

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock,
Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Georg Lamprecht

Forschungslabor für Gastroenterologie

Leiter: Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster

Antifibrotische Effekte verschiedener Vitamin D-Derivate auf murine pankreatische Sternzellen

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor
der Medizin der Universitätsmedizin Rostock

Gutachter:

Prof. Dr. Robert Jaster, Universität Rostock, Universitätsmedizin

Prof. Dr. Burkhard Hinz, Universität Rostock, Universitätsmedizin

PD Dr. I. Ekin Demir, Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar

vorgelegt von:

Peter Wallbaum, geboren am 02.09.1992 in Detmold

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

Inhaltsverzeichnis

1. Grundlagen	1
1.1 Stand der Forschung	1
1.1.1 Die chronische Pankreatitis	1
1.1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.1.2 Ätiologie	1
1.1.1.3 Pathophysiologie	2
1.1.1.4 Diagnostik	2
1.1.1.5 Klinik, Therapie und Komplikationen	2
1.1.2 Das Pankreaskarzinom	3
1.1.2.1 Epidemiologie	3
1.1.2.2 Ätiologie	4
1.1.2.3 Pathophysiologie	5
1.1.2.4 Diagnostik	5
1.1.2.5 Klinik und Therapie	5
1.1.3 Die Rolle pankreatischer Sternzellen bei der Fibrogenese	7
1.1.3.1 Erstbeschreibung und Begriffsprägung	7
1.1.3.2 Charakteristika von PSZ im ruhenden Zustand	7
1.1.3.3 Aktivierungsmechanismen von PSZ und deren Folgen	8
1.1.3.4 Interaktion zwischen PSZ und Tumorzellen	11
1.1.3.5 Stromadepletion und Stromamodulation als Therapieansätze	11
1.1.4 D-Vitamine	13
1.1.4.1 Grundlagen	13
1.1.4.2 Vitamin D-Effekte	14
1.1.4.3 Der Einfluss von D-Vitaminen auf PSZ	15
1.2. Zielstellung der Arbeit	16
2. Materialien	17
2.1 Verwendete Geräte	17
2.2 Verwendete Software	19
2.3 Allgemeine Labormaterialien	19
2.4 Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur	20
2.5 Lösungen für die Zellproliferationsmessung	21
2.6 Lösungen und Reagenzien für die Ölrotfärbung	22
2.7 Lösungen und Reagenzien für die α-SMA Immunfluoreszenzfärbung	22
2.8 Lösungen und Reagenzien für die β-Galactosidase-Färbung	23
2.9 Lösungen und Reagenzien für die Nukleinsäureanalytik	24
2.10 Lösungen und Antikörper für die Proteinanalytik	26
2.11 Lösungen für die IL-6-Bestimmung	29
3. Methoden	30
3.1 Verwendete Zellen und deren Isolation	30
3.2 Zellkulturarbeiten	30
3.3 Kultivierung und Passagierung der Zellen	30

3.4 DMSO	31
3.5 Quantifizierung des Zellwachstums	32
3.6 Nachweis von Lipidtröpfchen mittels Ölrotfärbung	33
3.7 α-SMA-Immunfluoreszenzfärbung	34
3.8 Seneszenz-assoziierte-β-Galactosidase-Färbung	35
3.9 Nukleinsäureanalytik	36
3.9.1 RNA-Isolation	36
3.9.2 DNA-Verdau	36
3.9.3 Photometrische RNA-Bestimmung	37
3.9.4 cDNA-Synthese	37
3.9.5 Quantitative Echtzeit-PCR	37
3.10 Proteinanalytik	39
3.10.1 Probengewinnung	39
3.10.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.10.3 Proteintransfer auf PVDF-Membran	41
3.10.4 Spezifischer Proteinnachweis	42
3.11 IL-6-Analyse mittels ELISA	43
3.12 Statistische Auswertung	44
4. Ergebnisse	45
4.1 Mikroskopische Beobachtungen kultivierter pankreatischer Sternzellen	45
4.2 Effekte der Vitamin D-Derivate auf die Zelltodrate passagierter PSZ	45
4.3 Einfluss der Vitamin D-Derivate auf das Proliferationsverhalten von PSZ	47
4.4 Wirkungen der Vitamin D-Derivate auf die Ausprägung der Lipidspeicher in den PSZ	50
4.5 Effekte der D-Vitamine auf die Ausprägung von α-SMA-Fasern in den PSZ	52
4.6 Einflüsse der Vitamin D-Derivate auf die Seneszenz von PSZ	54
4.7 Effekte der D-Vitamine auf die Expression ausgewählter PSZ-Gene	56
4.8 Wirkungen der Vitamin D-Derivate auf die Expression ausgewählter Proteine der PSZ	59
4.9 Die Wirkungen der D-Vitamine auf die IL-6-Konzentrationen im Kulturmedium der PSZ	62
5. Diskussion	63
5.1 Vitamin D-Effekte auf vollständig aktivierte PSZ	63
5.1.1 Auswirkungen auf das Zellwachstum	63
5.1.2 Effekte auf die Zelltodrate	64
5.1.3 Auswirkungen auf die Ausprägung von Lipidtröpfchen	64
5.1.4 Einfluss auf die Ausbildung von α -SMA-Fasern	65
5.1.5 Effekte auf die Seneszenz	65
5.1.6 Auswirkungen auf die Expression ausgewählter Gene	66
5.1.7 Einfluss auf die IL-6 Konzentration im Kulturmedium	68
5.1.8 Antifibrotische Effekte der D-Vitamine auf vollständig aktivierte PSZ	68
5.2 Vitamin D-Effekte auf frühe aktivierte PSZ	71
5.2.1 Auswirkungen auf die Zellproliferation	71
5.2.2 Einfluss auf die Ausbildung von Lipidtröpfchen	71

5.2.3 Effekte auf die Ausprägung von α -SMA-Fasern	72
5.2.4 Auswirkungen auf ausgewählte Proteine	72
5.2.5 Antifibrotische Effekte der D-Vitamine auf ruhende PSZ	73
5.3 Integrative Betrachtung und Ausblick	75
6. Zusammenfassung	76
7. Thesen	I
8. Literaturverzeichnis	II
9. Abkürzungsverzeichnis	XVI
10. Herstellerverzeichnis	XX
11. Lebenslauf	XXIII
12. Danksagung	XXIV
13. Selbstständigkeitserklärung	XXV

1. Grundlagen

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Die chronische Pankreatitis

1.1.1.1 Epidemiologie

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine progredient fortschreitende Erkrankung, die das Pankreas irreversibel schädigt und zur Pankreas-Fibrose führt. Diese Prozesse können sowohl zu einer exokrinen als auch zu einer endokrinen Pankreas-Insuffizienz beitragen.

In Deutschland erkranken jährlich 6-7/100000 Menschen neu an der CP, wobei der Erkrankungsgipfel mit 45 – 54 Jahren etwa 10 Jahre nach dem der akuten Pankreatitis liegt. Dies legt nahe, dass aus einer akuten Pankreatitis eine chronische Pankreatitis hervorgehen kann (Lankisch *et al.*, 2002). Jedoch unterscheidet sich der Altersgipfel der CP stark in Abhängigkeit von der Ätiologie der Erkrankung (Witt *et al.*, 2007). Insgesamt sind Männer mindestens zweimal so häufig von der CP betroffen wie Frauen (Levy *et al.*, 2014).

1.1.1.2 Ätiologie

Die Ursache für die Entwicklung einer CP ist oft multifaktoriell. Die TIGAR-O-Klassifikation stellt die Risikofaktoren zur Entstehung einer CP zusammen. Hier wird zwischen toxisch-metabolischen, idiopathischen, genetischen, autoimmunen, rezidivierend auftretenden akuten Pankreatiden und obstruktiven Ursachen unterschieden (Etemad *et al.*, 2001). Übermäßiger Alkoholkonsum ist mit 44,5% die häufigste Ursache für die Entstehung einer CP (Coté *et al.*, 2011), wobei schon 13,5 g Alkohol pro Tag als Risikofaktor für die Entwicklung einer CP diskutiert werden (Di Leo *et al.*, 2017). Auch Tabakkonsum wirkt sich negativ auf die Entwicklung einer CP aus. Rauchen wirkt Prognose-verschlechternd und fördert eine frühe Manifestation der Erkrankung (Maisonneuve *et al.*, 2005). Oftmals gehen alkoholbedingte chronische Pankreatiden mit einem zusätzlichen genetischen Defekt einher, der mit der Entstehung der CP assoziiert ist (Di Leo *et al.*, 2017), sodass Alkohol als alleinige Ursache einer CP viel seltener auftritt als früher vermutet (Coté *et al.*, 2011).

Als Auslöser der genetisch bedingten CP wird das *PRSS1*-Gen betrachtet, das für das kationische Trypsinogen kodiert (Whitcomb *et al.*, 1996). Mutationen im *PRSS1*-Gen, die einen Basenaustausch von Histidin anstelle von Arginin bedingen (Etemad *et al.*, 2001), können zu einer erhöhten Trypsinogen-Aktivierung innerhalb des Pankreas und somit zur Autodigestion führen (Witt *et al.*, 2007). Menschen mit diesem Gendefekt besitzen ein mehr als 1000-fach höheres relatives Risiko, eine CP zu entwickeln, als solche ohne jegliche Risikofaktoren (Mössner *et al.*, 2010)

Mutationen in *CFTR*-, *PRSS2*-, *CTRB*- und *SPINK1*-Genen gelten auch als Risikofaktoren für eine CP, wobei das relative Risiko hier deutlich geringer als bei einem *PRSS1*-Gendefekt ist (ebd.). *SPINK1* hemmt die Trypsinogen-Aktivierung (Brock *et al.*, 2013), sodass Veränderungen im *SPINK1*-Gen ebenfalls eine Autodigestion des Pankreas fördern und somit als Risikofaktor zur Pathogenese der CP herangezogen werden können (Pfützner *et al.*, 2000). Bei den idiopathischen chronischen Pankreatiden, die mit knapp 40% am zweithäufigsten als Auslöser der CP auftreten (Coté *et al.*, 2011), unterscheidet man anhand des Manifestationsalters der CP zwischen einer *early-onset* Form (Manifestation um das 23. Lebensjahr) und einer *late-onset* Form (Manifestation um das 62. Lebensjahr) (Witt *et al.*, 2007), wobei sich beide Formen auch anhand der Schmerzquantität und der Pankreasdestruktion differenzieren lassen (Layer *et al.*, 1994).

Jedoch wird die Diagnose idiopathische CP inzwischen seltener gestellt, da früher als idiopathische CP klassifizierte Erkrankungen heute, aufgrund verbesserter genetischer Methoden und deren Anwendung, als genetisch bedingte Pankreatiden erkannt und beurteilt werden (Raphael *et al.*, 2016).

1.1.1.3 Pathophysiologie

Wiederholt dargebotene pathologische Stimuli, wie beispielsweise Ethanol, rufen im Pankreas eine chronische Entzündung mit Gewebsnekrosen hervor. Dieses nekrotische Gewebe wird infolge von Umbauprozessen zu bindegewebigem Narbengewebe umgebaut, was Klöppel *et al.*, 1992 als Nekrose-Fibrose-Sequenz bezeichneten. Dieses nun entstandene Bindegewebe kann nicht mehr abgebaut werden und führt zur irreversiblen Pankreas-Fibrose, die durch Gangobstruktionen und Konkrementbildung weiterhin zur Abflussbehinderung beitragen kann. Ab einem bestimmten Punkt schreitet dieser Prozess sogar nach Beseitigung der auslösenden Noxe voran, was zu einer Progredienz der Pankreas-Fibrose führt.

1.1.1.4. Diagnostik

Zur Diagnostik der CP wird ein schrittweises Vorgehen nach dem STEP-Schema (*survey, tomographie, endoscopy, pancreas function*) empfohlen. Hierbei werden invasivitätssteigernd zunächst klinische Symptome erfragt, eine körperliche Untersuchung vorgenommen und Blutwerte ausgewertet, bevor in einem zweiten Schritt eine CT-Aufnahme angefertigt werden kann. Die Endosonografie (EUS) und Pankreasfunktionstests können als weitere Diagnostika eingesetzt werden (Conwell *et al.*, 2014).

1.1.1.5 Klinik, Therapie und Komplikationen

Patienten mit CP klagen oft über einen Oberbauchschmerz, der gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen kann und einen hohen Leidensdruck bedingt. Eine Steatorrhoe ist ein Symptom, das auf der exokrinen Insuffizienz des Pankreas fußt und erst bei einer Lipase-Konzentration

unter 10% des Normwertes auftritt (Dimagno *et al.*, 1973). Darüber hinaus weisen ein Gewichtsverlust und ein Mangel an fettlöslichen Vitaminen mit Symptomen wie Osteomalazie (Vitamin D), Nachtblindheit (Vitamin A) und Gerinnungsstörungen (Vitamin K) auf eine Malabsorption hin. Zeichen der endokrinen Insuffizienz ist ein Diabetes mellitus Typ 3c, der regelhaft, aber erst spät, im Krankheitsverlauf auftritt (Mössner *et al.*, 2010).

Im Vordergrund der Therapie der CP steht die adäquate Schmerzbehandlung und die damit einhergehende Wiederherstellung der Lebensqualität der Patienten (Issa *et al.*, 2013). Diese interdisziplinäre Herausforderung sollte priorisiert werden und bei konservativem Therapieversagen eine chirurgische Intervention erfolgen, die einem endoskopischen Vorgehen überlegen scheint (D´Haese *et al.*, 2014).

Auch eine Mangelernährung, die auf Malabsorptionsprozessen infolge der exokrinen Insuffizienz und einem gesteigerten Stoffwechsel aufgrund der schweren Erkrankung fußt, sollte behandelt werden (Rasmussen *et al.*, 2013). Hier sollten vor allem Pankreasenzyme substituiert werden, die auch helfen können, einen Mangel an fettlöslichen Vitaminen (Ewald *et al.*, 2013) und eine Steatorrhoe zu verhindern. Zwischen 30% und 60% aller an CP erkrankten Patienten entwickeln Komplikationen, die einer Intervention bedürfen (Mayerle *et al.*, 2013). Zur Behandlung von Verlegungen des Pankreasganges empfiehlt die *European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE)* (Dumonceau *et al.*, 2012) eine endoskopische Stentimplantation mit Wechsel innerhalb eines Jahres. Pseudozysten sollten endoskopisch oder chirurgisch drainiert, chirurgisch reseziert oder laparoskopisch anastomosiert werden. Hierbei wird eine individuelle Abwägung in Bezug auf das Therapieverfahren empfohlen (Lerch *et al.*, 2009).

Eine gefürchtete Komplikation der CP ist das Pankreaskarzinom, welches bei 13,3% aller Patienten mit chronischer Pankreatitis auftritt. Dabei vergehen etwa zehn bis zwanzig Jahre zwischen der Inzidenz der CP und der malignen Entartung (Raimondi *et al.*, 2010).

1.1.2 Das Pankreaskarzinom

1.1.2.1 Epidemiologie

Das Adenokarzinom, im weiteren Pankreaskarzinom (PK), des Pankreas ist mit über 95% die häufigste bösartige Neubildung des Pankreas, die auf malignen Entartungen des exokrinen Anteils fußt. Die 5-Jahres-Überlebensrate in den Vereinigten Staaten ist mit knapp über 8% sehr gering (*U.S. National Cancer Institute; Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER)*). Dies liegt daran, dass das PK oft, aufgrund mangelnder oder unspezifischer Symptome, erst im Spätstadium diagnostiziert wird. Somit haben Patienten, die unter einem PK leiden, die niedrigste Überlebensrate aller an bösartigen Neubildungen erkrankten

Personen in Deutschland. Obwohl die Inzidenz des PK mit 17130 Menschen im Jahr 2014 eher gering war, ist diese Form der bösartigen Neoplasie, aufgrund der hohen Mortalität von 16615 Menschen, die vierthäufigste Todesursache unter allen Krebserkrankungen in Deutschland (Krebs in Deutschland 2013/2014, Robert Koch Institut). Insgesamt erkranken etwa 30% mehr Männer am PK als Frauen (Shaib *et al.*, 2006).

1.1.2.2 Ätiologie

Die Ursache des PK ist oft multifaktoriell. Dennoch werden einige Risikofaktoren als vordergründig für die Entstehung des PK angesehen. So steht ein erhöhter *Body Mass Index* in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für die Genese eines PK, wobei das Risiko in Abhängigkeit des Grades des Übergewichts zunimmt. Bei adipösen Patienten manifestiert sich die Erkrankung früher und die Überlebensrate ist geringer (Li *et al.*, 2009). Auch Tabakkonsum gehört zu den Risikofaktoren, die ein PK begünstigen. Auch hier nimmt die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung mit dem Ausmaß des Konsums zu (Bosetti *et al.*, 2012). Auch ein Diabetes mellitus gilt als Risikofaktor für das Auftreten eines PK, wobei ein möglicher Zusammenhang dadurch begründet wird, dass Patienten mit einem erst kürzlich diagnostizierten Diabetes mellitus eine um 50% höhere Wahrscheinlichkeit haben, ein PK zu entwickeln als solche Patienten, die schon lange an dieser Erkrankung leiden (Huxley *et al.*, 2005). Obwohl Alkoholkonsum oft als Risikofaktor für das PK diskutiert wird, führen erst 30 g Alkohol pro Tag zu einer moderaten Risikoerhöhung, sodass Alkohol direkt nur ein unwesentlicher Faktor in der Entstehung des PK ist (Genkinger *et al.*, 2009). Das PK gehört zu den gefürchteten Komplikationen der CP, sodass auch die CP, und damit indirekt auch der Alkoholenuss, als Risikofaktor für ein PK aufgeführt werden muss (Talamini *et al.*, 1999). Schon im Jahre 1960 stellten Aird *et al.* ein erhöhtes Auftreten des PK in Abhängigkeit der Blutgruppe fest. So wurde herausgearbeitet, dass vor allem Menschen mit der Blutgruppe A eine Prädisposition für das PK haben. Patienten, die unter den autosomal-dominant vererbten Krankheiten des Peutz-Jeghers-Syndroms (Hearle *et al.*, 2006) und der familiären adenomatösen Polyposis (Giardiello *et al.*, 1993) leiden, haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko, an einem PK zu erkranken. Die oben genannten Risikofaktoren können zu Genveränderungen führen, die in unterschiedlichem Ausmaß und Schweregrad in 97% aller PK nachgewiesen werden können. Dabei dominieren Mutationen im *KRAS*-Gen mit einer Frequenz von 70%-95%, im *TP53*-Gen in 20%-76% der Fälle, im *CDKN2*-Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 49%-98% und im *SMAD4*-Gen mit einer Frequenz von 19%-50% (Cicenas *et al.*, 2017). Weniger häufig können Mutationen im *BRCA1* (6,6%-14%) und *BRCA2* (3,6%-7,5%) nachgewiesen werden (ebd.). Alle genannten Gene sind zentral an der Regulation von Signaltransduktions-Prozessen, von Wachstumsfaktoren, der Apoptose und der Zellteilung beteiligt.

1.1.2.3 Pathophysiologie

Die Entstehung des PK ist ein schrittweiser Prozess, der häufig mit der Ausbildung von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) beginnt. Solche PanINs sind eine mikroskopische Diagnose und durch flache oder papilläre, nicht invasiv wachsende, epitheliale Neubildungen innerhalb der Pankreasgänge gekennzeichnet. Die Zellen sind Muzin-reich sowie atypischer Morphe. PanINs werden in drei mikroskopische Ausprägungsgrade unterteilt, wobei sich lediglich Typ 3 unmittelbar zum invasiven Karzinom entwickeln kann (Hruban *et al.*, 2004). Als Auslöser dieser PanINs werden Punktmutationen im *KRAS*-Onkogen, einem wichtigen Regulator von Signaltransduktions- und Wachstumsprozessen, diskutiert (Hingorani *et al.*, 2003). Dabei stehen vor allem Punktmutationen im Codon 12 des *KRAS*-Gens im Vordergrund. In 49% aller Mutationen wird die Purin-Base Guanin für Adenin ausgetauscht, in 39% Guanin für Thymin und in 12% Guanin für Cytosin (Hruban *et al.*, 1993). Lühr *et al.* stellten 2005 fest, dass die Anzahl der *KRAS*-Mutationen in Abhängigkeit des Schweregrades der PanINs steigt. Waren in PanIN 1a Läsionen gerade einmal 36% aller Zellen mutiert, so wiesen 86% aller Zellen in PanIN 2 oder 3 Läsionen Punktmutationen im *KRAS*-Onkogen auf.

Rauchen erhöht die Wahrscheinlichkeit von *KRAS*-Mutationen in Zusammenhang mit einem PK. Während Patienten mit PK, die nie geraucht haben, lediglich in 68% aller Zellen *KRAS*-Mutationen aufwiesen, konnten bei Rauchern in Abhängigkeit der Intensität des Rauchens *KRAS*-Mutationen in 80% aller Zellen nachgewiesen werden (Hruban *et al.*, 1993).

1.1.2.4 Diagnostik

Aufgrund der unspezifischen Symptome des PK ist es oft schwierig zu entscheiden, bei welchen Symptomen eine Abklärung des PK erfolgen sollte. Die S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom von 2013 empfiehlt diagnostische Untersuchungen im Hinblick auf ein PK bei neu aufgetretenen Oberbauch- oder Rückenschmerzen, schmerzlosem Ikterus und erstmalig aufgetretener akuter Pankreatitis. Zur Abklärung des PK werden die Oberbauchsonografie, die Endosonografie, CT- und MRCP-Untersuchungen angewendet. Um die Ausdehnung des Tumors zu bewerten, haben sich die Endosonografie und die Multidetektor-CT bewährt. Zum Staging des PK gehören die Abdomensonografie, die Multidetektor-CT und ein Röntgen-Thorax zum Standard.

1.1.2.5 Klinik und Therapie

Die klinischen Symptome des PK sind sehr unspezifisch, was eine frühzeitige Diagnose erschwert und dazu beiträgt, dass das PK oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Schmidt-Hansen *et al.*, 2016 untersuchten in einer Meta-Analyse das Risiko eines PK in Abhängigkeit der Symptome der Patienten, die mit dem PK in Verbindung gebracht werden.

Hier konnte festgestellt werden, dass Patienten, die sich mit einem Ikterus vorstellten, ein um 4% erhöhtes Risiko aufwiesen, ein PK zu haben. Weitere Symptome, die auf ein PK hinweisen könnten, wie Bauchschmerzen, Leberfunktionsstörungen, erhöhte Entzündungsparameter, auffällige Laborparameter und ungewollter Gewichtsverlust, korrelieren weniger stark mit der Diagnose PK.

Da das PK oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, ist eine kurative Behandlung durch eine *in toto* Resektion des Karzinoms oft nicht mehr möglich. Dennoch kann bei Patienten ohne Fernmetastasen und mit grenzwertig resektablen Neubildungen eine neoadjuvante Radiochemotherapie versucht werden, um nach *Down-Staging* eine anschließende kurative R0-Resektion des PK in Erwägung zu ziehen (Hüser *et al.*, 2010). Die R0-Resektion des Tumors ist die einzige kurative Therapieoption des PK. Laut S3-Leitlinie des exokrinen Pankreaskarzinom von 2013 stellt eine Tumorfunktion des *Truncus coeliacus* und/oder der *Arteria mesenterica superior* ein Ausschlusskriterium für eine Pankreasresektion dar. Dies gilt nicht für einen Befall der anatomisch dicht liegenden venösen Gefäße der *Venae portae, mesenterica superior* und *lienalis*. Das Resektionsverfahren unterscheidet sich in Abhängigkeit der Lokalisation des Tumors, wobei in jedem Fall mindestens zehn regionäre Lymphknoten reseziert werden sollten. Im Anschluss an eine R0-Resektion sollte leitliniengerecht eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5'-Fluoruracil/Folinsäure für sechs Monate durchgeführt werden. Gleiches gilt für eine additive Chemotherapie infolge einer R1-Resektion.

Lokal fortgeschrittene und/oder metastasierte PK werden im Rahmen der Palliation, gemäß oben genannter Leitlinie, chemotherapiert und supportiv behandelt. Dieses Vorgehen hat sich gegenüber der alleinigen supportiven Therapie als überlegen gezeigt. Hier gilt Gemcitabin ebenfalls als Mittel der ersten Wahl, wobei eine Kombination dieses Medikaments mit dem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib beim metastasierten PK probiert werden kann. Patienten in einem guten Allgemeinzustand können auch mit dem Chemotherapeutikum FOLFIRINOX, einem Präparat aus Oxaliplatin, Irinotecan, Leucovirin und 5'-Fluoruracil, therapiert werden. Auch die Kombinationstherapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel sollte als palliative Therapieoption in Erwägung gezogen werden (Kang *et al.*, 2018).

Palliative Behandlungskonzepte beinhalten außerdem die Therapie von Obstruktionen der Gallenwege und des Duodenums. Hier stehen endoskopische Stentanlagen und operative Bypassoperationen zur Verfügung, die nach individueller Evaluation ausgewählt und eingesetzt werden.

1.1.3 Die Rolle pankreatischer Sternzellen bei der Fibrogenese

1.1.3.1 Erstbeschreibung und Begriffsprägung

Im Vordergrund der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms steht der bindegewebige Umbau des Pankreas. Für diese Fibrogenese sind vor allem pankreatische Sternzellen (PSZ) verantwortlich. Diese wurden im Jahre 1984 von Watari *et al.* als Vitamin A-speichernde Zellen erstmalig beschrieben. Eine erste Isolierung und Charakterisierung dieses Zelltyps gelang Apte *et al.* und Bachem *et al.* im Jahre 1998. Zur Isolierung machte sich die Forschungsgruppe um Minoti Apte den hohen Anteil an Lipidtröpfchen innerhalb des Zytoplasmas der PSZ zunutze, was eine geringere Dichte dieser Zellen im Vergleich zu anderen Zellen des Pankreas begründete. So konnten die PSZ, mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, aufgereinigt werden. Bachem *et al.* gewannen die Zellen hingegen mit der sogenannten Auswachs-Methode aus kultivierten pankreatischen Gewebestückchen.

Beide Forschungsgruppen beschrieben die Zellen morphologisch in Analogie zu hepatischen Sternzellen, was die Begriffsprägung als PSZ erklärt.

Apte *et al.* zeigten, dass etwa 4% aller Pankreaszellen als PSZ klassifiziert werden können, die vor allem im Stroma vorkommen. Dabei zeichnen sich die PSZ durch Vitamin A-haltige Lipidtröpfchen sowie das Vorhandensein der Intermediärfilamente Desmin und des *glial fibrillary acidic proteins* (GFAP) aus. Des Weiteren wurde postuliert, dass sich PSZ gut kultivieren lassen und diese auch nach 24-stündiger Kultivierung noch keine *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA)-Filamente aufweisen.

1.1.3.2 Charakteristika von PSZ im ruhenden Zustand

Weiterführende Forschungen konnten zeigen, dass PSZ im gesunden Pankreas maßgeblich für das Gleichgewicht der Extrazellulärmatrix (EZM) verantwortlich sind. So exprimieren PSZ sowohl Matrix-Metalloproteasen (MMPs) als auch deren Inhibitoren (*tissue inhibitor of metalloproteasen* (TIMPs)) (Phillips *et al.*, 2003). Im physiologischen Zustand werden die PSZ auch als ruhende PSZ bezeichnet, was daran liegt, dass PSZ in diesem Zustand kaum proliferieren, nur selten in andere Gewebe migrieren und insgesamt wenig EZM produzieren (Apte *et al.*, 2012). Auch die eingangs erwähnte Eigenschaft der Vitamin A-Speicherung in Lipidtröpfchen ist ein Charakteristikum für ruhende PSZ. Die Ausbildung der Lipidtröpfchen ist, so zeigten Kim *et al.*, 2009, albuminabhängig, sodass die Ausprägung der Lipidtröpfchen im Zytoplasma der PSZ durch Albumin getriggert werden kann.

Darüber hinaus werden PSZ auch Funktionen in der Immunmodulation zugeschrieben. PSZ exprimieren mehrere *toll like-receptors* (TLR) auf der Zelloberfläche, die verschiedene *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen und über unterschiedliche

Signalkaskaden Chemokine freisetzen können. Des Weiteren sind PSZ sowohl zur Endo- als auch zur Phagozytose fähig (Masamune *et al.*, 2008). Allerdings exprimieren PSZ keine *major histocompatibility complex-II* (MHC-II)-Moleküle, sodass eine Funktion als Antigen-präsentierende Zellen innerhalb der adaptiven Immunantwort ausgeschlossen werden kann (Shimizu *et al.*, 2012).

Auch werden PSZ Stammzeleigenschaften nachgesagt. So konnten Mato *et al.* im Jahre 2009 zeigen, dass sich PSZ zu Insulin-produzierenden Zellen differenzieren können. Außerdem wiesen sie die Expression des *ATP-binding cassette sub-family G2* (ABCG2)-Transporters als Charakteristikum von Zellen mit Stammzeleigenschaften nach.

Zudem wird diskutiert, ob und inwieweit PSZ zur Enzym-Sekretion der Azinuszellen des Pankreas beitragen. So wurde gezeigt, dass PSZ Cholecystokinin (CCK)-Rezeptoren und alle wichtigen Elemente zur Produktion und Freisetzung von Acetylcholin besitzen, sodass bei Aktivierung der CCK-Rezeptoren Acetylcholin freigesetzt wird, das innerhalb der Azini die Freisetzung von Amylase fördert (Phillips *et al.*, 2010). Sherman *et al.*, 2014 wiesen nach, dass PSZ Vitamin D-Rezeptor (VDR)-positiv sind (1.1.4.3).

1.1.3.3 Aktivierungsmechanismen von PSZ und deren Folgen

Aktivierte PSZ zeichnen sich durch sog. Aktivierungsparameter aus. Dazu gehören Zellproliferation, α -SMA-Expression, Produktion von EZM, Ungleichgewicht der EZM durch vermehrte MMP-Expression, Verlust der Vitamin A-speichernden Lipidtröpfchen, Migrationsprozesse der PSZ, Zytokinfreisetzung und vermehrte Kontraktilität der PSZ (Apte *et al.*, 2012). Diese Aktivierungsvorgänge lassen sich zum einen *in vitro* nachvollziehen, indem man PSZ für mindestens 48 Stunden kultiviert (Apte *et al.*, 2012), zum anderen aber auch durch nachfolgende Faktoren *in vivo* herbeiführen: Alkohol und dessen Abbauprodukt Acetaldehyd triggern innerhalb der PSZ die Aktivierung aller drei Subfamilien (ERK 1/2, JNK, p38-Kinase) des MAPK-Signalwegs, was zur Aktivierung der PSZ führt (McCarroll *et al.*, 2003). Weiter sind Zytokine, die infolge chronischer Pankreatiden ausgeschüttet werden, in der Lage, PSZ zu aktivieren. Dazu gehören der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), die Interleukine-1, -6 und -10 (IL-1, IL-6 und IL-10) (Mews *et al.*, 2002). Auch die Zytokine *transforming growth factor-beta* (TGF- β) und *platelet derived growth factor* (PDGF) sind dosisabhängige Aktivatoren der PSZ (Apte *et al.*, 1999). Dabei stimuliert PDGF die PSZ vor allem über eine Aktivierung des ERK 1/2-Signalwegs, während TGF- β vordergründig den Transkriptionsfaktor SMAD2 hochreguliert (Jaster *et al.*, 2002). Nakamura *et al.* zeigten 2011, dass eine Aktivierung der PSZ auch durch Ansteuerung des TLR-9 durch Bakterien erzielt werden kann. Die Aktivierung der PSZ erfolgt hier wiederum über den ERK 1/2-Signalweg der MAPK-Familie und zieht eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach sich. Auch mononukleäre Zellen des Blutes, wie Lymphozyten und Monozyten, scheinen im Stande zu sein, über eine

Zytokinfreisetzung eine Aktivierung von PSZ zu generieren (Michalski *et al.*, 2007). Des Weiteren sorgen auch hohe Glucose-Spiegel dafür, dass PSZ aktiviert werden.

Ausgelöst durch eine PKC- und p38-Kinasen-Aktivierung, proliferieren die PSZ, bilden vermehrt α -SMA-Fibrillen und synthetisieren in gesteigertem Maße Kollagen-Moleküle (Nomiyama *et al.*, 2007). Auch führt eine Ansteuerung der CCK-Rezeptoren der PSZ durch die physiologischen Stimuli CCK und Gastrin zur Aktivierung der PSZ. Dabei werden wiederum vor allem die profibrotischen Signalwege AKT und ERK 1/2 bedient (Berna *et al.*, 2010).

Die eben beschriebenen Auslöser aktivieren die PSZ, indem sie über unterschiedliche Wege vor allem den profibrotischen Signalweg ERK 1/2 und die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und SMAD 2/3 aktivieren. Die dadurch vermehrt freigesetzten proinflammatorischen und profibrotischen Zytokine wirken nun sowohl auf andere Zellen als auch autokrin, was eine permanente Aktivierung der PSZ fördert (Aoki *et al.*, 2006, 2007; Ohnishi *et al.*, 2004; McCarroll *et al.*, 2004; Jonitz *et al.*, 2009; Uchida *et al.*, 2013, 2014; Karger *et al.*, 2008). Der Aktivierungsprozess der PSZ und die Charakteristika ruhender und aktivierter PSZ sind in Abb. 1.1 zusammenfassend dargestellt.

Darüber hinaus lohnt es, einen Blick auf die Expression von *microRNAs* als Regulatoren der posttranskriptionellen Genexpression zu werfen. So zeigten Masamune *et al.*, 2014, dass verschiedene *microRNAs* innerhalb des Aktivierungsprozesses der PSZ sowohl *Up*- als auch *Down*-reguliert werden. Interessanterweise konnten Veränderungen innerhalb der *microRNAs* auf den Ebenen der Signalkaskaden von p38-Kinase und ERK 1/2 sowie der Transkriptionsfaktoren SMAD 2/3 festgestellt werden.

Dass *microRNAs* eine wichtige Rolle im Aktivierungsprozess der PSZ spielen können, stellten Shen *et al.*, 2012 fest, indem sie eine *Down*-Regulation der *microRNA* 15b und 16 in aktivierten PSZ nachwiesen. Diese *microRNA*-Moleküle sind an der posttranskriptionellen Modifikation des Bcl-2-Proteins, eines wichtigen Regulators der Apoptose, beteiligt. Das Bcl-2-Protein wurde in der Folge der verminderten Expression der *microRNAs* vermehrt exprimiert, was eine verminderte Apoptose-Rate der aktivierten PSZ zur Folge hatte. Die Induktion der *microRNA* 15b und 16 kann demnach die Apoptose-Rate der PSZ fördern und die Proliferation hemmen.

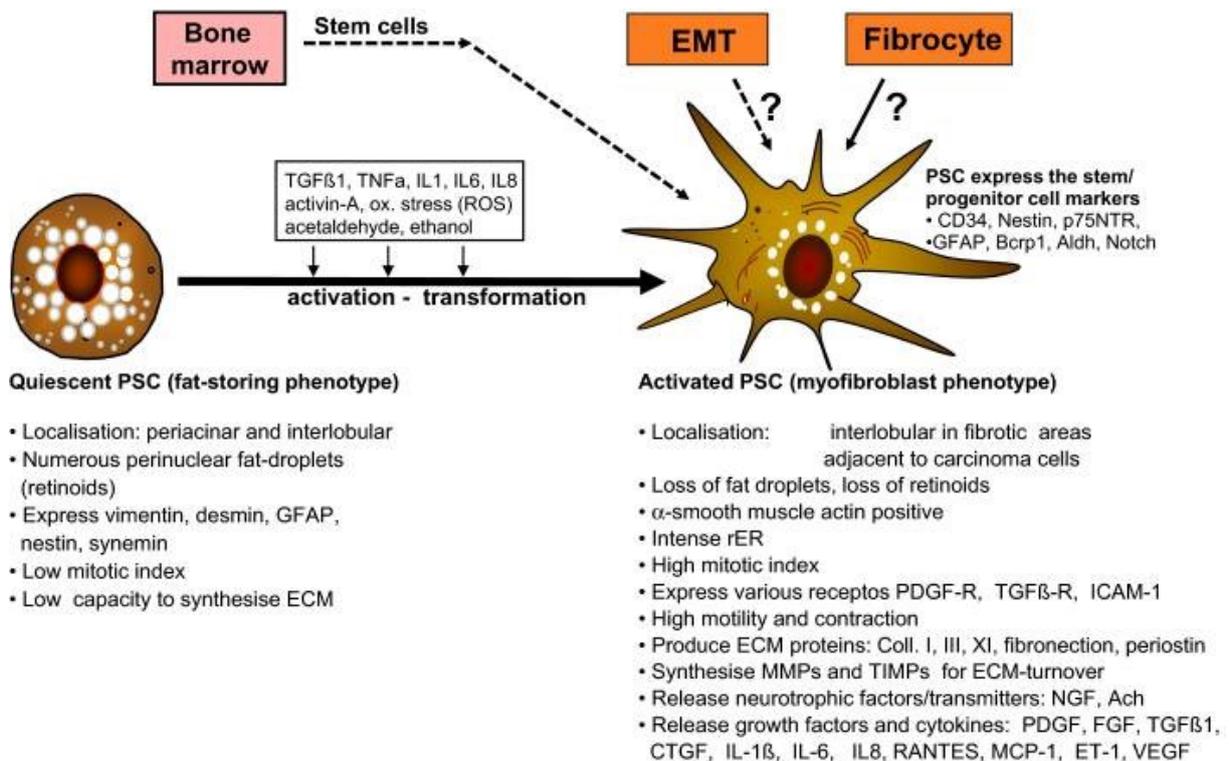


Abb. 1.1: Aktivierung ruhender PSZ

Ruhende PSZ werden durch verschiedene Zytokine, Alkohol, dessen Derivate und oxidativen Stress aktiviert. Aktivierte PSZ verlieren ihre Lipidtröpfchen, synthetisieren viele α-SMA-Fibrillen, die die PSZ zur Motilität und Kontraktion befähigen, proliferieren stark, bilden zahlreiche EZM-Proteine und setzen Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die sowohl parakrin als auch autokrin wirken können.

aus StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research, Erkan *et al.*, *Gut* 2012; 61: 172 – 178, © 2011 mit Genehmigung der BJM Publishing Group Ltd.

Eine kontrollierte und begrenzte Aktivierung der PSZ ist im Sinne einer Wundheilung physiologisch. Eine permanente und überschießende Aktivierung der PSZ im Rahmen einer CP oder eines PK führt zur Pankreasfibrose und wird durch das Ausbleiben der Hemmung, Apoptose oder Seneszenz der aktivierten PSZ begründet. Fitzner *et al.*, 2012 prägten den Begriff der Seneszenz als neuen Faktor der Beendigung der PSZ-Aktivierung. Senescente PSZ prägen nur noch im geringen Maße α-SMA-Fasern aus und sind empfindlich für Zytolyse. PSZ werden durch die massive Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und oxidativen Stress sowie durch die Noxen Ethanol und dessen Abbauprodukt Acetaldehyd beim Krankheitsbild der chronischen Pankreatitis aktiviert. Die durch die PSZ-Aktivierung gesteigerte Synthese von EZM-Proteinen triggert die Bildung der Fibrose (Erkan *et al.*, 2012).

1.1.3.4 Interaktion zwischen PSZ und Tumorzellen

Die gegenseitige Beeinflussung von PSZ und Tumorzellen innerhalb des PK spielt eine wichtige Rolle bei Therapieüberlegungen und neuen Forschungsansätzen.

Vonlaufen *et al.*, 2008 zeigten, dass PSZ von Tumorzellen aktiviert und rekrutiert werden, um in der Folge die Progression des Tumors zu fördern. So sorgten PSZ für eine Vergrößerung des Tumors, induzierten die Bildung von regionalen und Fernmetastasen und regten die Tumorzellen zur Proliferation an. Die Induktion der Proliferation, Migration und verminderten Apoptose der Tumorzellen durch PSZ, so postulierte die Forschungsgruppe weiter, ist dabei PDGF-abhängig.

Hwang *et al.*, 2008 bestätigten die Tumor-vergrößernde und Metastasen-fördernde Wirkung der PSZ in Gegenwart von Tumorzellen. Des Weiteren zeigten sie, dass das Chemotherapeutikum Gemcitabin und eine Radiochemotherapie auf Tumoren, die neben Tumorzellen auch PSZ aufwiesen, geringere Effekte hatten als auf Tumoren ohne PSZ.

Ein wichtiger Faktor in der Interaktion zwischen Tumor und PSZ ist dabei das Protein Periostin. Dieses Protein wird von PSZ freigesetzt, wobei die Freisetzung von Tumorzellen induziert wird. In der Folge wirkt Periostin autokrin auf die PSZ, indem die α -SMA-, die Kollagen-1-, die Fibronectin- und die TGF- β 1-Synthese gesteigert wird (Erkan *et al.*, 2007). Neben diesen profibrotischen Effekten sorgt Periostin außerdem für eine Vergrößerung des Tumorgewebes und wirkt supportiv auf die Umgebung des Tumors ein, indem die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Hypoxie und eine Minderversorgung durch Nährstoffe induziert werden (ebd.).

Masamune *et al.*, 2008 untersuchten den Einfluss von Sauerstoff auf PSZ. Dabei behandelten sie PSZ unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Unter Hypoxie wurden die PSZ aktiviert und schütteten sowohl profibrotische Proteine wie Kollagen-1 als auch proangiogenetische Faktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) aus, um der Hypoxie entgegenzuwirken. Diese Entdeckungen bestätigten Erkan *et al.*, 2009 mit Einschränkungen. So zeigten sie ebenfalls, dass PSZ unter hypoxischen Bedingungen Angiogenese-fördernde Faktoren synthetisierten. In Gegenwart von Tumorzellen wurde diese Angiogenese-fördernde Wirkung wieder relativiert. Zwar induzieren Tumorzellen die VEGF-Synthese innerhalb der PSZ, jedoch regen PSZ bei Hypoxie die Tumorzellen zur Endostatinsynthese an. Endostatin inhibiert die Angiogenese, sodass das Endothel-Wachstum in PSZ und Tumorzell-positiven Bereichen eher gehemmt als gefördert wird.

Dies begründet unter anderem die schlechte Durchblutung der Tumoren und die damit einhergehende Chemoresistenz des PK.

1.1.3.5 Stromadepletion und Stromamodulation als Therapieansätze

Infolge der Erkenntnisse, dass die PSZ im Stroma die Tumorzellen des PK zur Proliferation anregen, Chemoresistenzen vermitteln, die Metastasierung des Tumors fördern, aber

andererseits auch durch die Tumorzellen aktiviert und unterhalten werden, wurde vermehrt versucht, Möglichkeiten zu finden, um dieser Interaktion vorzubeugen.

Dabei stand vor allem das durch aktivierte PSZ vermehrt produzierte Stroma im Vordergrund experimenteller Ansätze. Olive *et al.*, 2009 zeigten, dass nach einer Depletion des Stromas die Vaskularität des Tumorgewebes maßgeblich gefördert wurde und so eine Anflutung des Chemotherapeutikums Gemcitabin verbessert werden konnte. Die Stromadepletion wurde durch eine Hemmung des *sonic hedgehog* (SHH)-Signalwegs in den Tumorzellen induziert. Provenzano *et al.*, 2012 bestätigten diese Erkenntnisse, indem sie die Hyaluronsäure als Hauptbestandteil der EZM des Stromas identifizierten, die Hyaluronsäure durch enzymatische Spaltung eliminierten und zeigten, dass infolge des verminderten Stromas eine verbesserte Durchblutung des Tumors erfolgte.

Auch Jacobetz *et al.*, 2013 konnten eine Verbesserung der Tumolvaskularität in Folge einer Depletion der Hyaluronsäure bestätigen, was zu einem verlängerten Überleben und verminderten Tumorwachstum unter der Therapie mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin führte.

Dass eine solche Depletion des Stromas nicht nur hemmende Effekte auf die Progression des PK hat, postulierten Özdemir *et al.*, 2014. Sie entwarfen ein transgenes Mausmodell, um α -SMA-positive Myofibroblasten, also aktivierte PSZ, in an PK erkrankten Mäusen auszuschalten. Diese genetisch manipulierten Mäuse sprachen unerwartet schlechter auf eine Therapie mit Gemcitabin an und verstarben dementsprechend schneller.

Vor einer unreflektierten Suppression des SHH-Signalwegs in Tumorzellen zur Stromadepletion warnten Rhim *et al.*, 2014. Zwar konnten sie bestätigen, dass unter einer Inhibierung des SHH-Signalwegs die Masse des Stromas abnahm, was jedoch zu einem aggressiveren Tumorwachstum führte. Obwohl die Angiogenese innerhalb des Tumors induziert wurde, konnte erst nach einer Intervention mit einem VEGF-Rezeptor-Antikörper ein verbessertes Überleben erreicht werden. Diese Erkenntnis postuliert entgegen der Annahme von Olive *et al.*, 2009, dass eine Induktion der Stromaproduktion über den SHH-Signalweg die Progression des Tumorwachstums über eine Hemmung der Angiogenese aufhält.

Inwieweit das Stroma nun die Progression des Tumors hemmt oder fördert, ist also höchst umstritten.

Sherman *et al.*, 2014 zeigten, dass eine Modulation des Stromas ein neuer Ansatzpunkt sein könnte, um in die Interaktion zwischen PSZ und Tumorzellen einzugreifen. Dabei wirkte das Vitamin D-Analogon Calcipotriol als Modulator des Stromas, indem unter Einsatz dieses VDR-Liganden die Vaskularität des Tumorgewebes gesteigert wurde und antifibrotische Effekte erzielt werden konnten. Dies führte dazu, dass eine Therapie mit Gemcitabin und Calcipotriol ein verlängertes Überleben im Vergleich zu einer alleinigen Gemcitabin-Therapie bewirkte.

1.1.4 D-Vitamine

1.1.4.1 Grundlagen

Die medizinische Bedeutung des fettlöslichen Vitamin D hat in der jüngeren Vergangenheit enorm zugenommen. Etliche Forschungsgruppen konnten positive Effekte von D-Vitaminen und deren synthetischen Analoga auf Krankheitsbilder verschiedener Organsysteme herausstellen. Demgegenüber stehen eine oftmals unter Vitamin D-Mangel leidende Bevölkerung und die damit einhergehende Nachfrage nach einer Vitamin D-Substitution. In einem Artikel der *ÄrzteZeitung* (2015) von Dagmar Jäger-Becker wurde jedem zweiten Bundesbürger ein Vitamin D-Mangel, also ein Serum-Wert < 30 ng/ml, nachgesagt. Dieser Vitamin D-Mangel fußt vor allem auf einer verminderten UV-Exposition in den Winter-, aber zunehmend auch in den Sommermonaten.

Die Substitution von Vitamin D wird meist über die *per os* Einnahme von Vitamin D3 (Cholecalciferol)-Präparaten vollzogen. Von einer Vitamin D2 (Ergocalciferol)-Einnahme wird hingegen aufgrund schlechterer Umwandlung zum aktiven Metaboliten abgeraten (Houghton *et al.*, 2006). Darüber hinaus sind viele verschiedene synthetische Vitamin D-Analoga auf dem Markt. So wird zur Behandlung der Schuppenflechte das Secosteroid Calcipotriol eingesetzt. Dabei beeinflusst Calcipotriol den Kalziumspiegel des Patienten kaum, wirkt aber antiinflammatorisch. Diese Möglichkeit des Einsatzes von nicht-kalzämischen Vitamin D-Agonisten ist wichtig, um die in 1.1.4.2 beschriebenen Vitamin D-Effekte zu induzieren, ohne eine Hyperkalzämie auszulösen. Dies treibt immer mehr Forschungsgruppen an, solche Substanzen zu ergründen und deren nicht-kalzämische Potenz zu testen (Ma *et al.*, 2006).

Vitamin D wird zum Großteil von der Epidermis synthetisiert, indem durch UV-B-Strahlung 7-Dehydrocholesterol photolytisch zum Vitamin D3 umgewandelt wird. Vitamin D3 gelangt nun über die Blutbahn ins Leberparenchym, wo es über eine 25-Hydroxylase, einem Cytochrom P450-Enzym, in 25-Hydroxyvitamin D3 (25-Hydroxycholecalciferol) oxidiert wird. 25-Hydroxyvitamin D3 hat die höchste Affinität unter allen Vitamin D-Formen, am *vitamin D binding protein* im Blut zu binden. So wird 25-Hydroxyvitamin D3 im Serum gemessen, um Erkenntnisse über die Vitamin D-Versorgung der Patienten zu gewinnen (Adams *et al.*, 2010). Aktiviert wird das 25-Hydroxyvitamin D3 durch eine 1-Hydroxylase in der Niere, was die Reaktion zum 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25-Dihydroxycholecalciferol) katalysiert. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 ist ein hochpotenter Ligand des nukleären Vitamin D-Rezeptors (VDR). Der VDR gehört zu den Liganden-abhängigen Transkriptionsfaktoren der Familie der Steroid-/Thyreoidhormon-Rezeptoren (Nagpal *et al.*, 2005) und heterodimerisiert nach Bindung eines Liganden mit dem Rezeptor für 9-cis Retinsäure (RXR). Die Transkription verschiedener Zielgene wird nach Interaktion des VDR/RXR-Heterodimers am *vitamin D response element* (VDRE) in Zusammenspiel mit weiteren Co-Aktivatoren eingeleitet (Christakos *et al.*, 2013).

1.1.4.2 Vitamin D-Effekte

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat vor allem Einfluss auf den Kalziumstoffwechsel, indem es im Darm die Resorption von Kalzium fördert. Auch in der Niere wird die Rückresorption dieses, u.a. für den Knochenstoffwechsel, unabdingbaren Elektrolyts gefördert. Dementsprechend ist eine Vitamin D-Substitution bei Osteoporose und sekundärem Hyperparathyreoidismus indiziert.

Neben diesen sog. kalzämischen Effekten spielen vermehrt sog. nicht-kalzämische Effekte des aktivierten VDR eine große Rolle.

So konnte gezeigt werden, dass der VDR und auch die entsprechenden Enzyme zur endogenen Vitamin D-Aktivierung in Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden. Eine Vitamin D-Aktivierung und dessen Bindung am VDR hemmen die Antigen-Präsentation und die darauf folgende T-Zellproliferation, was eine Modulation des erworbenen als auch des adaptiven Immunsystems unter Einfluss von D-Vitaminen impliziert (Christakos *et al.*, 2013). Diese Erkenntnisse legen einen Einsatz von D-Vitaminen bei Krankheiten, die durch eine überschießende Immunantwort (bspw. chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Multiple Sklerose, Arthritis) gekennzeichnet sind, nahe (Cantorna *et al.*, 1996, 1998, 2000).

Darüber hinaus wird Vitamin D auch Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem nachgesagt, die durch eine den Blutdruck senkende und damit einer Linksherz-Hypertrophie vorbeugende Wirkung begründet werden. Diese Blutdruck-senkende Wirkung des D-Vitamins beruht nach Zhang *et al.*, 2010 in einer das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System-hemmenden Wirkung des Vitamin D.

Vitamin D wirkt zudem präventiv auf die Entwicklung von Übergewicht (Christakos *et al.*, 2013) und ist an der Regulation der Insulin-Ausschüttung beteiligt (Zeitzi *et al.*, 2003).

Ein für die eigene Arbeit zentraler Punkt ist das postulierte antifibrotische Potential von D-Vitaminen. So konnten solche Effekte bislang sowohl auf Nieren, Lunge als auch auf die Leber gezeigt werden (Tan *et al.*, 2006, Ramirez *et al.*, 2010, Song *et al.*, 2013). Dabei spielte allen voran die Suppression der TGF- β -1-Synthese eine Rolle, die alle Forschungsgruppen unter Vitamin D-Einfluss ausmachen konnten.

Abramovitch *et al.*, 2011 zeigten neben antifibrotischen Effekten von Vitamin D in der Leber auch antiproliferative Wirkungen. So konnte nachgewiesen werden, dass unter dem Einfluss von Vitamin D die Proliferation von hepatischen Sternzellen (HSZ), die für die Fibrose maßgeblich sind, gehemmt wurde. Dieser antiproliferative Effekt könnte auch in Bezug auf bösartige Neoplasien interessant sein, wobei Vitamin D hier vor allem nachgesagt wird, Tumorzellen zur Differenzierung anzuregen (Gocek *et al.*, 2009).

1.1.4.3 Der Einfluss von D-Vitaminen auf PSZ

Eine amerikanische Forschungsgruppe um Mara Sherman wies 2014 nach, dass der *Vitamin D-Rezeptor (VDR)* in PSZ von Mäusen und Menschen exprimiert wird. Die Expression dieses intrazellulären Rezeptors ist dabei unabhängig vom Aktivierungszustand der PSZ. So konnte gezeigt werden, dass PSZ aus Patienten mit PK sogar eine erhöhte Expression des *VDR* aufwiesen.

Die Expression des *VDR* in PSZ und die in 1.1.4.2 beschriebenen antiproliferativen und antiinflammatorischen Effekte der unterschiedlichen Vitamin D-Derivate legten nun weiterführende Untersuchungen nahe, die in der Ansteuerung der *VDR* in den PSZ durch einen entsprechenden Liganden und die daraus resultierenden Konsequenzen auf Gen- und Proteinebene lagen. Dazu setzten Sherman *et al.* das synthetische Vitamin D-Analogon Calcipotriol als *VDR*-Ligand ein.

Sherman *et al.* zeigten, dass aktivierte PSZ aus PK-Patienten unter dem Einfluss von Calcipotriol *in vitro* vermehrt Lipidtröpfchen ausbildeten und die α -SMA-Expression gehemmt wurde.

Weiterführende *in vitro*-Analysen der RNA ergaben, dass aktivierte PSZ (PSZ aus gesunden Mäusen nach 7-tägiger Kultivierung) unter dem Einfluss von Calcipotriol vermehrt positive Regulatoren der Angiogenese, wie *MMP-9*, exprimierten. Gleichzeitig wurde die Expression von *Thrombospondin (Thbs)*, eines Angiogenese-Inhibitors, gehemmt. Auch die Bindung des Transkriptionsfaktors SMAD3, eines Induktors der Expression profibrotischer Faktoren (Meng *et al.*, 2015), wurde unter Calcipotriol-Einfluss gehemmt.

Diese *in vitro*-Studien konnten *in vivo* bestätigt werden. So wurde in Mäusen eine chronische Pankreatitis durch Cerulein induziert. Mäuse, die für 12 Wochen mit Calcipotriol behandelt wurden, entwickelten im Vergleich zu Kontrolltieren eine mildere CP mit einer schwächeren Fibrose, verminderter Inflammation und PSZ-Aktivierung, die mit einer niedrigeren Expression der *Kollagen-1a1*-, *IL-6* und α -SMA-Gene einhergingen.

Auch die *in vitro* beobachtete Angiogenese-fördernde Wirkung des Vitamin D-Liganden Calcipotriol konnte *in vivo* bestätigt werden, was u.a. zu einem verbesserten Anfluten von Gemcitabin, einem verminderten Tumorwachstum und einem verbesserten Überleben von PC-Patienten führte (1.1.3.5).

Sherman *et al.* postulierten als erste Forschungsgruppe überhaupt, dass der Einsatz des *VDR*-Liganden Calcipotriol eine Rückführung aktivierter PSZ in den ruhenden Zustand herbeiführen, eine Cerulein-induzierte CP über antifibrotische und antiinflammatorische Prozesse abschwächen und die Gemcitabin-Anflutung innerhalb eines PC durch die Induktion Angiogenese-fördernder Faktoren verbessern kann.

Bläuer *et al.*, 2015 untersuchten den Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D3 auf murine PSZ. Dabei stellten sie neben einer dosisabhängigen *Up*-Regulation des VDR bis zu einem *Peak* von 2 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D3 auch eine Hemmung der Proliferation unter Einsatz des VDR-Liganden fest. Diese dosisabhängige Hemmung der Proliferation konnte durch eine Abnahme des Proliferationsmarkers Ki67 auch qualitativ erfasst werden.

Des Weiteren konnte die zuvor von Sherman *et al.* beschriebene antifibrotische VDR-Liganden-Wirkung auch unter 1,25-Vitamin D3-Einfluss bestätigt werden, da die Fibronectin-Synthese der PSZ dosisabhängig abnahm.

1.2. Zielstellung der Arbeit

Die chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom sind Erkrankungen, die mit einer massiven Fibrose als Begleiterscheinung einhergehen. Dieser bindegewebige Umbau des Pankreas wird vor allem von aktivierten PSZ übernommen. Ob dieser fibrotische Umbau die Progression der Erkrankungen fördert oder hemmt, wird kontrovers diskutiert.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Vitamin D-Ligand Calcipotriol im Stande ist, die Aktivierung der PSZ zu begrenzen, diese in einen ruhenden Phänotyp zurückzuführen und die Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms zu verringern.

Das konkrete Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Effekte der natürlichen Vitamin D-Derivate Vitamin D2 und Vitamin D3 sowie des synthetischen Analogons Calcipotriol auf PSZ systematisch und im Vergleich zueinander zu untersuchen. Dafür standen PSZ aus gesunden Mäusen zur Verfügung, die *in vitro* mit den jeweiligen D-Vitaminen behandelt wurden. Dabei wurden Primärzellen und bereits passagierte PSZ unterschieden. Die Effekte der verschiedenen Vitamin D-Derivate wurden anhand von Proliferationsanalysen, der Detektion von Aktivierungsmarkern via Immunfluoreszenzanalysen und Ölotfärbungen sowie Genexpressionsanalysen evaluiert. Dabei sollte vor allem ein Augenmerk darauf gelegt werden, ob und inwieweit sich die Effekte der einzelnen D-Vitamine untereinander unterscheiden. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Vitamin D-Effekte vom Aktivierungszustand der PSZ analysiert.

2. Materialien

2.1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Seriennummer
-150°C Gefrierschrank	Sanyo Denki K.K	60915116
-80°C Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific Inc.	50054302
-20°C Gefrierschrank	Liebherr	-
4°C Kühlschranks	Robert Bosch GmbH	-
6°C Kühlschranks	Liebherr	-
Brutschrank HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific Inc.	40862222
Elektrophoresekammer Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories Inc.	552BR047080
Feinanalysewaage Chyobalance JL 200	Dynatech	90610
Flockeneisautomat AF 103	Scotsman Ice System	3006ES1L
Fluoreszenzmikroskop DM4000B	Leica Camera AG	-
Heizblock	Stuart Scientific	3278
Magnetrührer MR 2002	Heidolph Instruments	10667
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG	667234
NanoPhotometer P-Class	Implen Inc.	6303
Odyssey Infrared Imager	LI-COR Inc.	ODY-1790

pH-Messgerät Five Easy FE20	Mettler-Toledo Inc.	1229215156
Photometer Anthos reader 2001	Anthos Labtec Instruments GmbH	1098
Plattenschüttler MTS 4	IKA-Werke GmbH & Co.KG	94-173-05
Pipetboy	Integra Biosciences AG	-
Pipetten (Research 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf AG	-
Echtzeit-PCR-Cycler Typ ViiA 7	Thermo Fisher Scientific Inc.	27882087
Schüttler Rocky 3D	Labortechnik Fröbel GmbH	4024
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc.	41093135
Stromversorgungsgerät Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories Inc.	287BR03458
Thermomixer comfort	Eppendorf AG	5355ZK947672
UV-Messsystem	Intas Pharmaceuticals Ltd.	-
Vortexer VM 2	Karl Hecht GmbH & Co. KG	740482
Wasserbad 1083	GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH	11464501K

Western Blot Kammer Eco-Mini	Biometra GmbH	1109-0078
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG	542511840

2.2 Verwendete Software

Software	Hersteller
Image Studio Lite Version 5.2	LI-COR Inc.
SPSS Statistics 22	International Business Machines Corporation (IBM)
Quant Studio Real Time PCR Version 1.2	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.3 Allgemeine Labormaterialien

Material	Hersteller
6-well-Kulturplatte	Greiner Bio One International GmbH
12-well-Kulturplatte	Greiner Bio One International GmbH
24-well-Kulturplatte	Greiner Bio One International GmbH
96-well-half-area Kulturplatte	Greiner Bio One International GmbH
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bechergläser (50 ml, 100 ml, 250 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bechergläser (600 ml, 1000 ml)	Armin Baack
Deckgläser, rund	Carl Roth GmbH & Co. KG

Dual Filter Tips (0,1-1000 µl)	Eppendorf AG
Eisbehälter	Carl Roth GmbH & Co. KG
Faltenfilter	Carl Roth GmbH & Co. KG
Löffelspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG
Messzylinder	Carl Roth GmbH & Co. KG
Neubauer Zählkammer improved	Carl Roth GmbH & Co. KG
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Pinzette	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen (0,1-1000 µl)	Eppendorf AG
Parafilm M	American Can Company
PVDF-Transfermembran	Merck KgaA
Reaktionsgefäße (0,6 ml,1,5 ml,2 ml,5 ml)	Eppendorf AG
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio One International GmbH
sterile Pipetten (5 ml,10 ml,50 ml)	Greiner Bio One International GmbH

2.4 Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur

Lösung/Reagenz	Anmerkung	Hersteller
1 α ,25-Dihydroxyergocalciferol (Vitamin D2)	in DMSO gelöst, Stammlösung \cong 1 mM	Santa Cruz Biotechnology Inc.
1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D3)	in DMSO gelöst, Stammlösung \cong 1 mM	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Calcipotriol	in DMSO gelöst, Stammlösung \cong 10 mM	Sigma-Aldrich Co.
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma-Aldrich Co.
fetales Kälberserum (FKS)	hitzeinaktiviert	PAA Laboratories Inc.
Iscove Basal Medium	enthält 3,024 g/l NaHCO ₃ , stabiles Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc.
nicht-essentielle Aminosäuren (NEA, 100x)		Thermo Fisher Scientific Inc.
Phosphate buffered saline (PBS, 10x)	pH 7,4, mit Aqua dest. verdünnt	Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin/Streptomycin (P/S, 100x)	10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Trypanblau		Sigma-Aldrich Co.
Trypsin-EDTA	0,05% in PBS	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.5 Lösungen für die Zellproliferationsmessung

Lösung	Anmerkung	Hersteller
Zellproliferation – ELISA, BrdU (5-Brom-2´Deoxyuridin) colorimetic	enthält BrdU-Reagenz, Fix Denat, Antikörper Dilutionslösung, Anti-BrdU- POD, Waschpufferansatz, Substratlösung	F.Hoffmann-La Roche AG
Schwefelsäure	1 M, Stopplösung	

2.6 Lösungen und Reagenzien für die Ölrotfärbung

Lösung/Reagenz	Anmerkung	Hersteller
Aquatex	Eindeckmedium	VWR International
Hämalaun	1:5 mit Aqua dest. verdünnt	Merck KGaA
Ölrot-Stocklösung	1 g Ölrot in 100 ml Isopropanol gelöst, vor Gebrauch mit Aqua dest. Im Verhältnis 3:2 (Ölrot:Aqua dest.) verdünnen	
Paraformaldehyd (PFA, 4%)	mit PBS auf 2,5% verdünnt	Zentralapotheke des Klinikums (ZAP)

2.7 Lösungen und Reagenzien für die α -SMA Immunfluoreszenzfärbung

Lösung/Reagenz	Anmerkung	Hersteller
<i>Bovine serume albumin</i> (BSA)	1:100 in PBS gelöst	PAA Laboratories Inc.
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	2 μ l DAPI in 40 ml Methanol	Sigma-Aldrich Co.
Immunfluoreszenz-Einbettmedium	enthält 30 g Glycerin,	} Carl Roth GmbH & Co. KG
	0,05 M Tris	
	12 g Polyvinylalkohol,	} Sigma-Aldrich Co.
	0,5 g Phenol	

Primärantikörper	Quelle	Hersteller	Katalognummer
α -SMA	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Co.	A2547

Sekundärantikörper	Quelle	Hersteller	Katalognummer
IRDye 800CW Anti-Maus Ig	Ziege, polyklonal	LI-COR Inc.	926-32210

2.8 Lösungen und Reagenzien für die β -Galactosidase-Färbung

Lösung/Reagenz	Anmerkung	Hersteller
DMF (N-N-dimethylformamid)		Sigma-Aldrich Co.
Eindeckmedium Pertex		Medite GmbH
Ethanol (70%)		PKH Halle GmbH
Ethanol (98%)		ZAP
Glycerol (70%)		Carl Roth GmbH & Co. KG
Isopropanol		J.T. Baker
Kernechtrot- Aluminiumsulfatlösung		Carl Roth GmbH & Co. KG
Senescence β -Galactosidase Staining Kit	Enthält Fixative Solution, Staining Solution, Staining Solution Supplement A & B, X-gal	Cell Signaling Technology

Xylol		ZAP
-------	--	-----

2.9 Lösungen und Reagenzien für die Nukleinsäureanalytik

Lösung/Reagenz	Anmerkung	Hersteller
Agarose		Serva Elektrophoresis GmbH
Assay on demand (Acta2; α -smooth muscle actin)	Mm01546133_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (Col1a1; α 1 type 1 collagen)	Mm00801666_g1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (HPRT; Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)	Mm00446968_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (IFN- γ ; Interferon- γ)	Mm00801778_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (IL-2; Interleukin-2)	Mm00434256_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (IL-6; Interleukin-6)	Mm00446190_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (MMP-2; Matrix Metalloproteinase-2)	Mm00439498_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (MMP-9; Matrix Metalloproteinase-9)	Mm00442991_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.

Assay on demand (TGF- β 1; Transforming Groth Factor- β 1)	Mm01178820_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (TNF- α ; Tumornekrosefaktor- α)	Mm00443258_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Assay on demand (VDR; Vitamin- D-Rezeptor)	Mm00437297_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
Chloroform		Sigma-Aldrich Co.
Ambion DNA-free DNase Treatment & Removal DNase Inactivation Reagent	enthält DNase 1 Buffer, rDNase, DNase Inactivation Reagent	Invitrogen
DEPC - Wasser	mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat versetztes Aqua dest., vor Gebrauch 20 min autoklaviert	Sigma-Aldrich
Ethanol (75%)	mit DEPC – H ₂ O verdünnt	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid		Thermo Fisher Scientific Inc.
GeneRuler 1 kb DNA Ladder		Cell Signaling Technology
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	enthält RT-Buffer, RT- Random Primers, dNTP Mix, Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc.
Isopropanol		J.T.Baker

Takyon Low ROX Probe 2x MasterMix dTTP blue		Eurogentec
TBE-Puffer (10x)		Serva Elektrophoresis GmbH
Trifast		Peqlab Biotechnologie GmbH

2.10 Lösungen und Antikörper für die Proteinanalytik

Lösung	Anmerkung	Hersteller
Acrylamid (40%)		Bio-Rad Laboratories Inc.
APS (Ammoniumpersulfat 10%)	100 mg APS in 1 ml Aqua dest. gelöst	Sigma-Aldrich Co.
Blockpuffer	10 ml Blockpuffer → auf 50 ml mit PBS aufgefüllt 0,0125-0,025 g Natriumazid	Rockland Immunochemicals Inc. Thermo Fisher Scientific Inc. Honeywell Riedel-de-Haën
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder	8-260 kDa	LI-COR Inc.

Elektrophoresepuffer (3x)	81,81 g Tris 27 g SDS → auf 9 l mit Aqua dest. aufgefüllt	Carl Roth GmbH & Co. KG
Probenpuffer	2% SDS 10% Glycerin 62,5 g Tris-HCL, ph 6,8 5 mM EDTA-HCL, pH 8 0,001% Bromphenolblau 5% β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG AppliChem GmbH Sigma-Aldrich Co
Sammelgelpuffer	pH 6,8 6,06 g Tris 0,4 g SDS → auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt	Carl Roth GmbH & Co. KG Carl Roth GmbH & Co. KG
Strippuffer	pH 2,0 1,8 g Glycin 20 g SDS → auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt	Carl Roth GmbH & Co. KG
Transferpuffer	6 g Tris 29 g Glycin 10% Methanol → auf 2 l mit Aqua dest. aufgefüllt	Carl Roth GmbH & Co. KG J.T.Baker

TEMED (Tetramethylethyldiamin)		Sigma-Aldrich Co.
Trenngelpuffer	pH 8,8 36,33 g Tris } 0,8 g SDS → auf 200 ml mit Aqua dest. aufgefüllt	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween-20		Carl Roth GmbH & Co. KG

Primärantikörper	Quelle	Hersteller	Katalognummer
α -SMA	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Co.	A2547
ERK 1/2 (p-44/42 MAP Kinase)	Ratte, polyklonal	Upstate Biotechnology Inc.	06-182
GAPDH	Ratte, monoklonal	Cell Signaling Technology	2118
Phospho-ERK 1/2 (Phospho-p-44/42 MAP Kinase)	Ratte, polyklonal	Cell Signaling Technology	9101

Sekundärantikörper	Quelle	Hersteller	Katalognummer
IRDye 680CW Anti-Maus Ig	Ziege, polyklonal	LI-COR Inc.	926-32220

IRDye 800CW Anti-Maus Ig	Ziege, polyklonal	LI-COR Inc.	926-32210
--------------------------	----------------------	-------------	-----------

2.11 Lösungen für die IL-6-Bestimmung

Lösung	Anmerkung	Hersteller
Mouse IL-6 uncoated ELISA Kit	enthält Capture Antikörper, Detection Antikörper, Avidin HRP, Substratlösung	Thermo Fisher Scientific Inc.
Schwefelsäure (1M)	als Stopplösung verwendet	
Waschlösung	0,05% Tween-20 in PBS (pH 7,4)	

3. Methoden

3.1 Verwendete Zellen und deren Isolation

Für die Zellkultur wurden pankreatische Sternzellen (PSZ) aus gesunden, sechs bzw. zwölf Wochen alten C57BL/6-Mäusen verwendet. Es wurden sowohl PSZ aus weiblichen als auch männlichen Tieren nach folgendem Protokoll isoliert: Nachdem die Tiere narkotisiert und die Pankreata aufgesucht worden waren, wurden diese mit einer Lösung aus *Hank's Buffered Salt Solution*, 0,05% Kollagenase P, 0,02% Protease IX und 0,1% Desoxyribonuklease unterspritzt. Daraufhin wurden die Pankreata entnommen und mit einer spitzen Schere zerkleinert. Nach Homogenisierung durch gründliches Auf- und Abpipettieren mit einer 1 ml Pipette erfolgte eine Filterung des Zellgemisches durch ein Zellsieb. Im Anschluss daran wurden die einzelnen Zelltypen mittels Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation 20 min bei 2800 rpm aufgetrennt (Apte *et al.*, 1998). Die pankreatischen Sternzellen setzten sich oberhalb der Nycodenz-Phase ab, da sie einen hohen Lipidgehalt und damit eine geringe Dichte aufweisen. Die PSZ wurden nun entnommen und in eine Lösung aus 90% FKS und 10% DMSO überführt. Im Anschluss daran wurden die frisch isolierten PSZ bei -150 °C weggefroren und bedarfsgerecht in Kultur genommen. Die durch diese Methode isolierten PSZ sind noch teilungsinaktiv und werden als sogenannte ruhende pankreatische Sternzellen beschrieben. Die Isolation der Zellen wurde von Mitarbeitern der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Jaster durchgeführt.

3.2 Zellkulturarbeiten

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilwerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die PSZ wuchsen nach Passagierung auf verschiedenen *well*-Platten bei 37 °C unter wasserstoffgesättigten Bedingungen und 5% CO₂-Begasung in einem Brutschrank. Da pankreatische Azinuszellen nicht adhären und in der Folge absterben, konnten „Verunreinigungen“ durch diese Zellen so vermindert werden. Das verwendete Kulturmedium wurde mit Penicillin/Streptomycin (P/S) und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEA, 100x Stammlösung) versetzt. Außerdem wurde 17% fetales Kälberserum (FKS) hinzugegeben. Diese Zusammensetzung des Mediums wurde für nahezu alle Zellkulturarbeiten verwendet und wird im Weiteren deshalb als Standardmedium bezeichnet.

3.3 Kultivierung und Passagierung der Zellen

Die nach der oben beschriebenen Isolation weggefrorenen PSZ wurden kurz im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin

wurden die Zellen kurz an zentrifugiert, um das dann sichtbare Zellpellet in Standardmedium aufzunehmen. Im Folgenden müssen zwei Versuchssettings unterschieden werden, die grundlegend für die weiteren Arbeiten waren:

1. Nach gründlicher Resuspension wurden die Zellen sofort auf eine für den jeweiligen Versuch vorgesehene *well*-Platte als ruhende nicht passagierte PSZ eingesät. Die Aktivierungsprozesse der PSZ beginnen durch den Kontakt mit Plastik und die Versorgung mit Nährmedium schon nach wenigen Tagen (Apte *et al.*, 2012). Die nachfolgenden Versuche wurden demnach mit frühen aktivierten PSZ durchgeführt.
2. Die Zellen wurden nach gründlicher Resuspension auf zwei *wells* einer 6-*well*-Platte ausgesät. Dabei wurden die Zellen täglich unter dem Mikroskop beobachtet, sodass die PSZ nicht konfluent wuchsen. Außerdem wurde das Standardmedium, falls nötig, erneuert. Nach etwa sieben Tagen wurden die dann in etwa zu 90% bewachsenen *wells* abgeerntet. In dieser Zeit entwickelten sich die Zellen durch die Versorgung mit dem Nährmedium und den Kontakt mit Plastik von ruhenden (bei Einsaat), über frühe aktivierte (in den ersten Tagen nach der Einsaat), zu vollständig aktivierten PSZ. Das Standardmedium wurde nun zunächst abpipettiert und die *wells* mit sterilem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen für eine Minute mit 0,05% Trypsin behandelt, was zu einer Adhäsionolyse der Zellen führte. Konnten unter lichtmikroskopischer Kontrolle abgerundete und damit von der Oberfläche gelöste PSZ ausgemacht werden, wurden die Zellen mit Standardmedium geerntet. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1400 rpm wurde das Zellpellet in Standardmedium aufgenommen und resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau versetzt, sodass eine Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt werden konnte. So konnte eine Zellzahl pro ml Standardmedium ermittelt werden. Im Anschluss daran wurde eine für die bestimmten Versuche definierte Zellzahl der nun einmal passagierten und damit vollständig aktivierten PSZ eingesät.

3.4 DMSO

Alle verwendeten Vitamin D-Derivate wurden in DMSO gelöst. Für die Proliferationsanalysen mittels BrdU-Einbautest und Zellzählung wurden jeweils D-Vitamine verwendet, die in ihren jeweiligen Konzentrationen 0,1% DMSO enthielten. Auch wurden hier Kontrollen mitgeführt, die sowohl ein Standardmedium mit 0,1% DMSO als auch ein solches ohne DMSO enthielten. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich in diesen Versuchen auf Kontrollen mit 0,1% DMSO. Dabei zeigte sich kein Einfluss des Lösungsmittels auf das Zellwachstum. Nachdem auch in Pilotversuchen zu anderen in der Arbeit eingesetzten Methoden keine DMSO-Effekte

festgestellt werden konnten, wurde, sofern nicht anders angegeben, auf zusätzliche Lösungsmittelkontrollen verzichtet.

3.5 Quantifizierung des Zellwachstums

Zur Quantifizierung des Zellwachstums der PSZ wurde 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) verwendet. Dieses synthetische Basenanalogen wird in der S-Phase des Zellzykluses anstelle von Thymidin in die sich replizierende DNA eingebaut.

Dazu wurden 2000 vollständig aktivierte PSZ pro *well* auf eine 96-*well-half-area*-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht adhären konnten, erfolgte am folgenden Tag die Inkubation der Zellen mit den D-Vitamin Derivaten mittels Mediumwechsel. 24 h später wurde BrdU als 1000-fache Verdünnung der Stammlösung hinzugegeben, wonach wiederum nach 24 h die Inkubation mit den Vitamin D-Derivaten und mit BrdU abgestoppt und der Versuch ausgewertet wurde. Zur Quantifizierung der Zellproliferation von frühen aktivierten PSZ wurde jeweils ein Aliquot frisch aufgetauter PSZ verwendet, nach dem in Tab. 3.1 beschriebenem Schema in Standardmedium überführt und auf einer 96-*well-half-area*-Platte ausgesät.

	Einsaat	D-Vitamin Derivate	BrdU	Stopp
vollständig aktivierte PSZ	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Frühe aktivierte PSZ	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 4

Tab. 3.1: Behandlungsablauf der PSZ für BrdU-Assays

Darüber hinaus wurde versucht, einen Behandlungsablauf der PSZ nachzustellen, der sich am Protokoll von Bläuer *et. al*, 2015 orientiert. Hierzu wurden 500 vollständig aktivierte PSZ / *well* auf eine 96-*well-half-area*-Platte eingesät und dann, wie in Tab. 3.2 beschrieben, behandelt.

	Tag 0	Tag 3	Tag 4	Tag 7	Tag 9	Tag 10
vollständig aktivierte PSZ	Einsaat	Vitamin D ₃	Medium- / Vitamin D ₃ - Wechsel	Medium- / Vitamin D ₃ - Wechsel	BrdU- Zugabe	Stopp

Tab. 3.2: PSZ-Behandlung für BrdU-Assay nach Bläuer *et. al*, 2015

Für die Auswertung der Versuche wurde das Medium durch Ausklopfen und Absaugen entfernt. Daraufhin wurden die Zellen für 30 min mit einer Fixierlösung behandelt, die die DNA der PSZ denaturiert und diese für den BrdU-Antikörper zugänglich macht. Der BrdU-Antikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt, die das im nächsten Schritt hinzugegebene Substrat in eine fluoreszierende Substanz spaltet. Dabei entspricht die Menge des fluoreszierenden Produkts der Menge des eingebauten BrdUs in die DNA der PSZ. Die Katalyse des Substrats in ein fluoreszierendes Produkt wurde mit Schwefelsäure (1 M) abgestoppt. Die Extinktionsmessung des fluoreszierenden Produkts wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm am Photometer durchgeführt.

3.6 Nachweis von Lipidtröpfchen mittels Ölrotfärbung

Ölrot ist ein fettlöslicher Farbstoff, der zum Färben von Lipiden verwendet wird. Aufgrund von Absorptionsmaxima des Farbstoffs bei 518 nm bzw. 359 nm ist es möglich, die Analyse der Färbung der Lipide unter einem Phasenkontrastmikroskop durchzuführen.

Die Ölrotfärbungen wurden sowohl mit vollständig aktivierten PSZ als auch mit frühen aktivierten PSZ durchgeführt.

Für die Färbungen der vollständig aktivierten PSZ wurden 10000 Zellen pro *well* auf Deckgläschen in einer 24-*well*-Platte eingesät. Nachdem die Zellen einen Tag adhären konnten, wurden sie mit den jeweiligen Vitamin D-Derivaten mittels Mediumwechsel für insgesamt zwei Tage inkubiert.

Ein weggefrorenes Aliquot der frisch entnommenen PSZ wurde aufgetaut, in Standardmedium überführt und ebenfalls auf Deckgläschen in einer 24-*well*-Platte eingesät. Hier erfolgte eine insgesamt dreitägige Inkubation mit den Vitamin D-Derivaten nach eintägiger Adhärenzzeit der PSZ.

Nach der zwei- bzw. dreitägigen Inkubation der PSZ mit den Vitamin D-Derivaten wurde das Standardmedium abgesaugt und die Zellen mit 2,5% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Im Anschluss an mehrere Waschschrte mit PBS (pH 7,4) wurden die Zellen mit Ölrotlösung für 15 Minuten gefärbt. Dazu wurde 1 g Ölrot in 100 ml Isopropanol gelöst und kurz vor Gebrauch mit destilliertem Wasser (3 Teile Ölrotlösung und 2 Teile destilliertes Wasser) verdünnt und filtriert. Danach wurden die gefärbten Zellen gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Zum Schluss wurden die Deckgläschen auf Objektträger übertragen und über Nacht getrocknet.

Daraufhin konnten die jeweiligen Präparate gesichtet und bewertet werden. Das Scoring erfolgte durch zwei unabhängige Beobachter an den zuvor verblindeten Präparaten. In Abhängigkeit der Ausprägung der jeweiligen Lipidtröpfchen durch die Ölrotfärbung wurden die

Präparate anhand des nachfolgenden Schemas bewertet. Beispielbilder für die jeweiligen Scores sind im Ergebnisteil (Abb. 4.7) zu finden.

Score	0	1	2	3
Ausprägung der Ölrot-Färbung	keine	geringe	mäßige	starke

Tab. 3.3: Scoring-Schema für die Auswertung der Ölrotfärbung

3.7 α -SMA-Immunfluoreszenzfärbung

Die α -SMA-Immunfluoreszenzanalysen wurden mit vollständig aktivierten und frühen aktivierten PSZ durchgeführt. Dabei wurden die jeweiligen Zellen, wie unter 3.6 beschrieben, behandelt. Zusätzlich wurden PSZ auf 2 *wells* eingesät, die als Negativkontrolle für die Färbung dienten. Nach der Inkubation mit den Vitamin D-Derivaten wurde wie folgt verfahren: Nach Entfernung des Standardmediums wurden die Zellen kurz mit PBS (pH 7,4) gewaschen und danach für 10 min mit eiskaltem Methanol mit 0,0005% DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) fixiert. Da DAPI als Fluoreszenzfarbstoff, der an der DNA der Zellen bindet, lichtempfindlich ist, wurden alle folgenden Schritte unter geringer Lichtzufuhr durchgeführt. Bevor nun mit 1% BSA (Bovines Serum Albumin, gelöst in PBS, pH 7,4) geblockt wurde, wurden noch einige Waschrunde mit PBS (pH 7,4) durchgeführt. Daraufhin wurde der α -SMA-Primärantikörper 1:100 in 1% BSA verdünnt, auf Paraffinfolie gegeben und die Zellen auf den Deckgläschen für 30 min mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach Rückführung der Deckgläschen von der Paraffinfolie in die jeweiligen *wells* wurden die Zellen nun mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper 1:300 mit 1% BSA verdünnt und auf Paraffin aufgetragen. Die an den Deckgläschen haftenden Zellen wurden für 30 min in dunkler Umgebung inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen auf Objektträger übertragen, abgedunkelt für eine Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und daraufhin abgedunkelt bei 4 °C gelagert.

Die Bewertung der verblindeten Präparate wurde auch hier von zwei unabhängigen Beobachtern durchgeführt. Das Scoring-Schema gleicht hier dem der Ausprägung der Lipidtröpfchen mittels Ölrotfärbung. Beispielbilder zu den jeweiligen Scores sind auch hier im Ergebnisteil (Abb. 4.8) zu finden.

Score	0	1	2	3
Ausprägung der α -SMA-Fasern	keine	geringe	mäßige	starke

Tab. 3.4: Scoring-Schema für die Auswertung der α -SMA-Immunfluoreszenzfärbung

3.8 Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase-Färbung

Zur Analyse des Einflusses von D-Vitaminen auf den Seneszenzprozess kultivierter PSZ wurden die Zellen zunächst durch mehrfaches Passagieren dem Stadium der replikativen Seneszenz angenähert. Hierzu wurde ein subkonfluentes, mit pankreatischen Sternzellen bewachsenes *well* einer 6-*well*-Platte abgeerntet und auf drei neue *wells* einer 6-*well*-Platte aufgeteilt. Nach zwei Tagen Adhärenz wurde wiederum ein *well* dieser 6-*well*-Platte abgeerntet und ebenso verfahren. Nun wurde nach sechs Tagen Adhärenz erneut ein *well* abgeerntet und 750 PSZ pro *well* auf Deckgläschen einer 24-*well*-Platte eingesät. Diese Zellen adhärten für einen Tag und wurden dann für 48 h mit den Vitamin D-Derivaten inkubiert.

Daraufhin wurde das Standardmedium abpipettiert und die Zellen kurz mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde für 10 min eine Fixierlösung auf die Zellen gegeben, wonach die Zellen mit X-Gal-haltiger Färbelösung über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. X-Gal wird dabei in die Zellen aufgenommen und dient als Substrat für die β -Galactosidase. Diese Hydrolase wird in seneszenten, nicht mehr teilungsfähigen Zellen vermehrt exprimiert. Die β -Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl. Letzteres wird durch den Sauerstoff der Raumluft zum tiefblauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. Um die seneszenten Zellen quantifizieren zu können, wurde anschließend eine Gegenfärbung mit Kernechtrot durchgeführt. So werden alle Zellen gefärbt, wodurch eine Aussage über die Anzahl seneszenter Zellen gemacht werden kann. Zur Gegenfärbung wurde X-Gal zunächst entfernt, kurz mit PBS gewaschen und daraufhin Kernechtrot für 15 min auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das Kernechtrot entfernt, die Zellen mit Wasser gewaschen und die Deckgläschen in mehreren Schritten entwässert:

1. 1x 70% Ethanol für 2-3 min
2. 1x 98% Ethanol für 2-3 min
3. 1x Isopropanol für 5 min
4. 3x Xylol für 5 min

Nach der Entwässerung wurden die Deckgläschen mit Pertex auf Objektträgern eingedeckt und im Anschluss unter dem Mikroskop gesichtet.

3.9 Nukleinsäureanalytik

Genexpressionsanalysen mittels Echtzeit-PCR wurden sowohl mit vollständig aktivierten als auch mit frühen aktivierten PSZ durchgeführt. Dazu wurden 25000 vollständig aktivierte PSZ pro *well* auf eine 12-well-Platte eingesät. Nach dreitägiger Adhärenz wurden die jeweiligen Vitamin D-Derivate hinzugegeben und der Versuch nach 24-stündiger Inkubation ausgewertet. Frisch aufgetaute PSZ wurden direkt auf eine 12-*well*-Platte ausgesät, nach eintägiger Adhärenz mit den D Vitamin-Derivaten inkubiert und nach 48-stündiger Inkubation die RNA der PSZ isoliert.

3.9.1 RNA-Isolation

Dazu wurde zunächst das Standardmedium abgesaugt und 250 µl TRIzol™ pro *well* auf die Zellen gegeben. TRIzol™ enthält neben Phenol (Lösungsmittel für die RNA) Guanidinisothiocyanat, das die Zellen vom Boden der *wells* löst, RNAsen inaktiviert und somit für die Isolierung der RNA essenziell ist. Nach Aufnahme der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße wird Chloroform zur Phasentrennung hinzugegeben und für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Dadurch setzte sich eine wässrige Phase ab, die die RNA der Zellen enthält. Diese RNA-Phase wurde nun vorsichtig abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol zur Ausfällung der RNA versetzt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 4 °C konnte nun ein kleines RNA-Pellet gesichtet werden. Daraufhin wurde der Überstand möglichst vollständig abpipettiert, 1 ml 75% Ethanol (mit DEPC-Wasser verdünnt) hinzugefügt und wiederum für 5 min zentrifugiert. Diethylpyrocarbonat (DEPC) modifiziert Histidinreste von Proteinen zu N-Carboxyhistidin, was zu einer Inaktivierung von RNAsen führt (Mülhardt, 2013).

Anschließend wurde der Überstand vorsichtig und möglichst vollständig entfernt und das RNA-Pellet für 15 min unter dem Abzug getrocknet. Danach wurde das jeweilige Pellet in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen, zur besseren Lösung für 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend bei -80 °C weggefroren.

3.9.2 DNA-Verdau

Um verbleibende DNA-Reste zu entfernen, wurden den Proben 1 µl DNase-Puffer und 1 µl rDNase hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der DNA-Verdau durch Hinzugabe von 1 µl DNase-Inaktivierungsreagenz unter intermittierendem Schütteln abgestoppt. Durch eine kurze Zentrifugation der Proben setzte sich das DNase-Inaktivierungsreagenz am Boden des Reaktionsgefäßes ab, sodass der RNA-Überstand entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden konnte.

3.9.3 Photometrische RNA-Bestimmung

Eine Bestimmung der RNA-Menge in den jeweiligen Proben wurde nach jeder RNA-Isolation durchgeführt, um eine definierte RNA-Menge für die darauffolgende Echtzeit-PCR-Analyse einsetzen zu können. Da RNA Licht einer Wellenlänge von 260 nm absorbiert, konnte so am Nanophotometer der RNA-Gehalt der Proben bestimmt werden. Des Weiteren konnte auch eine Aussage zur Reinheit der jeweiligen Proben getroffen werden. Proteine absorbieren Licht einer Wellenlänge von 280 nm spezifisch. Setzt man die gemessenen Werte bei 260 nm und 280 nm nun ins Verhältnis, so sollte der Quotient einen Wert über 1,8 ergeben, um von einer Probe auszugehen, die nicht zu stark mit Proteinen kontaminiert ist.

3.9.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Die eingesetzte reverse Transkriptase ist dabei eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die aus der isolierten mRNA mithilfe von hinzugegeben Primern einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Im Anschluss an die DNA-Synthese baut eine RNase-H die RNA ab, sodass reine cDNA vorliegt.

Substanz	Menge für eine Probe (10 µl)
10x Puffer	2,0 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl
Random Primer	2,0 µl
DEPC-Wasser	0,8 µl
dNTPs	4,2 µl

Tab. 3.5: Mastermix-Zusammensetzung

Dazu wurden 0,25 µg RNA mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl Mastermix aufgefüllt. Im Anschluss folgten diese Inkubationsschritte:

1. 10 min bei 25°C
2. 120 min bei 37°C
3. 5 min bei 85°C

Daraufhin konnten die Proben bei -20 °C zwischengelagert werden.

3.9.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Durch eine Echtzeit-PCR-Analyse kann die Expression verschiedener Zielgene quantifiziert werden. Dazu werden genspezifische Sonden benutzt, die aus fluoreszenzmarkierten

Oligonukleotiden bestehen. Diese Sonden bilden mit ebenfalls genspezifischen Primern einen taqman-Assay. Der Fluoreszenzfarbstoff befindet sich am 5'-Ende des Oligonukleotids, wobei das Fluoreszenzsignal einer intakten Sonde durch eine Quencher am 3'-Ende unterdrückt wird. Das Oligonukleotid bindet nun zwischen zwei Primern am komplementären DNA-Strang. Die hitzestabile taq-Polymerase repliziert nun den DNA-Strang und besitzt neben der Polymerase- auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff vom Oligonukleotid gespalten, verliert die räumliche Nähe zum Quencher, sodass der Quencher das Fluoreszenzsignal nicht mehr unterdrücken kann. Das Signal ist proportional zum PCR-Produkt. Zu einem bestimmten Zeitpunkt verläuft der Intensitätsanstieg des Fluoreszenzsignals exponentiell. Hier kann eine Quantifizierung der Zielgen-Expression vorgenommen werden, da zu diesem Zeitpunkt optimale Reaktionsbedingungen vorherrschen. Dementsprechend gilt: Je früher ein exponentieller Anstieg der Signalintensität, desto größer die Menge des Zielgen-Transkripts in der Probe. Zur Quantifizierung der Transkriptmengen wurde der Echtzeit-PCR-Cycler Typ Viia 7 verwendet. Mithilfe der Software *Quant Studio Real Time PCR* Version 1.2 konnte der Beginn des exponentiellen Signalanstiegs als sogenannter Ct-Wert (*cycle threshold*-Wert) bestimmt werden. Um Unterschiede in der RNA-Menge der jeweiligen Proben auszugleichen, wurde Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als sogenanntes housekeeping-Gen eingesetzt. Die relative Expression des Zielgens im Vergleich zum housekeeping-Gen HPRT wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{HPRT}}$$

Um relative Quantifizierungen vorzunehmen, wurde die unten stehende Formel verwendet:

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{Kontrolle}}$$

Zur Berechnung der relativen Menge der Zielgen-mRNA wurde wie folgt vorgegangen:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden 96-well-Multititerplatten verwendet. Neben den cDNA-Proben wurden zusätzlich die in Tab. 3.6 aufgeführten Reagenzien eingesetzt.

Substanz	Menge für eine Probe
cDNA	2,5 µl
DEPC-Wasser	3,125 µl
MasterMix	6,25 µl
Primer/Sonden-Kombination	0,625 µl

Tab. 3.6: Substanzen für die quantitative Echtzeit-PCR

Diese Substanzen wurden in die *wells* der Multititerplatten pipettiert. Die Multititerplatten wurden dann mit einer Folie abgeklebt, die vor Verdunstung schützen soll. Nach kurzer Zentrifugation der Platte konnte diese in den PCR-Cycler eingesetzt und die quantitative Echtzeit-PCR nach folgendem Schema gestartet werden:

1. 1x 95 °C für 5 min
2. 45x 65 °C für 15 sec
3. 45x 60 °C für 1 min

3.10 Proteinanalytik

Zur Quantifizierung der Aktivität des Proliferations-assoziierten Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs sowie der Expression des PSZ-Aktivierungsmarkers α -SMA wurden Immunoblotanalysen durchgeführt. Dazu wurden frisch aufgetaute PSZ in Standardmedium überführt und auf 12-*well*-Platten eingesät. Nach eintägiger Adhärenz wurden die Zellen mit den Vitamin-D Derivaten mittels Mediumwechsel inkubiert. Diese Inkubation wurde an Tag 4 beendet.

3.10.1 Probengewinnung

Zur Gewinnung der Proben für die Proteinanalyse wurde zunächst das Standardmedium abgesaugt und 100 µl Probenpuffer auf die *wells* gegeben. Der Probenpuffer enthält 2%iges Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS). Dieses anionische Tensid zerstört die nicht-kovalenten Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine und sorgt so für eine Proteindenaturierung. Außerdem lagert sich das SDS an die Proteine an und bewirkt deren Negativierung. Das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene 5%ige β -Mercaptoethanol spaltet die

Disulfidbrückenbindungen der Proteine. Durch die oben genannten Denaturierungs- und Negativierungsvorgänge der Eiweiße werden diese für eine folgende SDS-Gelelektrophorese vorbereitet. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren konnten die Proteinextrakte in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden. Daraufhin wurden die Proben für 5 min bei 95 °C gekocht, um vorhandene Proteasen zu inaktivieren, den Zellaufschluss und die Proteindenaturierung zu komplettieren und Proteinkomplexe in Lösung zu bringen. Abschließend wurden die gewonnenen Proteinextrakte für 5 min bei maximaler Beschleunigung und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach konnten die Proben bei -20 °C gelagert werden.

3.10.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der einzelnen Proteine wurde eine diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Dabei werden die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Proteine wandern durch eine Gelmatrix aus Sammelgel und Trenngel aufgrund der zuvor durchgeführten Negativierung der Ladung durch SDS von der Kathode zur Anode. Das Sammelgel besitzt größere Poren und dient dazu, die Proteine am Übergang zum Trenngel zu konzentrieren. Das Trenngel ist feinporiger als das Sammelgel, sodass Eiweiße mit einer geringen Molekülmasse einfacher durch das Gel wandern können als solche mit einer großen Molekülmasse. Erst hier erfolgte die Auftrennung der jeweiligen Proteine nach der Größe.

Substanz	Menge
H ₂ O	3,35 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,55 ml
Acryamidstammlösung 40%	1,25 ml
10% APS	33 µl
TEMED	10 µl

Tab. 3.7: Trenngel-Zusammensetzung für ein 8%iges Minigel

Substanz	Menge
H ₂ O	950 µl
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	400 µl
Acryamidstammlösung 40%	187,5 µl
10% APS	10 µl
TEMED	3 µl

Tab. 3.8: Sammelgel-Zusammensetzung für ein Minigel

Zur Analyse des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs und von α -SMA wurden Minigele verwendet. Nachdem die Größe der Auftragesaschen auf den Glaskammern markiert worden war, konnte das Trenngel bis zur Markierung gegossen und mit Aqua dest. überschichtet werden. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Aqua dest. abgegossen und das Sammelgel bis zum oberen Ende der Glasplatten hinzugegeben. Nun wurde der Kamm für die Auftragesaschen in das Sammelgel gesetzt und wiederum gewartet, bis das Sammelgel auspolymerisiert war. Der Kamm für die Auftragesaschen konnte nun entfernt und die Glasplatten in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt werden. Die Geltaschen wurden nun mit jeweils 20 µl der Proben befüllt. Als Protein-Molekulargewichtsmarker wurden 2,5 µl *Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder* in eine Geltasche pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde nun bei 200 V durchgeführt, bis die Lauffront der Proteine den unteren Rand der Glasplatten erreichte.

3.10.3 Proteintransfer auf PVDF-Membran

Der Proteintransfer vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde mittels Tank-Blot unter durchgehend feuchten Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde die PVDF-Membran zunächst mit Methanol und Ethanol äquilibriert, um dann als Bestandteil eines „Sandwiches“ aus Schwamm-Pappe-Gel-PVDF-Membran-Pappe-Schwamm verwendet zu werden. Dieses „Sandwich“ wurde nun vertikal in den mit Transferpuffer gefüllten Tank-Blot gestellt. Das Blotting-Verfahren wurde über Nacht unter leichtem Rühren bei 100 mA und einer Raumtemperatur von 4 °C durchgeführt. Danach wurde die Membran für einige Minuten in PBS gewaschen und für eine Stunde mit Block-Puffer (1:5 in PBS pH 7,4 verdünnt) bei 4 °C

inkubiert, um frei gebliebene Bindungsstellen zu besetzen und somit unspezifische Bindungen des später hinzugegebenen Primärantikörpers zu verhindern.

3.10.4 Spezifischer Proteinnachweis

Die eingesetzten Primärantikörper wurden, wie in Tab. 3.9 angegeben, in Block-Puffer (1:5 in PBS, pH 7,4, verdünnt) verdünnt. Außerdem wurde 0,1% Tween-20 hinzugegeben. Daraufhin wurde der jeweilige Primärantikörper auf die Membran gegeben und konnte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln an das spezifische Protein binden. Im Anschluss daran wurde die Membran viermal für je 5 min mit PBS (pH 7,4) mit 0,1% Tween-20 gewaschen, sodass nicht gebundene Antikörpermoleküle entfernt werden konnten. Nun wurden die fluoreszierenden Sekundärantikörper hinzugegeben. Diese gegen Maus-IgG bzw. gegen Ratten-IgG gerichteten Sekundärantikörper waren mit den Fluoreszenzfarbstoffen IRDye 680CW (rot) oder IRDye 800CW (grün) gekoppelt. Die Sekundärantikörper wurden 1:5000 in Block-Puffer (1:5 verdünnt in PBS pH 7,4) und 0,1% Tween-20 verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur unter abgedunkelten Bedingungen auf die Membran gegeben. Daraufhin wurde die Membran abermals viermal für je 5 min mit PBS (pH 7,4) mit 0,1% Tween-20 gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Die jeweiligen Proteinbanden konnten nun mithilfe eines *Odyssey Infrared Imaging Systems* detektiert werden. Dazu wurde eine Anregungswellenlänge von 680 nm für IRDye 680CW und 800 nm für IRDye 800CW verwendet. Die Quantifizierung der Intensität der Proteinbanden erfolgte mit der *Software Image Studio Lite Version 5.2*.

Antikörper	Verdünnung in Block-Puffer und 0,1% Tween-20	relative Molekülmasse des zugehörigen Proteins
α-SMA	1:3000	42 kDa
ERK 1/2	1:5000	44/42 kDa
GAPDH	1:5000	37 kDa
Phospho-ERK 1/2	1:1000	44/42 kDa

Tab. 3.9: Verdünnung der eingesetzten Antikörper und relative Molekülmasse der zugehörigen Proteine

Um Proteine nachzuweisen, die eine identische oder ähnliche Molekulargröße hatten, wurde die Membran für zweimal 20 min mit Stripp-Puffer im Wasserbad bei 65 °C behandelt. So konnten gebundene Antikörper entfernt werden. Um den Erfolg dieses Waschvorgangs zu verifizieren, wurde die Membran am *Odyssey Infrared Imaging System* eingelesen. Sofern keine Proteinbanden mehr zu erkennen waren, war der Waschvorgang erfolgreich und ein neuer Primärantikörper konnte, nach einer einstündigen Behandlung mit Block-Puffer (1:5 in PBS gelöst, pH 7,4), auf die Membran gegeben werden.

3.11 IL-6-Analyse mittels ELISA

Zur Analyse der IL-6-Konzentration im Kulturmedium wurden vollständig aktivierte PSZ nach zweitägiger Adhärenz für 24 h mit den jeweiligen D-Vitaminen behandelt. Im Anschluss daran wurde das Standardmedium abpipettiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 20 min bei Raumtemperatur und 1000 x g zentrifugiert. Der daraufhin gewonnene Mediumüberstand wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Quantifizierung der IL-6-Konzentration wurde ein kommerziell verfügbares IL-6 ELISA-Kit verwendet. In einem ersten Schritt wurden die *wells* einer 96-*well*-Platte über Nacht mit einem gegen IL-6-gerichteten *capture*-Antikörper beschichtet. Nach mehreren Waschschritten mit Waschlösung konnten nun 100 µl der Proben auf die *wells* gegeben werden. Außerdem wurden 100 µl der nach Herstellerangaben verdünnten Standardlösungen in die *wells* pipettiert. Nun konnten die IL-6-Moleküle für 2 h bei Raumtemperatur am *capture*-Antikörper binden. Darauf folgende Waschschriffe entfernten nicht gebundene Mediumbestandteile. Anschließend wurden 100 µl eines nach Herstellerangaben verdünnten Detektions-Antikörper auf die *wells* gegeben. Dieser an Biotin gekoppelte Detektions-Antikörper konnte nun für 1 h am IL-6-Antigen binden, sodass ein Konstrukt aus Antikörper-IL-6-Antigen-Antikörper resultierte. Das Antigen befindet sich also zwischen zwei Antikörpern, weshalb man bei dieser Detektionsmöglichkeit von Antigenen auch vom „*Sandwich-Elisa*“ spricht. Nach weiteren Waschvorgängen zur Entfernung von nicht gebundenen Detektionsantikörpern wurde nun Avidin-HRP-Lösung auf die *wells* pipettiert. Das Avidin bindet am Biotin des Detektionsantikörpers. Nach 30-minütiger Inkubation mit der Avidin-Lösung wurde nochmals gründlich gewaschen, bevor für 15 min ein Substrat in die *wells* gegeben wurde. Dieses Substrat wird von einer an Avidin gekoppelten Peroxidase gespalten, was in einem Farbumschlag resultierte. Diese Peroxidase-Reaktion wurde nach 15 min mit Schwefelsäure (1 M) abgestoppt und die Intensität des Farbumschlags konnte am Photometer bei 450 nm gemessen werden. Die Auswertung der Messwerte erfolgte dann mit der Software *ELISAanalysis.com*.

3.12 Statistische Auswertung

Die Untersuchungsergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt. Die SEM berechnet sich dabei als Quotient aus der Standardabweichung und der Anzahl der jeweiligen Proben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS Statistics 22. Dabei wurde zunächst jeweils eine Testung der Werte auf Normalverteilung vorgenommen. Anschließend wurde ein nicht-parametrischer Test nach Kruskal-Wallis mit anschließendem Mann-Whitney U-Test durchgeführt, um statistische Signifikanzen zu analysieren. Lediglich die IL-6-ELISA-Daten wurden anhand einer einfaktoriellen ANOVA auf Signifikanzen geprüft. In allen Fällen lag die Signifikanzschwelle bei $p \leq 0,05$ nach Bonferroni-Korrektur.

4. Ergebnisse

4.1 Mikroskopische Beobachtungen kultivierter pankreatischer Sternzellen

Für die nachfolgenden Versuche wurden kultivierte murine PSZ verwendet, die entweder sofort nach dem Auftauen der Zellen verwendet oder nach einmaliger Passagierung für die jeweiligen Versuche eingesetzt wurden. Auffällig ist, dass sich die Zellmorphologie der PSZ in beiden Versuchsanordnungen unterscheidet. Die frisch eingesäten Zellen (Abb. 4.1, A) besitzen einen rundlichen, eher flachen Zellkörper. Am dritten Tag der Adhärenz (Abb. 4.1, B) wirken die Zellkörper der PSZ schon verzweigt und auslaufend. Einmal passagierte PSZ (Abb. 4.2) imponieren mit schmalen Zellkörpern und sternförmig auslaufenden Fortsätzen. Diese, auch morphologisch erkennbare, Aktivierung der PSZ erfolgte durch den Kontakt mit dem Plastikboden der *wells* und die Versorgung der Zellen mit Mitogenen und Wachstumsfaktoren des eingesetzten Standardkulturmediums.

4.2 Effekte der Vitamin D-Derivate auf die Zelltodrate passagierter PSZ

Um den Einfluss der Vitamin D-Derivate auf den Zelltod passagierter PSZ zu analysieren, wurde ein Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Trypanblau kann ausschließlich die Membran toter Zellen passieren, färbt diese und erlaubt eine anschließende Zählung der blau gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop.

Die nachfolgende Abbildung zeigt, dass keines der drei Vitamin D-Derivate in einer Konzentration von 100 nM die Zelltodrate passagierter PSZ signifikant beeinflusst. In der unbehandelten Kontrolle konnten 5,3% toter PSZ nachgewiesen werden. Zwar war der Anteil der toten PSZ in den mit Vitamin D2 bzw. Vitamin D3 behandelten PSZ mit 7% bzw. 6,3% numerisch größer, doch stellten sich diese Unterschiede als nicht signifikant heraus. Die mit Calcipotriol behandelten PSZ wiesen einen Anteil toter PSZ von 4,2% auf, was einen nicht signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle darstellte.

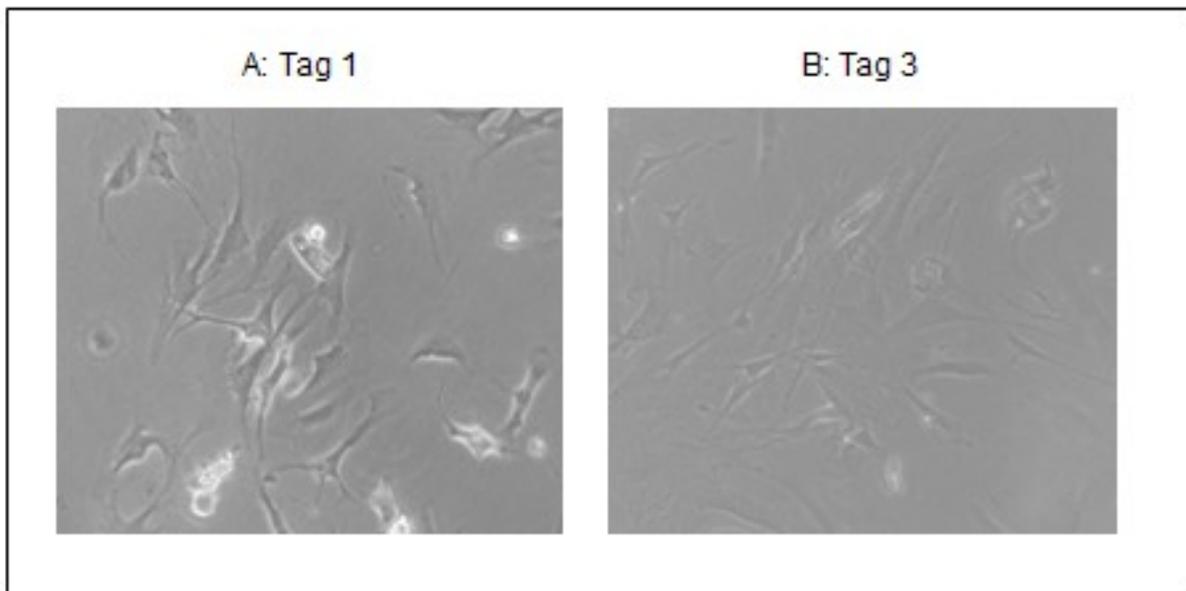


Abb. 4.1: PSZ wurden frisch aufgetaut, in Standardkulturmedium aufgenommen und auf einer 6-*well*-Platte eingesät.

A: Tag 1 nach Einsaat, 100-fache Vergrößerung

B: Tag 3 nach Einsaat, 100-fache Vergrößerung

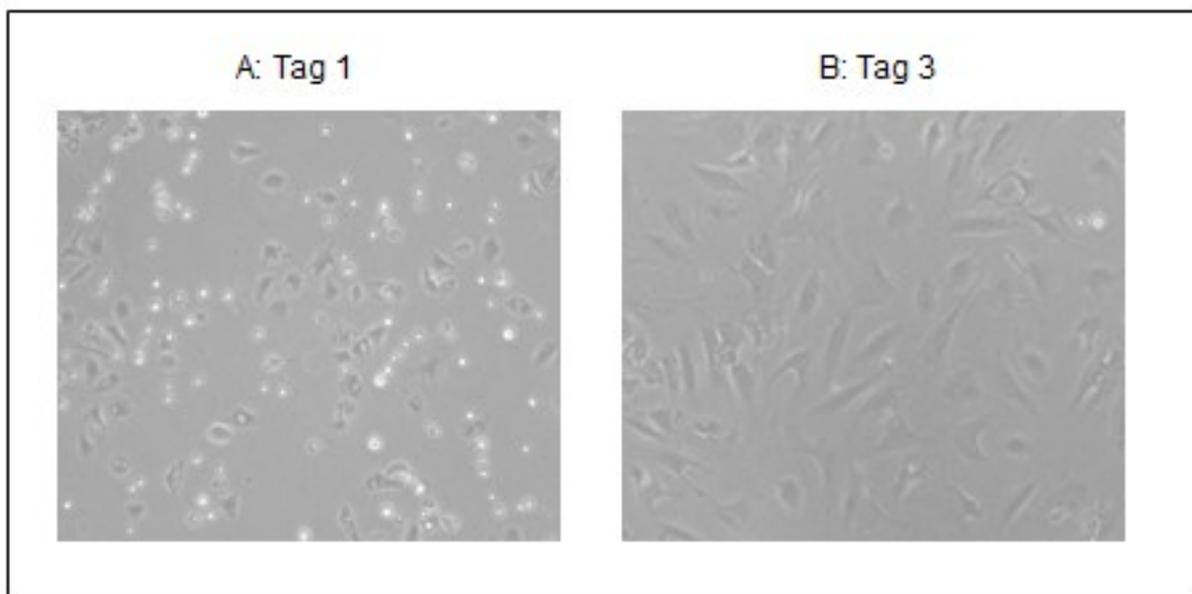


Abb. 4.2: PSZ wurden einmalig passagiert, in Standardkulturmedium aufgenommen und auf 6-*well*-Platten eingesät.

A: Tag 1 nach Einsaat, 100-fache Vergrößerung

B: Tag 3 nach Einsaat, 100-fache Vergrößerung

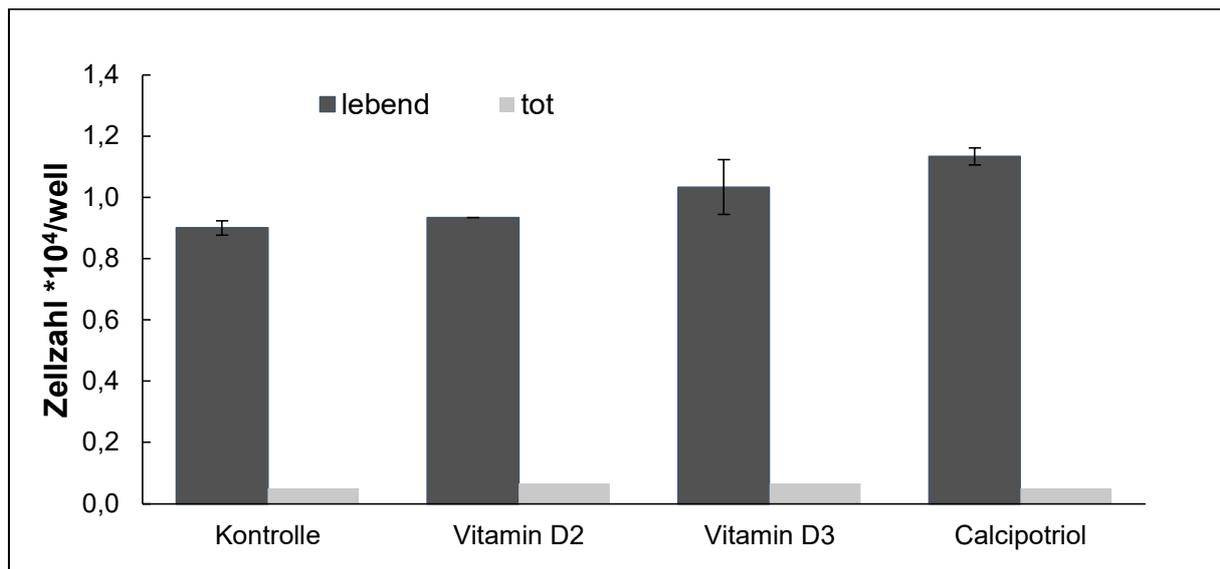


Abb. 4.3: Einmalig passagierete PSZ wurden für 48 h mit den angegebenen Vitamin D-Derivaten in einer Konzentration von jeweils 100 nM behandelt. Die Zahl lebender und toter Zellen wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Kulturen pro Messpunkt.

4.3 Einfluss der Vitamin D-Derivate auf das Proliferationsverhalten von PSZ

Der Einfluss der Vitamin D-Derivate auf die Proliferationsrate von PSZ wurde mittels BrdU-Einbautest quantifiziert. BrdU wird während der Replikation in die sich verlängernde DNA eingebaut.

Abb. 4.4 zeigt die BrdU-Inkorporation in frühe aktivierte PSZ in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen der unterschiedlichen D-Vitamine in Bezug auf eine Kontrollpopulation. Es zeigte sich, dass die D-Vitamine unabhängig von der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf die Proliferationsaktivität der PSZ haben. Die Unterschiede im Vergleich zu einer mitgeführten Kontrolle sind nicht signifikant.

Der BrdU-Einbau in passagierete und damit vollständig aktivierte PSZ ist in Abb. 4.5 dargestellt. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede der in verschiedenen Konzentrationen eingesetzten Vitamin D-Derivate auf die Proliferationsaktivität der PSZ im Vergleich zur Kontrollpopulation ausgemacht werden.

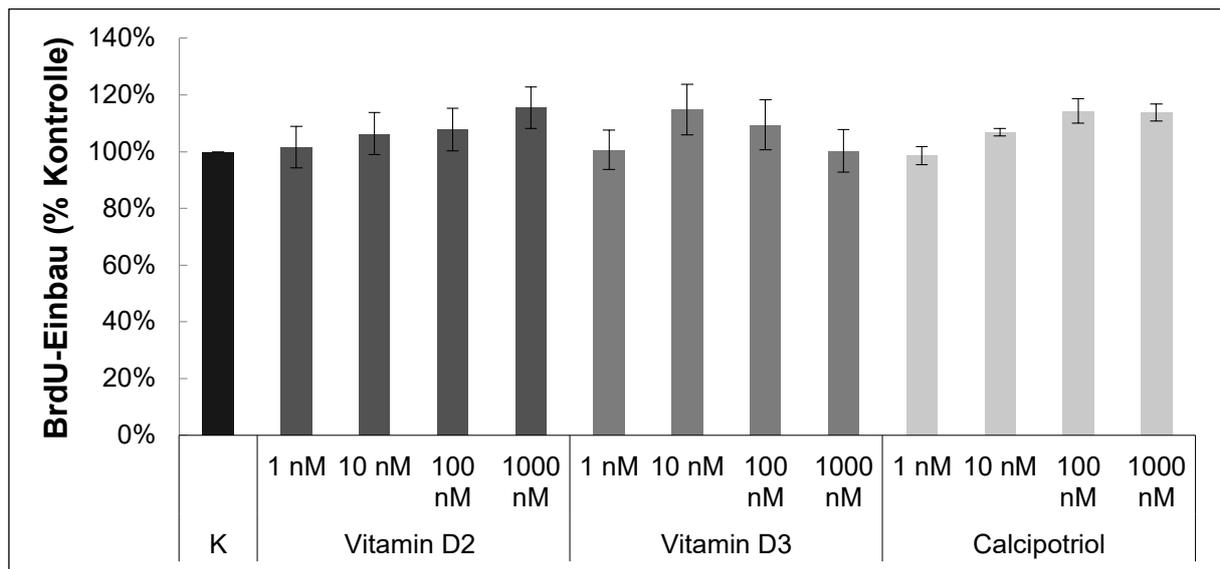


Abb. 4.4: Frisch aufgetaute PSZ wurden in gleicher Dichte auf *wells* einer 96-*well*-Platte eingesät und nach eintägiger Adhärenz mit den Vitamin D-Derivaten in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach 48-stündiger Inkubation mit den D-Vitaminen wurde BrdU (1:1000 verdünnt) hinzugegeben und der Versuch wiederum 24 h später abgestoppt. Der BrdU-Einbau wurde mittels eines ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von ≥ 12 unabhängigen Kulturen pro Messpunkt.

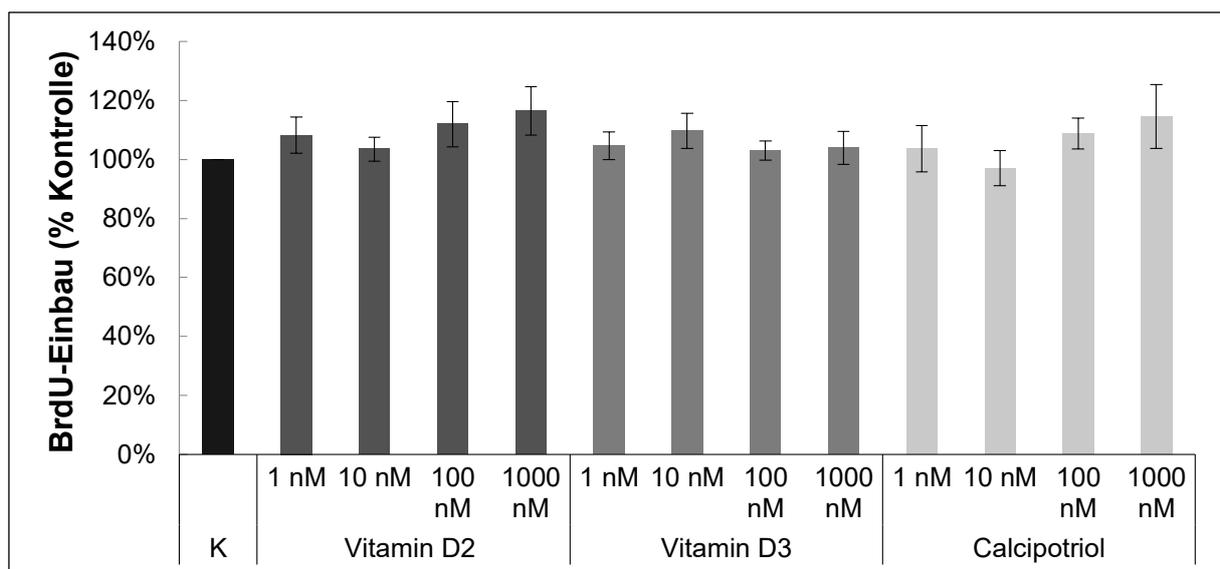


Abb. 4.5: Einmal passagierte PSZ wurden in gleicher Dichte auf *wells* einer 96-*well*-Platte eingesät und nach eintägiger Adhärenz mit den Vitamin D-Derivaten in angegebener Konzentration behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation mit den D-Vitaminen wurde BrdU (1:1000 verdünnt) hinzugegeben und der Versuch wiederum 24 h später abgestoppt. Der BrdU-Einbau wurde mittels eines ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von ≥ 18 unabhängigen Kulturen pro Messpunkt.

In einem weiteren BrdU-Assay wurde versucht, den Behandlungsablauf von PSZ einer finnischen Arbeitsgruppe (Bläuer *et. al*, 2015) nachzuvollziehen. Das experimentelle *Design* wurde dazu wie folgt verändert: Die Inkubation der zuvor einmal passagierten PSZ mit Vitamin D3 in den angegebenen Konzentrationen erfolgte erstmalig nach dreitägiger Adhärenz. An Tag 4 und Tag 7 wurde jeweils eine Erneuerung der D-Vitamine mittels Mediumwechsel durchgeführt. An Tag 9 wurde BrdU hinzugegeben und der Versuch an Tag 10 abgestoppt und mittels ELISA ausgewertet. Insgesamt wurden die PSZ für 7 Tage und damit deutlich länger als in den zuvor beschriebenen BrdU-Assays mit Vitamin D3 behandelt. Nachfolgend sind die Ergebnisse dieses BrdU-Assays unter dem Einfluss verschiedener Vitamin D3-Konzentrationen in Bezug auf eine Kontrolle dargestellt. Hier wird deutlich, dass der BrdU-Einbau in die PSZ unter dem Einfluss von 0,1 nM Vitamin D3 auf 88% absinkt. Diese Proliferationshemmung wird durch eine Steigerung der Vitamin D3-Dosis auf 1 nM verstärkt, sodass der BrdU-Einbau auf 67% abnimmt. Diese dosisabhängige Hemmung der PSZ-Proliferation lässt sich durch eine nochmalige Steigerung der Dosis um den Faktor 10 jedoch nicht fortführen. So sinkt die PSZ-Proliferationsrate unter dem Einfluss von Vitamin D3 in einer Konzentration von 10 nM zwar auf 68% im Vergleich zur Kontrolle, verglichen mit der PSZ-Proliferation unter dem Einfluss von Vitamin D3 in einer Konzentration von 1 nM steigt der Wert jedoch leicht um 1%. Alle beschriebenen Rückgänge der Proliferationsrate unter dem Einfluss verschiedener Vitamin D3-Konzentrationen sind jedoch mit einem p-Wert von 0,233 im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant.

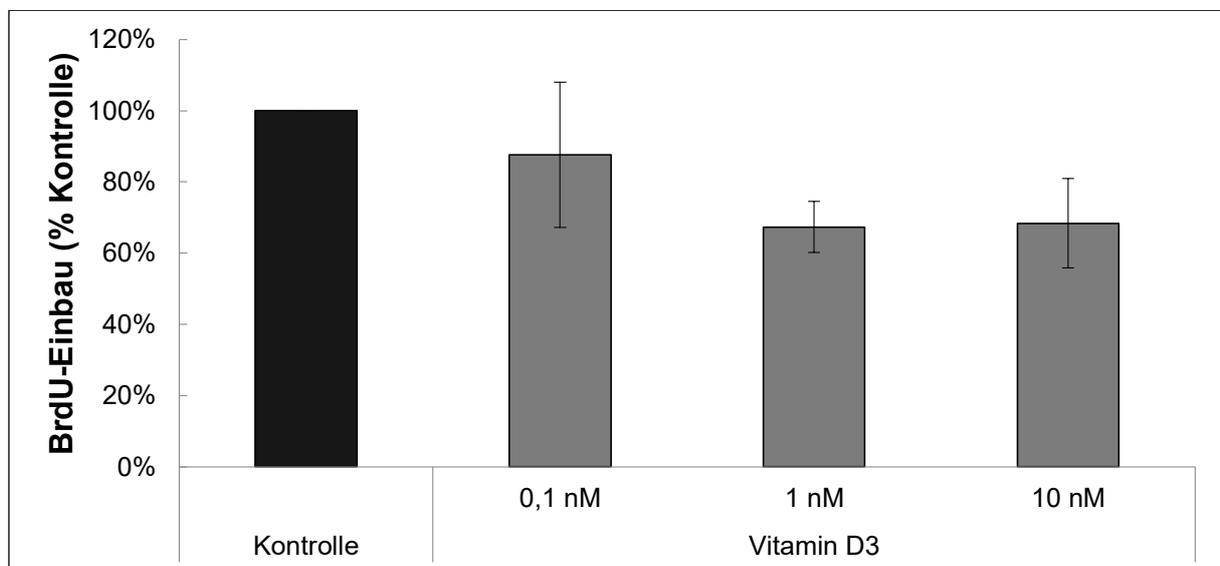


Abb. 4.6: Einmal passagierte PSZ wurden nach dreitägiger Adhärenz mit Vitamin D3 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Ein Wechsel des Standardmediums bzw. von Vitamin D3 erfolgte an Tag 4 und Tag 7 nach Passagierung. An Tag 9 wurde BrdU (1:1000 verdünnt) hinzugegeben und der Versuch wiederum 24 h später abgestoppt. Die DNA-Syntheserate wurde mittels BrdU-Einbautest detektiert. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Kulturen pro Messpunkt.

4.4 Wirkungen der Vitamin D-Derivate auf die Ausprägung der Lipidspeicher in den PSZ

Ruhende PSZ zeichnen sich durch eine hohe Anzahl von Lipiden aus, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Eine Aktivierung der PSZ führt zu einem Verlust der Lipide. So kann über eine Quantifizierung der Fetttröpfchen innerhalb der PSZ auf den Aktivierungszustand geschlossen werden. Ölrot färbt die Lipide in den PSZ, sodass die Lipidtröpfchen der PSZ daraufhin über eine Sichtung im Phasenmikroskop evaluiert werden können.

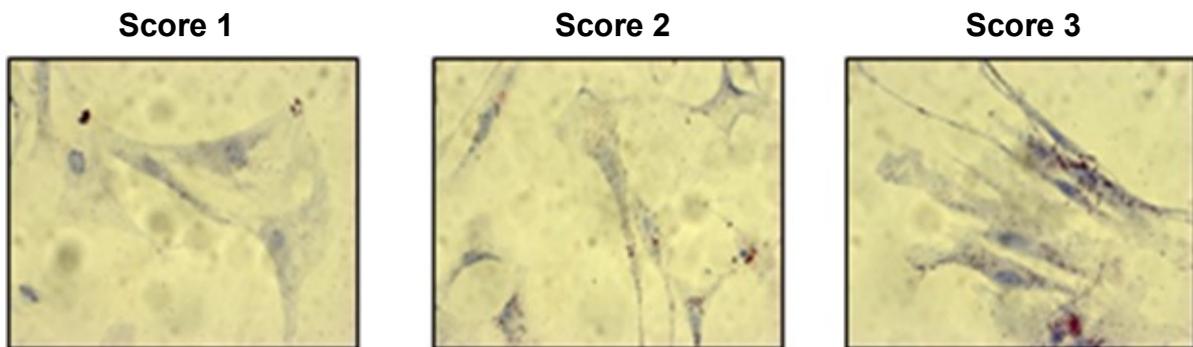
Die nachfolgende Abb. 4.7 zeigt, dass sich frisch eingesäte PSZ und einmal passagierte PSZ in der Ausprägung der Fetttröpfchen unterscheiden. Um diese Unterschiede semiquantitativ zu erfassen, wurde ein Scoring-Schema (Abb. 4.7, A) etabliert, das im Methodenteil (3.6) detailliert beschrieben ist. Die Befundung erfolgte durch zwei unabhängige Beobachter anhand verblindeter Präparate.

Während die Kontrollpopulation der frisch eingesäten und in der Folge frühen aktivierten PSZ mit einem Score von $1,5 \pm 0,08$ eingestuft wurde, wurden die frühen aktivierten PSZ unter Vitamin D2-Einfluss mit $2,1 \pm 0,11$ bewertet. Auch die Scores für die mit Vitamin D3 und Calcipotriol behandelten PSZ lagen mit Scoring-Werten von $2 \pm 0,12$ bzw. $2 \pm 0,07$ über dem Score der Kontrollpopulation. Die Effekte der D-Vitamine auf die Ausprägung PSZ-Lipidspeicher im Vergleich zu einer Kontrolle waren statistisch signifikant.

Die Ausprägung der Lipidtröpfchen passagierter und damit vollständig aktivierter PSZ wurde unter dem Einfluss von Vitamin D2 und Calcipotriol mit einem Score von $1,9 \pm 0,1$ bzw. $1,8 \pm 0,08$ höher bewertet als bei einer mitgeführten Kontrollpopulation ($1,6 \pm 0,07$). Mit Vitamin D3 behandelte PSZ wurden mit einem Wert von $1,5 \pm 0,05$ bewertet, was unter dem Wert der Kontrollpopulation liegt. Alle beschriebenen Effekte der Vitamin D-Derivate auf die Ausprägung der PSZ-Lipidspeicher verglichen mit einer Kontrollpopulation waren nicht signifikant.

Insgesamt konnte anhand der durchgeführten Versuche ein signifikanter Anstieg der Lipidausprägungen in frisch aufgetauten PSZ im Vergleich zu einer Kontrolle ausgemacht werden. Diese Effekte der D-Vitamine konnten in einmal passagierten PSZ hingegen nicht beobachtet werden.

A



B

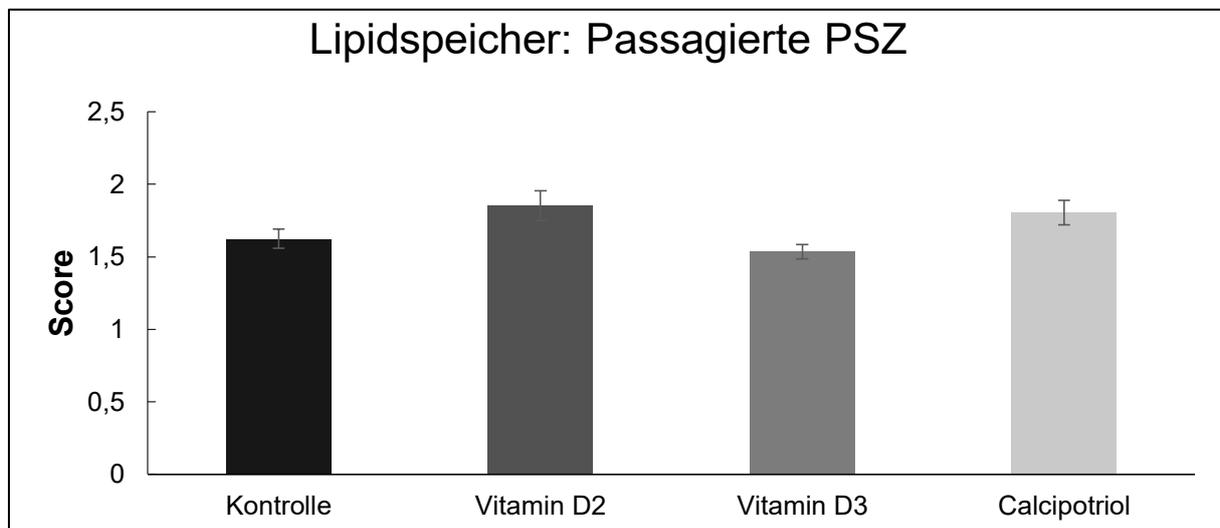
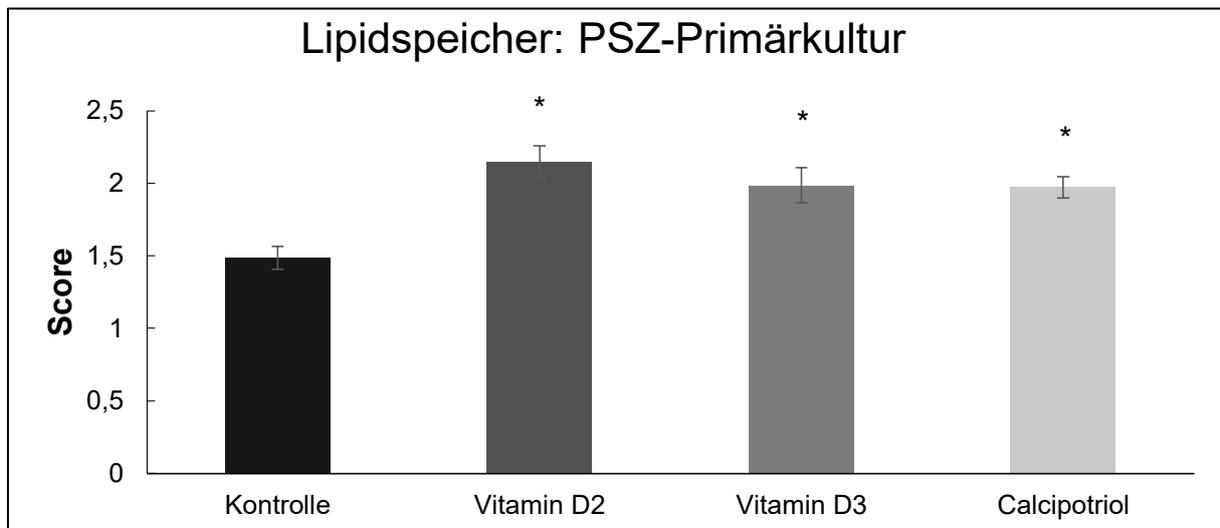


Abb. 4.7: PSZ in Primärkultur (d1-d4) sowie nach einmaliger Passage (d1-d3) wurden mit den angegebenen Vitamin D-Derivaten in einer Konzentration von jeweils 100 nM behandelt. Anschließend wurden intrazelluläre Lipidtröpfchen mittels Ölrotfärbung visualisiert. Anhand verblindeter Präparate erfolgte durch 2 unabhängige Beobachter eine semiquantitative Befundevaluation unter Einsatz eines Scores von 0-3 (A). In (B) angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von ≥ 14 Untersuchungen pro Messpunkt. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur)

4.5 Effekte der D-Vitamine auf die Ausprägung von α -SMA-Fasern in den PSZ

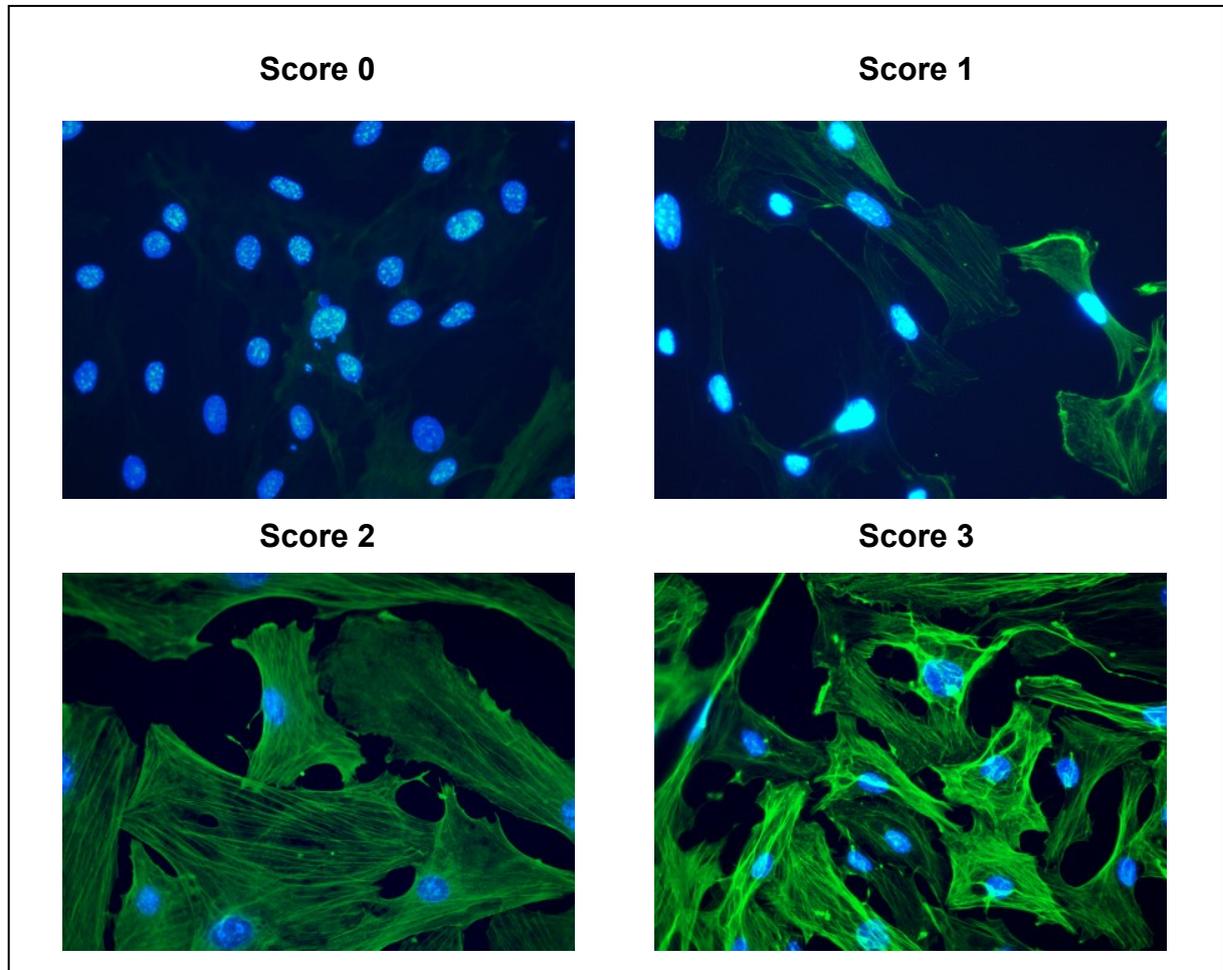
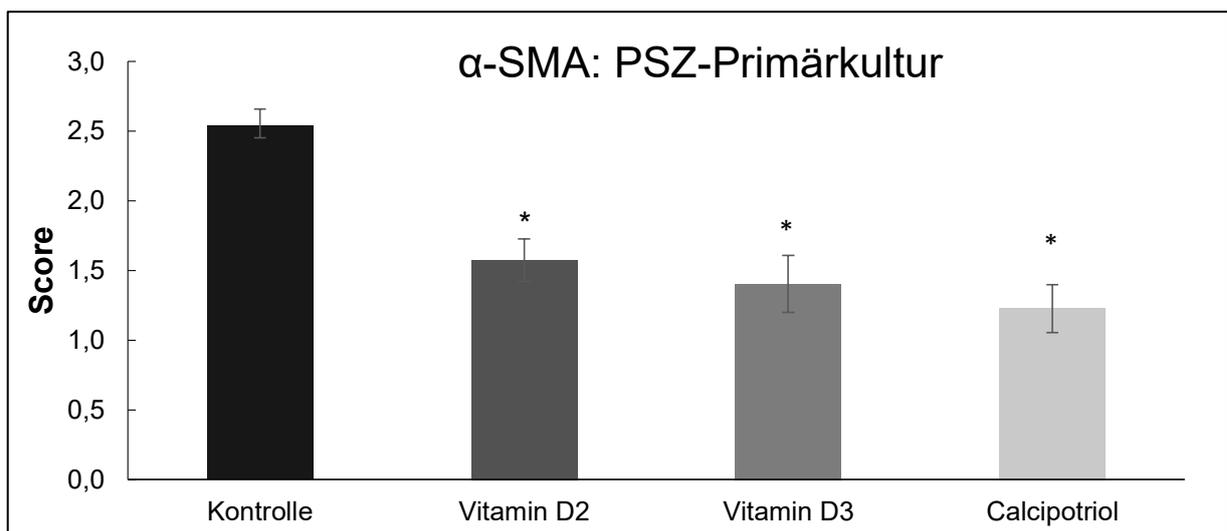
Die Ausprägung von α -SMA-Fasern ist charakteristisch für aktivierte PSZ, wohingegen die Ausprägung solcher Fasern in ruhenden PSZ nicht oder nur gering nachzuweisen ist. Somit kann die Ausprägung der α -SMA-Fasern in den PSZ einen Anhaltspunkt für den Aktivierungszustand der PSZ geben. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnten die α -SMA-Fasern visualisiert und im Anschluss daran unter einem Fluoreszenzmikroskop gesichtet werden.

Zur semiquantitativen Beurteilung der α -SMA-Ausprägung in den PSZ wurde ebenfalls ein Scoring-Schema (Abb. 4.8, A) erstellt, das im Methodenteil (3.7) näher beschrieben ist. Anhand verblindeter Präparate konnte die Ausprägung der α -SMA-Fasern beurteilt werden.

Die Effekte der verschiedenen D-Vitamine auf frisch aufgetaute und im Verlauf frühen aktivierten PSZ sind in Abb. 4.8, B dargestellt. Die α -SMA-Ausprägung in den PSZ der Kontrollpopulation wurde mit einem Wert von $2,5 \pm 0,1$ bewertet. Die Ausprägung der *stress-fibers* in den mit Vitamin D2 und Vitamin D3 behandelten PSZ wurde mit einem Score von $1,6 \pm 0,2$ bzw. $1,4 \pm 0,2$ bewertet. Auch die mit Calcipotriol behandelten PSZ wurden mit einem Wert von $1,2 \pm 0,2$ eingestuft, sodass auch hier von einem Rückgang der Organisation des α -SMA-Zytoskellets ausgegangen werden kann. Insgesamt sind die Effekte aller Vitamin D-Derivate auf die α -SMA-Ausprägung in den PSZ mit einem p-Wert $< 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle signifikant.

Die α -SMA-Ausprägung in passagierten PSZ unter dem Einfluss der Vitamin D-Derivate ist in Abb. 4.8, B dargestellt. Während die Ausprägung der α -SMA-Fasern in den PSZ der Kontrolle mit $2,4 \pm 0,1$ bewertet wurde, wurde die α -SMA-Ausprägung in den mit Vitamin D2 bzw. Vitamin D3 behandelten Zellen mit $2,7 \pm 0,1$ bzw. $2,6 \pm 0,1$ bewertet. Die Organisation des α -SMA-Zytoskellets der PSZ unter Calcipotriol-Einfluss erreichte einen Score von $2,4 \pm 0,1$. Die Wirkungen der eingesetzten D-Vitamine auf die Ausprägung der α -SMA-Fasern in passagierten PSZ sind verglichen mit einer Kontrolle nicht signifikant. Unter den Einflüssen der Vitamin D-Derivate konnte die Ausprägung der α -SMA-Fasern in frisch aufgetauten PSZ

im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesenkt werden, wohingegen die D-Vitamine keine signifikanten Effekte auf die α -SMA-Ausprägung in passagierten PSZ hatten.

A**B**

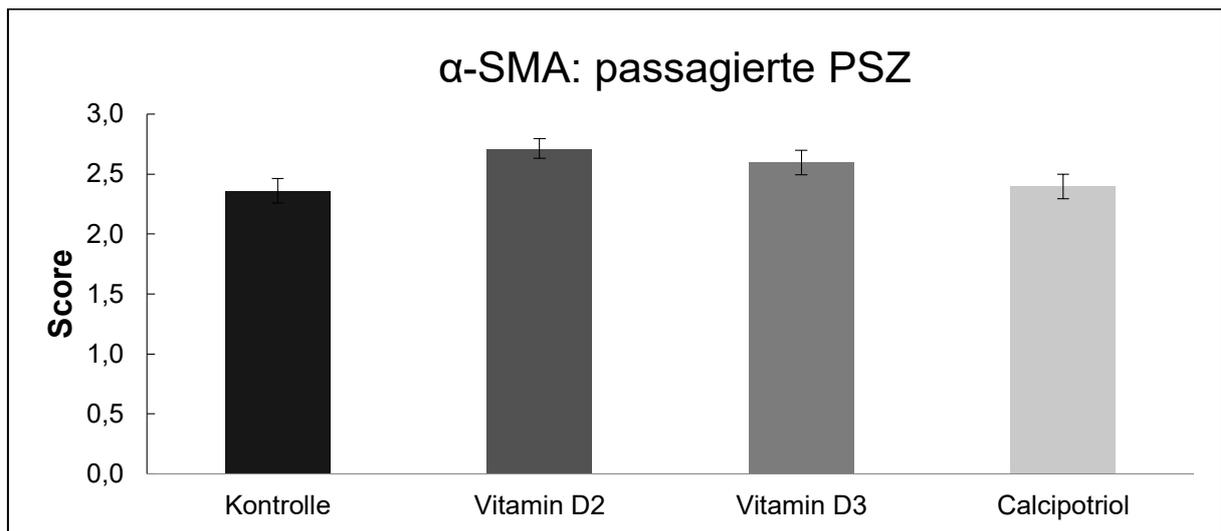


Abb. 4.8: PSZ in Primärkultur (d1-d4) sowie nach einmaliger Passage (d1-d3) wurden mit den angegebenen Vitamin D-Derivaten in einer Konzentration von jeweils 100 nM behandelt. Anschließend wurden α -SMA-Fasern mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert; eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Anhand verblindeter Präparate nahmen 2 unabhängige Beobachter eine semiquantitative Befundung unter Einsatz eines Scores von 0-3 (A) vor. In (B) angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von ≥ 12 Untersuchungen pro Messpunkt. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur)

4.6 Einflüsse der Vitamin D-Derivate auf die Seneszenz von PSZ

Anhand einer Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase-Färbung (SA- β -Gal-Färbung) können seneszente Zellen von noch teilungsfähigen Zellen innerhalb einer Zellkultur abgegrenzt werden. Seneszente Zellen sind als teilungsunfähig definiert, sodass eine Analyse seneszenten Zellen einen Rückschluss auf die diesbezügliche Aktivität der Zellpopulation zulässt.

In der nachfolgenden Abb. 4.9 sind lichtmikroskopische Aufnahmen dargestellt, die die mit den verschiedenen D-Vitaminen behandelten Zellpopulationen nach einer SA- β -Gal-Färbung zeigen. Dabei lässt sich erkennen, dass optisch keine Unterschiede in der Dichte blau gefärbter, seneszenten Zellen in Abhängigkeit der Behandlung der PSZ auszumachen sind. Auch war der Anteil seneszenten Zellen insgesamt minimal. Auf eine (semi)quantitative Evaluation wurde deshalb verzichtet. Die verwendeten D-Vitamine haben demnach keinen Einfluss auf die Seneszenz der PSZ.

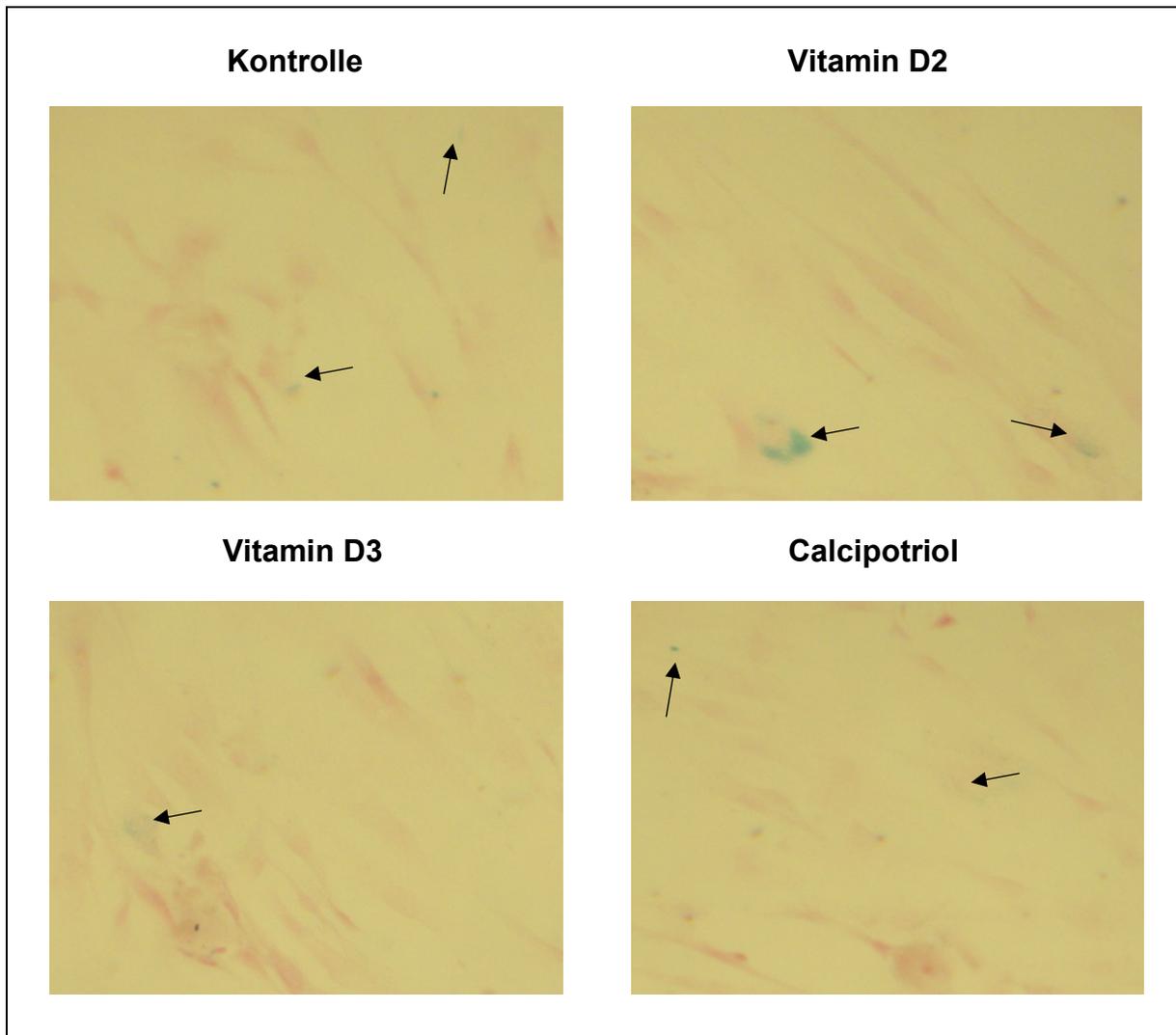


Abb. 4.9: Ein subkonfluent mit PSZ bewachsenes *well* einer 6-*well*-Platte wurde abgeerntet und die Zellen auf 3 *wells* einer 6-*well*-Platte eingesät. Dieser Vorgang der Passagierung wurde nach 2 Tagen Adhärenz der Zellen wiederholt. Nach 6 Tagen Adhärenz wurde wiederum ein mit PSZ bewachsenes *well* abgeerntet und 750 PSZ / *well* auf Deckgläschen einer 24-*well*-Platte eingesät. Nach eintägiger Adhärenz wurden die PSZ für 48 h mit den angegebenen Vitamin D-Derivaten in einer Konzentration von 100 nM inkubiert. Die Markierung seneszenten PSZ (→) erfolgte mit einer Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase-Färbung. Eine Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Kernechtrot (100-fache Vergrößerung). Die Abbildungen verstehen sich jeweils als repräsentative Ausschnitte aus 3 unabhängigen Kulturen.

4.7 Effekte der D-Vitamine auf die Expression ausgewählter PSZ-Gene

Um die Einflüsse der Vitamin D-Derivate auf die Expression verschiedener PSZ-Gene zu evaluieren, wurden Echtzeit-PCR-Analysen durchgeführt. So konnte die mRNA-Expression ausgewählter Gene passagierter und somit vollständig aktivierter PSZ ausgewertet werden.

Nachfolgende Abb. 4.10 zeigt, dass die Expression des *Vitamin D-Rezeptors (VDR)* unter dem Einfluss der eingesetzten D-Vitamine im Vergleich zu einer Kontrollpopulation anstieg. So steigerte Vitamin D2 die *VDR*-Expression auf 209% verglichen mit einer als 100% angesehenen Kontrolle. Auch PSZ, die mit Vitamin D3 bzw. Calcipotriol behandelt wurden, wiesen eine *VDR*-Expression von 321% bzw. 280% auf. Diese Effekte sind im Vergleich mit einer Kontrollpopulation mit einem p-Wert < 0,05 statistisch signifikant.

Weiterhin wurde der Einfluss der D-Vitamine auf die Expression von *Interleukin-6 (IL-6)* untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass die *IL-6*-Expression der PSZ unter Vitamin D2-Einfluss auf 51%, bezogen auf eine 100%ige Kontrolle, gesenkt werden konnte. Ähnliche Wirkungen konnten unter dem Einfluss von Vitamin D3 und Calcipotriol ausgemacht werden. Auch hier war eine Senkung der *IL-6*-Expression auf 58% bzw. 57% festzustellen. Dieser Rückgang der *IL-6*-Expression der passagierten PSZ unter dem Einfluss aller eingesetzten D-Vitamine ist verglichen mit einer mitgeführten Kontrolle signifikant.

Die Wirkungen der D-Vitamine auf die Expression von *α -1-Typ-1-Kollagen (Col1a1)* der PSZ wurden ebenfalls untersucht und analysiert. Es ist erkennbar, dass keines der drei eingesetzten D-Vitamine die *Col1a1*-Expression signifikant beeinflusst.

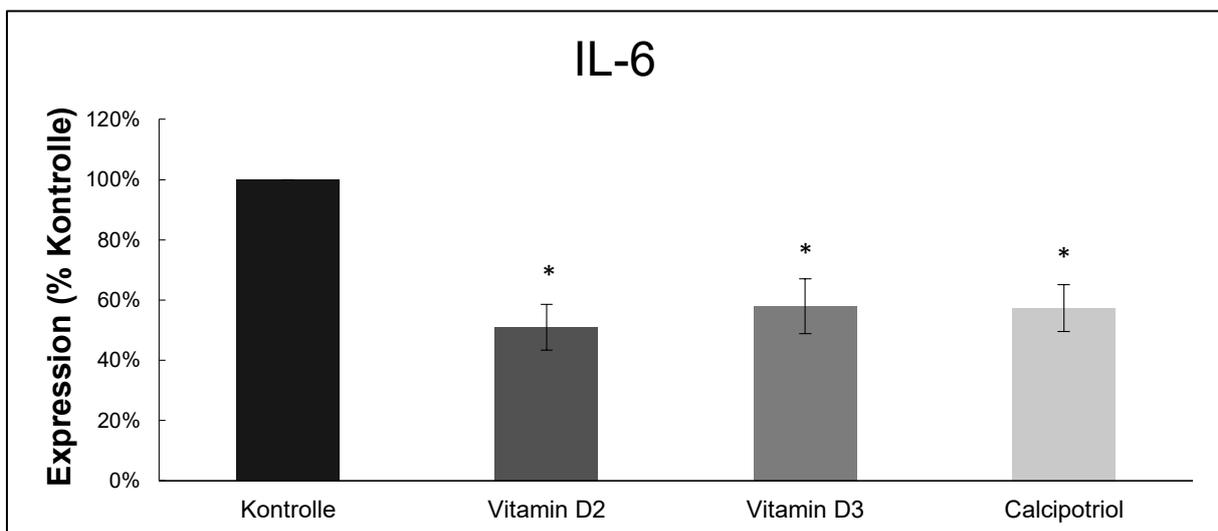
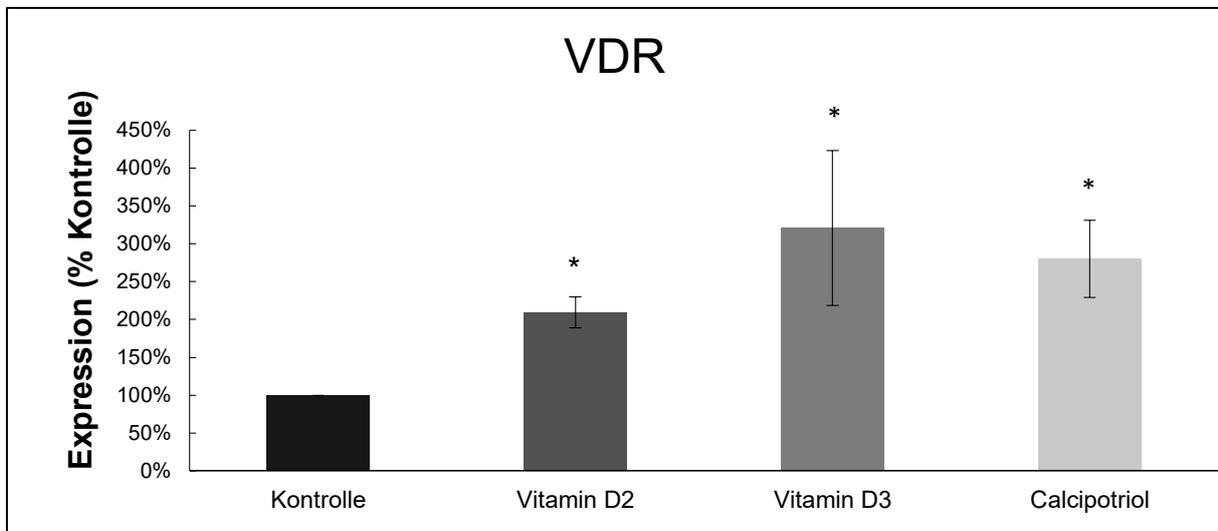
Die Einflüsse der Vitamin D-Derivate auf die Gen-Ausprägung des *Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)* der PSZ wurden ebenfalls evaluiert. Zwar sinkt die *TGF- β 1*-Expression unter dem Einfluss von Vitamin D2, Vitamin D3 und Calcipotriol auf 97%, 93% und 86%, verglichen mit einer *TGF- β 1*-Expression von 100% in einer Kontrolle, doch sind diese Wirkungen der D-Vitamine mit einem p-Wert von 0,243 nicht signifikant.

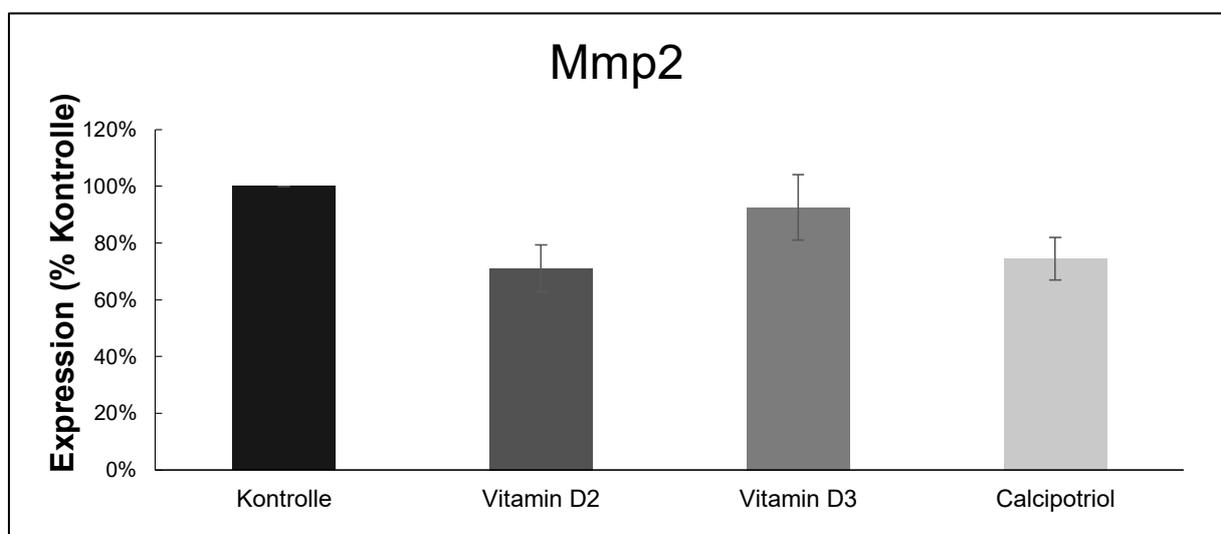
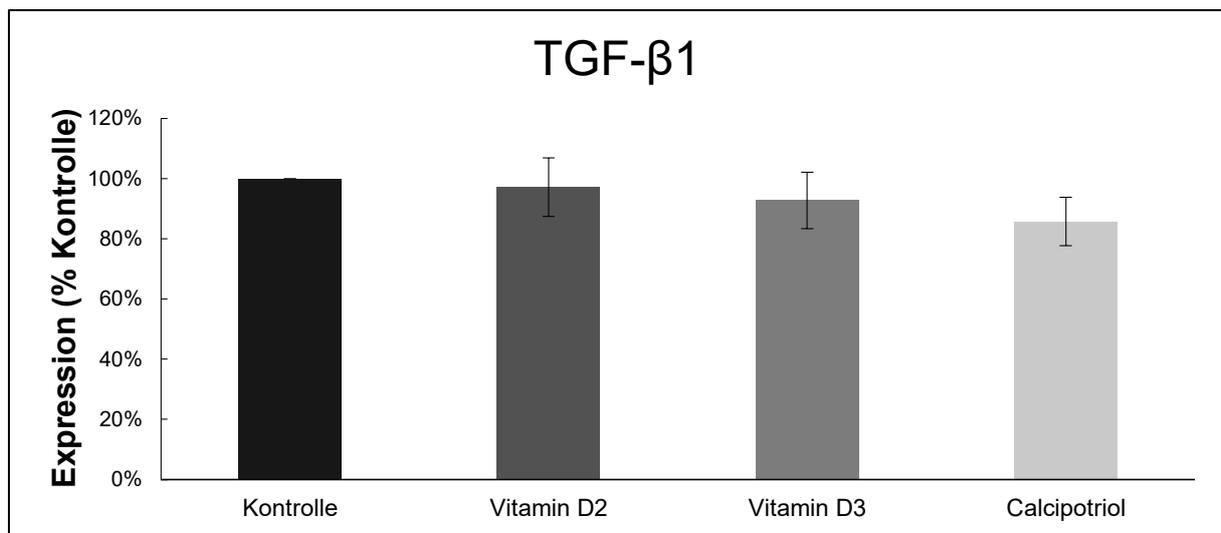
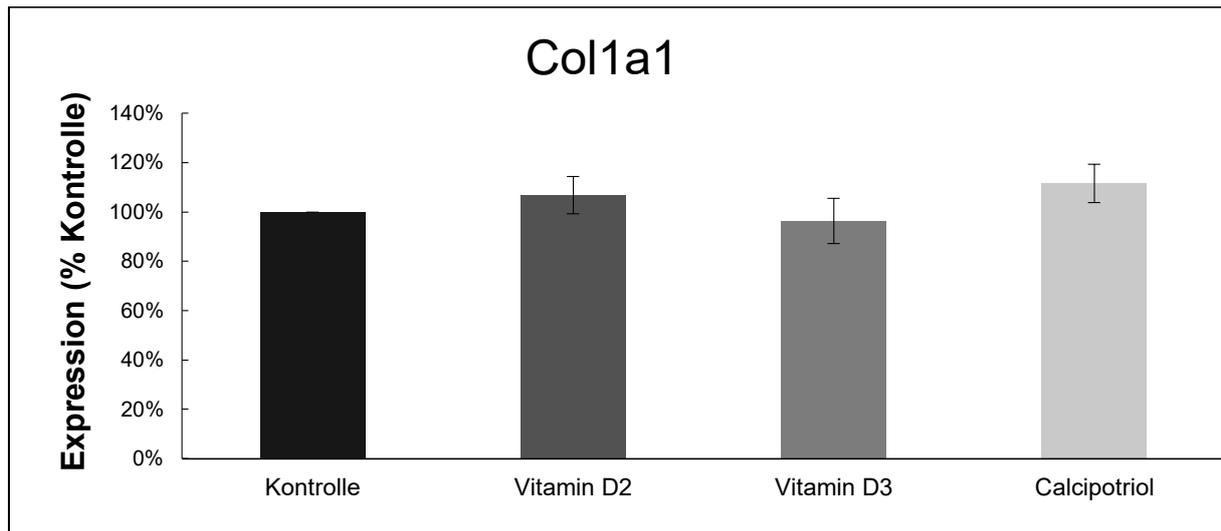
Vitamin D2 und Calcipotriol senken die Genexpression der *Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)* der PSZ auf 71% bzw. 75%, wohingegen die *MMP-2*-Ausprägung unter dem Einfluss von Vitamin D3 auf 95% sinkt. Da auch hier der p-Wert der *MMP-2*-Ausprägung der PSZ unter den Einflüssen der D-Vitamine verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle oberhalb der Signifikanzschwelle liegt, sind die D-Vitamin-Effekte nicht signifikant.

Darüber hinaus wurde die *α -SMA*-Expression unter den jeweiligen Vitamin D-Einflüssen untersucht. Während unter Vitamin D2-Inkubation die *α -SMA*-Ausprägung auf 86% sank, entsprach die *α -SMA*-Expression unter Calcipotriol mit 100% der *α -SMA*-Expression der Kontrolle. Unter dem Einfluss von Vitamin D3 stieg die *α -SMA*-Expression auf 103%. Auch diese Werte beziehen sich auf eine *α -SMA*-Ausprägung von 100% in einer PSZ-

Kontrollpopulation. Mit einem p-Wert von 0,266 sind die Vitamin D-Effekte auf die α -SMA-Expression im Vergleich mit einer Kontrolle nicht signifikant.

Mehrmalige Versuche von Genexpressionsanalysen aus frühen aktivierten PSZ blieben aufgrund der geringen RNA-Extraktionsmenge erfolglos.





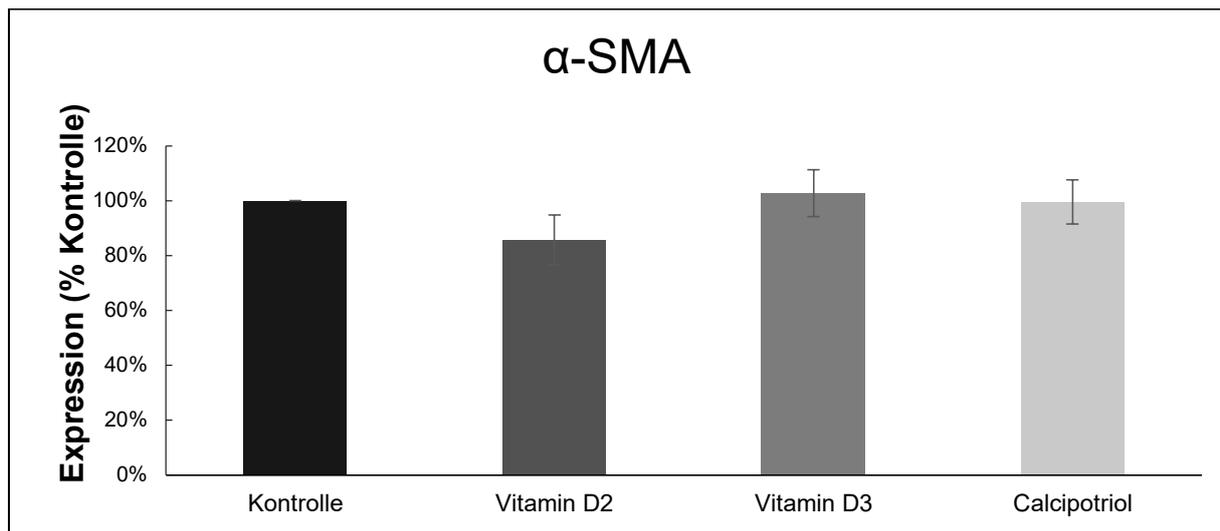


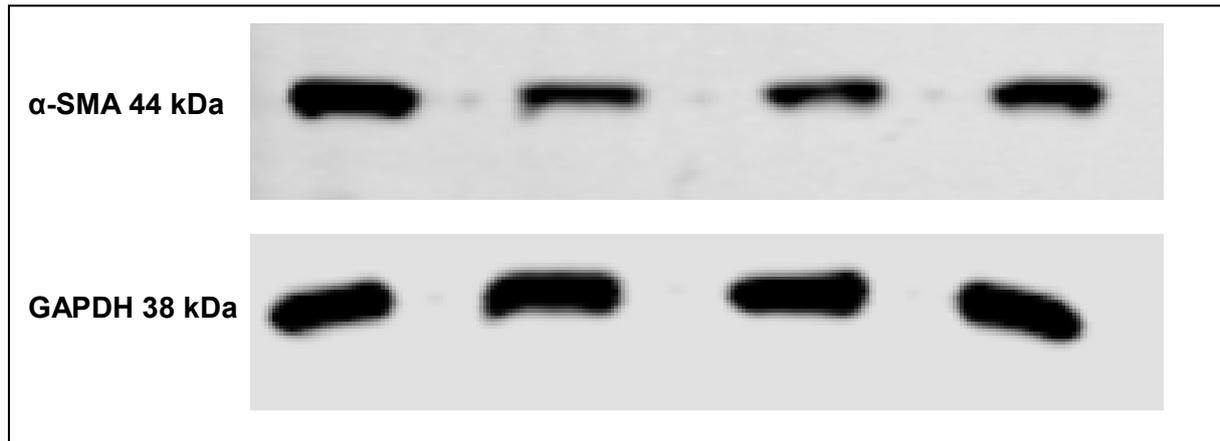
Abb. 4.10: Einmalig passagierte PSZ wurden für 24 h mit den angegebenen Vitamin D-Derivaten in einer Konzentration von jeweils 100 nM behandelt. Die mRNA-Expression der angegebenen Gene wurde mittels *Real-time* PCR unter Einsatz spezifischer taqman-Sonden analysiert; zum Abgleich diente HPRT als *housekeeping*-Gen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von ≥ 8 Proben pro Messpunkt. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur)

4.8 Wirkungen der Vitamin D-Derivate auf die Expression ausgewählter Proteine der PSZ

Zur Beurteilung der Spiegel ausgewählter Proteine in ruhenden PSZ unter dem Einfluss der D-Vitamine wurden Immunoblotanalysen durchgeführt.

Zunächst wurde die Expression von α -SMA als Aktivierungsmarker der PSZ unter den Einflüssen der Vitamin D-Derivate beurteilt. Dabei zeigte sich, dass schon rein optisch die Intensitäten der α -SMA-Banden unter den Einflüssen der D-Vitamine im Vergleich zu einer mitgeführten Kontrollbande abnahmen (Abb. 4.11, A). Dieser Eindruck konnte durch eine anschließende Quantifizierung der Intensitäten der α -SMA-Banden bestätigt werden. So wurde die α -SMA-Expression in ruhenden PSZ unter dem Einfluss von Vitamin D2 auf 37 % und unter Vitamin D3-Einfluss auf 32% gesenkt (Abb. 4.11, B). PSZ, die mit Calcipotriol behandelt wurden, verminderten die Expression von α -SMA auf 39 %. Alle Werte beziehen sich auf die α -SMA-Spiegel in einer PSZ-Kontrollpopulation. Die Effekte der D-Vitamine sind mit einem p -Wert $< 0,05$ im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle statistisch signifikant. Weiterhin wurden die Wirkungen der Vitamin D-Derivate auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg untersucht, indem die Spiegel der *Extracellular-signal regulated Kinase* (ERK) 1 und 2 und der phosphorylierten Metabolite P-ERK 1 und 2 analysiert wurden. Dazu wurde die Ratio P-ERK/ERK gebildet.

A



B

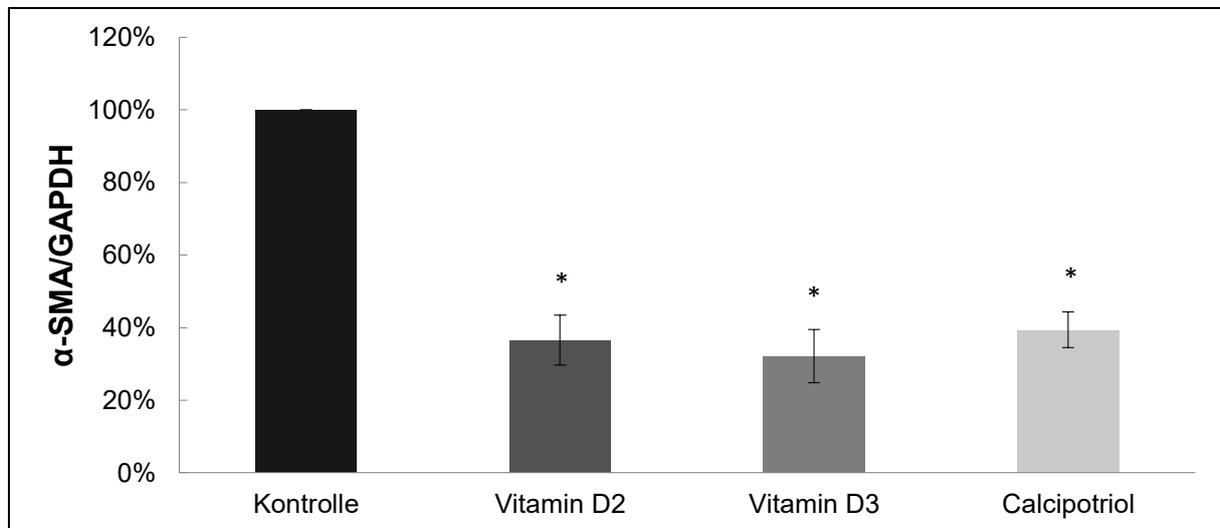
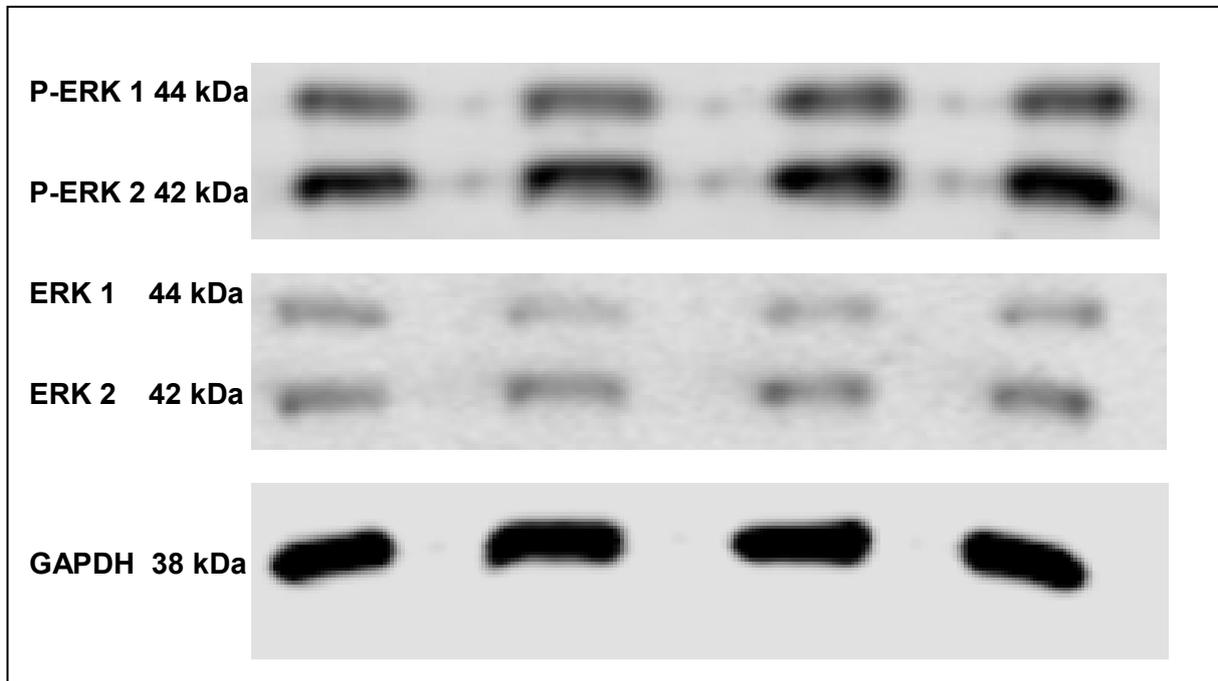


Abb. 4.11: PSZ in Primärkultur (d1-4) wurden mit den angegebenen D-Vitaminen in einer Konzentration von jeweils 100 nM behandelt. Im Anschluss daran wurden die Proben mittels Western-Blot-Analysen ausgewertet. Die Quantifizierung der Banden (A) wurde anhand der Signalintensitäten mit der *Odyssey Software 3.0* analysiert. Die jeweiligen Quotienten aus α -SMA und GAPDH (*housekeeping*-Protein) sind in B als Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Kulturen pro Messpunkt dargestellt. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test mit Bonferroni Korrektur)

Weiterhin wurden die Wirkungen der Vitamin D-Derivate auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg untersucht, indem die Spiegel der *Extracellular-signal regulated Kinase* (ERK) 1 und 2 und der phosphorylierten Metabolite P-ERK 1 und 2 analysiert wurden. Dazu wurde die Ratio P-ERK/ERK gebildet. Unter Vitamin D2-Einfluss stieg die Ratio P-ERK/ERK in den ruhenden PSZ von 100% in einer Kontrollpopulation auf 154% (Abb. 4.12, B). Auch Vitamin

D3 und Calcipotriol steigerten die P-ERK/ERK-Ratio auf 164% bzw. 169% verglichen mit einer mitgeführten Kontrolle. Diese Effekte sind, verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle, nicht signifikant, was durch einen p-Wert von 0,67 begründet wird.

A



B

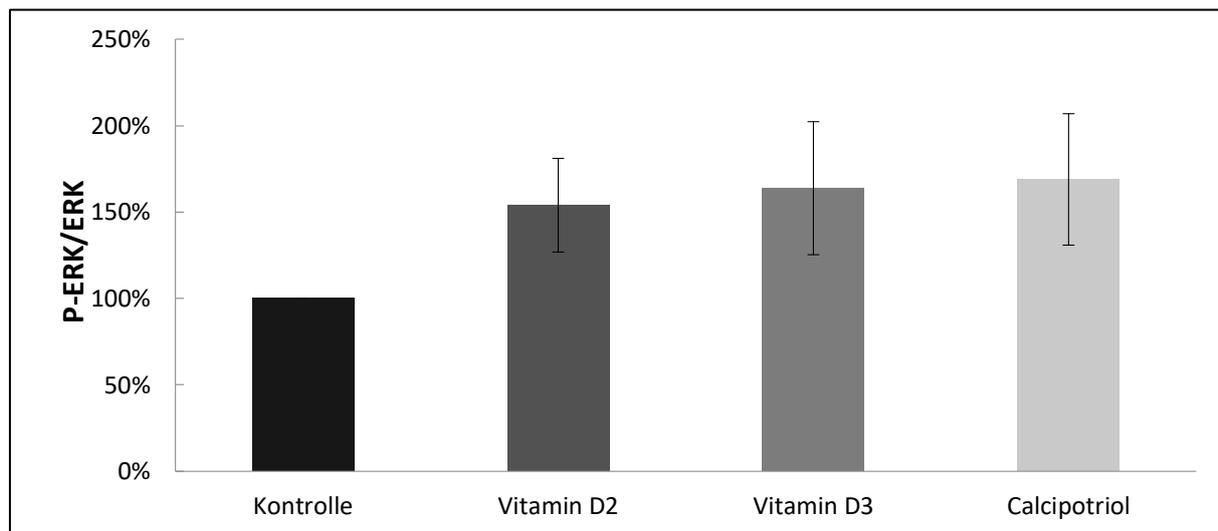


Abb. 4.12: PSZ in Primärkultur (d1-4) wurden mit den angegebenen D-Vitaminen in einer Konzentration von jeweils 100 nM behandelt. Im Anschluss daran wurden die Proben mittels Western-Blot-Analysen ausgewertet. Die Quantifizierung der Banden (A) wurde anhand der Signalintensitäten mit der *Odyssey Software 3.0* analysiert. Die jeweiligen Quotienten aus P-ERK und ERK sind in B als Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Kulturen pro Messpunkt dargestellt. Die GAPDH-Banden sind zur Kontrolle der Taschenbeladung gezeigt.

4.9 Die Wirkungen der D-Vitamine auf die IL-6-Konzentrationen im Kulturmedium der PSZ

Zur Bestimmung der Effekte der Vitamin D-Derivate auf die IL-6-Konzentrationen im Kulturmedium von passagierten PSZ wurde ein IL-6-spezifischer ELISA verwendet.

Abb. 4.13 zeigt, dass die IL-6-Konzentration im Kulturmedium von mit Vitamin D2 behandelten PSZ von 306 pg/ml in der Kontrollpopulation auf 183 pg/ml abfiel. Dies entspricht einer IL-6-Konzentrationsabnahme von etwa 40% in Bezug auf die Kontrolle, was mit einem p-Wert $< 0,05$ einen signifikanten Rückgang der IL-6-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Kulturmedium vollständig aktivierter PSZ bedeutet. Die IL-6-Konzentration im Kulturmedium der PSZ unter Vitamin D3-Einfluss nahm um 33% von 306 pg/ml in der Kontrollpopulation auf 206 pg/ml in der mit Vitamin D3 behandelten PSZ ab. Diese Vitamin D3-Effekte auf die IL-6-Konzentration im Kulturmedium, bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle, sind mit einem p-Wert $< 0,05$ statistisch signifikant. Auch in den mit Calcipotriol behandelten PSZ konnte ein Rückgang der IL-6-Konzentration im Kulturmedium um 19% auf 247 pg/ml gemessen werden. Dieser Rückgang der IL-6-Konzentration im Kulturmedium der PSZ unter Calcipotriol-Inkubation ist mit einem p-Wert von 0,141 im Vergleich zur Kontrollpopulation nicht signifikant.

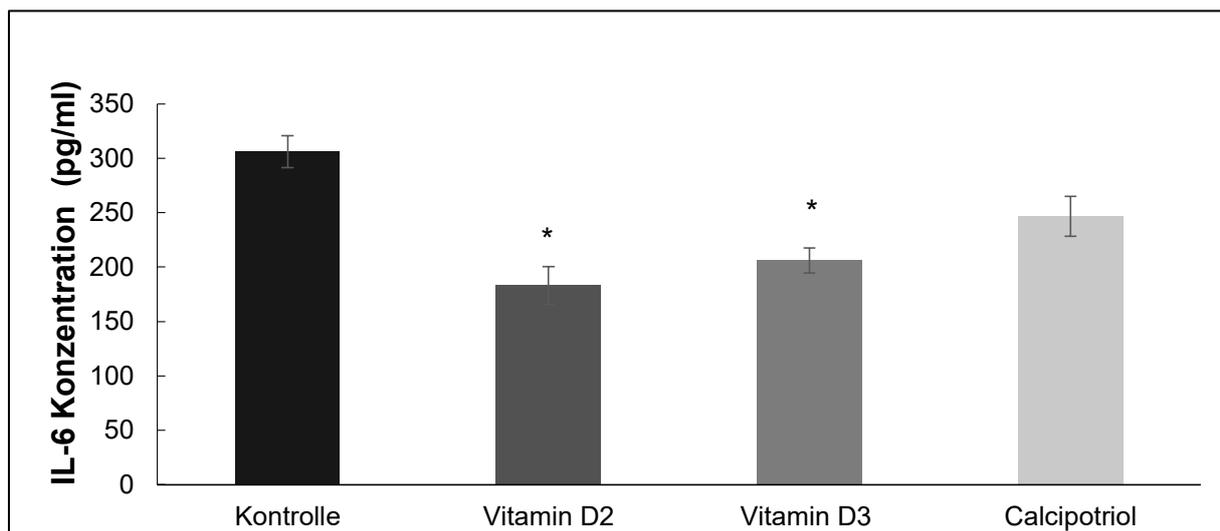


Abb. 4.13: Nach 24-stündiger Inkubation von einmal passagierten mPSZ mit den angegebenen Vitamin D-Derivaten in einer Konzentration von jeweils 100 nM wurden die Mediumüberstände gewonnen, zentrifugiert und mittels IL-6 ELISA-Kit analysiert. Im Anschluss an die Inkubationsschritte konnte die Absorption der Proben bei 450 nm am Photometer gemessen werden. Die Analyse der Messwerte erfolgte mit der Software *elisaanalysis.com*. Dabei wurde das Verfahren der Vier-parametrischen logistischen Regression verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Untersuchungen pro Messpunkt. * $p < 0.05$ (Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur)

5. Diskussion

Das Pankreaskarzinom und die chronische Pankreatitis verursachen einen fibrotischen Umbau des Pankreas, dessen Pathogenese maßgeblich durch die Aktivierung von PSZ geprägt wird. Die Auswirkungen dieser Pankreasfibrose können sowohl exokrine als auch endokrine Funktionseinschränkungen des Organs bedingen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der D-Vitamine Vitamin D2, Vitamin D3 und Calcipotriol auf murine PSZ *in vitro* untersucht. Die Effekte der Vitamin D-Derivate wurden dafür zum einen auf passagierte und dadurch aktivierte PSZ, zum anderen auf frisch aufgetaute und in der Folge frühe aktivierte PSZ untersucht.

5.1 Vitamin D-Effekte auf vollständig aktivierte PSZ

5.1.1 Auswirkungen auf das Zellwachstum

Zur Quantifizierung der Effekte der D-Vitamine auf die Proliferationsaktivität von vollständig aktivierten PSZ wurde ein BrdU-Einbautest durchgeführt. Dazu wurden die PSZ für 48 h mit den verschiedenen D-Vitaminen in den aufsteigenden Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM behandelt. Es konnte herausgestellt werden, dass weder Vitamin D2 oder Vitamin D3 noch Calcipotriol, unabhängig von den jeweiligen Konzentrationen, die Proliferationsaktivität der PSZ signifikant verändern.

Diese Ergebnisse stehen tendenziell im Widerspruch zu anderen Arbeiten mit D-Vitaminen und deren Einfluss auf die Proliferationsaktivität von Zellen aus anderen Organsystemen. So konnten Fraczek *et al.*, 2015 hemmende Effekte von verschiedenen Vitamin D-Analoga auf unterschiedliche Krebszelllinien nachweisen. Vor allem proliferationshemmende Effekte von D-Vitaminen auf Melanomzellen wurden häufig beschrieben (Spath *et al.*, 2017 und Wasiewicz *et al.*, 2018). Diese Arbeitsgruppen verwendeten allerdings allesamt andere Methoden, um das Zellwachstum zu quantifizieren. Weiterhin wurden in den zitierten Arbeiten Tumorzelllinien verwendet, während in der eigenen Arbeit Primärzellen zum Einsatz kamen. Relevanter ist deshalb die folgende Publikation:

Bläuer *et al.* stellten 2015 wachstumshemmende Effekte von Vitamin D3 in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen auf vollständig aktivierte PSZ heraus, die dosisabhängig waren. Die verwendeten PSZ wurden allerdings, anders als in den eigenen Studien, vor der Vitamin D3-Inkubation mehrfach passagiert und für 7 Tage mit Vitamin D3 behandelt. Zur Quantifizierung des Zellwachstums wurde ein Kristallviolett-Assay verwendet.

Um zu eruieren, ob die Dauer der Vitamin D3-Inkubation einen Einfluss auf die Proliferationsaktivität der PSZ hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiterer BrdU-

Einbautest durchgeführt, der sich am oben beschriebenen Versuchsprotokoll von Bläuer *et al.* orientiert. Zwar konnte ein Rückgang des BrdU-Einbaus unter 0,1 nM Vitamin D3 auf 88% und unter 1 nM Vitamin D3 auf 67% im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Diese wachstumshemmenden Effekte waren allerdings nicht signifikant und konnten, anders als die finnische Arbeitsgruppe zeigte, nicht dosisabhängig fortgeführt werden. So sank der BrdU-Einbau unter einer Vitamin D3-Gabe von 10 nM zwar auf 68% im Vergleich zur Kontrolle, was jedoch einen Anstieg um 1% im Vergleich zur Vitamin D3-Behandlung in einer Konzentration von 1 nM bedeutet. Neben der Verwendung eines anderen Assays zur Analyse der Proliferationsaktivität, nutzten Bläuer *et al.* mit der Auswachs-Methode, die 1998 von Bachem *et al.* erstmals angewendet wurde, eine andere Möglichkeit, um die PSZ aus Mäusen zu gewinnen, als die in dieser Arbeit beschriebene Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation. Möglicherweise wurde dadurch eine andere Subpopulation von PSZ isoliert. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass methodische Unterschiede ursächlich für die abweichenden Ergebnisse sind. In den eigenen Versuchen erwies es sich darüber hinaus als schwierig, die Kulturbedingungen über den für einen biologischen Assay recht langen Zeitraum von 7 Tagen so konstant zu halten, dass reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten.

5.1.2 Effekte auf die Zelltoderate

Um eine zytotoxische Wirkung der D-Vitamine auszuschließen, wurde ein Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Zwar stieg der Anteil toter PSZ unter den Einflüssen von Vitamin D2 bzw. Vitamin D3 von 5,3% in der Kontrolle auf 7% bzw. 6,3%. Da dieser Anstieg jedoch unterhalb der Signifikanzschwelle liegt, kann davon ausgegangen werden, dass weder Vitamin D2 noch Vitamin D3 einen toxischen Effekt auf aktivierte PSZ haben. Unter dem Einfluss von Calcipotriol sank der Anteil toter Zellen auf 4,2%.

5.1.3 Auswirkungen auf die Ausprägung von Lipidtröpfchen

Apte *et al.* zeigten bereits 1998, dass ruhende PSZ eine Vielzahl an Vitamin A-speichernden Lipidtröpfchen ausbilden, die eines der Charakteristika des ruhenden Phänotyps darstellen. Um zu eruieren, ob D-Vitamine vollständig aktivierte PSZ in einen ruhenden Phänotyp zurückführen können, wurden bereits passagierte PSZ mit jeweils 100 nM der jeweiligen Vitamin D-Derivate behandelt, mit Ölrot gefärbt, auf Deckgläschen übertragen und die Präparate verblindet. Eine anschließende Beurteilung der Ausprägung der Lipidtröpfchen innerhalb der PSZ, anhand des im Methodenteil (Tab. 3.3) beschriebenen Scoring-Schemas, wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt.

Die Ausprägung der Lipidtröpfchen unter dem Einfluss von Vitamin D2 und Calcipotriol stieg mit einem Scoring-Wert von 1,9 bzw. 1,8 im Vergleich zur mit 1,6 bewerteten Kontrolle leicht an. Demgegenüber sank der Score für die Ausbildung der Fetttröpfchen innerhalb der mit Vitamin D3 behandelten PSZ auf 1,5. Alle Veränderungen waren nicht signifikant, sodass keines der D-Vitamine eine verstärkte Ausprägung von Lipidtröpfchen innerhalb der PSZ herbeiführen konnte. Daraus lässt sich schließen, dass die durch die vollständige Aktivierung der PSZ verminderte Ausprägung der Lipidtröpfchen unter dem Einfluss der untersuchten Vitamin D-Derivate nicht rückgängig gemacht werden kann.

5.1.4 Einfluss auf die Ausbildung von α -SMA-Fasern

Die Ausbildung von α -SMA-Fasern ist charakteristisch für Myofibroblasten. Myofibroblasten sind kontraktile Zellen, die in der Wundheilung, aber auch in der Fibro- und Onkogenese eine wichtige Rolle spielen (Rao *et al.*, 2014). Die auch als *stress fibers* bezeichneten α -SMA-Elemente sind neben der Kontraktilität der Myofibroblasten auch für die fokale Adhäsion der Zellen verantwortlich (Hinz *et al.*, 2003).

Dass aktivierte PSZ vermehrt α -SMA-Fasern ausbilden und kontraktile sind, demnach einen myofibroblastären Phänotyp darstellen, erkannten Apte *et al.*, 1998.

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurde der Einfluss der D-Vitamine auf die Ausbildung der *stress fibers* in den PSZ analysiert. Die Auswertung fußte einmal mehr auf einem Scoring-System (Tab. 3.4), das dem der Auswertung der Ölrotfärbungen von Lipidtröpfchen ähnelt und von zwei unabhängigen Untersuchern angewendet wurde.

Während der Scoring-Mittelwert der mit Calcipotriol behandelten PSZ mit 2,4 dem der Kontrolle entsprach, stieg die α -SMA-Ausprägung in den PSZ unter den Einflüssen von Vitamin D2 und Vitamin D3 auf 2,7 bzw. 2,6 an. Alle auf die Kontrolle bezogenen Unterschiede lagen unterhalb des Signifikanzniveaus.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die verwendeten D-Vitamine die α -SMA-Ausbildung innerhalb aktivierter PSZ nicht beeinflussen. Sowohl die Verminderung von Lipidtröpfchen als auch die Zunahme der α -SMA-Fasern sind Charakteristika von aktivierten PSZ. Diese Aktivierung scheint durch den Einsatz der verwendeten Vitamin D-Derivate nicht reversibel, sodass die verwendeten D-Vitamine, auf den hier untersuchten Ebenen, nicht imstande sind, aktivierte PSZ in einen ruhenden Phänotypen zurückzuführen.

5.1.5 Effekte auf die Seneszenz

Die Auswirkungen der Vitamin D-Derivate auf die Seneszenz aktivierter PSZ wurden mittels Seneszenz-assoziiertes- β -Galactosidase-Färbung (SA- β -Gal) durchgeführt. β -Galactosidasen

sind lysosomale Enzyme, die teilungsunfähige Zellen charakterisieren (Lee *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Verkürzung der Telomere ebenfalls ein Merkmal seneszenten Zellen ist (Bernadotte *et al.*, 2016). Fitzner *et al.* arbeiteten 2012 heraus, dass der Anteil seneszenten PSZ im Pankreas mit dem Ausmaß der Schädigung des Pankreasgewebes korreliert. So konnten seneszenten PSZ vor allem in fibrotischen Bereichen des Pankreas nachgewiesen werden. Auch stellte diese Forschungsgruppe fest, dass seneszenten Zellen nur in geringem Maße die für aktivierte PSZ charakteristischen α -SMA-Fasern ausbilden. Die in dieser Arbeit getesteten D-Vitamine beeinflussen den Anteil seneszenten PSZ in Kulturen aktivierter PSZ nicht. Die Vitamin D-Derivate sind also nicht imstande, eine Seneszenz aktivierter PSZ herbeizuführen. Insgesamt war der Anteil seneszenten Zellen in den SA- β -Gal gefärbten Präparaten sehr gering. Deshalb wurde auf eine weiterführende Auswertung der Ergebnisse verzichtet.

5.1.6 Auswirkungen auf die Expression ausgewählter Gene

Um die Effekte der D-Vitamine auf die Expression ausgewählter Gene aktivierter PSZ darzustellen, wurden Echtzeit-PCR-Messungen durchgeführt.

Mit der Analyse der *Vitamin D-Rezeptor (VDR)*-Expression in PSZ sollte überprüft werden, ob PSZ als molekulares *Target* von Vitamin D-Präparaten in Frage kommen, was Sherman *et al.*, 2014 suggerierten. Ein Anstieg des *VDR* unter dem Einfluss der D-Vitamine würde implizieren, dass der *VDR* infolgedessen als Transkriptionsfaktor Effekte auf andere Gene innerhalb der PSZ ausüben kann. Dass auch Organe, die keinen Zusammenhang mit der Calciumhomöostase aufweisen, den *VDR* exprimieren, wurde schon im Jahre 1980 von Colston *et al.* herausgearbeitet.

Alle eingesetzten D-Vitamine erhöhen die Expression des *VDR* in aktivierten PSZ signifikant. Unter dem Einfluss von Vitamin D2, Vitamin D3 und Calcipotriol stieg die *VDR*-Expression auf 209%, 321% bzw. 280%, verglichen mit einer auf 100% gesetzten Kontrolle, an. Lee *et al.* konnten 2015 nachweisen, dass Vitamin A-Metabolite, das Parathormon und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 die Expression des *VDR* *Up*-regulieren.

Die Untersuchung der Expression von *Interleukin-6 (IL-6)* zielte darauf ab, den Einfluss der D-Vitamine auf ein Zytokin zu untersuchen, das Tanaka *et al.*, 2014, in einer zusammenfassenden Arbeit als proinflammatorisches und vor allem profibrotisches Interleukin beschrieben. Der fördernde Effekt auf das Wachstum von Bindegewebe wird dabei durch eine Aktivierung von Fibroblasten begründet. Aoki *et al.*, 2006 stellten heraus, dass IL-6 vor allem autokrine Effekte auf PSZ hat, die die Aktivierung dieser Zellen fördern.

Unter dem Einfluss aller eingesetzten Vitamin D-Derivate kann die Expression von *IL-6* signifikant gehemmt werden. Aktivierte PSZ, die mit Vitamin D2, Vitamin D3 beziehungsweise Calcipotriol behandelt wurden, exprimierten 51%, 58% beziehungsweise 57% *IL-6*, verglichen mit einer als 100% angesehenen Kontrolle. Somit schwächen alle eingesetzten D-Vitamine die *IL-6*-Expression, was eine Hemmung der Aktivierung noch ruhender PSZ zur Folge haben könnte.

Zur Analyse der Effekte der Vitamin D-Derivate auf die Expression von Genen, die für die Kollagensynthese verantwortlich sind, wurde das α -1-Typ-1-Kollagen (*Col1A1*)-Gen untersucht. Dieses Gen kodiert für das Kollagen Typ 1, das maßgeblicher Bestandteil des fibrotischen Bindegewebes ist (Chan *et al.*, 2008).

Die Messwerte der aktivierten PSZ, die mit den D-Vitaminen behandelt wurden, unterscheiden sich, unabhängig vom eingesetzten Vitamin D-Präparat, nicht signifikant von denen der Kontrolle.

Zwar bleibt die Expression von *Col1A1* durch den Einsatz der D-Vitamine unbeeinflusst, jedoch kann zumindest die Expression des profibrotischen Zytokins *IL-6* gehemmt werden. Neben der oben beschriebenen Hemmung der Aktivierung noch ruhender PSZ könnte eine verminderte *IL-6*-Expression die Aktivität von Entzündungszellen hemmen, die ihrerseits so weniger profibrotische Mediatoren freisetzen könnten.

Ein weiterer, die Fibrose fördernder, Faktor ist das *Transforming growth factor- β 1* (*TGF- β 1*)-Protein. Dieser Wachstumsfaktor entfaltet seine Wirkung nach Rezeptorbindung über die Phosphorylierung von *SMAD*-Proteinen, die anschließend als Transkriptionsfaktoren profibrotisch wirken können (Penn *et al.*, 2012).

Jedes eingesetzte D-Vitamin hemmt tendenziell die Expression von *TGF- β 1* in aktivierten PSZ. Die gemessenen Unterschiede liegen im Vergleich zu einer Kontrollpopulation jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus.

Auch die *Matrix Metalloproteinase-2* (*MMP2*) steht im Zusammenhang mit Prozessen der Fibrose. Tveitaras *et al.* stellten 2015 in Mausmodellen dar, dass *MMP2-Knockout*-Mäuse nach einer kompletten Obstruktion des Harnleiters keine Fibrose der Niere entwickelten, wohingegen Wildtyp-Mäuse einen hochgradigen bindegewebigen Umbau des Organs ausbildeten.

Unter dem Einfluss der eingesetzten Vitamin D-Derivate sinken die *MMP2*-mRNA-Spiegel in den einzelnen Zellpopulationen zwar, die Unterschiede, im Vergleich zur 100%igen Kontrolle, sind mit 71% (Vitamin D2), 95% (Vitamin D3) und 75% (Calcipotriol) jedoch nicht signifikant. Auch die α -SMA-Expression in aktivierten PSZ unter D-Vitamin-Einfluss wurde mittels Echtzeit-PCR-Analysen ausgewertet. Auch hier ergaben sich im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede.

Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen der α -SMA-Analysen mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die eingesetzten D-Vitamine scheinen auf die Ausbildung von α -SMA-Fibrillen in bereits vollständig aktivierten PSZ, sowohl auf phänotypischer als auch auf molekularer Ebene, keine Effekte zu haben.

Auch die Expression antifibrotischer Marker bleibt weitgehend unbeeinflusst. Einzig das profibrotisch wirkende *IL-6* kann durch alle D-Vitamine signifikant gehemmt werden.

Im Gegensatz dazu beobachteten Sherman *et al.*, 2014 Effekte von Calcipotriol auf die Genexpression von *Col1A1* und *MMP2* in aktivierten PSZ. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass in der zitierten Publikation die Genexpression von aktivierten Primärzellen an Tag 7 nach der Einsaat gemessen wurde. In dieser Arbeit werden PSZ als vollständig aktiviert bezeichnet, wenn sie nach 7-tägiger Anzucht abgeerntet, einmalig passagiert, erst dann mit den D-Vitaminen inkubiert und an Tag 4 nach der Passagierung ausgewertet werden. Die Kulturbedingungen könnten also die Genexpression der PSZ beeinflussen. Dies gilt es in Folgestudien zu untersuchen.

5.1.7 Einfluss auf die IL-6 Konzentration im Kulturmedium

Die Genexpression von IL-6 in aktivierten PSZ konnte durch die eingesetzten D-Vitamine signifikant gehemmt werden. Ob sich dieser Rückgang auf der mRNA-Ebene auch auf der Ebene der IL-6-Sekretion fortsetzt, wurde durch den Einsatz eines IL-6-spezifischen ELISAs getestet.

Es konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte PSZ unter dem Einfluss von Vitamin D2 und Vitamin D3 signifikant weniger IL-6 sezernierten als PSZ einer Kontrollpopulation. Auch unter dem Einfluss von Calcipotriol nahm die gemessene IL-6-Konzentration im Kulturmedium um 19% ab. Dieser Unterschied ist verglichen mit einer Kontrolle nicht signifikant.

So konnte gezeigt werden, dass nicht nur die IL-6-Expression auf Genebene durch die Vitamin D-Derivate gehemmt wird. Vielmehr wirkt sich diese verminderte Genexpression von IL-6 auch auf die Sekretion des Zytokins durch die aktivierten PSZ aus.

5.1.8 Antifibrotische Effekte der D-Vitamine auf vollständig aktivierte PSZ

In dieser Arbeit wurden PSZ als vollständig aktiviert bezeichnet, wenn sie nach konfluentem Wachstum einmalig passagiert worden waren. Die einmalig passagierten Zellen wiesen nach mikroskopischer Sichtung phänotypische Charakteristika aktivierter PSZ auf (4.1). Tab. 5.1 zeigt zusammenfassend, dass viele charakteristische Aktivierungsparameter unabhängig von den jeweiligen D-Vitaminen sind. So können weder das Zellwachstum oder die Ausprägung

der α -SMA-Fasern noch die Expression profibrotischer Gene wie *Col1a1*, *TGF- β 1* oder *MMP2* durch den Einsatz der Vitamin D-Derivate gehemmt werden. Dass die D-Vitamine die PSZ beeinflussen, konnte durch eine signifikante Hemmung der Synthese des profibrotischen Zytokins IL-6 gezeigt werden. Dabei konnte sowohl die *IL-6*-Expression auf mRNA Ebene, als auch die IL-6-Sekretion, die mittels ELISA-Analyse gemessen wurde, durch die eingesetzten D-Vitamine vermindert werden. Dabei unterschieden sich die verwendeten D-Vitamine in ihrer Wirksamkeit nicht.

Insgesamt muss jedoch angemerkt werden, dass die herausgestellten antifibrotischen Effekte der D-Vitamine auf aktivierte PSZ deutlich geringer waren, als andere Publikationen nahelegen. So arbeiteten Sherman *et al.*, 2014 einen signifikanten Rückgang der mRNA-Expression von EZM-Bestandteilen, verschiedenen Zyto- und Chemokinen sowie Wachstumsfaktoren unter Calcipotriol-Einfluss heraus. Bläuer *et al.*, 2015 zeigten hemmende Effekte von Vitamin D3 auf das Zellwachstum von aktivierten PSZ schon in geringen Konzentrationen. Allerdings unterscheiden sich die Kulturbedingungen in beiden Publikationen von den in dieser Arbeit angewandten. Ob diese methodisch-technischen Unterschiede für die divergenten Ergebnisse verantwortlich sind, müssen Folgestudien zeigen.

Der tendenziell antifibrotische Effekt der D-Vitamine in dieser Arbeit stimmt jedoch mit den oben genannten Publikationen überein.

	Vitamin D2	Vitamin D3	Calcipotriol
Zellwachstum	=	=	=
Seneszenz	=	=	=
Lipidtröpfchen	=	=	=
α -SMA ¹	=	=	=
VDR	↑	↑	↑
Col1a1	=	=	=
TGF- β 1	=	=	=
MMP2	=	=	=
IL-6 ²	↓	↓	↓ / =

↑ signifikante Erhöhung des Parameters

↓ signifikante Abnahme des Parameters

= keine Veränderungen (alle Angaben beziehen sich auf eine unbehandelte Kontrolle)

Tab. 5.1: Antifibrotische Effekte der D-Vitamine auf vollständig aktivierte PSZ

Dargestellt sind die Ergebnisse der BrdU-Proliferationsmessungen (4.3) in der Zeile Zellwachstum, der Seneszenz-Analysen (4.6), der Ölotrfärbungen (4.4) in der Zeile Lipidtröpfchen sowie der Genexpressionsanalysen (4.7) mittels RT-PCR zur Quantifizierung der Gene α -SMA, VDR, Col1a1, TGF- β 1, MMP2 und IL-6. Eine Verifizierung der Ergebnisse erfolgte auch anhand ¹Immunfluoreszenzfärbungen (4.5) bzw. ²ELISA-Analysen (4.9).

5.2 Vitamin D-Effekte auf frühe aktivierte PSZ

5.2.1 Auswirkungen auf die Zellproliferation

Die Einflüsse der D-Vitamine in unterschiedlichen Konzentrationen auf frisch eingesäte, und damit definitionsgemäß noch ruhende, nach zweitägiger Adhärenz jedoch frühe aktivierte, PSZ, wurden, analog zur Proliferationsmessung vollständig aktivierter PSZ, mittels BrdU-Einbautest analysiert.

Apte *et al.* erkannten schon 1998, dass frisch eingesäte PSZ nach Isolation mit einer Verdopplungszeit von 96 Stunden sehr langsam proliferieren. Im Jahre 2012 arbeiteten Apte *et al.* weiterführend heraus, dass das Zellwachstum von PSZ vom Aktivierungszustand der Zellen abhängig ist. Während ruhende PSZ sehr langsam wachsen, proliferieren aktivierte PSZ deutlich stärker.

Wann PSZ durch den Kontakt mit Plastik und dem Kulturmedium aktiviert werden, differiert in verschiedenen Publikationen. Während Apte *et al.*, 2012 schon 48 Stunden nach Einsaat einen Anstieg von Aktivierungsmarkern (1.1.3.3) in PSZ und damit deren Aktivierung beschrieben, stellten Omary *et al.*, 2007 eine vollständige Aktivierung erst nach 7 Tagen fest. Demnach ist anzunehmen, dass schon nach zweitägiger Kultivierung die Aktivierung der PSZ beginnt und diese nach etwa einer Woche abgeschlossen ist. Dies würde auch mit einer erhöhten Proliferationsaktivität, der in dieser Arbeit als frühe aktivierte PSZ bezeichneten Zellen, einhergehen.

Nach 96-stündiger Kultivierung und 72-stündiger Inkubation der PSZ mit den D-Vitaminen in verschiedenen Konzentrationen konnten in den eigenen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum im Vergleich zu einer Kontrollpopulation herausgestellt werden. Somit ist konzentrationsunabhängig keines der getesteten D-Vitamine in der Lage, das Wachstum der Zellen in der Frühphase der Aktivierung zu hemmen. Diese Erkenntnisse decken sich mit der Analyse der Vitamin D-Effekte auf das Zellwachstum definitiv aktivierter PSZ. Auch hier ist die proliferative Aktivität der PSZ unabhängig von den D-Vitaminen.

5.2.2 Einfluss auf die Ausbildung von Lipidtröpfchen

Eine starke Ausprägung Vitamin A-speichernder Lipidtröpfchen ist ein Charakteristikum ruhender PSZ. Eine Visualisierung dieser Lipidtröpfchen wurde mittels Ölrotfärbung durchgeführt. Die anschließende Quantifizierung der Ausprägung der Lipidtröpfchen in den entsprechenden Präparaten erfolgte mithilfe eines Scoring-Systems (Tab. 3.3) durch zwei unabhängige Beobachter.

Unter den Einflüssen der eingesetzten D-Vitamine konnte die Ausprägung der Lipidtröpfchen innerhalb der PSZ signifikant erhöht werden. So wurden die PSZ unter Vitamin D₂-Einfluss mit

einem Score von 2,1, die mit Vitamin D₃- bzw. Calcipotriol-inkubierten PSZ mit einem Wert von je 2 bewertet. Die Ausprägung der Lipidtröpfchen in PSZ einer Kontrollpopulation erreichte einen Wert von 1,5.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Aktivierung der PSZ, hier durch den Rückgang der Lipidtröpfchen in den PSZ untersucht, schon recht früh beginnt (Apte *et al.*, 2012). Zum anderen kann dieser Aktivierungsprozess durch jedes der untersuchten Vitamin D-Derivate gehemmt werden. Diese Hemmung oder Verzögerung der PSZ-Aktivierung durch eine Persistenz der Lipidtröpfchen in den PSZ konnte so zum ersten Mal gezeigt werden. Sherman *et al.*, 2014 stellten zwar hemmende Effekte von Calcipotriol auf unterschiedlichen Ebenen der PSZ-Aktivierung heraus, die Auswirkungen auf die Ausprägung von Lipidtröpfchen wurden allerdings nicht untersucht.

5.2.3 Effekte auf die Ausprägung von α -SMA-Fasern

Ein weiterer Aktivierungsmarker von PSZ ist die vermehrte Ausbildung von α -SMA-Fasern. Dass Calcipotriol die Ausprägung solcher Fasern in PSZ hemmen kann, zeigten Sherman *et al.*, 2014. Hierbei induzierten sie durch Cerulein eine akute Pankreatitis in Mäusen und analysierten die Genexpression der PSZ 12 Wochen *post injectionem*. PSZ, die neben Cerulein auch mit Calcipotriol inkubiert worden waren, exprimierten dabei signifikant weniger *ACTA 2* als PSZ der Kontrollpopulation. *ACTA 2* kodiert das α -SMA-Protein.

Um diese Erkenntnisse auf molekularer Ebene phänotypisch zu verifizieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Färbungen wurden, analog der α -SMA-Analysen aktivierter PSZ, anhand eines Scoring-Systems (Tab. 3.4) von zwei unabhängigen Beobachtern ausgewertet.

Alle untersuchten D-Vitamine hemmten die Ausprägung der α -SMA-Fasern signifikant. Während eine Kontrolle mit einem Wert von 2,5 bewertet wurde, erreichten die mit Vitamin D₂, Vitamin D₃ und Calcipotriol behandelten PSZ lediglich Werte von 1,6, 1,4 und 1,2.

Diese Ergebnisse sind mit denen der Analyse der Ausprägung der Lipidtröpfchen in Einklang zu bringen, sprechen doch beide Beobachtungen für eine Verzögerung der Aktivierung von PSZ und damit für eine Persistenz des ruhenden Phänotyps.

5.2.4 Auswirkungen auf ausgewählte Proteine

Um die Effekte der D-Vitamine auf ausgewählte Proteine zu erfassen, wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Im Fokus der Protein-Analysen standen α -SMA und ERK 1/2 bzw. P-ERK 1/2 als Repräsentanten des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs.

Konnten hemmende Effekte der D-Vitamine auf die Ausprägung der α -SMA-Fibrillen mittels Immunfluoreszenzfärbungen (5.2.3) gezeigt werden, so würde ein Rückgang der α -SMA-Expression auf Proteinebene die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmessungen verifizieren. Demnach passen die Ergebnisse der *Western Blot*-Untersuchungen zu denen der Immunfluoreszenzanalysen. So konnte unter den Einflüssen von Vitamin D₂, D₃ und Calcipotriol ein Rückgang der α -SMA-Expression auf 37%, 32% und 39% verglichen mit einer als 100% angesehenen Kontrolle beobachtet werden. Diese Unterschiede sind verglichen mit einer Kontrollpopulation statistisch signifikant.

Über den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg werden verschiedene Signale, die über einen Rezeptor an der Zelloberfläche aufgenommen werden, auf Transkriptionsfaktoren übertragen, die die Expression verschiedener Gene regulieren. Dabei stehen vor allem Gene im Vordergrund, die für die Apoptose und die Proliferationsaktivität der Zelle verantwortlich sind. Eine Fehlregulation dieses Signalwegs kann in vielen Tumoren nachgewiesen werden (McCubrey *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung von ERK 1/2 zu P-ERK 1/2 durch MEK 1/2 sorgt für eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits proliferativ und die Apoptose hemmend wirken (ebd.). In PSZ spielt die Aktivierung des ERK-Signalwegs eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellwachstums (Jaster *et al.*, 2002).

Die Analyse der P-ERK/ERK-Ratio unter Vitamin D-Einfluss zeigte, dass die Phosphorylierung Vitamin D-unabhängig ist. Der ERK-Signalweg ist demzufolge offenbar nicht an der Vermittlung antiproliferativer Effekte von D-Vitaminen beteiligt. Alle D-Vitamine erhöhen die P-ERK/ERK-Ratio tendenziell sogar, wobei alle Unterschiede im Vergleich zu einer mitgeführten Kontrolle nicht signifikant waren.

5.2.5 Antifibrotische Effekte der D-Vitamine auf ruhende PSZ

Ruhende PSZ unterscheiden sich sowohl mikroskopisch (4.1) als auch molekular (1.1.3.2 und 1.1.3.3) von aktivierten PSZ. Unter dem Einfluss des Kulturmediums und durch den Kontakt mit Plastik werden die PSZ schon nach 48 Stunden aktiviert (Apte *et al.*, 2012), sodass sie danach als frühe aktivierte PSZ bezeichnet werden können. Dass dieser Aktivierung durch D-Vitamine vorgebeugt werden kann, konnte in dieser Arbeit sowohl auf der Ebene der Ausprägung der Lipidtröpfchen als auch auf der der α -SMA-Fasern gezeigt werden. So bildeten die PSZ unter dem Einsatz der D-Vitamine vermehrt Lipidtröpfchen als Charakteristika eines ruhenden Phänotyps aus. Weiterhin konnte die Ausprägung der α -SMA-Fasern, die für aktivierte PSZ typisch sind, gehemmt werden. Dabei konnte kein Unterschied in der Wirksamkeit der einzelnen D-Vitamine untereinander herausgearbeitet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Aktivierung von PSZ in der Frühphase durch den Einsatz von D-Vitaminen entgegengewirkt werden kann. So wird verhindert, dass aktivierte PSZ ihre mannigfaltigen profibrotischen Effekte (1.1.3.3) ausüben.

	Vitamin D2	Vitamin D3	Calcipotriol
Zellwachstum	=	=	=
Lipidtröpfchen	↑	↑	↑
α -SMA ¹	↓	↓	↓
P-ERK/ERK	=	=	=

↑ signifikante Erhöhung des Parameters

↓ signifikante Abnahme des Parameters

= keine Veränderungen (alle Angaben beziehen sich auf eine unbehandelte Kontrolle)

Tab. 5.2: Antifibrotische Effekte der D-Vitamine auf frühe aktivierte PSZ

Dargestellt sind die Ergebnisse der BrdU-Proliferationsmessungen (4.3) in der Zeile Zellwachstum, der Ölrotfärbungen (4.4) in der Zeile Lipidtröpfchen sowie der Immunfluoreszenzfärbungen (4.5) der α -SMA-Fasern und Protein Analysen (4.8) in der Zeile P-ERK/ERK. ¹ Eine Verifizierung der Ergebnisse erfolgte anhand von Protein-Analysen (4.8).

5.3 Integrative Betrachtung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die Effekte von Vitamin D2, Vitamin D3 und Calcipotriol auf vollständig aktivierte und frühe aktivierte PSZ *in vitro* vergleichend dar. Außerdem sollte ein systematischer Vergleich der Wirksamkeit der D-Vitamine untereinander durchgeführt werden.

Während die Auswirkungen der D-Vitamine auf aktivierte PSZ gering waren, konnte einer Aktivierung der PSZ in der Frühphase entgegengewirkt werden. So legen die Erkenntnisse dieser Arbeit nahe, dass die Effekte der Vitamin D-Präparate vom Aktivierungszustand der PSZ abhängig sind. Dabei unterschieden sich die eingesetzten D-Vitamine in ihrer Wirksamkeit nicht.

Sowohl das PK als auch die CP sind Krankheiten, die mit einer massiven Fibrose einhergehen. Da diese Erkrankungen in der Frühphase meist asymptomatisch verlaufen und so oft erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden, kann bei Diagnose der Erkrankungen von einer fortgeschrittenen Pankreasfibrose ausgegangen werden. Dieser bindegewebige Organumbau wird primär von PSZ unterhalten, die durch verschiedene Mechanismen aktiviert wurden (1.1.3.3 und 1.1.3.4). Der Einsatz von D-Vitaminen würde, so suggerieren die Ergebnisse dieser Arbeit, in dieser Phase der Erkrankung, in der der Großteil der PSZ schon aktiviert ist, keinen Einfluss auf den Aktivierungszustand der PSZ haben. Die aktivierten PSZ würden auch unter den Einflüssen der D-Vitamine weiterhin profibrotisch wirken und eine Progredienz der Fibrose fördern. Allerdings könnte die verminderte IL-6-Sekretion der PSZ, die durch die D-Vitamine hervorgerufen wird, dafür sorgen, dass noch ruhende PSZ nicht aktiviert werden. So zeigten aktuelle Studien, dass IL-6 ruhende PSZ aktivieren kann (Aoki *et al.*, 2006). In der Hemmung der Rekrutierung noch ruhender PSZ könnte ein Ansatz von D-Vitaminen beim PK und der CP liegen. Zum anderen würden die Vitamin D-Derivate ihre Wirkung auf PSZ in der Frühphase der Aktivierung entfalten, so deren Aktivierungsprozess aufhalten und damit einer Progredienz der Pankreasfibrose entgegenwirken können. Grundlage dafür wäre, dass noch nicht vollständig aktivierte PSZ vorliegen.

Die Effekte der D-Vitamine auf frühe aktivierte PSZ legen darüber hinaus nahe, über eine prophylaktische Vitamin D-Substitution bei Patienten mit Risikofaktoren (1.1.1.2 und 1.1.2.2) für das PK bzw. die CP nachzudenken, um so einer Organfibrose bei Krankheitsmanifestation in der Frühphase entgegenzuwirken.

Die beobachteten Effekte müssten in Tiermodellen nachvollzogen werden, bevor in klinischen Studien eine Wirksamkeit der D-Vitamine bei Patienten mit PK oder CP zu beweisen wäre. Ein Vorteil der D-Vitamine ist hierbei sicherlich, dass Vitamin D-Präparate schon bei Mangelzuständen und Osteoporose eingesetzt werden. Außerdem gelten D-Vitamine als nebenwirkungsarm.

6. Zusammenfassung

Die chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom sind Erkrankungen des exokrinen Pankreas, die mit einem fibrotischen Umbau des Pankreas einhergehen. Obwohl die Pathophysiologie beider Krankheiten differiert, spielen PSZ eine herausragende Rolle in der Ausbildung der Fibrose des Pankreas beider Erkrankungen. PSZ sind im gesunden Pankreas an der Regulation des EZM-*turnovers* beteiligt und werden im Zuge pathologischer Einflüsse kurzfristig aktiviert, um Wundheilungsprozesse im Pankreas einzuleiten. Beim PK und der CP werden kontinuierlich Stimuli freigesetzt, die die PSZ aktivieren. Diese chronische Aktivierung der PSZ führt zu einer Transformation zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen, die charakteristische Aktivierungsmarker ausbilden und vermehrt EZM synthetisieren, was eine Vermehrung des Stromas des Pankreas zur Folge hat. Darüber hinaus können PSZ über verschiedene Mechanismen mit Tumorzellen interagieren und deren Proliferation fördern. Dementsprechend ist das Stroma, in dem sich die PSZ befinden und dessen Menge aufgrund der vermehrten EZM-Produktion durch PSZ zunimmt, als *Target* zur Behandlung des PK in den Mittelpunkt verschiedener Studien gerückt. Wurde zunächst davon ausgegangen, dass eine Stromadepletion ein sinnvoller Ansatz ist, um die Tumorprogression zu hemmen, so konnten aktuelle Studien auch ein vermehrtes Wachstum des Tumors nach einer Stromadepletion zeigen. Neueste Studien stellen eine Modulation des Stromas als Therapieoption vor, um das Anfluten von Chemotherapeutika zu erhöhen, das Tumorstadium zu hemmen und das Langzeitüberleben von PK-Patienten signifikant zu erhöhen. Zur Umsetzung dieser Stromamodulation beim PK sind momentan jedoch noch keine Präparate zugelassen.

Vitamin D gehört zu den fettlöslichen Vitaminen und erlangte in jüngerer Vergangenheit immer mehr Aufmerksamkeit aufgrund der weiten Verbreitung von Mangelzuständen in der Bevölkerung. Während Vitamin D₂ und Vitamin D₃ in die Regulation des Kalziumhaushalts eingreifen, bleibt dieser vom Vitamin D-Analogen Calcipotriol unbeeinflusst. Neueste Studien wiesen den VDR auch in PSZ nach, was Untersuchungen von Einflüssen von Vitamin D-Derivaten auf PSZ nahelegte. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Einflüsse von Vitamin D₂, Vitamin D₃ und Calcipotriol auf PSZ darzustellen.

Als Untersuchungsmodell dienten PSZ, die aus gesunden Mäusen gewonnen wurden. Alle Experimente wurden mit Primärzellen durchgeführt, die entweder für einige Tage nach der Einsaat mit den D-Vitaminen inkubiert wurden oder bis zur Konfluenz wuchsen, anschließend passagiert und nach Adhärenz der Zellen mit den Vitamin D-Derivaten behandelt wurden. Je nach Versuchsansatz wurden so frühe aktivierte von vollständig aktivierten PSZ unterschieden. Untersucht wurden die Einflüsse der D-Vitamine auf das Zellwachstum mittels BrdU-Assays, die Ausprägung von Lipidtröpfchen mit Hilfe von Ölrotfärbungen und die

Ausbildung von α -SMA-Fasern anhand von Immunfluoreszenzanalysen. Weiterhin wurden zur Untersuchung der Vitamin D-Effekte auf frühe aktivierte PSZ Proteinanalysen von α -SMA und P-ERK/ERK durchgeführt. Zur Analyse der Effekte der D-Vitamine auf die Seneszenz aktivierter PSZ wurden zusätzlich β -Galactosidase-Färbungen realisiert. Auch Untersuchungen zur Expression ausgewählter Gene mittels Echtzeit-PCR und die Messung von IL-6 im Zellüberstand anhand eines IL-6-spezifischen ELISAs wurden mit vollständig aktivierten PSZ vollzogen.

Die Vitamin D-Derivate hemmten die *IL-6*-Expression aktivierter PSZ statistisch signifikant. Dieser Rückgang der *IL-6*-Expression konnte anhand einer IL-6-spezifischen ELISA-Analyse verifiziert werden. So nahm auch die IL-6-Konzentration im Zellüberstand vollständig aktivierter PSZ unter Vitamin D-Einfluss ab. Effekte der D-Vitamine auf andere untersuchte molekulare und biologische Eigenschaften vollständig aktivierter PSZ konnten nicht herausgearbeitet werden.

Frühe aktivierte PSZ wurden durch die eingesetzten D-Vitamine nachhaltiger beeinflusst. So nahm die Ausprägung von Lipidtröpfchen in PSZ, die mit den Vitamin D-Präparaten behandelt wurden, signifikant zu. Passend dazu konnte die Ausbildung von α -SMA-Fasern in den PSZ durch die D-Vitamine gehemmt werden. Auch auf Proteinebene konnte ein Rückgang der α -SMA-Expression unter D-Vitamin-Behandlung beobachtet werden.

So konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Effekte der D-Vitamine vom Aktivierungszustand der PSZ abhängig sind. Dabei unterscheiden sich die D-Vitamine in ihrer Wirksamkeit untereinander nicht.

Die Ergebnisse an PSZ in der Frühphase der Aktivierung sprechen für eine Verzögerung der Aktivierung durch den Einsatz der D-Vitamine. Sowohl die vermehrte Ausprägung von Lipidtröpfchen als auch die verminderte Expression von α -SMA-Fibrillen sind Charakteristika ruhender PSZ. Demgegenüber sind die D-Vitamine, den Ergebnissen dieser Arbeit folgend, nicht imstande, bereits vollständig aktivierte PSZ in einen ruhenden Zustand zurückzuführen. Allerdings sollte die verminderte *IL-6*-Expression durch den Einsatz der D-Vitamine nicht außer Acht gelassen werden. IL-6 gilt als Zytokin, das für die Aktivierung von PSZ mitverantwortlich ist. Eine Verminderung der Sekretion dieses Zytokins durch die Vitamin D-Derivate könnte eine Hemmung der Aktivierung noch ruhender PSZ herbeiführen und so schlussendlich antifibrotisch wirken.

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit aktuellen Publikationen in Einklang bringen. Zwar sind die in dieser Dissertation herausgestellten Effekte auf aktivierte PSZ schwächer als in anderen Arbeiten, gleichen sich jedoch tendenziell. Eine Modulation des Tumorstromas durch D-Vitamine, die von anderen Forschungsgruppen für möglich erachtet wird und vor allem die Ansprechrate auf eine Chemotherapie erhöhen soll, wurde in dieser

Arbeit nicht direkt untersucht. Inwieweit der Rückgang der Expression des Zytokins IL-6 in vollständig aktivierten PSZ unter dem Einfluss der D-Vitamine die Tumorzellen und das Stroma beeinflusst, müssen Folgestudien zeigen.

7. Thesen

1. Das Pankreaskarzinom (PK) und die chronische Pankreatitis (CP) sind Krankheiten, die mit einer Fibrose des Pankreas einhergehen. Die Fibrose fördert die Progression der Erkrankungen.
2. Pankreatische Sternzellen (PSZ) sind die Hauptakteure der Fibrogenese des Pankreas beim PK und der CP.
3. PSZ werden über verschiedene Mediatoren dauerhaft stimuliert und aktiviert. Erst nach Aktivierung entfalten die PSZ ihr profibrotisches Potential.
4. Das Ausmaß der Vitamin D-Effekte auf PSZ ist von deren Aktivierungszustand abhängig.
5. D-Vitamine erhöhen die Ausprägung von Lipidtröpfchen in ruhenden PSZ, hemmen so deren Aktivierung und wirken dadurch antifibrotisch.
6. Die Ausbildung von α -SMA-Fasern in ruhenden PSZ wird durch die D-Vitamine gehemmt. Die Vitamin D-Derivate wirken so einer Aktivierung ruhender PSZ, die profibrotische Mediatoren sezernieren, entgegen.
7. Die eingesetzten Vitamin-Präparate Vitamin D2, Vitamin D3 und Calcipotriol unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit auf PSZ untereinander nicht.
8. Eine Rückführung aktivierter PSZ in einen ruhenden Zustand ist durch den Einsatz der D-Vitamine nicht möglich.
9. Vitamin D-Derivate haben keinen Einfluss auf die Ausprägung wichtiger Aktivierungsmarker (Lipidtröpfchen und α -SMA-Fasern) in bereits aktivierten PSZ.
10. D-Vitamine wirken über eine Hemmung der IL-6-Sekretion und -Expression auch auf aktivierte PSZ antifibrotisch.
11. Das Zellwachstum der PSZ wird, unabhängig vom Aktivierungszustand der Zellen, von den D-Vitaminen nicht beeinflusst.
12. Die Vitamin D-Effekte auf PSZ sollten am Tiermodell *in vivo* verifiziert werden.
13. Der Einsatz von D-Vitaminen im Sinne einer Stromamodulation beim PK sollte in weiterführenden Arbeiten vertieft werden.

8. Literaturverzeichnis

Abramovitch, S.; Dahan-Bachar, L.; Sharvit, E.; Weisman, Y.; Ben Tov, A.; Brazowski, E.; Reif, S. (2011): Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut* 60 (12), 1728–1737.

Adams, J. S.; Hewison, M. (2010): Update in Vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95 (2), 471–478.

Aird, I.; Lee, D. R.; Fraser Roberts, J. A. (1960): AB0 Blood Groups and Cancer of Oesohagus, Cancer of Pancreas, and Pituitary Adenoma. *British Medical Journal* 1 (5180), 1163–1166.

Aoki, H.; Ohnishi, H.; Hama, K.; Ishijima, T.; Satoh, Y.; Hanatsuka, K.; Ohashi, A.; Wada, S.; Miyata, T.; Kita, H.; Yamamoto, H.; Osawa, H.; Sato, K.; Tamada, K.; Yasuda, H.; Mashima, H.; Sugano, K. (2006): Autocrine loop between TGF-beta1 and IL-1beta through Smad3- and ERK-dependent pathways in rat pancreatic stellate cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 290 (4), 1100-1108.

Aoki, Hiroyoshi; Ohnishi, Hirohide; Hama, Kouji; Shinozaki, Satoshi; Kita, Hiroto; Yamamoto, Hironori; Osawa, Hiroyuki; Sato, Kiichi; Tamada, Kiichi; Sugano, Kentaro (2006): Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. *Journal of cellular biochemistry* 99 (1), 221-228.

Aoki, H.; Ohnishi, H.; Hama, K.; Shinozaki, S.; Kita, H.; Osawa, H.; Yamamoto, H.; Sato, K.; Tamada, K.; Sugano, K. (2007): Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to proinflammatory cytokines. *American journal of physiology. Cell physiology* 292 (1), 259-268.

Apte, M. V.; Haber, P. S.; Applegate, T. L.; Norton, I. D.; McCaughan, G. W.; Korsten, M. A.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S. (1998): Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43 (1), 128–133.

Apte, M. V.; Haber, P. S.; Darby, S. J.; Rodgers, S. C.; McCaughan, G. W.; Korsten, M. A.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S. (1999): Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44 (4), 534–541.

Apte, Minoti V.; Pirola, Romano C.; Wilson, Jeremy S. (2012): Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Frontiers in physiology* 3 (344), 1–14.

Bachem, M. G.; Schneider, E.; Gross, H.; Weidenbach, H.; Schmid, R. M.; Menke, A.; Siech, M.; Beger, H.; Grünert, A.; Adler, G. (1998): Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115 (2), 421–432.

Berna, M. J.; Seiz, O.; Nast, J. F.; Benten, D.; Bläker, M.; Koch, J.; Lohse, A. W.; Pace, A. (2010): CCK1 and CCK2 receptors are expressed on pancreatic stellate cells and induce collagen production. *The Journal of biological chemistry* 285 (50), 38905–38914.

Bernadotte, A.; Mikhelson, V. M.; Spivak, I. M. (2016): Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging* 8 (1), 3–11.

Bläuer, M.; Sand, J.; Laukkanen, J. (2015): Physiological and clinically attainable concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppress proliferation and extracellular matrix protein expression in mouse pancreatic stellate cells. *Pancreatology* 15 (4), 366–371.

Bosetti, C.; Lucenteforte, E.; Silverman, D. T.; Petersen, G.; Bracci, P. M.; Ji, B. T.; Negri, E.; Li, D.; Risch, H. A.; Olson, S. H.; Gallinger, S.; Miller, A. B.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Talamini, R.; Polesel, J.; Ghadirian, P.; Baghurst, P. A.; Zatonski, W.; Fontham, E.; Bamlet, W. R.; Holly, E. A.; Bertuccio, P.; Gao, Y. T.; Hassan, M.; Yu, H.; Kurtz, R. C.; Cotterchio, M.; Su, J.; Maisonneuve, P.; Duell, E. J.; Boffetta, P.; La Vecchia, C. (2012): Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (7), 1880–1888.

Brock, C.; Møller Nielsen, L.; Lelic, D.; Mohr Drewes, A. (2013): Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology* 19 (42), 7231–7240.

Cantorna, M. T.; Hayes, C. E.; DeLuca, H. F. (1996): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15), 7861–7864.

Cantorna, M. T.; Hayes, C. E.; DeLuca, H. F. (1998): 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *The Journal of nutrition* 128 (1), 68–72.

Cantorna, M. T.; Munsick, C.; Bemiss, C.; Mahon, B. D. (2000): 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *The Journal of nutrition* 130 (11), 2648–2652.

Chan, T.-F.; Poon, A.; Basu, A.; Addleman, N. R.; Chen, J.; Phong, A.; Byers, P. H.; Klein, T. E.; Kwok, P.-Y. (2008): Natural variation in four human collagen genes across an ethnically diverse population. *Genomics* 91 (4), 307–314.

Christakos, S.; Hewison, M.; Gardner, D. G.; Wagner, C. L.; Sergeev, I. N.; Rutten, E.; Pittas, A. G.; Boland, R.; Ferrucci, L.; Bikle, D. D. (2013): Vitamin D: beyond bone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1287 (1), 45–58.

Cicenas, J.; Kvederaviciute, K.; Meskinyte, I.; Meskinyte-Kausiliene, E.; Skeberdyte, A. (2017): KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers* 9 (42).

Colston, K.; Hirt, M.; Feldman, D. (1980): Organ distribution of the cytoplasmic 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor in various mouse tissues. *Endocrinology* 107 (6), 1916–1922.

Conwell, D. L.; Lee, L. S.; Yadav, D.; Longnecker, D. S.; Miller, F. H.; Mortelet, K. J.; Levy, M. J.; Kwon, R.; Lieb, J. G.; Stevens, T.; Toskes, P. P.; Gardner, T. B.; Gelrud, A.; Wu, B. U.; Forsmark, C. E.; Vege, S. S. (2014): American Pancreatic Association Practice Guidelines in Chronic Pancreatitis: evidence-based report on diagnostic guidelines. *Pancreas* 43 (8), 1143–1162.

Coté, G. A.; Yadav, D.; Slivka, A.; Hawes, R. H.; Anderson, M. A.; Burton, F. R.; Brand, R. E.; Banks, P. A.; Lewis, M. D.; Disario, J. A.; Gardner, T. B.; Gelrud, A.; Amann, S. T.; Baillie, J.; Money, M. E.; O'Connell, M.; Whitcomb, D. C.; Sherman, S. (2011): Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 9 (3), 266-273.

D'Haese, J. G.; Ceyhan, G. O.; Demir, I. E.; Tieftrunk, E.; Friess, H. (2014): Treatment options in painful chronic pancreatitis: a systematic review. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 16 (6), 512–521.

Di Leo, M.; Bianco, M.; Zuppardo, R. A.; Guslandi, M.; Calabrese, F.; Mannucci, A.; Neri, T. M.; Testoni, P. A.; Leandro, G.; Cavestro, G. M. (2017): Meta-analysis of the impact of SPINK1 p.N34S gene variation in Caucasian patients with chronic pancreatitis. An update. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 49 (8), 847–853.

Di Leo, M.; Leandro, G.; Singh, S. K.; Mariani, A.; Bianco, M.; Zuppardo, R. A.; Goni, E.; Rogger, T. M.; Di Mario, F.; Guslandi, M.; Cobelli, F. de; Del Maschio, A.; Testoni, P. A.; Cavestro, G. M. (2017): Low Alcohol and Cigarette Use Is Associated to the Risk of Developing Chronic Pancreatitis. *Pancreas* 46 (2), 225–229.

Dimagno, E. P.; Go, V. L.; Summerskill, W. H. (1973): Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. *The New England journal of medicine* 288 (16), 813–815.

Dumonceau, J-M; Delhay, M.; Tringali, A.; Dominguez-Munoz, J. E.; Poley, J-W; Arvanitaki, M.; Costamagna, G.; Costea, F.; Devière, J.; Eisendrath, P.; Lakhtakia, S.; Reddy, N.; Fockens, P.; Ponchon, T.; Bruno, M. (2012): Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy* 44 (8), 784–800.

Erkan, M.; Adler, G.; Apte, M. V.; Bachem, M. G.; Buchholz, M.; Detlefsen, S.; Esposito, I.; Friess, H.; Gress, T. M.; Habisch, H-J.; Hwang, R. F.; Jaster, R.; Kleeff, J.; Kloeppel, G.; Kordes, C.; Logsdon, C. D.; Masamune, A.; Michalski, C. W.; Oh, J.; Phillips, P. A.; Pinzani, M.; Reiser-Erkan, C.; Tsukamoto, H.; Wilson, J. (2012): StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* 61 (2), 172–178.

Erkan, M.; Reiser-Erkan, C.; Michalski, C. W.; Deucker, S.; Sauliunaite, D.; Streit, S.; Esposito, I.; Friess, H.; Kleeff, J. (2009): Cancer-Stellate Cell Interactions Perpetuate the Hypoxia-Fibrosis Cycle in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Neoplasia* 11 (5), 497–508.

Erkan, M.; Kleeff, J.; Gorbachevski, A.; Reiser, C.; Mitkus, T.; Esposito, I.; Giese, T.; Büchler, M.W.; Giese, N.A.; Friess, H. (2007): Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. *Gastroenterology* 132 (4), 1447-1464.

Etemad, B.; Whitcomb, D. C. (2001): Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 120 (3), 682–707.

Ewald, N.; Hardt, P. D. (2013): Diagnosis and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology* 19 (42), 7276–7281.

Fitzner, B.; Müller, S.; Walther, M.; Fischer, M.; Engelmann, R.; Müller-Hilke, B.; Pützer, B. M.; Kreutzer, M.; Nizze, H.; Jaster, R. (2012): Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 16 (11), 2620–2630.

Fraczek, M.; Kusmierz, D.; Rostowska-Nadolska, B.; Kutner, A.; Latocha, M. T. (2015): Antiproliferative and cytotoxic effect of selected Vitamin D analogs on nasal polyps fibroblasts and other cells with higher proliferative potential. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 72 (5), 923–929.

Genkinger, J. M.; Spiegelman, D.; Anderson, K. E.; Bergkvist, L.; Bernstein, L.; van den Brandt, P. A.; English, D. R.; Freudenheim, J. L.; Fuchs, C. S.; Giles, G. G.; Giovannucci, E.; Hankinson, S. E.; Horn-Ross, P. L.; Leitzmann, M.; Männistö, S.; Marshall, J. R.; McCullough, M. L.; Miller, A. B.; Reding, D. J.; Robien, K.; Rohan, T. E.; Schatzkin, A.; Stevens, V. L.; Stolzenberg-Solomon, R. Z.; Verhage, B. A. J.; Wolk, A.; Ziegler, R. G.; Smith-Warner, S. A. (2009): Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (3), 765–776.

Giardiello, F. M.; Offerhaus, G. J.; Lee, D. H.; Krush, A. J.; Tersmette, A. C.; Booker, S. V.; Kelley, N. C.; Hamilton, S. R. (1993): Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut* 34 (10), 1394–1396.

Gocek, E.; Studzinski, G. P. (2009): Vitamin D and differentiation in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 46 (4), 190–209.

Hearle, N.; Schumacher, V.; Menko, F. H.; Olschwang, S.; Boardman, L. A.; Gille, J. J. P.; Keller, J. J.; Westerman, A. Marie; Scott, R. J.; Lim, W.; Trimbath, J. D.; Giardiello, F. M.; Gruber, S. B.; Offerhaus, G. J. A.; Rooij, F. W. M. de; Wilson, J. H. P.; Hansmann, A.; Möslein, G.; Royer-Pokora, B.; Vogel, T.; Phillips, R. K. S.; Spigelman, A. D.; Houlston, R. S. (2006): Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (10), 3209–3215.

Hingorani, S. R.; Petricoin, E. F.; Maitra, A.; Rajapakse, V.; King, C.; Jacobetz, M. A.; Ross, S.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Hitt, B. A.; Kawaguchi, Y.; Johann, D.; Liotta, L. A.; Crawford, H. C.; Putt, M. E.; Jacks, T.; Wright, C. V.E.; Hruban, R. H.; Lowy, A. M.; Tuveson, D. A. (2003): Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4 (6), 437–450.

Hinz, B.; Dugina, V.; Ballestrem, C.; Wehrle-Haller, B.; Chaponnier, C. (2003): Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Molecular biology of the cell* 14 (6), 2508–2519.

Houghton, L. A.; Vieth, R. (2006): The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. *The American Journal of Clinical Nutrition* 84 (4), 694–697.

Hruban, R. H.; Takaori, K.; Klimstra, D. S.; Adsay, N. V.; Albores-Saavedra, J.; Biankin, A. V.; Biankin, S. A.; Compton, C.; Fukushima, N.; Furukawa, T.; Goggins, M.; Kato, Y.; Klöppel, G.; Longnecker, D. S.; Lüttges, J.; Maitra, A.; Offerhaus, G. J. A.; Shimizu, M.; Yonezawa, S. (2004): An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology* 28 (8), 977–987.

Hruban, R. H.; van Mansfeld, G. J. H.; Offerhaus, G. J. A.; van Weering, D. H. J.; Allison, D. C.; Goodman, S. N.; Kensler, T. W.; Bose, K. K.; Cameron, J. L.; Bos, J. L. (1993): K-ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Pancreas. *American Journal of Pathology* 143 (2), 545–554.

Hüser, N.; Assfalg, V.; Michalski, C. W.; Gillen, S.; Kleeff, J.; Friess, H. (2010): Das inoperable Pankreaskarzinom-palliative interventionelle und chirurgische Therapie. *Zentralblatt für Chirurgie* 135 (6), 502–507.

Huxley, R.; Ansary-Moghaddam, A.; Berrington de González, A.; Barzi, F.; Woodward, M. (2005): Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British journal of cancer* 92 (11), 2076–2083.

Hwang, R. F.; Moore, T.; Arumugam, T.; Ramachandran, V.; Amos, K. D.; Rivera, A.; Ji, B.; Evans, D. B.; Logsdon, C. D. (2008): Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer research* 68 (3), 918–926.

Issa, Y.; van Santvoort, H. C.; van Goor, H.; Cahen, D. L.; Bruno, M. J.; Boermeester, M. A. (2013): Surgical and endoscopic treatment of pain in chronic pancreatitis: a multidisciplinary update. *Digestive surgery* 30 (1), 35–50.

Jacobetz, M. A.; Chan, D. S.; Neesse, A.; Bapiro, T. E.; Cook, N.; Frese, K. K.; Feig, C.; Nakagawa, T.; Caldwell, M. E.; Zecchini, H. I.; Lolkema, M. P.; Jiang, P.; Kultti, A.; Thompson, C. B.; Maneval, D. C.; Jodrell, D. I.; Frost, G. I.; Shepard, H. M.; Skepper, J. N.; Tuveson, D. A. (2013): Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 62 (1), 112–120.

Jaeger-Becker, D. (2015): Vitamin-D-Mangel - Was bringt die Supplementierung? In: *ÄrzteZeitung*, Springer-Verlag GmbH, Nr. 127 - 231D, S. 14.

Jaster, R.; Sparmann, G.; Emmrich, J.; Liebe, S. (2002): Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut* 51 (4), 579–584.

Jonitz, A.; Fitzner, B.; Jaster, R. (2009): Molecular determinants of the profibrogenic effects of endothelin-1 in pancreatic stellate cells. *World Journal of Gastroenterology* 15 (33), 4143–4149.

Kang, J.; Hwang, I.; Yoo, C.; Kim, K.-P.; Jeong, J. H.; Chang, H.-M.; Lee, S. S.; Park, D. H.; Song, T. J.; Seo, D. W.; Lee, S. K.; Kim, M.-H.; Hong, S.-M.; Shin, S. H.; Hwang, D. W.; Song, K. B.; Lee, J. H.; Kim, S. C.; Ryoo, B.-Y. (2018): Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus FOLFIRINOX as the first-line chemotherapy for patients with metastatic pancreatic cancer: retrospective analysis. *Investigational new drugs* 36 (4), 732–741.

Karger, A.; Fitzner, B.; Brock, P.; Sparmann, G.; Emmrich, J.; Liebe, S.; Jaster, R. (2008): Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells. *Cellular signalling* 20 (10), 1865–1872.

Kim, N.; Yoo, W.; Lee, J.; Kim, H.; Lee, H.; Kim, Y-S; Kim, D-U; Oh, J. (2009): Formation of vitamin A lipid droplets in pancreatic stellate cells requires albumin. *Gut* 58 (10), 1382–1390.

Klöppel G.; Maillet, B. (1992): The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology* 420 (1), 1–4.

Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017.

Lankisch, P. G.; Assmus, C.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A. B. (2002): Epidemiology of pancreatic diseases in Lüneburg County. A study in a defined german population. *Pancreatology* 2 (5), 469–477.

Layer, P.; Yamamoto, H.; Kalthoff, L.; Clain, J. E.; Bakken, L. J.; Dimagno, E. P. (1994): The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 107 (5), 1481–1487.

Lee, B. Y.; Han, J. A.; Im, J. S.; Morrone, A.; Johung, K.; Goodwin, E. C.; Kleijer, W. J.; DiMaio, D.; Hwang, E. S. (2006): Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell* 5 (2), 187–195.

Lee, S. M.; Meyer, M. B.; Benkusky, N. A.; O'Brien, C. A.; Pike, J. W. (2015): Mechanisms of Enhancer-mediated Hormonal Control of Vitamin D Receptor Gene Expression in Target Cells. *The Journal of biological chemistry* 290 (51), 30573–30586.

Lerch, M. M.; Stier, A.; Wahnschaffe, U.; Mayerle, J. (2009): Pancreatic pseudocysts: observation, endoscopic drainage, or resection? *Deutsches Ärzteblatt international* 106 (38), 614–621.

Lévy, P.; Domínguez-Muñoz, E.; Imrie, C.; Löhr, M.; Maisonneuve, P. (2014): Epidemiology of chronic pancreatitis: burden of the disease and consequences. *United European gastroenterology journal* 2 (5), 345–354..

Li, D.; Morris, J. S.; Liu, J.; Hassan, M. M.; Day, R. S.; Bondy, M. L.; Abbruzzese, J. L. (2009): Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA* 301 (24), 2553–2562.

Löhr, M.; Klöppel, G.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A. B.; Lüttges, J. (2005): Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 7 (1), 17–23.

Ma, Y.; Khalifa, B.; Yee, Y. K.; Lu, J.; Memezawa, A.; Savkur, R. S.; Yamamoto, Y.; Chintalacheruvu, S. R.; Yamaoka, K.; Stayrook, K. R.; Bramlett, K. S.; Zeng, Q. Q.; Chandrasekhar, S.; Yu, X.-P.; Linebarger, J. H.; Iturria, S. J.; Burris, T. P.; Kato, S.; Chin, W. W.; Nagpal, S. (2006): Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *The Journal of clinical investigation* 116 (4), 892–904.

Maisonneuve, P.; Lowenfels, A. B.; Müllhaupt, B.; Cavallini, G.; Lankisch, P. G.; Andersen, J. R.; Dimagno, E. P.; Andrén-Sandberg, A.; Domellöf, L.; Frulloni, L.; Ammann, R. W. (2005): Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut* 54 (4), 510–514.

Masamune, A.; Kikuta, K.; Watanabe, T.; Satoh, K.; Hirota, M.; Shimosegawa, T. (2008): Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 295 (4), 709–717.

Masamune, A.; Kikuta, K.; Watanabe, T.; Satoh, K.; Satoh, A.; Shimosegawa, T. (2008): Pancreatic stellate cells express Toll-like receptors. *Journal of gastroenterology* 43 (5), 352–362.

Masamune, A.; Nakano, E.; Hamada, S.; Takikawa, T.; Yoshida, N.; Shimosegawa, T. (2014): Alteration of the microRNA expression profile during the activation of pancreatic stellate cells. *Scandinavian journal of gastroenterology* 49 (3), 323–331.

Mato, E.; Lucas, M.; Petriz, J.; Gomis, R.; Novials, A. (2009): Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *The Biochemical journal* 421 (2), 181–191.

Mayerle, J.; Hoffmeister, A.; Werner, J.; Witt, H.; Lerch, M. M.; Mössner, J. (2013): Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 110 (22), 387–393.

McCarroll, J. A.; Phillips, P. A.; Kumar, R. K.; Park, S.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S.; Apte, M. V. (2004): Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway. *Biochemical pharmacology* 67 (6), 1215–1225.

McCarroll, J. A.; Phillips, P. A.; Park, S.; Doherty, E.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S.; Apte, M. V. (2003): Pancreatic Stellate Cell Activation by Ethanol and Acetaldehyde: Is it Mediated by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway? *Pancreas* 27 (2), 150–160.

McCubrey, J. A.; Steelman, L. S.; Chappell, W. H.; Abrams, S. L.; Wong, E. W. T.; Chang, F.; Lehmann, B.; Terrian, D. M.; Milella, M.; Tafuri, A.; Stivala, F.; Libra, M.; Basecke, J.; Evangelisti, C.; Martelli, A. M.; Franklin, R. A. (2007): Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1773 (8), 1263–1284.

Meng, X.-M.; Tang, P.M.-K.; Li, J.; Lan, H.T. (2015): TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Frontiers in physiology* 6, 82.

Mews, P.; Phillips, P.; Fahmy, R.; Korsten, M.; Pirola, R.; Wilson, J.; Apte, M. (2002): Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut* 50 (4), 535–541.

Michalski, Christoph W.; Gorbachevski, Andre; Erkan, Mert; Reiser, Carolin; Deucker, Stefanie; Bergmann, Frank; Giese, Thomas; Weigand, Markus; Giese, Nathalia A.; Friess, Helmut; Kleeff, Jörg (2007): Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis. *Journal of translational medicine* 63 (5).

Mössner, J.; Keim, V. (2010): Klinik, Diagnostik und konservative Therapie der chronischen Pankreatitis. In: Riemann, J.F. und Adam, B. (Hrsg.), *Intestinum*, Stuttgart, Thieme, S. 1844–1858.

Mülhardt C. (2013) RNA. In: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. Der Experimentator*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, S. 115-131.

Nagpal, S.; Na, S.; Rathnachalam, R. (2005): Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine reviews* 26 (5), 662–687.

Nakamura, T.; Ito, T.; Oono, T.; Igarashi, H.; Fujimori, N.; Uchida, M.; Niina, Y.; Yasuda, M.; Suzuki, K.; Takayanagi, R. (2011): Bacterial DNA Promotes Proliferation of Rat Pancreatic Stellate Cells Through Toll-Like Receptor 9. *Pancreas* 40 (6), 823-831.

Nomiyama, Y.; Tashiro, M.; Yamaguchi, T.; Watanabe, S.; Taguchi, M.; Asaumi, H.; Nakamura, H.; Otsuki, M. (2007): High glucose activates rat pancreatic stellate cells through protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Pancreas* 34 (3), 364–372.

Ohnishi, H.; Miyata, T.; Yasuda, H.; Satoh, Y.; Hanatsuka, K.; Kita, H.; Ohashi, A.; Tamada, K.; Makita, N.; Iiri, T.; Ueda, N.; Mashima, H.; Sugano, K. (2004): Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. *The Journal of biological chemistry* 279 (10), 8873–8878.

Olive, K. P.; Jacobetz, M. A.; Davidson, C. J.; Gopinathan, A.; McIntyre, D.; Honess, D.; Madhu, B.; Goldgraben, M. A.; Caldwell, M. E.; Allard, D.; Frese, K. K.; Denicola, G.; Feig, C.; Combs, C.; Winter, S. P.; Ireland-Zecchini, H.; Reichelt, S.; Howat, W. J.; Chang, A.; Dhara, M.; Wang, L.; Rückert, F.; Grützmann, R.; Pilarsky, C.; Izeradjene, K.; Hingorani, S. R.; Huang, P.; Davies, S. E.; Plunkett, W.; Egorin, M.; Hruban, R. H.; Whitebread, N.; McGovern, K.; Adams, J.; Iacobuzio-Donahue, C.; Griffiths, J.; Tuveson, D. A. (2009): Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324 (5933), 1457–1461.

Omary, M. Bishr; Lugea, Aurelia; Lowe, Anson W.; Pandol, Stephen J. (2007): The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *The Journal of clinical investigation* 117 (1), 50–59.

Özdemir, B. C.; Pentcheva-Hoang, T.; Carstens, J. L.; Zheng, X.; Wu, C.-C.; Simpson, T. R.; Laklai, H.; Sugimoto, H.; Kahlert, C.; Novitskiy, S. V.; Jesus-Acosta, A. de; Sharma, P.; Heidari, P.; Mahmood, U.; Chin, L.; Moses, H. L.; Weaver, V. M.; Maitra, A.; Allison, J. P.; LeBleu, V. S.; Kalluri, R. (2014): Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25 (6), 719–734.

Penn, J. W.; Grobbelaar, Adriaan, O.; Rolfe, K. J. (2012): The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma* 2 (1), 18–28.

Pfützer, R. H.; Barmada, M. M.; Brunskill, A. P.J.; Finch, R.; Hart, P. S.; Neoptolemos, J.; Furey, W. F.; Whitcomb, D. C. (2000): SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 119 (3), 615–623.

Phillips, P. A.; McCarroll, J. A.; Park, S.; Wu, M.-J.; Pirola, R.; Korsten, M.; Wilson, J. S.; Apte, M. V. (2003): Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 52 (2), 275–282.

Phillips, P. A.; Yang, L.; Shulkes, A.; Vonlaufen, A.; Poljak, A.; Bustamante, S.; Warren, A.; Xu, Z.; Guilhaus, M.; Pirola, R.; Apte, M. V.; Wilson, J. S. (2010): Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (40), 17397–17402.

Provenzano, P. P.; Cuevas, C.; Chang, A. E.; Goel, V. K.; Hoff, D. D. von; Hingorani, S. R. (2012): Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21 (3), 418–429.

Raimondi, S.; Lowenfels, A. B.; Morselli-Labate, A. M.; Maisonneuve, P.; Pezzilli, R. (2010): Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 24 (3), 349–358.

Ramirez, A. M.; Wongtrakool, C.; Welch, T.; Steinmeyer, A.; Zügel, U.; Roman, J. (2010): Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor β 1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 118 (3), 142–150.

Rao K, B.; Malathi, N.; Narashiman, S.; Rajan, S. T. (2014): Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 8 (4), 14 -17.

Raphael, K. L.; Willingham, F. F. (2016): Hereditary pancreatitis: current perspectives. *Clinical and experimental gastroenterology* 9, 197–207.

Rasmussen, H. H.; Irtun, Ø.; Olesen, S. S.; Drewes, A. M.; Holst, M. (2013): Nutrition in chronic pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology* 19 (42), 7267–7275.

Rhim, A. D.; Oberstein, P. E.; Thomas, D. H.; Mirek, E. T.; Palermo, C. F.; Sastra, S. A.; Dekleva, E. N.; Saunders, T.; Becerra, C. P.; Tattersall, I. W.; Westphalen, C. B.; Kitajewski, J.; Fernandez-Barrena, M. G.; Fernandez-Zapico, M. E.; Iacobuzio-Donahue, C.; Olive, K. P.; Stanger, B. Z. (2014): Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25 (6), 735–747.

Schmidt-Hansen, M.; Berendse, S.; Hamilton, W. (2016): Symptoms of Pancreatic Cancer in Primary Care. *Pancreas* 45 (6).

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-0100L, online abrufbar unter: <http://leitlinienprogrammonkologie.de/Leitlinien.7.0.html>; zuletzt geprüft am 20.03.2019.

Shaib, Y. H.; Davila, J. A.; El-Serag, H. B. (2006): The epidemiology of pancreatic cancer in the United States: changes below the surface. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 24 (1), 87–94.

Shen, J.; Wan, R.; Hu, G.; Yang, L.; Xiong, J.; Wang, F.; Shen, J.; He, S.; Guo, X.; Ni, J.; Guo, C.; Wang, X. (2012): miR-15b and miR-16 induce the apoptosis of rat activated pancreatic stellate cells by targeting Bcl-2 in vitro. *Pancreatology* 12 (2), 91–99..

Sherman, M. H.; Yu, R. T.; Engle, D. D.; Ding, N.; Atkins, A. R.; Tiriach, H.; Collisson, E. A.; Connor, F.; van Dyke, T.; Kozlov, S.; Martin, P.; Tseng, T. W.; Dawson, D. W.; Donahue, T. R.; Masamune, A.; Shimosegawa, T.; Apte, M. V.; Wilson, J. S.; Ng, B.; Lau, S. L.; Gunton, J. E.; Wahl, G. M.; Hunter, T.; Drebin, J. A.; O'Dwyer, P. J.; Liddle, C.; Tuveson, D. A.; Downes, M.; Evans, R. M. (2014): Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell* 159 (1), 80–93.

Shimizu, K.; Hashimoto, K.; Tahara, J.; Imaeda, H.; Andoh, A.; Shiratori, K. (2012): Pancreatic stellate cells do not exhibit features of antigen-presenting cells. *Pancreas* 41 (3), 422–427.

Song, B. - J.; Rockey, D. C. (2013): Status of research on vitamin D supplementation in treating or preventing liver fibrosis. *Liver Int* 33 (5), 653–655.

Spath, L.; Olivieri, A.; Lavra, L.; Fidanza, L.; Carlesimo, M.; Giubettini, M.; Narcisi, A.; Luciani, E.; Bucci, B.; Pisani, D.; Sciacchitano, S.; Bartolazzi, A. (2017): Antiproliferative Effects of 1 α -OH-vitD3 in Malignant Melanoma: Potential Therapeutic implications. *Scientific reports* 7.

Talamini, G.; Bassi, C.; Falconi, M.; Sartori, N.; Salvia, R.; Rigo, L.; Castagnini, A.; Di Francesco, V.; Frulloni, L.; Bovo, P.; Vaona, B.; Angelini, G.; Vantini, I.; Cavallini, G.; Pederzoli, P. (1999): Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Digestive diseases and sciences* 44 (7), 1303–1311.

Tan, X.; Li, Y.; Liu, Y. (2006): Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17 (12), 3382–3393.

Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. (2014): IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (10).

Tveitarås, M. K.; Skogstrand, T.; Leh, S.; Helle, F.; Iversen, B. M.; Chatziantoniou, C.; Reed, R. K.; Hultström, M. (2015): Matrix Metalloproteinase-2 Knockout and Heterozygote Mice Are Protected from Hydronephrosis and Kidney Fibrosis after Unilateral Ureteral Obstruction. *PLoS one* 10 (12).

Uchida, M.; Ito, T.; Nakamura, T.; Hijioaka, M.; Igarashi, H.; Oono, T.; Kato, M.; Nakamura, K.; Suzuki, K.; Takayanagi, R.; Jensen, R. T. (2014): Pancreatic stellate cells and CX3CR1: occurrence in normal pancreas and acute and chronic pancreatitis and effect of their activation by a CX3CR1 agonist. *Pancreas* 43 (5), 708–719.

Uchida, M.; Ito, T.; Nakamura, T.; Igarashi, H.; Oono, T.; Fujimori, N.; Kawabe, K.; Suzuki, K.; Jensen, R. T.; Takayanagi, R. (2013): ERK pathway and sheddases play an essential role in ethanol-induced CX3CL1 release in pancreatic stellate cells. *Laboratory Investigation* 93 (1), 41–53.

U.S. National Cancer Institute, Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER), Pancreas Cancer 5-Year Relative Survival Rate, online abrufbar unter: https://seer.cancer.gov/explorer/application.php?site=40&data_type=4&graph_type=5&compareBy=race&series=sex&chk_sex_1=1&chk_race_3=3&chk_race_2=2&chk_age_range_1=1&chk_stage_101=101&adopt_precision=1&showDataFor=age_range_1_and_stage_101, zuletzt geprüft am 20.03.2019.

Vonlaufen, A.; Joshi, S.; Qu, C.; Phillips, P. A.; Xu, Z.; Parker, N. R.; Toi, C. S.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S.; Goldstein, D.; Apte, M. V. (2008): Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer research* 68 (7), 2085–2093.

Wasiewicz, T.; Piotrowska, A.; Wierzbicka, J.; Slominski, A. T.; Zmijewski, M. A. (2018): Antiproliferative Activity of Non-Calcemic Vitamin D Analogs on Human Melanoma Lines in Relation to VDR and PDIA3 Receptors. *International journal of molecular sciences* 19 (9).

Watari, N.; Hotta, Y.; Mabuchi, Y. (1982): 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 anatomica Japonica* 58 (4-6), 837–858.

Whitcomb, D. C.; Gorry, M. C.; Preston, R. A.; Furey, W.; Sossenheimer, M. J.; Ulrich, C. D.; Martin, S. P.; Gates, L. K.; Amann, S. T.; Toskes, P. P.; Liddle, R.; McGrath, K.; Uomo, G.; Post, J. C.; Ehrlich, G. D. (1996): Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature genetics* 14 (2), 141–145.

Witt, H.; Apte M.V.; Keim, V.; Wilson, J.S. (2007): Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 132 (4), 1557-1573.

Zeitz, U.; Weber, K.; Soegiarto, D. W.; Wolf, E.; Balling, R.; Erben, R. G. (2003): Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (3), 509–511.

Zhang, R.; Naughton, D.P. (2010): Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutrition journal* 9, 65.

9. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
Abb.	Abbildung
ABCG-2	<i>ATP-binding cassette sub-family G2</i>
ACTA 2	Gen, das für α -SMA kodiert
AKT	Gen, das für eine Proteinkinase B kodiert
Aldh	Aldehyd-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl-2-Protein	<i>B-cell lymphoma-2-protein</i>
Bcrp1	<i>breakpoint cluster region pseudogene 1</i>
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2</i>
BrdU	5-Brom-2'-Deoxyuridin
BSA	<i>bovine serume albumin</i>
CCK	Cholecystokinin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CDKN2	<i>cyclin-dependent kinase Inhibitor 2</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Coll	<i>Collagen</i>
Col1A1	Gen, das für alpha-1-Typ-I-Kollagen kodiert
CP	chronische Pankreatitis
CT	Computertomografie
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CTRB	Gen, das für ein Chymotrypsinogen kodiert
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat

DMF	N-N-dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ebd.	ebenda
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	<i>epithelial mesenchymal transition</i>
ERK 1/2	<i>extracellular-signal regulated kinases 1/2</i>
ET-1	Endothelin-1
EUS	Endosonografie
EZM/ECM	Extrazellulärmatrix
et al.	<i>et alii</i>
FGF	<i>fibroblast-growth-factor</i>
FKS	fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	kombiniertes Chemotherapeutikum aus Leucovirin, 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Avidin-HPR	<i>Avidin-horseradish peroxidase</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HSZ	hepatische Sternzellen
ICAM-1	<i>inter-cellular adhesion molecule-1</i>
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>

MEK	mitogen aktivierte Proteinkinasekinase
MHC-II	<i>major histocompatibility complex-II</i>
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie
MMP	Matrix-Metalloprotease
nab-Paclitaxel	<i>nanoparticle albumin bound-Paclitaxel</i>
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
ox. stress	<i>oxidative stress</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PanIn	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>plateled derived growth factor</i>
P-ERK 1/2	Phospho-ERK 1/2
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PK	Pankreaskarzinom
PKC	Proteinkinase C
PRSS1	Gen, das für ein kationisches Trypsinogen kodiert
PRSS2	Gen, das für ein anionisches Trypsinogen kodiert
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSZ	pankreatische Sternzellen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p75NTR	p75 Neurotrophin Rezeptor
RANTES	<i>regulated upon activation</i>

Raf	<i>rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rER	<i>rough endoplasmic reticulum</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	9-cis Retinsäure
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziiierter- β -Galactosidase
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SMAD	<i>small mothers against decapentaplegic</i>
SPINK1	<i>serine protease inhibitor Kazal-type 1</i>
STEP-Schema	<i>survey, tomography, endoscopy and pancreas function-Schema</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>
Thbs	Thrombospondin
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteasen</i>
TLR	<i>toll like-receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TP53	<i>tumor protein 53</i>
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	<i>vitamin D response element</i>

10. Herstellerverzeichnis

Hersteller	Firmensitz
American Can Company	New York City, New York, USA
Anthos Labtec Instruments GmbH	Salzburg, Salzburg, Österreich
AppliChem GmbH	Darmstadt, Hessen, Deutschland
Armin Baack	Schwerin, Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland
Biometra GmbH	Jena, Thüringen, Deutschland
Bio-Rad Laboratories Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland
Carl Zeiss AG	Oberkochen, Baden-Württemberg, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA
Dynatech	Chemnitz, Sachsen, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Hamburg, Deutschland
Eurogentec	Seraing, Wallonien, Belgien
F.Hoffmann-La Roche AG	Basel, Basel-Stadt, Schweiz
GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Niedersachsen, Deutschland
Greiner Bio One International GmbH	Kremsmünster, Oberösterreich, Österreich
Heidolph Instruments	Schwabach, Bayern, . Deutschland
Honeywell Riedel-de-Haën	Seelze, Niedersachsen, Deutschland

IKA-Werke GmbH & Co.KG	Staufen im Breisgau, Baden-Württemberg, Deutschland
Implen Inc.	Westlake Village, Kalifornien, USA
Integra Biosciences AG	Zizers, Graubünden, Schweiz
International Business Machines Corporation (IBM)	Armonk, New York, USA
Intas Pharmaceuticals Ltd.	Ahmedabad, Indien
J.T. Baker	Center Valley, Pennsylvania, USA
Karl Hecht GmbH & Co. KG	Sondheim vor der Rhön, Bayern, Deutschland
Labortechnik Fröbel GmbH	Lindau, Bayern, Deutschland
Leica Camera AG	Wetzlar, Hessen, Deutschland
LI-COR Inc.	Lincoln, Nebraska, USA
Liebherr	Bulle, Freiburg, Schweiz
Medite GmbH	Burgdorf, Niedersachsen, Deutschland
Merck KgaA	Darmstadt, Hessen, Deutschland
Mettler-Toledo Inc.	Columbus, Ohio, USA
PAA Laboratories Inc.	Pasching, Oberösterreich, Österreich
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Baden-Württemberg, Österreich
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Bayern, Deutschland
PKH Halle GmbH	Halle (Saale), Sachsen-Anhalt, Deutschland
Robert Bosch GmbH	Stuttgart, Baden-Württemberg, Deutschland

Rockland Immunochemicals Inc.	Limerick, Pennsylvania, USA
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, Texas, USA
Sanyo Denki K.K	Moriguchi, Osaka, Japan
Scotsman Ice Systems	Vernon Hills, Illinois, USA
Serva Elektrophoresis GmbH	Heidelberg, Baden-Württemberg, Deutschland
Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Missouri, USA
Stuart Scientific	Staffordshire, England, UK
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Upstate Biotechnology Inc.	Lake Placid, New York, USA
VWR International	Darmstadt, Hessen, Deutschland

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Peter Wallbaum
Geburtsdatum: 02.09.1992
Geburtsort: Detmold

Schulbildung

1999 – 2003 Grundschule Reelkirchen
2003 – 2012 Hermann-Vöchting-Gymnasium Blomberg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife 2012

Hochschulbildung

2013 – 2020 Humanmedizin Universität Rostock
Approbation als Arzt November 2020

Veröffentlichte Beiträge

Kongressbeitrag: P. Wallbaum; S. Müller; R. Jaster
Inhibitorische Effekte von Vitamin D-Derivaten auf murine
pankreatische Sternzellen (Posterbeitrag)
37. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs,
Greifswald 26. – 28. Januar 2017

Publikation: Wallbaum, P.; Rohde, S.; Ehlers, L.; Lange, F.; Hohn, A.;
Bergner, C.; Schwarzenböck, S.M.; Krause, B.J.; Jaster, R.
(2018): Antifibrogenic effects of vitamin D derivatives on
mouse pancreatic stellate cells, *World Journal of
Gastronenterology*, 24 (2), 170-178.

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Ein herausragender Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Jaster für die engagierte Betreuung dieser Dissertation. Seine Hilfen bezüglich der Planungen der Experimente, der Diskussion der Ergebnisse und der Überarbeitung des Manuskripts waren von unsagbarem Wert.

Auch bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschungsgruppen Gastroenterologie der Universitätsmedizin Rostock für ein jederzeit angenehmes Arbeitsklima und den respektvollen Umgang miteinander sowie die Möglichkeit der Präsentation und der Diskussion meiner Daten.

Ein besonderer Dank gilt Frau Katja Bergmann, die mir geduldig die methodischen Kniffe und Abläufe im Labor beibrachte und bei Fragestellungen jederzeit unterstützend zur Seite stand.

Abschließend gebührt ein großes Dankeschön meiner Familie für die liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Studienzeit sowie meiner Freundin Judith für ihr Verständnis, wenn ich auch einmal am Wochenende im Labor sein musste und ihre motivierenden Worte an weniger erfolgreichen Tagen.

13. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, wurden in jedem Fall unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Rostock, 14.12.2020

Peter Wallbaum