasgangs mittels der endoskopisch retrograden Pankreatikographie (ERP). Hiermit lässt

sich über den Nachweis von Gangveränderungen sowohl die Diagnose stellen, als auch der Schweregrad anhand der Cambridge-Klassifikation bestimmen¹⁰. Die ERP ist essentiell hinsichtlich der Entscheidung, ob es bei Patienten mit chronischer Pankreatitis eine interventionelle Therapiemöglichkeit gibt, wie z.B. das Stenting von Pankreasgängen oder die Drainage von Zysten.

Bezüglich der schwierigen Differentialdiagnose zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom bietet die Kernspintomographie (MRT) Zusatzinformationen. Mit diesem Verfahren gelingt eine nicht-invasive Darstellung der Gallenwege und der Pankreasgänge.

Vorteile der Magnetresonananz-Cholangio-Pankreatikographie (MRCP) gegenüber der ERCP sind die Darstellung schwieriger Verhältnisse im Pankreas ohne das ERCP-assoziierte Pankreatitisrisiko. Außerdem lassen sich die Gangverhältnisse bei technisch nicht intubierbarer Papille abbilden. Die milde chronische Pankreatitis mit geringen Gangveränderungen wird durch die MRCP (im Gegensatz zur ERCP) jedoch nur unzureichend dargestellt.

Als sensitivste Methode zum Nachweis einer chronischen Pankreatitis wird die Endosonographie angesehen. Die Zeichen der Erkrankung sind echoarme oder echoreiche Läsionen, die Verstärkung der Lobulierung, Veränderungen der Gangechogenität sowie Verengung oder Dilatation des Hauptganges und der Seitenäste¹⁴. Während die Sensitivität der Endosonographie sehr hoch ist, sind bezüglich der Spezifität bei frühen Stadien jedoch Zweifel angebracht. Man geht davon aus, dass die häufig beschriebenen Echoinhomogenitäten und Lobulierungen nur wenig spezifisch für eine chronische Pankreatitis sind. Allerdings wurde kürzlich eine Follow-up-Studie publiziert, in der Patienten mit initial normaler ERP und pathologischen Befunden im endoskopischen Ultraschall untersucht wurden. Nach 18 Monaten zeigte sich, dass nun bei zwei Drittel der Patienten ein pathologischer Befund in der ERP zu finden war¹⁵.

Invasive Verfahren: Liegt seitens der Bildgebung ein tumorverdächtiger Befund im Pankreas vor, der eine Operation erlaubt, so ist diese auch ohne Sonographie- oder CT-gesteuerte Feinnadelbiopsie indiziert. Bei inoperablem Tumorbefund wird biopsiert, um vor der Chemotherapie eine Sicherung der Diagnose zu erreichen.

Die Diagnose einer cP kann aufgrund von Pankreasverkalkungen bzw. von Komplikationen der Erkrankung (größere Pseudozysten, Gallengangobstruktionen oder Duodenalstenose) gestellt werden. Hat der Patient keinen akuten Schub der Erkrankung, ist zu diesem Zeitpunkt keine weitere Diagnostik erforderlich.

1.3.4. Verlauf und Prognose chronischer Pankreatitiden

Eine der wichtigsten prognosebestimmenden Faktoren ist die Ätiologie der cP. Während die Prognose hinsichtlich der Lebenserwartung bei idiopathischer cP nur unwesentlich gegenüber der Normalpopulation vermindert ist, weisen Patienten mit alkoholischer cP im Mittel eine signifikante Verkürzung ihrer Lebenserwartung um mehr als acht Jahre auf, vor allem, wenn der ursächliche Alkoholabusus weiter betrieben wird¹⁶. Allerdings verstirbt nur eine Minderheit der Patienten mit chronischer Pankreatitis direkt an der Erkrankung beziehungsweise an unmittelbaren Komplikationen. Weit häufiger sind für den Tod Gefäßerkrankungen oder Malignome infolge des meist ebenfalls bestehenden Nikotinabusus verantwortlich. Neben Karzinomen des Respirationstrakts treten auch Pankreaskarzinome gehäuft auf, insbesondere bei Patienten mit hereditärer chronischer Pankreatitis¹⁷⁻¹⁹.

Auch die Wahrscheinlichkeit und der Zeitpunkt des Auftretens von Komplikationen werden von der Ätiologie stark beeinflusst. So treten Verkalkungen, exokrine Insuffizienz, Diabetes mellitus und lokale Komplikationen wie Pankreaspseudozysten und pankreatische Infektionen bei Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis signifikant häufiger und früher auf als bei Patienten mit idiopathischen Pankreatitisformen¹⁶.

Eine unklare prognostische Frage ist die Entwicklung der Schmerzsymptomatik. Persistierende progrediente Schmerzen können auf eine lokale Komplikation hinweisen, deren Beseitigung meist zu Schmerzfreiheit führt²⁰. Demgegenüber ist umstritten, ob chronische Schmerzen ohne ursächliche Komplikation durch den fortschreitenden Funktionsverlust („Ausbrennen“) der Drüse innerhalb einer Dekade allmählich verschwinden^{20, 21} oder ob vielmehr zumindest ein Teil der Patienten mit einem persistierenden Schmerzsyndrom rechnen muss^{16, 22, 23}. Hier sind multizentrische Studien mit einheitlichen Protokollen erforderlich. Da sich jedoch der Schmerzverlauf entscheidend durch einen fortgesetzten Alkoholkonsum nach Diagnosestellung verschlechtert²⁴, erscheint Alkoholabstinenz eines der wichtigsten Therapieziele bei der Führung von Patienten mit chronischer Pankreatitis.

1.3.5 Therapeutische Ansätze

Die Therapie der chronischen Pankreatitis orientiert sich an drei Zielsetzungen: Behandlung der exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz sowie der Schmerzbekämpfung. Bei der schmerzlos verlaufenden chronischen Pankreatitis kommt es naturgemäß nur auf die Behandlung der exokrinen und endokrinen Funktionsstörung an.

Pankreasenzyme sind bei pankreatogener Steatorrhö (in der Regel $>7\text{g/d}$ Fettsäureausscheidung) und Gewichtsverlust indiziert. Die Enzympräparate sind häufig aus Schweinepankreas herzustellen. Die Dosierungen sind dabei individuell festzulegen.

Bei chronischer Pankreatitis liegt häufig ein pankreopriver Diabetes mellitus vor. Das Besondere dieser Diabetesform ist, dass nicht nur die Insulinproduktion, sondern auch die Gegenregulation durch Glukagon gestört ist²⁵. Wegen der metabolischen Problematik ist eine sehr viel höhere Toleranz hinsichtlich des HbA1c-Wertes angebracht. Eine intensiviertere Insulintherapie ist möglich. Spätkomplikationen der Diabetes werden von diesen Patienten in der Regel nicht erlebt.²⁶

Generell sollte durch bildgebende Verfahren, einschließlich MRCP bzw. ERCP geklärt werden, ob eine morphologische Veränderung im Pankreas für die Schmerzsymptomatik verantwortlich ist, die interventionell oder operativ behandelt werden kann. Neben antipyretischen und/oder Opioid-Analgetika kann eine gewisse Schmerzlinderung durch diätetische Maßnahmen erzielt werden. Hierzu gehört die Einnahme häufiger kleiner Mahlzeiten und das Meiden von Nahrungsmitteln, die auch für gesunde Menschen oft unverträglich sind (zum Beispiel Hülsenfrüchte). Zudem ist ein striktes Alkoholverbot einzuhalten, denn eine konsequente Alkoholabstinenz soll bei 50 Prozent der Erkrankten zu einer Minderung der Schmerzen führen²⁷. Zur Beeinflussung der Schmerzsymptomatik wurde wiederholt die orale Gabe von Pankreasenzympräparaten empfohlen, auch wenn noch keine Steatorrhoe vorliegt²⁸, um über einen hypothetischen negativen Rückkopplungsmechanismus (Feedback) eine Sekretionshemmung und dadurch eine Schmerzlinderung zu bewirken. Allerdings haben spätere Untersuchungen keine Anhaltspunkte dieser Art ergeben²⁹.

Der Stellenwert der so genannten interventionellen Therapieverfahren ist derzeit noch nicht abschließend gesichert. Unkontrollierte Studien lassen vermuten, dass die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie (ESWL) von Pankreasgangsteinen zumindest bei einer Untergruppe von Patienten für mehrere Monate die Schmerzsymptomatik günstig beeinflussen kann³⁰, obwohl eine andere Arbeitsgruppe diesen Effekt nicht reproduzieren konnte³¹.

Schmerzen infolge isolierter, kurzstreckiger Gangstenosen im Pankreaskopfbereich mit prästenotischer Dilatation sprechen mitunter gut auf Überbrückung mit einem endoskopisch platzierten Stent an ³², der allerdings selbst Pankreasgangveränderungen auslösen kann ²⁷. Zur Vermeidung einer Stentokklusion mit der Gefahr der Auslösung eines entzündlichen Schubs oder einer Infektion sind Endoprothesen in programmierten Intervallen (circa alle zwei Monate) zu wechseln.

In ausgewählten Einzelfällen, vor allem bei schwersten refraktären Schmerzen und fehlender Möglichkeit einer chirurgischen Therapie, kommen eine Ganglion-Zöliakum-Blockade oder eine Periduralanästhesie in Betracht.

Generell gelten für alle interventionellen Ansätze grundsätzliche Einschränkungen ³³. Zu keinem der Verfahren liegen mehrere valide prospektive, kontrollierte Studien vor. Der Therapieerfolg ist generell unsicher und die Prädiktoren eines möglichen Ansprechens sind ungewiss. Die Besserung ist meist nur vorübergehend und kann von einer Änderung im Rahmen des natürlichen Verlaufs nur schlecht abgegrenzt werden. Darüber hinaus besteht die Gefahr von Komplikationen oder eines übersehenen Malignoms. Vor diesem Hintergrund sollten diese Verfahren derzeit grundsätzlich im Rahmen einer Studie oder allenfalls eines interdisziplinären, einen erfahrenen Pankreaschirurgen einschließenden, therapeutischen Gesamtkonzepts eingesetzt werden.

Sollte sich die Schmerzsymptomatik unter konservativen Maßnahmen nicht bessern oder eine ERCP Gangveränderungen erkennen lassen, die den Schmerzen zuzuordnen und einer operativen Korrektur zugänglich sind, so sollte die Operationsindikation möglichst frühzeitig gestellt werden, um eine Analgetikaabhängigkeit zu vermeiden. Eine Operation ist auch bei folgenden Komplikationen einer chronischen Pankreatitis indiziert: Choledochusstenose, Aszites, Pleuraerguss, segmentale portale Hypertension, Kolonstenose und Pseudozysten. Grundsätzlich stehen drei verschiedene Operationsverfahren zur Verfügung. Die Drainageoperation (Pankreatikojejunostomie) ist bei erweitertem Pankreasgang indiziert und aussichtsreich. Als weitere Operationsmöglichkeit ist die Rechtsresektion (klassische Whipple-Operation oder Duodenum-erhaltende Pankreaskopfresektion) anzuführen. Diese wird bei Pankreaspseudozysten und/oder -gangveränderungen, vor allem im Kopfbereich des Organs, durchgeführt. Ein drittes Operationsverfahren stellt die ausgedehnte Linksresektion dar. Diese führt jedoch häufig zu der Manifestation eines Diabetes mellitus. Eine Linksresektion wird auch in den Fällen diskutiert, in denen heftigste Schmerzen ohne sichtbare, operativ zu beseitigende Gangveränderungen auftreten und die Gefahr einer Medikamentenabhängigkeit besteht ³⁴.

Schließlich ist bei jedem Karzinomverdacht die chirurgische Exploration und eine Resektion indiziert, wenn noch keine Metastasen vorhanden sind.

Zusammenfassend stehen bei der chronischen Pankreatitis bis heute nur die Schmerzbekämpfung und die Behandlung der Komplikationen als symptomatische therapeutische Maßnahmen zur Verfügung.

1.4 Pathogenese der chronischen Pankreatitis

Etwa 70-80% der Patienten mit cP weisen einen chronischen Alkoholkonsum auf. Demgegenüber stehen etwa 20 % der Fälle, die keine ursächlichen Rückschlüsse zulassen. Zum geringen Teil lassen sich anatomische Varianten (Pankreas divisum), metabolische Veränderungen (Hypertriglyzeridämie, Hyperparathyreoidismus) oder immunologische Reaktionen (Autoimmunpankreatitis) als Ursache der cP nachweisen.

Bei etwa 3-4 % der Patienten findet man eine familiär gehäufte Erkrankung und bei weniger als 1% ein autosomal dominant vererbtes Krankheitsbild³⁵.

1.4.1 Die alkoholinduzierte chronische Pankreatitis:

Das Risiko, eine cP durch Alkoholabusus zu entwickeln, steigt mit der Zeitdauer und Menge des Alkoholkonsums. Es scheint aber keine Schwellendosis zu existieren³⁶⁻³⁸. Allerdings erkranken nur etwa 2-3% aller Personen mit übermäßigem Alkoholgenuss (>60-80 g/d, länger als 5 Jahre) an einer chronischen Pankreatitis^{39,40}.

Der Alkoholkonsum steigert die Wahrscheinlichkeit für die Pankreaserkrankung um den Faktor 3-4⁴¹. Dies bedeutet, dass der Alkoholismus zwar ein häufiger, aber ein insgesamt schwacher Risikofaktor für die Manifestation einer chronischen Pankreatitis ist. Wahrscheinlich ist das Vorhandensein protektiver, genetischer Faktoren, welche die Manifestation einer chronischen Pankreatitis bei über 95% der Alkoholiker verhindert.⁴²

1.4.2 Pathophysiologie der alkoholinduzierten chronischen Pankreatitis

Die molekular- und zellbiologischen pathogenetischen Mechanismen der alkoholinduzierten chronischen Pankreatitis sind noch weitgehend umstritten. Im folgenden Abschnitt sollen dazu vier wichtige Hypothesen angeführt werden:

Gangobstruktion durch Lithiasis:

Nach Sarles ²⁷ ist die alkoholinduzierte cP eine klassische Lithiasis. Chronischer Alkoholkonsum führe in der Pankreasazinuszelle zu einer verminderten Synthese eines oder mehrerer Proteine, welche zusammen mit den Digestionsenzymen sezerniert werden, die Lithostatine. Diese Proteine halten das metastabile Pankreassekret in Lösung und verhindern die Kalziumpräzipitatbildung. Bei Reduktion dieser Proteine im Pankreassekret komme es zu Proteinpräzipitaten, die verkalken und die Gänge verstopfen. Die Folgen davon sind die Druckatrophie des vorgeschalteten exokrinen Gewebes und schließlich die Abtötung der absterbenden Zellen durch Zellen des Immunsystems. An Veränderungen der Quantität und Qualität des Pankreassekrets bei cP besteht kein Zweifel. Es kommt zu einer verminderten Bikarbonatsekretion und zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration im Sekret. Derzeit existiert noch keine kausale Therapiemöglichkeit, um die Präzipitatbildung zu verhindern oder die Präzipitate wieder aufzulösen ²⁷. Kritiker führen an, dass Proteinpräzipitate nicht bei jeder cP und auch nicht in den frühen Stadien gefunden werden ⁴³.

Toxisch-metabolische Theorie:

Nach Bordalo führt der Alkohol zu einer fettigen Degeneration der Azini durch eine direkte Schädigung des zellulären Metabolismus ⁴⁴. Dabei bewirkt der Alkohol eine Akkumulation der zytoplasmatischen Fettsäureethylester, welche durch den pankreatischen Ethanolmetabolismus entstehen. Es konnte bisher jedoch noch nicht gezeigt werden, dass die „Steatopankreatitis“ eine unbedingte Vorstufe der Fibrose darstellt ⁴⁵.

Theorie des oxidativen Stresses:

Nach Braganza ist die Leber durch die Doppelbelastung Alkohol und Industrieabgase nicht in der Lage, freie Radikale vollkommen abzubauen. Es kommt zu einer Überlastung der hepatischen Oxidasen. Freie Radikale führen zu einer Entzündungsreaktion mit Gewebeschädigung ⁴⁶. Dabei würden die freien Radikale mit Hilfe des Gallensekretes durch den duodeno-pankreatischen Reflux ins Pankreas transportiert ⁴⁷. Diese Radikale schädigen

die Zellmembranen mit der Folge von Mastzelldegranulation, Plättchenaggregation und Entzündungsreaktion⁴⁸. Braganza schlussfolgert, dass Antioxidantien eine Therapieoption der chronischen Pankreatitis darstellen. Kritiker dieser Theorie sehen den oxidativen Stress mit Freisetzung von freien Radikalen als Resultat der chronischen Pankreatitis an - nicht als deren Ursprung⁴⁹. Auch der Nachweis des therapeutischen Nutzens von Antioxidantien steht noch aus.

Die Nekrose-Fibrose-Sequenz:

Nach Klöppel führt der Alkohol zur Nekrose der Azinuszellen. Die nekrotischen Areale werden durch Bindegewebe ersetzt (Nekrose-Fibrose-Sequenz). Zunächst seien Nekrosen von interstitiellen Fettzellen als Veränderungen zu beobachten, welche später auch auf kleinere Gefäße, besonders Venen und benachbartes Azinusgewebe übergreifen⁵⁰. Die dabei entstehende inflammatorische und hämorrhagische Reaktion, die dieser Gewebnekrose folgt, initiiert die Fibrose⁵¹. Diese Pathogenese der cP beschreibt eine schrittweise Entstehung der Fibrose durch rezidivierende akute Pankreatitiden. Unterstützung erhielt dieses Modell durch eine interessante klinische Langzeitstudie, welche die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis abhängig von der Schwere und Häufigkeit akuter pankreatitischer Episoden belegt⁴³.

1.4.3 Weitere Ursachen der chronischen Pankreatitis

In 20 bis 25 Prozent der chronischen Pankreatitiden liegt kein übermäßiger Alkoholkonsum als Ursache vor. Die cP wird dann als idiopathische cP bezeichnet.

Patienten unter 35 Jahren bei Erstdiagnose und Patienten mit nicht-alkoholischen Pankreatitiden bei einem oder mehreren Verwandten mit einer cP sollte eine Untersuchung auf das Vorliegen einer **hereditären Pankreatitis** empfohlen werden.

Die ersten Mutationen wurden bei Patienten mit autosomal dominant vererbter chronischer Pankreatitis nachgewiesen. Es handelte sich dabei um die Varianten N29I und R122H des kationischen Trypsinogens⁵². Später wurden Mutationen im Trypsininhibitor (SPINK1) sowie im ‚cystic fibrosis transmembrane conductance regulator‘ (CFTR) nachgewiesen⁵³⁻⁵⁵. Diese Mutationen fanden sich auch bei Patienten mit der sogenannten idiopathischen und auch der alkoholischen Pankreatitis. Der Erkrankungsbeginn bei autosomal dominant vererbten Mutationen liegt meist in der Kindheit oder Jugend (10-13 Jahre).

Auf der Basis limitierter Patientenzahlen^{55, 56} und der Häufigkeit in der gesunden Bevölkerung kann abgeschätzt werden, dass die Mutationen N29I und R122H das Risiko an

einer chronischen Pankreatitis zu erkranken, etwa um den Faktor 1000 erhöhen. Zudem wird das Risiko durch Tabakkonsum gesteigert. Patienten mit einer homozygoten N34S-Mutation des Trypsininhibitors SPINK1 besitzen ein etwa um das Fünfhundertfache erhöhtes Risiko. Liegt die Variante heterozygot vor, ist ebenso wie bei den CFTR-Varianten von einer etwa 20-40fach höheren Inzidenz auszugehen⁵⁶.

Diese Risiken sind deutlich höher als bei reichlichem Alkoholkonsum, für den nur eine Risikosteigerung um den Faktor 3-4 beschrieben wurde⁴¹.

Die **Autoimmunpankreatitis** (AIP) ist eine chronische Entzündung des Pankreas, die durch immunologische Mechanismen induziert und aufrechterhalten wird.⁵⁷ Seit der Erstbeschreibung einer nicht-alkoholinduzierten cP mit assoziierter Hypergammaglobulinämie durch Sarles et al.⁵⁸ wurde die Assoziation einer Pankreatitis mit autoimmunen Erkrankungen wie primär sklerosierender Cholangitis, primär biliärer Zirrhose⁵⁹ sowie dem Sjögren-Syndrom⁶⁰ publiziert, so dass eine systemische autoimmune Pathogenese der cP vermutet wurde⁶¹. In Anlehnung daran konnten IgG4-positive Plasmazellen (kennzeichnend für die AIP) in extrapankreatischen Geweben bei Patienten mit AIP nachgewiesen werden⁶²,⁶³. Schließlich wurde das Krankheitsbild mit ähnlicher Histopathologie auch in Abwesenheit von anderen Autoimmunerkrankungen beobachtet und 1995 durch Yoshida et al. als „autoimmune Pankreatitis“ bezeichnet⁶⁴.

Die Inzidenz der AIP ist weltweit steigend. Dies hängt höchstwahrscheinlich damit zusammen, dass die AIP als eigene Entität bisher selten erkannt und deshalb falsch klassifiziert wurde.

Beim primären Hyperparathyreoidismus oder bei Hyperkalzämien anderer Ursache kann es über sehr hohe Kalziumkonzentrationen im Pankreassekret zu intraduktalen Präzipitationen und Verkalkungen und damit zu einer cP kommen. Die Diagnose **idiopathische Pankreatitis** wird voraussichtlich seltener werden mit der weiteren Entdeckung genetischer und autoimmunologischer Ursachen der Pankreatitis.

1.5 Pankreatische Stellate-Zellen

Die pankreatische Fibrose ist ein Hauptmerkmal der cP^{65, 66} und des Pankreaskarzinoms^{67, 68}. Die molekularen Mechanismen, die zur Entwicklung der pankreatischen Fibrose führen, sind zum Teil immer noch ungeklärt. Im Jahre 1998 wurden sternförmige Zellen im Pankreas beschrieben und pankreatische Stellate-Zellen (PSZ) genannt^{66, 69}. Diese Zellen weisen Ähnlichkeiten zu hepatischen Stellate-Zellen (HSZ) auf, die auch ihre Rolle als Initiatoren der hepatischen Fibrose betreffen^{66, 70}. Viele Erkenntnisse über die PSZ sind dieser Analogie zu verdanken. Weitere Studien zeigten, dass Stellate-Zellen auch im Pankreas im Zentrum der Entwicklung einer Fibrose und damit der Pathogenese der cP stehen^{66, 69, 71, 72}. Die Aktivierung der pankreatischen Stellate-Zellen scheint irreversibel zu sein.

1.6 Etablierung von Zelllinien

1.6.1 Vorteile

Zellkulturen erlauben viele Untersuchungen, die in vivo schwierig durchzuführen sind. Die Effekte von Medikamenten, Mediatoren oder Toxinen auf individuelle Zellen können unter Variation verschiedener Parameter unabhängig von den komplexen Einflüssen im Gewebezellverband getestet werden. Viele wichtige Parameter wie der Inhalt von Nährmedien, das Material der Zellkulturgefäße, die Populationsdichte und die Wachstumsrate können unter Kontrolle gehalten werden.

Werden primäre Zellen für die Kulturen verwendet, müssen diese bei Versuchsserien jeweils erneut frisch präpariert werden, wodurch sich eine erhebliche Variabilität ergibt. Die Isolation der Zellen ist zudem zeitaufwendig und kostenintensiv bei oftmals geringer Zellausbeute.

Um eine weitgehende Standardisierung der Arbeiten zu erreichen, werden daher häufig Zelllinien etabliert, die sich durch ein unbegrenztes Wachstum bei Konstanz des Phänotyps auszeichnen.

Parallel zu den laufenden Arbeiten mit primären pankreatischen Stellate-Zellen aus der Ratte wurden daher im Forschungslabor der Abteilung für Gastroenterologie der Universitätsklinik Rostock unter Verwendung dieser Zellen zwei immortalisierte Zelllinien etabliert.

1.6.2 Probleme

Zell-Zell-Interaktionen stellen einen wesentlichen Faktor für spezifische Funktionen in einem Organ dar. Das Herauslösen einzelner Populationen aus dem Gewebeverband ist zwangsläufig mit bekannten und unbekanntem Konsequenzen verbunden. Genetisch manipulierte Zellen erfahren weitere Veränderungen, die endgültig auch zu Veränderungen nativer Funktionen sowie der Reaktivität gegenüber Mediatoren führen können. Ein weiteres Problem ist die über einen längeren Kultivierungszeitraum mögliche Tendenz zur Degeneration. Weiterhin besteht bei der Kultivierung über viele Passagen hinweg ein erhöhtes Risiko der Kontamination mit Mykoplasmen.

Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten sind Zelllinien aber in der zellbiologischen Forschung unverzichtbar. Die mit deren Hilfe erarbeiteten Ergebnisse müssen dann aber an primären Zellen verifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

In einer tabellarischen Übersicht sind nachfolgend die verwendeten Materialien dargestellt.

Chemikalien

| | |
|--|--|
| Aceton | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Rekombinanter menschlicher Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) | Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz |
| DNase | Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Biochrom, Berlin |
| Ethylendinitrilotetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA) | Merck, Darmstadt |
| Fötales Kälberserum (FKS) | Biochrom, Berlin |
| Giemsa-Lösung | Merck, Darmstadt |
| HBSS | Sigma, Deisenhofen |
| Serum-free Hybridoma-Medium | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |
| Hygromycin B | Clontech, Mountain View, USA |
| Rekombinantes Ratten Interleukin-1 β (IL-1 β) | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| Rekombinantes Ratten Interleukin-6 (IL-6) | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM) | Biochrom, Berlin |
| Isotone NaCl-Lösung | B.Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Kollagenase P | Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz |
| MEM (100%) nichtessentielle Aminosäuren-Lösung | Gibco BRL, Paisley, GB |
| Nycodenz | Nycomed, Oslo, Norwegen |
| Rekombinanter Ratten- Platelet Derived Growth Factor BB (PDGF-BB) | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| Penicillin 10000 IE/100 ml | Jenapharm GmbH, Jena |
| Protease IX | Sigma, Deisenhofen |
| Streptomycin 0,1 mg/ml | Fatol Arzneimittel GmbH, Schiffweiler |

| | |
|--|------------------------------------|
| Rekombinanter menschlicher Tumor Growth Factor β 1 (TGF- β 1) | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| Trypanblau | Sigma, Steigheim |
| Trypsin-EDTA (100x) | Gibco BRL, Paisley, GB |
| Ratten IL-1 β Quantikine Murine ELISA-Kit | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| Ratten IL-6 Quantikine Murine ELISA-Kit | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| Ratten IL-10 Quantikine Murine ELISA-Kit | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| 5-bromo-2'-deoxyurine (BrdU) Cell Proliferation ELISA | Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz |
| Einbettmedium | Sigma, Steigheim |

Antikörper

| | |
|---|---------------------------------------|
| Kaninchen-anti-Human Platelet Derived Growth Factor BB (PDGF-BB) | Chemicon International, Temecula, USA |
| Maus IgG1 Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) | Sigma, St. Louis, USA |
| Maus IgG1 Anti-Vimentin | Sigma, St. Louis, USA |
| Maus IgG2a Anti- α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) | Sigma, St. Louis, USA |
| Maus IgG1 Anti-Desmin | Sigma, St. Louis, USA |
| Alexa Fluor Ziege-anti-Maus IgG (488nm) | MoBiTec GmbH, Göttingen |

Verbrauchsmaterial

| | |
|--|--|
| 96-well Platte | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Einwegpipetten (1ml, 5ml, 10ml, 25ml) | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Mikrotiterplatten für die Zellkultur | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Objektträger | HistoBond Adhäsions-Objektträger, Marienfeld |
| Petrischalen | Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Spitzen (10 μ l, 100 μ l, 300 μ l, 1 ml) | Greiner GmbH, Frickenhausen |

| | |
|--|--|
| Spritzen (5 ml, 10 ml, 50 ml) | Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien |
| Zellkulturflaschen T25, T75 (25 cm ² , 75 cm ²) | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturschalen (6 cm ²) | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zentrifugenröhrchen (15ml, 50 ml) | TPP, Trasadingen, Schweiz |

Geräte

| | |
|-------------------------------------|--|
| CO ₂ -Brutschrank | NuAire, Zapf Instrumente, Sarstedt |
| Mikroskope | |
| Jenaval, | Carl Zeiss Jena, Jena |
| Zeiss Axiolab Fluoreszenzmikroskop, | Carl Zeiss Jena, Jena |
| Laminarbox | Hera Safe, Heraeus Instruments GmbH, Hannover |
| Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl,) | Eppendorf, Hamburg |
| Schüttler | IKA-VIBRAX-VXR, Omnilab, Bremen |
| Wasserbad | Typ 1012, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| Zentrifuge | Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH, Hannover, Rotor 7500 3324, rmax: 8,5 cm, rmin: 5,9 cm |
| Microplate Reader | Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld |

2.2 Versuchstiere

Zur Gewinnung der primären PSZ wurden männliche LEW.1W Ratten im Alter zwischen acht und zwölf Wochen mit einem Gewicht bis zu 200 g eingesetzt. Diese Tiere konnten von der Universität Greifswald bezogen werden.

Die Haltung und Fütterung aller für die Versuche verwendeten Tiere erfolgte nach den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) im Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock (Direktor: Frau Prof. Dr. med. B. Vollmar).

2.3 Zellkulturen

2.3.1 Zellbiologische Verfahren

Als Standardmedium für die Zellkulturen wurde DMEM-Medium mit dem 17% Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS), Antibiotika (Penicillin 100 Units/ml, Streptomycin 100 µg/ml) und nichtessentiellen Aminosäuren verwendet. Die Aussaat der Zellen erfolgte in T 75- und T 25-Kulturflaschen. Aufbewahrt wurden die Zellen in einem mit 5% CO₂ und 95% Luft begasten Brutschrank bei 37° C.

Bei Konfluenz wurden die Zellen alle 4-5 Tage in neue Kulturflaschen überführt. Dazu mussten die Zellen mit 1 ml Trypsin - EDTA abgelöst werden. Nach Überprüfung der vollständigen Lösung der Zellen unter dem Lichtmikroskop wurde die Zellsuspension mit 3 ml Medium aufgefüllt und in einem Zentrifugenröhrchen 6 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Danach konnte der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut in Medium aufgenommen werden.

Zum Einfrieren der Zellen musste Medium, fetales Kälberserum und DMSO zugesetzt werden. Die Zellsuspension wurde in Kryo-Röhrchen über 24 Stunden bei -80° C langsam eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff endgültig aufbewahrt werden konnte. Beim Auftauen wurden zunächst die Kryo-Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entfernt. Anschließend erfolgte der langsame Zusatz von DMEM-Standard-Medium zur vorliegenden

Zellsuspension. In einem Zentrifugationsschritt bei 800 U/min über 6 Minuten konnte das DMSO entfernt werden. Anschließend ließen sich die Zellen auf Kulturflaschen verteilen.

Für die Zellzählung und die Vitalitätsprüfung wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau ermöglicht die Identifikation lebender bzw. nekrotischer Zellen. Während die Membran vitaler Zellen nicht permeabel für Trypanblau ist, wird die geschädigte Membran durchlässig für diese Substanz. Tote Zellen sind durch ihre Blaufärbung erkennbar.

2.3.2 Gewinnung und Immortalisierung von Stellate-Zellen

Pankreatische Stellate-Zellen wurden aus dem Pankreas männlicher LEW.1W Ratten gewonnen. Dazu wurde die Papille des gemeinsamen Galle-Pankreasganges der Ratte aufgesucht und kanüliert. In den Gang konnten dann 8 ml HBSS mit 0.05% Kollagenase P, 0.02% Protease IX und 50 µg/ml DNase injiziert werden. Das perfundierte Pankreas wurde entnommen, mechanisch zerkleinert und in der enzymhaltigen HBSS-Lösung bei 37°C 20min geschüttelt. Nach einer weiteren Dispersion durch Auf- und Abpipettieren wurde das Gewebe zentrifugiert und das Pellet in HBSS mit 4% FCS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch ein 150 µm Zellsieb gefiltert, um Bindegewebe und Zellverbände zu entfernen, zentrifugiert und wieder resuspendiert.

Die Gewinnung primärer PSZ erfolgte mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde die Zellsuspension mit dem Gradientenmedium Nycodenz versetzt bis zu einer Lösung mit einem 12% Nycodenzanteil. Anschließend wurden 6 ml HBSS mit der Zell-Nycodenz-Lösung unterschichtet und für 20 min bei 1400 g und 4°C zentrifugiert. Die PSZ imponierten als Bande oberhalb des Nycodenz, während die Azinuszellen aufgrund ihrer größeren Dichte auf dem Boden ein Pellet bildeten. Die PSZ - Bande wurde vorsichtig abpipettiert, gewaschen und in IMDM-Lösung mit 17% FKS, 0.1 mM nichtessentiellen Aminosäuren und Antibiotika (Penicillin 100 Units/ml, Streptomycin 100 µg/ml) aufgenommen. Die Zellsuspension musste dann über Nacht in entsprechenden Kulturgefäßen unter Standardbedingungen inkubiert werden. Da Azinuszellen nicht adhären, konnten diese zusammen mit anderen kontaminierenden Zellstrukturen durch einfachen Mediumwechsel entfernt werden.

Primäre pankreatische Stellate-Zellen der Ratte wurden am 7. sowie am 14. Tag nach Isolation durch Transduktion des SV40 Large T-Antigen (SV40 LT) mittels retroviralem Gentransfer immortalisiert⁸³. Dazu wurde das SV40 LT - Gen in einen auf dem Maus-

Leukämie-Retrovirus (MLV) basierenden Vektor (pLXSN) kloniert (pLLTIHN3). Das Plasmid enthielt die Resistenzgene für Hygromycin und Neomycin. Ferner ermöglichte die Cre Rekombinase nach stabiler Transfektion eine Deletion des eingebrachten Gens.

Zur Generierung infektiöser Viruspartikel wurde eine Verpackungszelllinie (293, humane embryonale Nierenzellen) verwendet, die nach entsprechender gentechnischer Manipulation die erforderlichen MLV-Hüllproteine (envelope) gag-pol exprimierte. Die 293-Zellen wurden mit dem pLLTIHN – Konstrukt transfiziert. Die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte durch Hygromycin. Die Virusproduktion wurde durch Infektion von HIH3T3-Zellen der Maus quantifiziert. Die Virustiter betragen $3 \times 10^5/10^6$ Zellen/ml.

Zur Gewinnung der infektiösen Partikel für den Gentransfer des SV40 LT in die PSZ wurden Virus-produzierende 293-Zellen in T75-Flaschen von ca. 80%-iger Konfluenz verwendet. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen über Nacht mit 4 ml DMEM und 10% FKS kultiviert. Die in T25-Flaschen wachsenden PSZ wurden mit 1 ml dieses Virus-haltigen Mediums nach dessen Filtration 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium mit 4 ml DMEM, das 15% FKS, nicht-essentielle Aminosäuren und Insulin (7µg/ml) enthielt, aufgefüllt.

Die Selektion der PSZ, die das pLLTIHN-Konstrukt stabil in die genomische DANN integriert hatten, erfolgte wiederum mit Hygromycin. Die nach 2 – 5 Wochen generierten immortalisierten PSZ-Linien wurden entsprechen der in vitro Kultivierungszeit von 7 bzw. 14 Tagen nach Isolation aus dem Rattenpankreas bis zum Gentransfer als Lat-7 bzw. Lat-14 bezeichnet.

2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Diese mussten dann in Petrischalen gelagert und mehrfach mit PBS gewaschen werden. Danach wurden auf die Deckgläschen 100 µl eiskaltes Aceton (Lagerung bei -20°C) zur Fixierung der Zellen gegeben und diese bei -20°C für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS gespült, um das Aceton herauszuwaschen.

Nun konnten 100 µl der verdünnten Antikörperlösung auf das Deckgläschen gegeben werden. In Tabelle 1 sind die unterschiedlichen Verdünnungen der jeweiligen Antikörper angegeben. Bei Zimmertemperatur wurden die Zellen nun über 30 Minuten im Schüttler inkubiert. Nicht gebundene Antikörper ließen sich dann mit einmaliger PBS-Waschung entfernen. Es folgte

die Zugabe von 100 µl des sekundären, gegen den primären Antikörper gerichteten Antikörpers mit Farbstoff. Das Deckgläschen wurde erneut bei Zimmertemperatur für 30 Minuten bei Dunkelheit inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen.

Danach konnte das Deckgläschen mit den gefärbten Zellen auf einen mit 40 µl Einbettmedium vorbereiteten Objektträger gebracht werden. Bis zum Erstarren des Einbettmediums wurden Objektträger und Deckgläschen im Kühlschrank aufbewahrt. Die Kontrollen wurden nun mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach dieser Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in einem Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografiert. Die Lagerung der Objektträger für weitere Untersuchungen erfolgte gleichfalls bei 4° C.

| <u>Antikörper</u> | <u>Verdünnung mit PBS</u> |
|---------------------------|---------------------------|
| α-SMA | 1:70 |
| Vimentin | 1:40 |
| Desmin | 1:10 |
| GFAP | 1:100 |
| Alexa 488 Ziege-anti-Maus | 1:300 |

Tab.1 : Verdünnungsfaktoren der Antikörperstammlösungen mit PBS

2.5. Proliferationsmessungen

Die Proliferation wurde mit Hilfe des Einbaus von BrdU in die genomische DNA bestimmt. Nach dem Ablösen der jeweiligen Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung mussten die Zellen auf eine Konzentration von 10 000 Zellen/ml in IMDM mit 17% FKS eingestellt werden. 200µl dieser Zellsuspension wurden in je eine Kavität einer 96-well-Platte pipettiert und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nachdem die adhärennten Zellen nahezu Konfluenz erreicht hatten, wurde die Platte mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von PDGF, bFGF oder den Retinoaten in der entsprechenden Konzentration. Hier mussten jeweils 6-fach Bestimmungen vorgenommen werden. Die Zellen wurden mit den Zytokinen bzw. den Retinoaten über 24h kultiviert. Danach erfolgte die Inkubation mit BrdU über 4 Stunden. Nach dem Trocknen der Mikrotiterplatten wurde ein mit Peroxidase gekoppelter Antikörper hinzugegeben. Es schlossen sich weitere Waschschrte an, bevor die Substratlösung

(Tetramethylbenzidin) zugesetzt werden konnte. Durch die POD-Aktivität erfolgte eine Farbreaktion (blau). Nach dem Abbruch der Reaktion durch H_2SO_4 resultierte eine gelbe Lösung, die bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen wurde.

2.6 Quantitativer Zytokinnachweis

Die Bestimmung von TGF- β 1, IL-1 β und IL-6 erfolgte im Zellkulturmedium der PSZ mittels „sandwich“ Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA). Verwendet wurden die entsprechenden Quantikine ELISA Kits von R&D (rat TGF- β 1, rat IL-1 β und rat IL-6) Dabei ist ein monoklonaler Antikörper an eine Matrix gebunden und wird mit der Lösung inkubiert, welche die zu untersuchende Substanz enthält. Es erfolgt im positiven Falle die Bindung der Substanz an den Antikörper. Dieser Komplex wird mit einem sekundären Antikörper detektiert, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Durch die Zugabe des chromogenen Substrates dieses Enzyms kommt es zu einer Farbreaktion, die im Photometer nachgewiesen werden kann.

Im vorliegenden Fall sollten die Zytokine TGF- β 1, IL-1 β und IL-6 nachgewiesen werden. Dazu wurden die Zellen in 96-well-Platten kultiviert. Nachdem nahezu Konfluenz erreicht war, wurde das Medium durch ein serumfreies Medium ersetzt und für 6 h im Brutschrank inkubiert. Mit und ohne Zusatz von PDGF wurden die Zellen 24h kultiviert. Der Überstand wurde gewonnen und bei $-20^\circ C$ aufbewahrt.

Für die Messung der Zytokine wurden die Zellkulturüberstände auf Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper gegeben. Nach Inkubation und Waschschrinen konnte der zweite polyklonale mit POD gekoppelte Antikörper zugesetzt werden. Überschüssige enzymmarkierte Antikörper wurden durch Waschen entfernt. Mit Zugabe der chromogenen Lösung (Tetramethylbenzidin) begann die Bildung eines farbigen Endproduktes, wobei die Farbintensität proportional der Menge der zu untersuchenden Substanz in der Probe oder in den Standardproben war. Diese Reaktion wurde durch Zugabe einer Säurelösung (H_2SO_4) beendet. Anschließend konnte die Absorption des farbigen Endproduktes bei 450 nm gemessen und ausgewertet werden.

2.7 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Proliferationstests wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet. Beim Zytokinnachweis im Medium kam der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen zum Einsatz. Der Stichprobenumfang jeder Versuchsgruppe ist im Ergebnisteil angegeben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zweier Versuchsgruppen wurde gekennzeichnet (*, #). Unterschiede zwischen Gruppen wurden als signifikant erachtet, wenn eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% unterschritten wurde ($p < 0,05$).

Sämtliche Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2003 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von PSZ-Markern mit der Immunfluoreszenz

3.1.1 Vimentin

Bei Vimentin handelt es sich um ein zelluläres Intermediärfilament, welches konstitutiv in Stellate-Zellen exprimiert wird. Der Vimentin-Nachweis erfolgte bei primären PSZ, die an den Tagen 3, 14 und 21 nach der Isolierung gewonnen wurden. Zum Vergleich wurden Untersuchungen auf Vimentin an den Lat-7 und Lat-14 dargestellt (Abb. 1).

In den Zellen des 3. Tages nach der Isolierung (Bild A in Abb.1) war eine deutliche Expression von Vimentin zu erkennen. Am 14. Tag nach der Isolierung (Bild B in Abb.1) nahm die Expression zu, die Strukturierung der Filamente war deutlicher zu sehen. Am 21. Tag nach der Isolierung (Bild C in Abb.1) war diese Strukturierung weiterhin sichtbar. In den Lat-7 (Bild D in Abb.1) und Lat-14 (Bild E in Abb.1) ließ sich gleichfalls eine deutliche Expression von Vimentin erkennen. Die Intensität und Strukturierung der Vimentin-Filamente der Lat-7 (Bild D in Abb.1) ähnelte der Färbung der PSZ des 3. Tages nach der Isolierung (Bild A in Abb.1). Die Intensität in der Markierung und der Strukturierung der Lat-14 (Bild E in Abb.1) entsprach den PSZ des 14. Tages nach der Isolierung (Bild B in Abb.1).

3.1.2 α -SMA

Die Aktivierung primärer pankreatischer Stellate-Zellen ist mit einer zunehmenden Expression von α -SMA verbunden. Auch hier handelt es sich um zelluläres Intermediärfilament. Die Abb. 2 zeigt die Expression von α -SMA in PSZ des 3., 14. und 21. Tages nach der Isolierung sowie in den Lat-7 und Lat-14.

In den PSZ des 3. Tages nach der Isolierung (Bild A der Abb.2) war eine sehr geringe Expression von α -SMA zu erkennen. Eine Differenzierung, die bis zur Ausbildung der ‚stress fibers‘ führt, lässt sich nicht nachweisen. Nach 14 Tagen Kultivierung (Bild B der Abb.2) waren die PSZ aktiviert und imponierten als Myofibroblasten mit der typischen filamentären

α -SMA-Struktur. In den PSZ des 21. Tages nach der Isolierung (Bild C der Abb.2) blieb die hohe Expression von α -SMA erhalten.

Hinsichtlich der α -SMA - Expression war in den Lat-14 (Bild E der Abb.2) eine Expression und Anordnung der α -SMA Fasern ähnlich den PSZ des 14. Tages nach der Isolierung (Bild B der Abb.2) zu erkennen. Die Lat-7 (Bild D der Abb.2) zeigten eine weniger differenzierte Ausbildung der „stress fibers“, die Ausbildung von α -SMA war stärker als in den PSZ des 3. Tages (Bild A der Abb.2) ausgeprägt, doch nicht so stark wie in den Zellen des 14. Tages nach der Isolierung (Bild B der Abb.2) oder bei den Lat-14 (Bild E der Abb.2).

3.1.3 Desmin

Desmin wird von den PSZ unabhängig von der Aktivierung exprimiert, wobei jedoch nicht alle Zellen positiv sind. Untersucht wurde die Desmin-Expression von Zellen des 3., 14. und 21. Tages nach der Isolierung sowie von Lat-7 und Lat-14. Die PSZ des 3. Tages nach der Isolierung (Bild A aus Abb.3) zeigten eine deutliche Expression von Desmin. Im Vergleich dazu nimmt die Expression am 14. Tag (Bild B aus Abb.3) und am 21. Tag nach der Isolierung (Bild C aus Abb.3) geringfügig ab. An den Zellen des 21. Tages nach der Isolierung (Bild C aus Abb.3) war eine Zunahme der perinukleären Expression zu erkennen. Auch in den Lat-7 (Bild D aus Abb.3) und Lat-14 (Bild E aus Abb.3) wurde Desmin exprimiert. In den Lat-7 geschah dies strukturierter als in den Lat-14.

3.1.4 GFAP

Das glial fibrillary acidic protein (GFAP) wird von neuronalen Zellen exprimiert und findet sich auch in PSZ. Die PSZ wiesen an den Tagen 3, 14 und 21 nach Isolierung eine Expression von GFAP auf, die im Verlauf abnahm. Auch die Lat-7 und Lat-14 exprimierten GFAP. In den Lat-14 entsprach die GFAP-Expression den Zellen des 14. Tages nach der Isolierung.

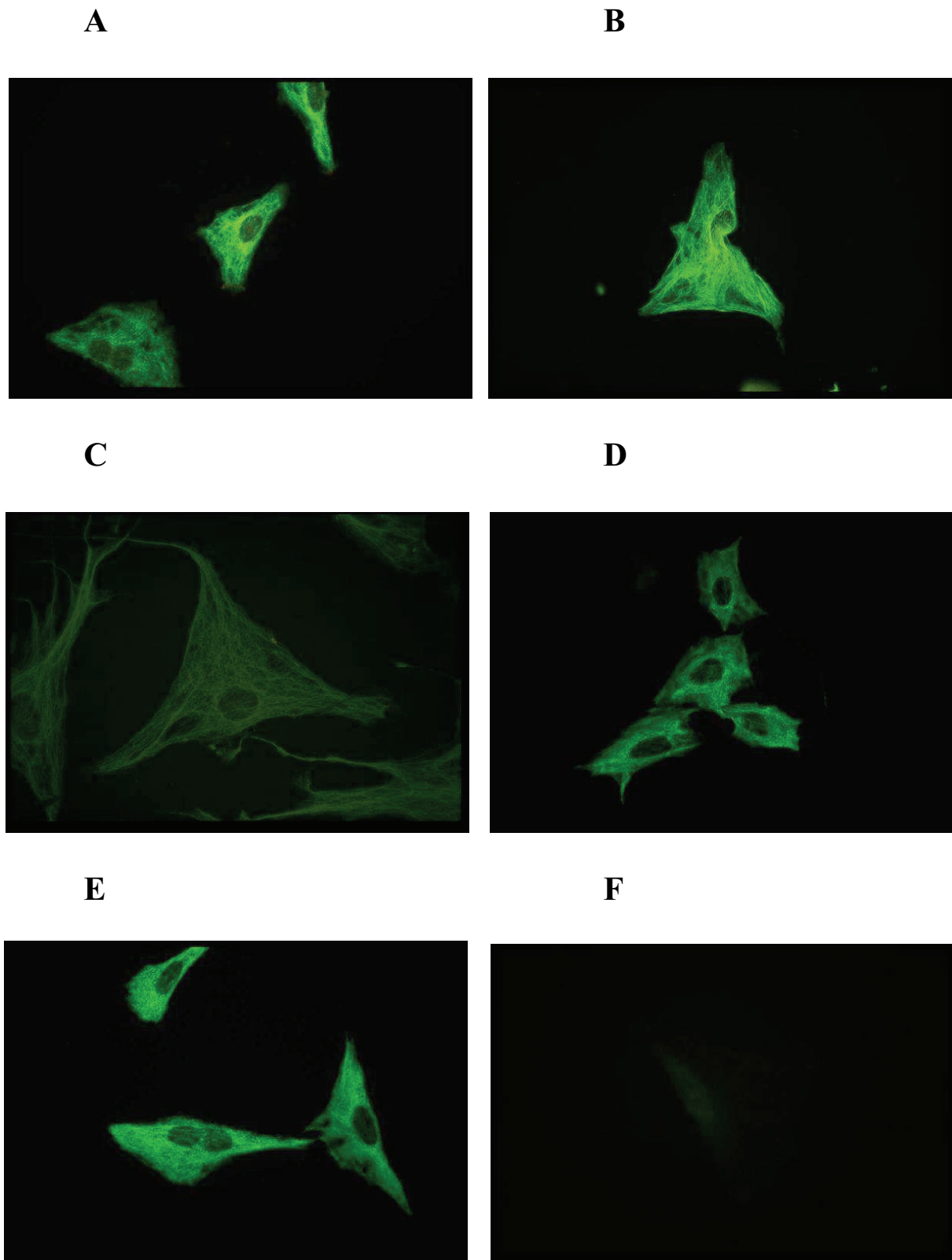


Abb. 1: PSZ am 3. (A), 14. (B) und 21. (C) Tag nach der Isolierung. Lat-7 (D) und Lat-14 (E), Kontrolle (F). Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin-Filamenten (400-fache Vergrößerung)

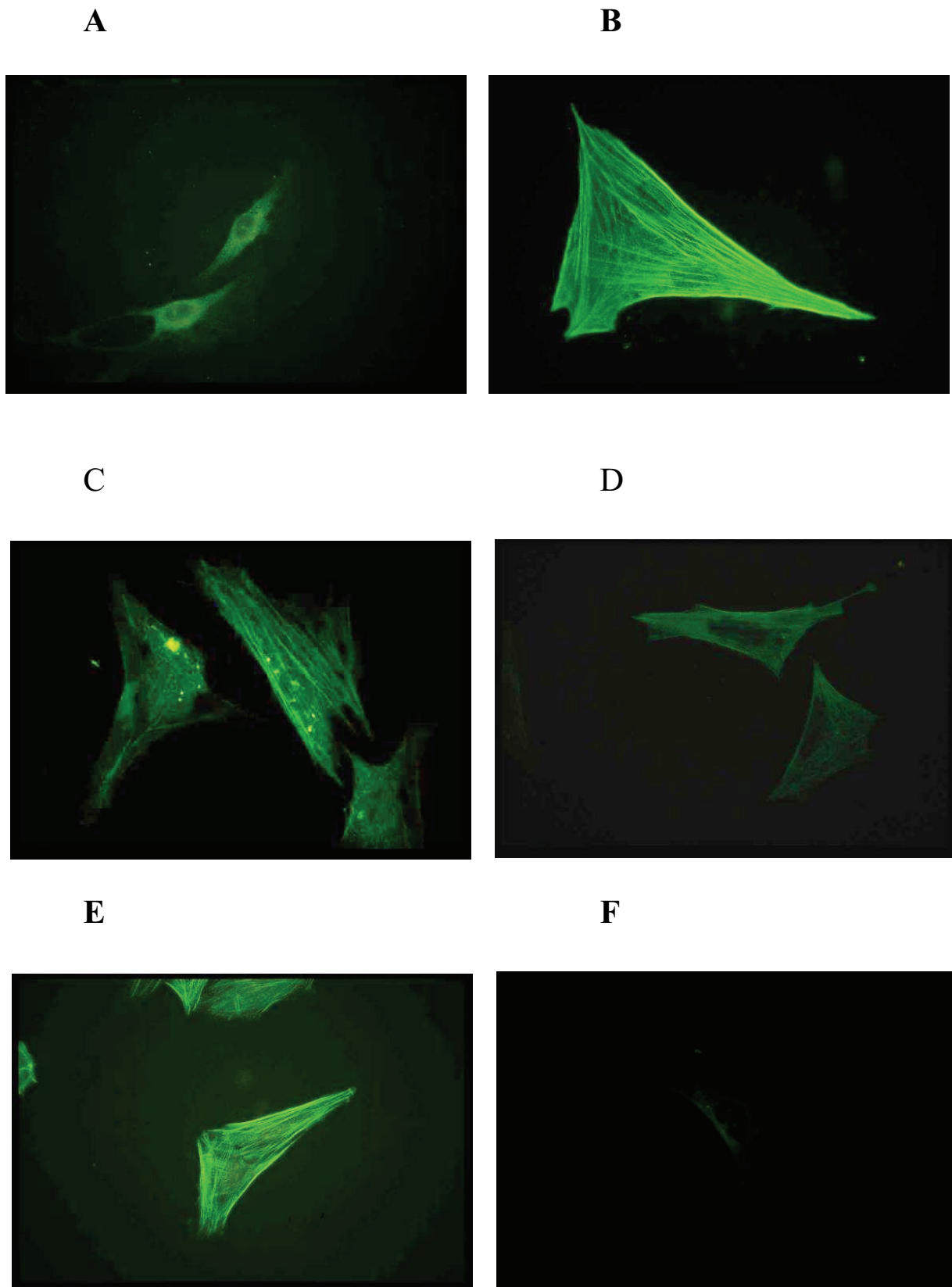


Abb. 2: PSZ am 3. (A), 14. (B) und 21. (C) Tag nach der Isolierung. Lat-7 (D) und Lat-14 (E), Kontrolle (F).
Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA (400-fache Vergrößerung)

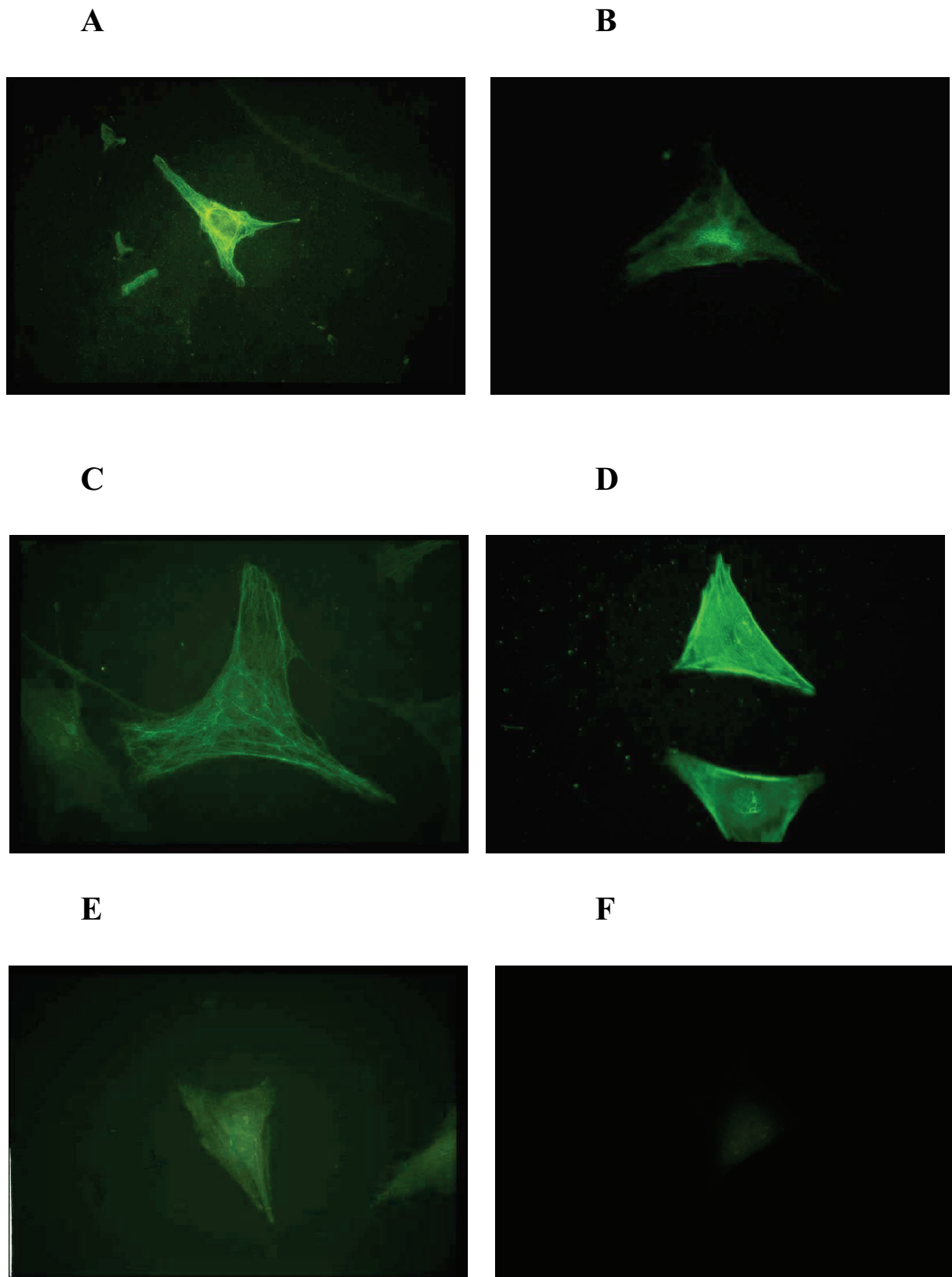


Abb. 3: PSZ am 3. (A), 14. (B) und 21. (C) Tag nach der Isolierung. Lat-7 (D) und Lat-14 (E), Kontrolle (F). Immunfluoreszenzfärbung von Desmin (400-fache Vergrößerung)

3.2 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Proliferation

3.2.1 PDGF

PDGF ist als ein starkes Mitogen für verschiedene Zellpopulationen bekannt. Daher sollte der Einfluß dieses Mitogens auf primäre PSZ und die immortalisierten Stellate-Zellen analysiert werden. Die Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse, wobei PSZ am 12. Tag nach Isolierung verwendet wurden.

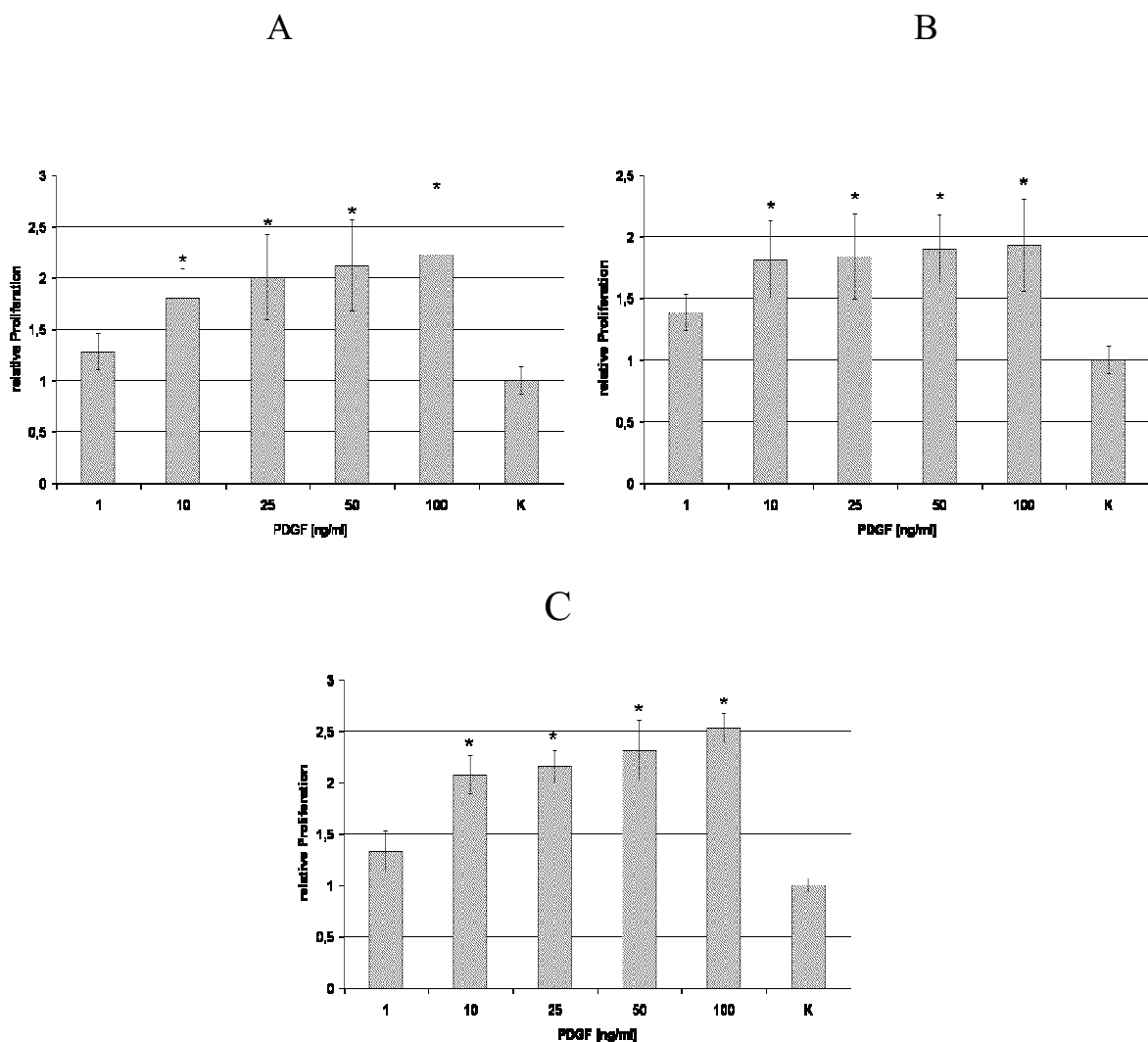


Abb. 4: Einfluß von PDGF auf die Proliferation von Lat-7 (A), Lat-14 (B) und PSZ (12. Tag nach Isolierung) (C). Die Werte einer Kontrollgruppe ohne PDGF-Zugabe wurden als 1 definiert (K). Die signifikante Steigerung der Proliferation gegenüber der Kontrollgruppe ist markiert (*), $p < 0,05$, $n = 30$.

Eine signifikante Steigerung der Proliferation durch Stimulation mit PDGF ist ab einer Konzentration von 10 ng/ml zu erkennen. Dieses trifft sowohl auf die Lat-7 (Diagramm A aus Abb.4), die Lat-14 (Diagramm B aus Abb.4), als auch auf die PSZ (Diagramm C aus Abb.4) zu.

3.2.1.1 PDGF-Antikörper (BB) unter PDGF-Stimulation

Um die spezifische Mitogenität von PDGF zu zeigen wurde bei konstanter Konzentration von PDGF ein PDGF-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen zu Populationen von Lat-7 hinzugefügt.

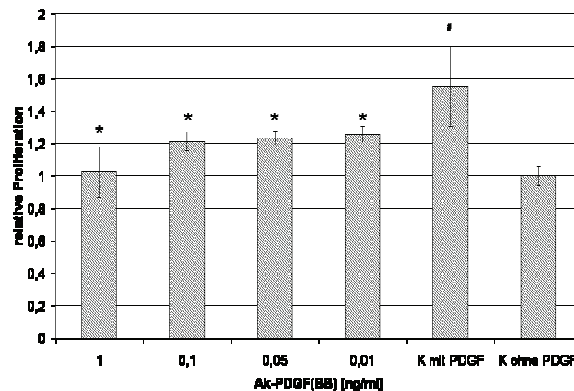


Abb. 5: Proliferation von Lat-7 unter PDGF (50ng/ml) bei unterschiedlichen Konzentrationen eines Antikörpers gegen PDGF (BB). Die Werte der Kontrollgruppe ohne PDGF-Zugabe wurde als 1 definiert (K ohne PDGF). Eine signifikante Steigerung der Proliferation in der Kontrollgruppe mit PDGF gegenüber der Kontrollgruppe ohne PDGF ist markiert (#). Eine signifikante Veränderung der Proliferation durch den Ak-PDGF (BB) gegenüber der Kontrollgruppe mit PDGF ist markiert (*), $p < 0,05$, $n = 30$.

In diesen Versuchen wurden Lat-7 (Diagramm A aus Abb.5) mit 50 ng/ml PDGF stimuliert. Die Kontrolle mit 50 ng/ml PDGF (K mit PDGF) zeigte gegenüber der Kontrolle ohne PDGF (K ohne PDGF) eine signifikante Steigerung (#). Beeinflusst wurde die Proliferation durch zusätzliche Substitution eines PDGF-Antikörpers (BB). Die Lat-7 (Diagramm A aus Abb.5) zeigen dabei eine signifikante Verminderung der Proliferation (*) gegenüber der Kontrollpopulation ohne Substitution von PDGF-Ak(BB), aber mit 50 ng/ml PDGF (K mit PDGF) korrelierend zur Konzentration des Ak-PDGF(BB). Somit wurde die PDGF-Wirkung durch den Antikörper aufgehoben.

3.2.1.2 PDGF-Antikörper (BB) ohne PDGF-Stimulation

Um eine möglicherweise unspezifische Wirkung des PDGF-Antikörpers genauer zu untersuchen, wurde den Lat-7 der PDGF-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen ohne gleichzeitige Gabe von PDGF zugefügt und die Proliferation gemessen. Dabei konnte keine Beeinflussung der Proliferation nachgewiesen werden, wie die Abbildung 6 zeigt.

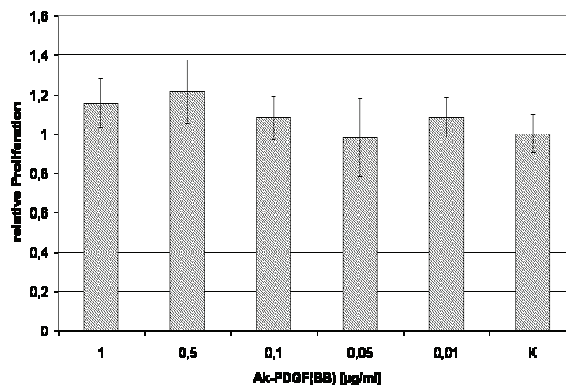


Abb. 6: Einfluß von PDGF auf die Proliferation von Lat-7 bei unterschiedlichen Konzentrationen eines Antikörpers gegen PDGF (BB). Die Werte einer Kontrollgruppe ohne PDGF-Zugabe wurden als 1 definiert (K), n=30.

3.2.2 bFGF

Neben dem PDGF ist bFGF als ein starkes Mitogen bei pankreatischen Stellate-Zellen bekannt. Untersucht wurde der Einfluss von bFGF auf Lat-7 und Lat-14 sowie auf pankreatische Stellate-Zellen, die am Tag 12 nach der Isolierung gewonnen wurden.

Bei der Stimulation der Proliferation durch bFGF war eine signifikante Steigerung des Wachstums aller drei Zellpopulationen zu erkennen. Abhängig von der Konzentration des bFGF konnte die Proliferation signifikant (*) bei Lat-7 (Diagramm A aus Abb.7) bis zum 2-fachen, Lat-14 (Diagramm B) bis zum 3-fachen und bei den PSZ (Diagramm C aus Abb.7) bis zum 2,2-fachen gegenüber einer Kontrollpopulation ohne Zusatz von bFGF (K) gesteigert werden.

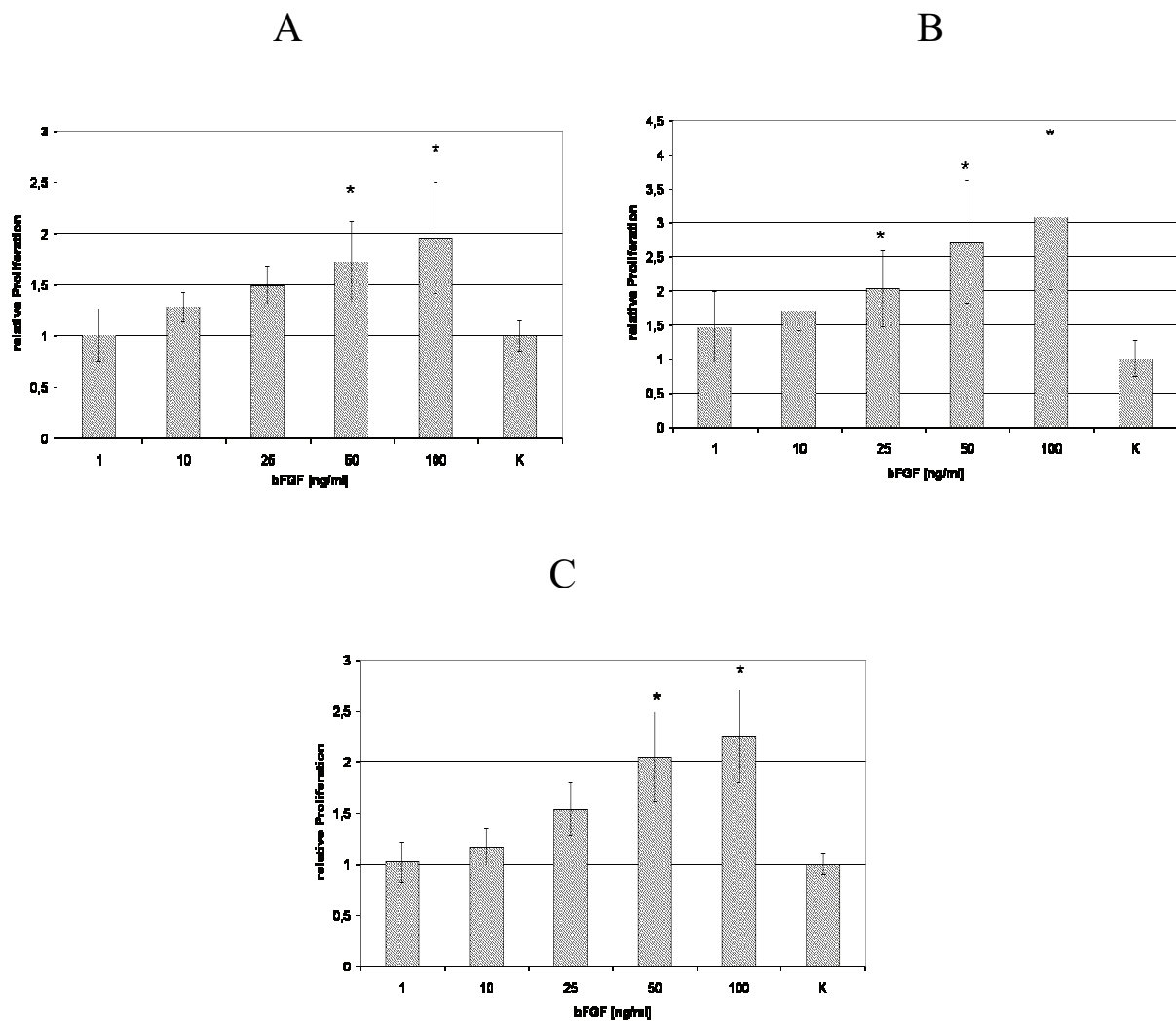


Abb. 7: Einfluß von bFGF auf die Proliferation von Lat-7 (A), Lat-14 (B) und PSZ (12. Tag nach Isolierung) (C). Die Werte einer Kontrollgruppe ohne bFGF-Zugabe wurden als 1 definiert (K). Eine signifikante Steigerung der Proliferation gegenüber der Kontrollgruppe ist markiert (*), $p < 0,05$, $n = 30$.

3.3 Einfluss von Retinoiden auf die Proliferation

3.3.1 Retinol

Pankreatische Stellate-Zellen verlieren bei der Aktivierung ihre Speichervakuolen mit Retinoiden. Hinsichtlich des Einflusses von Retinol auf die Proliferation wurden Lat-7, Lat-14 und PSZ verglichen. Durch Gabe von Retinol zu Lat-7 (Diagramm A aus Abb.8), Lat-14 (Diagramm B aus Abb.8) und den PSZ (Diagramm C aus Abb.8) war eine signifikante Abnahme der Proliferation ab Konzentrationen von 25 μM Retinol gegenüber einer Kontrollpopulation ohne Substitution von Retinol (K) zu erkennen. Lichtmikroskopisch zeigte sich bei Konzentrationen von mehr als 10 μM Retinol mit der Trypanblaufärbung in allen Zellpopulationen eine Abnahme von lebenden Zellen und eine deutliche Zunahme von Zelltrümmern. Insofern war davon auszugehen, dass es nicht nur zu einer Hemmung der Proliferation, sondern zusätzlich auch noch zu einem Absterben der Zellen kam.

Aufsteigende Konzentrationen von Ethanol hatten in keiner Zellpopulation einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation.

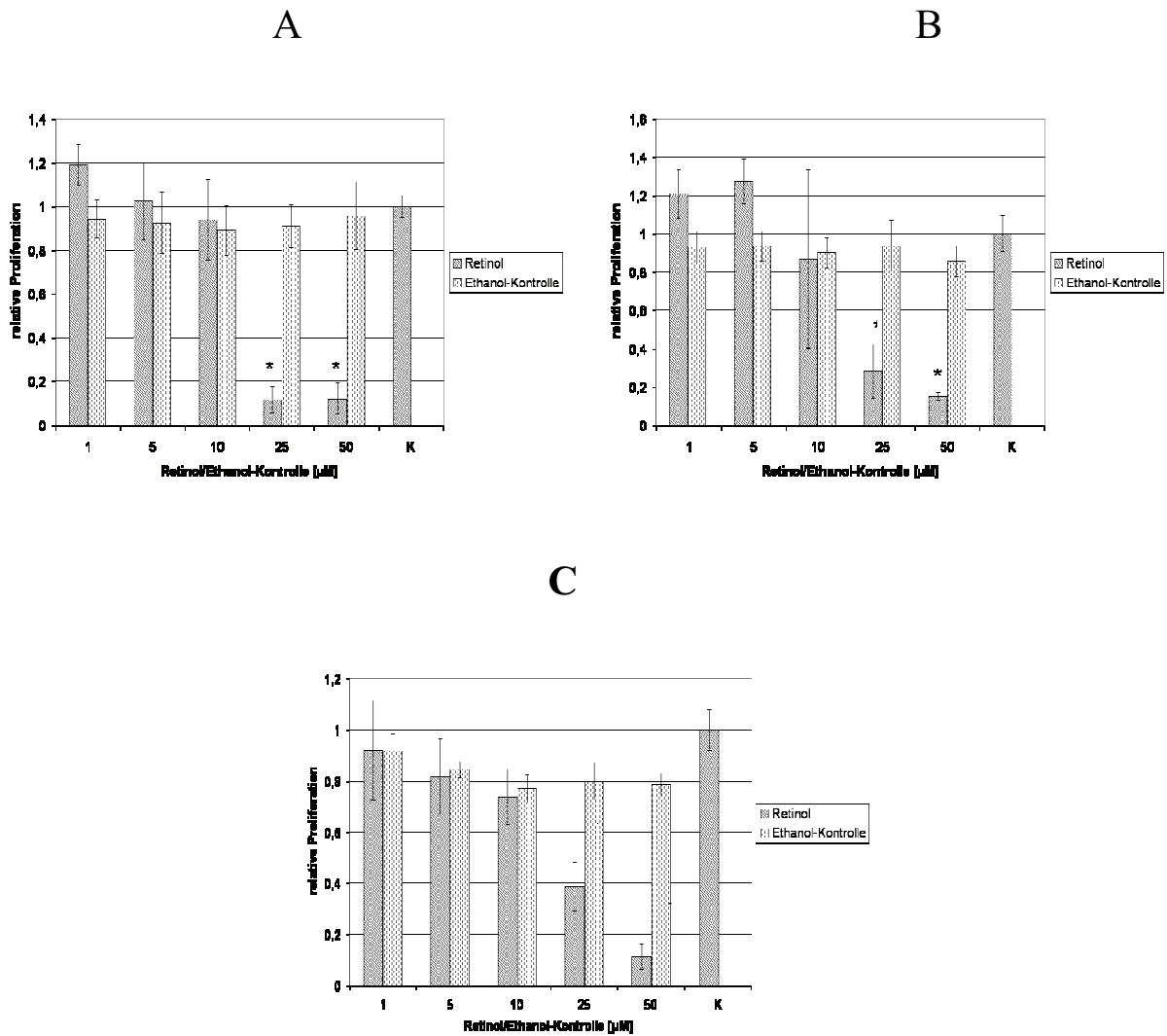


Abb. 8: Einfluß von Retinol in Ethanol auf die Proliferation von Lat-7 (A), Lat-14 (B) und PSZ (12. Tag nach Isolierung) (C). Die Werte einer Kontrollgruppe ohne Retinol wurden als 1 definiert (K). Kontrollen mit Ethanol ohne Retinol sind zum Vergleich dargestellt. Eine signifikante Änderung der Proliferation gegenüber der Kontrollgruppe ist markiert (*), $p < 0,05$, $n = 30$.

3.3.2 all-trans Retinoat

Wie das Retinol gehört auch das all-trans Retinoat zu den Retinol-Derivaten, die in den Vakuolen ruhender Stellate-Zellen vorkommen. Untersucht wurde daher der Einfluß von all-trans Retinoat auf die Proliferation der Lat-7 und Lat-14.

Durch Konzentrationen von 20 μM und mehr all-trans Retinoat war eine signifikante Reduktion der Proliferation in den Lat-7 (Diagramm A aus Abb.9) und den Lat-14 (Diagramm B aus Abb.9) gegenüber einer Kontrollpopulation (K) zu verzeichnen. Ethanol hat keinen signifikanten Einfluß auf die Proliferation.

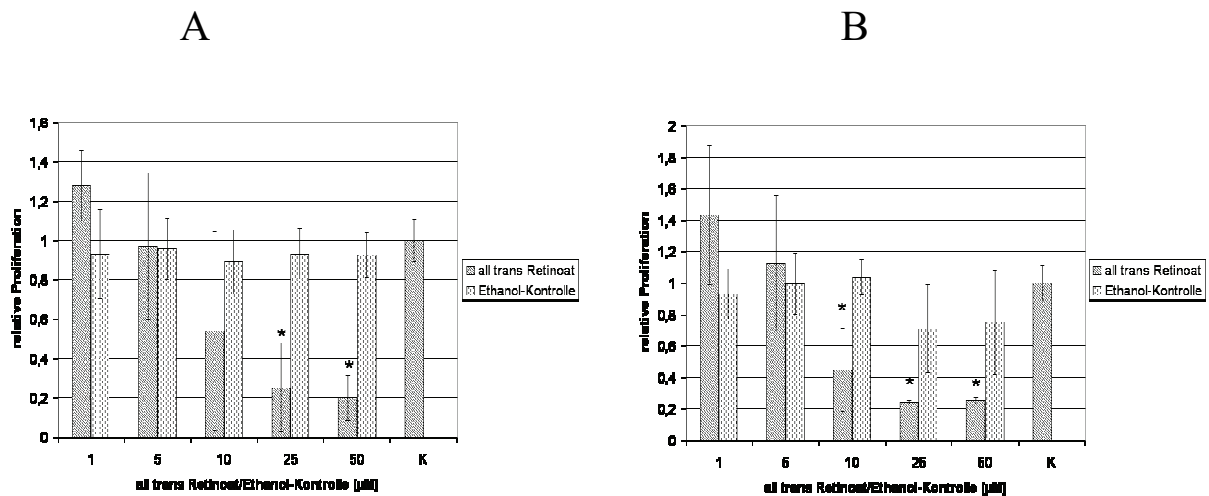


Abb. 9: Einfluß von all-trans Retinoat in Ethanol auf die Proliferation von Lat-7 (A) und Lat-14 (B). Die Werte einer Kontrollgruppe ohne all trans Retinoat wurden als 1 definiert (K). Kontrollen mit Ethanol ohne all-trans Retinoat sind zum Vergleich dargestellt. Eine signifikante Änderung der Proliferation gegenüber der Kontrollgruppe ist markiert (*), $p < 0,05$, $n = 30$.

3.3.3 9-cis Retinoat

Ein weiteres Retinol-Derivat in PSZ ist das 9-cis Retinoat. Aus diesem Grund wurde auch der Einfluss von 9-cis Retinoat auf die Proliferation der Lat-7 und Lat-14 analysiert. Sowohl bei den Lat-7 (Diagramm A aus Abb.10), als auch bei den Lat-14 (Diagramm B aus Abb.10) war eine signifikante Zunahme der Proliferation durch Substitution von 0,1 bzw. 1 μ M 9-cis Retinoat gegenüber einer Kontrollpopulation (K) zu beobachten. In der Konzentration von 20 μ M 9-cis Retinoat kam es jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. Ethanol hatte in den hier verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluß auf die Proliferation.

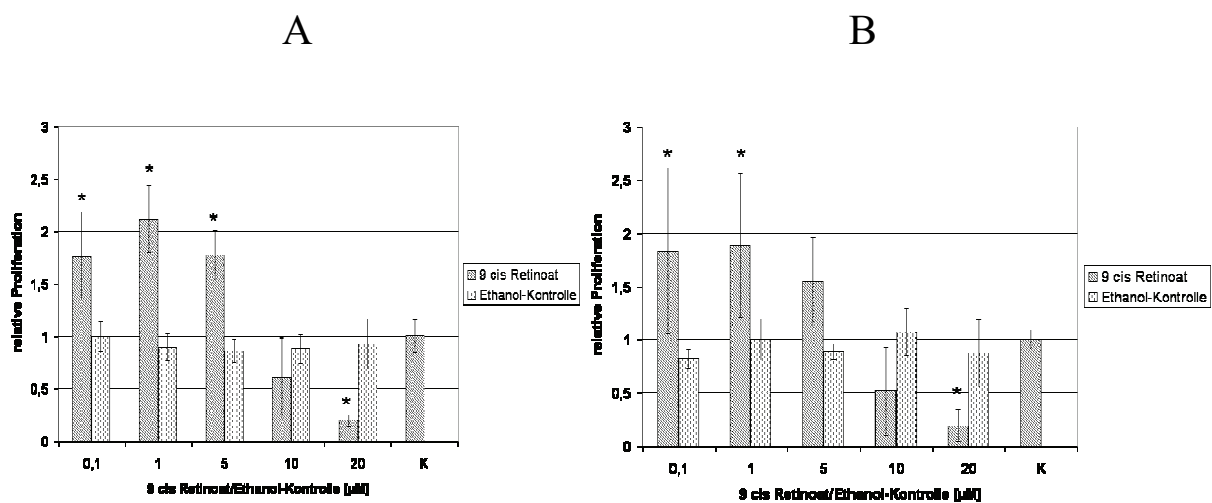


Abb. 10: Einfluß von 9-cis Retinoat in Ethanol auf die Proliferation von Lat-7 (A) und Lat-14 (B). Die Werte einer Kontrollgruppe ohne 9-cis Retinoat wurden als 1 definiert (K). Kontrollen mit Ethanol ohne 9-cis Retinoat sind zum Vergleich dargestellt. Eine signifikante Änderung der Proliferation gegenüber der Kontrollgruppe ist markiert (*), $p < 0,05$, $n = 30$.

3.4 Zytokinnachweis

3.4.1 Expression von TGF- β 1

TGF- β 1 wird eine wesentliche Rolle bei der Fibrogenese im Pankreas zugeschrieben. Dieses Zytokin ist in der Lage, die Kollagensynthese der Zellen zu stimulieren. Analysiert wurden daher die Konzentrationen von TGF- β 1 im Zellkulturmedium von Lat-7, Lat-14 und PSZ an den Tagen 3, 7 und 16 nach der Isolierung. Dabei erfolgte ein Vergleich zwischen den TGF- β 1 – Werten in Medium mit 5% FKS und in serumfreiem Hybridoma-Medium. Dieses schien sinnvoll, da im FKS TGF- β 1 enthalten ist. Zusätzlich zu den Zytokinmessungen im Medium wurden die Untersuchungen jeweils mit und ohne PDGF-Zugabe durchgeführt.

Sowohl die Lat-7 und Lat-14, als auch die PSZ des 3., 7. und 16. Tages nach der Isolierung exprimierten TGF- β 1. Dies war sowohl im 5%FKS-haltigen IMDM-Medium (Diagramm A aus Abb.11), als auch im Hybridoma-Medium (Diagramm B aus Abb.11) an den signifikanten Differenzen gegenüber den Kontrollen zu erkennen. In beiden Medien ließ sich in allen Zellen die Expression von TGF- β 1 durch Zusatz von 50 ng/ml PDGF signifikant gegenüber den nichtstimulierten Zellen steigern. Besonders auffällig war die Expression von TGF- β 1 in den über mehrere Tage bereits aktivierten PSZ.

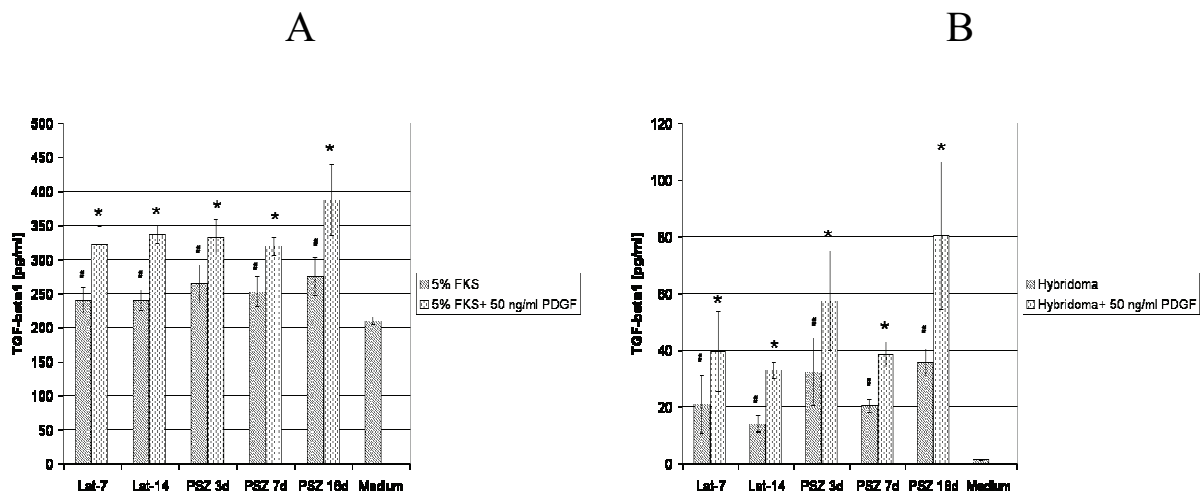


Abb. 11: Konzentration von TGF- β 1 im Überstand nach 24h Inkubation in 5%FKS-IMDM-Medium (A) und im serumfreien Hybridoma-Medium (B) der Lat-7, Lat-14, PSZ des 3., 7. und 16. Tages nach der Isolierung. Darstellung der Ergebnisse mit und ohne Zugabe von 50 ng/ml PDGF. Eine Bestimmung im jeweiligen Medium diene als Kontrolle. Eine signifikante Zunahme der TGF- β 1-Konzentration gegenüber dem Medium wurde gekennzeichnet (#) wie auch eine signifikante Erhöhung durch Zugabe von 50 ng/ml PDGF gegenüber den unstimulierten Kontrollen (*). n=6

3.4.2 Expression von IL-1 β

IL-1 β zählt zu den proinflammatorischen Interleukinen und wird von zahlreichen Zellpopulationen freigesetzt. Die Zytokinmessungen im Zellkulturüberstand von Lat-7, Lat-14 und PSZ zeigten, dass IL-1 β nur von den aktivierten PSZ (16. Tag) nach Stimulation mit PDGF freigesetzt wurde (Abb.12). Hier ist wieder zu beachten, dass FKS IL-1 β enthält.

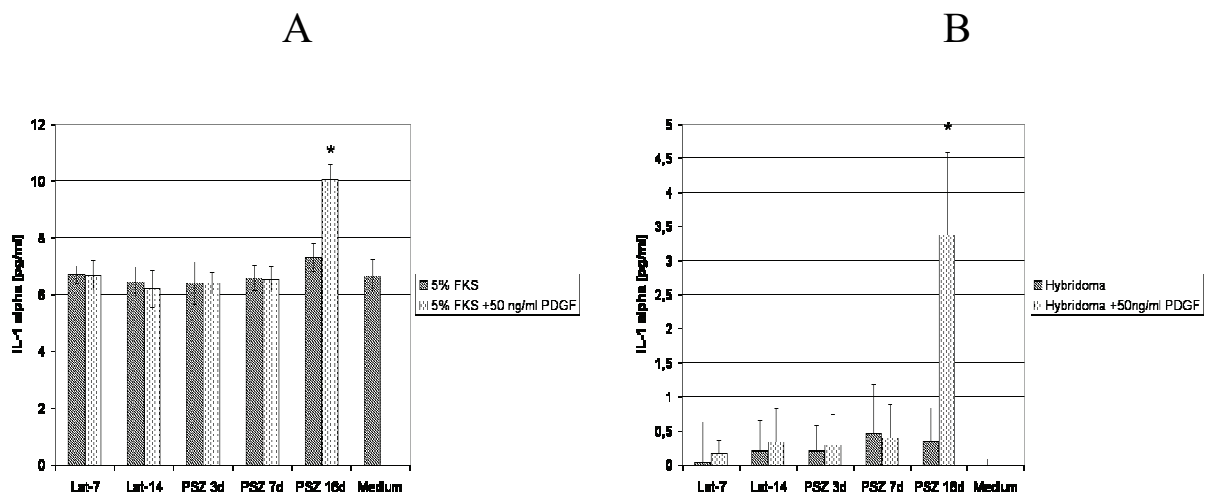


Abb.12: Konzentration von IL-1 β im Überstand nach 24h Inkubation in 5%FKS-IMDM-Medium (A) und im serumfreien Hybridoma-Medium (B) der Lat-7, Lat-14, PSZ des 3., 7. und 16. Tages nach der Isolierung. Darstellung der Ergebnisse mit und ohne Zugabe von 50 ng/ml PDGF. Eine Bestimmung im jeweiligen Medium diene als Kontrolle. Eine signifikante Zunahme der IL-1 β -Konzentration gegenüber dem Medium wurde gekennzeichnet (#) wie auch eine signifikante Erhöhung durch Zugabe von 50 ng/ml PDGF gegenüber den unstimulierten Kontrollen (*). n=6

3. Expression von IL-6

Wie im Falle des IL-1 β handelt es sich auch bei IL-6 um ein proinflammatorisches Zytokin. Untersucht wurde die Expression des Zytokins in Zellkulturüberständen der Lat-7, der Lat-14 und bei verschiedenen Aktivierungsstadien der PSZ unter Verwendung von zwei Medien jeweils mit und ohne PDGF-Zusatz.

Eine signifikante Zunahme der IL-6 Konzentration in den Zellkulturüberständen ließ sich bei den PSZ des 3., des 7. und des 16. Tages nach der Isolierung in beiden verwendeten Medien (Abb.13) gegenüber den Kontrollen zeigen. Unter Zugabe von PDGF nahm die Expression von IL-6 weiter zu, wobei die weitaus höchsten Werte bei den PSZ am 3. Tag der Aktivierung erreicht wurden.

Die Lat-7 und Lat-14 exprimierten IL-6 ohne Stimulation nur im serumfreien Medium. Hier führte der Zusatz von PDGF auch zur Stimulation der Expression in den Zellkulturen.

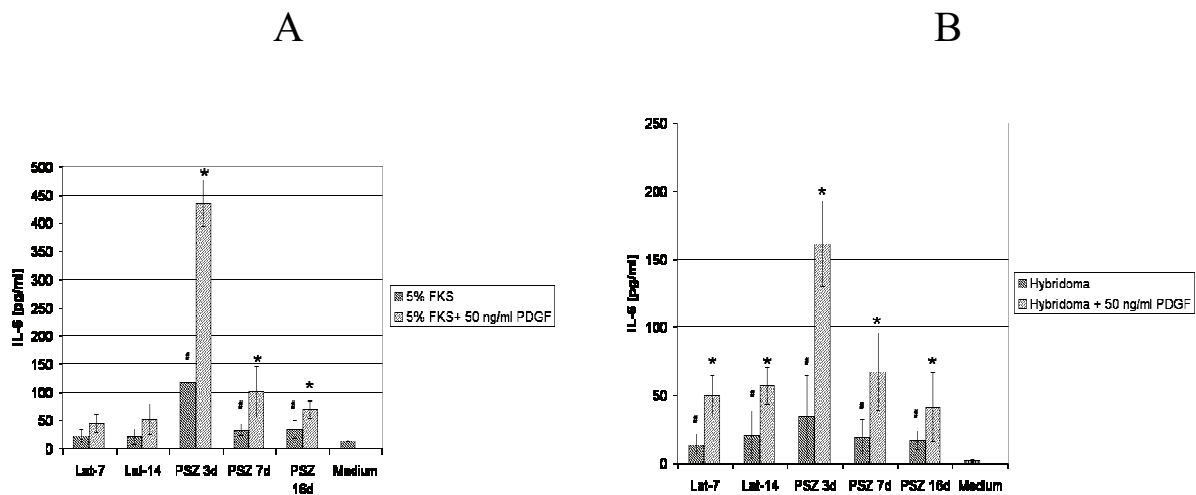


Abb. 13: Konzentration von IL-6 im Überstand nach 24h Inkubation in 5%FKS-IMDM-Medium (A) und im serumfreien Hybridoma-Medium (B) der Lat-7, Lat-14 und der PSZ des 3., 7. und 16. Tages nach der Isolierung. Darstellung der Ergebnisse mit und ohne Zugabe von 50 ng/ml PDGF. Eine Bestimmung im jeweiligen Medium diente als Kontrolle. Eine signifikante Zunahme der IL-6-Konzentration gegenüber dem Medium wurde gekennzeichnet (#) wie auch eine signifikante Erhöhung durch Zugabe von 50 ng/ml PDGF gegenüber den unstimulierten Kontrollen (*), n=6

4. Diskussion

4.1 Physiologie der Stellate-Zellen

Pankreatische Stellate Zellen (PSZ) befinden sich an der Basis der pankreatischen Azini; mit dem erweiterten Zytoplasma umgeben sie basal die Azinus-Zellen^{66, 69, 77}. Ruhende PSZ können im normalen pankreatischen Gewebe durch die Speicherung von Vitamin A in zytoplasmatischen Fettspeichervakuolen identifiziert werden. Dabei zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen ein sehr prominentes rauhes endoplasmatisches Retikulum, Kollagenfibrillen und Vakuolen um den Zellkern^{66, 69, 77}.

Stellate-Zellen werden *in vivo* im Verlauf einer Pankreasschädigung aktiviert, proliferieren und können migrieren. Sie verlieren ihre Vitamin A-Speicherfunktion und transformieren zu den Myofibroblasten ähnlichen Zellen, die durch Expression von α -SMA identifiziert werden.^{72, 78, 79}

Funktionell ist der Transformationsprozess durch eine Steigerung der Zellproliferation und eine vermehrte Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix gekennzeichnet^{66, 69, 78, 80-84} PSZ exprimieren und sezernieren den Hauptanteil extrazellulärer Matrix, wie Kollagen I und III, Fibronectin und Laminin^{78, 85}.

Unter *in vivo*-Bedingungen spielen Entzündungszellen, durch Sekretion von Zytokinen, eine wesentliche Rolle in der Aktivierung. Initial sind infiltrierende Leukozyten, insbesondere Makrophagen, eine wesentliche Quelle⁸⁶⁻⁸⁸. Aber auch umliegende duktale und azinäre Zellen, sowie die PSZ selbst werden zur Produktion und Sekretion von Zytokinen, wie zum Beispiel TGF- β , angeregt^{84, 86, 89, 90}. Arbeiten unserer Gruppe an einem Tiermodell haben gezeigt, dass auch aktivierte T-Zellen an der Progredienz der Krankheit wesentlich beteiligt sind. Aktivierte PSZ hemmen - zumindest teilweise - durch Synthese von Interleukin-15 die Lymphozytenapoptose und vermitteln damit eine proinflammatorische Wirkung^{90, 91}. Komplexe Interaktionen zwischen infiltrierten Leukozyten und pankreatischen Stellate Zellen, die durch eine Vielzahl von Mediatoren mit auto- und parakrinen Effekten vermittelt werden, führen letztlich zum chronischen Verlauf der Krankheit. Dabei sind PSZ nicht nur Effektorzellen, sondern beeinflussen aktiv den Entzündungsprozess⁹⁰. Weitere Studien zeigten, dass es zu einer gewissen Verzögerungsphase der Aktivierung kommt, so transformieren sich die Stellate Zellen erst nach einigen Tagen der Stimulation. Dieses ist wahrscheinlich ein Schutzmechanismus des Körpers, um ungewollte Aktivierungen zu vermeiden⁹².

Im Gegensatz zu den relativ gut verstandenen Aktivierungsmechanismen ist der Zell-Turnover bisher weitgehend ungeklärt. Die Elimination aktivierter PSZ *in vivo* erfolgt wahrscheinlich durch Apoptose. Aber auch eine ‚Re-Differenzierung‘ in ruhende Zellen wird diskutiert. Unter dem Aspekt einer anti-fibrotischen Therapie sind Substanzen, die die PSZ-Aktivität hemmen, von besonderer Bedeutung.

Isolierte PSZ werden *in vitro* bereits infolge der Kultivierung und Anheftung an Plastikmaterial aktiviert. Morphologisch zeigt sich die typische Transformation von kleinen polygonalen („sternförmig“), im Zytoplasma Vitamin-A-Fetttröpfchen-haltigen Zellen zum Myofibroblastenphänotyp. Trotz der zahlreichen *in vitro*-Untersuchungen konnte bisher kein wirksames Konzept zur Therapie der Pankreasfibrose entwickelt werden⁹³.

Weil die Aktivierung der PSZ der entscheidende Prozess in der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis ist, sind Untersuchungen des geschilderten Transformationsprozesses der PSZ notwendig. Da die nativen PSZ nur aufwendig gewonnen werden können, und sich durch unterschiedlich fortgeschrittene Aktivierung auszeichnen, sollten immortalisierte Zelllinien verschiedener Transformationsstadien etabliert und untersucht werden.

Dazu wurden die Lat-7, als Zelllinie eines frühen Aktivierungsstadiums aus PSZ des 7. Tages nach der Isolierung gewonnen. Die Lat-14 wurden ausgehend von aktivierten PSZ des 14. Tages nach der Isolierung etabliert.

4.2 SV-40 Large-T-Antigen Infektion

Die Immortalisierung mittels retroviralem Gentransfer des Large-T-Antigen ist eine häufig verwendete Methode zur Generierung von Zelllinien^{94, 95}. Die molekularen Mechanismen der Large-T-Antigen-induzierten Immortalisierung sind komplex. Das Ergebnis und die speziellen Eigenschaften scheinen in geringem Maße auch zufällig zu sein, beeinflusst unter anderem, durch die Integration des Large-T-Antigen und die transfizierte Zellpopulation^{96, 97}. Der Mechanismus der Wirkung von SV-40 konnte bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt werden. Einige Arbeiten lassen vermuten, dass das Large T-Antigen zu einer Verminderung der Stabilität der Chromosomen führt. Es soll zur Immortalisierung durch Aktivierung von wachstumsfördernden und Ausschaltung von wachstumkontrollierenden

Genen kommen⁹⁸. Die Zunahme der Chromosomen einer Zelle auf bis zu 60 durch Infektion mit dem Large-T-Antigen wurde beschrieben^{99, 100}.

Banerjee et al. postulierten, dass das SV-40 Large-T-antigen p53 Moleküle während der Immortalisation bindet, in deren Folge es zu einer verminderten Wirkung des Tumor-Suppressorgens kommt¹⁰¹. Daran schließt sich auch die Arbeit von Truckenmiller et al. an, die die Immortalisierung von Säugerzellen durch das SV-40 Large-T-Antigen auf die Blockierung von zellulären Suppressorgenen während der G1 Phase des Zellteilungszyklus bezog¹⁰². SV-40 Large-T-Antigen kann eine Vielfalt von Änderungen im Phänotyp von Zellen bewirken¹⁰³. Es wurde beobachtet, dass die Infektion von Zellen mit dem Large-T-Antigen zu einer Kolonieformung der Zellen führen kann, auch können Zellen in der G0-Phase wieder in den Zellzyklus geführt werden. Die Zellen sind immortalisiert und teilen sich unbeschränkt. Dabei scheinen tag-infizierte Zellen den nonproliferativen Zyklusteil zu verlieren und sich in einem ständigen Proliferationszyklus zu befinden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Dauer der G1-Phase vermindert und sich die der G2- und M-Phase verlängert, während die S-Phase nicht verändert wird¹⁰⁴.

Die Veränderungen am Genom können die Aussagekraft von Versuchen mit SV-40 Large-T-Antigen infizierten Zellen für die molekularbiologische Forschung einschränken. Insbesondere betrifft dies Untersuchungen der Zelldifferenzierung, da weitere Veränderungen am Genom nicht auszuschließen sind. Trotzdem ist es eine häufig angewandte Methode zur Etablierung von Zelllinien.

4.3 Immunfluoreszenzmarkierung

Typisch für pankreatische Stellate Zellen ist die Expression von Vimentin, α -SMA, Desmin und GFAP. Schon in frühen Arbeiten über pankreatische Stellate-Zellen wurde der Nachweis dieser Proteine genutzt, um PSZ zu charakterisieren^{69, 84, 87}. Aus diesem Grund sollte die Expression von Vimentin, α -SMA, Desmin und GFAP in den Zelllinien Lat-7 und Lat-14 untersucht werden.

Vimentin ist ein zelluläres Intermediärfilament, wie auch Desmin und GFAP. Bisher konnte diesem Protein noch keine genaue Funktion zugeordnet werden. Es wird ausschließlich im Zytoplasma aller Zellen mesenchymalen Ursprungs gefunden und daher zu deren Nachweis genutzt. Vimentin wird schwach von ruhenden PSZ exprimiert, durch die Aktivierung in Myofibroblasten nimmt die Expression zu^{78, 87}.

Die Expression von Vimentin ließ sich unabhängig vom Aktivierungsgrad in allen PSZ in ähnlich starkem Maße nachweisen. Der mesenchymale Ursprung der Lat-7 und Lat-14 konnte somit gezeigt werden. Beide Lat-Zelllinien wiesen eine deutliche Expression und eine ähnliche zelluläre Organisationsstruktur von Vimentin wie die PSZ auf.

Die Aktivierung der PSZ wird in der Literatur überwiegend durch die Expression von α -SMA charakterisiert^{69, 83, 87}. α -SMA gehört zu den zytoskeletalen Proteinen und ermöglicht der Zelle eine Veränderung der Form durch Kontraktion. Während des inaktiven Zustandes der PSZ ist es nicht nachzuweisen. Während der Aktivierung der PSZ kommt es zu einer starken Steigerung der Expression von α -SMA^{78, 87}. Es kann weiterhin in der glatten Muskulatur, in der Herzmuskulatur, den Stellate-Zellen der Leber, im Speichel und im Serum nachgewiesen werden.

In den Immunfluoreszenzfärbungen von α -SMA konnte eine Zunahme der Expression mit dem Grad der Aktivierung der PSZ gezeigt werden. Mit der zunehmenden Expression werden sogenannte „stress fibers“ ausgebildet, die sich in den PSZ des 14. Tages nach der Isolierung erkennen lassen. Die starke Expression von α -SMA bleibt mit dem zunehmendem Alter der Zellen erhalten^{87, 105}. Die Lat-7 und die Lat-14 exprimierten α -SMA entsprechend ihren Ursprungszellen, den PSZ des 7. bzw. 14. Tages nach der Isolierung.

Desmin wird als ein für Stellate- Zellen spezifischer Marker angesehen, mit dem sich auch in Ruhe befindliche PSZ im gesunden Pankreas markieren lassen⁶⁹. Allerdings sind nicht alle PSZ Desmin positiv. Mit der Transformation zu aktivierten Myofibroblasten nimmt die Expression von Desmin zu. Dieses Intermediärfilament kommt in der Muskulatur vor und bildet hier einen wichtigen Anteil des kontraktiven Apparates^{78, 87}. Nach mehreren Wochen der Kultur von primären PSZ lässt es sich nicht mehr als Intermediärfilament, sondern punktuell nachweisen¹⁰⁵.

In den eigenen Untersuchungen wurde Desmin in den meisten PSZ verschiedener Aktivierungsstadien exprimiert gefunden. Dabei war eine leichte Tendenz zur Abnahme der Expression mit zunehmender Aktivierung zu erkennen, wie es auch in der Literatur beschrieben wird¹⁰⁵. In den Lat wurde gleichfalls Desmin exprimiert. Hier war eine stärkere Expression von Desmin als in den Ursprungszellen zu erkennen, in den Lat-7 mehr als in den Lat-14.

GFAP ist ein Protein, welches ruhende pankreatische Stellate-Zellen von aktivierten Myofibroblasten unterscheiden lässt. Die Expression nimmt mit der Aktivierung der Zellen ab^{69, 78}. GFAP zählt zu den intermediären Filamenten des Zytoskeletts der Zelle und wurde erstmalig in den Astrozyten des Gehirns beschrieben. Weiterhin konnte es in den hepatischen

Stellate-Zellen, den mesangialen Zellen der Niere und den Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Ähnlich der Expression von Desmin zeigten die Lat auch eine höhere Expressionsrate von GFAP als die PSZ. Die Lat-7 exprimieren mehr GFAP als die Lat-14. Eine ähnliche Beobachtung der Zunahme der GFAP-Expression in mittels des Large-T-Antigen immortalisierten PSZ sowohl der Ratte als auch des Menschen wurde bereits beschrieben⁹⁴.⁹⁵ Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wird bei einer mittels Large-T-Antigen immortalisierten menschlichen PSZ-linie die Abnahme der Desmin-Expression beschrieben⁹⁴. Anscheinend besteht ein Einfluß auf die quantitative Expression von Desmin und GFAP durch eine Transfektion mit dem SV-40 Large-T-Antigen.

Die Morphologie der Lat-7 und Lat-14 war nach den vorliegenden Untersuchungen mit den Zellen der Ausgangspopulation vergleichbar. So entsprachen anhand der Immunfluoreszenzfärbung der typischen Marker Vimentin, α -SMA, Desmin und GFAP die Lat-7 den Zellen eines frühen Aktivierungsstadiums, während die Lat-14 ein späteres Aktivierungsstadium repräsentierten.

4.4 Einfluss von Mediatoren auf die Proliferation

4.4.1 Beeinflussung der Proliferation durch PDGF und bFGF

Die Proliferation von pankreatischen Stellate-Zellen wird durch Zytokine stimuliert. Dazu zählen proliferativ und profibrotisch wirksame Wachstumsfaktoren wie PDGF und bFGF. PDGF stellt das effektivste Mitogen dar und trägt wesentlich zur Migration bei^{66, 72, 78, 79, 87}. Die Reaktion der Stellate-Zellen auf Zytokine ist eine wichtige Eigenschaft für die Vermittlung der Fibrose.

PDGF ist ein ubiquitäres Wachstumsmodulationspeptid, welches schon bei den hepatischen Stellate-Zellen als der potenteste Stimulator des Wachstums für Stellate-Zellen beschrieben wurde^{107, 108}. Während Gewebereparationsvorgängen wird PDGF von verschiedenen Zellen in hohen Konzentrationen sezerniert, so zum Beispiel durch mononukleäre Zellen, Makrophagen, Blutplättchen und andere¹⁰⁹. PDGF scheint hierbei ein wichtiger Mediator der Fibrose zu sein. *In vivo* verursacht eine PDGF-Exposition leicht eine pankreatische Inflammation^{78, 80, 87, 110, 111}.

PDGF ist ein dimeres Protein aus zwei Polypeptid-Ketten (A und B) bestehend, woraus sich die möglichen Formen PDGF AA, BB und AB ergeben. Schon an hepatischen Stellate-Zellen

konnte gezeigt werden, dass die Isoformen BB und AB eine höhere Mitogenität haben als die AA-Form. Auch an pankreatischen Stellate-Zellen hat die BB-Isoform die höchste Mitogenität, während die AA-Unterform nur einen geringen Effekt auf die Proliferation ausübt⁷⁸. Es gibt zwei PDGF-Rezeptoren. Der Typ α kann alle drei Typen von PDGF AA, BB und AB binden, während der Typ β nur die BB Unterform binden kann¹¹².

PDGF verfügt in den PSZ über einen ähnlichen Signalweg, wie er in hepatischen Stellate-Zellen und anderen Geweben nachgewiesen werden konnte. Dabei entfaltet PDGF seine Wirkung über eine Phosphoinosit-3-kinase und durch eine über ein extrazelluläres Signal regulierte Kinase mit intrazellulärer Ca- Abgabe¹¹³. In PSZ konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von ERK (extracellular signal regulated kinase) die Migration reduzierte und die Proliferation blockierte, während eine Antagonisierung der PI-3-kinase die Migration komplett blockierte, ohne einen Effekt auf die Proliferation zu haben. Es wurde gezeigt, daß ERK der Schlüsselmediator der Aktivierung von PSZ ist⁸². Beide Kinasen scheinen die Hauptwirkungswege des PDGF zu sein. Durch PDGF-BB konnte eine bis zu 5-fache Steigerung der Proliferationsrate erreicht werden¹¹⁴.

Die Stimulation der Lat-Zelllinien mit PDGF resultierte in einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Proliferation, wie es typisch für die PSZ ist^{87, 111}. In der Literatur werden noch höhere Steigerungsraten beschrieben. Diese wurden in den vorliegenden Untersuchungen nicht erreicht, da ein standardisiertes Protokoll für alle drei verschiedenen Zellpopulationen genutzt wurde, welches nicht für eine Zellreihe optimiert war.

Mehrfach wird in der Literatur der Wirkmechanismus des PDGF auf seine Rezeptoren beschrieben. Hierbei spielt insbesondere der PDGF-Rezeptor (BB) eine zentrale und entscheidende Rolle⁷⁸. Um die Wirkung von PDGF nachzuweisen, wurden die Lat-7 mit PDGF stimuliert unter Zusatz eines spezifischen Antikörpers gegen PDGF (BB) in zunehmender Konzentration. Hierbei war eine Abnahme der Proliferation bei ansteigender Konzentration des Antikörpers nachweisbar. Um eine eigene, die Proliferation beeinflussende Funktion des Antikörpers auszuschließen, wurde der Proliferationstest mit ansteigenden Konzentrationen des PDGF-Ak (BB) ohne Stimulation mit PDGF wiederholt. Dabei zeigte sich keine signifikante Änderung des Proliferationsverhaltens.

Ein weiterer Proliferationsmediator ist bFGF. Schon vor Jahren konnte gezeigt werden, dass bFGF und seine Rezeptoren überexprimiert sind in pankreatischen Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis. bFGF ist nicht nur in chronischen Pankreatitiden erhöht, auch in der Regenerationsphase nach einer akuten Pankreatitis ist bFGF in exokrinen Zellen vermehrt zu finden¹¹⁵. Besonders im Zytoplasma duktaler und azinärer Zellen wurde bFGF beschrieben,

während es im Bindegewebe und in Gewebsfibroblasten nicht nachgewiesen werden konnte⁸⁹. Schneider et al. zeigten, dass bFGF sowohl die Proliferation als auch die Synthese von Kollagen steigert⁷².

Ähnlich dem PDGF konnten mit bFGF-Zusatz konzentrationsabhängig Proliferationssteigerungen erreicht werden. In der Literatur wird eine Proliferationssteigerung durch bFGF beschrieben, allerdings geringer als die von PDGF^{72, 78, 87, 110}. Dies ließ sich sowohl bei den PSZ des 12. Tages nach der Isolierung, als auch bei den Lat-7 bestätigen. Im Fall der Lat-14 ließ sich durch bFGF eine leicht höhere Proliferationsrate erreichen als durch Zusatz von PDGF.

Die Proliferation der Lat-7 und der Lat-14 konnte durch PDGF und bFGF in einer ähnlichen Größenordnung wie bei den PSZ gesteigert werden. Bei den Lat-7 ließ sich die proliferationsfördernde Wirkung des PDGF durch einen spezifischen Antikörper vermindern.

4.4.2 Beeinflussung der Proliferation durch Retinol, all-trans-Retinoat und 9-cis-Retinoat

Wie schon frühzeitig erkannt wurde, transformieren ruhende PSZ zu Myofibroblasten. Dabei kommt es mit zunehmender Proliferation zu einer Differenzierung der Zellen, welche mit einer Abnahme der Vitamin-A speichernden Vakuolen in den PSZ einhergeht. Die Befunde lassen auf eine funktionelle Bedeutung von Vitamin A schließen. PSZ sind bekannt für ihre Vitamin- A- Speicherung in Ruhe. Retinol, all-trans-Retinoat und 9-cis-Retinoat hemmen die Zellproliferation, die Expression von α -SMA, Kollagen I, Fibronectin, Laminin und die Aktivierung der MAP-Kinasen^{116, 117}. In Studien an hepatischen Stellate-Zellen konnte mehrfach gezeigt werden, dass der Zusatz von Aldehyden vor der phänotypischen Transition schützt und die Zellproliferation vermindert¹¹⁸⁻¹²⁰. Es wird in der Literatur geschlossen, dass die Aktivierung der hepatischen Stellate-Zellen und die resultierende hepatische Fibrose durch Veränderungen des Retinol-Aldehyd- Metabolismus und des molekularen Signalweges in diesen Zellen verursacht werden¹²¹. Neuere Arbeiten sprechen dafür, daß dies auch für pankreatische Stellate-Zellen zutrifft^{116, 122}.

Retinoide und insbesondere Retinoid-Aldehyde modulieren die Zellproliferation und die Differenzierung durch Aktivierung von zwei nukleären Rezeptoren, den RAR und den RXR¹²³. Beide gehören zur Superfamilie der steroid-thyroid nuclear hormone Rezeptoren^{124, 125}. Die bekannten Liganden für die RAR sind all-trans-RA und 9-cis-RA und für die RXR nur 9-cis-Retinaldehyd. Die Expression der Rezeptoren wird durch ihre Liganden induziert¹²⁶⁻¹²⁸.

Die biologische Funktion der Retinoate wird durch die RAR/ RXR gesteuert, die wiederum im aktivierten Zustand eine Gentranskription stimulieren ¹²⁹.

Bereits mehrfach wurde versucht, PSZ durch Gabe von Retinol und seinen Derivaten all-trans-Retinol und 9-cis-Retinoat zu deaktivieren ¹¹⁶. Bei Ethanol-induzierter Aktivierung von PSZ scheint es aufgrund der Ähnlichkeit der Signalwege von Retinol und Ethanol eher zu einer Hemmung durch Retinol zu kommen, als bei nicht-alkoholisch induzierten Pankreatitiden ^{69, 130}. An hepatischen Stellate-Zellen wurde schon eine kompetitive Hemmung der Konversion von Retinol zu Retinalaldehyd mittels Ethanol gezeigt ^{117, 131}. Retinoate könnten somit Kandidaten zur Behandlung von pankreatischen Fibrosen sein. Leider liegen derzeit wirksame Konzentrationen im toxischen Bereich. Bei der Aktivierung pankreatischer Stellate Zellen zu aktivierten Myofibroblasten kommt es zu einer Abnahme der zellulären Vitamin-A-Vakuolen. Aus diesem Grund stellte sich schon häufig die Frage, ob hohe Konzentrationen von Retinol und seinen beiden Derivaten eine Abnahme der Aktivierung bis zu einer Umkehrung des Aktivierungsprozesses der PSZ führen könnten.

Diese Idee wird durch eine Arbeit von Silveira et al. unterstützt, in der er beschrieb, dass Retinol, all-trans- und 9-cis-Retinoat die Zellproliferation während Hepatokarzinogenese bei Wistar-Ratten hemmen konnte ¹³². In einer anderen Studie, in der HSZ einem Retinol angereicherten Medium ausgesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Zellen zwingend mit dem Verlust der Vitamin-A-Speichervakuolen einhergeht und nicht durch hohe Retinol- oder Retinolderivatkonzentrationen gehemmt werden kann ¹¹⁸. *In vitro* konnte durch Retinoate die Proliferation von PSZ vermindert werden. Dies erfolgte durch eine Hemmung der Aktivierung von MAP-Kinasen. Weiterhin wurde die Hemmung der Expression extrazellulärer Matrix, α -SMA und Fibronectin durch Retinol gezeigt. ¹¹⁶

Daß Retinoate nicht nur eine hemmende, sondern eine komplexere Wirkung auf die PSZ haben könnten, lassen zusätzlich Studien aus der Onkologie vermuten. Die Ursache einer akuten promyeloischen Leukämie (APL) kann bei einer Translokation des retinoic acid receptor-alpha (RAR- α , RAR α), lokalisiert auf dem 17.Chromosom, gesucht werden ¹³³. Die Fähigkeit von Retinoiden, eine myeloide Differenzierung zu induzieren, wurde schon vor der Erkenntnis der Verbindung von RAR α in APL entdeckt. Durch Verwendung von all-trans Retinoat konnte eine komplette Remission bei Patienten mit APL erreicht werden. Interessanterweise verursacht ATRA (all-trans-retinoic acid) weniger einen Zelltod bei malignen promyelozytischen Klonen, als vielmehr eine Differenzierung, die *in vivo* und *in vitro* beobachtet wurde ¹³⁴⁻¹³⁶. Retinol und sein natürliches Derivat all-trans-Retinoat haben sich bei der Differenzierung von epithelialeem Gewebe als notwendig gezeigt ¹³⁷. In mehreren

Studien konnte die Möglichkeit der Transformierung der einzelnen Retinolderivate ineinander an verschiedenen Geweben gezeigt werden ^{131, 138-142}.

Der Einfluss von Retinoaten auf die Proliferation der primären sowie der immortalisierten Stellate-Zellen wurde untersucht. Dafür kamen sowohl Retinol, als auch all-trans-Retinoat und 9-cis-Retinoat zur Anwendung. Da Retinol und seine Derivate in Ethanol gelöst waren und die Eigenwirkung des Ethanols auf die Zellen ausgeschlossen werden musste, erfolgten Kontrollversuche mit Ethanol in gleicher Konzentration. Bei diesen Kontrollen zeigte sich, dass Ethanol in den gewählten Konzentrationen keinen erkennbaren Einfluss auf die Zellen hatte.

In allen Untersuchungen zeigte sich, dass die Retinoate mit zunehmender Konzentration eine Verminderung der Proliferation bewirkten. Diese Ergebnisse entsprechen der Literatur ¹¹⁶.

Zusätzlich zeigen in unseren Versuchen Retinol und seine zwei Derivate an den Lat-7 und -14, dass geringe Konzentrationen zu einer Zunahme der Proliferation führen, bei ansteigenden Konzentrationen aber zu einer immer stärkeren Hemmung, die im weiteren Anstieg der Konzentrationen zu einem Absterben der Zellen führt. Bei den PSZ, in unserer Arbeit anhand der Beeinflussung von Retinol dargestellt, ist dieses nicht zu beobachten, obwohl eine starke Streuung der Standardabweichung zu beobachten ist.

Die proliferationssteigernde Wirkung in geringen Konzentrationen, signifikant bei 9-cis-Retinoat, ist durch bisherige Studien nicht belegbar. In einer neueren Studie an aktivierten PSZ konnte gezeigt werden, dass Retinol und seine Derivate nicht nur inhibierend auf Rezeptoren des Mitogen aktivierten Protein-Kinase-Signalweges (MAPK) auswirken, sondern einzelne Rezeptoren durch Retinol-Derivate stimuliert werden. Erst im Zusammenwirken der Signalwege ergibt sich eine hemmende Wirkung bei PSZ. ¹¹⁶ Beim Vorhandensein aller drei Retinoate kann von einem noch komplexeren System ausgegangen werden.

Zwei Studien zeigten sogar, dass Retinol und all-trans-Retinoat zur Hyperplasie in der Epidermis des Menschen führen, welche auf eine proliferationssteuernde und -steigernde Wirkung der Retinolderivate an anderen Zellen hinweist. ^{143, 144}

Dieses könnte in gewisser Weise auch für die PSZ zutreffen. Durch die Transfektion der Lat könnte eine Veränderung des Verhältnisses der Rezeptoren zu einer Verstärkung der proliferationssteigernden Wirkung der Retinoate geführt haben. Andererseits sind bisherige Versuche nicht an PSZ eines definierten Aktivierungsstadiums durchgeführt worden. Die Reaktion der PSZ eines frühen Aktivierungsstadiums auf Retinoate sollte genauer untersucht werden.

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass die Proliferation von Lat-7 und Lat-14 mit zunehmender Konzentration von Retinol, all-trans-Retinoat und 9-cis-Retinoat jeweils gehemmt wird, wie es bei den PSZ beschrieben ist. Zusätzlich ist bei geringen Konzentrationen der Retinoate eine Steigerung der Proliferation zu beobachten.

4.5 Zytokinexpression

Pankreatische Stellate-Zellen können durch Zytokine aktiviert und stimuliert werden. PSZ stellen dabei nicht nur Effektorzellen dar, sondern sind selbst in der Lage, Wachstumsfaktoren und Zytokine zu exprimieren. Daher wurde in dieser Arbeit die Zytokinsynthese primärer PSZ mit der der Zelllinien verglichen.

Transforming Growth Factors (TGF) ist die Sammelbezeichnung für eine Gruppe von Zytokinen, welche an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind.¹⁴⁵ So spielt TGF- β eine dominante Rolle in der Gewebeheilung nach Verletzungen. TGF- β fördert die Wundheilung durch Beeinflussung von Monozyten, Leukozyten und Fibroblasten, durch Induktion der Angiogenese und durch die Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen, Fibronectin und Laminin)^{72, 84}. TGF- β kontrolliert die Produktion von zahlreichen inflammatorischen Mediatoren^{146, 147}. Die TGF- β -Familie stellt einen entscheidenden profibrotischen Faktor dar. Das TGF- β 1 ist dabei ein wesentliches Stimulans der Synthese von extrazellulärer Matrix^{66, 72, 78, 87}.

TGF- β ist ein aus zwei identischen Untereinheiten bestehendes Homodimer, dessen Untereinheiten durch eine Disulphid-Brücke verlinkt sind. Fünf homologe Vertreter dieser Proteinfamilie wurden beschrieben. Dabei ist TGF- β 1 der potenteste fibrogenische Mediator, welcher an hepatischen Stellate-Zellen beschrieben wurde.¹⁴⁸ TGF- β 1 konnte als ein Faktor identifiziert werden, der zu einer Transformation der pankreatischen Stellate-Zellen in eine myofibroblastäre Form führt und die Kollagensynthese der Zellen stimuliert^{78, 149}. Thrombozyten scheinen die größte Quelle für TGF- β zu sein. Eine autonome Produktion von TGF- β durch die PSZ konnte beschrieben werden. Ob dies für die Zytokinwirkung bei der Fibrose von Bedeutung ist, wird gegensätzlich diskutiert^{72, 87, 110, 150}. In Studien mit Antikörpern gegen PDGF-BB und TGF- β 1 wurde gezeigt, dass TGF- β 1 die größte Potenz zur Induktion von Matrixneubildung besitzt^{87, 151}.

Einige Studien belegen die Möglichkeit, die Aktivierung von PSZ durch Gabe von TGF- β -Antagonisten zu hemmen und am Modell der Maus sogar umzukehren¹⁴⁹. Ähnlich verhält es sich mit Interleukin-1 und Interleukin-6^{110, 150}. In vielen Organen geht die pathologische

Fibrogenese mit vermehrt exprimiertem TGF- β 1 einher, so zum Beispiel in der Leber, Lunge und den Nieren ¹⁵².

TGF- β erhöht auch die Produktion der Metallo-Matrix-Proteinase 2 (MMP2), welche das basale Membrankollagen degradiert ¹⁵⁷. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass der Verlust von „normalem“ (Matrix)-Kollagen, und der Ersatz durch anomales (fibrilläres) Kollagen die Fibrose verursacht. Am Modell der Maus wurde gezeigt, daß es durch ein fehlerhaftes TGF- β 1 Signal zu keiner pankreatischen Fibrose nach mehrfacher Cerulein-Stimulierung kam ¹⁵⁸. TGF- β 1 scheint also eine Schlüsselrolle in der Fibrosierung von Geweben, insbesondere im Pankreas zu spielen ^{87, 110}.

Eine Stimulierung der autokrinen Expression von IL-1 β und IL-6 erfolgt durch die Zugabe von TGF- β 1, wie auch IL-1 β und IL-6 die Expression von TGF- β 1 in pankreatischen Stellate Zellen fördern ^{153, 154}. Da in der Literatur eine Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8, PDGF und TGF- β 1 ^{80, 155, 156} durch Stellate-Zellen beschrieben wurde, sollten primäre PSZ und Lat hinsichtlich der Zytokinsynthese verglichen werden.

Alle Zellen in unseren Versuchen exprimierten TGF- β 1, sowohl in den FKS-IMDM-Medien als auch im serumfreien Medium. Die stärkste Expression zeigten frühe und späte Differenzierungsstadien der PSZ unter serumfreien Bedingungen. Sowohl die Lat-7, als auch die Lat-14 exprimieren TGF- β 1 entsprechend den PSZ, aus denen sie gewonnen worden waren.

Außer durch oxidativen Stress und durch Wachstumsfaktoren, wie PDGF oder TGF- β 1, werden PSZ auch durch proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und IL-6 aktiviert ^{111, 159-163}. IL-1 erhöht die α -SMA-Produktion, verändert aber nicht die Zellproliferationsrate oder die Kollagensynthese in kultivierten PSZ ¹¹¹. Von IL-1 wurde bereits eine autonome Produktion durch die PSZ gezeigt. ¹⁵⁰

Einen merklichen Einfluß auf die PSZ-Aktivierung sollen auch Azinuszellen und Leukozyten ausüben, welche durch eine Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF- α bewirkt wird ^{111, 159, 164}. Aus der Literatur ist bekannt, dass IL-1 und IL-6 in den frühen Stadien der akuten Pankreatitis vermehrt exprimiert werden und diese Zytokine zur Entwicklung einer pankreatischen Fibrose beitragen können ^{111, 159, 160}.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich, dass IL-1 β von den Zellen im unstimulierten Zustand nicht sezerniert wird. Eine Steigerung der Expression mit zunehmendem Differenzierungsstadium deutet sich an. In einem späteren Differenzierungsstadium (Tag 16) konnte eine signifikante Expression durch PDGF-Stimulation erzielt werden sowohl im Medium mit als auch ohne Serum.

Es besteht eine Korrelation zwischen der Konzentration von IL-6 im Serum und dem Schweregrad einer Pankreatitis ¹⁶⁵. Aus diesem Grund werden Serumspiegel von IL-6 als klinische Indikatoren für den Schweregrad der akuten Pankreatitis verwendet. Der hauptsächliche Ursprung von IL-6 scheinen Makrophagen zu sein, die im inflammatorischen Infiltrat der Bauchspeicheldrüse aktiviert sind. Auch pankreatische Azinus-Zellen können diese Zytokine während einer experimentellen akuten Pankreatitis exprimieren ^{159, 166}. Die Sekretion von IL-6 erfolgt früh, wenn auch später als die von IL-1 und TNF- α , welche als „Akute-Phase-Proteine“ gelten. IL-6 reguliert unter anderem die Expression von IL-1 und TNF- α ¹⁶⁷.

IL-6 inhibiert die Proliferation und vermindert die Expression von α -SMA ¹¹¹. Dies scheint anderen Effekten dieses Interleukins entgegen zu wirken und unterstreicht die komplexe Rolle, welche es in der chronischen Pankreatitis spielt.

Im Vergleich von Lat und PSZ kam es zu einer deutlichen Expression von IL-6 bei PSZ, die am 3. Tag gewonnen wurden. Bei den PSZ späterer Differenzierungsstadien und den Lat im serumfreien Medium war eine geringere Expression von IL-6 zu verzeichnen, die jedoch durch den Zusatz von PDGF signifikant gesteigert werden konnte. Der Literatur zufolge ist der IL-6 in den Anfangsstadien von Pankreatitiden stark erhöht ^{111, 159, 160}. IL-6 vermindert nicht nur die α -SMA-Produktion, sondern reduziert auch Zellproliferation und Kollagensynthese. *In vivo* wird IL-6 als Reaktion auf erhöhte IL-1 und α -TGF-Spiegel produziert ¹¹¹. An hepatischen Stellate-Zellen konnte durch IL-6 eine Herabregulation von IL-1 und TNF- α gezeigt werden ¹⁶⁸. Da IL-6 zu Beginn der Aktivierung von PSZ stark exprimiert wurde, könnte dieses ein Grund für die geringe Expression von IL-1 zu dieser Zeit sein. Die IL-6 Konzentration im Medium könnte eine mögliche IL-1 Expression unterdrücken.

In der Literatur werden bei Zytokinmessungen an Stellate-Zellen meist Zellkulturmedien mit FKS beschrieben ⁸⁷. Da im FKS-Medium verschiedenste Faktoren vorliegen, die einen regulierenden Effekt besitzen könnten, wurden alle Versuche parallel mit serumfreiem Medium durchgeführt. Allerdings befand sich in diesem Medium Insulin, welches auch proliferationsstimulierende Effekte besitzt.

Bei der Diskussion von Zytokinsynthese und -konzentrationen muß daran erinnert werden, dass *in vivo* während eines inflammatorischen Prozesses viele Zytokine gleichzeitig wirken und es aus diesem Grund zu synergistischen, komplementären oder antagonistischen Effekten kommen kann.

Bei dem Vergleich der Expression von TGF- β 1, IL-1 β und IL-6 zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den PSZ und den Lats. Somit können die Lat-Zelllinien auch bei die Zytokinsynthese betreffenden Fragestellungen eingesetzt werden.

4.6 Etablierung pankreatischer Stellate- Zelllinien im Vergleich zu Lat

In der Literatur sind gegenwärtig drei verschiedene Zelllinien von pankreatischen Stellate-Zellen bekannt. Eine Zelllinie der Ratte wurde durch Klonierung aus Kulturen der PSZ gewonnen. Die Autoren gehen von einer spontanen Immortalisierung aus¹⁶⁹. Eine weitere Zelllinie konnte durch Transfektion von PSZ der Ratte mit SV-40 gewonnen werden⁹⁵. Neben diesen Zelllinien der Ratte wurde auch über die erfolgreiche Immortalisierung humaner PSZ durch Transfektion mit dem SV-40 large-T-Antigen berichtet⁹⁴.

Die nach spontaner Immortalisierung gewonnene PSZ-Zelllinie wurde als SIPS (Spontaneous immortalized pancreatic stellate cells) bezeichnet. Die Zellen exprimierten α -SMA, GFAP, Vimentin und Desmin, Type I Collagen, Fibronectin und Prolylhydroxylasen. Die Proliferation ließ sich durch PDGF steigern. Die Zellen waren negativ für Telomeraseaktivität und p53-Expression. Weiterhin konnten durch Stimulation mit IL-1 β das AP-1 (activator-protein 1), NF κ B (nuclear factor- κ B) und MAP-Kinasen aktiviert werden. Im Unterschied zu unseren Lat-7 und Lat-14-Zelllinien handelt es sich bei den SIPS offenbar um Zellen späterer Differenzierungsstadien, so dass fraglich ist, ob Untersuchungen damit repräsentativ für Stellate-Zellfunktionen sind.

Die mit SV-40 immortalisierte Zelllinie der Ratte wurde als SAM-K-Zellen bezeichnet. Diese Zellen exprimierten auch α -SMA, GFAP, Typ I Kollagen, Fibronectin und Prolylhydroxylasen. Die Proliferation ließ sich durch PDGF steigern, IL-1 β aktivierte NF κ B, AP-1 und drei Klassen von MAP-Kinasen. Ein wesentlicher Unterschied zu den SIPS bestand in der Expression von p53. Die SAM-K exprimierten in hohem Maße p53, während sich kein p53 bei den SIPS nachweisen ließ. p53 ist ein Tumorsuppressor, der als Transskriptionsfaktor die Expression von Genen reguliert, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der Induktion der Apoptose oder der DNS-Reparatur beteiligt sind. Da die SAM-K-Zellen im frühen Stadium der Aktivierung der PSZ etabliert wurden, entsprechen sie eher den primären PSZ.

Die humanen immortalisierten Zellen exprimierten bei ähnlichem Phänotyp α -SMA, Vimentin, GFAP und Desmin. Durch TGF- β 1 konnte eine höhere Expression von α -SMA, Kollagen Typ I und Fibronectin erreicht werden. PDGF stimulierte die Proliferation. Eine Kultivierung der Zellen *in vitro* auf Matrigel mit Zusatz von N-Acetylcystein führte zu einer

Deaktivierung der Zellen mit Einlagerung von Vitamin-A-Speichervakuolen. Da die PSZ durch Auswachsen aus Resektatmaterial gewonnen wurden, entsprechen sie Myofibroblasten. Prozesse der Aktivierung der PSZ lassen sich somit kaum an dieser Zelllinie untersuchen.

Sowohl beide beschriebenen immortalisierten PSZ-Zelllinien der Ratte als auch die humane Zelllinie wurden bisher nicht in weiterführenden Arbeiten eingesetzt.

Zusammenfassend konnten zwei Zelllinien unterschiedlicher Aktivierungsstadien (Lat-7, Lat-14) der PSZ etabliert werden. Es ließ sich zeigen, dass dabei der Phänotyp der Ursprungszellen weitestgehend erhalten blieb. Die Zellen exprimierten Vimentin, α -SMA, Desmin und GFAP. Durch PDGF und bFGF ließ sich die Proliferation steigern, wie durch Retinoate hemmen. Die Expression von TGF- β 1 und IL-6 konnte nachgewiesen werden. Somit handelt es sich um Zelllinien, welche den Phänotyp einzelner Stadien des Aktivierungsprozesses repräsentieren. Die Lat-Zelllinie wurden inzwischen auch in weiterführenden Arbeiten eingesetzt im Gegensatz zu den anderen in der Literatur beschriebenen Zelllinien.

5. Zusammenfassung

Aktiviert pankreatische Stellate-Zellen nehmen als Produzenten der intrazellulären Matrix eine Schlüsselstellung in der Entwicklung der Fibrose bei chronischer Pankreatitis ein. Da humane Zellen nur in begrenztem Maße zur Verfügung stehen, erfolgen zahlreiche Untersuchungen an den PSZ der Ratte. Die Gewinnung und Kultivierung primärer PSZ ist jedoch aufwendig und führt häufig zu heterogenen Ergebnissen bei dem Einsatz von Zellen aus unterschiedlichen Präparationen. Zelllinien in verschiedenen Stadien der Aktivierung wären daher wertvoll zur Erforschung von molekularen Mechanismen der Fibrose im Pankreas. Ziel der Arbeit war der Vergleich von zwei immortalisierten Zelllinien der PSZ mit primären PSZ der Ratte hinsichtlich der Morphologie, der Proliferation und der Zytokinsynthese.

Primäre Stellate-Zellen wurden aus dem Pankreas männlicher LEW.1W Ratten gewonnen. Am 7. und 14. Tag nach der Isolierung erfolgte mittels retroviralem Gentransfer des SV-40-large-T-Antigens die Etablierung der zwei immortalisierten Zelllinien Lat-7 und Lat-14. Die Zelllinien konnten über ein Jahr kultiviert werden, wobei ihre typische Morphologie erhalten blieb.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung ließ sich die Expression von Vimentin, α -SMA, Desmin und GFAP nachweisen. Die Proliferation unter Stimulation mit den Zytokinen PDGF und bFGF wurde mit der BrdU-Methode erfasst. Die Freisetzung von TGF- β 1, IL-1 β und IL-6 in serumhaltiges und -freies Zellkulturmedium der PSZ konnte mit Hilfe von ELISA-Kits gemessen werden.

Vimentin wurde gleichermaßen von den Lat und den PSZ exprimiert. Bei der Expression von α -SMA waren die Lat-7 mit dem 7. Tag und die Lat-14 mit dem 14. Tag der Aktivierung der primären PSZ vergleichbar. Desmin wurde nicht von allen primären PSZ exprimiert. Sowohl die Lat-7 als auch die Lat-14 wiesen eine Expression von Desmin und GFAP auf.

Bei allen drei Zellpopulationen ließ sich die Proliferation durch PDGF und bFGF steigern. Die Stimulation der Proliferation durch PDGF war durch spezifische Antikörper hemmbar, wie an den Lat-7 gezeigt werden konnte.

Sowohl die Lat-7 und Lat-14, als auch die PSZ des 3., 7. und 16. Tages nach der Isolierung, exprimierten TGF- β 1. Dies konnte im 5%FKS-haltigen Medium und im serumfreien System gezeigt werden. In beiden Medien ließ sich in allen Zellen die Expression von TGF- β 1 durch Zusatz von 50 ng/ml PDGF signifikant gegenüber den nicht stimulierten Zellen steigern.

Eine signifikante Zunahme der IL-6 Konzentration in den Zellkulturüberständen ließ sich bei den PSZ des 3., des 7. und des 16. Tages nach der Isolierung in beiden verwendeten Medien gegenüber den Kontrollen zeigen. Unter Zugabe von PDGF nahm die Expression von IL-6 weiter zu, wobei die weitaus höchsten Werte bei den PSZ am 3. Tag der Aktivierung erreicht wurden. Die Lat-7 und Lat-14 exprimierten IL-6 ohne Stimulation nur im serumfreien Medium. Hier führte der Zusatz von PDGF auch zur Stimulation der Expression in den Zellkulturen.

Die Zytokinmessungen im Zellkulturüberstand von Lat-7, Lat-14 und PSZ zeigten, dass IL-1 β nur von den aktivierten PSZ (16. Tag) nach Stimulation mit PDGF freigesetzt wurde.

Die zwei etablierten immortalisierten Zelllinien pankreatischer Stellate-Zellen waren bei der Expression der Zellmarker Vimentin, α -SMA, Desmin und GFAP mit den primären PSZ vergleichbar. Auch bei der Stimulation der Zellpopulationen durch PDGF und bFGF zeigten sich ähnliche Reaktionen bei den Lat-7 und Lat-14 wie bei den primären PSZ. Bei der Zytokinsynthese traten Unterschiede zwischen primären PSZ und Zelllinien lediglich bei dem Nachweis von IL-6 und IL-1 auf.

Die Zelllinie Lat-7 wies wesentliche Merkmale von PSZ im frühen Stadium der Aktivierung auf, die Zelllinie Lat-14 entsprach einem späteren Stadium. Beide Zelllinien sind somit als Modellsysteme für PSZ einsetzbar, wobei die an diesen Zellpopulationen gewonnenen Ergebnisse jeweils durch Untersuchungen an primären PSZ bestätigt werden müssen.

5. Thesen

These 1

Aktivierte pankreatische Stellate-Zellen (PSZ) nehmen als Produzenten der intrazellulären Matrix eine Schlüsselstellung in der Entwicklung der Fibrose bei chronischer Pankreatitis ein. Da humane Zellen nur in begrenztem Maße zur Verfügung stehen, erfolgen zahlreiche Untersuchungen an den PSZ der Ratte.

These 2:

Die Gewinnung und Kultivierung primärer PSZ ist aufwendig und führt häufig zu heterogenen Ergebnissen bei dem Einsatz von Zellen aus unterschiedlichen Präparationen. Zelllinien in verschiedenen Stadien der Aktivierung sind daher zur Erforschung von molekularen Mechanismen der Fibrogenese im Pankreas erforderlich.

These 3:

Primäre Stellate-Zellen werden aus dem Pankreas männlicher LEW.1W Ratten gewonnen. Am 7. und 14. Tag nach der Isolierung erfolgt mittels retroviralem Gentransfer des SV-40 Large-T-Antigens die Etablierung der zwei immortalisierten Zelllinien Lat-7 und Lat-14. Die Zelllinien konnten über ein Jahr kultiviert werden, wobei ihre typische Morphologie erhalten blieb.

These 4:

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung ließ sich die Expression von Vimentin, α -Smooth Muscle Actin (α -SMA), Desmin und Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) nachweisen. Die Proliferation unter Stimulation mit den Zytokinen Platelet derived growth factor (PDGF) und basic Fibroblast growth factor (bFGF) wurde mit der BrdU-Methode erfasst. Die Freisetzung von Transforming growth factor (TGF)- β 1, IL-6 und IL-1 β in das Zellkulturmedium der PSZ konnte mit Hilfe von ELISA-Kits gemessen werden.

These 5:

Vimentin wurde gleichermaßen von den Lat und den PSZ exprimiert. Bei der Expression von α -SMA waren die Lat-7 mit dem 7. Tag und die Lat-14 mit dem 14. Tag der Aktivierung der primären PSZ vergleichbar.

These 6:

Desmin als Marker von pankreatischen Stellate-Zellen, wurde sowohl von primären PSZ als auch von den Lat-7 und Lat-14 in ähnlicher Struktur und Intensität exprimiert. Die Markierung von GFAP nahm mit zunehmendem Differenzierungsgrad der PSZ ab. Die Lat-7 und Lat-14 exprimierten GFAP entsprechend ihren Ursprungszellen.

These 7:

Durch PDGF und bFGF wurde die Proliferation der Lat-7 und Lat-14 stimuliert. Dies entsprach der Proliferationssteigerung in primären PSZ. Der Einfluß des PDGF auf die Zellpopulationen war bei den Lat-7 durch spezifische Antikörper hemmbar.

These 8:

Entsprechend den primären PSZ konnte durch Retinol die Proliferation der Lat-7 und Lat-14 gehemmt werden. In gleicher Weise wurde die Proliferation der Lat-7 und Lat-14 durch all-trans Retinoat und 9-cis Retinoat inhibiert. Die lichtmikroskopisch erfasste Reduktion vitaler Zellen weist auf eine toxische Wirkung der Retinoide als eine Ursache der reduzierten Proliferation hin.

These 9:

Sowohl die Lat-7 und Lat-14, als auch die PSZ des 3., 7. und 16. Tages nach der Isolierung exprimierten TGF- β 1. Dies war im 5%FKS-haltigen Medium und im serumfreien System erkennbar. In beiden Medien ließ sich in allen Zellen die Expression von TGF- β 1 durch Zusatz von 50 ng/ml PDGF signifikant gegenüber den nichtstimulierten Zellen steigern.

These 10:

Eine signifikante Zunahme der IL-6 Konzentration in den Zellkulturüberständen ließ sich bei den PSZ des 3., des 7. und des 16. Tages nach der Isolierung in beiden verwendeten Medien gegenüber den Kontrollen zeigen. Unter Zugabe von PDGF nahm die Expression von IL-6 weiter zu, wobei die weitaus höchsten Werte bei den PSZ am 3. Tag der Aktivierung erreicht wurden.

These 11:

Die Lat-7 und Lat-14 exprimierten IL-6 ohne Stimulation nur im serumfreien Medium. Hier führte der Zusatz von PDGF auch zur Stimulation der Zytokinfreisetzung in den Zellkulturen.

These 12:

Die Zytokinmessungen im Zellkulturüberstand von Lat-7, Lat-14 und PSZ zeigten, dass IL-1 β nur von den aktivierten PSZ (16. Tag) nach Stimulation mit PDGF freigesetzt wurde.

These 13:

Die Zelllinie Lat-7 weist wesentliche Merkmale von PSZ im frühen Stadium der Aktivierung auf, die Zelllinie Lat-14 entspricht einem späteren Stadium.

These 14:

Beide Zelllinien sind somit als Modellsysteme für PSZ einsetzbar, wobei die an diesen Zellpopulationen gewonnenen Ergebnisse jeweils durch Untersuchungen an primären PSZ bestätigt werden müssen.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| AIP | autoimmune Pankreatitis |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| BrdU | Bromdeoxyuridin |
| CP | chronische Pankreatitis |
| CFTR | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CT | Computertomographie |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ELISA | Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay |
| ERP | endoskopisch retrograde Pankreatographie |
| ERCP | endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatographie |
| ESWL | extrakorporale Stoßwellenlithotripsie |
| FKS | fetales Kälberserum |
| GFAP | glial fibrillar acidic protein |
| HBSS | Hanks Balanced Salt Solution |
| HSZ | hepatischen Stellate Zellen |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL-1 β | Interleukin 1 β |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| IL-8 | Interleukin 8 |
| IL-15 | Interleukin 15 |
| IMDM-Medium | Iscove's modified Dulbecco's Medium |
| K | Kontrollgruppe |
| KG | Körpergewicht |
| Lat-7 | large-T-Antigen transfizierte pankreatische Stellate Zelllinie des 7.Tages nach der Isolierung |
| Lat-14 | large-T-Antigen transfizierte pankreatische Stellate Zelllinie des 14.Tages nach der Isolierung |
| MAP | mitogen aktiviertes Protein |
| MAPK | Mitogen aktivierte Protein-Kinase |
| MRCP | Magnetresonanz-Cholangio-Pankreatographie |
| MRT | Magnetresonanztomographie |

| | |
|------------------|---|
| NF κ B | nuclear factor- κ B |
| PBS | Phosphate buffered Saline |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| PDGF-Ak(BB) | platelet derived growth factor-Antikörper, Isoform BB |
| POD | Peroxidase |
| PSZ | primäre Stellate Zellen |
| RAR | retinoic acid receptor |
| RXR | retinoid X receptor |
| SV-40 LT-Antigen | simian virus 40 large T Antigen |
| TGF- β 1 | transforming growth factor |
| α -SMA | alpha smooth muscle actin |
| γ -GT | gamma glutamyl transpeptidase |

7. Literaturverzeichnis

1. CC M. History of Medicine. Philadelphia: The Blakiston Co., 1947.
2. Daremberg C RE. Oeuvres de Rufus d'Ephese. Paris, 1879.
3. Modlin IM. Regnier de Graaf: Paris, purging, and the pancreas. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30:109-13.
4. T C. A singular case of diabetes, consisting entirely in the quantity of urine with an inquiry into the different theories of that disease. *London Medical Journal* 1788; 9:286.
5. Modlin IM, Kidd M. Ernest Starling and the discovery of secretin. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32:187-92.
6. Opie E. The Etiology of Acute Hemorrhagic Pancreatitis. Vol. 12: *Bull John Hopkins Hospital*, 1901:182-188.
7. Chiari H. Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Z. d. Heilkunde* 1896; 17:69-96.
8. Suda K, Shiotsu H, Nakamura T, Akai J. Pancreatic fibrosis in patients with chronic alcohol abuse: correlation with alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:2060-2.
9. Lankisch PGL, Peter. Chronische Pankreatitis: Update-Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 2000; 33:2169-2177.
10. Sarner M, Cotton PB. Classification of pancreatitis. *Gut* 1984; 25:756-9.
11. Bozkurt T, Braun U, Leferink S, Gilly G, Lux G. Comparison of pancreatic morphology and exocrine functional impairment in patients with chronic pancreatitis. *Gut* 1994; 35:1132-6.
12. Siegmund E, Lohr JM, Schuff-Werner P. [The diagnostic validity of non-invasive pancreatic function tests--a meta-analysis]. *Z Gastroenterol* 2004; 42:1117-28.
13. Luetmer PH, Stephens DH, Ward EM. Chronic pancreatitis: reassessment with current CT. *Radiology* 1989; 171:353-7.
14. Wiersema MJ, Hawes RH, Lehman GA, Kochman ML, Sherman S, Kopecky KK. Prospective evaluation of endoscopic ultrasonography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography in patients with chronic abdominal pain of suspected pancreatic origin. *Endoscopy* 1993; 25:555-64.
15. Kahl S, Glasbrenner B, Leodolter A, Pross M, Schulz HU, Malfertheiner P. EUS in the diagnosis of early chronic pancreatitis: a prospective follow-up study. *Gastrointest Endosc* 2002; 55:507-11.
16. Layer P, Yamamoto H, Kalthoff L, Clain JE, Bakken LJ, DiMagno EP. The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1994; 107:1481-7.
17. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993; 328:1433-7.
18. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:442-6.
19. Talamini G, Bassi C, Falconi M, et al. Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 1999; 44:1303-11.
20. Ammann RW, Muellhaupt B. The natural history of pain in alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116:1132-40.

21. Ammann RW, Akovbiantz A, Largiader F, Schueler G. Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients. *Gastroenterology* 1984; 86:820-8.
22. Cavallini G, Frulloni L, Pederzoli P, et al. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis in Italy. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:880-9.
23. Lankisch PG, Lohr-Happe A, Otto J, Creutzfeldt W. Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease. *Digestion* 1993; 54:148-55.
24. Strum WB, Spiro HM. Chronic pancreatitis. *Ann Intern Med* 1971; 74:264-77.
25. Nakamura T, Imamura K, Takebe K, et al. Correlation between pancreatic endocrine and exocrine function and characteristics of pancreatic endocrine function in patients with diabetes mellitus owing to chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1996; 20:169-75.
26. Strate T, Yekebas E, Knoefel WT, Bloechle C, Izbicki JR. Pathogenesis and the natural course of chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:929-34.
27. Sarles HS, J. Die chronische Pankreatitis. *Handbuch der Inneren Medizin*. Vol. 3. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1976:737-844.
28. Ihse I, Gasslander T. Surgical treatment of pain in chronic pancreatitis: the role of pancreaticojejunostomy. *Acta Chir Scand* 1990; 156:299-301.
29. Brown A, Hughes M, Tenner S, Banks PA. Does pancreatic enzyme supplementation reduce pain in patients with chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:2032-5.
30. Delhaye M, Vandermeeren A, Baize M, Cremer M. Extracorporeal shock-wave lithotripsy of pancreatic calculi. *Gastroenterology* 1992; 102:610-20.
31. Adamek HE, Jakobs R, Buttman A, Adamek MU, Schneider AR, Riemann JF. Long term follow up of patients with chronic pancreatitis and pancreatic stones treated with extracorporeal shock wave lithotripsy. *Gut* 1999; 45:402-5.
32. Gulliver DJ, Edmunds S, Baker ME, et al. Stent placement for benign pancreatic diseases: correlation between ERCP findings and clinical response. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 159:751-5.
33. DiMagno EP. Toward understanding (and management) of painful chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116:1252-7.
34. Schoenberg MH SW, Beger HG. Die chirurgische Therapie der chronischen Pankreatitis. *Dtsch Arztebl* 1999; 1999:625-631.
35. Keim V. [Pancreatitis: from chronic inflammation to cancer]. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129 Suppl 2:S94-5.
36. Robinette CD, Hrubec Z, Fraumeni JF, Jr. Chronic alcoholism and subsequent mortality in World War II veterans. *Am J Epidemiol* 1979; 109:687-700.
37. Hartwig W, Werner J, Ryschich E, et al. Cigarette smoke enhances ethanol-induced pancreatic injury. *Pancreas* 2000; 21:272-8.
38. Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Sugimoto Y, Kitagawa M. Chronic alcoholism and evolution of pain and prognosis in chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1989; 34:33-8.
39. Lankisch PG, Lowenfels AB, Maisonneuve P. What is the risk of alcoholic pancreatitis in heavy drinkers? *Pancreas* 2002; 25:411-2.
40. Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, Apte MV. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health* 2007; 30:48-54.
41. White IR, Altmann DR, Nanchahal K. Alcohol consumption and mortality: modelling risks for men and women at different ages. *Bmj* 2002; 325:191.
42. Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, et al. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology* 2007; 133:1293-303.

43. Ammann RW, Heitz PU, Kloppel G. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study. *Gastroenterology* 1996; 111:224-31.
44. Bordalo O, Goncalves D, Noronha M, Cristina ML, Salgado A, Dreiling DA. Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1977; 68:278-85.
45. Sarles H, Bernard JP, Johnson C. Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis. *Annu Rev Med* 1989; 40:453-68.
46. Braganza JM. The pathogenesis of chronic pancreatitis. *Qjm* 1996; 89:243-50.
47. Gregg JA. Pancreas divisum: its association with pancreatitis. *Am J Surg* 1977; 134:539-43.
48. DiMagno EP. A short, eclectic history of exocrine pancreatic insufficiency and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1993; 104:1255-62.
49. Sidhu SS, Tandon RK. The pathogenesis of chronic pancreatitis. *Postgrad Med J* 1995; 71:67-70.
50. Kloppel G. Progression from acute to chronic pancreatitis. A pathologist's view. *Surg Clin North Am* 1999; 79:801-14.
51. Kloppel G, Maillet B. Chronic pancreatitis: evolution of the disease. *Hepatogastroenterology* 1991; 38:408-12.
52. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14:141-5.
53. Witt H, Luck W, Hennies HC, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000; 25:213-6.
54. Sharer N, Schwarz M, Malone G, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339:645-52.
55. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339:653-8.
56. Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology* 2001; 121:1310-9.
57. Jaster R, Emrich J. Molecular characteristics of autoimmune pancreatitis. *Curr Pharm Des* 2006; 12:3781-6.
58. Sarles H, Sarles JC, Muratore R, Guien C. Chronic inflammatory sclerosis of the pancreas--an autonomous pancreatic disease? *Am J Dig Dis* 1961; 6:688-98.
59. Epstein O, Chapman RW, Lake-Bakaar G, Foo AY, Rosalki SB, Sherlock S. The pancreas in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1982; 83:1177-82.
60. Montefusco PP, Geiss AC, Bronzo RL, Randall S, Kahn E, McKinley MJ. Sclerosing cholangitis, chronic pancreatitis, and Sjogren's syndrome: a syndrome complex. *Am J Surg* 1984; 147:822-6.
61. Kamisawa T, Egawa N, Nakajima H. Autoimmune pancreatitis is a systemic autoimmune disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2811-2.
62. Shinji A, Sano K, Hamano H, et al. Autoimmune pancreatitis is closely associated with gastric ulcer presenting with abundant IgG4-bearing plasma cell infiltration. *Gastrointest Endosc* 2004; 59:506-11.
63. Takeda S, Haratake J, Kasai T, Takaeda C, Takazakura E. IgG4-associated idiopathic tubulointerstitial nephritis complicating autoimmune pancreatitis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:474-6.

64. Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40:1561-8.
65. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993; 7:812-21.
66. Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115:421-32.
67. Longnecker DS. Pathology and pathogenesis of diseases of the pancreas. *Am J Pathol* 1982; 107:103-21.
68. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001; 120:682-707.
69. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998; 43:128-33.
70. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-50.
71. Apte MV, Wilson JS. Stellate cell activation in alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27:316-20.
72. Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, et al. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281:C532-43.
73. Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 1989; 7:980-2, 984-6, 989-90.
74. Lundberg C, Martinez-Serrano A, Cattaneo E, McKay RD, Bjorklund A. Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol* 1997; 145:342-60.
75. Markowitz D, Goff S, Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 1988; 167:400-6.
76. Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MK. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 1995; 69:7430-6.
77. Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1982; 58:837-58.
78. Apte MV, Haber PS, Darby SJ, et al. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 1999; 44:534-41.
79. McCarroll JA, Phillips PA, Park S, et al. Pancreatic stellate cell activation by ethanol and acetaldehyde: is it mediated by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway? *Pancreas* 2003; 27:150-60.
80. Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995; 22:28-36.
81. Fitzner B, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Involvement of AP-1 proteins in pancreatic stellate cell activation in vitro. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:414-20.
82. Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut* 2002; 51:579-84.
83. Sparmann G, Hohenadl C, Tornoe J, et al. Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287:G211-9.
84. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, et al. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 1999; 155:1087-95.

85. Casini A, Galli A, Pignalosa P, et al. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J Pathol* 2000; 192:81-9.
86. Ebert M, Kasper HU, Hernberg S, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor (PDGF) B chain and type beta PDGF receptor in human chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43:567-74.
87. Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, et al. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest* 2000; 80:47-55.
88. Sparmann G, Behrend S, Merkord J, et al. Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Dig Dis Sci* 2001; 46:1647-56.
89. Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, et al. Increased expression of acidic and basic fibroblast growth factors in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 1994; 144:117-28.
90. Sparmann G, Glass A, Brock P, et al. Inhibition of lymphocyte apoptosis by pancreatic stellate cells: impact of interleukin-15. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289:G842-51.
91. Emmrich J, Weber I, Nausch M, et al. Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion* 1998; 59:192-8.
92. Glass A, Kundt G, Brock P, et al. Delayed response toward activation stimuli in pancreatic stellate cells. *Pancreas* 2006; 33:293-300.
93. Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol Cancer* 2004; 3:26.
94. Jesnowski R, Furst D, Ringel J, et al. Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab Invest* 2005; 85:1276-91.
95. Satoh M, Masamune A, Sakai Y, Kikuta K, Hamada H, Shimosegawa T. Establishment and characterization of a simian virus 40-immortalized rat pancreatic stellate cell line. *Tohoku J Exp Med* 2002; 198:55-69.
96. Conzen SD, Cole CN. The three transforming regions of SV40 T antigen are required for immortalization of primary mouse embryo fibroblasts. *Oncogene* 1995; 11:2295-302.
97. Powell AJ, Darmon AJ, Gonos ES, Lam EW, Peden KW, Jat PS. Different functions are required for initiation and maintenance of immortalization of rat embryo fibroblasts by SV40 large T antigen. *Oncogene* 1999; 18:7343-50.
98. Ray FA, Peabody DS, Cooper JL, Cram LS, Kraemer PM. SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts. *J Cell Biochem* 1990; 42:13-31.
99. Lohr M, Muller P, Zauner I, et al. Immortalized bovine pancreatic duct cells become tumorigenic after transfection with mutant k-ras. *Virchows Arch* 2001; 438:581-90.
100. Delgado JP, Parouchev A, Allain JE, et al. Long-term controlled immortalization of a primate hepatic progenitor cell line after Simian virus 40 T-Antigen gene transfer. *Oncogene* 2005; 24:541-51.
101. Banerjee A, Srivatsan E, Hashimoto T, et al. Immortalization of fibroblasts from two patients with hereditary retinoblastoma. *Anticancer Res* 1992; 12:1347-54.
102. Truckenmiller ME, Tornatore C, Wright RD, et al. A truncated SV40 large T antigen lacking the p53 binding domain overcomes p53-induced growth arrest and immortalizes primary mesencephalic cells. *Cell Tissue Res* 1998; 291:175-89.
103. Thompson DL, Kalderon D, Smith AE, Tevethia MJ. Dissociation of Rb-binding and anchorage-independent growth from immortalization and tumorigenicity using SV40

- mutants producing N-terminally truncated large T antigens. *Virology* 1990; 178:15-34.
104. Sladek TL, Jacobberger JW. Simian virus 40 large T-antigen expression decreases the G1 and increases the G2 + M cell cycle phase durations in exponentially growing cells. *J Virol* 1992; 66:1059-65.
 105. Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Folsch UR, Schafer H, Schmidt WE. Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid/stellate cells. *Pancreas* 2001; 23:49-54.
 106. Bulow R, Fitzner B, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Antifibrogenic effects of histone deacetylase inhibitors on pancreatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2007.
 107. Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989; 84:1780-5.
 108. Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 1989; 84:1786-93.
 109. Ross R. Platelet-derived growth factor. *Lancet* 1989; 1:1179-82.
 110. Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Folsch UR, Schmidt WE. TGFbeta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul Pept* 2000; 90:47-52.
 111. Mews P, Phillips P, Fahmy R, et al. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut* 2002; 50:535-41.
 112. Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 1994; 269:32023-6.
 113. Pinzani M, Knauss TC, Pierce GF, et al. Mitogenic signals for platelet-derived growth factor isoforms in liver fat-storing cells. *Am J Physiol* 1991; 260:C485-91.
 114. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Kume K, Shimosegawa T. Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *Tohoku J Exp Med* 2003; 199:69-84.
 115. Ebert M, Yokoyama M, Ishiwata T, et al. Alteration of fibroblast growth factor and receptor expression after acute pancreatitis in humans. *Pancreas* 1999; 18:240-6.
 116. McCarroll JA, Phillips PA, Santucci N, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut* 2006; 55:79-89.
 117. Jaster R, Hilgendorf I, Fitzner B, et al. Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-trans retinoic acid. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:633-41.
 118. Davis BH, Vucic A. The effect of retinol on Ito cell proliferation in vitro. *Hepatology* 1988; 8:788-93.
 119. Davis BH, Kramer RT, Davidson NO. Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, and transforming growth factor beta production. *J Clin Invest* 1990; 86:2062-70.
 120. Pinzani M, Gentilini P, Abboud HE. Phenotypical modulation of liver fat-storing cells by retinoids. Influence on unstimulated and growth factor-induced cell proliferation. *J Hepatol* 1992; 14:211-20.
 121. Ohata M, Lin M, Satre M, Tsukamoto H. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am J Physiol* 1997; 272:G589-96.

122. Hu R, Wang YL, Edderkaoui M, Lugea A, Apte MV, Pandol SJ. Ethanol augments PDGF-induced NADPH oxidase activity and proliferation in rat pancreatic stellate cells. *Pancreatology* 2007; 7:332-40.
123. Weiner FR, Blaner WS, Czaja MJ, Shah A, Geerts A. Ito cell expression of a nuclear retinoic acid receptor. *Hepatology* 1992; 15:336-42.
124. Wendling O, Ghyselinck NB, Chambon P, Mark M. Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* 2001; 128:2031-8.
125. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83:835-9.
126. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987; 330:444-50.
127. Leid M, Kastner P, Lyons R, et al. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 1992; 68:377-95.
128. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, et al. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992; 68:397-406.
129. Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, et al. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 1997; 124:313-26.
130. Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 2000; 267:4315-24.
131. Sauvant P, Sapin V, Abergel A, et al. PAV-1, a new rat hepatic stellate cell line converts retinol into retinoic acid, a process altered by ethanol. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34:1017-29.
132. Silveira ER, Naves MM, Vannucchi H, Jordao Junior AA, Dagli ML, Moreno FS. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Nutr Cancer* 2001; 39:244-51.
133. Grimwade D. The pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. *Br J Haematol* 1999; 106:591-613.
134. Warrell RP, Jr., de The H, Wang ZY, Degos L. Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 1993; 329:177-89.
135. Liu TX, Zhang JW, Tao J, et al. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 2000; 96:1496-504.
136. Cassinat B, Chevret S, Zassadowski F, et al. In vitro all-trans retinoic acid sensitivity of acute promyelocytic leukemia blasts: a novel indicator of poor patient outcome. *Blood* 2001; 98:2862-4.
137. Chytil F. Retinoic acid: biochemistry and metabolism. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15:741-7.
138. Bhat PV, Jetten AM. Metabolism of all-trans-retinol and all-trans-retinoic acid in rabbit tracheal epithelial cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1987; 922:18-27.
139. Napoli JL, Race KR. The biosynthesis of retinoic acid from retinol by rat tissues in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1987; 255:95-101.
140. Napoli JL. Retinol metabolism in LLC-PK1 Cells. Characterization of retinoic acid synthesis by an established mammalian cell line. *J Biol Chem* 1986; 261:13592-7.
141. Williams JB, Napoli JL. Metabolism of retinoic acid and retinol during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:4658-62.

142. Bailly J, Crettaz M, Schifflers MH, Marty JP. In vitro metabolism by human skin and fibroblasts of retinol, retinal and retinoic acid. *Exp Dermatol* 1998; 7:27-34.
143. Kang S, Duell EA, Fisher GJ, et al. Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid binding proteins characteristic of retinoic acid but without measurable retinoic acid levels or irritation. *J Invest Dermatol* 1995; 105:549-56.
144. Saurat JH, Didierjean L, Masgrau E, et al. Topical retinaldehyde on human skin: biologic effects and tolerance. *J Invest Dermatol* 1994; 103:770-4.
145. Massague J. Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 1992; 69:1067-70.
146. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:5788-92.
147. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1987; 165:251-6.
148. Friess H, Lu Z, Riesle E, et al. Enhanced expression of TGF-betas and their receptors in human acute pancreatitis. *Ann Surg* 1998; 227:95-104.
149. Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, et al. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. *Lab Invest* 2004; 84:1610-8.
150. Shek FW, Benyon RC, Walker FM, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 2002; 160:1787-98.
151. Breitkopf K, Sawitza I, Westhoff JH, Wickert L, Dooley S, Gressner AM. Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor beta effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut* 2005; 54:673-81.
152. Polyak K. Negative regulation of cell growth by TGF beta. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1242:185-99.
153. Aoki H, Ohnishi H, Hama K, et al. Autocrine loop between TGF-beta1 and IL-1beta through Smad3- and ERK-dependent pathways in rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:C1100-8.
154. Aoki H, Ohnishi H, Hama K, et al. Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem* 2006; 99:221-8.
155. Andoh A, Takaya H, Saotome T, et al. Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Gastroenterology* 2000; 119:211-9.
156. Knittel T, Kobold D, Saile B, et al. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999; 117:1205-21.
157. Phillips PA, McCarroll JA, Park S, et al. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 2003; 52:275-82.
158. Yoo BM, Yeo M, Oh TY, et al. Amelioration of pancreatic fibrosis in mice with defective TGF-beta signaling. *Pancreas* 2005; 30:e71-9.
159. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175:76-83.
160. Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; 82:6-13.
161. Farkas G, Jr., Takacs T, Mandi Y, Balogh A. TGF-beta 1 and IL-6--new aspects in pancreas regeneration? *Acta Chir Hung* 1997; 36:89-91.

162. Brock P, Sparmann G, Ritter T, Jaster R, Liebe S, Emmrich J. Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 into pancreatic stellate cells promotes interleukin-10 expression. *J Cell Mol Med* 2006; 10:884-95.
163. Fitzner B, Brock P, Nechutova H, et al. Inhibitory effects of interferon-gamma on activation of rat pancreatic stellate cells are mediated by STAT1 and involve down-regulation of CTGF expression. *Cell Signal* 2007; 19:782-90.
164. Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest* 2002; 82:1359-68.
165. Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, et al. Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 1997; 14:1-8.
166. Vaccaro MI, Ropolo A, Grasso D, et al. Pancreatic acinar cells submitted to stress activate TNF-alpha gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268:485-90.
167. Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Kandefier-Zerszen M. Serum levels of cytokines in alcoholic liver cirrhosis and pancreatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000; 48:301-7.
168. Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Brand HS, Sala M, Chamuleau RA. Interleukin-6 production by human liver (myo)fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL-1 beta and TNF alpha. *J Hepatol* 1995; 23:295-306.
169. Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Establishment and characterization of a rat pancreatic stellate cell line by spontaneous immortalization. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2751-8.
170. Jaster R, Lichte P, Fitzner B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med* 2005; 9:670-82.

8. Anlagen

Selbständigkeitserklärung

Diese Dissertation wurde weder gegenwärtig noch in der Vergangenheit bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 17.06.2008

Carsten Behrendt

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|--------------------------|
| Name | Carsten Wilhelm Behrendt |
| Geburt | 25.05.1977 in Pasewalk |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch |
| Familienstand | verheiratet |

Bildung

| | |
|-------------------|--|
| 10/1983 – 06/1995 | Schulbesuch in Pasewalk, Abitur |
| 07/1995 – 08/1996 | Zivildienst im Kreiskrankenhaus Pasewalk |

Universitäre Ausbildung

| | |
|-------------------|---|
| 10/1996 – 03/2004 | Medizinstudium an der Universität Rostock |
| 10/1999 – 07/2000 | Medizinstudium an der Université de Nancy, Frankreich |
| 05/2004 | 3. Staatsexamen |

Famulaturen

| | |
|-------------------|-------------------------------|
| 02/1998 – 03/1998 | Kardiologie, Pasewalk |
| 10/1999 – 12/1999 | Neurologie, Nancy, Frankreich |
| 01/2000 – 04/2000 | Pneumologie, Nancy |
| 05/2000 – 07/2000 | Kardiologie, Nancy |
| 02/2001 – 03/2001 | Chirurgie, Wexford, Irland |

Praktisches Jahr

| | |
|-------------------|---|
| 04/2003 – 08/2003 | Innere Medizin, Brown University, Providence, USA |
| 09/2003 – 11/2003 | Viszeralchirurgie, La Plata, Argentinien |
| 12/2003 – 03/2004 | Orthopädie und Traumatologie, Genf, Schweiz |

Ärztliche Tätigkeit

| | |
|------------------|--|
| 01/2005- 09/2007 | Klinik für Orthopädie, Martin-Luther-Universität Halle |
| seit 10/2007 | Klinik für Orthopädie und Traumatologie, Helios Kliniken Schwerin |