

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**Stressreaktionen des Pankreas –
Bedeutung von HSP70 für die Präkonditionierung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Irmgard Plöbl

aus

Amberg

München 2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Wagner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Machleidt Prof. Dr. med. J. Diebold
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. C. Schäfer
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	10.03.2005

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Gegenstand der vorliegenden Arbeit	1
1.2	Physiologie des Pankreas	2
1.2.1	Anatomie	3
1.2.1.1	Makroskopische Anatomie	3
1.2.1.2	Mikroskopische Anatomie	3
1.2.2	Hormonregulierte Sekretion	4
1.3	Akute Pankreatitis	6
1.3.1	Epidemiologie und Ätiologie	6
1.3.2	Pathophysiologische Vorgänge in der Frühphase	7
1.3.2.1	Sekretorische Blockade	7
1.3.2.2	Frühzeitige intrazelluläre Trypsinogenaktivierung	8
1.3.2.3	Immunologische Reaktion	12
1.4	Hitzeschockproteine	13
1.4.1	Einführung	14
1.4.2	Struktur und Funktion von HSP70	14
1.4.3	Genetische Regulation der Hitzeschockantwort	16
1.4.4	Rolle von HSP70 bei der Stressantwort	16
1.5	Atrial Natriuretisches Peptid	18
1.5.1	Natriuretische Peptide	18
1.5.2	Rezeptoren und Signaltransduktion	20
1.5.3	Zytoprotektives Potential	21
1.5.4	Hormonelle Präkonditionierung mit dem Atrialen Natriuretischen Peptid	22
1.6	Transgene Maus	23
1.6.1	Zusammensetzung des Inserts	23
1.6.1.1	Elastase Promotor	23
1.6.1.2	HSP70	25
1.6.1.3	Human Growth Hormon	25
2	Ergebnisse	27
2.1	Azinuszellpräparation	27
2.1.1	Sekretionsantwort	27
2.1.2	Lactatdehydrogenase	28
2.1.3	Struktur der isolierten Azinuszellen	29
2.2	Etablierung der Bestimmung von Trypsin in Azinuszellen und Pankreashomogenaten	30
2.3	Die Bedeutung von HSP70 für die Stressreaktion des Pankreas	33
2.3.1	Auswirkung der Hyperthermie-Präkonditionierung auf die Pathophysiologie der Hyperstimulation	33
2.3.1.1	Nachweis von Hitzeschockproteinen	33
2.3.1.2	Einfluss der Hyperthermie auf die Sekretion von Amylase und Lipase	35
2.3.1.3	Einfluss der Hyperthermie auf frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung	40
2.3.2	Hormonelle Präkonditionierung mit ANP – Effekte auf die akute experimentelle Pankreatitis	42
2.3.2.1	Einfluss von ANP auf cGMP-Spiegel	43
2.3.2.2	Einfluss von ANP auf den mittleren arteriellen Druck	44
2.3.2.3	Einfluss von ANP auf die akute experimentelle Pankreatitis	45

2.3.2.3.1	Ermittlung der nötigen Caerulein- Dosierung für die Induktion einer experimentellen Pankreatitis	46
2.3.2.3.2	Einfluss der ANP Präkonditionierung auf die Pankreatitisparameter	50
2.3.2.3.3	Induktion von HSP70 durch ANP	55
2.3.3	Generierung transgener Mäuse – selektive Überexpression von HSP70 im Pankreas	56
2.3.3.1	Zusammenbau des Plasmids	57
2.3.3.2	Herstellung von Kopienstandards für die PCR Genotypisierung	59
2.3.3.3	Ergebnis der Mikroinjektion – HSP70 Founder	61
2.3.3.4	Analyse der HSP70 Expression im Pankreas im Western Blot	62
3	Diskussion	64
3.1	Hyperthermie-Präkonditionierung - Einfluss der Hyperthermie auf das Verhalten isolierter Azinuszellen	64
3.2	Hormonelle Präkonditionierung mit ANP	69
3.2.1	Einfluß von ANP auf cGMP-Spiegel	70
3.2.2	Einfluß von ANP auf mittleren arteriellen Druck	71
3.2.3	Einfluß von ANP auf akute experimentelle Pankreatitis	71
3.2.3.1	Einfluss der ANP Präkonditionierung auf Pankreatitisparameter	72
3.2.3.2	Induktion von HSP70 durch ANP Präkonditionierung	73
3.3	Generierung einer transgenen Maus zur Untersuchung des protektiven Effekts von HSP70 auf die akute experimentelle Pankreatitis	74
4	Zusammenfassung	76
5	Methoden	78
5.1	Arbeiten mit Isolierten Azinuszellen	78
5.1.1	Gewinnung von Azinuszellen	78
5.1.2	Stimulation	78
5.1.2.1	Cholezystokinin	79
5.1.2.2	Atrial Natriuretisches Peptid	79
5.2	Präkonditionierung von Ratten mit Hyperthermie	80
5.3	Präkonditionierung von Ratten mit ANP	80
5.3.1	Anästhesie	80
5.3.2	Kontinuierliche ANP Infusion	81
5.3.3	Bestimmung der ANP Spiegel	81
5.3.4	Messung des mittleren Arteriendrucks	82
5.3.5	Induktion einer akuten experimentellen Pankreatitis	82
5.3.6	Biochemische Assays	83
5.3.6.1	Amylase	83
5.3.6.2	Lipase	84
5.3.6.3	Trypsin	85
5.3.6.4	Bestimmung des cGMP-Spiegels in Azinuszellen	86
5.3.6.5	Lactatdehydrogenase	86
5.3.7	Pankreasödem	87
5.4	Generierung einer Transgenen Maus	87
5.4.1	Herstellung des Konstrukts	87
5.4.2	Mikroinjektion	88
5.4.3	Aufzucht transgener Mauslinien	88
5.5	Western Blot	89
5.5.1	Probenbereitung	89

5.5.2	Quantitative Proteinbestimmung	89
5.5.3	Bereitung der Proben für die Elektrophorese	89
5.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	89
5.6	DNA-Isolierung	90
5.6.1	Verdau	90
5.6.2	Isolierung	90
5.6.3	Messung der DNA-Konzentration	90
5.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	91
5.7.1	Master-Mix und reaktionsbedingungen	91
5.7.1.1	PCR zum Nachweis von HSP70 aus mausschwanz DNA	91
5.7.2	Elektrophorese der amplifizierten Produkte	91
5.8	Histologische Untersuchungen	92
5.8.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	92
5.9	Statistik	92
6	Material	93
6.1	Chemikalien	93
6.2	Enzyme und Hormone	94
6.3	Reagenzien und Kits	95
6.3.1	Amylase/Lipase Bestimmung	95
6.3.2	ANP Bestimmung	95
6.3.3	LDH Bestimmung	95
6.3.4	PCR	95
6.3.5	Proteinbestimmung	95
6.3.6	cGMP Bestimmung	95
6.3.7	Western Blot	95
6.4	Geräte und Materialien	96
6.5	Tiere	97
6.6	Lösungen und Puffer	97
6.6.1	DNA-Isolierung	97
6.6.2	Agarose-Gelelektrophorese	97
6.6.3	SDS-Probenaufbereitung/Western Blot	98
6.6.4	Trypsin-Bestimmung	99
6.6.5	Azinus-Zellisolierung	100
6.6.6	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	101
6.7	DNA und Molekulargewichtsstandards	101
6.8	Oligonukleotide	101
6.8.1	PCR - DNA	101
	Ela-HSP70	101
	HSP70-hGH	101
6.9	Antikörper und Proteine	101
6.10	Vektor	102
6.11	Bakterienstämme	102
7	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	103
8	Literaturverzeichnis	107
9	Danksagung	125
10	Lebenslauf	126

1 EINLEITUNG

1.1 GEGENSTAND DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Die akute Pankreatitis ist in den Industrieländern eine relativ häufig vorkommende Erkrankung des Pankreas mit einer Inzidenz von 20-100 Fällen pro 100.000 Menschen jährlich (Göke, 1999). Das Ursachenspektrum ist breit gefächert. Die häufigsten Ursachen stellen Alkoholabusus und Gallensteine dar. Der Krankheitsverlauf ist in mehr als $\frac{3}{4}$ der Fälle mild und selbstlimitierend. In etwa 20-30 % der Fälle kommt es zu einem schweren Verlauf mit systemischen Komplikationen, die nicht selten zu einem letalen Ausgang führen (Nam und Murthy, 2003). Das Verständnis der Pathophysiologie der Pankreatitis hat durch neuere Forschungsergebnisse der letzten Jahre bedeutend zugenommen. Dennoch gibt es bislang keine Möglichkeit, den Verlauf einer Pankreatitis vorherzusagen und es steht auch keine kausale Therapie zur Verfügung. Im Vordergrund der Therapie stehen daher rein symptomatische Ansätze wie Schmerz- und Volumentherapie sowie die Therapie von Komplikationen.

Die Arbeitsgruppe Pankreas der Medizinischen Klinik II setzt sich daher mit der Untersuchung der Stressreaktion des Pankreas auseinander, mit dem Ziel, durch die Charakterisierung der Stressreaktion des Pankreas weiterführende Erkenntnisse zum Verständnis der Pathophysiologie der Pankreatitis und damit Ansatzpunkte für eine adäquate Therapie zu erarbeiten. Durch die eingehende Untersuchung der Stressreaktion konnte bereits aufgedeckt werden, dass Hitzeschockproteine im Tiermodell gegen eine Pankreatitis protektiv wirken. Neben der Untersuchung von HSP27 und HSP32, die nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, steht besonders die Bedeutung von HSP70 im Vordergrund der wissenschaftlichen Tätigkeit der Arbeitsgruppe. Zum einen sollte die Bedeutung von HSP70 für die Stressreaktion und Protektion des Pankreas weiter untersucht werden. Zum anderen stand aber auch der Versuch im Vordergrund, Methoden zu entwickeln, mit denen es möglich ist, die Expression von HSP70 im Pankreas gezielt zu steigern. Hierzu wurde neben der Hyperthermie auch ein pharmakologischer Ansatz, die Stimulierung mit ANP, gewählt, da dieser bereits in Modellen isoliert perfundierter Lebern angewendet wurde. Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit sind inzwischen publiziert (Ploessl *et al.*, 2004), haben aber gezeigt, dass sich dieser Ansatz nicht von der Leber auf das Pankreas übertragen lässt.

In einem Nebenprojekt wurde außerdem versucht, durch die Generierung transgener Mäuse mit Überexpression von HSP70 im Pankreas ein Modell zu erzeugen, das es ermöglicht, die Funktion und Bedeutung von HSP70 bei der Stressantwort und Protektion im Pankreas

definitiv zu beweisen. Allerdings konnte bei den transgenen Mäusen trotz erfolgreicher Geninkorporation keine HSP70 Expression auf Proteinebene erreicht werden.

1.2 PHYSIOLOGIE DES PANKREAS

Das Pankreas ist ein zentrales Organ für die Verdauung und die Regulation des Blutzuckers. Es liegt unterhalb der Leber und ist durch einen Ausführungsgang direkt mit dem Duodenum verbunden. Das Pankreas lässt sich funktional in zwei Einheiten unterteilen: den exokrinen Teil, dessen funktionelle Untereinheit die Azinuszellen sind und den endokrinen Teil, der inselartig in den exokrinen Teil eingelagert ist und deshalb auch als Inselorgan bezeichnet wird. Der endokrine Teil ist essentiell an der Regulation des Blutzuckers beteiligt. In verschiedenen Zelltypen werden dafür Hormone gebildet und in die Blutbahn abgegeben. A-Zellen produzieren Glucagon, das bei niedriger Blutzuckerkonzentration ausgeschüttet wird und einen Abbau von Glycogen zu Glucose in der Leber und damit eine Erhöhung des Blutzuckers bewirkt. Der Gegenspieler dazu ist das Insulin, das bei hohen Blutzuckerkonzentrationen ausgeschüttet wird und eine Aufnahme von Glucose aus dem Blut in die Zellen bewirkt. Für die vorliegende Arbeit ist der endokrine Anteil des Pankreas nicht von Bedeutung.

Das exokrine Pankreas ist zuständig für die Synthese von Verdauungsenzymen und für die Sekretion des Verdauungssaftes in das Duodenum. Dieser Saft setzt sich aus einer Vielzahl an Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Lipid- abbauenden Enzymen sowie Bicarbonat, das für die Neutralisation des sauren Magensafts zuständig ist, zusammen.

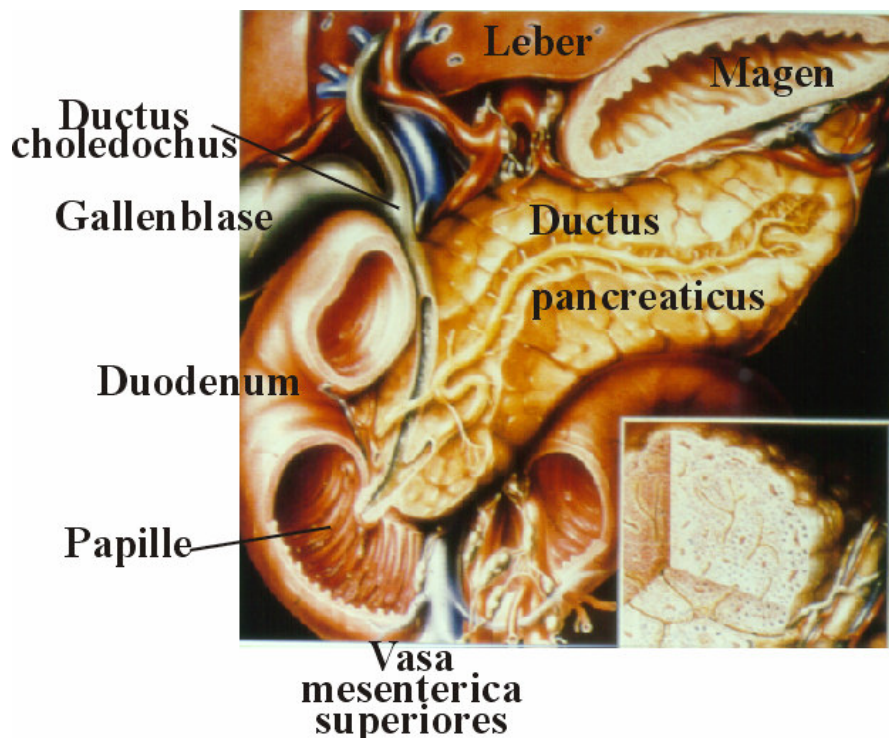


Bild 1.1: Anatomie und Lage des Pankreas**1.2.1 ANATOMIE**

1.2.1.1 MAKROSKOPISCHE ANATOMIE

Das Pankreas gliedert sich anatomisch in drei Abschnitte: den Pankreaskopf, der in der Duodenalschleife liegt, den Pankreaskörper, der in der Höhe der ersten beiden Lendenwirbel die Wirbelsäule überquert und den Pankreasschwanz, der sich von der linken Niere bis zum Milzhilus erstreckt. Das gesamte Organ wird in seiner Länge von einem Ausführungsgang durchquert, der mit dem Gallengang, der ein kleines Stück im Pankreaskopf verläuft, gemeinsam in das Duodenum mündet.

1.2.1.2 MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

Der sekretorische Teil stellt die Hauptmasse des Organs dar. Das Pankreas setzt sich aus vielen größeren Lappen zusammen. Diese Lappen wiederum sind aus kleineren Läppchen zusammengesetzt, die mehrere Gangverzweigungen enthalten, an deren Enden sich beerenförmige Drüsenendstücke, die sogenannten Azinuszellen angliedern (s. Bild 1.2.). Die Verbindung zwischen den Azini und den Ausführungsgängen bilden die Schaltstückzellen, die in die einzelnen Azinusgruppen eingestülpt erscheinen. Diese Schaltstückzellen, auch zentroazinäre Zellen genannt, sind charakteristisch für den exokrinen Teil des Pankreas. Die Langerhans Zellen, die den endokrinen Anteil des Pankreas darstellen liegen inmitten dieser Läppchen.



Bild 1.2: beerenförmig angeordnete Azinuszelle mit Schaltstückzellen und Ausführungsgang

1.2.2 HORMONREGULIERTE SEKRETION

Die Hauptfunktion der pankreatischen Azinuszellen ist die Synthese, Speicherung und Sekretion von Verdauungsenzymen (Thews *et al.*, 1999). Die Verdauungsenzyme bzw. Proenzyme werden im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und von dort zum Golgi-Apparat transportiert und in sogenannten Zymogengranula gespeichert, die membranumgebene Speicherorganellen darstellen. Hormone wie Cholezystokinin oder Sekretin und der Neurotransmitter Acetylcholin bewirken eine Fusion der Zymogengranulamembran mit der apikalen Plasmamembran der Azinuszelle, wodurch es schließlich zur Exozytose der Verdauungsenzyme in die Pankreasgänge kommt.

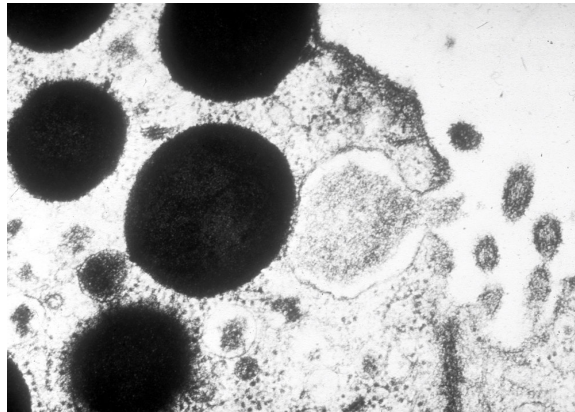


Bild 1.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Azinuszelle mit deutlich erkennbaren fusionierten Granula

Die Sekretion der Verdauungsenzyme erfolgt nach Stimulation von spezifischen Rezeptoren, die an der basolateralen Membran der Azinuszelle lokalisiert sind und durch Hormone wie z.B. Acetylcholin oder CCK stimuliert werden. Für die Induktion der experimentellen Pankreatitis bei Tieren wird häufig das CCK-Analogon Caerulein verwendet. Beim Menschen werden die CCK-Effekte überwiegend über neuronale Einflüsse vermittelt. Es gibt Hinweise darauf, dass beim Menschen ein erheblicher Anteil der CCK-Rezeptoren nicht auf Azinuszellen, sondern auf präsynaptischen cholinergen Neuronen lokalisiert ist. Bei der exogenen Gabe von CCK ist hier die stimulierte exokrine Pankreassekretion durch Atropin blockierbar (Niederau *et al.*, 1994; Adler *et al.*, 1991; You *et al.*, 1988).

Der CCK Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit 7 transmembranösen Domänen. Wird der Rezeptor durch CCK stimuliert kommt es zu einer Aktivierung von Phospholipase C. Phospholipase C bedingt daraufhin die Hydrolyse von

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol (DAG). Dies erfolgt innerhalb von Sekunden als Antwort auf eine physiologische Konzentration an Sekretagoga.

IP₃ führt zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, während DAG die Proteinkinase C aktiviert.

Dies führt zu einer Aktivierung von diversen Kinasen und Phosphatasen und dadurch zu einer Änderung des Phosphorylierungszustands von Struktur- und Regulatorproteinen. Schließlich kommt es zur Fusion von Zymogengranula mit der apikalen Plasmamembran und zur Exozytose (Williams, Blevins, 1993; Williams, 1995; Williams *et al.*, 1997,)

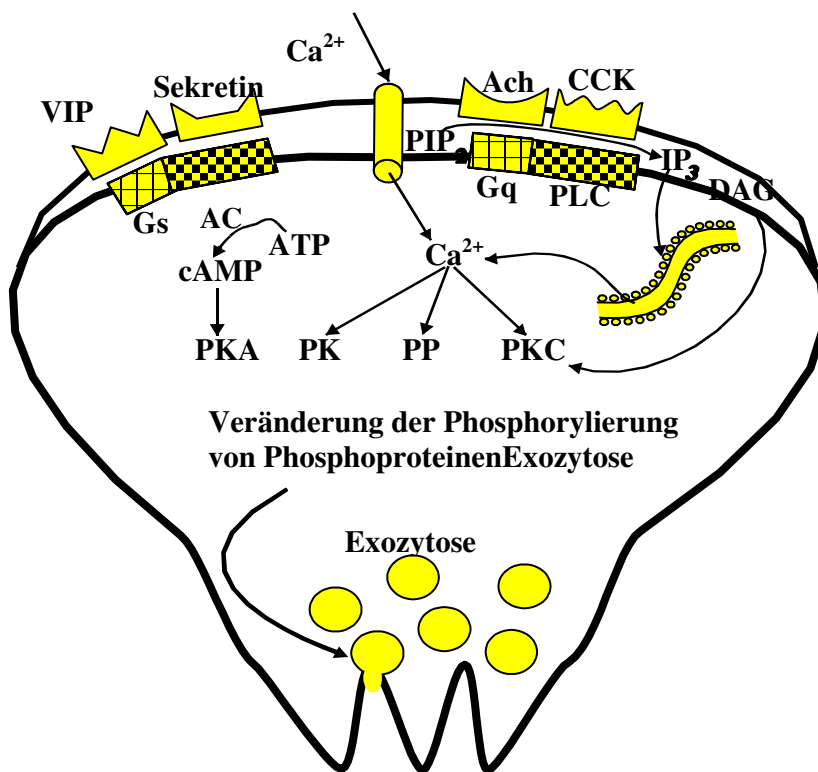


Bild 1.4: Stimulus-Secretion-Coupling in Azinuszellen.

Die Bindung von Hormonen oder Neurotransmittern an ihre entsprechenden Rezeptoren führt zu einer Aktivierung G-Protein gekoppelter second messengers. Daraus resultiert eine Aktivierung verschiedener Kinasen und Phosphatasen und eine Änderung des Phosphorylierungszustands verschiedener Regulatorproteine. AC = Adenylatcyclase; PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLC = Phospholipase C; PK = Proteinkinase; IP₃ = Inositol-1,4,5-trisphosphat; PP = Proteinphosphatase; DAG = Diacylglycerol; VIP = Vasoaktives intestinales Peptid

1.3 AKUTE PANKREATITIS

Bei der akuten Pankreatitis handelt es sich um eine plötzlich auftretende entzündliche Erkrankung des Pankreas mit, je nach Schweregrad, lokalen und systemischen Komplikationen. Diese bedingen bei der milden Verlaufsform interstitielle Ödeme. Bei der schweren Verlaufsform kommt es zu ausgedehnten peri- und intrapancreatischen Fettgewebsnekrosen sowie Parenchymnekrosen bis hin zu schweren hämorrhagisch-nekrotisierenden Entzündungen. Die Mehrheit der Patienten entwickelt eine milde Verlaufsform der akuten Pankreatitis, bei 15-30% jedoch bildet sich eine schwere Verlaufsform aus, die in 20-30 % der Fälle einen letalen Ausgang hat (Nam und Murthy 2003).

In der zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Opie aufgestellten klassischen Hypothese wird der Gallenreflux in den Ductus wirsungianus und damit verbunden ein direkter toxischer Effekt der Galle auf Pankreasgang und Azinuszellen als Ursache für die Pankreatitis angenommen. Diese These stützt sich auf die Autopsiebefunde von zwei an Pankreatitis verstorbenen Patienten, bei denen Gallensteine die Papilla major verschlossen. Allerdings findet sich bei weniger als 20% der Bevölkerung ein gemeinsamer Ausführungsgang von Pankreas- und Gallenwegen, der lange genug wäre, einen Gallenreflux im Falle einer Okklusion der Papilla zu gestatten (Opie EL, 1901; Opie EL, 1901).

In den letzten Jahren hat sich ein Konzept der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis etabliert, das drei wichtige Phänomene in der Frühphase der akuten Pankreatitis definiert. Diese umfassen die sekretorische Blockade, eine frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung und die Bildung von Entzündungsmediatoren (siehe 1.3.2, 1.3.2.1-1.3.2.3). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, dass neben der Schädigung auf azinärer Ebene als „first hit“, die Ausprägung des Schweregrades der akuten Pankreatitis von weiteren Faktoren („second hit“) abhängt.

1.3.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE

Die akute Pankreatitis ist eine besonders in der industrialisierten Welt relativ weit verbreitete Erkrankung und tritt mit einer Inzidenz von 20-100 Fällen pro 100.000 Menschen jährlich auf (Göke, 1999). Neuere epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass die Inzidenz für eine akute Pankreatitis steigt. Dieser Anstieg ist möglicherweise auf den steigenden Alkoholkonsum und bessere diagnostische Möglichkeiten zurückzuführen. Während die milde akute Pankreatitis selbstlimitierend und ereignislos ausheilt, beträgt die Letalität bei der schweren Verlaufsform immer noch 20-30% (Nam und Murthy 2003).

Ätiologisch findet sich bei ca. 80% der Patienten entweder ein eingeklemmter Gallenstein oder ein chronischer Alkoholabusus. Bei 10 % spielen u.a. Schock, Trauma, iatrogene Ursa-

chen, bestimmte Medikamente und Toxine, Hyperlipidämie eine Rolle und bei weiteren 10% liegt eine idiopathische Pankreatitis vor. (siehe Tabelle)

häufig	gelegentlich	sehr selten
Gallensteine	Pankreas divisum	Virale Infektionen
Alkoholabusus	Pankreastumore	Mumps
Medikamente	Vaskulitis	HIV
Idiopathisch	Hereditär	Askariasis
Trauma, Schock	SPINK	Vergiftung
ERCP induziert	CFTR	Skorpionbiss
	Postoperativ	Hyperlipidämie
	Spinkter Oddi Dysfunktion	Hyperkalziämie

Tabelle 1: Ätiologie der akuten Pankreatitis

Angeführt sind die bekanntesten und nachgewiesenen Faktoren und Ursachen, die zu einer akuten Pankreatitis führen können (aus Nam und Murthy, 2003).

1.3.2 PATHOPHYSIOLOGISCHE VORGÄNGE IN DER FRÜHPHASE

Trotz guter Fortschritte in der letzten Zeit sind die pathophysiologischen Vorgänge bei der akuten Pankreatitis bis heute noch nicht genau genug erforscht und verstanden. Allerdings hat sich in den letzten Jahren ein Konzept für die pathophysiologischen Vorgänge etabliert, welches für die Frühphase der akuten Pankreatitis drei entscheidende Phänomene definiert (Steer, 1997; Grendell, 1997). So wurde postuliert, dass es am Beginn einer akuten Pankreatitis zur sekretorischen Blockade (Saluja *et al.*, 1999), zur frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung (Saluja *et al.*, 1999; Hofbauer *et al.*, 1998; Saluja *et al.*, 1997) und letztlich durch die Bildung proinflammatorischer Mediatoren zu einer immunologischen Antwort (Brady *et al.*, 1999; Grady *et al.*, 1997) auf die pathophysiologischen Vorgänge kommt.

1.3.2.1 SEKRETORISCHE BLOCKADE

Die sekretorische Blockade zu Beginn der Entstehung einer akuten Pankreatitis ist ein schon seit längerem bekanntes Phänomen. Darunter versteht man, dass die Sekretionsantwort nach Stimulation mit bestimmten Sekretagoga, wie zum Beispiel Cholezystokinin, einem biphasischen Verlauf folgt. Nach Erreichen der maximal wirksamen Dosis kommt es bei Hyperstimulation zu einer Hemmung der Sekretion von Verdauungsenzymen. Die Synthese der Verdauungsenzyme in der Azinuszelle erfolgt aber weiterhin, so dass die neu synthetisierten Enzyme in der Drüse akkumulieren (Steer ML. 1997). Als Ursache für die sekretorische

Blockade wird diskutiert, dass es infolge der Pankreatitis zu einer Zerstörung des Aktinzytoskeletts an der basolateralen Zellmembran der Azinuszelle kommt und damit der Transport der Verdauungsenzyme aus der Zelle heraus unterbrochen ist.

1.3.2.2 FRÜHZEITIGE INTRAZELLULÄRE TRYPSINOGENAKTIVIERUNG

Ein weiteres bedeutendes Ereignis in der Frühphase ist die frühzeitige, intrazelluläre Aktivierung von Verdauungsenzymen, insbesondere die von Trypsinogen zu Trypsin. Es ist bis heute noch nicht definitiv geklärt, welcher Mechanismus hinter dieser frühzeitigen intrazellulären Aktivierung steckt.

Das Pankreas besitzt normalerweise ausreichende Schutzmechanismen gegen eine mögliche Selbstverdauung durch Verdauungsenzyme. Zum einen werden die meisten Enzyme in Form von inaktiven Pro-Enzymen (Zymogene) synthetisiert und in Zymogengranula gespeichert. Die Aktivierung der Verdauungsenzyme erfolgt normalerweise erst im Duodenum. Trypsinogen wird von der Enterokinase des Dünndarmepithels durch Abspaltung eines Peptides zu Trypsin aktiviert. Trypsin aktiviert dann die übrigen Proenzyme (Proteolytische Kaskade). Unter physiologischen Bedingungen liegt zwar ein geringer Anteil aktiven Trypsins in der Azinuszelle vor, aber eine Vielzahl von Schutzmechanismen verhindert eine Zellschädigung durch Trypsin. Die protektiven Mechanismen in den Zymogengranula beinhalten zum einen das Vorliegen großer Mengen an Trypsininhibitor (SPINK, serine protease inhibitor type KAZAL I), einen sauren pH-Wert in den Zymogengranula, der weit unterhalb des pH-Optimums der meisten proteolytischen Enzyme liegt und das Vorliegen von Proteasen wie z.B. Mesotrypsin, die in der Lage sind schon vorhandene aktive Enzyme zu degradieren (Lerch M.M. und Gorelick F.S. 2000). Jedoch kann eine frühzeitige Aktivierung großer Mengen Trypsins diese protektiven Schutzvorkehrungen überwinden. Diese Aktivierung kann zu einer Schädigung der Zymogengranulamembran führen und bedingt dadurch eine Freisetzung der aktivierten Enzyme in das Cytosol (Lerch *et al.*, 2000).

Die Vorstellung, dass die Aktivierung der Zymogene durch frühzeitig aktiviertes Trypsin eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der akuten Pankreatitis spielt, begründet sich auf folgende Beobachtungen. Bei der experimentellen Pankreatitis kommt es früh zu einem Anstieg der Trypsin- und Elastase- Aktivität (Luthen *et al.*, 1995; Bialek *et al.*, 1991; Lerch *et al.*, 2000).

Im Serum lassen sich sehr früh Trypsinogen activated peptide (TAP) und Carboxypeptidase A₁ (PCA₁) nachweisen, die von dem entsprechenden Proenzym durch den Aktivierungsprozess abgespalten werden (Schmidt J *et al.*, 1992).

Der Einsatz von Serin-Protease-Inhibitoren reduziert den Schweregrad der experimentellen Pankreatitis (Lasson *et al.*, 1984; Niederau *et al.*, 1985). Allerdings bestätigte sich diese

Beobachtung nicht in der klinischen Praxis. Hier zeigte sich keine positive Beeinflussung des Verlaufs der akuten Pankreatitis durch den Einsatz von Serin-Protease-Inhibitoren (Buchler *et al.*; 1993).

Ein weiterer Beweis für die zentrale Rolle der frühzeitigen Trypsinaktivierung findet sich bei der hereditären Form der Pankreatitis. Die Ursachen der hereditären Pankreatitis sind Mutationen im Gen des kationischen Trypsingens. Dabei wird vermutet, dass eine der bekannten Mutationen (Arg117His) zum Verlust einer putativen Schnittstelle im Trypsin führt, so dass frühzeitig intrazellulär aktiviertes Trypsin nicht mehr durch Proteasen abgebaut werden kann und somit die Aktivierung weitere Verdauungsenzyme bereits intrazellulär erfolgen kann (Grendell J.H. 1997; Whitcomb *et al.*, 1996)). Eine weitere Mutation (Asp21Iso) führt dagegen möglicherweise zu einer verstärkten Aktivität des Trypsins im sauren Milieu, was eine gesteigerte Aktivität in den Zymogengranula erklären könnte (Teich *et al.*, 1998; Keim *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen beweisen, dass Trypsinmutationen ausreichend für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis sein können. Auch Mutationen im SPINK Gen können mit einem erhöhten Risiko einer chronischen Pankreatitis einhergehen. Dies scheint auch eine Rolle bei der tropischen Pankreatitis zu spielen (Whitcomb D.C.2002, Witt H. 2002, Keim V. 2002).

Wie es allerdings zur intrazellulären Trypsinaktivierung kommt ist noch unklar. Es gibt zwei dominierende Hypothesen die diskutiert werden. Die eine Hypothese besagt, dass es zu einer Autoaktivierung von Trypsinogen zu Trypsin kommt. Mit Hilfe von Experimenten unter Einsatz eines zellpermeablen, hochspezifischen und reversiblen Trypsininhibitors S124 konnte diese Hypothese widerlegt werden (Halangk *et al.*, 2001). Die zweite und bedeutendere Hypothese postuliert, dass es im Zusammenhang mit der Störung der Sekretion zu einer Colokalisation von Zymogengranula und Lysosomen kommt. In Folge soll die lysosomale Protease Cathepsin B durch proteolytische Spaltung Trypsinogen zu Trypsin aktivieren und so die gesamte proteolytische Kaskade in Gang setzen (Steer *et al.*, 1987; Niederau *et al.*, 1988). Arbeiten der letzten Jahre haben sich intensiv mit dieser Hypothese beschäftigt. Dabei konnte zum einen an isolierten Azinuszellen und im in vivo Modell der akuten experimentellen Pankreatitis gezeigt werden, dass der zellpermeable Cathepsin B Inhibitor CA-074me die Caerulein-induzierte Aktivierung von Trypsin komplett hemmen kann (Teich *et al.*, 1998; Keim *et al.*, 1999). Um diese Hypothese eindeutig beweisen zu können wurden Cathepsin B *-/-* knock-out Mäuse generiert. Experimente mit diesen knock-out Tieren zeigten, dass die Caerulein induzierte, intrazelluläre Trypsinaktivierung bei diesen Mäusen um bis zu 90% reduziert, gegenüber Wildtypmäusen, aber nicht gänzlich verschwunden ist. Damit

wird die Pankreatitis nur lokal abgeschwächt, aber nicht verhindert. Auch die systemischen Auswirkungen zum Beispiel auf die Lunge sind nicht verändert (Halangk *et al.*, 2000). Somit bleibt weiter unklar welche Rolle Cathepsin B spielt. Des Weiteren ist diese Colokalisationshypothese nicht uniform akzeptiert, sondern es gibt im Gegenteil eine Reihe von Daten, die ihre Bedeutung in Zweifel stellen. Elektronenmikroskopisch konnte mittels Immunogold-Markierung gezeigt werden, dass Cathepsin B und Verdauungsenzyme auch in gesundem Pankreasgewebe teilweise in den gleichen Organellen vorkommen (Willemer *et al.*, 1990). Außerdem konnte eine Colokalisation lysosomaler und sekretorischer Verdauungsenzyme auch nach Stimulation mit Bombesin, das keine Pankreatitis auslöst, beobachtet werden (Grady *et al.*, 1996). Durch Bombesin kommt es auch zu einer Trypsinaktivierung, deren Ausmaß mit der durch Caerulein vergleichbar ist. Des Weiteren hat der Einsatz von Trypsin- und Proteaseinhibitoren den klinischen Verlauf einer akuten Pankreatitis nicht positiv beeinflussen können im Gegensatz zu den experimentell gemachten Beobachtungen (Buchler *et al.*, 1993; Lasso *et al.*, 1984; Niederau *et al.*, 1985).

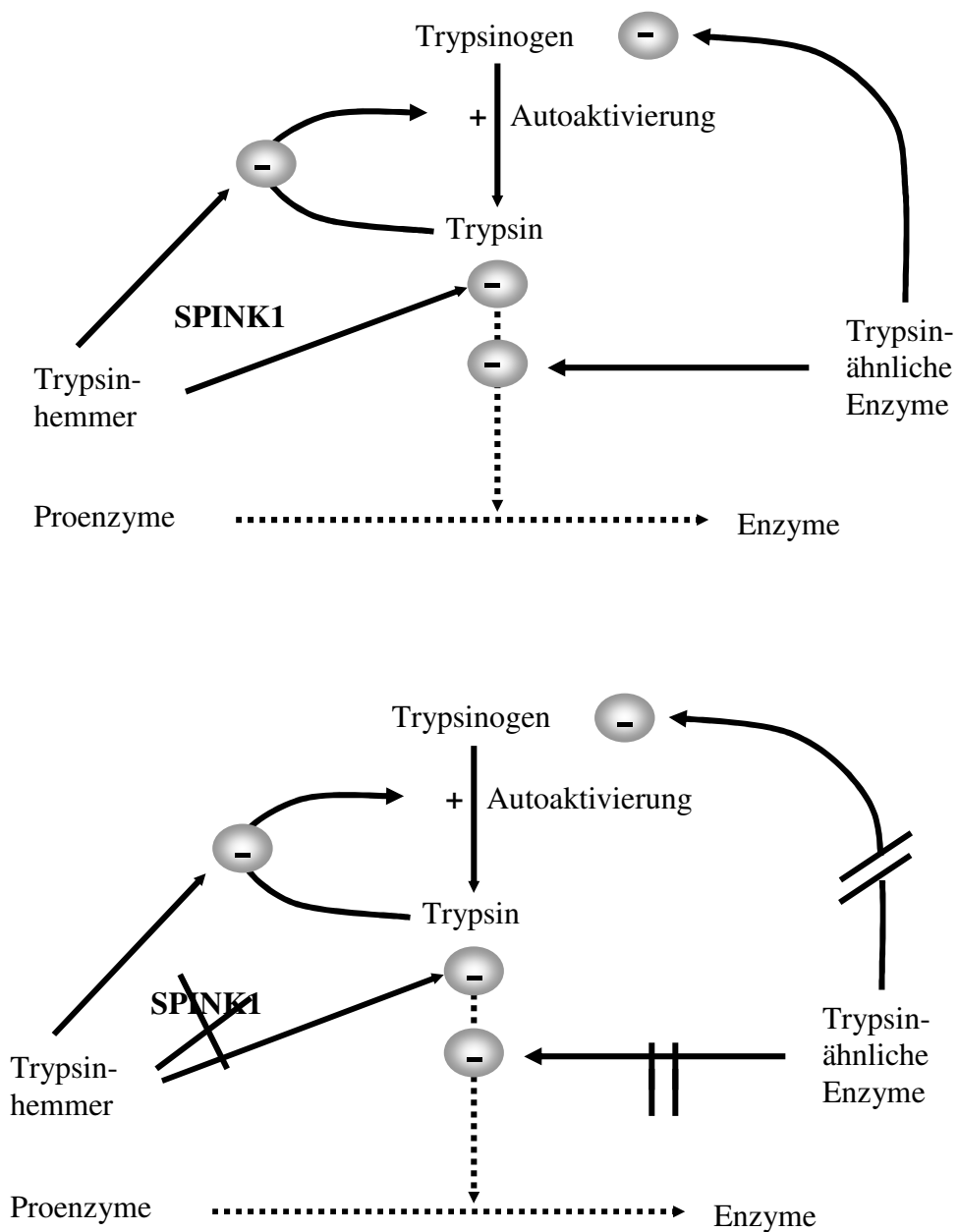


Bild 1.5: Oben: Modell der intrazellulären Mechanismen gegen frühzeitige Trypsinaktivierung (nach Grendell 1997). Unten: Mutationen im Trypsinogen bewirken einen verringerten Abbau durch Mesotrypsin bzw. stärkere Aktivierung bei niedrigem pH. Mutationen im SPINK Gen können die trypsinhemmende Aktivität reduzieren.

1.3.2.3 IMMUNOLOGISCHE REAKTION

Der Schweregrad einer akuten Pankreatitis wird nicht nur von der lokalen Schädigung des Pankreas mit sekretorischer Blockade und frühzeitiger intrazellulärer Aktivierung von Verdauungsenzymen bestimmt, sondern vielmehr hängt der Schweregrad der Pankreatitis ganz entscheidend von der im Rahmen der Pankreatitis ablaufenden, immunologischen Reaktion ab. Seit längerem ist bekannt, dass es im Verlauf der akuten Pankreatitis zu einer systemischen Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten kommt. Diese bedingen nicht nur im Pankreas, sondern auch in anderen Organen wie beispielsweise in der Lunge eine entzündliche Reaktion (Norman *et al.*, 1995). Dementsprechend kommt es in Folge der Pankreatitis zu einer Erhöhung diverser entzündlicher Zytokine, wie TNF α (Hughes und Henry *et al.*, 1995; Hughes und Gaber *et al.*, 1995), IL-1 β (Fink *et al.*, 1997), IL-6 (Gross *et al.*, 1993; Leser *et al.*, 1991; Heath *et al.*, 1993; Viedma *et al.*, 1992) oder PAF (Kald B *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1993) im Serum. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Azinuszellen nicht nur selbst auf Zytokine reagieren, sondern diese im Rahmen der Stressantwort bei der akuten Pankreatitis auch selbst produzieren können (Gukovskaya A.S. *et al.*, 1997). Darüber hinaus können Azinuszellen auch chemotaktisch wirksame Chemokine als Stressantwort synthetisieren (Luster A.D. 1998). Somit ist die Bauchspeicheldrüse aktiv an der Orchestrierung der entzündlichen Reaktion im Rahmen der Pankreatitis durch Chemokin-vermittelte Anreicherung des Pankreasgewebes mit weißen Blutzellen, sowie deren Aktivierung durch Zytokine beteiligt.

1.4 HITZESCHOCKPROTEINE

Unter dem Begriff Hitzeschockproteine versteht man Proteine, deren Synthese in einer Vielzahl von Zelltypen und Organismen unter Hitzeschockbedingungen induziert oder hochreguliert wird (Lindquist 1986; Lindquist und Craig, 1988; Nover 1991). Der Ausdruck selbst ist historisch bedingt. Die meisten dieser Proteine liegen bereits konstitutiv im Organismus vor oder werden in bestimmten Entwicklungs- oder Zellzyklusphasen synthetisiert. Sie üben dabei essentielle Funktionen in den Zellen aus (Hartl 1996; Welch 1992; Becker und Craig 1993; Ellis 1991; Wynn *et al.*, 1994).

Hitzeschockproteine sind eine Gruppe strukturell nicht verwandter Proteine, deren Einteilung in die einzelnen Familien nach ihrem Molekulargewicht erfolgt (Tabelle).

Familie	Mitglieder	Lokalisation	Funktion
Small HSPs	Ubiquitin	Cytosol/Zellkern	Beteiligt am nichtlysosomalen Abbau von Proteinen Co-Chaperon von HSP60
	HSP10 HSP27	Mitochondrien Cytosol/Zellkern	Stabilisieren Mikrofilamente, Regulation des Aktinzytoskellets
	HSP32	Cytosol	Auch als Heme-oxygenase-1 bezeichnet, antioxidative Eigenschaften
HSP40 HSP60 (Chaperonin)	HSP40	Cytosol/Zellkern	Co-Chaperon von HSP70
	HSP60	Mitochondrien	Bindet an naszierende Polypeptidkette und ist beteiligt an der korrekten Faltung
HSP70	TCP	Cytosol	Spezifisches Substrat von Aktin und Tubulin
	HSP72 (HSP70) HSP73 (HSC70) GRP75	Cytosol/Zellkern Cytosol/Zellkern Mitochondrien	Stressinduzierbare Form Konstitutive Form Beteiligt an der Translokation von ungefalteten Proteinen durch Mitochondrienmembranen
	GRP78	Endoplasmatisches Retikulum	Zusammenbau von Proteine beteiligt
HSP90	HSP90 α HSP90 β GRP94	Cytosol } Cytosol } Endoplasmatisches Retikulum	Beteiligt an Regulation von Steroidhormonrezeptoren Calcium-bindendes Chaperon
HSP100	HSP100	Cytosol/Zellkern	Beteiligt an der Auflösung von Aggregaten, erleichtert Proteolyse und Thermotoleranz

Table 1: Übersicht über die bekanntesten und wichtigsten Hitzeschockprotein-Familien (in Anlehnung an Rakonczay *et al.*, 2003)

1.4.1 EINFÜHRUNG

Alle Organismen sind wechselnden Umweltbedingungen, das heißt Schwankungen einer Reihe von abiotischen und biotischen Faktoren ausgesetzt. Häufig haben derartige Situationen, die eine Abweichung von einem relativ eng begrenzten Optimum darstellen, eine veränderte Genexpression zur Folge, die eine Vielzahl von Anpassungs- oder Abwehrreaktionen bewirkt. Reaktionen auf potentiell schädliche Einflüsse werden generell als Stressreaktion bezeichnet.

Der deutsche Pflanzenphysiologe Julius Sachs veröffentlichte schon 1864 seine Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzen unter Einfluss hoher Temperaturen. Ritossa beobachtete 1962 bei *Drosophila*-Larven dramatische Veränderungen in den „Puff“-Mustern ihrer polytenen Riesenchromosomen und eine veränderte Genexpression nach Hitzeschock oder der Gabe von 2,4-Dinitro-Phenol.

Eine bedeutende Klasse von Stressproteinen wurde aufgrund ihrer gesteigerten Expression nach Hitzeeinwirkung entdeckt und als Hitzeschockproteine (HSPs) bezeichnet (Lindquist, 1986). Die Expression dieser Proteine kann aber auch durch nahezu jede andere Art von Stress induziert werden (mechanischer Stress, oxidativer Stress, toxisch/metabolischer Stress, Hyperosmolarität, UV-Bestrahlung etc). HSPs werden ubiquitär exprimiert. HSPs sind aber nicht nur für die pathophysiologische Stressreaktion wichtig, sondern erfüllen auch zahlreiche physiologische Funktionen. HSP60 und HSP70 wirken zum Beispiel zusammen, um entstehenden Peptiden bei der Translation die Einnahme ihrer korrekten Tertiärstruktur zu ermöglichen und werden deshalb auch als Chaperone bezeichnet.

Zusätzlich zu ihrer Funktion als Teil der akuten, zellulären Antwort auf Stress, führt die gesteigerte Expression von HSPs auch zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber nachfolgenden Stressereignissen.

1.4.2 STRUKTUR UND FUNKTION VON HSP70

Die HSP70-Familie ist die größte und derzeit am besten untersuchte Familie aller Stressproteine mit der am höchsten konservierten Struktur.

HSP70 kommt in einer Vielzahl von Zellkompartimenten, wie Mitochondrien, Cytosol und dem Endoplasmatischen Retikulum vor (Nover, 1991).

HSP70 sind Adenosintriphosphatasen, die aus einer hochkonservierten nucleotidbindenden aminoterminalen Domäne mit einer hohen Affinität zu Adenosin-5'-triphosphat (ATP) bestehen und einer carboxyterminalen Domäne, die zu Interaktionen mit verschiedenen

Proteinstrukturen befähigt ist. Der aminoternale Bereich besteht aus 385 und der carboxyterminale Bereich aus 145 Aminosäuren (Becker und Craig, 1994; Ellis, 1990). Neben einer konstitutiv exprimierten Isoform, HSC70, gibt es eine nur unter Stressbedingungen exprimierte Isoform, welche als HSP72 oder HSP70, wie in dieser Arbeit, bezeichnet wird. Für beide stehen spezifische Antikörper zur Verfügung, wobei im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich die induzierbare Form untersucht wurde.

Funktion im ungestressten Zustand

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass HSPs an der korrekten Faltung der Tertiärstruktur und der Stabilisierung von partiell denaturierten und naszierenden Proteinen beteiligt sind. Des Weiteren sind HSP zuständig für den Transport von Proteinen durch Membranen und für den Zusammenbau von Proteinstrukturen. Aus diesem Grund werden HSPs auch als Molekulare Chaperone bezeichnet. Die Aufgabe der Molekulare Chaperone ist es, Interaktionen zwischen partiell denaturierten Proteinen und dabei besonders zwischen exponierten hydrophoben Bereichen zu verhindern, was ansonsten zur irreversiblen Inaktivierung durch Aggregatbildung führen würde (Hartl *et al.*, 1996; Mathew *et al.*, 1998).

HSP70 bindet dabei mit der carboxyterminalen Domäne Proteinsubstrate und ändert oder stabilisiert durch diese Bindung deren Konformation oder ermöglicht Interaktionen mit anderen Proteinen. Die Freisetzung der gebundenen Proteinsubstrate ist gekoppelt an die Hydrolyse von ATP (Hartl *et al.*, 1992).

Funktion im gestressten Zustand

Ein primärer Toxizitätsmechanismus, verursacht durch physikalische oder chemische Noxen, ist die Denaturierung von Proteinen. Bei der Denaturierung kommt es zur Schwächung polarer Bindungen, zum Aufbruch von Disulfidbrücken und dadurch zu einer Exposition von hydrophoben Molekülgruppen, die eine Missfaltung und Aggregation von Proteinen bedingt. Die Funktion von HSP70 im gestressten Zellzustand besteht darin, die Zellen vor proteotoxischen Schäden zu schützen. Um diese Aufgabe zu realisieren kommt es zu einer Hochregulation dieser induzierbaren Form.

HSP70 aus dem Cytoplasma wandert in den Zellkern und bindet an sogenannte Pre-Ribosomen und andere Proteinkomplexe, um sie vor Denaturierung zu schützen. Darüber hinaus verhindert HSP70 die Bildung unlöslicher Proteinaggregate, beziehungsweise ermöglicht ein Aufbrechen schon vorhandener Aggregate und führt damit geschädigte Proteine einer korrekten Wiederherstellung ihrer Faltung zu und der Erhaltung ihrer biologische Aktivität

(Ellis, 1990). Irreversibel geschädigte Proteine werden dagegen einem Abbau in den Lysosomen zugeführt.

Die Induktion von HSP70 hat aber nicht nur einen protektiven Effekt zum Zeitpunkt der Expression aufgrund einer einwirkenden Noxe, sondern sie führt auch zu einer erhöhten Toleranz gegenüber nachfolgenden Stressereignissen, die anschließend innerhalb eines begrenzten Zeitraumes auftreten, und die unter normalen Bedingungen, also ohne vorherige HSP70 Induktion, möglicherweise letale Folgen gehabt hätten. Durch geeignete Methoden der Präkonditionierung, z.B. subletale Hyperthermie, kann also eine erhöhte Resistenz gegenüber anderen Stressfaktoren erreicht werden, die in vielen Fällen mit dem Ausmaß der Induktion von HSPs korreliert.

1.4.3 GENETISCHE REGULATION DER HITZESCHOCKANTWORT

Die Regulation der Hitzeschockantwort erfolgt durch eine Aktivierung der Transkription. Der "heat-shock" Transkriptionsfaktor (HSF), welcher die Transkription z.B. von HSP70 reguliert, ist identifiziert. Zu seiner Aktivierung muss der HSF phosphoryliert werden. Drei Monomere müssen sich zu einem Trimer zusammenfügen und es muss eine Translokation aus dem Cytosol in den Zellkern erfolgen (Sarge KD 1993, Westwood JT 1993, Nieto-Sotelo 1990, Morimoto 1992). Sehr wahrscheinlich besteht eine negative Feedback-Regulation zwischen HSP70 und dem HSF. HSP70 bindet HSF und hemmt so seine transkriptionelle Aktivität. Stress bewirkt die Akkumulation denaturierter Proteine, an welche sich HSP70 bindet. Somit steht weniger HSP70 zur Hemmung der HSF-Aktivität zur Verfügung, was zu einer Derepression der HSP-Transkription führt.

1.4.4 ROLLE VON HSP70 BEI DER STRESSANTWORT

Zusätzlich zu seiner Funktion als Teil der akuten zellulären Antwort auf Stress, führt die gesteigerte Expression von HSP70 auch zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber nachfolgenden Stressereignissen. So konnte zum Beispiel am Rattenherzen gezeigt werden, dass eine Ischämie zur gesteigerten Expression von HSP70 führt (Currie *et al.*, 1987). Durch eine Präkonditionierung mit Hyperthermie kommt es ebenfalls zu einer Induktion der HSP70 Expression und als Folge zu einer Erhöhung der Toleranz isolierter Rattenherzen gegenüber Ischämie und zu einer Reduktion der Infarktgröße (Currie *et al.*, 1988; Currie *et al.*, 1993; Donnelly *et al.*, 1992). Der Umfang des protektiven Effekts korreliert dabei mit dem Ausmaß der HSP70 Expression. Es ist dieses protektive Potential, welches auch für uns von entscheidender Bedeutung ist. Die Bedeutung von Hitzeschockproteinen für die Stressreaktion des exokrinen Pankreas stellt daher seit einigen Jahren einen wesentlichen Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe dar.

So konnte bereits vor mehreren Jahren gezeigt werden, dass HSP70 auch in Azinuszellen durch Hyperthermie induzierbar ist (Wagner *et al.*, 1996; Strowski *et al.*, 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Verlauf einer experimentellen Pankreatitis durch Hyperthermie-Präkonditionierung mit einer Induktion von HSP70 zu einer deutlichen Abschwächung des Schweregrades der Pankreatitis führt. Bhagat *et al.* untersuchten den protektiven Effekt von HSP70 bei der Caerulein-induzierten Pankreatitis mit Hilfe von Antisense- und Sense-Oligonukleotiden. Dabei konnten sie einen Zusammenhang zwischen HSP70 und der Reduktion der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung aufzeigen. Sie konnten zeigen, dass durch die Hochregulation von HSP70 die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung verhindert wird. Die Gabe von Antisense-Oligos vor der Hyperthermiebehandlung verhinderte die Expression von HSP70 und dadurch war trotz Hyperthermie kein protektiver Effekt zu induzieren. Darüber hinaus kam es bei Tieren, die nur Antisense-Oligos erhielten, zu einer Verschlimmerung der mit einer Pankreatitis assoziierten Parameter nach Caerulein-Gabe (Bhagat *et al.*, 2002).

Frossard *et al.* untersuchten den Zusammenhang von HSP70 Expression und Protektion des Pankreas vor einer Caerulein-induzierten Pankreas am *in vivo* Modell. Zum einen erfolgte die Induktion von HSP70 durch Hyperthermie-Präkonditionierung und zum anderen durch intraperitoneale (i.p.) Gabe von Isoprenalin und einer dadurch hervorgerufenen β -adrenergen Stimulation, die eine Stressreaktion in den Tieren hervorrief und ebenfalls zu einer Hochregulation von HSP70 führte. In beiden Fällen kam es zu einer Protektion des Pankreas vor einer Caerulein-induzierten Pankreatitis und zu einer signifikanten Reduzierung der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung (Frossard *et al.*, 2002).

In diesen untersuchten Modellen wurde jeweils angenommen, dass HSP70 für die Protektion des Pankreas verantwortlich ist. Besonders bei der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung scheint HSP70 eine zentrale Rolle zu spielen. Über die Signaltransduktion, welche der HSP70 Expression in gestressten Zellen vorangeht, ist allerdings sehr wenig bekannt. Okadaäure, welche die Serin/Threonin Phosphatasen 1 und 2 hemmt, kann die Hyperthermie-induzierte HSP-Expression verstärken. In braunen Zellen scheinen Katecholamine die HSP-Expression zu induzieren, während die Hemmung von Tyrosin-Phosphatasen die HSP-Induktion hemmen kann (Matz, 1995; Mivechi, 1994). Thiol-reduzierende Substanzen können ebenfalls die HSP-Induktion hemmen (Chen, 1992; Huang, 1994). In einer Studie wurde auch die Hemmung der HSP-Induktion durch Hemmung von G-Proteinen mit Pertussis-Toxin berichtet (Ralhan, 1995).

Neben HSP70 ist insbesondere die Regulation und Funktion von HSP27 im Pankreas bereits recht gut untersucht (Schäfer *et al.*, 1999). Ähnlich wie andere Hitzeschockproteine auch, wird die HSP27 Expression durch Stress induziert und die HSP27 Überexpression führt zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Hitze oder anderen Stressfaktoren in einer Reihe von Zelllinien. HSP27 ist offensichtlich an der Regulation des Zytoskeletts, insbesondere des Aktins beteiligt und die HSP27 Überexpression führt zu einer Stabilisierung der Aktin Mikrofilamente (Schäfer *et al.*, 1999, Kubisch *et al.*, 2004). Die Untersuchung der Bedeutung von HSP27 ist aber nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

1.5 ATRIAL NATRIURETISCHES PEPTID

1981 beobachteten de Bold und seine Kollegen, dass die Infusion von Extrakten aus Atriumgewebe des Herzens in Ratten starke Natriurese, Diurese und Blutdruckabfall auslöste (de Bold *et al.*, 1981). Dies führte zur Isolierung und Klonierung des Atrial Natriuretischen Peptids (ANP), dem ersten Mitglied einer Familie von Natriuretischen Peptiden (NP) (de Bold, 1982 und 1985), das von den Myozyten im Vorhof des Herzens aus zytosolischen Granula in die Zirkulation sezerniert wird und natriuretische, diuretische sowie vasodilatierende Eigenschaften besitzt (Levin *et al.*, 1998). Neben seiner Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System konnten für ANP jedoch auch andere biologische Funktionen nachgewiesen werden.

1.5.1 NATRIURETISCHE PEPTIDE

Nach Entdeckung des ersten Natriuretischen Peptids, ANP, wurden weitere, strukturell ähnliche Peptide gefunden und näher charakterisiert (Levin *et al.*, 1998). Von Matuso und Mitarbeitern wurde BNP (Brain oder B-Typ Natriuretisches Peptid) und CNP (C-Typ Natriuretisches Peptid) aus Schweinehirnen isoliert (Sudoh *et al.*, 1988 und 1990). Urodilatin, das ausschließlich in der Niere gebildet wird, wurde erstmals aus humanem Urin isoliert (Schulz-Knappe *et al.*, 1988). Vor vier Jahren erst wurde DNP (Dendroaspis Natriuretisches Peptid), das ursprünglich aus dem Gift der grünen Mambaschlange, *Dendroaspis angusticeps*, isoliert wurde, im humanen Plasma und im atrialen Myokard nachgewiesen (Schirger *et al.*, 1999).

Alle Natriuretischen Peptide weisen eine Ringstruktur aus 17 Aminosäuren auf, die durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten gebildet wird (Currie *et al.*, 1984). Diese Struktur ist essentiell für die biologische Aktivität (Misono *et al.*, 1984) der Natriuretischen Peptide. Elf der zyklischen Aminosäuren sind in jedem der verschiedenen Natriuretischen

Peptide homolog, die Anzahl und Art der AS am C- und am N-Terminus dagegen sind unterschiedlich.

ANP wird hauptsächlich im Atrium des Herzens gebildet, seine mRNA kodiert eine Vorstufe des physiologisch aktiven ANP, das sogenannte prä-pro-ANP, das aus insgesamt 152 AS besteht. Nach Abspaltung eines Signalpeptids am N-Terminus entsteht pro-ANP mit 126 AS, das in atrialen Granula gespeichert wird (Rosenzweig und Seidman, 1991). Diese Vorstufe wird anschließend proteolytisch gespalten, wodurch ein aminoterminales Fragment aus 98 AS und das biologisch aktive Hormon ANP entstehen (Rosenzweig und Seidman, 1991). Die Abgabe von ANP in die Blutzirkulation erfolgt durch Exozytose (Nemer *et al.*, 1984). Alle anderen NP werden auf ähnliche Weise synthetisiert.

BNP ist ein zyklisches Peptid aus 32 AS und wird überwiegend in den Ventrikeln des Herzens gebildet, wo es z.B. bei dekompensierter Herzinsuffizienz vermehrt gebildet wird (Langenickel *et al.*, 2000). Es hat eine ähnliche Wirkung wie ANP. 2001 wurde in den USA ein humanes, rekombinantes BNP (Natreacor[®]) von der Food and Drug Administration zur Behandlung der akuten, dekompensierten kongestiven Herzinsuffizienz zugelassen.

CNP wird hauptsächlich im Gehirn synthetisiert. Es besitzt keine natriuretischen Eigenschaften, wie die anderen NPs, sondern wirkt vasodilatierend (Levin *et al.*, 1998).

DNP, das aus 38 AS zusammengesetzt ist, wirkt vor allem natriuretisch (Lisy *et al.*, 1999).

Urodilatin unterscheidet sich nur geringfügig von ANP, durch vier zusätzliche AS am Ende des N-Terminus. Es wird ausschließlich in der Niere produziert und ist dort für die Regulation des Natrium- und Wasserhaushaltes zuständig (Schulze-Knappe *et al.*, 1988).

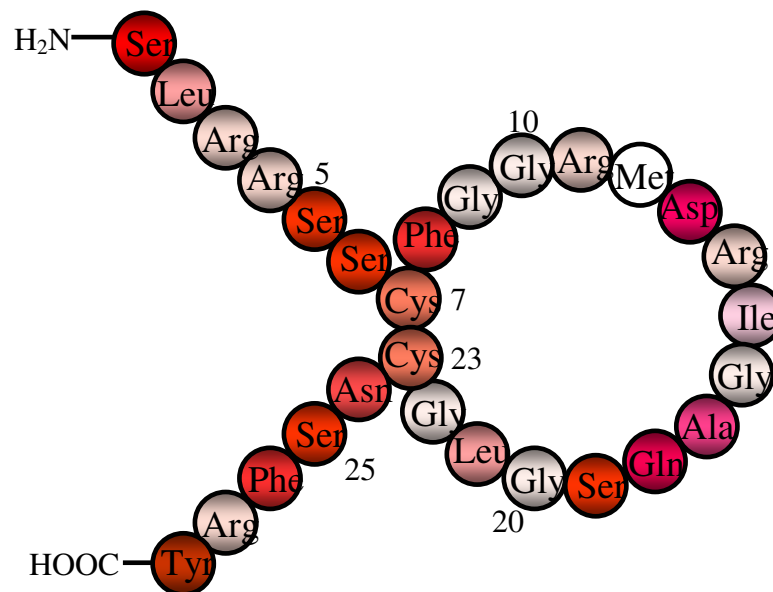


Bild 1.6: Struktur und Aminosäuresequenz von ANP

1.5.2 REZEPTOREN UND SIGNALTRANSDUKTION

Bislang wurden drei verschiedene Rezeptoren identifiziert, über die Natriuretische Peptide ihre Effekte vermitteln, NPR-A, NPR-B und NPR-C (Levin *et al.*, 1998; Venugopal, 2001).

Dabei handelt es sich bei NPR-A und NPR-B um Guanylatzyklase gekoppelte Rezeptoren. Diese setzen sich zusammen aus einer extrazellulären Peptidbindungsstelle, einer kurzen transmembränständigen Sequenz und zwei intrazellulären Domänen. Eine dieser Domänen besitzt eine Proteinkinase-ähnliche Aktivität, die andere eine Guanylatzyklase Aktivität. An den NPR-A Rezeptor binden ANP und BNP, wobei aber ANP mit einer viel höheren Affinität bindet. CNP hat eine hohe Affinität zum NPR-B Rezeptor. In beiden Fällen führt die Stimulation des Rezeptors zur Aktivierung der Guanylatzyklase und damit zur Erhöhung der intrazellulären Spiegel von cGMP. Die meisten biologischen Effekte von NPs werden über diese beiden Rezeptoren vermittelt.

Der NPR-C Rezeptor dagegen weist eine andere Struktur auf. Die extrazelluläre Domäne entspricht dem der anderen beiden Rezeptoren, aber im Gegensatz zu NPR-A und NPR-B besitzt NPR-C nur eine kurze intrazelluläre Sequenz ohne Guanylatzyklase-Aktivität. An diesen Rezeptor binden alle NPs mit hoher Affinität. Nach der Bindung der NPs an den NPR-C Rezeptor werden diese internalisiert und enzymatisch abgebaut. Neben der regulatorischen Funktion als Clearance-Rezeptor wird vermutet, dass der NPR-C Rezeptor die Adenylatzyklase-Aktivität inhibiert und Proteinkinase C aktiviert (Palaparti und Anand-Srivastava, 2000). Einige der NPR-C vermittelten Effekte, wie die Hemmung der Astrozyten-Proliferation (Levin und Frank, 1991) oder Hemmung der Endothelin-Produktion (Hu *et al.*, 1992), können möglicherweise darauf zurückgeführt werden.

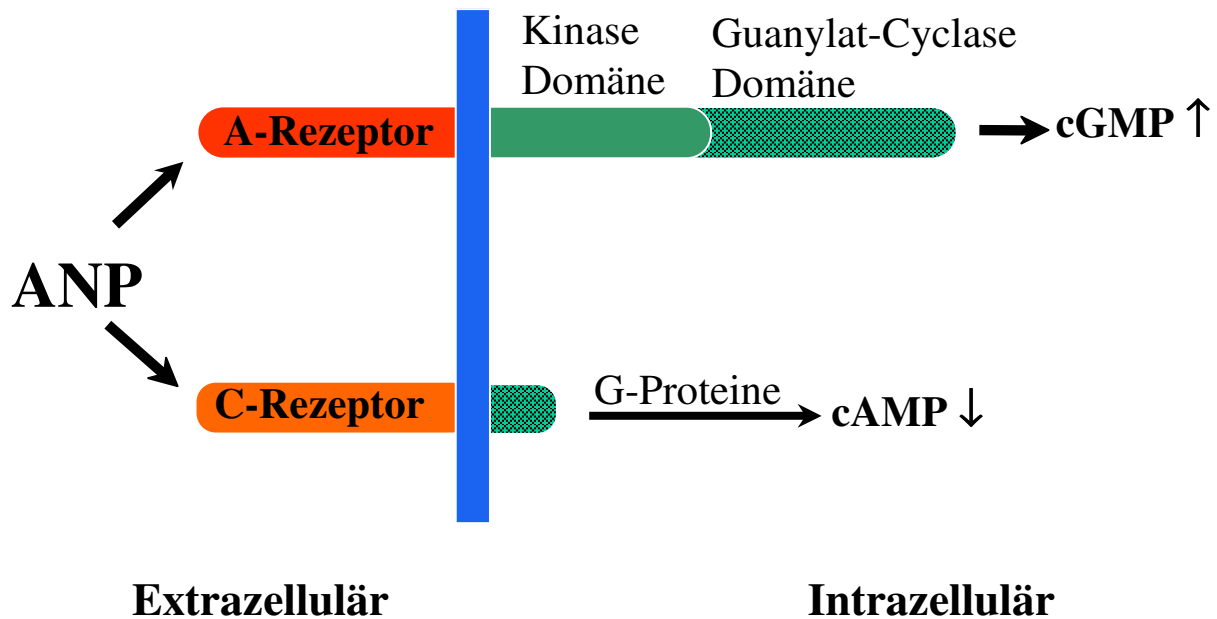


Bild 1.7: *Atrial Natriuretisches Peptid und seine Rezeptoren*
(Erläuterung siehe Text)

1.5.3 ZYTOPROTEKTIVES POTENTIAL

Anfang der 90er Jahre wurde entdeckt, dass ANP nicht nur im Herzen, sondern auch im Darm gebildet wird. Dabei entdeckte man die Bildung des Peptids in den enterochromaffinen Zellen des Dünndarms (Gerbes, 1991). Daraufhin wurde verstärkt der Zusammenhang zwischen ANP und dem Immunsystem untersucht und entdeckt, dass ANP in Organen wie dem Thymus, der Milz oder den Lymphknoten produziert wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Kreislaufhormon im Immunsystem wichtige Funktionen ausübt.

Zum einen spielt ANP eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Reifung von T-Lymphozyten im Thymus (Vollmar, 1997). Die andere wichtige Aufgabe ist die Regulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Makrophagen. NO ist zwar zum einen essentiell für die Abwehr von Bakterien, Pilzen und Viren, kann aber andererseits Zellen in Rahmen einer Entzündungsreaktion schädigen, wenn es in zu hohen Konzentrationen gebildet wird. ANP vermag die Menge an neugebildetem iNOS und folglich die freigesetzte Menge an NO zu verringern. Da ANP in Makrophagen selbst produziert wird, können damit über den autokrinen Mechanismus Makrophagen vor einer überschießenden und pathophysiologischen Produktion von NO geschützt werden. (Kierner und Vollmar, 2001; Vollmar et al., 1995; Kierner et al., 1998). Diese Erkenntnisse führten dazu, dass man ANP ein zytoprotektives Potential zuordnete. Bei der Ischämie-Reperfusionsschädigung der Leber konnte schon ein zytoprotektiver Effekt durch ANP gezeigt werden (Bilzer et al., 1994).

1.5.4 HORMONELLE PRÄKONDITIONIERUNG MIT DEM ATRIALEN NATRIURETISCHEN PEPTID

Die protektive Wirkung des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP), eines zirkulierenden kardiovaskulären Hormons, das vor allem an der Regulation des Gefäßtonus und des Wasser- und Salzhaushaltes beteiligt ist (Levin *et al.*, 1998), wurde zuerst an der Niere beschrieben (Shaw *et al.*, 1987; Nakamoto *et al.*, 1987).

Später konnte dann gezeigt werden, dass eine Präkonditionierung mit ANP auch vor Ischämie-Reperfusionsschäden in der Rattenleber sowohl nach warmer (Bilzer *et al.*, 1994) als auch nach kalter Ischämie (Gerbes *et al.*, 1998) schützt. Die Freisetzung von Lactatdehydrogenase, einem Parameter für das Ausmaß des Zelltods, ist bei ANP-präkonditionierten Lebern geringer. Außerdem ist der Gallenfluss, ein wichtiger Parameter der Leberfunktion, nach der Ischämie erhöht. Die protektiven Effekte scheinen über den NPR-A Rezeptor vermittelt zu werden (Gerbes *et al.*, 1998), einem Guanylatzyklase-gekoppelten Rezeptor, der nach Aktivierung die intrazellulären Spiegel des second messengers cGMP erhöht. Die beschriebenen Effekte können auch mit dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP erzeugt werden (Bilzer *et al.*, 1994; Gerbes *et al.*, 1998).

Für die Protektion der Leber durch ANP werden mehrere Mechanismen diskutiert, die von Bedeutung zu sein erscheinen (Bilzer *et al.*, 1999; Kiemer, 2002; Gerwig *et al.*, 2003; Kiemer *et al.*, 2002).

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit war aber, dass gezeigt werden konnte, dass es durch cGMP vermittelt zu einer Aktivierung des Hitzeschocktranskriptionsfaktors und infolge zu einer HSP70 Expression nach erfolgter ANP Infusion kommt (Kiemer *et al.*, 2002). Damit führt eine Präkonditionierung von Rattenlebern mit ANP zu einer Induktion der Hitzeschockantwort, zu einer Hochregulation von HSP70 und darüber vermittelt zu einer Protektion von Rattenlebern gegenüber des Ischämie/Reperfusionsschadens.

1987 konnte *in vitro* mit ¹²⁵J markierten ANP durch Autoradiographie eine Expression von ANP-Bindungsstellen auch im Pankreas nachgewiesen werden. Dabei fand man in drei verschiedenen Zelltypen des exokrinen Pankreas ANP Rezeptoren und zwar in Azinuszellen, zentroazinären Zellen und Gangzellen (Chabot *et al.*, 1987). Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass Azinuszellen auf ANP mit einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Spiegel speziell in Azinuszellen antworten. ANP zeigt aber keinen Effekt auf das Sekretionsverhalten von Verdauungsenzymen (Heisler *et al.*, 1987). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte auch der Nachweis erbracht werden, dass ANP in Azinuszellen enthalten ist (Chabot *et al.*, 1987). Ob allerdings Azinuszellen selbst ANP synthetisieren ist nicht geklärt. Untersuchungen zum Zeitverlauf der azinären Inkorporation nach i.v. Gabe von

¹²⁵J-markierten ANP weisen darauf hin, dass ein großer Teil des in Azinuszellen nachweisbaren ANP durch Internalisierung dorthin gelangt. Durch Autoradiographie konnte gezeigt werden, dass bereit ca. 1-2 Minuten nach i.v. Gabe von ¹²⁵J-ANP es zu einem maximalen Signal besonders der basolateralen Plasmamembran von Azini kommt (Chabot *et al.*, 1988). Golgi-Apparat und Zymogengranula zeigten erst zu späteren Zeitpunkten maximale Signale. Aus diesen Daten lässt sich zusammenfassend sagen, dass Azinuszellen ANP-Rezeptoren besitzen und mit einer vermehrten Bildung des second messenger cGMP auf Stimulation mit ANP antworten.

An Hand der schon gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkung von ANP auf Azinuszellen und aufgrund des protektiven Potential einer ANP-Präkonditionierung beim Ischämie/Reperfusionsschadens der Leber soll nun die ANP-Präkonditionierung am Modell der experimentellen Caerulein-induzierten Pankreatitis untersucht werden.

1.6 TRANSGENE MAUS

1.6.1 ZUSAMMENSETZUNG DES INSERTS

Trotz der sehr klaren Hinweise, dass HSP70 eine zentrale Rolle für die Protektion nach Präkonditionierung bei der Pankreatitis zukommt, ist dies bislang nicht definitiv bewiesen. Dies liegt daran, dass z.B. die Hyperthermie-Präkonditionierung nicht nur zur Induktion von HSP70, sondern auch von anderen HSPs, wie z.B. HSP27 und 32, führen kann. Durch die Generierung einer transgenen Maus sollte, neben der Untersuchung möglicher Ansätze zur Präkonditionierung des Pankreas durch gesteigerte HSP70 Expression, versucht werden, ein Modell zu etablieren, mit dem sich die Bedeutung von HSP70 für die Protektion nach Präkonditionierung eindeutig untersuchen lässt.

Ziel war, ein Insert zu konstruieren, welches zur selektiven und konstitutiven Expression von HSP70 im Pankreas führt. Dafür wurde vor das Gen für die induzierbare Isoform von HSP70 der pankreasspezifische Elastasepromotor kloniert. Ans Ende des Gens wurde dann ein Stück des menschlichen Wachstumshormons gesetzt, um eine verstärkte Expression im Pankreas zu gewährleisten.

1.6.1.1 ELASTASE PROMOTOR

Die Regulation der pankreasspezifischen Genexpression von Verdauungsenzymen, sowie die entsprechenden regulatorischen Elemente die für die Expression von Verdauungsenzymen verantwortlich sind, wurden schon vor 15 Jahren genau erforscht (Hagenbuchle *et al.*, 1985, Swift *et al.*, 1989)

Dabei wurde festgestellt, dass sich die gesamte Information zur pankreasspezifischen Genexpression in einer Enhancer-Region zwischen den Nukleotiden -95 bis-205, oberhalb der translatierten Gensequenz befindet. Zwischen dem Nukleotid -95 und dem Translationsstart liegt noch eine Promotorregion, die allerdings nicht an der gewebespezifischen Expression beteiligt ist. Gene, die für Verdauungsenzyme codieren, beinhalten Sequenzen, die ausschließlich von einem DNA bindendem Protein erkannt werden, dem sogenannten Pankreas-Transkriptionsfaktor, der exklusiv nur im Pankreas vorkommt.

Die Enhancer-Region des Elastase Promotors setzt sich aus drei funktionellen, regulatorischen Elementen zusammen, die als A, B und C-Element bezeichnet werden. Der Enhancer aktiviert die Transkription in hohem Ausmaß im Pankreas und in sehr geringem in anderen Verdauungsorganen und hat keine Aktivität in anderen Organen.

Das A-Element ermöglicht die spezifische Expression in Azinuszellen und stellt zugleich die Bindungsstelle für den Pankreas-Transkriptionsfaktor dar.

Das B-Element bewirkt in Azinuszellen eine Verstärkung des A-Elements in Gegenwart des Repressors und reguliert in Abwesenheit des Repressors die spezifische Genexpression in β -Zellen des Pankreas.

An das B-Element schließt sich das C-Element an. Dieses spielt allerdings keine zellspezifische Rolle, übt aber einen synergistischen Effekt auf die Funktion der beiden anderen Elemente aus.

Im Anschluss an diese Region befindet sich ein Repressor, der eine Expression des Transgens in Inselzellen verhindert und dadurch selektiv die Expression in Azinuszellen ermöglicht.

(Swift *et al.*,1989;Hammer *et al.*,1987; Ornitz *et al.*, 1987; Kruse *et al.*, 1988 ; Kruse *et al.*, 1993 ; Kruse *et al.*, 1995)

Der Elastase-Promoter wurde schon eingesetzt, um transgene Mäuse zu generieren, die eine hohe Expression des Wachstumshormons im Pankreas aufweisen (Kruse *et al.*, 1995). Des Weiteren wurden transgene Tiere hergestellt, bei denen Ras mit Hilfe des Elastase-Promotors im Pankreas exprimiert wurde und zur Bildung von Pankreaskarzinomen führte (Quaife *et al.*, 1987).

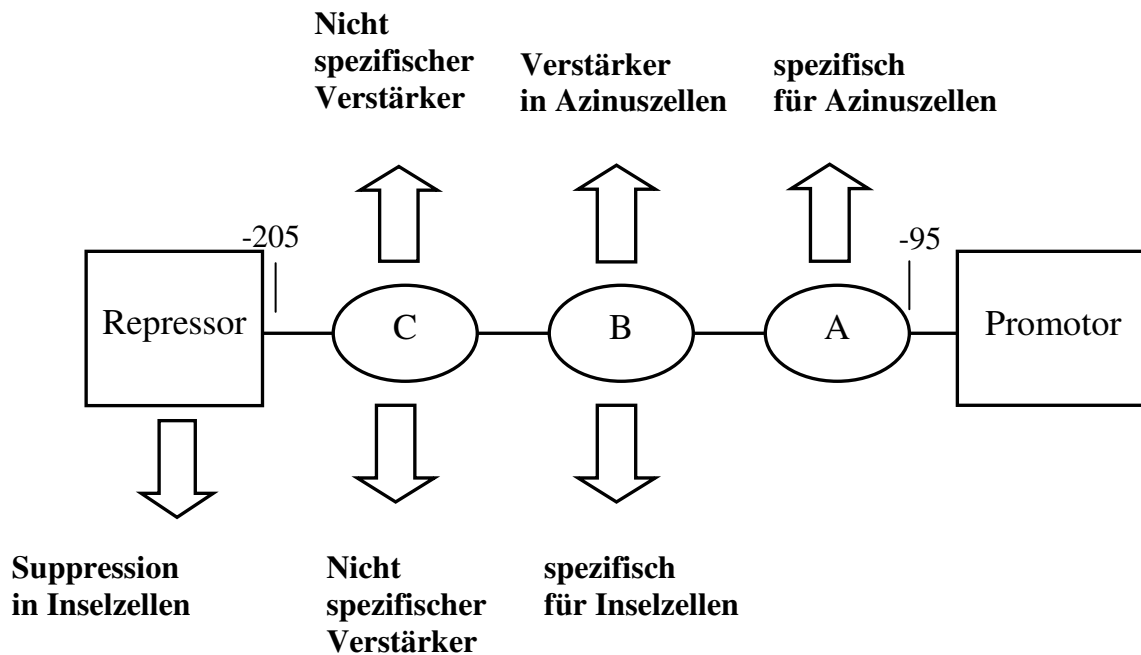


Bild 1.8: *Regulatorische Elemente für die Expression von Elastase im Pankreas*

1.6.1.2 HSP70

Das gewünschte Transgen, das selektiv im Pankreas überexprimiert werden soll, ist die induzierbare Isoform des HSP70 der Ratte. Diese Form von HSP70 wird normalerweise nur infolge von Stresseinwirkung, wie z.B. durch eine Hyperthermie-Präkonditionierung und dann ubiquitär im gesamten Organismus gebildet.

In verschiedenen Systemen wurde schon gezeigt, dass die Überexpression des induzierbaren HSP70 zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit des jeweiligen Organismus oder Systems auf schädliche Noxen führt. Bei transgenen Mäusen, die HSP70 unter Kontrolle des Aktinpromotors im Herzen überexprimierten, kam es zu einer erhöhten Toleranz des Herzen gegenüber Ischämie. (Marber *et al.*, 1995; Plumier *et al.*, 1995).

Mittels stabiler Transfektion wurde HSP70 in myogene Zelllinien überexprimiert und führte dort zu einer erhöhten Resistenz dieser Zellen gegenüber Endotoxinen (Chi SH, Mestral R 1996).

1.6.1.3 HUMAN GROWTH HORMON

Im Anschluss an die HSP70 Sequenz wurde ein Teil des Wachstumshormogens angefügt, da die Vermutung besteht, dass der Elastasepromotor zwar eine gute Organspezifität der Genexpression bedingt, aber nicht ausreicht, um eine quantitativ relevante Expression im Pankreas zu erreichen. Dies steht nur scheinbar im Widerspruch zu den Daten von RJ McDonald, da in diesen Arbeiten zumeist das menschliche Wachstumshormogen als Marker für die mit dem Elastasepromotor bewirkte Genexpression im Pankreas verwendet wurde. Es scheint nun

so zu sein, dass Teile des Wachstumshormongens Sequenzen enthalten, die eine Verstärkung der Genexpression im Pankreas bewirken können. Zumindest ist es auch anderen Arbeitsgruppen erst durch die Kombination des Elastasepromotors mit einem Teil des Wachstumshormongens gelungen, signifikante Proteinexpression in transgenen Tieren zu erreichen (Diane Simeone und JA Williams, pers. Mitteilung, Raul Urrutia, persönliche Mitteilung). Daher wurde ein Stück des bovinen Wachstumshormongenes ebenfalls in den Vektor kloniert.

2 ERGEBNISSE

2.1 AZINUSZELLPRÄPARATION

Am Beginn der Arbeit galt es die Präparation von Azinuszellen zu erlernen und zu etablieren. Diese Zellen stellen ein sehr gutes Modell dar, physiologische und pathophysiologische Vorgänge in diesen Zellen und damit die Vorgänge, die in der Frühphase einer Pankreatitis auftreten, zu untersuchen.

Die Präparationstechnik wurde Anfang der 70er Jahre von Amsterdam und Jamieson entwickelt und ermöglicht die Isolierung von Azinuszellen durch enzymatischen Verdau und mechanische Zerkleinerung (Amsterdam und Jamieson, 1972 und 1974). 1978 wurde die Methode von J.A. Williams modifiziert (Williams et al., 1978) und es galt, dieses etablierte Standardverfahren zu erlernen. Die Schwierigkeit bestand darin, Azinuszellen zu gewinnen, die strukturell und funktionell intakt waren. Die Präparation selbst ist eine diffizile und aufwendige Methode, mit vielen Schritten, die zu einer Zerstörung der Azinuszellen führen können. Um Azinuszellen als Modell zur Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge der akuten experimentellen Pankreatitis verwenden zu können, benötigt man voll funktionsfähige, ungestresste und nicht mit Zelltrümmern und β -Zellen verunreinigte Azini.

Die funktionelle und strukturelle Integrität der isolierten Azinuszellen wurde an Hand verschiedener Parameter, wie z.B. sekretorische Antwort auf Stimulation mit Sekretagoga und zelluläre Integrität, untersucht.

2.1.1 SEKRETIONSANTWORT

Zum einen wurde die Sekretionsantwort von Amylase und Lipase auf die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Cholezystokinin untersucht, um die Funktion des CCK-Rezeptors, der intrazellulären Signaltransduktion und des Energiehaushaltes zu überprüfen, da Azini auf Störungen empfindlich mit Funktionseinbusen reagieren. Die Zellen gelten dann als intakt, wenn sich mit CCK-Konzentrationen zwischen 10 pM und 10 nM ein biphasischer Verlauf der Sekretionsantwort nach 30 Minuten sowohl für Amylase als auch Lipase darstellen lässt, mit einem Maximum der Sekretion zwischen 300 pM und 1 nM CCK und einer ca. 10-fachen Steigerung der Sekretionsantwort zwischen Basalwert und Maximum.

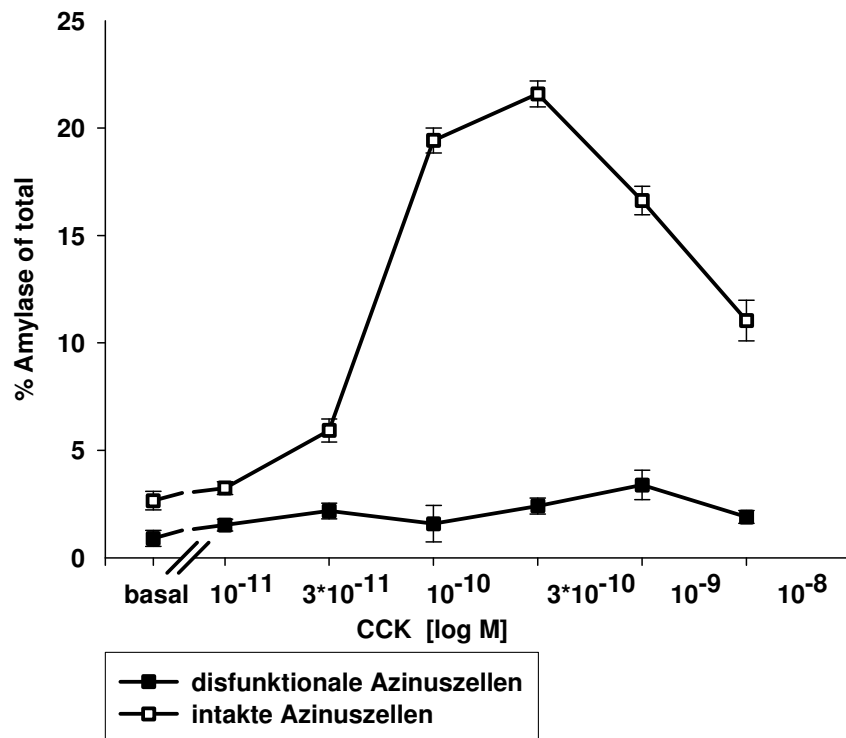


Bild 2.1: *Amylasesekretionskurve mit voll funktionsfähigen und disfunktionalen Azini*

Zu erkennen ist der lineare Anstieg bis zum Erreichen des Maximums bei 300 pM CCK und der darauffolgenden Abnahme der Sekretion durch die sekretorische Blockade und den damit verbundenen Verbleib der Enzyme in der Zelle. Die untere Kurve zeigt die CCK-Stimulation mit Zellen, die durch den Isolationsprozess so gestresst und zum Teil zerstört wurden, dass sie ihre Funktionsfähigkeit verloren haben.

2.1.2 LACTATDEHYDROGENASE

Ein weiteres Kriterium für die Integrität der Azini bzw. der Plasmamembran ist die Messung der Lactatdehydrogenase (LDH) im Medium. LDH wird im Cytosol exprimiert ist aber kein sekretorisches Enzym und wird folglich auch nicht in die Granula verpackt. Das Molekulargewicht der LDH liegt bei 36 kD. Nur beim Auftreten größerer Defekte in der Zellmembran kann sie in den Überstand austreten. LDH wird damit nur von in ihrer Integrität deutlich beeinträchtigten Zellen abgegeben und eignet sich somit gut zur Untersuchung der Vitalität der gewonnenen Azinuszellen. Bei den ersten Isolierungsversuchen war das Problem, dass keine Azinuszellen gewonnen wurden, sondern alle im Laufe der einzelnen Isolierungsschritte abgestorben sind. Im Laufe der Optimierung der Methode wurde die LDH-Konzentration im Medium immer niedriger, so dass man bei LDH-Werten von $5\% \pm 3\%$ von intakten Azini und einem vernachlässigbaren Anteil an toten Zellen ausgehen konnte.

2.1.3 STRUKTUR DER ISOLIERTEN AZINUSZELLEN

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Bestimmung des Zustands von Azini ist die Anfärbung mit Trypanblau und die anschließende mikroskopische Untersuchung. Dieser Farbstoff ist nicht in der Lage durch intakte Zellmembranen zu diffundieren und färbt daher nur geschädigte Zellen blau an.

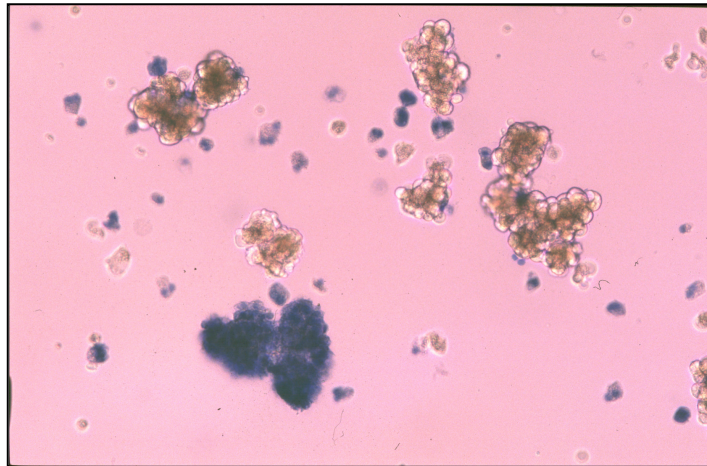


Bild 2.2: *Anfärbung von Azinuszellen mit Trypanblau*

Die mikroskopische Untersuchung von Azinuszellen nach Anfärbung mit Trypanblau zeigt zum einen intakte Zellen und Azinuszellen, die durch den Isolierungsprozess zerstört wurden und sich deshalb mit Trypanblau anfärben lassen.

Durch den Farbkontrast zwischen blauem Medium und Azinuszellen lässt sich auch gut erkennen, wie stark gestresst die Zellen durch den Isolationsprozess sind. Gestresste Zellen zeigen an der Membran charakteristische Ausstülpungen, sogenannte Blebs. Je gestresster die Zellen sind, desto mehr dieser Blebs bilden sie aus und desto größer sind die Einschränkungen in ihrer Funktionalität. Zu Beginn ließen sich pro Sichtfeld noch sehr viele Azini mit Trypanblau anfärben und viele Azinuszellen, die zwar noch intakt waren zeigten dafür eine starke Ausbildung von Blebs. Im Laufe der Zeit wurde die Technik immer besser beherrscht und war damit mit immer weniger Stress für die Zellen verbunden. Dadurch wurde die Ausgangsbasis für die anstehenden Untersuchungen zur akuten experimentellen Pankreatitis auf zellulärer Ebene geschaffen. Besonders für die Untersuchung der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung wurde dieses Modell herangezogen.

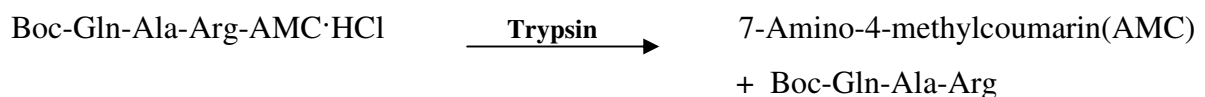


Bild 2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Azinuszellen

Man sieht hier gut die Integrität der Zellen. Die Polarität der Azinuszellen ist erhalten. Der Pfeil markiert den apikal liegenden Ausführungsgang. Man erkennt die am apikalen Pol akkumulierten Zymogengranula.

2.2 ETABLIERUNG DER BESTIMMUNG VON TRYPSIN IN AZINUSZELLEN UND PANKREASHOMOGENATEN

Der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung in der Frühphase der akuten Pankreatitis kommt eine zentrale Bedeutung zu. Als Parameter zur Beurteilung der Pankreatitis ist daher die Messung intrazellulär aktivierten Trypsins zwingend erforderlich, sowohl bei in vivo (experimentelle Pankreatitis) als auch bei in vitro Modellen (Azini) des exokrinen Pankreas. Zunächst musste die Methodik zur Trypsinbestimmung etabliert werden. Die Messung der Aktivität wurde in Anlehnung an die Methode von Kawabata et al. etabliert (Kawabata *et al.*, 1988). Dabei handelte es sich um eine Fluoreszenzmessung, bei der das Substrat Boc-Gln-Ala-Arg-AMC·HCl durch Trypsin, nicht aber durch Trypsinogen gespalten wird, wodurch die fluoreszierende Verbindung 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) entsteht.



Die Durchführung der Messung erfolgte wie unter Methoden 4.3.6.3 S. 44/45 beschrieben. Die Auswertung der erhaltenen Messwerte wurde folgendermaßen durchgeführt. Die Messung beruht auf einer Umsetzung des Substrats mit Trypsin, wobei das Substrat durch Trypsin

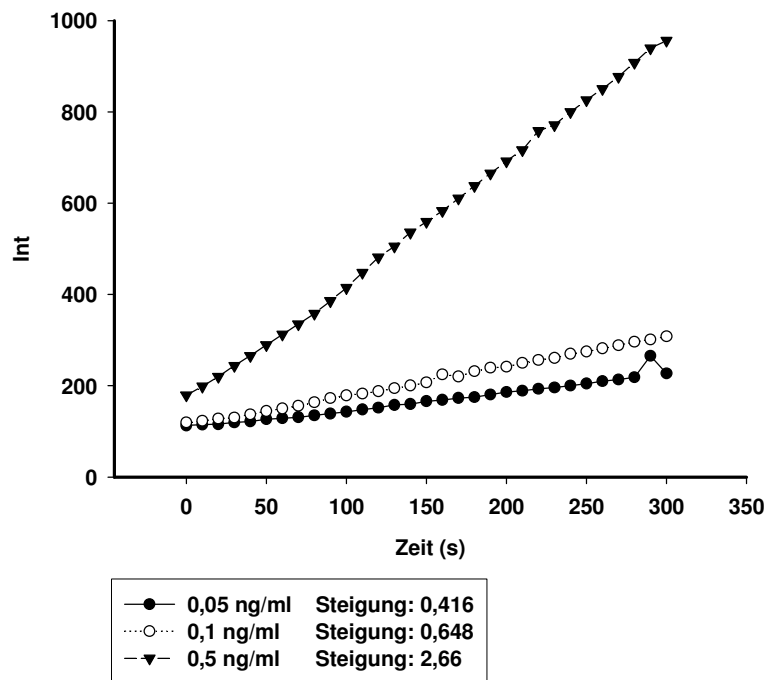
gespalten wird und eine fluoreszierende Verbindung entsteht. Der Anstieg der Intensität der Fluoreszenz über die Zeit wurde alle 10 Sekunden nachfolgend über einen Zeitraum von 5 Minuten fluorimetrisch gemessen. Aus den Differenzen der Fluoreszenz zwischen zwei Messpunkten wurde dann die Steigung nach der Geradengleichung ermittelt.

Die Steigung entspricht dabei dem Quotienten aus dem jeweiligen vertikalen (Zeitachse) und dem horizontalen (Delta F) Abstand zweier beliebiger Punkte der Geraden und ist ein Maß für die Änderung entlang der Regressionsgeraden. Die Gleichung, nach der die Steigung einer Regressionsgeraden berechnet wird, lautet wie folgt:

$$b = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Vor jeder Messung von Pankreas- bzw. Azini-Proben mussten Standardkonzentrationen von Trypsin vermessen werden, um eine Standardkurve (Steigung gegen Trypsin-Konzentration) zu erstellen, um die Konzentration an Trypsin in der zu vermessenden Proben errechnen zu können. Hierfür wurden Standards mit definierten Trypsinkonzentrationen (0,05 ng/ml; 0,1 ng/ml; 0,25 ng/ml; 0,5 ng/ml; siehe auch Methoden 4.3.6.3 Seite 44/45) hergestellt und vermessen. Aus den erhaltenen Geraden der vermessenen verschieden konzentrierten Standards wurden die jeweiligen Steigungen ermittelt. (Bild 2.4.A) Die berechneten Geradensteigungen wurden dann gegen die dazugehörigen Trypsinkonzentrationen in ng/ml in einem Koordinatensystem aufgetragen (Bild. 2.4. B). Zur Berechnung des Trypsingehalts der Pankreas- bzw. Azini-Proben, wurden die ermittelten Steigungen aus den vermessenen Proben jeweils in die Geradengleichung der Kalibriergeraden $y = mx$ eingesetzt, wobei m = der Steigung der Kalibriergeraden entspricht. Indem man für x die Geradensteigung der jeweiligen Probe einsetzt erhält man folglich als y = die Konzentration an Trypsin in der zu bestimmenden Probe. Bei Proben, die für die Vermessung verdünnt wurden, musste anschließend der Verdünnungsfaktor mit in das Ergebnis eingerechnet werden, um die tatsächliche Trypsinkonzentration in der Probe zu erhalten.

A



B

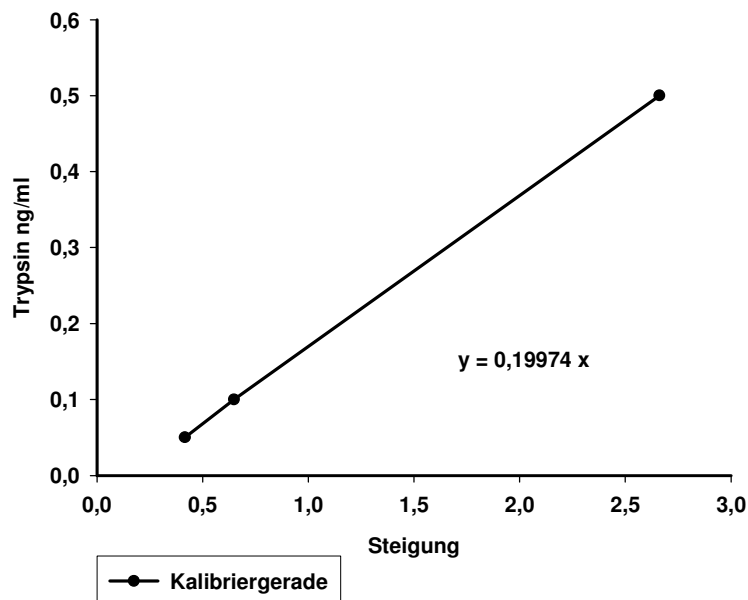


Bild 2.4: Validierung der Trypsin-Bestimmung

Bild A zeigt die Messung der Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit, abhängig von den unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen.

Bild B zeigt die Kalibriergerade, die sich ergibt, wenn die Steigungen der einzelnen Intensitätsgeraden gegen die jeweils entsprechende Trypsinkonzentration aufgetragen werden.

2.3 DIE BEDEUTUNG VON HSP70 FÜR DIE STRESSREAKTION DES PANKREAS

Die akute Pankreatitis läuft bis heute klinisch immer noch mehr oder weniger schicksalhaft ab. Es wurde zwar in den letzten Jahren ein Konzept etabliert, das u.a. die sekretorische Blockade und die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung als zentrale Ereignisse für die Pathophysiologie benennt s. 1.3. Es gibt aber keine spezifische Therapie für die akute Pankreatitis, sodass nur eine symptomatische Behandlung der Erkrankung möglich ist. Deshalb ist eine genaue Charakterisierung der Stressreaktion des Pankreas von entscheidender Bedeutung, um zusätzliche Erkenntnisse zum Verständnis der Pathophysiologie der Pankreatitis und damit Ansatzpunkte für eine adäquate kausale Therapie zu erhalten.

Durch vorangegangene eingehende Untersuchungen der Stressreaktion konnte bereits aufgedeckt werden, dass Hitzeschockproteine im Tiermodell gegen eine Pankreatitis protektiv wirken. Neben der Untersuchung von HSP27 und HSP32, die nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, steht für die Arbeitsgruppe Pankreas der Med. Klinik II in Großhadern und dieser Arbeit besonders die Bedeutung von HSP70 im Vordergrund.

Zunächst sollte der Mechanismus der durch Prækonditionierung vermittelten Protektion weiter charakterisiert werden. Dazu wurde am Modell isolierter Azinuszellen untersucht, inwiefern die Prækonditionierung Einfluss auf die bekannten biochemischen Veränderungen bei der Pankreatitis hat.

2.3.1 AUSWIRKUNG DER HYPERTHERMIE-PRÆKONDITIONIERUNG AUF DIE PATHOPHYSIOLOGIE DER HYPERSTIMULATION

Am Modell frisch isolierter Azinuszellen wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß es durch eine Hyperthermie-Prækonditionierung zu Veränderungen in der azinären Antwort auf eine CCK-Hyperstimulation kommt.

Zum einen wurde untersucht, inwiefern die Hyperthermie Prækonditionierung zu einer Veränderung der sekretorischen Blockade nach Hyperstimulation mit CCK führt. Zum anderen wurde untersucht, ob eine Hyperthermie und damit verbunden die Expression von HSPs zu einer Reduktion oder Inhibierung der CCK induzierten frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung führt.

2.3.1.1 NACHWEIS VON HITZESCHOCKPROTEINEN

Aufgrund des protektiven Potentials einiger HSPs wurde die Expression der für unsere Arbeitsgruppe relevantesten Hitzeschockproteine im Western Blot ermittelt. Für die Bestimmung des Expressionsmusters wurden Ratten einer Hyperthermie-Prækonditionierung unterzogen und 24h später die HSP- Expression in Pankreashomogenaten und Azinuszellen untersucht.

HSP70 welches in verschiedenen Isoformen im Organismus vorkommt und die größte Bedeutung im Rahmen dieser Arbeit hat, wurde durch die Hyperthermie-Behandlung in großem Ausmaß induziert. Dabei beschränkte sich die Untersuchung aber auf die induzierbare Isoform, auch als HSP72 bekannt. Diese Isoform wird im Pankreas nicht konstitutiv exprimiert, lässt sich aber durch thermalen Stress in hohem Ausmaß sowohl in Pankreasgewebe als auch in Azinuszellen hochregulieren (Wagner *et al.*, 1996).

Mittels eines HSP25 Antikörper konnte das konstitutiv im Pankreas vorliegende HSP25 nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Hochregulation des genuin schon vorliegenden Proteins sowohl im Pankreas als auch in Azinuszellen (Tashiro *et al.*, 2002).

Hämoxxygenase (HO)-1 auch als HSP32 bekannt gehört ebenfalls zu den Hitzeschockproteinen, die genuin im Pankreasgewebe vorkommen, und das vor allem durch sein protektives Potential gegenüber oxidativem Stress bekannt ist. Mit Hilfe der Hyperthermiebehandlung kam es zu einer wenn auch schwach ausgeprägten Induktion der HSP32 Expression (Daten nicht gezeigt) (Wagner *et al.*, 1996).

HSP60 gehört zu den Hitzeschockproteinen, das schon in größerem Ausmaß konstitutiv im Pankreas vorliegt. Durch eine Hyperthermie lässt sich die Expression von HSP60 nicht mehr sichtbar steigern (Wagner *et al.*, 1996).

HSP90 ist ein Hitzeschockprotein welches in vielen Geweben konstitutiv vorliegt. Im Pankreas dagegen ließ sich in unseren Versuchen keine genuine Expression feststellen, jedoch zeigen die Ergebnisse von Tashiro *et al.* eine genuine Expression im Pankreas, die sich durch eine Hyperthermie nicht weiter steigern lässt. Durch thermalen Stress war in unserem Versuch eine Expression im Pankreasgewebe aber nur eine schwache Expression in Azinuszellen feststellbar (Daten nicht gezeigt) (Tashiro *et al.*, 2002).

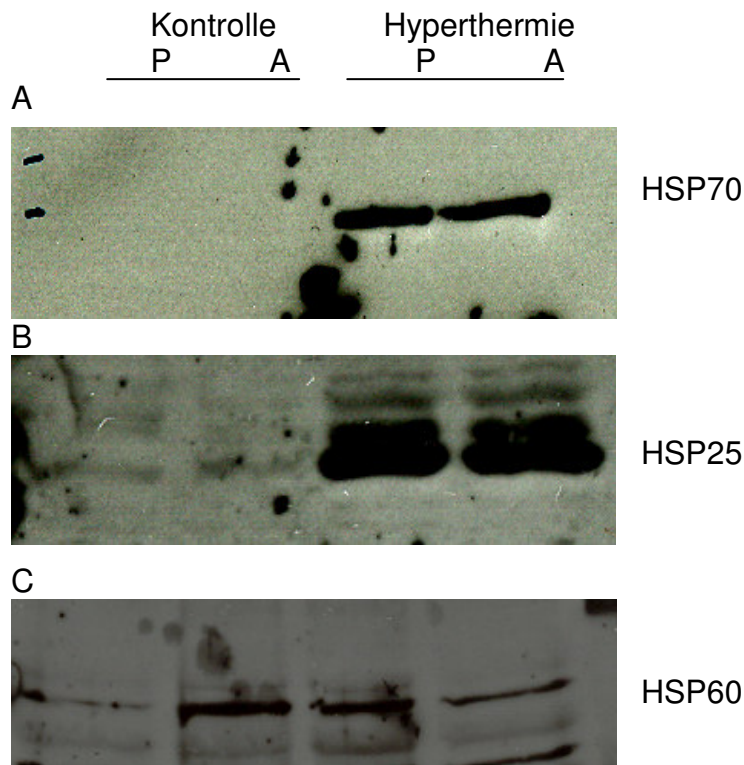


Bild 2.5: *Expressionsmuster bestimmter Hitzeschockproteine im Pankreas ohne und mit Hyperthermiebehandlung*

Im Western Blot wurde die Expression der verschiedenen Hitzeschockproteine im Pankreas (P) und in Azinuszellen (A) ohne Hyperthermie-Präkonditionierung (jeweils die beiden ersten Banden) und 24h nach erfolgter Hyperthermiebehandlung (jeweils die beiden letzten Banden) ermittelt. **Blot A: HSP70; Blot B: HSP25; Blot C: HSP60** (Erläuterungen siehe Text).

2.3.1.2 EINFLUSS DER HYPERTHERMIE AUF DIE SEKRETION VON AMYLASE UND LIPASE

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hyperthermie im besonderen die Expression von HSP70, und weniger die anderer HSPs beeinflusst, die alle konstitutiv schon im Pankreasgewebe vorliegen, wurde untersucht, inwiefern sich biochemische Parameter, wie Amylase-sekretion und Trypsinaktivierung, in isolierten Azini durch eine zuvor erfolgte Hyperthermie-Präkonditionierung beeinflussen lassen.

Der Einfluss einer Hyperthermie-Präkonditionierung und des dadurch gebildeten HSP70 auf die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung wurde bislang nur am in vivo Modell der akuten experimentellen Caerulein-induzierten Pankreatitis untersucht. Nun sollte geklärt werden, wie sich die Trypsinaktivität in frisch isolierten Azini mit Hyperthermie Präkonditionierung auf eine Hyperstimulation mit CCK verändert.

Zunächst wurde ein Modell verwendet, in dem frisch isolierte Azinuszellen einer Hyperthermie-Präkonditionierung unterzogen wurden. Dabei wurden die Zellen 20 min auf 42°C

erwärmt und anschließend bei 37°C für 8h inkubiert, um ihnen die Möglichkeit zu geben, Hitzeschockproteine zu exprimieren. Dabei zeigte sich im Western Blot nach 4h ein deutliches HSP70 Signal.

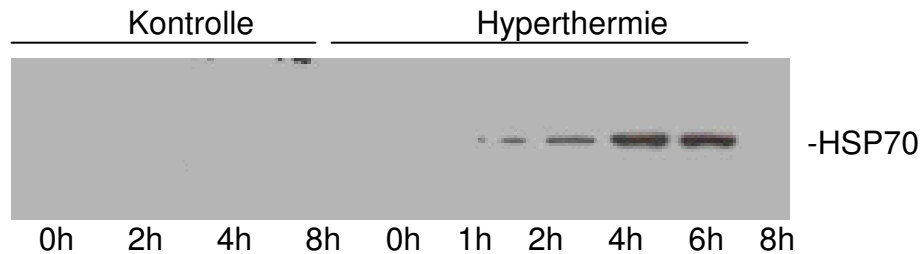
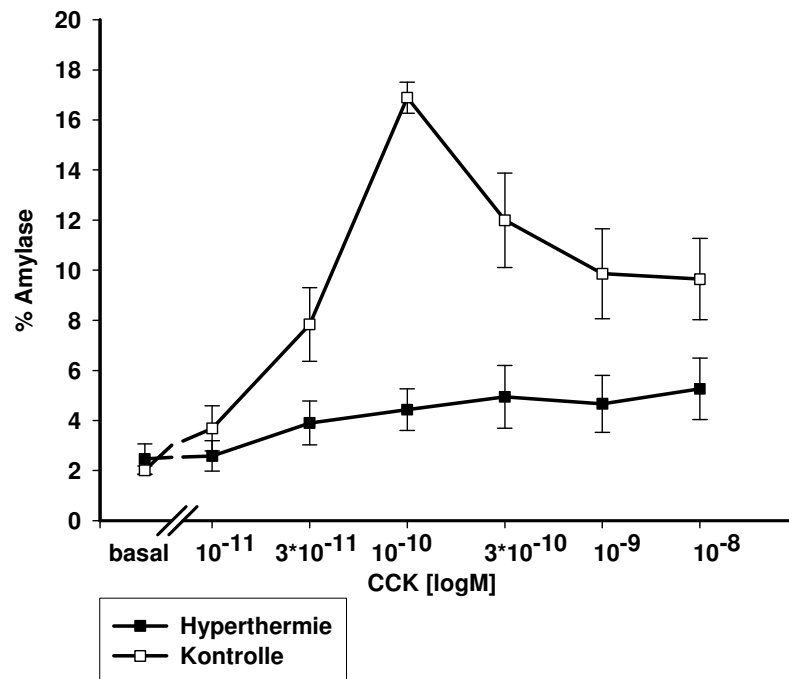


Bild 2.6: *HSP70 Expression nach Hyperthermie mit frisch isolierten Azinuszellen*

Azinuszellen die eine Hyperthermiebehandlung erhielten zeigten nach 4 h ein deutliches HSP70 Signal, wohingegen Zellen, die ohne Hyperthermiebehandlung bei 37°C inkubiert wurden auch nach 8h keine HSP70 Expression aufwiesen.

Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit CCK-Konzentrationen zwischen 30 pM und 100 nM. Die Untersuchung des Einflusses der Hyperthermie-Behandlung der Azinuszellen auf ihr Sekretionsverhalten und die frühzeitigen Trypsinaktivierung brachte allerdings keine Ergebnisse. Die Zellen waren durch die vorangegangene Hyperthermie so in ihrer Funktionalität geschädigt, dass sie keine Reaktion mehr auf die Stimulation mit verschiedenen CCK-Konzentrationen zeigten. Die Untersuchung der LDH Werte machte aber deutlich, dass die Zellen soweit noch intakt waren und es durch die Hyperthermiebehandlung nicht zu einem Absterben der Zellen kam.

A



B

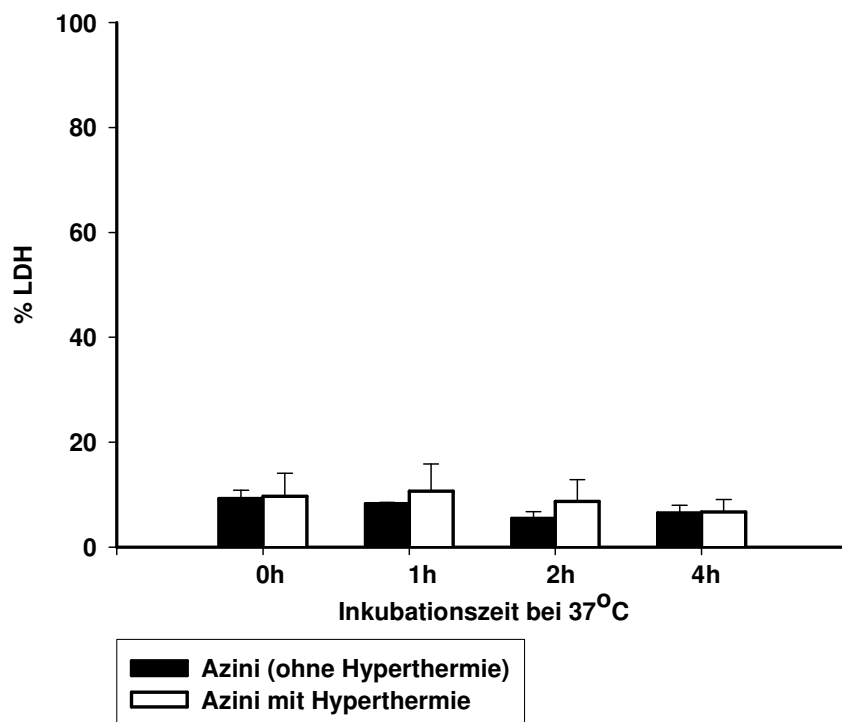


Bild 2.7: *Hyperthermie mit frisch isolierten Azinuszellen.*

Bild 2.7 A zeigt das Azinuszellen 4h nach der Hyperthermiebehandlung nicht mehr auf die Stimulation mit verschiedenen CCK- Konzentrationen reagieren im Gegensatz zu Zellen ohne Hyperthermie. Die Ursache des Verlustes der Funktionalität liegt aber nicht im Absterben der Zellen. Eine Untersuchung der LDH-Konzentration (Bild 2.7 B) im Azinuszellmedi-

um zeigte über 4h hinweg keinen Anstieg der LDH- Werte. Auch der Vergleich der LDH- Werte von Kontroll- und Hyperthermieazini zeigen keinen signifikanten Unterschied.

Nachdem sich dieses Modell als nicht praktikabel herausstellte, um den Einfluss von HSP70 auf das Sekretionsverhalten und die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung eingehender zu untersuchen, wurde ein Modell verwendet, das eine in vivo Hyperthermiebehandlung von Ratten mit einem in vitro Modell der experimentellen Pankreatitis an frisch isolierten Azinuszellen, gewonnen aus den vorbehandelten Tieren, kombinierte. Denn durch eine Ganzkörperhyperthermie kommt es auch in Azinuszellen zu einer Expression von HSPs. Ratten wurden also zunächst einer Ganzkörperhyperthermie unterzogen und nach 24h erfolgte die Präparation der Azinuszellen

Im Western Blot wurde der Nachweis erbracht, dass die Hyperthermie Präkonditionierung zu einer Induktion von HSP70 sowohl im Pankreas als auch in Azinuszellen führte. Dabei ließ sich feststellen, dass in den Kontrollen keinerlei HSP70 Expression zu beobachten ist, wohingegen 24h nach erfolgreich durchgeführter Hyperthermie die Expression im Pankreasgewebe als auch in den Azinuszellen gleichermaßen stark induziert wurde.

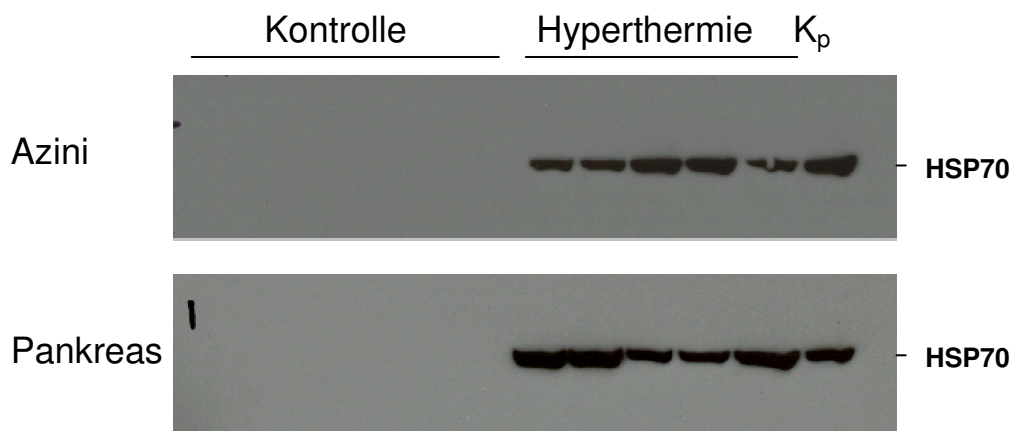
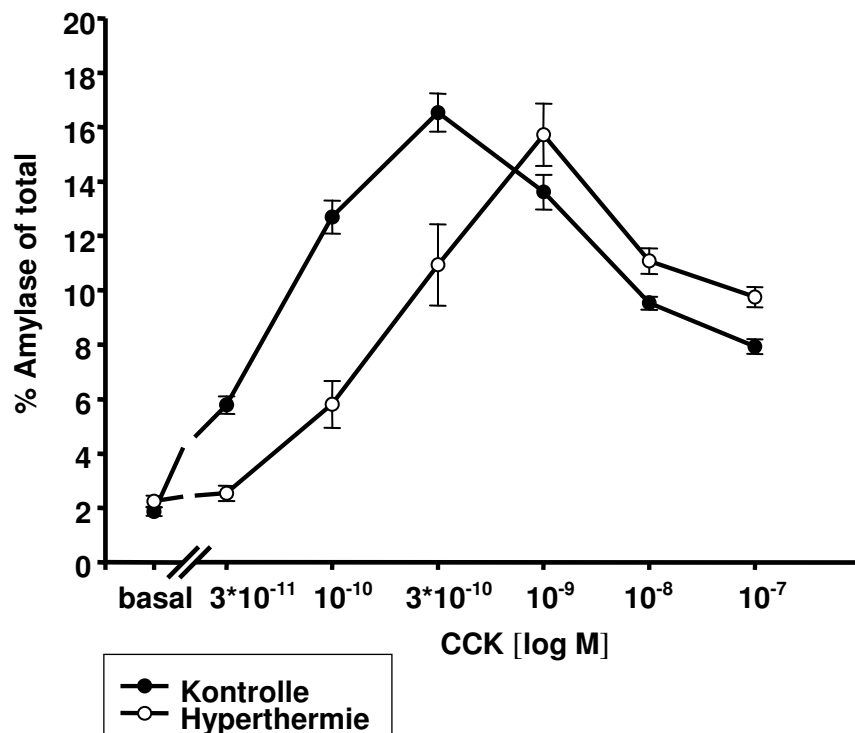


Bild 2.8: *HSP70 Expression ohne und mit Hyperthermie.*

Pankreasgewebe und Azinuszellen von Ratten wurden hinsichtlich ihrer HSP70 Expression mit und ohne Hyperthermie Präkonditionierung untersucht. A: Vergleich der HSP70 Expression im Pankreasgewebe zwischen der Kontrollgruppe und der Hyperthermie präkonditionierten Gruppe. B: Vergleich der HSP70 Expression in isolierten Azinuszellen zwischen der Kontrollgruppe und der Hyperthermie präkonditionierten Gruppe. (K_p = HSP70 positiv Kontrolle). Gezeigt ist eine Auswahl aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Azinuszellen wurden zunächst hinsichtlich der sekretorischen Blockade nach Hyperstimulation untersucht. Es sollte überprüft werden, ob die Hyperthermie auf die biphasische Sekretionsantwort der Azini bezüglich der Amylase- und Lipase- Ausschüttung einen Einfluß hat.

Azinuszellen reagieren auf die Stimulation mit sub- und supramaximalen CCK-Dosierungen mit einem charakteristischen biphasischen Verlauf der Sekretionsantwort von Amylase und Lipase. Der biphasische Verlauf der Sekretion der Enzyme aus den Azinuszellen ist sowohl bei Zellen nicht vorbehandelter Tiere als auch bei denen von Tieren, die 24h vorher einer Hyperthermiebehandlung unterzogen wurden gleich. Die Zellen aus hyperthermierten Tieren zeigten aber eine Verschiebung des Sekretionsmaximums hin zu höheren CCK-Konzentrationen. Das Maximum bei den Kontrollen lag bei 300 pM CCK, bei der vorbehandelten Gruppe dagegen bei 1 nM CCK, bis es zur Auslösung der sekretorischen Blockade kam. Diese Zellen scheinen somit robuster gegenüber unphysiologischen CCK-Dosierungen zu sein.



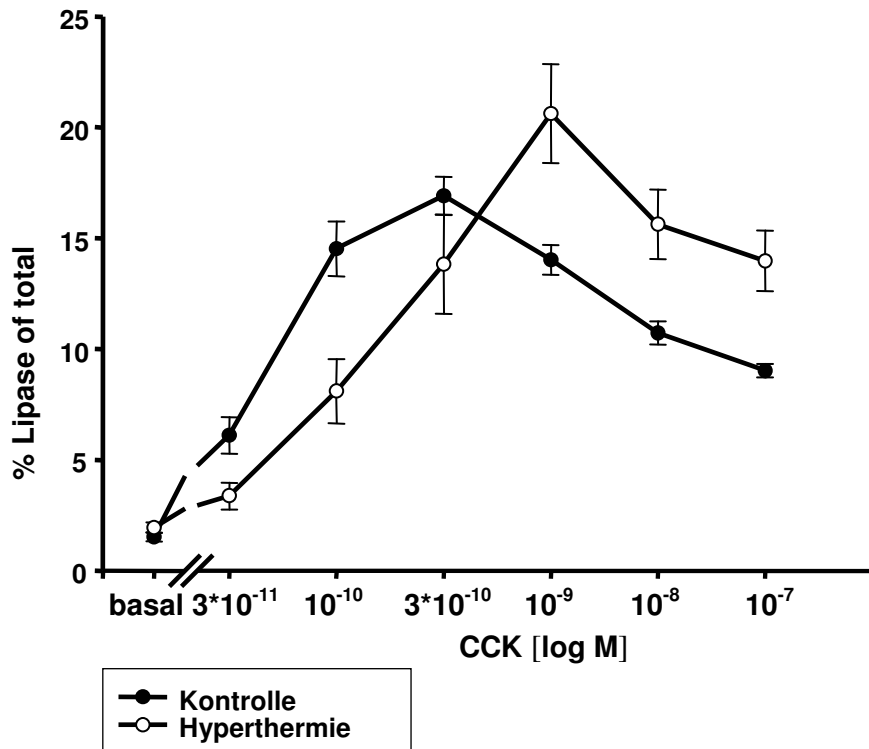


Bild 2.9: Sekretionsverhalten von Amylase und Lipase in Zellen ohne und mit Hyperthermie.

Die obere Abbildung zeigt die CCK-konzentrationsabhängige Sekretion von Amylase aus Azinuszellen, die untere Abbildung gibt das gleiche nochmals für Lipase wieder. Die schwarzen Punkte zeigen das Verhalten von Azinuszellen aus unbehandelten Tieren mit einem Maximum der Sekretionsleistung bei 300 pM CCK und die weißen Punkte das Verhalten von Azinuszellen aus vorher hyperthermierten Tieren mit einem Maximum der Sekretion bei 1 nM CCK. Beiden gemeinsam ist der biphasische Verlauf der Sekretionsleistung. Im Bereich von physiologischen CCK Konzentration kommt es zum linearen Anstieg der Enzymfreisetzung bis hin zu einem Maximum. Anschließend kommt es durch Auslösung der sekretorischen Blockade zu einer Inhibierung der Enzymsekretion. Dargestellt ist eine Graphik aus jeweils 5 voneinander unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM.

2.3.1.3 EINFLUSS DER HYPERTHERMIE AUF FRÜHZEITIGE INTRAZELLULÄRE TRYPSINAKTIVIERUNG

Ein bedeutendes Ereignis in der Frühphase der akuten Pankreatitis ist die frühzeitige, intrazelluläre Aktivierung von Verdauungsenzymen, insbesondere die von Trypsinogen zu Trypsin, das in der Lage ist, die proteolytische Kaskade in Gang zu setzen. Dieses Phänomen scheint eine zentrale Rolle zu spielen für die Pathogenese der akuten Pankreatitis.

Es sollte nun untersucht werden, ob die Hyperthermie auf die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung einen Einfluß hat.

Zunächst wurde das Verhalten von frisch isolierten Azinuszellen von Tieren ohne Präkonditionierung mit Ganzkörperhyperthermie auf die 30-minütige Stimulation mit verschiedenen CCK- Konzentrationen untersucht. Dabei kam es im Bereich physiologischer CCK- Mengen zu keiner Erhöhung des intrazellulären Trypsingehalts im Vergleich zum basalen Trypsin-

wert. Allerdings kam es ab der Gabe von supramaximalen CCK- Dosierungen von 1 nM bis 100 nM zu einem sehr deutlichen steilen Anstieg der intrazellulären Konzentration an aktivem Trypsin in der Azinuszelle. Der Anstieg des freien Trypsins in der Zelle korreliert dabei mit dem Einsetzen der sekretorischen Blockade in den Azinuszellen, die bei CCK- Konzentrationen von 300 pm - 1 nM einsetzt. Ab diesem Punkt sind die Azinuszellen nicht mehr in der Lage Enzyme zu sezernieren.

Nun sollte untersucht werden, ob die Hyperthermie einen Einfluss auf die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung hat.

Dafür wurden Azinuszellen aus dem Pankreas von Tieren frisch isoliert, die 24h vorher einer Ganzkörperhyperthermie unterzogen wurden. Dabei zeigte sich ein völlig anderes Verhalten der Azinuszellen gegenüber den verschiedenen CCK- Konzentrationen als bei Azinuszellen von nicht präkonditionierten Tieren. Es kam bei den Azinuszellen von präkonditionierten Tieren zu einer kompletten Inhibierung der CCK induzierten intrazellulären Trypsinogenaktivierung. Auch bei einer supramaximalen CCK- Konzentration von 100 nM kam es zu keinem Anstieg des Trypsins verglichen mit dem Basalwert. Trotz der oben gezeigten nicht wesentlichen Veränderung im Einsetzen der sekretorischen Blockade bei Azinuszellen von präkonditionierten Tieren und der damit verbundenen Inhibierung der Enzymsezernierung aus der Zelle, unterbleibt die intrazelluläre Trypsinaktivierung gänzlich. Somit zeigte sich, dass Azinuszellen, isoliert aus Zellen präkonditionierter Tiere, geschützt sind gegenüber einer CCK-konzentrationsabhängigen frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung.

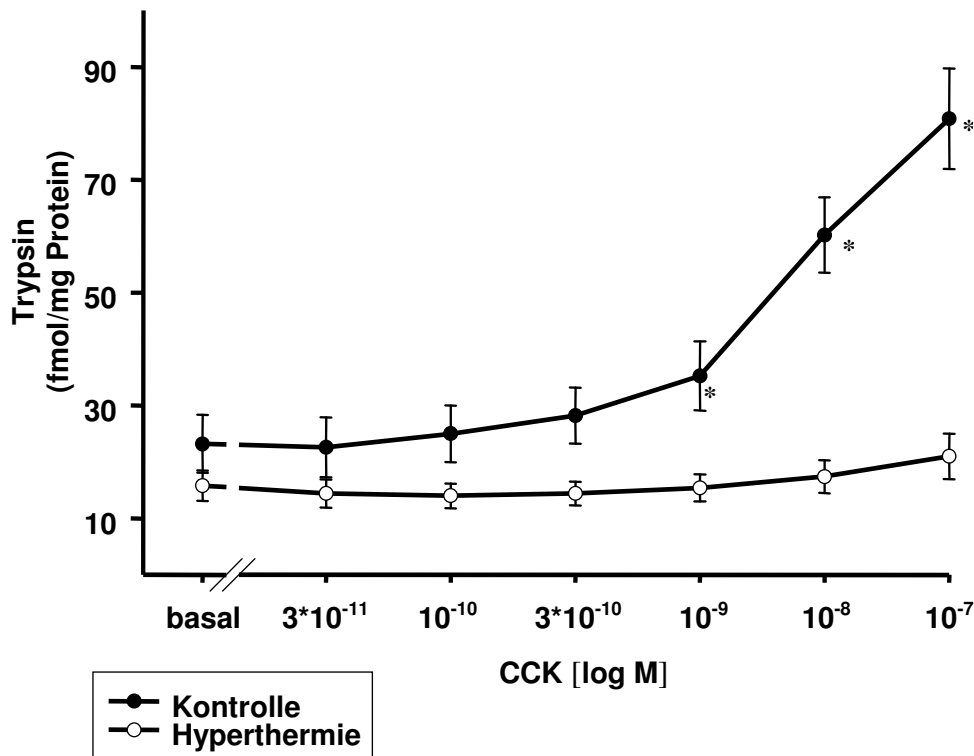


Bild 2.10: *Effekt der Hyperthermie Präkonditionierung auf die frühzeitige intrazelluläre Trypsinogen Aktivierung*

Die schwarzen Punkte zeigen die Trypsinogenaktivierung in Azinuszellen von unbehandelten Tieren. Dabei zeigt sich im Bereich physiologischer CCK- Konzentrationen kein Anstieg der Trypsinaktivität nach 30-minütiger Inkubation. Erst im Bereich supramaximaler CCK- Dosierungen kommt es zu einem steilen Anstieg an freiem Trypsin in der Zelle. Die weißen Punkte zeigen das Verhalten von Azinuszellen isoliert aus Tieren, die 24h vorher einer Hyperthermie unterzogen wurden. Hier zeigt sich, dass es auch bei supramaximalen Dosierungen von CCK zu keiner Aktivierung von Trypsin in der Zelle kommt. Dargestellt ist eine Graphik aus jeweils 5 voneinander unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Hyperthermie betrachtet.

2.3.2 HORMONELLE PRÄKONDITIONIERUNG MIT ANP – EFFEKTE AUF DIE AKUTE EXPERIMENTELLE PANKREATITIS

Die Präkonditionierung mit Ganzkörperhyperthermie mit Induktion von HSP70 und anderen Hitzeschockproteinen zeigte einen protektiven Effekt bei der akuten experimentellen Pankreatitis in einer Reihe verschiedener Modelle. Eine Präkonditionierung wäre zumindest theoretisch geeignet, die Inzidenz und den Schweregrad bei der iatrogen bedingten Pankreatitis, z.B. nach ERCP oder extrakorporalem Kreislauf in der Herzchirurgie, zu reduzieren. Klinisch ist so eine Hyperthermie zur Präkonditionierung nicht einsetzbar. Daher ist die Suche nach alternativen z.B. pharmakologischen Möglichkeiten einer (vgl. 1.4.4 S.17) Präkonditionierung mit Induktion von HSP70 von besonderem Interesse. Eine interessante Möglichkeit bietet die hormonelle Präkonditionierung mit dem Atrial Natriuretischen Peptid (ANP). Die Untersu-

chung der Effekte von ANP auf das Pankreas, die Induktion von HSPs, insbesondere HSP70 und die experimentelle Pankreatitis standen damit im Zentrum des Interesses dieser Arbeit.

In Modellen der isoliert perfundierten Rattenlebern konnte gezeigt werden, dass ANP zur Präkonditionierung und Protektion gegen Ischämie/Reperfusionsschäden schon erfolgreich eingesetzt werden konnte (Bilzer *et al.*, 1994). ANP ist in der Lage in der Leber HSP70 zu induzieren und darüber seinen protektiven Effekt zu bewirken (Kiemer *et al.*, 2002). Da Azinuszellen ANP- Rezeptoren aufweisen, wurde untersucht, ob ANP auch im Pankreas HSP70 induzieren kann und es durch diese hormonelle Präkonditionierung zu einer Protektion gegenüber einer akuten experimentellen Pankreatitis kommt. Der Nachweis einer pharmakologisch durchführbaren Präkonditionierung wäre eine vielversprechende Option auf eine klinisch einsetzbare Methode zur Prävention vor der iatrogen bedingten Pankreatitis. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind inzwischen publiziert (Ploessl *et al.*, 2004).

2.3.2.1 EINFLUSS VON ANP AUF cGMP-SPIEGEL

Da die Effekte von ANP über cGMP vermittelt werden, wurde zunächst die Reaktion von frisch isolierten Azinuszellen auf die Stimulation mit ANP untersucht. Damit sollte zum einen der Effekt der Stimulation auf die cGMP Produktion in Azinuszellen untersucht und zum anderen unser System überprüft werden, um die Reproduzierbarkeit der aus der Literatur bekannten Daten zu gewährleisten (Heisler *et al.*, 1987).

Dafür wurden nun frisch isolierte Azinuszellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von ANP stimuliert. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur ein deutlicher Anstieg des cGMP in Azinuszellen durch die Behandlung mit ANP. Dabei war zu beobachten, dass eine Konzentration von 1 nM ANP nur einen sehr geringen Effekt hat, dagegen 10 nM zu einer 12-fachen Steigerung des cGMP Spiegels nach fünf- minütiger Inkubation führte. Eine weitere Erhöhung der ANP Konzentration bis zu 1 μ M führte zu keiner weiteren Steigerung des cGMP Spiegels, sondern es stellte sich nach Erreichen des Maximums ein Plateau ein.

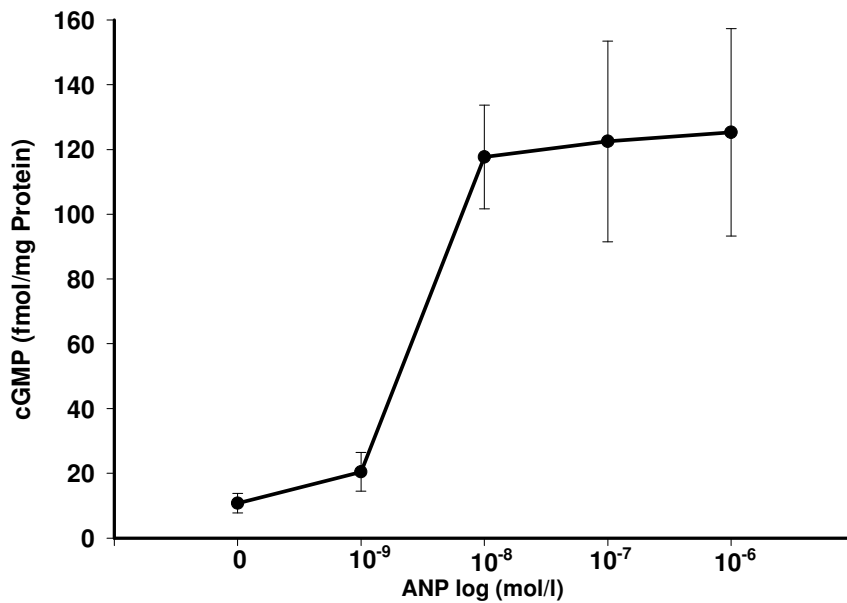


Bild 2.11: Dosisabhängiger Anstieg des intraaziniären cGMP Gehaltes nach Stimulation mit ANP

Azini wurden 5 min mit den entsprechenden Konzentrationen an ANP inkubiert. Eine maximale Stimulation mit 12-fachem Anstieg des cGMP Gehaltes wurde mit 100 nM ANP beobachtet. Mit höheren Konzentrationen bis zu 1 μ M ANP kam es zu einer Sättigung der cGMP Sekretion, aber zu keiner Inhibierung. Dargestellt ist eine Graphik aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM.

2.3.2.2 EINFLUSS VON ANP AUF DEN MITTLEREN ARTERIELLEN DRUCK

Für die Präkonditionierung der Leber wurde ANP in einer Dosierung von 200 nM eingesetzt. In Anlehnung an die protektiven Effekte dieses Modells wurden vergleichbare Bedingungen für das in vivo Modell der akuten experimentellen Pankreatitis verwendet und ANP in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt. Die zugrundeliegende Berechnung der perfundierten Menge ANP ist in Kapitel 4.3.2 S.40 dargelegt.

Nach einer Infusion von 40 μ g/kg/min ANP über einen Zeitraum von 20 min konnte im Plasma eine Konzentration von durchschnittlich 54 nM ANP gemessen werden. Nachfolgend wurden Experimente mit 80 μ g/kg/min ANP durchgeführt und dabei zeigten sich ANP-Plasmakonzentrationen von 179 nM. Aufgrund der sehr großen Menge an ANP und der bekannten blutdrucksenkenden Wirkung von ANP wurde in einer Versuchsreihe die Beeinflussung des Blutdrucks durch eine ANP-Infusion untersucht. Hierfür wurde die Arteria femoralis kanüliert und der mittlere arterielle Druck kontinuierlich gemessen. Es zeigte sich, dass es durch ANP zu einer deutlichen Absenkung des Blutdrucks um 25-30% vom Normaldruck kommt. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen Ratten die mit 40 μ g/kg/min ANP oder mit 80 μ g/kg/min ANP behandelt wurden. Unbehandelte Tiere wiesen einen durchschnittlichen mittleren arteriellen Druck von 105 \pm 2,8 mmHg auf, wohingegen es bei mit

80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ANP behandelten Tieren zu einer starken Reduktion des MAP auf Werte von $77 \pm 3,6$ mmHg innerhalb von 20 min kam. Nach Beendigung der ANP-Infusion normalisierte sich der MAP innerhalb von 10 Minuten und erreichte wieder Normalwerte. Im Gegensatz zum MAP blieb die Herzfrequenz unbeeinflusst, was in anderen Studien schon gezeigt wurde (Harrison-Bernard *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1987). Die durch ANP verursachte starke Senkung des MAP konnte durch eine gleichzeitige Infusion von isotonischer Kochsalzlösung reduziert werden. Dabei wurde beobachtet, dass der MAP bei gleichzeitiger Gabe von 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ANP und 2,5 ml 0,9% NaCl über einen Zeitraum von 20 min nur mehr auf einen Wert von $88,2 \pm 3,4$ mmHg absank. Aufgrund dieser Ergebnisse erhielten in allen darauffolgenden Experimenten die Tiere entweder 40 bzw. 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ANP in 2,5 ml 0,9% NaCl oder 125 $\mu\text{l}/\text{min}$ 0,9% NaCl alleine innerhalb von 20 min. Eine Infusion von 2,5 ml 0,9% NaCl alleine weist keinen Effekt auf den Blutdruck auf.

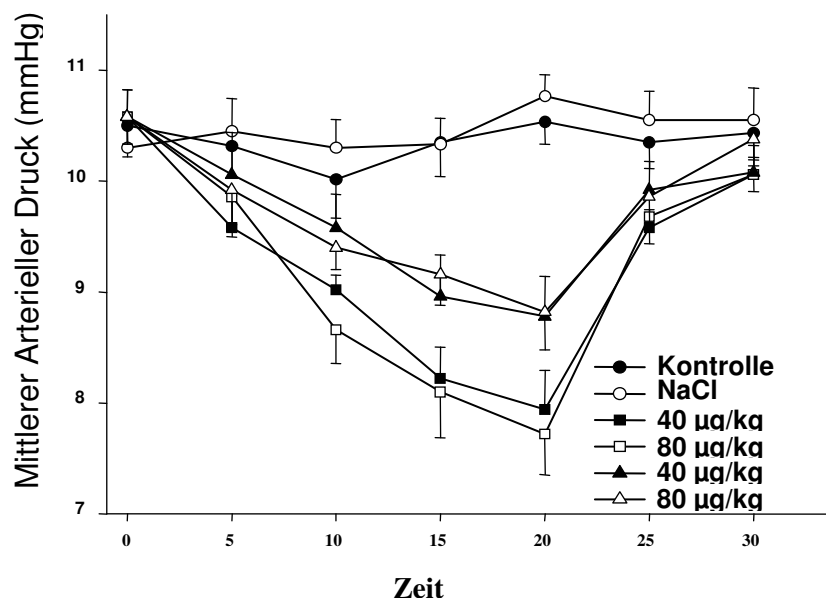


Bild 2.12: ANP senkt den arteriellen Mitteldruck.

Sowohl 40 als auch 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ANP führen zu einer deutlichen Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks innerhalb von 20 min (weiße und schwarze Quadrate). Der Ausgangsblutdruck wird innerhalb von 10 min nach Absetzen der Infusion wieder erreicht. Gemeinsame Infusion mit 2,5 ml 0,9% NaCl reduziert das Ausmaß der blutdrucksenkenden Wirkung (weiße und schwarze Dreiecke). Die schwarzen und weißen Punkte zeigen den Verlauf des Blutdrucks genuin und mit Gabe von 0,9% NaCl.

2.3.2.3 EINFLUSS VON ANP AUF DIE AKUTE EXPERIMENTELLE PANKREATITIS

Im Anschluss an diese Vorversuche sollte nun der Effekt der hormonellen Präkonditionierung mit ANP auf eine mögliche Protektion des Pankreas vor einer akuten Caerulein- induzierten Pankreatitis am in vivo Modell untersucht werden.

Aufgrund der in 2.2.1 und 2.2.2 dargestellten Ergebnisse wurden folgende experimentelle Bedingungen für die Untersuchung des protektiven Effektes auf die experimentelle Pankreatitis gewählt.

ANP wurde zusammen mit 2,5 ml 0,9% NaCl, um den Blutdruck stabil zu halten und ein zu starkes Absenken des Blutdrucks zu vermeiden, in einer Dosierung von 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ oder 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ über 20 Minuten i.v. verabreicht. Dafür wurden die Ratten narkotisiert und ein zentralvenöser Katheter in die Vena jugularis gelegt, über den anschließend das ANP/NaCl-Gemisch infundiert wurde.

In einer ersten Versuchsreihe erfolgte die Induktion der Pankreatitis mit Caerulein direkt im Anschluss an die ANP Infusion, in Analogie zu den verwendeten Protokollen in Modellen des Ischämie/Reperfusionsschadens der Leber (Bilzer *et al.*, 1994; Gerbes *et al.*, 1998).

In einer zweiten Versuchsreihe erfolgte die Induktion der Pankreatitis mit Caerulein 24h nach erfolgter ANP Gabe. Dies geschah in Anlehnung an das Präkonditionierungsmodell mit Hyperthermie.

Kontrollen erhielten ausschließlich 2,5 ml NaCl ohne ANP.

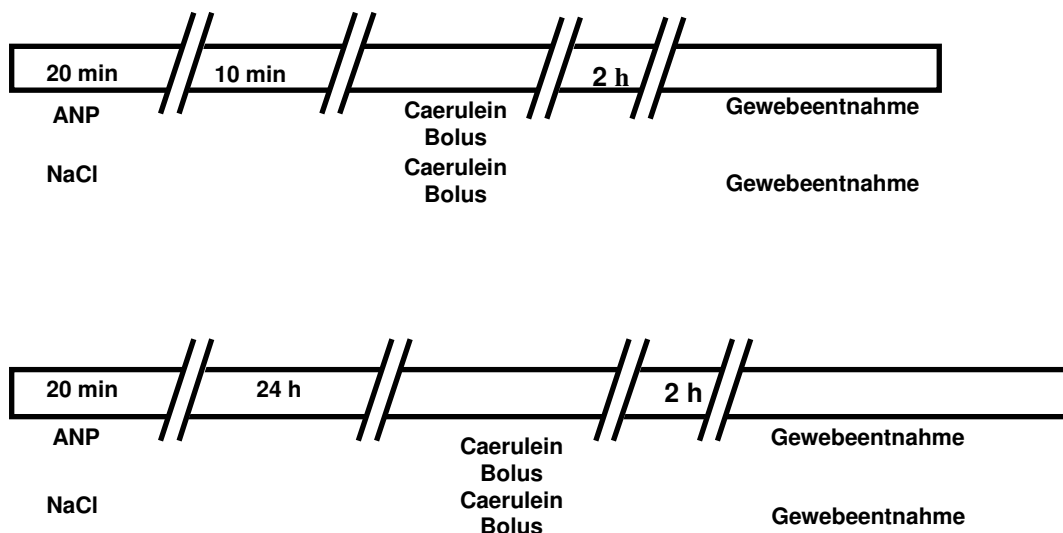


Bild 2.13: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens zur Induktion der Caerulein-Pankreatitis nach Präkonditionierung.

Während in der ersten Versuchsreihe Caerulein bereits 10 Minuten nach der ANP Infusion gegeben wurde (oberer Teil) lagen in der anderen Versuchsreihe 24 h zwischen Präkonditionierung und Caerulein Gabe (unterer Teil).

2.3.2.3.1 Ermittlung der nötigen Caerulein-Dosierung für die Induktion einer experimentellen Pankreatitis

Die Induktion einer akuten experimentellen Pankreatitis bei Tieren erfolgt standardmäßig durch die Verwendung von Caerulein. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Analogon zu Cholezystokinin (CCK), das sich von diesem nur durch zwei zusätzliche Aminosäuren unterscheidet, die sich im Anschluss an das für die biologische Aktivität zwingend notwen-

ge Heptapeptid befinden. Die Wirkungen von Caerulein und CCK auf das Pankreas sind aber identisch.

Da die Induktion einer Pankreatitis durch Caerulein dosisabhängig ist, erfolgte zunächst eine Dosisfindung, um die genaue Menge an Caerulein zu ermitteln, die nötig ist, um eine Pankreatitis zu induzieren und damit sowohl auf biochemischer wie auch auf histologischer Ebene charakteristische Veränderungen hervorzurufen.

Dabei wurde zuerst eine Dosis von 10 µg/kg Körpergewicht Caerulein i.v. verabreicht. Dabei kam es aber lediglich zu einer geringfügigen Veränderung der biochemischen Parameter. Die Serum- Amylase Spiegel stiegen von basal 1003 ± 191 U/l auf 2210 ± 463 U/l ($p=0.043$) und die entsprechenden Lipase Werte lagen basal bei $2,45 \pm 0,38$ U/l und stiegen nach Caeruleingabe auf $59 \pm 22,5$ U/l ($p=0,026$). Die Werte an aktiven Trypsin im Pankreas lagen basal bei $3,43 \pm 0,4$ fmol/mg Protein und stiegen auf $10,25 \pm 1$ fmol/mg Protein ($p=0,000085$) nach Caeruleingabe. Das prozentuale Verhältnis von Trocken- zu Gesamtgewicht, welches eine Aussage über das Ausmaß der Ödembildung macht, sank von $25,03 \pm 0,75$ % auf $21,6 \pm 0,41$ %. Im Gegensatz dazu konnten histologische Veränderung des Pankreasgewebes kaum beobachtet werden.

Deshalb wurde die Caeruleindosis zum einen auf 50 µg/kg und zum anderen auf 100 µg/kg erhöht. Hierbei zeigten sich die erwarteten biochemischen und auch histologischen Veränderungen aller Parameter 2 h nach der Gabe von Caerulein.

Serum- Amylase Spiegel stiegen nun von basal 1003 ± 191 U/l auf 2995 ± 147 U/l ($p=0.000066$) nach der Bolusgabe von 50 µg/kg Caerulein und auf 3884 ± 820 U/l ($p=0.0024$). Für die Lipase ergaben sich Veränderungen von basal $2,45 \pm 0,38$ U/l auf 264 ± 84 U/l ($p=0,03$) und 251 ± 48 U/l ($p=0,0035$).

Die Änderung des Pankreas- Trypsingehalts stellt sich dar in einer Steigerung des Basalwertes von $3,43 \pm 0,4$ fmol/mg Protein auf $20,12 \pm 4.34$ fmol/mg Protein ($p=0,00071$) und $34,6 \pm 11.3$ fmol/mg Protein ($p=0,0025$).

Das Verhältnis von Trocken- zu Gesamtgewicht sank von basal $25,03 \pm 0,75$ % auf $17,67 \pm 1,29$ % ($p=0,00071$) und weiter auf $15,64 \pm 1.24$ % ($p=0,00048$).

Bei den höheren Caerulein- Konzentrationen waren nun auch histologische Veränderungen des Pankreasgewebes zu sehen. Der histologische Score stieg von $3,0 \pm 0$ auf $6,67 \pm 0,67$ ($p=0,005$) nach 50 µg/kg Caerulein und $7,0 \pm 1$ ($p=0,016$) nach der Gabe von 100 µg/kg Caerulein.

Obwohl 100 µg/kg Caerulein zu etwas stärkeren Veränderungen der pankreatitisspezifischen Parameter führte, war aber kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten, vergli-

chen mit der Gabe von 50 µg/kg Caerulein. Deshalb wurden alle folgenden Experimente mit der Gabe eines Caeruleinbolus von 50 µg/kg durchgeführt um eine Pankreatitis zu induzieren.

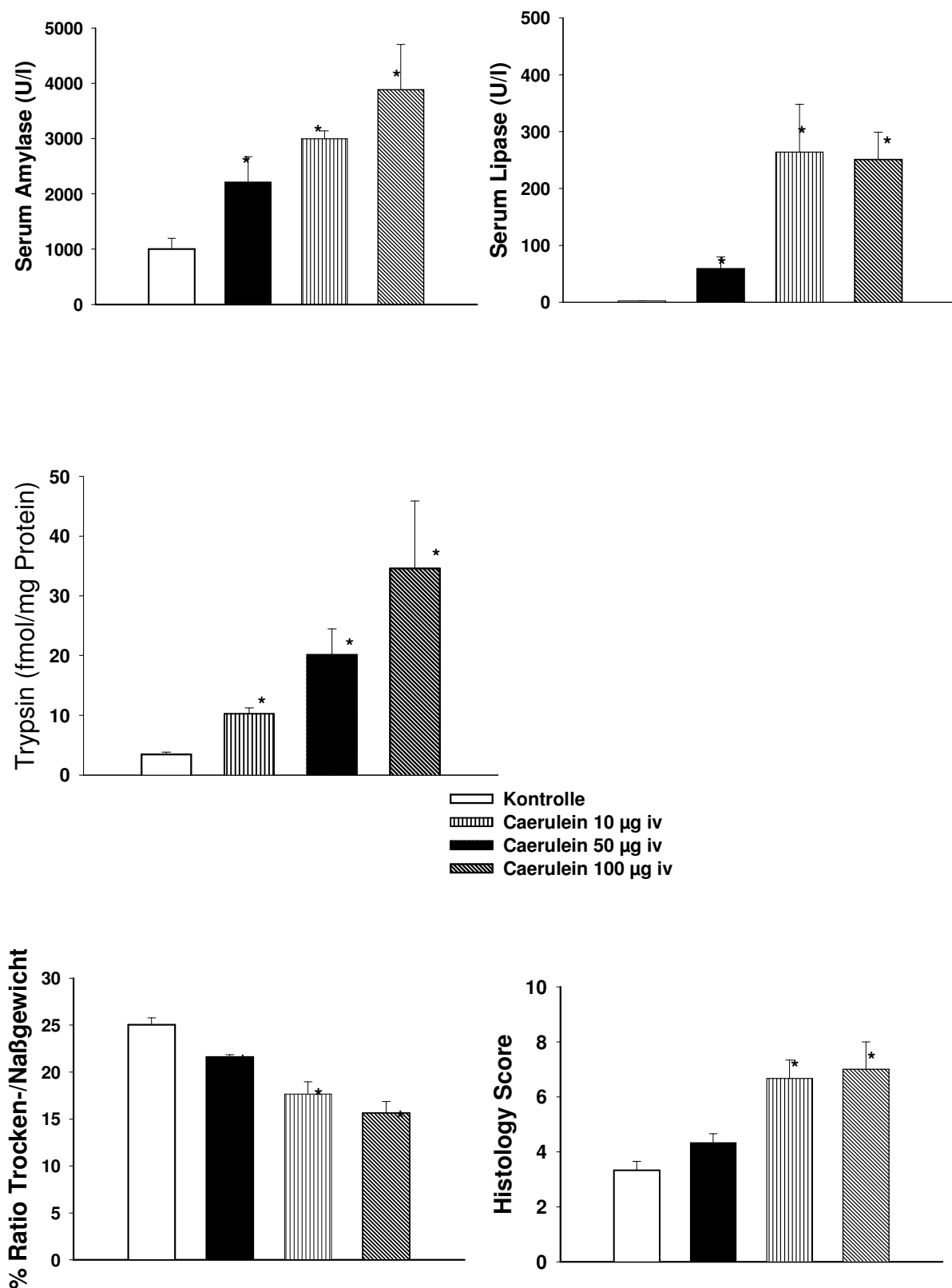
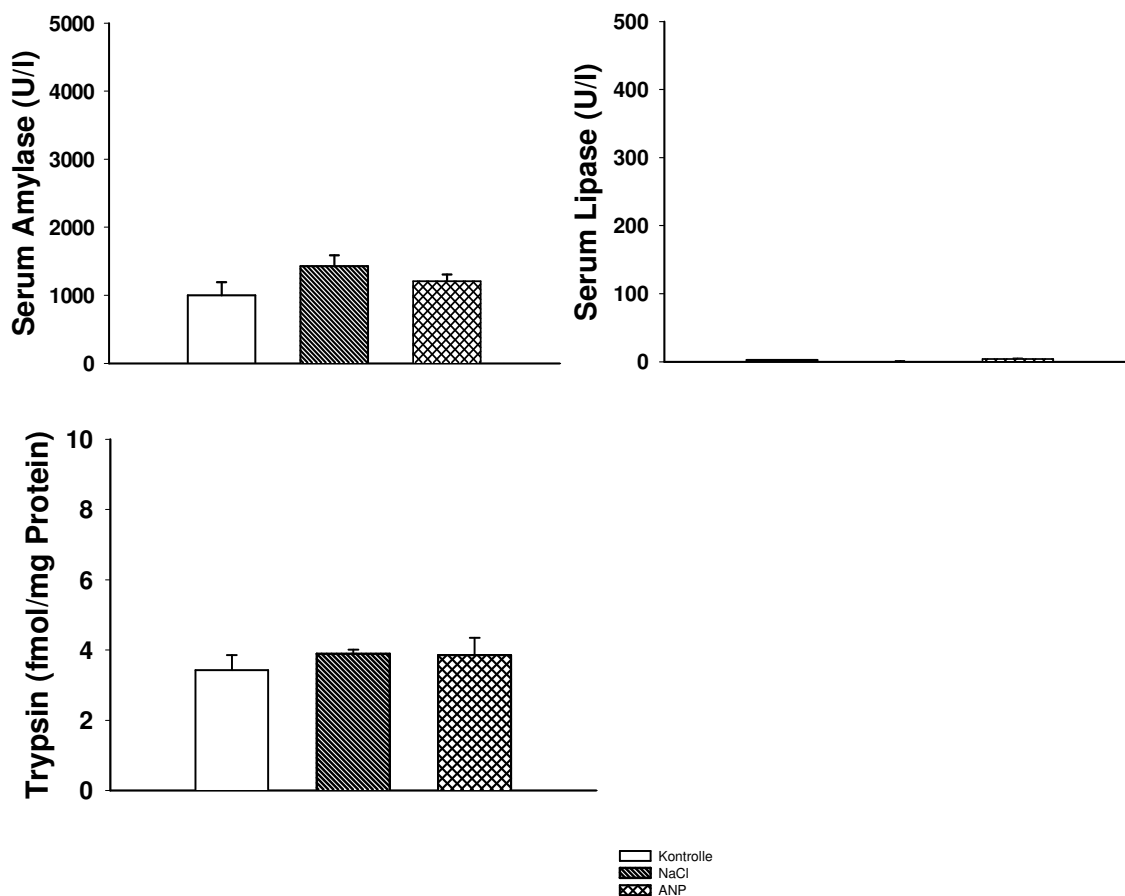


Bild 2.14: Dosisabhängige Caeruleineffekte auf biochemische und histologische Parameter der Pankreatitis

Versuchstiere erhielten 10, 50 oder 100 µg Caerulein in Form einer i.p. Bolusinjektion. Kontrollen erhielten keine Behandlung. Typische Parameter für eine Pankreatitis wurden 2h nach Abschluss der Behandlung beurteilt. In Abhängigkeit von der Caeruleindosis stiegen alle Pankreatitisparameter an. Dargestellt sind die Graphiken aus 3-5 voneinander unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

Um sicherzugehen, dass weder ANP noch NaCl einen Einfluss auf biochemische und histologische Pankreasparameter hat, wurde die Auswirkung einer ANP- bzw. NaCl- Infusion ohne Gabe von Caerulein auf die Pankreatitis Parameter untersucht. Dabei zeigten sich, wie erwartet, keinerlei Veränderungen der Parameter verglichen mit den Basalwerten. Die kleinen Unterschiede in den Amylase- und Lipase- Werten zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und einer ANP- bzw. NaCl- Präkonditionierung, sondern stellen normale Werteschwankungen dar. Die einzige Änderung betraf das prozentuale Verhältnis von Trocken- zu Gesamtgewicht, das eine Aussage bezüglich der Stärke der Ödembildung macht, nach ANP-Infusion. Es kam zu einem leichten Anstieg des Wassergehalts, der aber mit der vasodilatierenden Eigenschaft des ANP zu erklären ist (Valentin *et al.*, 1988).



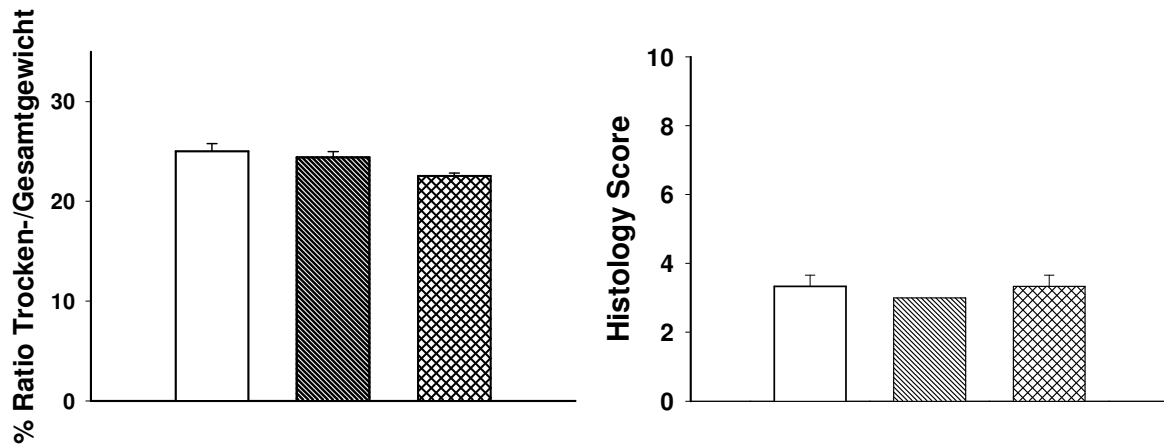


Bild 2.15: Untersuchung des Einfluss von ANP und NaCl alleine auf biochemische und histologische Parameter der Pankreatitis

Versuchstiere erhielten 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ANP in 2,5 ml 0,9% NaCl über 20 min oder 2,5 ml 0,9% NaCl über die Jugularvene. Kontrollen erhielten keine Behandlung. Typische Parameter für eine Pankreatitis wurden 2 h nach Abschluss der Behandlung beurteilt. Dabei zeigte sich, dass ANP und NaCl keinerlei Einfluss auf die biochemischen und histologischen Pankreatitisparameter haben. Die Amylase und Lipase Werte zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und ANP- oder NaCl-Präkonditionierung. Nur ANP wirkte sich leicht auf den Wassergehalt des Pankreas aus. Dargestellt sind die Graphiken aus 3-5 voneinander unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

2.3.2.3.2 Einfluss der ANP Präkonditionierung auf die Pankreatitisparameter

Nach Abschluss der Voruntersuchungen wurde der protektive Effekt der hormonellen Präkonditionierung mit ANP auf das Pankreas bezüglich der akuten experimentellen Pankreatitis untersucht.

Um eine Aussage über die Protektion durch ANP treffen zu können, wurden Ratten direkt im Anschluss an die Präkonditionierung ein Caerulein-Bolus verabreicht. Zwei Stunden nach der Caeruleingabe wurden die pankreatitisspezifischen Parameter analysiert.

Dieser Versuchsaufbau lehnte sich an das Modell an, dass für die Protektion der Ischämie/Reperfusionsschädigung der Leber verwendet wurde (Bilzer *et al.*, 1994; Gerbes *et al.*, 1998).

Bei der Untersuchung der pankreatitisspezifischen Parameter zeigte sich, dass die Behandlung mit ANP keine protektive Wirkung auf den Verlauf der Pankreatitis hat, da es zu keiner Verbesserung der Parameter kam, im Vergleich zu nicht mit ANP vorbehandelten Tieren. So zeigte sich nach der Präkonditionierung mit 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ANP kein Unterschied in der Entwicklung der Pankreatitis und im Schweregrad zu Tieren, die vor der Caeruleingabe nur NaCl statt ANP infundiert bekamen. Serum-Amylase Spiegel stiegen bei ANP präkonditionierten Tieren auf 3184 ± 407 U/l und bei NaCl behandelten Tieren auf 2910 ± 296 U/l.

Die entsprechenden Werte für Lipase, Trypsin, prozentuale Verhältnis von Trocken- zu Gesamtgewicht und der histologische Befund unterschieden sich auch nicht zwischen den beiden Gruppen:

271±63 U/l und 264±79 U/l für Lipase

19,38±1,57 und 19,55±3,31 fmol/mg Protein für Trypsin

17,67±1,42 % und 17,79±1,43 % für das Pankreasödem und

6,67±0,88 % und 5,67±1,43 % für die histologischen Veränderungen.

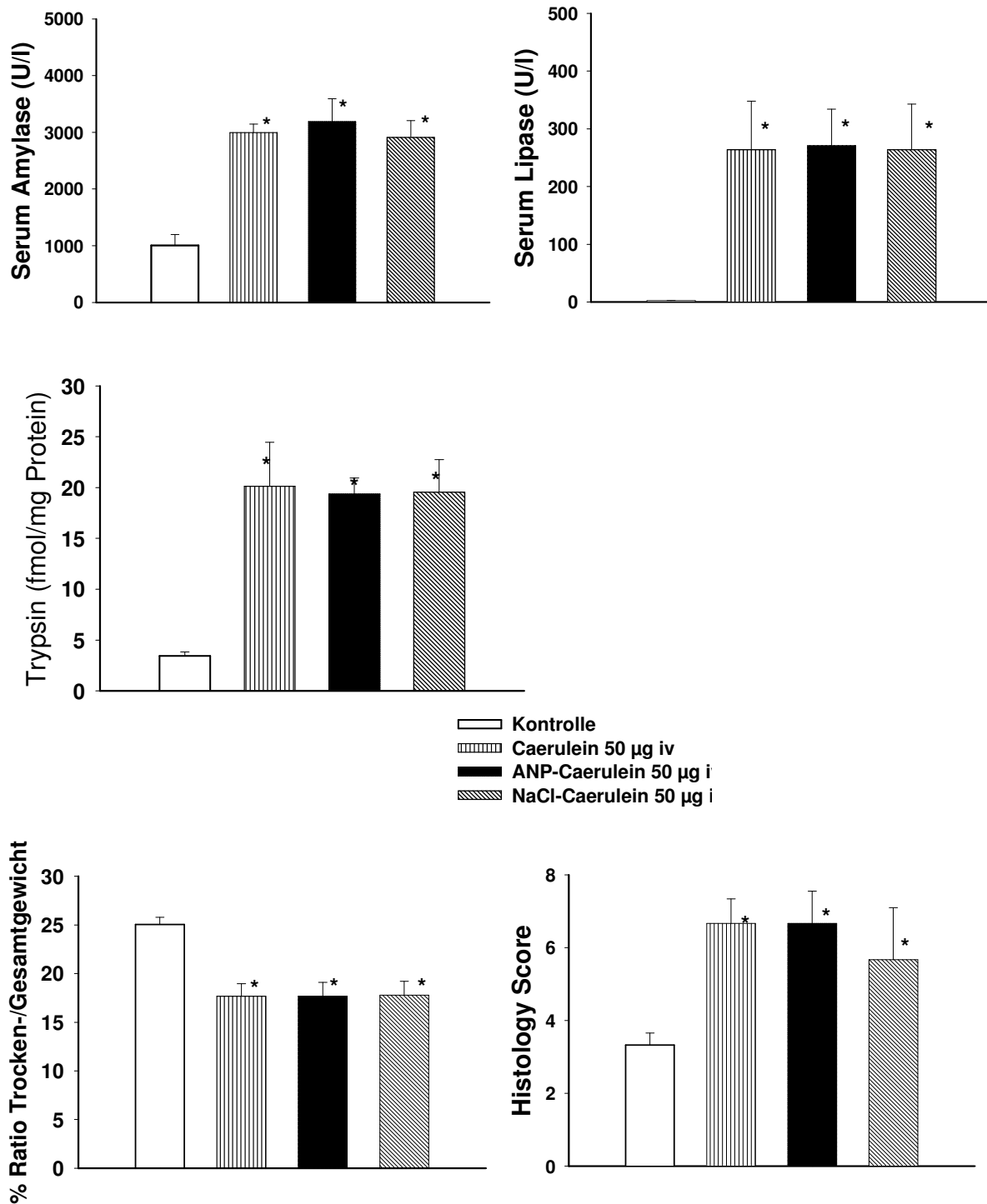


Bild 2.16: Caerulein induzierte Pankreatitis nach ANP Präkonditionierung

Erfolgt die ANP Infusion direkt vor der Caeruleingabe, so kommt es zu keiner feststellbaren Veränderung des Schweregrades der Pankreatitis. Tiere erhielten 80 µg/kg/min ANP direkt vor der Gabe von 50 µg/kg Caerulein. Die Pankreatitis wurde beurteilt durch Messung biochemischer und morphologischer Parameter. Kontrollen erhielten keinerlei Behandlung. Dargestellt sind die Graphiken aus 3-5 voneinander unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine zweite Versuchsreihe konzipiert, bei der in Anlehnung an die Präkonditionierung mit Hyperthermie die Gabe des Caerulein-Bolus von 50 µg/kg Caerulein erst 24h nach durchgeführter ANP- Präkonditionierung erfolgte.

Hierbei konnte eine deutliche Reduktion der meisten Pankreatitisparameter im Vergleich zu Tieren, die keine ANP- Präkonditionierung vor der Caeruleingabe erhalten haben, beobachtet werden. Damit zeigte sich, dass die Präkonditionierung eine Milderung der akuten Pankreatitis bewirken konnte.

Der Vergleich der pankreatitisspezifischen Parametern zwischen der Versuchsgruppe mit direkter Gabe des Caerulein und der Versuchsgruppe, die erst 24 h nach der Präkonditionierung Caerulein verabreicht bekamen, zeigt eine deutliche Reduktion der meisten Parameter. Die einzige Ausnahme waren die Serum- Amylase Spiegel, die nach wie vor sehr hoch waren und sich nicht durch die Präkonditionierung 24 h vor der Caeruleingabe senken ließen.

	Caeruleingabe direkt im Anschluss an Präkonditionierung	Caeruleingabe 24h nach Präkonditionierung
Amylase	2995 \pm 147 U/l	3391 \pm 540 U/l
Lipase	264 \pm 84 U/l	33 \pm 11 U/l
Trypsin	20,12 \pm 4,34 fmol/mg Protein	9,21 \pm 0,4 fmol/mg Protein
Pankreasödem	17,67 \pm 1,42 %	22,44 \pm 0,66 %
Histologischer Befund	6,67 \pm 0,88	3,67 \pm 0,33

Tabelle 2.1 Pankreatitisspezifische Parameter nach ANP-Präkonditionierung mit direkter Caeruleingabe und 24 h nach erfolgter Präkonditionierung.

Darüber hinaus zeigte sich aber, dass auch bei Tieren die nur eine Infusion von 2,5 ml 0,9% NaCl ohne ANP 24 h vor der Caeruleingabe erhielten, der Schweregrad der Pankreatitis deutlich schwächer war. Das Ausmaß der Protektion ist dabei vergleichbar mit dem, das durch ANP hervorgerufen wurde. Auch bei den histologischen Veränderungen des Pankreasgewebes infolge einer Caerulein induzierten Pankreatitis konnte ein protektiver Effekt durch die Vorbehandlung 24 h vor der Caeruleinbolusgabe beobachtet werden. Allerdings war die Protektion wiederum unabhängig von der Art der Präkonditionierung. Sowohl die Behandlung mit ANP als auch mit 0,9% NaCl alleine führten zu einer deutlichen Verbesserung des histologischen Befundes.

	Caeruleingabe 24h nach Infusion von 0,9% NaCl	Caeruleingabe 24h nach ANP-Präkonditionierung
Amylase	3528±792 U/l	3391±540 U/l
Lipase	151±43 U/l	33±11 U/l
Trypsin	9,02±0,73 fmol/mg Protein	9,21±0,4 fmol/mg Protein
Pankreasödem	21,01±0,7 %	22,44±0,66 %
Histologischer Befund	3,33±0,33	3,67±0,33

Table 2.2 Pankreatitisspezifische Parameter 24 h nach ANP-Präkonditionierung und 24 h nach Infusion von 0,9% NaCl

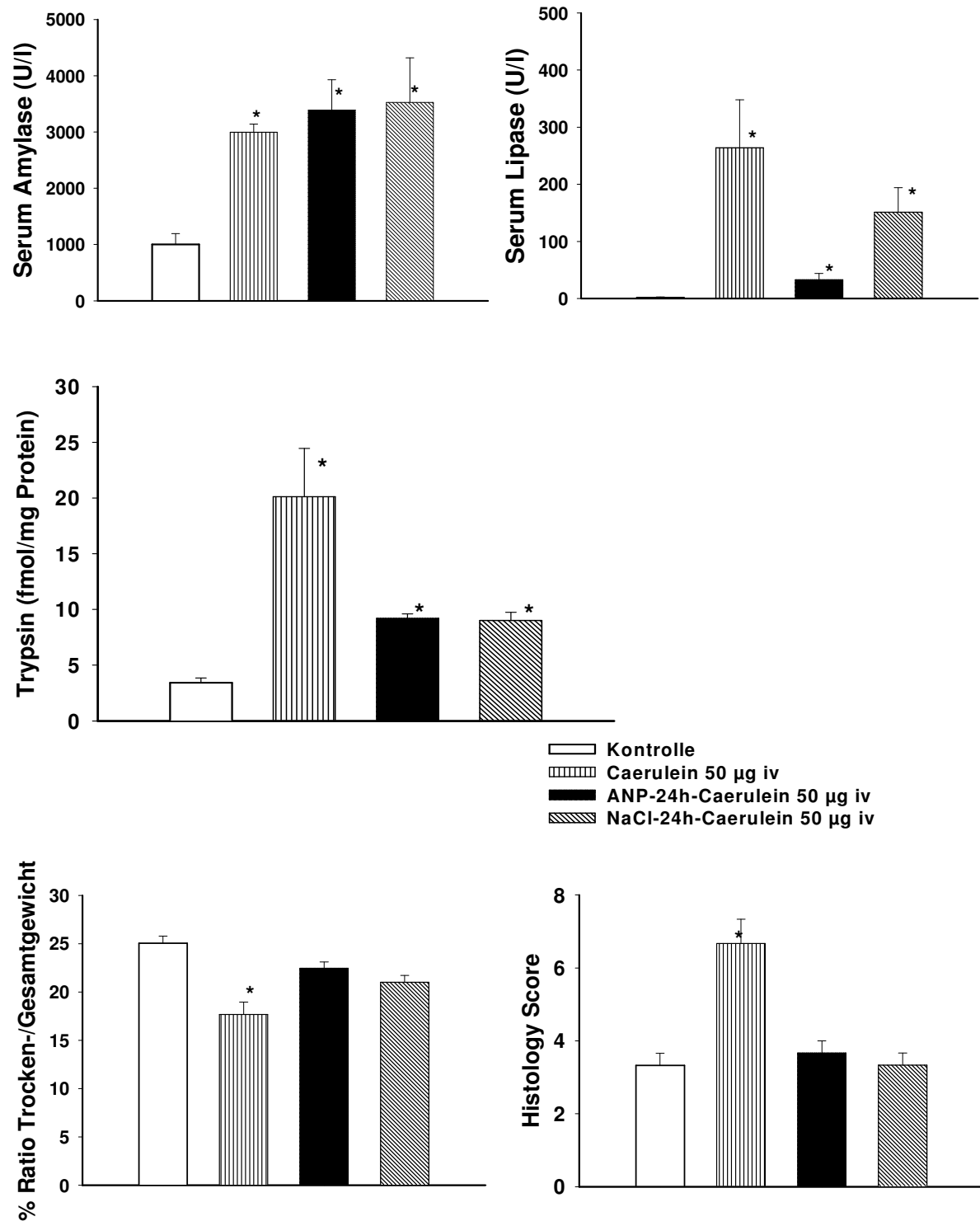


Bild 2.17: Caerulein induzierte Pankreatitis nach ANP Präkonditionierung

Tiere erhielten 80 µg/kg/min ANP oder 0,9% NaCl 24 h vor der Gabe von 50 µg /kg Caerulein. Pankreatitis wurde beurteilt durch Messung biochemischer als auch morphologischer Parameter. Kontrollen erhielten keinerlei Behandlung. Eine Vorbehandlung mit ANP oder 0,9% NaCl unter Anästhesie 24 h vor der Caeruleingabe führte jeweils zu einer Reduktion des Schweregrades. Dargestellt sind die Graphiken aus 3-5 voneinander unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

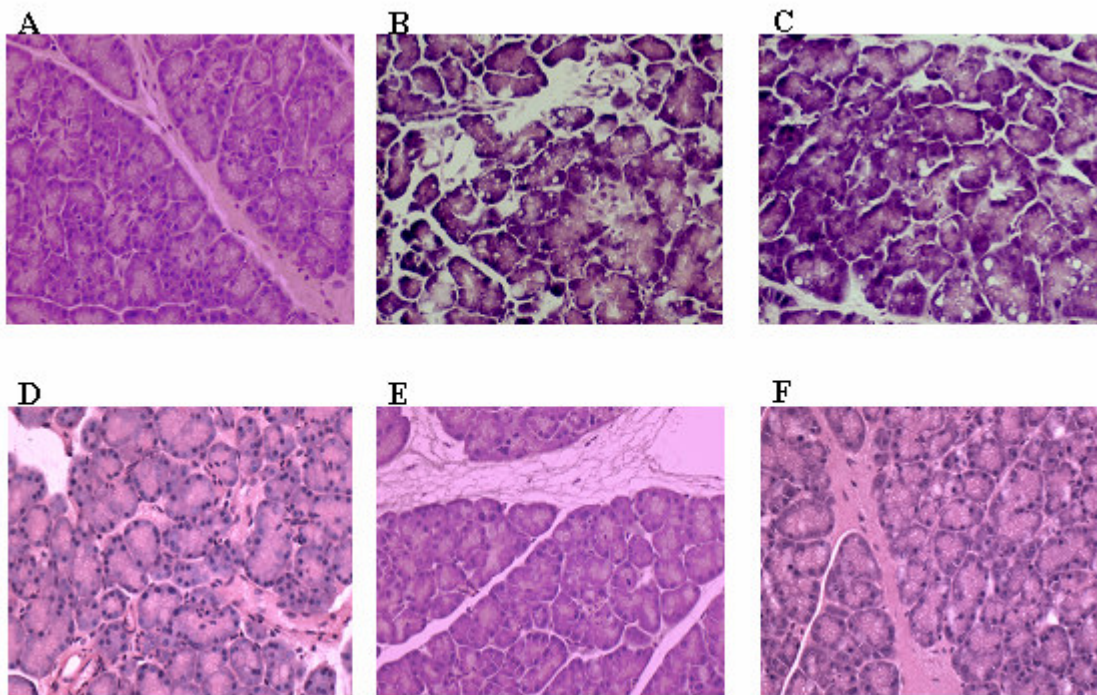


Bild 2.18: Präkonditionierung vermindert den histologischen Schweregrad der caeruleininduzierten Pankreatitis

Bild A zeigt Pankreasgewebe eines Tieres ohne Behandlung. Bild B: 2,5 ml 0,9 % NaCl direkt vor Caeruleingabe; Bild C: ANP Gabe direkt vor Caerulein- Bolus; Bild D: nur Gabe von ANP; Bild E: 2,5 ml 0,9 % NaCl 24 h vor Caeruleingabe; Bild F: ANP 24 h vor Caeruleingabe. Typische Caerulein induzierte Veränderungen des Pankreasgewebes wurden durch eine direkt vorher durchgeführte Infusion von ANP oder 0,9 % NaCl ohne ANP nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu waren die histologischen Veränderungen des Pankreasgewebes 24 h nach Präkonditionierung weniger stark ausgeprägt, allerdings unabhängig davon, ob die Vorbehandlung mit ANP oder mit 0,9 % NaCl alleine erfolgte.

2.3.2.3.3 Induktion von HSP70 durch ANP

Die Hormonelle Präkonditionierung wurde am Modell des Ischämie/Reperfusionsschaden schon erfolgreich untersucht und man hat dabei entdeckt, dass ANP eine Induktion von HSP70 im Lebergewebe bewirkt und darüber wohl der protektive Effekt von ANP zustande kommt, da Hitzeschockproteine eine Protektion gegenüber Stressereignissen bieten. Die Induktion der Expression von HSP70 durch ANP erfolgt vermutlich über eine Aktivierung des HSF (Kierner *et al.*, 2002). Deshalb wurde das Pankreasgewebe der präkonditionierten Ratten auf die Expression von HSP70 mittels Western Blot untersucht.

Dabei zeigte sich, dass eine 20-minütige ANP Infusion alleine vom Zeitraum her wohl zu kurz ist, um eine sichtbare und signifikante Hochregulation von HSP70 im Pankreasgewebe zu induzieren. Dagegen lässt sich nach 24 h eine deutliche Induktion von HSP70 im Pankreas

beobachten. Die Expression war dabei aber deutlich schwächer ausgeprägt, als sie nach einer Hyperthermie Präkonditionierung zu beobachten ist.

Allerdings war auch bei Tieren die nur mit 0,9 % NaCl ohne ANP vorbehandelt wurden, eine vergleichbare Expression von HSP70 im Pankreasgewebe zu erkennen. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass für die Induktion der HSP70 Expression und der beobachteten Protektion hauptsächlich die Anästhesie und Katheterisierung der Jugularvene verantwortlich sind und weniger die ANP Behandlung.

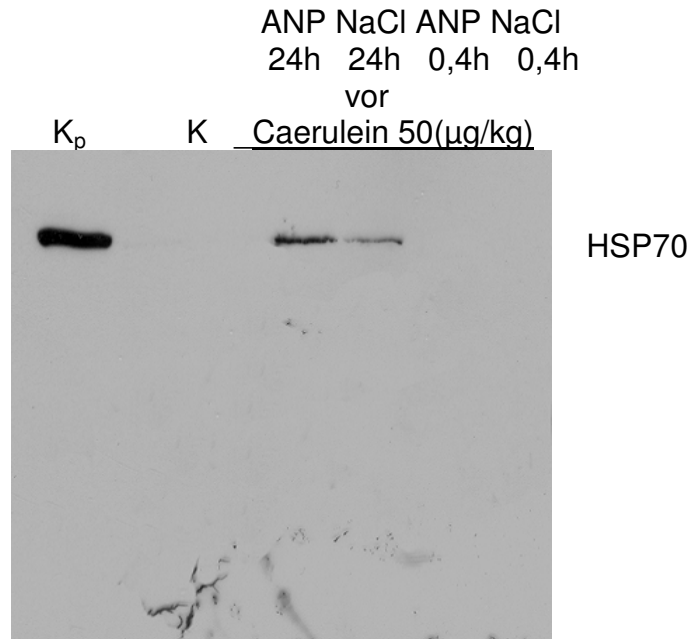


Bild 2.19: HSP70 Expression nach Präkonditionierung in Narkose

Im Western Blot zeigte sich, dass HSP70 weder nach 20-minütiger ANP- oder 0,9 % NaCl-Infusion im Pankreas exprimiert wird. Dagegen zeigt sich eine schwache HSP70 Expression im Pankreas 24 h nach erfolgter Präkonditionierung mit ANP und 0,9 % NaCl ohne ANP. (K_p = HSP70 positiv Kontrolle, K = Kontrolle ohne eine Vorbehandlung)

2.3.3 GENERIERUNG TRANSGENER MÄUSE – SELEKTIVE ÜBEREXPRESSION VON HSP70 IM PANKREAS

Die Hyperthermie-induzierte Protektion des Pankreas vor einer Pankreatitis, durch die gesteigerte Expression von Hitzeschockproteinen im Pankreasgewebe, ist nicht nur im Rahmen dieser Arbeit, sondern auch von anderen Forschergruppen eingehend untersucht und verifiziert worden. Das protektive Agens und der protektive Mechanismus konnten aber noch nicht eindeutig dargestellt werden. In unserer Arbeitsgruppe wird HSP70 eine zentrale Rolle für die Protektion zugeschrieben. Mit dem Ziel, diese Vermutung eindeutig zu beweisen, sollte versucht werden, transgene Mäuse zu generieren, die eine Überexpression der induzierbaren Form von HSP70 aufweisen. Eine transgene Maus würde ein optimales Modell darstel-

len, die Bedeutung von HSP70 für die Protektion des Schweregrades der akuten Pankreatitis zu untersuchen. Durch den eingesetzten Promotor für die Generierung wäre eine selektive Überexpression im Pankreas gewährleistet und damit eine ubiquitäre Expression im Organismus, wie sie nach einer Hyperthermie Behandlung vorliegt, unterbunden. Des weiteren wäre im Gegensatz zu einer Präkonditionierung mit Hyperthermie kein weiteres Hitzeschockprotein im Pankreas hochreguliert. Trotz der erfolgreichen Generierung transgener Mäuse kam es nicht zu einer messbaren Expression von HSP70 Protein im Pankreas, so dass die weiterführenden Fragen nicht beantwortet werden können. Der Vollständigkeit halber sollen die Ergebnisse aber dennoch präsentiert werden.

2.3.3.3 ZUSAMMENBAU DES PLASMIDS

Um eine spezifische Expression im Pankreas zu erreichen, wurde ein Konstrukt hergestellt, das sich aus dem Elastase Promotor, der induzierbaren Isoform des Ratten HSP70 und einem Teil des menschlichen Wachstumshormons zusammensetzt (Bild 4.1 S.47). Im Restriktionsverdau zeigte sich das gewünschte Bandenmuster wie im Bild 2.20 dargestellt.

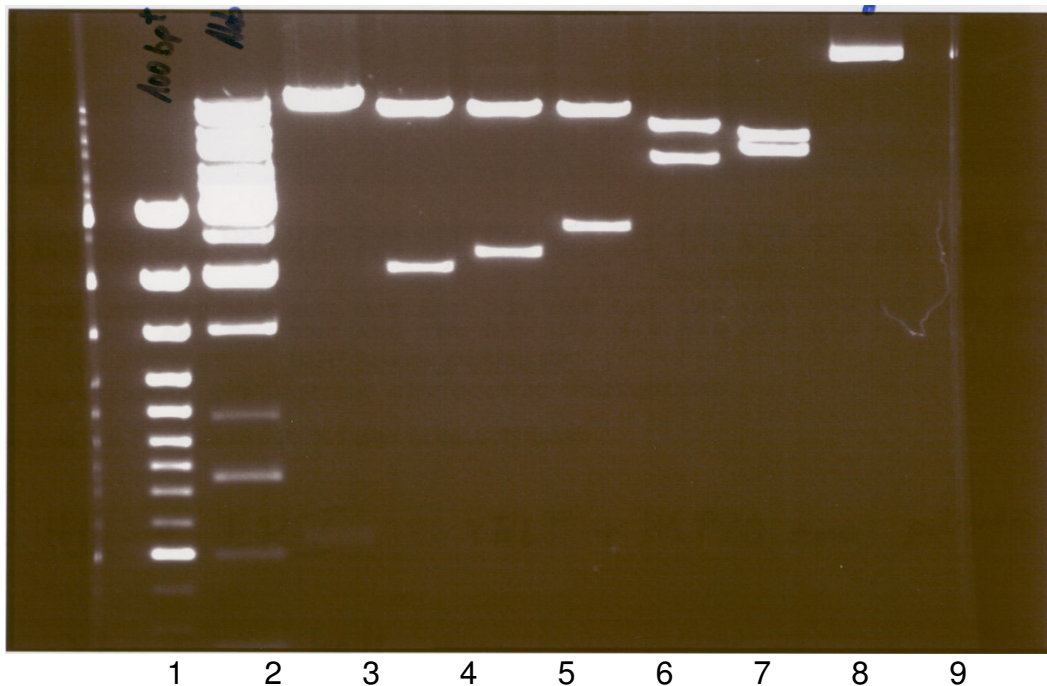


Bild 2.20: Schnittmuster des Restriktionsverdaus

Lane 1 Größenstandard 100 bp

Lane 2 Größenstandard 100 bp

Lane 3 Hind III/BamH I Elastase Promotor 525+9635

Lane 4 BamH I/EcoR V HSP70 1959+8291

Lane 5 Xba hGH 2170+7990

Lane 6 Hind III/EcoR V ELP+HSP70 2484+7676

Lane 7 BamH I/EcoR I HSP70+hGH 4129+6031

Lane 8 Hind III/ EcoR I ELP+HSP70+hGH 4654+5506

Lane 9 ungeschnitten

In Bahn 3 ist die untere Bande bei 525 im eingescannten Bild nicht gut zu erkennen.

caatctcagaaagctcctggctcctggaggatggagagagaaaaacaacagctcctggag-
 cagggagagtgtggcctcttgcctccggctccctctgttgcctctggtttctccc-
 caggctcccggacgtccctgctcctggcttttggcctgctctgcctgcctggcttcaa-
 gagggcagtgccttccaaccattcccttatccaggcttttgaacgctatgctccgcgcc-
 catcgtctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagtttgaagctcttggg-
 gaatgggtgcgcatcagggtggcaggaaggggtgactttccccgctgggaaataagaggag-
 gagactaaggagctcagggttttcccgaagcgaatgcaggcagatgacacacgctgagt-
 gaggtcccagaaaagtaacaatgggagctggtctccagcgt-
 gaccttgggtggcgctctcctaggaagaagcctatatcccaaaggaacagaagtatt-
 cattctgcagaacccccagacctccctctgtttctcagagtctattccgacacctccaa-
 cagggaggaacaacagaaatccgtgagtggatgccttctccccaggcggggatggggga-
 gacctgtagtcagagccccgggcagcacagccaatgcccgtccttcccctgcagaaccta-
 gagctgctccgcatcctcctgctgctatccagtcgtggctggagcccgtgcagttcctcag-
 gagtgtcttcccaacgctggtgtacggcgcctctgacagcaacgtctatgacctcta-
 aaggacctagaggaagcctccaacgctgatgggggtgagggtggcggcagggtccc-
 caatcctggagccccactgactttgagagctgtgtagagaaacactgctgccctttttag-
 cagtcaggccctgaccaagagaactcaccttattcttatttcccctcgtgaatctc-
 caggcctttctacacctgaaggggagggaggaatgaatgaatgagaagggagggaa-
 cagtaccaagcgttggcctctccttcttctccttcttgcagaggctggaagatgg-
 cagccccggactgggcagatctcaagcagacctacagcaagttcgacacaaactcaca-
 caacgatgacgactactcaagaactacgggctgctctactgcttcaggaaggacatgga-
 caagtcgagacattctgcgcatcgtgcagtgccgctctgtggaggcagctgtgcttc-
 tagctgcccgggtggcatccctgtgacctccccagtgctctcctggccctggaagttgc-
 cactccagtgccaccagccttgcctaataaaattaagttgcatctttgtctgac-
 taggtgtccttctataatattatgggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagtgg-
 gaagacaacctgtagggcctgcggggtctattcgggaaccaagctggagtgcagtggca-
 caatcttgctcactgcaatctccgctcctgggttcaagcattctcctgcctcagcctccc-
 gagttgtgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaattttgtttttgttaga-
 gacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaactcaggtgatctacc-
 caccttggcctcccaattgctgggattacaggcgtgaac-
 cactgctccctcctgctcctctgattttaaataactataaccagcaggaggacgtccaga-
 cacagcataggctacctGccatgcccaccgggtgggacatttgagttgcttgg-
 cactgtcctctcatgcgttgggtccactcagtagatgctgtgaattccTctagagggcccggttcgaa

Primer 1 und 2, 528 bp grau hinterlegt

Primer 3 und 4, 349 bp (kursiv umrahmt)

Fett: ATG = HSP70 Start, TAG = HSP70 Stop

Kursiv, Sequenzen aus Vektoren

Kursiv unterstrichen, Sequenz aus Vektor pc dann 3.1-V5-His TOPO

Bild 2.21: Sequenz des Inserts und die Lage der beiden Primerpaare

Die Sequenz des Inserts setzt sich zusammen aus dem Elastase Promotor, der induzierbaren Isoform des Ratten HSP70 und dem Intron des menschlichen Wachstumshormons. Um das Insert eindeutig nachweisen zu können wurden zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt. Das erste Paar liegt zwischen dem Ende des ELP und dem Anfang von HSP70. Das zweite Primerpaar liegt zwischen dem Ende der HSP70 Sequenz und dem Anfang des hGH Introns.

2.3.3.4 HERSTELLUNG VON KOPIENSTANDARDS FÜR DIE PCR GENOTYPISIERUNG

Für die Genotypisierung transgener Tiere mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) muss diese Nachweismethode so konzipiert sein, dass das für die Herstellung der transgenen Tiere verwendete Insert auf Ein-Kopien Ebenen detektiert werden kann. Um nun diese

Sensitivität nachzuweisen, wurden DNA, isoliert aus Schwanzbiopsien von Wildtyp Mäusen, mit definierten Mengen des Inserts vermischt um Kopienstandards des Transgens herzustellen.

Dafür wurden die Kopienstandards folgendermaßen berechnet: es wurde angenommen, dass der Haploide Chromosomensatz eines tierischen Genoms 3×10^9 Basenpaare beträgt und man $2 \mu\text{g}$ Schwanz DNA zur Verfügung hat. Sind die transgenen Foundermäuse homozygot, so errechnet sich die Masse an Insert, die für den jeweiligen Kopienstandard eingesetzt werden muss, wie folgt:

$$\frac{\text{Masse an transgener DNA}}{1 \mu\text{g genomischer DNA}} = \frac{\text{N bp transgener DNA}}{3 \times 10^9 \text{ bp genomischer DNA}}$$

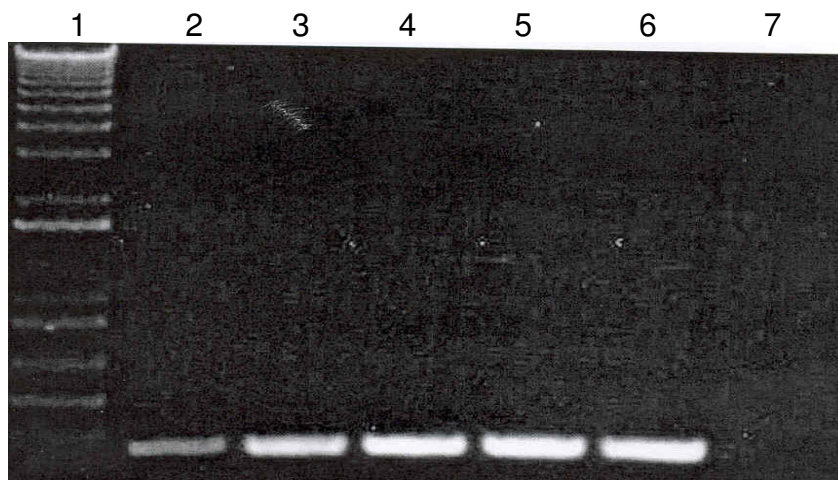
Das verwendete Insert hat eine Gesamtlänge von 4654 bp

$$\begin{aligned} \Rightarrow \text{die Masse an Insert die eingesetzt werden muss, um einen Standard mit einer Kopie zu bekommen} &= \frac{4654 \text{ bp Insert DNA}}{3 \times 10^9 \text{ bp genomische DNA}} \times 1 \mu\text{g genomischer DNA} \\ &= 1,55 \text{ pg} \end{aligned}$$

- ⇒ Um einen 1 Kopienstandard herzustellen wurden 1,55 pg transgener DNA zu $2 \mu\text{g}$ Schwanz DNA zugegeben
- ⇒ 0,1 Kopienstandard 0,155 pg Insert
- ⇒ 10 Kopienstandard 15,5 pg Insert
- ⇒ 100 Kopienstandard 155 pg Insert

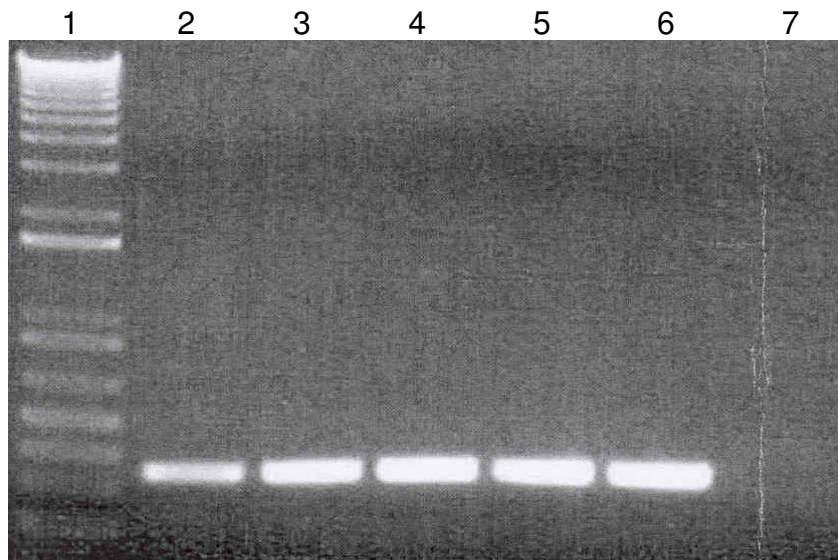
Die Kopienstandards wurden in die PCR eingesetzt und mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Das Ergebnis der PCR ist in Bild 4.14 dargestellt.

Als PCR Standard wurde für die Genotypisierung der Nachkommen jeweils der 1 Kopienstandard eingesetzt.



Primerpaar I

GAGTGCCGGCCTTGTTCTGTCTTT
AACGACCAGGGCAACCGCACGAC



Primerpaar II

CACGCTGGCTGAGAAAGAGGAGTT
 CCTCTTGCTCTCCGGCTCCCTCTG

Bild 2.22: Kopienstandards für die PCR Genotypisierung - Austestung der Primerpaare

Um die Sensitivität der in PCR verwendeten Primerpaare zu testen, wurden verschiedene Kopienstandards hergestellt, indem Schwanz- DNA von Mäusen mit entsprechenden Mengen an Transgen so vermischt wurde, dass es einem Mengenverhältnis zwischen 0,1 und 100 Kopien Transgen pro Genom entsprach. Selbst in der niedrigsten Konzentration lies sich eine ausreichende Sensitivität der Primerpaare nachweisen. Abbildung A zeigt die PCR mit Primerpaar I (ELP-HSP70) und Abbildung B zeigt die PCR mit Primerpaar II (HSP70-hGH).

Lane 1	1 kb DNA-Leiter
Lane 2	0,1 Kopie
Lane 3	1 Kopie
Lane 4	10 Kopien
Lane 5	100 Kopien
Lane 6	pos. Kontrolle
Lane 7	neg. Kontrolle

2.3.3.5 ERGEBNIS DER MIKROINJEKTION – HSP70 FOUNDER

Das Insert wurde anschließend aufgereinigt (kommerziell) und durch Mikroinjektionstechnik (EMBL Heidelberg) in den männlichen Vorkern befruchteter Eier injiziert. Anschließend wurden die Eier in das Ovidukt von 6 scheinchwangeren Weibchen transplantiert. Nach ca. 3 Wochen wurden von den schwangeren Weibchen insgesamt 63 potentielle Founder geboren. Durch PCR- Analyse von DNA, präpariert aus Schwanzbiopsien, wurde getestet, ob die injizierte DNA in das Genom von Mausnachkommen integriert wurde. Dabei fand sich bei fünf der Nachkommen ein positiver Nachweis auf das injizierte Insert. Der Nachweis erfolgte auf Grund des sehr langen Inserts (4654 bp), zum eindeutigen Nachweis, mit zwei verschiedenen Primerpaaren. Das erste Primerpaar umfasste dabei einen Sequenzabschnitt zwischen dem ELP und HSP70, das zweite Primerpaar lag zwischen HSP70 und dem hGH Intron. Ausschließlich bei den fünf Foundern zeigten sich bei beiden Primerpaaren Banden. Alle

anderen Tiere hatten bei keinen der Primerpaare positive Banden, so dass ein falsch positives Ergebnis ausgeschlossen werden konnte. Die transgenen Tiere wurden dann durch Auszucht und damit durch Kreuzung mit den entsprechenden weiblichen und männlichen Wildtyp Mäusen weitervermehrt. Der Nachweis der Transgenität erfolgte auch bei der daraufhin geborenen F1-Generation durch PCR-Analyse mit DNA aus Schwanzbiopsien.

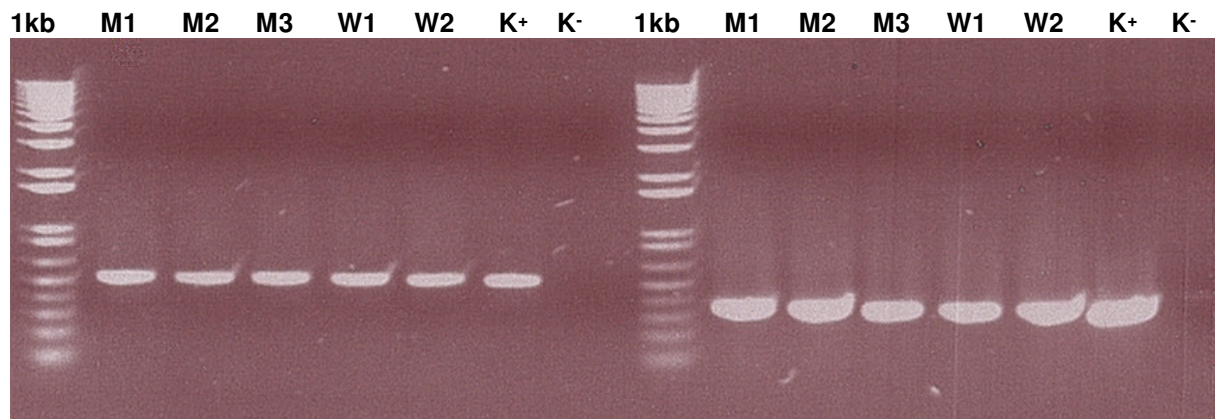


Bild 2.23: *Nachweis der erfolgreichen Integration des Inserts bei fünf Nachkommen.*

Mittels PCR- Analyse mit aus Schwanzbiopsien isolierter DNA, wurde die erfolgreiche Integration des Inserts in das Genom von fünf Jungtieren nachgewiesen. Dabei wurden drei männliche (M1-M3) und zwei weibliche (W1, W2) transgene Tiere identifiziert. Diese wurden anschließend für die Auszucht transgener Nachkommen verwendet.

2.3.3.6 ANALYSE DER HSP70 EXPRESSION IM PANKREAS IM WESTERN BLOT

Für den Nachweis der Überexpression des inserierten HSP70 im Pankreas auf Proteinebene wurden Western Blot Proben aus Pankreasgewebe von sechs genotyp transgenen Tieren und zwei Wildtyptieren aus der F1-Generation angefertigt. Diese wurden im Western Blot aufgetrennt und mit dem spezifischen Antikörper für die induzierbare Isoform des HSP70 versetzt. Allerdings zeigte sich bei keinem der in der PCR transgenen Tiere für HSP70 ein positives Signal auf Proteinebene. Einzig die aufgetragene Positivkontrolle gibt ein Signal, so dass ein falsch negatives Ergebnis ausgeschlossen werden konnte.

Bild A

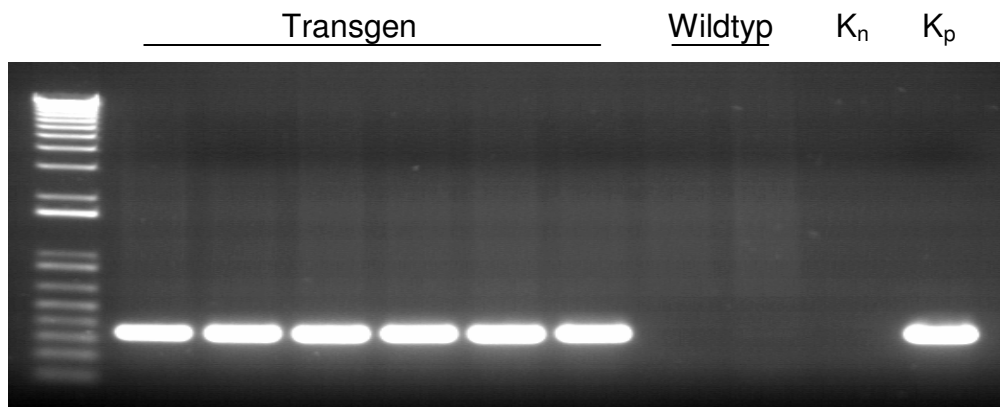


Bild B



K_p = Positivkontrolle

K_n = Negativkontrolle

Bild 2.24: Nachweis der Expression des Transgens auf Proteinebene

Der Nachweis erfolgte an sechs in der PCR positiven Tieren und 2 negativen Tieren der F1-Generation. Dafür wurde aus Pankreasgewebe Western Blot Proben hergestellt. Dabei zeigt sich bei keinen der Tiere eine detektierbare Expression des Transgens auf Proteinebene. Einzig die aufgetragene Positivkontrolle schließt ein falsch negatives Ergebnis aus.

Abbildung A zeigt den Nachweis des Transgens in der PCR Analyse

Abbildung B zeigt den Nachweis der Expression des Transgens im Western Blot

Aufgrund der fehlenden Expression des Transgens auf Proteinebene, fehlte die Grundlage für weitere Untersuchungen, um die Bedeutung von HSP70 für die Protektion bei der akuten experimentellen Pankreatitis eindeutig untersuchen und aufdecken zu können.

3 DISKUSSION

Die Stressreaktion der Bauchspeicheldrüse steht im Zentrum des Interesses dieser Arbeit. Zum einen lassen weitergehende Untersuchungen zur Stressreaktion erhoffen, die Mechanismen, die zur Entstehung einer akuten Pankreatitis führen, noch besser zu verstehen. Zum anderen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Präkonditionierung durch geeignete Stressoren, z.B. Hyperthermie, geeignet ist, eine akute Pankreatitis, zumindest im Tiermodell, zu verhindern oder wenigstens deutlich abzuschwächen. Gerade bei iatrogener Pankreatitis wäre es daher durchaus sinnvoll, Strategien zur Präkonditionierung zu entwickeln. Es sollte daher versucht werden, die Mechanismen der HSP- vermittelten Induktion näher zu charakterisieren. Außerdem stand die Untersuchung eines pharmakologischen Ansatzes zur Präkonditionierung mit ANP im Zentrum der Arbeit.

3.1 HYPERTHERMIE-PRÄKONDITIONIERUNG - EINFLUSS DER HYPERTHERMIE AUF DAS VERHALTEN ISOLIERTER AZINUSZELLEN

Durch vorangegangene eingehende Untersuchungen ist mittlerweile erwiesen, dass auch das Pankreas auf eine geeignete Präkonditionierung mit der Expression von Hitzeschockproteinen reagiert. Dies hat eine verbesserte Resistenz gegenüber anderen Noxen, die eine Pankreatitis auslösen, zur Folge. Wenn zum Beispiel Ratten einer Hyperthermie Behandlung ausgesetzt werden und anschließend eine Induktion einer akuten Pankreatitis durch Injektion von Caerulein erfolgt, kann man eine deutliche Protektion beobachten (Wagner *et al.*, 1996; Frossard *et al.*, 1999; Bagaht *et al.*, 2002; Frossard *et al.*, 2002). Der Mechanismus der hinter diesem protektiven Effekt steckt, ist dabei aber unklar geblieben. Eine Reihe von Hitzeschockproteinen sind in diesem Zusammenhang als ursächliche Protektoren vermutet worden. Insbesondere HSP70 wird eine entscheidende Rolle zugeordnet (Wagner *et al.*, 1996; Bhagat *et al.*, 2000; Bagaht *et al.*, 2002; Frossard *et al.*, 2002). Nach einer Hyperthermiebehandlung konnten sowohl im Pankreasgewebe, als auch in den Azinuszellen eine Reihe von HSPs nachgewiesen werden. Besonders deutlich ist der Effekt bei HSP70 ausgeprägt. Da HSP70 unter normalen Bedingungen nicht exprimiert wird und erst durch ein einwirkendes Stressereignis gebildet wird, liegt es nahe, HSP70 den hauptsächlich protektiven Effekt zuzuschreiben. Nicht nur erscheint HSP70 als das einzig nur unter Stressbedingungen exprimierte HSP, im Gegensatz z.B. zu HSP25, HSP32 oder HSP60 (Wagner *et al.*, 1996), es gibt auch eine Reihe indirekter Hinweise, dass gerade HSP70 entscheidend wichtig für die Protektion sein könnte. Bhagat *et al.* untersuchten den protektiven Effekt von HSP70 bei der Caerulein- induzierten Pankreatitis mit Hilfe von Antisense- und Sense- Oligonukleotiden. Dabei konnten sie einen Zusammen-

hang zwischen HSP70 und Reduktion des Schweregrades der akuten experimentellen Pankreatitis aufzeigen. Sie konnten zum einen zeigen, dass durch die Hochregulation von HSP70 die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung verhindert wird. Zum anderen zeigten ihre Untersuchungen, dass die Gabe von Antisense- Oligonukleotiden vor der Hyperthermiebehandlung die Expression von HSP70 verhinderte. Die Folge der fehlenden HSP70 Expression war, dass trotz Hyperthermiebehandlung kein protektiver Effekt auf die akute experimentelle Pankreatitis zu sehen war (Bhagat *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen von Bhagat et al. machen deutlich, dass HSP70 eine entscheidende Rolle bei der Protektion spielt.

Darüber hinaus ist HSP70 die bislang bekannteste und am besten untersuchte Familie von zytoprotektiven Hitzeschockproteinen. Untersuchungen am Herzen haben gezeigt, dass durch eine Hyperthermiebehandlung und die dadurch hervorgerufene Induktion von HSP70 zum einen die Toleranz isolierter Rattenherzen gegenüber Ischämie gesteigert, und zum anderen die Infarktgröße infolge einer Ischämie im entsprechenden Modell reduziert werden konnte. (Currie *et al.*, 1987; Donnelly *et al.*, 1992; Hutter *et al.*, 1994). Das Ausmaß der HSP70 Expression korreliert dabei mit dem protektiven Effekt. Auch Arbeiten von Bilzer et al. 1994 und 1995 und Kiemer et al. 2002 an isoliert perfundierten Rattenlebern konnten einen Zusammenhang zwischen HSP70 und der Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschadens der Leber herstellen. Sie konnten zeigen, dass es durch eine Präkonditionierung von Rattenlebern mit ANP zu einer Induktion der Hitzeschockantwort und zu einer Hochregulation von HSP70 und darüber vermittelt zu einer Protektion von Rattenlebern gegenüber des Ischämie/Reperfusionsschadens kommt (Bilzer *et al.*, 1994/1995; Kiemer *et al.*, 2002).

Ein weiteres an der Protektion möglicherweise beteiligtes Hitzeschockprotein, das im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht behandelt wurde, ist HSP27. Die Regulation und Funktion von HSP27 im Pankreas ist bereits recht gut untersucht (Schäfer *et al.*, 1999) und scheint auch wie HSP70 ein protektives Potential im Bezug auf die akute Pankreatitis zu haben. Ähnlich wie andere Hitzeschockproteine auch, wird die Expression des schon genuin vorliegenden HSP27 durch Stress hochreguliert und eine Überexpression führt zu erhöhter Widerstandsfähigkeit gegenüber Hitze oder anderen Stressfaktoren in einer Reihe von Zelllinien. HSP27 ist offensichtlich an der Regulation des Zytoskeletts, insbesondere des Aktins beteiligt und eine HSP27 Überexpression führt zu einer Stabilisierung der Aktin Mikrofilamente (Schäfer *et al.*, 1999). Somit scheint neben HSP70 auch HSP27 ein protektives Potential gegenüber Stressereignissen im Rahmen der akuten Pankreatitis aufzuweisen.

Verschiedene Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass die Entstehung und Entwicklung einer akuten Pankreatitis ihren Anfang in der Azinuszelle nimmt und die frühzeitige und in-

trazellulär stattfindende Aktivierung von Verdauungsenzymen dabei eine entscheidende Rolle spielt (Saluja *et al.*, 1999; Leach *et al.*, 1991; Whitcomb *et al.*, 1999). Deshalb wurde untersucht, ob dieser protektive Effekt auf die akute Pankreatitis durch eine vorangegangene Hyperthermie und die damit verbundene Expression von HSP70 in einer Änderung dieser initial in der Zelle ablaufenden schädlichen Mechanismen liegt. Dafür wurden Modelle gewählt, mit denen es möglich war, die intrazelluläre Aktivität von Trypsin und die Sekretion von Enzymen darzustellen und zu quantifizieren. Zunächst wurde ein Modell herangezogen, in dem allein mit frisch isolierten Azinuszellen gearbeitet werden sollte. Dabei wurde die Hyperthermiebehandlung an Azinuszellen durchgeführt, in dem das Inkubationsmedium 20 min lang eine Temperatur von 42°C aufwies. Die anschließende Untersuchung des Einflusses der Hyperthermiebehandlung der Azinuszellen auf ihr Sekretionsverhalten und die frühzeitige Trypsinaktivierung zeigte aber, dass die Zellen durch die vorangegangene Hyperthermie so in ihrer Funktionalität geschädigt waren, dass keine Reaktion mehr auf die Stimulation mit verschiedenen CCK- Konzentrationen erfolgte. Die Untersuchung der LDH- Werte machte zwar deutlich, dass die Zellintegrität noch weitgehend erhalten war. Durch den Verlust der sekretorischen Stimulierbarkeit erbrachte dieses experimentelle Vorgehen aber kein brauchbares Modell, um die Effekte der Hyperthermie auf die Ereignisse in der Frühphase der akuten Pankreatitis eingehender untersuchen zu können. Über die genauen Ursachen der fehlenden Stimulierbarkeit kann nur spekuliert werden. Am ehesten dürfte es aufgrund der langen Inkubationszeit, gekoppelt mit der Hyperthermie zu metabolischen Störungen und damit zu einer Beeinträchtigung des Energiehaushaltes gekommen sein (Lepock JR 2003). Zusätzlich könnten durch die Hyperthermie auch für die Signaltransduktion wichtige Proteine teilweise denaturiert und in Ihrer Funktion gestört worden sein (Lepock JR 2003). Nachdem sich dieses Modell als nicht praktikabel herausstellte, um den Einfluss von HSP70 auf das Sekretionsverhalten und die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung eingehender zu untersuchen, wurde ein Modell verwendet, das eine in vivo Hyperthermiebehandlung von Ratten mit einem in vitro Modell der experimentellen Pankreatitis an frisch isolierten Azinuszellen, gewonnen aus den vorbehandelten Tieren, kombinierte. Denn durch eine Ganzkörperhyperthermie kommt es auch in Azinuszellen zu einer Expression von HSPs. Die Untersuchung der hormonregulierten Sekretion von Amylase und Lipase zeigte sich hier unverändert durch die vorangegangene Hyperthermie. Allerdings konnte beobachtet werden, dass es zur Auslösung der sekretorischen Blockade einer deutlich höheren CCK- Konzentration bedurfte, als dies ohne Hyperthermie- Vorbehandlung der Fall war. Daraus lässt sich schließen, dass die Hyperthermie und die damit verbundene HSP70 Expression ein gewisses zytoprotektives Potential ausüben.

Dieses zytoprotektive Potential von HSP70 wird vermutlich durch die Hochregulation eines weiteren Hitzeschockproteins, HSP27, unterstützt. HSP27 liegt konstitutiv im Pankreas vor und wird durch eine Hyperthermie stark exprimiert. HSP27 stellt ein Phosphoprotein dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation und Stabilisierung des Zytoskellets, insbesondere des F-Aktins. Hohe Dosierungen von CCK führen zu negativen Veränderungen des Aktinzytoskellets und damit zu einer Unterbindung der Exozytose von Zymogengranula aus den Azinuszellen in die Pankreasgänge. Eine Überexpression von HSP27 bewirkt aber eine Stabilisierung der Aktin-Mikrofilamente und inhibiert damit die negativen Folgen von unphysiologisch hohen Konzentrationen von CCK. Somit könnte ein Synergismus von HSP70 und HSP27 für das zytoprotektive Potential, bedingt durch die Hyperthermie, vorliegen (Schaefer *et al.*, 2000; Schaefer *et al.*, 1999, Kubisch *et al.*, 2004).

Betrachtet man aber nun die Auswirkung der Hyperthermie auf die Trypsinaktivierung, so zeigt sich eine direkte Inhibierung der frühzeitigen und intrazellulären Aktivierung von Trypsin nach Gabe supramaximaler CCK-Konzentrationen. Interessanterweise zeigten Azini, welche von Hyperthermie-präkonditionierten Tieren gewonnen wurden, eine wesentlich schwächere Aktivierung des intrazellulären Trypsins durch supramaximale Stimulation mit CCK, als dies bei den Zellen der Fall war, welche von Ratten isoliert wurden, die nicht zuvor präkonditioniert waren. Zusammen mit der ebenfalls beobachteten starken Expression von HSP70 kann dies zumindest als weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass der Mechanismus der Protektion gegen die Entstehung einer Pankreatitis in der verringerten Aktivierung des intrazellulären Trypsins zu sehen ist. Wie in der Einleitung unter 1.3.2.2 S. 8-11 erläutert wurde, stellt die intrazelluläre Aktivierung von Trypsin ein zentrales Phänomen für die pathophysiologischen Vorgänge in der Frühphase der akuten Pankreatitis dar. Die Unterbindung dieser schädlichen Aktivierung von Trypsin in der Azinuszelle spielt vermutlich eine entscheidende Rolle für die Abschwächung des Schweregrades des Verlaufs der akuten experimentellen Pankreatitis und dürfte auch eine entscheidende Rolle für die Protektion des Pankreas in diesem Zusammenhang spielen.

Da wie oben schon erwähnt auch Azinuszellen, welche von Tieren gewonnen wurden, die zuvor einer Präkonditionierung per Ganzkörperhyperthermie unterzogen worden waren, ihre volle Funktionstüchtigkeit im Hinblick auf die hormonregulierte Sekretion behalten haben und somit der CCK-Rezeptor als auch die nachgeschaltete intraazinäre Signaltransduktionskaskade intakt waren, konnte ausgeschlossen werden, dass die Inhibierung der Trypsinaktivität auf eine Disfunktionalität der Azinuszellen, hervorgerufen durch die Hyperthermie, zurückzuführen ist. Als ursächliches Agens für das zytoprotektive Potential kommt HSP70 in

Frage. Vorangegangene Studien, die den Effekt der Hyperthermie am in vivo Modell untersuchten, kamen eindeutig zu dem Schluss, dass die Protektion, hervorgerufen durch thermalen Stress, auf die Expression von HSP70 zurückzuführen ist (Bhagat *et al.*, 2002; Frossard *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 1996). Der Mechanismus durch den HSP70 in die CCK bzw. Caerulein induzierte intrazelluläre Trypsinaktivierung eingreift bleibt allerdings weiter unklar. Viele Arbeitsgruppen nehmen an, dass der Prozess der intrazellulären Aktivierung durch eine Colokalisation von Trypsinogen und anderen Zymogenen mit lysosomalen Hydrolasen insbesondere Cathepsin B in instabilen intrazellulären Organellen hervorgerufen wird (Steer *et al.*, 1993). Die dargestellten Ergebnisse im Zusammenhang mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Systemen legen nahe, dass HSP70 eine bedeutende Rolle bei der Protektion der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung spielt, in dem vermutlich HSP70 in das CCK bzw. Caerulein induzierte Colokalisationsphänomen eingreift. Um diese Vermutung näher zu untersuchen wurden schon Cathepsin B *-/-* knock-out Mäuse generiert. Experimente mit diesen knock-out Tieren zeigten, dass die Caerulein induzierte, intrazelluläre Trypsinaktivierung bei diesen Mäusen um bis zu 90% reduziert gegenüber Wildtypmäusen, aber nicht gänzlich verschwunden ist. Damit wird die Pankreatitis nur lokal abgeschwächt, aber nicht verhindert. Auch die systemischen Auswirkungen, zum Beispiel auf die Lunge, sind nicht verändert (Halangk *et al.*, 2000). Somit brachte auch dieses Modell keinen eindeutigen Beweis für bzw. gegen die Colokalisationshypothese und es ist damit weiterhin unklar, welche Rolle Cathepsin B bei der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung spielt.

Eine Publikation von Krüger *et al.*, die im Lauf der vorliegenden Arbeit erschienen ist, beschäftigte sich auch mit der behandelten Fragestellung. Übereinstimmend mit den hier vorgelegten Daten zeigte sich, dass eine Hyperthermie-Präkonditionierung auf zellulärer Ebene zu einer Inhibierung der Trypsinaktivität in den Azinuszellen führt. Darüber hinaus konnten sie auch erfolgreich eine Hyperthermie-Präkonditionierung an frisch isolierten Azinuszellen durchführen. Diese Azinuszellen zeigten im Gegensatz zu denen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, eine völlig intakte Funktionstüchtigkeit. Auch an diesem Modell ließ sich die völlige Inhibierung der intrazellulären Trypsinaktivität zeigen. Allerdings geht diese Arbeitsgruppe davon aus, dass die Hyperthermie alleine und nicht die damit verbundenen Induktion von HSP70 einen direkten protektiven Effekt auf die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung ausübt (Krüger *et al.*, 2001). Unbestritten zeigt sich aber aus den gewonnenen Beobachtungen, dass eine Hyperthermie ein potentes Präkonditionierungsmodell für die akute experimentelle Pankreatitis darstellt und dass es durchaus einen Zusammenhang

zwischen der Hyperthermie und der dadurch hervorgerufenen verstärkten Expression von Hitzeschockproteinen und der Protektion des Pankreas gibt. Allerdings lässt sich klinisch eine Hyperthermie bei Patienten nicht anwenden, um bei ihnen die Inzidenz für das Auftreten einer iatrogen verursachten Pankreatitis zu senken. Dafür müssen andere Präkonditionierungsmodelle am Tier zunächst untersucht werden, die auf pharmakologischen Weg die potentiellen Protektoren einer Hyperthermie, also die Hitzeschockproteine, zu induzieren vermögen. Eine mögliche Variante stellt hier die Präkonditionierung mit dem Atrial Natriuretischen Peptid dar.

3.2 HORMONELLE PRÄKONDITIONIERUNG MIT ANP

Präkonditionierung als Möglichkeit Organschädigungen vorzubeugen und das Ausmaß der Schädigung zu reduzieren ist ein intensiv erforschtes Thema. Eine Präkonditionierung eignet sich jedoch nicht zur Protektion von spontan erworbenen bzw. auftretenden Erkrankungen. Hingegen ist sie eine durchaus sinnvolle Methode, um iatrogen verursachte Schädigungen, wie z.B. bei ERCP induzierter Pankreatitis, zu minimieren (Raeburn *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Serracino-Inglott *et al.*, 2001).

Viele Forschergruppen glauben, dass eine Induktion von Hitzeschockproteinen, im speziellen HSP70, eine zentrale Rolle für die protektive Wirkung der Präkonditionierung spielt. Zusätzlich zu den typischen Ursachen, die zu einer akuten Pankreatitis führen können, wie Alkoholabusus, eingeklemmte Gallensteine, Einnahme bestimmter Medikamente, kann eine Pankreatitis auch iatrogen ausgelöst werden z.B. nach einer ERCP oder nach extrakorporalem Kreislauf in der Herzchirurgie. Dadurch, dass eine Pankreatitis einen sehr schweren und mitunter lebensbedrohlichen Verlauf nehmen kann, wäre eine klinische anwendbare Form der Präkonditionierung von größtem Nutzen.

Eine etablierte experimentelle Methode ist die Hyperthermie-Präkonditionierung. Hier wurde schon innerhalb dieser Arbeit der Beweis erbracht und darüber hinaus auch von verschiedenen Arbeitsgruppen, dass diese Methode zu einer Induktion der HSP70 Expression im Pankreas führt und dadurch Schutz vor einer Pankreatitis bietet (Wagner *et al.*, 1996; Bhagat *et al.*, 2002; Bhagat *et al.*, 2000). Auch bei der Ischämie Reperfusionsschädigung am Herzen konnte eine Hyperthermie Präkonditionierung die Infarktgröße deutlich verringern (Currie *et al.*, 1988, Currie *et al.*, 1993, Donnelly *et al.*, 1992). Dieses Verfahren der Hyperthermie Präkonditionierung ist jedoch klinisch nicht einsetzbar.

Seit vielen Jahren ist die pharmakologische Prävention der post- ERCP Pankreatitis Gegenstand zahlreicher Studien. Dabei wurden zahlreiche Substanzen, die ein vielversprechendes Potential aufwiesen untersucht. Zum Einsatz kamen Somatostatin, Octreotid, Gabexatmesilat,

Corticosteroide und einige andere Substanzen. Allen gemeinsam ist, dass sie entweder kein protektives Potential aufwiesen oder nur einen sehr geringen Benefit brachten, der in keinem Kosten/Nutzen Verhältnis stand, um als Erfolg oder weiter zu verfolgendes Ziel gewertet werden zu können (Mariani, 2003; Testoni, 2003). Daher geht die Suche weiter, geeignete Pharmaka zu suchen und zu erforschen, die in der Prophylaxe einsetzbar sind.

Eine vielversprechende Substanz stellte das Atrial Natriuretische Peptid dar. ANP wurde bisher nur an einem experimentellen Präkonditionierungsmodell der isoliert perfundierten Rattenleber getestet. Dabei zeigte sich eine protektive Wirkung gegenüber der Ischämie/Reperfusionsschädigung der Leber (Bilzer *et al.*, 1994; Gerbes *et al.*, 1998; Kiemer *et al.*, 2002; Bilzer *et al.*, 1995). Als Ursache für das protektive Potential von ANP wird dabei HSP70 diskutiert. ANP vermag den heat shock transcription factor (HSF) zu aktivieren, wodurch die Bildung des Heat Shock Protein HSP70 induziert wird, das damit an der Vermittlung des protektiven Effekts von ANP beteiligt sein könnte (Kiemer *et al.*, 2002).

Nachdem schon vor Jahren entdeckt wurde, dass Pankreas- Azinuszellen ANP- Rezeptoren aufweisen, liegt es nahe, zu überprüfen, ob das Konzept der pharmakologischen Präkonditionierung mit ANP auf das System der akuten Caerulein-induzierten Pankreatitis übertragbar ist. Immerhin wäre damit zumindest theoretische eine Grundlage geschaffen, die iatrogen verursachten Pankreatitiden vorbeugend behandeln zu können.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die pharmakologische Präkonditionierung mit ANP auf das Pankreas übertragen (Ploessl *et al.*, 2004).

3.2.1 EINFLUSS VON ANP AUF cGMP-SPIEGEL

Vor über 15 Jahren konnte durch in vitro Autoradiographie mit ¹²⁵J markiertem ANP festgestellt werden, dass Azinuszellen über ANP-Rezeptoren verfügen (Chabot *et al.*, 1987). Diese Rezeptoren haben auch eine biochemische Bedeutung, denn es konnte gezeigt werden, dass Azini auf die Stimulation mit nanomolaren Konzentrationen von ANP mit einem raschen dosisabhängigen Anstieg der cGMP Konzentration in den Azinuszellen reagieren (Heisler *et al.*, 1987). Allerdings hat dieser Anstieg von cGMP keinerlei Einfluss auf die Sekretion von Verdauungshormonen und –enzymen. Interessanterweise konnte im Modell der isoliert perfundierten Leber gezeigt werden, dass der intrazelluläre Anstieg von cGMP zu einer Aktivierung des HSF und dadurch letztendlich zu einer Expression von HSP70 führt (Kiemer *et al.*, 2002;). Auch in unserem Modell zeigte die Untersuchung des Effekts von ANP auf Azinuszellen einen dosisabhängigen Anstieg der azinären cGMP Konzentration. Bereits bei 10 nM ANP wurde die maximale cGMP Konzentration erreicht. Höhere Konzentrationen von ANP führten aber zu keiner weiteren Steigerung der cGMP- Bildung, noch zu einer Inhibierung der

Ausschüttung. Vielmehr stellt sich nach dem Erreichen des Maximums ein Plateau ein, aus dem zu schließen ist, dass ab einer bestimmten Sättigungskonzentration kein gesteigerter Effekt mehr hervorgerufen werden kann. Diese Beobachtung bestätigte zum einen die Untersuchung von Heisler et al (Heisler *et al.*, 1987) und zum anderen, dass das eingesetzte ANP auch voll biologisch aktiv und damit gewährleistet ist, dass die ANP-Präkonditionierung zu einem Anstieg an cGMP führt. Der Dosis-Wirkungsbereich entspricht dabei den aus der Literatur bekannten Angaben (Heisler *et al.*, 1987).

3.2.2 EINFLUSS VON ANP AUF MITTLEREN ARTERIELLEN DRUCK

Aufgrund der sehr großen Menge an ANP, die eingesetzt wurde und der bekannten stark blutdrucksenkenden Wirkung von ANP wurde in einer Versuchsreihe die Beeinflussung des Blutdrucks durch eine ANP-Infusion untersucht. ANP ist im Organismus an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Eine erhöhte Ausschüttung von ANP führt dabei zu einer Reduktion des Blutdrucks. Somit ist anzunehmen, dass eine mögliche, nicht unbedenkliche Nebenwirkung der ANP-Präkonditionierung eine starke Herabsetzung des Blutdrucks darstellt. Deshalb wurden die bekannten biologischen Auswirkungen der ANP-Infusion auf den Blutdruck untersucht.

Die in den Experimenten eingesetzte hohe Dosierung von ANP führte dabei, wie erwartet, zu einer deutlichen Reduktion des mittleren arteriellen Drucks um 25-30% und zu ANP-Plasmaspiegeln zwischen 57 und 179 nM. Darüber hinaus bewirkte ANP einen leichten Anstieg des Wassergehalts von Pankreasgewebe, hatte aber ansonsten keine weiteren Effekte auf biochemische oder histologische Pankreasparameter. Die beobachteten biologischen Effekte von ANP stehen damit im Einklang mit früher veröffentlichten Daten. So konnte dort schon gezeigt werden, dass Ratten mit einer Senkung des MAP auf ANP-Infusionen reagieren (Harrison-Bernard *et al.*, 1991; Allen und Gellai, 1987). Des Weiteren bewirkte ANP auch eine Veränderung der vaskulären Permeabilität, womit sich auch der Anstieg des Pankreaswassergehaltes erklären lässt (Valentin *et al.*, 1988; Kiemer *et al.*, 2002). Der Mechanismus über den ANP die vaskuläre Permeabilität erhöht, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird aber diskutiert, dass ANP das intravaskuläre Volumen beeinflusst. ANP soll dabei einen direkten Effekt auf das vaskuläre Endothel ausüben, wodurch es zu einer Erhöhung der Permeabilität des Endothels für intrazelluläre Flüssigkeit und wahrscheinlich auch für Plasmaproteine kommen soll (Groban *et al.*, 1990).

3.2.3 EINFLUSS VON ANP AUF AKUTE EXPERIMENTELLE PANKREATITIS

Da die ANP-Infusion auf den Organismus die bekannten und erwarteten Auswirkungen zeigte, wurde nun untersucht, ob eine Präkonditionierung, die unter ähnlichen Bedingungen wie

im Lebermodell erfolgt, neben der Steigerung des cGMP Spiegels auch zu einer Induktion der HSP70 Expression im Pankreas führt.

3.2.3.1 EINFLUSS DER ANP PRÄKONDITIONIERUNG AUF PANKREATITISPARAMETER

Die gewählten Bedingungen für die ANP Infusion erfolgten in Anlehnung an vorangegangene Veröffentlichungen über den protektiven Effekt von 200 nM ANP auf das Leber-Ischämie-Reperfusionmodell (Bilzer *et al.*, 1994). Aus dem im Punkt 4.3.2 S. 40 angestellten Überlegungen zur Festsetzung der zu infundierenden Menge an ANP, sowie der Zeitdauer der Infusion wurde eine Konzentration von 40 µg/kg KG/ min als kontinuierliche Infusion über 30 min errechnet, die ausreicht, um einen Plasmaspiegel in der gewünschten Konzentration von 200 nM ANP zu erhalten. Des Weiteren fand sich in der Literatur der Hinweis (Harrison-Bernard LM *et al.*, 1991), dass eine Infusion von 100 ng/kg/min ANP über 2h zu Plasmaspiegeln von 260 pM ANP führt. Deshalb wurden auch Experimente mit 80 µg/kg KG/min ANP über 20 min durchgeführt, um sicherzugehen, dass die gewünschte Plasmakonzentration an ANP auf jeden Fall erreicht wurde und damit die Möglichkeit zur Entfaltung des protektiven Potentials gegeben war. Eine Infusion von 80 µg/kg KG/min ANP führte zu einem Plasmaspiegel von 179 nM im Gegensatz zu nur 54 nM bei einer Infusion von 40 µg/kg KG/min ANP. Trotz dieses Unterschiedes wurden beide Konzentrationen verwendet, wenn auch die Dosierung von 80 µg/kg KG/min ANP am besten unseren Bedingungen entsprach.

Die erste Versuchsreihe wurde durchgeführt, indem nach der erfolgten 20-minütigen ANP-Infusion über den Jugularvenenkatheter ein Caerulein-Bolus gegeben wurde um eine akute Pankreatitis zu induzieren. Die anschließende Analyse der Pankreatitis-typischen Parameter zeigte jedoch, dass sich der Verlauf und der Schweregrad der experimentellen Pankreatitis weder biochemisch noch histologisch durch die ANP Präkonditionierung beeinflussen ließen. Dies zeigte sich übereinstimmend in beiden Versuchsreihen mit 40 µg/kg KG/min bzw. 80 µg/kg KG/min ANP im Vergleich zu Tieren, die nur NaCl erhalten hatten. Passend dazu zeigte sich auch keine messbare Induktion der Expression von HSP70 auf Proteinebene.

Diese Beobachtung zeigte somit, dass sich die Ergebnisse, die im Modell der Ischämie/Reperfusionsschädigung der Leber gemacht wurden (Bilzer *et al.*, 1994; Gerbes *et al.*, 1998; Kiemer *et al.*, 2002), nicht direkt auf das Pankreas übertragen lassen. Im Unterschied zu dem von uns zunächst gewählten Ansatz, war allerdings bei diesen Untersuchungen am Modell der isoliert-perfundierten Rattenleber 200 nM ANP direkt vor der Herausnahme des Organs infundiert worden und die Leberschädigung erst nach einer 24-stündigen kalten Ischämiephase und anschließender Reperfusion analysiert worden. Der protektive Effekt war dabei zeit- und dosisabhängig. Eine Infusion von 200 nM ANP über 10 min oder die Gabe von nur

20 nM über 20 min zeigten beispielsweise keinerlei protektives Potential. Untersuchungen wiesen daraufhin, dass die Protektion durch ANP in diesem Modell über eine Aktivierung des HSF und eine Expression von HSP70 erfolgte. Mit dem Ziel, die experimentellen Bedingungen möglichst anzupassen und auch in Analogie zum Verfahren der Präkonditionierung mit Hyperthermie, wurde daher ein zweiter Ansatz gewählt. Hier wurden die Tiere identisch mit ANP präkonditioniert, die Induktion der Pankreatitis erfolgte allerdings erst nach 24 h. Dieser Ansatz entsprach vom Zeitablauf daher noch genauer dem Ansatz der Lebermodelle und auch dem Ansatz der Hyperthermiepräkonditionierung und gewährleistete eine ausreichende Zeit, um eine Expression von HSP70 zu erlauben. Bei der Hyperthermie-Präkonditionierung wurde die akute experimentelle Pankreatitis erst 24 h nach erfolgter Hyperthermie induziert und es konnte dabei eine signifikante Protektion des Pankreas gezeigt werden (Wagner *et al.*, 1996; Bhagat *et al.*, 2002). Diese Zeitspanne von 12h - 24h ist somit nötig, um eine hohe Expression von HSP70 zu gewährleisten.

Die Auswertung der Pankreatitisparameter am modifizierten Modell zeigte dann auch die erhoffte Protektion des Pankreas gegenüber einer experimentell induzierten Pankreatitis. Aber nicht nur mit ANP behandelte Tiere, sondern auch Tiere, die statt ANP eine 0,9 % NaCl-Infusion erhielten, waren geschützt gegenüber einer Pankreatitis. Somit wurde der zu beobachtende protektive Effekt nicht durch die vorangegangene ANP-Infusion hervorgerufen, da eine Infusion von NaCl ohne ANP Zusatz die gleichen Effekte auf die pankreatitisspezifischen Parameter zeigte und damit das gleiche protektive Potential aufwies. Bei der Untersuchung der Expression von HSP70 im Western Blot zeigte sich bei beiden Versuchsgruppen eine vergleichbare Induktion von HSP70.

3.2.3.2 INDUKTION VON HSP70 DURCH ANP PRÄKONDITIONIERUNG

Im Western Blot wurde dann die Expression von HSP70 untersucht. In der ersten Versuchsreihe konnte keine HSP70 Expression beobachtet werden, was die Vermutung bekräftigte, dass für die Expression von HSP70 und damit für die Sicherstellung des protektiven Effekts mehr Zeit erforderlich ist.

Die zweite Versuchsreihe war so konzipiert, dass ein ausreichender Zeitraum von 24 h gewählt wurde, um eine HSP70 Expression sicherzustellen. Allerdings zeigte sich, bei sowohl mit ANP als auch mit 0,9 % NaCl behandelten Tieren eine gewisse Protektion gegenüber einer Caerulein induzierten Pankreatitis. Im Western Blot zeigte sich dann das Phänomen, dass sowohl im Pankreas von ANP- als auch von NaCl- Tieren eine Expression von HSP70 nachweisbar war. Es zeigte sich auch kein Unterschied im Expressionsgrad von HSP70 zwischen den beiden Gruppen. Der Grad der HSP70 Expression war aber deutlich geringer im Ver-

gleich zum Expressionsgrad nach einer Hyperthermie-Präkonditionierung. Anscheinend ist aber auch eine geringe Expression ausreichend um eine Protektion zu gewährleisten.

Da Hitzeschockproteine und damit auch HSP70 durch verschiedenste Formen von Stress induziert oder hochreguliert werden können, scheint im gewählten System der Stress, der durch die Anästhesie und die Legung des Jugularvenenkatheters auf den Rattenorganismus einwirkten, so stark gewesen zu sein, dass er ausreichte, um eine HSP70 Expression zu induzieren und damit eine Protektion gegenüber einer experimentellen Pankreatitis zu gewährleisten.

Diese Ergebnisse machen eindeutig klar, dass ANP für eine mögliche pharmakologische Präkonditionierung des Organismus zum Schutz vor einer akuten Pankreatitis nicht geeignet ist. Andererseits zeigen die Beobachtungen, dass jegliche Form der Präkonditionierung, die eine Expression von HSP70 hervorrufen kann, zu einer Protektion führt und dass schon eine schwache aber deutlich detektierbare Expression dafür auszureichend scheint. Deshalb bedarf es weiterer Anstrengungen, um geeignete Modelle für eine Präkonditionierung zu finden, die eine Expression von HSP70 ermöglichen und für eine spätere Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen in Frage kommen. Auch die Funktion von HSP70 bei der Protektion bedarf weiterer eingehender Untersuchungen, um die Mechanismen noch genauer zu verstehen und neue Anhaltspunkte für das Verständnis der Stressreaktionen des Pankreas zu erhalten.

3.3 GENERIERUNG EINER TRANSGENEN MAUS ZUR UNTERSUCHUNG DES PROTEKTIVEN EFFEKTS VON HSP70 AUF DIE AKUTE EXPERIMENTELLE PANKREATITIS

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse mit Hyperthermiepräkonditionierung ist deutlich geworden, dass Hyperthermie gegen eine experimentelle Pankreatitis schützen kann. Die Vermutung liegt nahe, dass dieser Effekt zum großen Teil durch die gesteigerte Expression von Hitzeschockproteinen erklärbar ist. Insbesondere HSP70 kann dabei eine entscheidende Rolle zugeordnet werden. Um diese Vermutung nun eindeutig beweisen zu können, dass HSP70 für die Protektion vor einer akuten experimentellen Pankreatitis die entscheidende Rolle spielt, wurde das Ziel verfolgt, transgene Mäuse herzustellen, die konstitutiv im Pankreas die induzierbare Form von HSP70 überexprimieren. Damit würde ein Modell zur Verfügung stehen, mit dem die Bedeutung von HSP70 für die akute Pankreatitis eindeutig geklärt werden könnte.

In anderen Systemen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von HSP70 zu einer verstärkten Resistenz myogener Zelllinien gegenüber Endotoxinen führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HSP70 im Herzen unter Kontrolle des Aktinpromotors bei transgenen Mäusen zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber ischämischen Ereignissen führt (Marber *et al.*, 1995; Plumier *et al.*, 1995).

Aufgrund dieser Daten und der Erkenntnis, dass Hyperthermie eine Protektion bietet, kann vermutet werden, dass Tiere, die HSP70 im Pankreas überexprimieren, gegenüber einer Caeruleinpankreatitis geschützt sein sollten. Diese Tiere könnten somit zum Beweis der Vermutung, dass HSP70 eine Protektion vor einer experimentellen akuten Pankreatitis durch Inhibition der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung bietet, dienen. Des Weiteren würden Azinuszellen dieser Mäuse ein hervorragendes Modell darstellen, um die HSP70 vermittelte Protektion und die Beeinflussung der azinären Signaltransduktion durch HSP70 auf zellulärer Ebene, eingehend untersuchen zu können.

Aufgrund der Datenlage (siehe 1.6 S. 23-26) haben wir einen Vektor, bestehend aus dem Elastasepromotor, dem HSP70 Gen und einem Stück des Wachstumshormongenes konstruiert und das Insert in Oozyten scheinsschwangerer Mäuse injiziert. Tatsächlich ist die Inkorporation des Transgenes auch bei 6 Foundertieren gelungen. Diese zeigten allerdings keine HSP70 Expression auf Proteinebene, so dass auch keine Protektion gegenüber der Pankreatitis zu erwarten ist. Die Ursache der fehlenden Proteinexpression bleibt leider im Unklaren. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Expression von Genen unter der Kontrolle des Elastasepromotors zwar hochselektiv aber nicht sehr effizient sein kann. Alternativ wäre daher denkbar, einen ähnlichen Vektor z.B. mit dem CMV Promotor zu konstruieren. Obwohl zunächst die Annahme bestand, dass dieser Promotor zu einer Genexpression in fast allen Geweben führen würde (Schmidt *et al.*, 1990), haben aber Arbeiten gezeigt, dass Gene, die unter der Kontrolle des CMV Promotors stehen nur in einigen Organen zur Expression gebracht werden. Pankreasazinuszellen scheinen interessanterweise Gene, die unter Kontrolle des CMV Promotors stehen, besonders gut zu exprimieren (Natori *et al.*, 1998; Baskar *et al.*, 1996; Koedood *et al.*, 1995). Diese Strategie konnte schon erfolgreich zur Generierung einer transgenen Mauslinie, die HSP27 im Pankreas überexprimiert, zum Einsatz gebracht werden. Von Nachteil für unser Vorhaben war aber, dass die Gewebespezifität nicht in gleicher Weise gegeben ist, wie im Falle des Elastasepromotors. Die Generierung eines zweiten Konstruktes mit dem CMV Promotor als vielversprechende Option hätte aber den Rahmen der vorliegenden Arbeit überzogen, so dass diese Frage in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an Hand dreier verschiedener Ansätze, die Bedeutung von HSP70 für die Stressreaktion der Bauchspeicheldrüse und den Schweregrad bei der akuten experimentellen Pankreatitis untersucht. Im Zentrum stand dabei die Frage, ob durch die verschiedenen gewählten Präkonditionierungsmodelle HSP70 induziert werden kann und welche Auswirkungen HSP70 auf die pankreatitisspezifischen Parameter, insbesondere der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung hat. Von besonderem Interesse war zudem die hormonelle Präkonditionierung mit dem Atrial Natriuretischen Peptid zur Prävention vor einer Caerulein- induzierten Pankreatitis durch Induktion von HSP70. Dieser Teil der Arbeit ist inzwischen publiziert (Ploessl *et al.*, 2004). Weiterhin wurde die Bedeutung der Hyperthermie-Präkonditionierung an isolierten Azinuszellen eingehend studiert und schließlich durch die Generierung einer transgenen Maus versucht, die genaue Funktion von HSP70 bei der akuten experimentellen Pankreatitis aufzudecken.

Am Modell frisch isolierter Azinuszellen wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß es durch eine **Hyperthermie Präkonditionierung** zu Veränderungen in der azinären Antwort auf eine CCK- Hyperstimulation kommt. Die Hyperthermie führt sowohl im Pankreas als auch in Azinuszellen zu einer verstärkten Expression von Hitzeschockproteinen, insbesondere von HSP70. Die Untersuchung des Effekts der Hyperthermie an isolierten Azinuszellen, die einer Hyperthermie Präkonditionierung unterzogen wurden, stellte sich als ein nicht praktikables Modell heraus, da die Zellen durch die vorangegangene Hyperthermie so in ihrer Funktionalität geschädigt waren, dass sie keine Reaktion mehr auf die Stimulation mit verschiedenen CCK- Konzentrationen zeigten. Die Kombination einer in vivo Hyperthermiebehandlung von Ratten mit einem in vitro Modell der experimentellen Pankreatitis an frisch isolierten Azinuszellen, gewonnen aus den vorbehandelten Tieren, zeigte dann eine sehr deutliche Reduktion der CCK- vermittelten intrazellulären Trypsinaktivierung. Dies spricht dafür, dass die Präkonditionierung und die darausfolgende gesteigerte HSP70 Expression eine Protektion des Pankreas bewirkt und dadurch eine Reduktion der pathophysiologisch für die Entstehung der Pankreatitis bedeutsamen frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung hervorruft.

Die **hormonelle Präkonditionierung mit ANP** hat sich als wirksamer Schutz vor Ischämie-Reperfusionsschäden in der isoliert perfundierten Rattenleber herausgestellt. Untersuchungen

haben gezeigt, dass der protektiven Effekt von ANP über einen Anstieg des cGMP- Spiegels, eine Aktivierung des Hitzeschocktranskriptionsfaktors (HSF) und die dadurch hervorgerufene Expression von HSP70 zustande kommt. Pankreas- Azinuszellen weisen ANP- Rezeptoren auf und reagieren auf ANP mit einem Anstieg des cGMP- Spiegel. Deshalb wurde der Effekt der intravenösen ANP- Präkonditionierung untersucht, als mögliche Protektion des Pankreas vor einer Caerulein- induzierten Pankreatitis. Eine Gabe von ANP 20 Minuten vor der Induktion einer akuten Pankreatitis erwies sich aber als nicht protektiv. Dagegen konnte 24 h nach einer Präkonditionierung eine Induktion der HSP70 Expression und eine Protektion des Pankreas vor einer experimentellen Pankreatitis beobachtet werden. Jedoch zeigte sich bei der Kontrollgruppe, die nur mit NaCl vorbehandelt wurde, der gleiche Effekt auf ANP. Dies lässt darauf schließen, dass Stress hervorgerufen durch die Anästhesie und die Katheterisierung der Jugularvene für eine Präkonditionierung und damit für eine Protektion ausreichend ist und damit ANP, im Gegensatz zum Modell des Ischämie-Reperfusionsschadens Leber, nicht für eine Präkonditionierung des Pankreas eingesetzt werden kann.

Die **Generierung einer transgenen Maus**, zum definitiven Beweis des protektiven Potentials von HSP70, führte zwar zu einer Inkorporation des Transgens, aber zu keiner Expression von HSP70 auf Proteinebene, so dass hier keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden konnten.

5 METHODEN

5.1 ARBEITEN MIT ISOLIERTEN AZINUSZELLEN

5.1.1 GEWINNUNG VON AZINUSZELLEN

Anfang der 70er Jahre wurde von Amsterdam und Jamieson eine Methode entwickelt die eine Isolierung von Azinuszellen durch enzymatischen Verdau und mechanische Zerkleinerung ermöglichte (Amsterdam and Jamieson, 1972 und 1974). Diese Methode wurde 1978 von J.A. Williams modifiziert (Williams et al., 1978). Die Gewinnung von Azinuszellen erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von J.A. Williams und unter Verwendung von Plastikmaterial aus Polycarbonat (PC).

Für die Isolierung von Azinuszellen wurden Ratten in einem Exsikkator mit Isofluran betäubt und anschließend durch Dekapitation getötet und ausgeblutet. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet und das Pankreas entnommen. Nach der Entfernung von Fettgewebe und Lymphknoten erfolgte der Verdau des Organs mittels Collagenase P. Diese wurde mit Hilfe einer 27 G Kanüle (BD Microlance) in das Organ injiziert bis sich die einzelnen Pankreasläppchen klar voneinander separierten. Anschließend wurde das Gewebe im Inkubator bei 37°C 30-40 min unter einmaligem Mediumwechsel nach 10 min in einem 25 ml Erlenmeyer-PC-Kolben gerüttelt (120x/min). Danach wurde das verdaute Gewebe mit Hilfe von Pipetten mit absteigend großen Ansaugöffnungen (Ø 3mm-0,9mm) mechanisch homogenisiert. Die erhaltene Gewebe-Zell-Suspension wurde durch ein befeuchtetes Nylonnetz filtriert und dieses mit der Waschlösung gespült. Die Azinuszellen wurden dann über einem Albumingradienten 3x gewaschen, wobei der Sedimentationsüberstand jeweils verworfen wurde. Nach den drei Waschgängen setzte sich das Ergebnis der Präparation zu 95% aus intakten Azinuszellen, kleinen Resten von Inselzellen, einigen Gangzellen, kleinen Blutgefäßen und unidentifizierbaren beschädigten Zellen zusammen. Zelltrümmer waren nach dem Waschgang nicht mehr vorhanden, was die Effizienz der Reinigung verdeutlicht (Amsterdam und Jamieson, 1974).

Anschließend wurden die isolierten Azinuszellen in die Inkubationslösung überführt und für 1h bei 37°C präinkubiert.

5.1.2 STIMULATION

Es wurden verschiedene Stimulationsverfahren an jeweils frisch isolierten Ratten-Azinuszellen durchgeführt.

5.1.2.1 CHOLEZYSTOKININ

Frisch isolierte Ratten-Azinuszellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen CCK stimuliert, um das Enzymsekretionsverhalten von Azinuszellen zu untersuchen.

CCK-Verdünnungsreihe: (Herstellung erfolgte ausgehend von einer 10^{-4} M Stock-Lösung)

10 μ l	10^{-4} M CCK	+	990 μ l Aqua dest.	=> 10^{-6} M CCK
100 μ l	10^{-6} M CCK	+	900 μ l Aqua dest.	=> 10^{-7} M CCK
100 μ l	10^{-7} M CCK	+	900 μ l Aqua dest.	=> 10^{-8} M CCK
100 μ l	10^{-8} M CCK	+	900 μ l Aqua dest.	=> 10^{-9} M CCK

Vor Beginn der Stimulation wurde eine definierte Menge an Zellsuspension für folgende Messwerte genommen:

T_0 = Nullwertprobe: Enzymsekretion zum Zeitpunkt null. Die Bestimmung erfolgt aus dem Zellüberstand. Im Zellüberstand befindet sich die Menge an Amylase/Lipase, die bis zum Zeitpunkt des Aliquotierens freigesetzt wurde. Dieser Wert T_0 wurde daher in der Berechnung von allen anderen Werten abgezogen.

P_0 = Gesamtmenge an Amylase bzw. Lipase: ermittelt wird der Gesamtgehalt der Amylase/Lipase, der sich aus intra- und extrazellulären Anteilen zusammensetzt. Dieser Wert dient zur Ermittlung des prozentualen Anteils der durch die Stimulation freigesetzten Amylase/Lipase, die in % des Gesamtgehalts dargestellt wird.

T_1 = Basalsekretion: entspricht der basalen Sekretion von Amylase/Lipase innerhalb der Stimulationsphase ohne Zusatz von CCK als Sekretagoga.

Stimulationsansatz: 2 ml Zellsuspension pro CCK-Konzentration, Ansatz im Duplett.

Stimulationskonzentrationen: 30 pM, 100 pM, 300 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM CCK

Inkubationsbedingungen: kurzes Begasen mit O_2 , 30 min, 37°C, leichtes Schütteln

Nach Ende der Inkubationszeit wurde jeweils eine definierte Menge an Zellsuspension von jeder Probe genommen und 15 s bei RT und 13.400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Bestimmung der Amylase/Lipase Konzentration verwendet (siehe 5.4.5.1/5.4.5.2). Das erhaltene Pellet wurde für die Trypsinbestimmung verwendet (siehe 5.4.5.3).

5.1.2.2 ATRIAL NATRIURETISCHES PEPTID

Frisch isolierte Ratten-Azinuszellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ANP stimuliert. Dabei wurden die Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe wurde vor der Stimulation 15 min mit IBMX präinkubiert, die andere erhielt keine IBMX-Zugabe.

ANP-Verdünnungsreihe: (Herstellung erfolgte ausgehend von einer 10^{-4} M ANP-Stocklösung)

10 μl 10^{-4} M	+	90 μl Aqua dest.	$\Rightarrow 10^{-5}$ M ANP
10 μl 10^{-5} M	+	90 μl Aqua dest.	$\Rightarrow 10^{-6}$ M ANP
10 μl 10^{-6} M	+	90 μl Aqua dest.	$\Rightarrow 10^{-7}$ M ANP

Stimulationsansatz: 2 ml pro ANP-Konzentration, Ansatz im Duplett

IBMX-Konzentration: 0,5 mM

ANP-Konzentrationen: 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 nM ANP

Inkubationsbedingungen: 5 min, 37°C, leichtes Schwenken

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde jeweils der gesamte Inkubationsansatz zentrifugiert bei 4°C, 10.000 rpm, 20s und anschließend der Überstand verworfen und das Zellpellet bis zur Bestimmung der cGMP-Konzentration (siehe 5.3.6.4) in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.2 PRÄKONDITIONIERUNG VON RATTEN MIT HYPERTHERMIE

Für die Hyperthermiebehandlung wurden Ratten narkotisiert. Für die Einleitung der Anästhesie wurden die Ratten in einem Glasexsikkator mit 4% Isofluran in Sauerstoff über einen Isofluran Vaporisator narkotisiert. Die eigentliche Narkose erfolgte unter Einsatz von Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht und Xylazin (Rompun®) in einer Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht. Die Verabreichung des Narkotikums erfolgte intraperitoneal.

Die Tiere wurden anschließend in eine Heizdecke eingepackt und auf 42°C Körpertemperatur erwärmt. Die Kontrolle der Körpertemperatur erfolgte über ein rektal appliziertes Digitalthermometer.

Im Abstand von ca. fünf Minuten erfolgte die i.p.-Verabreichung von 1 ml isotonischer Kochsalzsalzlösung über eine Flügelkanüle, um das Austrocknen der Tiere zu vermeiden.

Die Ratten wurden nach Erreichen der Körpertemperatur von 42°C für 20 min konstant bei dieser Körpertemperatur gehalten.

24 h nach der Hyperthermiebehandlung erfolgte die Entnahme des Pankreas und die Isolierung der Azinuszellen.

Kontrolltiere wurden einer Narkose ohne Hyperthermie unterzogen.

5.3 PRÄKONDITIONIERUNG VON RATTEN MIT ANP

5.3.1 ANÄSTHESIE

Für die Einleitung der Anästhesie wurden die Ratten in einem Glasexsikkator mit 4% Isofluran in Sauerstoff über einen Isofluran Vaporisator betäubt. Die eigentliche Narkose erfolgte

dann durch i.p.-Gabe eines Gemisches aus Ketaminhydrochlorid in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht und Xylazin in einer Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht.

Anschließend wurden die Tiere auf eine Heizdecke gelegt, um das Auskühlen der Tiere zu vermeiden. Die Körpertemperatur wurde über ein rektal appliziertes Digitalthermometer überwacht und auf 36,5-37,5°C gehalten.

5.3.2 KONTINUIERLICHE ANP INFUSION

Mit Hilfe eines Stereomikroskops (Leihgabe des AK PD Dr. med. W.M. Franz Med. Klinik I Klinikum Großhadern) wurde die rechte Jugularvene präpariert und ein PE10 Katheter in die Vene eingeführt. Der Katheter wurde mit 50 µl isotonischer Kochsalzlösung und 50 U Heparin gespült und über eine 30 G Perfusorleitung an einen Perfusor angeschlossen.

Die gewählten Bedingungen für die ANP Infusion erfolgten in Anlehnung an vorangegangene Veröffentlichungen über den protektiven Effekt von 200 nM ANP auf das Leber-Ischämie-Reperusionsmodell (Bilzer *et al.*, 1994).

Folgende Überlegungen führten zur Festsetzung sowohl der zu infundierenden Menge an ANP, als auch der Zeitdauer der Infusion *in vivo*:

Am Modell der Ischämie/Reperfusion der Leber an isolierten perfundierten Rattenlebern wurde ein protektiver Effekt von ANP bei Konzentrationen von 200 nM beobachtet. Die nötige Infusionsdauer betrug 20 Minuten (Bilzer *et al.*, 1994).

Das Blutvolumen von Ratten liegt zwischen 50-75 ml Blut/kg Körpergewicht (BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group, 1993). Demzufolge haben Ratten mit einem Körpergewicht von 250-320 g ein Blutvolumen von 13-23 ml.

Die Halbwertszeit mit der ANP aus dem Plasma entfernt wird liegt unter einer Minute (Murthy KK *et al.*, 1986).

Daraus wurde errechnet, dass eine Konzentration an ANP von 40 µg/kg KG/min als kontinuierliche Infusion über 20 min ausreicht, um einen Plasmaspiegel in der gewünschten Konzentration von 200 nM ANP zu erhalten.

Des Weiteren fand sich in der Literatur der Hinweis (Harrison-Bernard LM *et al.*), dass eine Infusion von 100 ng/kg/min ANP über 2h zu Plasmaspiegeln von 260 pM ANP führt. Deshalb wurden auch Experimente mit 80 µg/kg KG/min ANP durchgeführt.

Die verabreichte Menge an ANP wurde jeweils gewichtsadaptiert berechnet und infundiert.

5.3.3 BESTIMMUNG DER ANP SPIEGEL

Die Messung des ANP Gehalts im Plasma nach erfolgter ANP-Infusion erfolgt durch Aspiration von Blut nach Punktion der Schwanzvene. Die Messung erfolgte durch die Mitarbeiter

des Labors von Herrn PD Dr. med. M. Bilzer (Med. Klinik II Klinikum Großhadern) mittels RIA-Technik.

Zunächst wurde mit Hilfe der Amprep[™] minicolumns (RPN 1902) der Firma Amersham ANP aus den Plasma-Proben extrahiert. Diese Säulen enthalten eine unpolare stationäre Phase aus C8 Octyl-Resten. Die Säulen wurden mit 2 ml Methanol und 2ml H₂O gewaschen und die Fließgeschwindigkeit auf < 5 ml/Minute eingestellt. 1 ml des gewonnen Plasmas wurden mit 0,25 ml 2M HCl angesäuert, zentrifugiert und auf die Säule aufgebracht. Die Säule wurde anschließend mit 5 ml 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gespült. Die Eluation der Proben von der Säule erfolgte mit 4 ml einer Lösung aus Methanol und 0,1% TFA. Der Gehalt an Methanol im Gemisch betrug 60%. Die Proben wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und das erhaltene Pellet in 250 µl 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,2 aufgenommen. Die Quantifizierung der ANP Konzentration erfolgte exakt nach dem Protokoll des Human α ANP[¹²⁵I] Biotrak Radioimmunoassay System with Magnetic Separation Kits (Amersham Biosciences, Freiburg).

5.3.4 MESSUNG DES MITTLEREN ARTERIENDRUCKS

Um die Auswirkung der hohen Mengen an ANP auf den mittleren arteriellen Druck (MAP) zu untersuchen wurden Ratten mit 40 µg/kg/min bzw. 80 µg/kg/min ANP über 20 min behandelt. Eine Kontrollgruppe erhielt nur NaCl. Für die Messung des MAP wurde die rechte Arteria femoralis katheterisiert. Nach Anschluss des Arterienkatheters an einen Druckwandler (Becton Dickinson, 84070 Utah) erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung des MAP (Sirecust 302, Siemens, München, Deutschland).

5.3.5 INDUKTION EINER AKUTEN EXPERIMENTELLEN PANKREATITIS

Eine experimentelle akute Pankreatitis wurde durch die einmalige intraperitoneale Bolus-Injektion von verschiedenen Konzentrationen an Caerulein (10-100 µg/kg Körpergewicht) induziert.

In einer Versuchsgruppe wurde das Caerulein direkt im Anschluß an die ANP-Präkonditionierung appliziert.

In einer weiteren Versuchsgruppe erfolgte die Gabe von Caerulein 24h nach der ANP-Behandlung. In jeder Versuchsgruppe erhielten Kontrolltiere nur isotonische Kochsalzlösung. Zwei Stunden nach der erfolgten Caerulein- oder NaCl 0,9%-Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und dabei Blut aufgefangen und bei 4°C, 14,000rpm, 15 min zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und für weitere Messungen bei -80°C aufbewahrt.

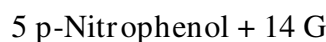
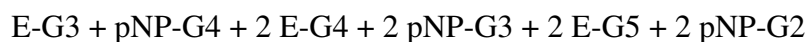
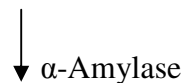
Die Pankreata wurden entnommen, in mehrere Stücke geteilt, schockgefroren und bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80°C aufbewahrt.

Aus den gewonnenen Proben erfolgte die Bestimmung wichtiger Pankreatitis-Parameter. (Siehe 5.4.6.1-5.4.6.3; 5.4.7)

5.3.6 BIOCHEMISCHE ASSAYS

5.3.6.1 AMYLASE

Die Messung der α -Amylase-Konzentration erfolgte zum einen im Überstand stimulierter Azinuszellen und zum anderen im Serum bei in vivo Versuchen. Durchgeführt wurde die Messung nach Anleitung des Infinity Amylase Reagenz von Sigma Diagnostics. Hierbei wird das im Reagenz enthaltene Substrat Ethyliden-p-Nitrophenol-G7 durch α -Amylase in kleinere Fragmente gespalten, auf die dann α -Glucosidase einwirken kann unter Freisetzung von p-Nitrophenol als Chromophor. Die Geschwindigkeit der Bildung von p-Nitrophenol ist dabei proportional zur Aktivität der α -Amylase. Die Aktivität wurde durch den Extinktionsanstieg bei 405 nm über einen Zeitraum von 120 s im UV/VIS-Spektrometer gemessen.



Die Aktivität der α -Amylase errechnet sich wie folgt:

Aktivität in U/l = $\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \text{Faktor}$

$$\text{Faktor (405 nm)} = \frac{V_G \times 1000}{V_P \times E \times P}$$

V_G = Gesamtreaktionsvolmen in ml

V_P = Probenvolumen in ml

E = millimolarer Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm: 10,13

P = Küvettendurchmesser in cm

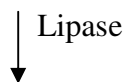
$$\text{Faktor} = \frac{1,025 \times 1000}{0,025 \times 10,13 \times 1} = 4047$$

5.3.6.2 LIPASE

Die Messung der Lipase-Konzentration erfolgte zum einen im Überstand stimulierter Azinuszellen und zum anderen im Serum bei in vivo Versuchen. Durchgeführt wurde die Bestimmung nach den Herstellerangaben des Lipase Kits LIP von Roche Diagnostics. Hierbei handelt es sich um einen enzymatischen Farbttest der auf der Umsetzung des Substrats 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester mit Lipase im alkalischen Milieu zu 1,2-O-Dilauryl-rac-glycerin + Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester.

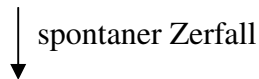
Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester ist eine instabile Zwischenstufe und zerfällt spontan im alkalischen Milieu zu Glutarsäure und dem roten Farbstoff Methylresorufin. Dabei ist die Farbintensität des gebildeten Farbstoffs direkt proportional zur Lipaseaktivität. Die Messung der Aktivität erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm in einem Zeitraum von 90 s.

- 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester



- 1,2-O-Dilauryl-rac-glycerin + Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester

- Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester



Glutarsäure + **Methylresorufin**

Berechnung der Lipaseaktivität: Faktor $\times \Delta E$

$$\text{Faktor (570 nm)} = \frac{V_G \times 1000}{V_P \times \epsilon \times d \times \Delta t}$$

- V_G = Gesamtvolumen in μl : 1610 μl
 V_P = Probenvolumen in μl : 10 μl
 ϵ (570nm) = molarer Extinktionskoeffizient: 48,35
 d = Küvettendurchmesser in cm: 1 cm
 Δt = Messzeitraum in min: 1,5 min

$$\text{Faktor (570 nm)} = \frac{1610 \times 1000}{10 \times 48,35 \times 1 \times 1,5} = 2219,9$$

Aufgrund der Bestimmung des Gesamtgehaltes an Lipase und Amylase wurden die in vitro von Azinuszellen sezernierten Mengen als % des Gesamtgehaltes aufgetragen. Der Wert der Doppelbestimmungen wurde gemittelt und die Ergebnisse von mindestens drei Experimenten als Mittelwert plus Standardabweichung (standard error of means SEM) ausgedrückt.

5.3.6.3 TRYPSIN

Die Bestimmung der Trypsinaktivität erfolgte zum einen aus Zellhomogenaten und zum anderen aus frischem Pankreasgewebe. Die Messung der Aktivität erfolgte fluorimetrisch (Perkin Elmer) mit Hilfe des Substrats Boc-Gln-Ala-Arg-AMC·HCl nach der Methode von Kawabata et al. (Kawabata *et al.*, 1988) Das Substrat wird durch Trypsin, nicht aber durch Trypsinogen gespalten, wodurch eine fluoreszierende Verbindung entsteht.

Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm, die Lichtemission wurde bei 440 nm gemessen. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 300 s gemessen. Vor der Vermessung der Proben wurde immer eine Standardkurve mit definierten Trypsinkonzentrationen vermessen.

Die für die Standardkurve eingesetzten Standardkonzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnung eines Trypsin-Stock mit einer Konzentration von 10 mg/ml hergestellt.

eingesetzte Standardkonzentrationen:

0,05 ng/ml	5 µl 10 ng/ml
0,1 ng/ml	10 µl 10 ng/ml
0,25 ng/ml	25 µl 10 ng/ml
0,5 ng/ml	50 µl 10 ng/ml

Substrat:

Das Substrat wurde in DMSO in einer Konzentration von 10 mM gelöst. Die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt. Für die Messung wurden 20 µM Substrat pro Einzelmessung eingesetzt.

Bestimmung aus Zellen:

Die Zellpelletts wurden in 250 µl frischen eiskalten Mops-Puffer aufgenommen und lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert bei 4°C, 3000 rpm, 5 min. Der Überstand wurde sofort für die Trypsinmessung verwendet.

Bestimmung aus frischem Pankreasgewebe:

0,05 g frisches Pankreasgewebe wurden in 1 ml eiskaltem Mops-Puffer aufgenommen und mit einem Handhomogenisator mechanisch zerkleinert. Die Gewebetrümmer wurden bei 4°C, 3000 rpm, 5 min abzentrifugiert und der Überstand sofort für die Vermessung verwendet.

Für die Messung wurde folgender Ansatz eingesetzt:

700 µl Tab-Puffer

100 µl Substrat (20 µM)

200 µl Probe

Bei zu hoher Intensität der Probe, wurde diese entsprechend verdünnt und der Verdünnungsfaktor hinterher in das Ergebnis eingerechnet.

5.3.6.4 BESTIMMUNG DES cGMP-SPIEGELS IN AZINUSZELLEN

Für die Bestimmung des cGMP Spiegels in mit ANP stimulierten Azinuszellen wurden die bei -80°C aufbewahrten Zellpellets zunächst lysiert. Die gefrorenen Pellets wurden dabei zur Proteinfällung mit kalter 6 % (m/v) Trichloressigsäure im Verhältnis 1:10 versetzt und sonifiziert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 2000 g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand 4mal mit der 5-fachen Menge wassergesättigtem Ether gewaschen, um überschüssiges Protein zu entfernen. Der Etherüberstand wurde nach jedem Waschgang verworfen. Der Wasseranteil in der verbleibenden wässrigen Phase wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge vollständig verdampft und das erhaltene Pellet in 50 mM Acetatpuffer aufgenommen. Die Quantifizierung der cGMP Konzentration erfolgte exakt nach Protokoll 4 des cGMP Enzymimmunoassay System (EIA) Kits (Amersham Biosciences, Freiburg)

5.3.6.5 LACTATDEHYDROGENASE

Die Messung der Lactatdehydrogenase-Konzentration, zur Abschätzung der Menge an abgestorbenen Azinuszellen nach erfolgter Isolation, erfolgte im Azinuszellmedium. Dafür wurden 500 µl Medium abgenommen und 15 s bei 13 000 rpm zentrifugiert. 200 µl des Überstands wurden für die LDH-Bestimmung abgenommen. Für die Bestimmung der Gesamt-LDH wurden 500 µl Medium sonifiziert und 1+10 mit 0,9% NaCl verdünnt. Durchgeführt wurde die Messung nach Anleitung des NobiFlow LDH Kits von NOBIS Labordiagnostica. Hierbei katalysiert LDH die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat. Dabei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH Abnahme ist dabei direkt proportional zur LDH-Konzentration und wird photometrisch gemessen. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Extinktionsabnahme wurde über einen Zeitraum von 3 min zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3 min im UV/VIS-Spektrometer gemessen.



Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wurden die Mittelwerte gebildet ($\Delta E/\text{min}$) und diese in nachfolgende Berechnungsformel eingesetzt:

$$\text{LDH (U/l)} = (\Delta E/\text{min}) \times F$$

$$F (340 \text{ nm}) = 4127$$

Als Ergebnis wurde der prozentuale Anteil der LDH-Konzentration der Probe bezogen auf die Gesamt-LDH Konzentration angegeben.

5.3.7 PANKREASÖDEM

Für die Bestimmung des Pankreasödems wurde ein Stück Pankreasgewebe in ein zuvor ausgewogenes Reaktionsgefäß gegeben, gewogen und anschließend bei 90°C 48h bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Danach erfolgt erneut die Bestimmung des Gewichts. Aus der resultierenden Abnahme des Gewichts wurde der prozentuale Anteil des Feuchtgewichts am Gesamtgewicht bestimmt.

5.4 GENERIERUNG EINER TRANSGENEN MAUS

Die Herstellung des Konstrukts erfolgte durch die Mithilfe von Herrn Harald Schmidt (MTA) aus Marburg.

5.4.1 HERSTELLUNG DES KONSTRUKTS

Das Konstrukt für die Injektion in fertilisierte Eizellen setzt sich zusammen aus der Elastase Promotor Region, bestehend aus den Nukleotiden +8- -500 (Accession No L00112), welche von RJ Mc Donald zur Verfügung gestellt wurde. An diese Region schließt sich die induzierbare HSP70 Isoform der Ratte (Accession No X75357) an, welche von WH Dillmann bereitgestellt wurde. Als Intron wurde ein funktionell inaktives Fragment des menschlichen Wachstumshormons (Accession No J03071) angefügt, welches von R. Urrutia stammt.

Zunächst wurde HSP70 mittels PCR amplifiziert und anschließend in den pcDNA3.1/V5/HIS-TOPO Vektor (Invitrogen) über die TOPO-Schnittstelle inkloniert. Der Elastase Promotor (ELP) wurde über die Schnittstellen Hind III und BamH I ebenfalls inkloniert. Über die Schnittstellen Hind III und EcoR V wurde dann das Konstrukt ELP-HSP70 ausgeschnitten und in pcDNA3.1/V5-His B (Invitrogen) umklont. Zusätzlich wurde dann in dieses Plasmid das hgH Intron über Xba I kloniert. Für die Amplifikation des Konstrukts wurde der Vektor in One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E.coli Bakterien (Invitrogen) chemisch transformiert. Die Durchführung erfolgte jeweils nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen). Zur genauen Identifizierung des Inserts wurde ein Restriktionsverdau mit den unter 6.2 angegebenen Restriktionsenzymen und den entsprechenden REact[®]-Puffern (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

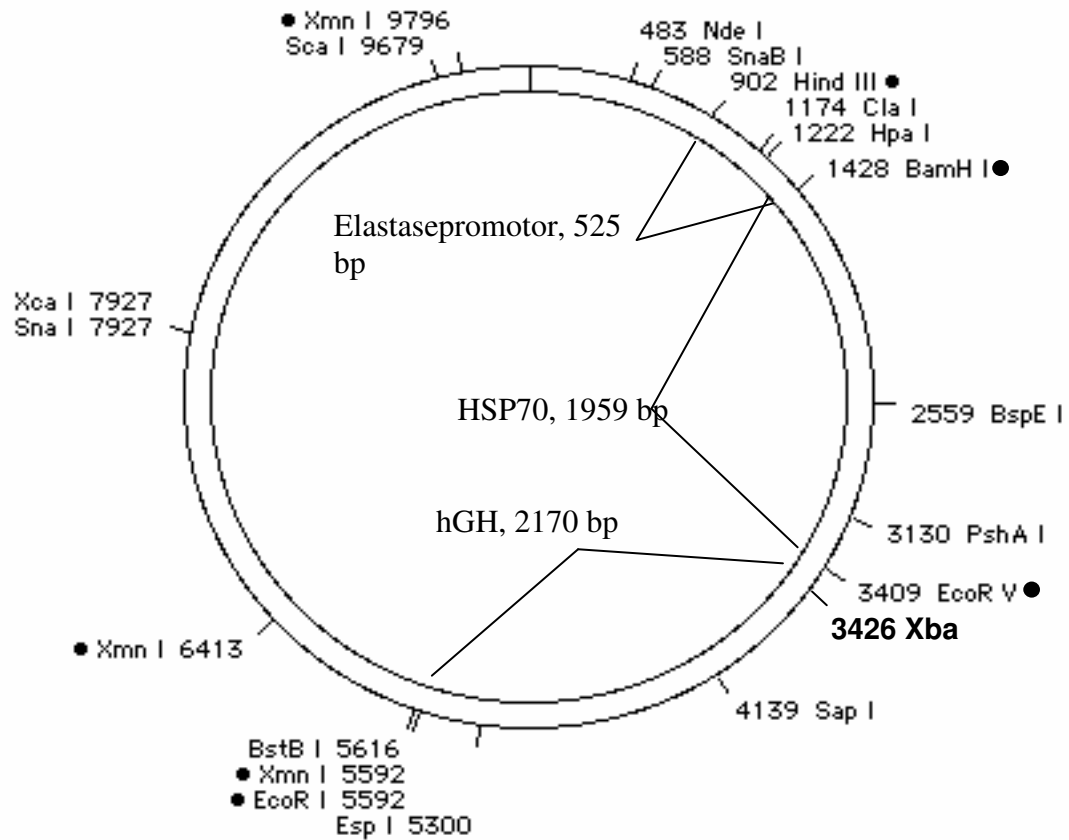


Bild 4.1: Plasmidkarte des Konstruktes aus Elastasepromotor (rELP), HSP70 und hGH in pcDNA3.1 zur Generierung transgener Mäuse.

5.4.2 MIKROINJEKTION

Die Mikroinjektion des Konstruktes erfolgte durch das Transgen Labor am Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH) der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Das Konstrukt wurde dabei in den Vorkern befruchteter Eier injiziert und diese bis zum Zweizellstadium inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer der Oozyten in die Ovidukte von scheinchwangeren Weibchen.

5.4.3 AUFZUCHT TRANSGENER MAUSLINIEN

Fünf Foundertiere wurden anschließend für die Auszucht transgener Nachkommen mit wt-Männchen bzw. Weibchen gepaart.

Die Auszucht wurde im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung durch Frau B. Blount und Herrn C. Kollmar durchgeführt.

5.5 WESTERN BLOT

5.5.1 PROBENBEREITUNG

Azinuszellen oder Pankreasgewebe wurde in 250 µl bzw. 500 µl Homo-Puffer mit Proteaseinhibitor überführt und mit Ultraschall (Bandelin Electronic, Berlin) bzw. mit einem Homogenisiergerät (Kinematica AG, Littau/Luzern, Schweiz) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Homogenate dreimal für je 15 min bei 4°C und 14,000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils verworfen. Der klare Überstand wurde für die folgende Proteinquantifizierung und Proteinelektrophorese verwendet.

5.5.2 QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode.

Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brillant Blau an Proteine im sauren Milieu. Die Kalibriergerade wurde mit definierten BSA Standards (0,2-0,8 mg/ml) angefertigt. Die Verdünnung des Reagenz und die Durchführung erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

5.5.3 BEREITUNG DER PROBEN FÜR DIE ELEKTROPHORESE

Vor der Proteinelektrophorese wurden die Proteinproben denaturiert und negativ geladen durch Zugabe von Laemmli-Puffer und anschließendem 5 minütigen Kochen der Proben.

5.5.4 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKROPHORESE

Die Protein-Auftrennung erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurden die Proben im elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (BioRad, München) verwendet. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgt bei 150 V für 60 min in 10%-igen SDS-Trenngelen, die mit Sammelgelen überschichtet wurden. Es wurden 7,3 x 8,0 x 0,1 cm große Mini-Protein-Gele eingesetzt. Unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des Mini Trans-Blot Elektroblotsystems auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte bei 300 mA innerhalb einer Stunde. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die NC-Membran nach erfolgtem Transfer 1h lang in Blocklösung bei Raumtemperatur geschwenkt.

Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper in Waschpuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Zugabe des Zweitantikörpers wurde die NC-Membran dreimal für 10 min in Waschpuffer geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem gegen den Primäantikörper gerichteten und Peroxidase gekoppelten Sekundäantikörper in Waschpuffer. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die NC-Membran wieder dreimal für 10 min in Waschlösung geschwenkt. Danach erfolgte die Detektion der Proteine mit Hilfe verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham) nach Angabe des Herstellers. Die Auflagezeit des Films für eine zuverlässige Detektion betrug ca. 5-10 min. Die korrekte Höhe des erwarteten Signals wurde zum einen durch den Vergleich mit dem Protein-Standard-Marker und zum anderen durch das Mitlaufen einer Positivkontrolle festgestellt.

5.6 DNA-ISOLIERUNG

5.6.1 VERDAU

Für die Genotypisierung der Mäuse wurden diesen mit Hilfe von Einmalskalpellen ein ca. 1cm langes Stück Schwanz abgeschnitten. Die genommenen Schwanzbiopsien wurden über Nacht in TNES-Puffer mit 580 µg/ml Proteinase K bei 55 °C im Inkubator bei leichtem Schütteln lysiert.

5.6.2 ISOLIERUNG

Nach dem Verdau wurden die Proben mit 166,7 µl 6 M NaCl versetzt und 15 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand zur Präzipitation der DNA mit eiskaltem Ethanol abs. versetzt. In der oberen Alkoholphase befindet sich die DNA, welche mittels des geschlossenen Endes einer Schmelzpunktkapillare isoliert wurde. Die Kapillare mit der DNA wurde dann 10 min an der Luft getrocknet, bevor die erhaltene DNA durch Klopfen und Drehen der Kapillare in TE-Puffer resuspendiert wurde. Zur vollständigen Suspendierung wurden die Proben 10 min bei 65°C im Inkubator behandelt.

5.6.3 MESSUNG DER DNA-KONZENTRATION

Die Quantifizierung der DNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer Spectrosil Microzelle. Um eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung machen zu können, wurde das Verhältnis A_{260}/A_{280} bestimmt.

5.7 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

5.7.1 MASTER-MIX UND REAKTIONSBEDINGUNGEN

5.7.1.1 PCR ZUM NACHWEIS VON HSP70 AUS MAUSSCHWANZ DNA

Master-Mix

MgCl ₂	2,5 mM
10x Puffer	1,25 x
Primer sense	0,25 µM
Primer antisense	0,25 µM
dNTP	250 µM
Taq DNA Polymerase	1,25 U
H ₂ O	ad 19,75 µl
DNA	200 nM

Die Zubereitung erfolgte auf Eis.

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	0.5 min
Annealing	56°C	1 min
Polymerisation	72°C	1 min
abschließende Polymerisation	72°C	10 min
Zyklenzahl		40

5.7.2 ELEKTROPHORESE DER AMPLIFIZIERTEN PRODUKTE

Zur Auswertung der amplifizierten Produkte wurden die Proben durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurden 1% Agarosegele mit TAE-Puffer hergestellt und nach Abkühlung der Lösung auf ca. 60°C 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Proben und DNA Leiter wurden mit Ladepuffer gemischt. Der Größenstandard wurde zur Größenbestimmung und zur Zuordnung der Nukleinsäurefragmente und PCR-Produkte mit aufgetragen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung (120 V, TAE-Puffer, 40 min). Die Detektion der amplifizierten Produkte erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm an einer Kodak Image Station durch Interkalierung des Ethidiumbromids mit der DNA. Die Darstellung erfolgte durch ein CCD Kamerasystem.

5.8 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

5.8.1 HÄMATOXYLIN/EOSIN-FÄRBUNG

Histologische Schnitte des Pankreas wurden am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Großhadern, München unter Anleitung von Prof. Dr. med. J. Diebold angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die formalinfixierten Gewebeproben wurden in einem Einbettautomaten über Nacht in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt und in einem Färbeautomat mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Die Schnitte wurden maschinell von einem Eindeckautomat mit Deckgläschen versehen.

Die durch Caerulein hervorgerufene Schädigung des Pankreasgewebes wurde von einem Pathologen in einem verblindeten Verfahren eingeschätzt. Um den Schweregrad der Pankreatitis quantifizieren und vergleichen zu können, wurden sieben Parameter festgelegt, mit denen die Charakterisierung des Pankreasgewebes durchgeführt wurde. Diese Parameter umfassten Acidophilie, Vesikulation und Vakuolisierung von Azinuszellen, Hyperämie, Ödem und Granulozyten und round cell Einwanderung in den Interstitialraum. Entsprechend des Schweregrades wurden 0 bis 3 Punkte für jeden Parameter vergeben. Die maximal erreichbare Punktzahl war demzufolge 21.

5.9 STATISTIK

Die statistische Auswertung erfolgte mit Sigma Stat, Version 3.0. Es sind jeweils die Mittelwert und standard error of means (SEM) angegeben. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem one sample t-test oder dem student's t-test ermittelt. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

6 MATERIAL

6.1 CHEMIKALIEN

30% Acrylamide/Bis Solution	BioRad, München, Deutschland
Agarose	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Benzamidin	Sigma
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BioRad
Brij® 30% w/v	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Chloroform	Sigma
Diethylether	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma
DL-Dithiothreitol	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70%	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Glucose	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycerolphosphat	Sigma
Glycin	Sigma
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma
Isofluran „Forene®“	Abbott GmbH, Wiesbaden
Isotonische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma

Ketaminhydrochlorid (Ketavet [®] 100 mg/ml)	Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Mops	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Natriumdodecylsulfat	BioRad
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydragencarbonat	Sigma
Natriumhydroxid	Sigma
Natriumorthovanadat	Sigma
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck
Rinderserumalbumin	Fluka
Salzsäure	Merck
Sucrose	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad
Top Block	Fluka
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma
TrisBase	Sigma
TrisHCl	Sigma
Trizol [®] Reagenz	Invitrogen
Tween [®] 20	Sigma
Trypanblau	Invitrogen
Xylazin (Rompun [®] 2%)	BayerVital, Leverkusen, Deutschland

6.2 ENZYME UND HORMONE

Atrial Natriuretisches Peptid, Rat	Calbiochem, La Jolla, Canada
Caerulein	Sigma
Boc-Gln-Ala-Arg-AMC·HCl	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Cholezystokinin CCK-8	Research Plus
Collagenase P	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Proteinase K	Roche Diagnostics
Trypsin	Sigma
<i>Restriktionsenzyme</i>	
BamH I	Invitrogen
EcoR I	Invitrogen
EcoR V	Invitrogen
Hind III	Invitrogen
Xba I	Invitrogen
REact [®] Puffer	Invitrogen

6.3 REAGENZIEN UND KITS

6.3.1 AMYLASE/LIPASE BESTIMMUNG

Infinity [™] Amylase-Reagenz	Sigma
LIP Lipase Farb-Test	Roche Diagnostics

6.3.2 ANP BESTIMMUNG

Amprep [™] Minicolumns C8 octyl (RPN1902)	Amersham Biosciences
Human α ANP[¹²⁵ I] Biotrak Radioimmunoassay System with Magnetic Separation	Amersham Biosciences

6.3.3 LDH BESTIMMUNG

NobiFlow LDH	NOBIS Labordiagnostica GmbH, Endingen
--------------	--

6.3.4 PCR

AmpliTaQ Gold [®] with GeneAmp	Roche Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA
10X PCR Gold Buffer & MgCl ₂ Solution	
Desoxy-Ribonucleotid-Triphosphate (dNTPs)	PeqLab, Erlangen, Deutschland

6.3.5 PROTEINBESTIMMUNG

BioRad Protein Assay	BioRad
Protease Inhibitor Cocktail SetI	Calbiochem, La Jolla, Kanada

6.3.6 cGMP BESTIMMUNG

cGMP enzyme immunoassay kit	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
-----------------------------	--

6.3.7 WESTERN BLOT

ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
---	----------------------

6.4 GERÄTE UND MATERIALIEN

Analysenwaage	Satorius, Göttingen
Aufnahmesystem für Agarosegele	Bio-Rad
Blot Kammer	Bio-Rad
SLT Spectra, ELISA Reader	SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
Fluoreszenz Spektrometer LS50B	Perkin Elmer Instruments
Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Isofluran Vaporator	Dräger, Lübeck
MiniSpin Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer RCTbasic	IKA Werke, Staufen, Deutschland
Minigelapparatur	Bio-Rad
PCR-Thermo-Cycler PTC 200	Biozym, Oldendorf
pH Meter InoLab pH Level 1	WTW, Weilheim, Deutschland
Perfusor BSP-99M	Braintree scientific, Braintree, MA, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Polytron Homogenisator	Kinematica AG, Littau/Luzern, Schweiz
Speed Vac	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Stereomikroskop Stemi 200	Carl Zeiss, Göttingen Deutschland
Ultrospec 3100 pro	Amersham Pharmacia Biotech
Inkubator GFL 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Sirecust 302	Siemens, München, Deutschland
Sonoplus Bandelin HD 2070	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Zentrifuge 541712	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kreisrüttler Rocky 3D	Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland
Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Vortex Mixer 2020	neoLab
Nitrocellulosemembran „Protran“	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Agarose Gelkammer biosmart	BioRad
Gel-Blotting Papier	Schleicher&Schüll
Hyperfilm™ ECL™	Amersham Pharmacia Biotech
Einmal-Küvetten, UV	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Halbmikro-Fluoreszenz-Küvetten	Hellma GmbH & Co. KG

Quarzglas SUPRASIL®

Mülheim, Deutschland

6.5 TIERE

Für die ANP-Präkonditionierung und für die Präparation von isolierten Azinus-Zellen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 150-220 g Körpergewicht, für die Generierung der transgenen Mäuse und für die Auszucht der Founder wurden männliche und weibliche B6SJL-Mäuse (Charles River L,Arbresle, Frankreich) eingesetzt. Die Tiere wurden in vollklimatisierten Ställen mit einem konstanten 12h Licht-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Ssniff Soest, Deutschland) und entsprechend den Bedingungen des Tierschutzgesetzes gehalten. Vor der Durchführung von Experimenten wurden die Tiere über Nacht nüchtern gehalten mit freiem Zugang zu Wasser. Die Tierversuche waren von der zuständigen Behörde genehmigt. (AZ: 211-2531-34/2001)

6.6 LÖSUNGEN UND PUFFER

6.6.1 DNA-ISOLIERUNG

TE-Puffer

TrisBase	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0	

TNES-Puffer

TrisBase	10 mM
NaCl	400 mM
EDTA	100 mM
SDS	0,6%
pH 7,5	

6.6.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Elektrophorese-Laufpuffer(TAE-Puffer)

TrisBase	16,6 mM
EDTA	1,27 mM
Essigsäure	20 mM
pH 7,8	

6.6.3 SDS-PROBENAUFBEREITUNG/WESTERN BLOT*Homo-Puffer*

Glycerolphosphat	50 mM
Benzamidin	2 mM
Brij	0,03%
Glycerol	5%
EGTA	1 mM
Na ₂ VO ₄	2 mM
NaF	1 mM
DTT	1 mM
β-Mercaptoethanol	0,1%
Protease-Inhibitor Cocktail	1x
auffüllen mit PBS	
pH 7,4	

PBS

NaCl	0,14 M
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH 7,4	

Laemmli-Puffer

Tris HCl	0,2 M (pH 6,8)
SDS	8%
β-Mercaptoethanol	10%
Bromphenolblau	0,2%
Glycerol	40%

Trenngelpuffer

TrisBase	1,5 M
SDS	0,014 M
pH 8,8	

Sammelgelpuffer

TrisBase	0,125 M
SDS	0,014 M
pH 6,8	

Lauf-Puffer

TrisBase	25 mM
Glycin	0,2 M
SDS	10 mM

Transfer-Puffer

TrisBase	25 mM
Glycin	0,2 mM
SDS	10 mM
Methanol	5 M

Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween®20 (TBS-T)

TrisBase	20 mM
NaCl	140 mM
Tween® 20	0,15 %
PH 7,6	

Blocklösung

TBS-T	
Non-Fat Dry Milk/Top Block	5%

Waschlösung

TBS-T	
Non-Fat Dry Milk/Top Block	2%

Trenngel 10%

30% PAA-Lösung	5,3 ml
Trenngelpuffer	4,0 ml
APS 10%	75 µl
TEMED	37,5 µl
Aqua dest.	6,7 ml

Sammelgel

30% PAA-Lösung	1,6 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
APS 10%	60 µl
TEMED	20 µl
Aqua dest.	5,9 ml

6.6.4 TRYPSIN-BESTIMMUNG*Mops-Homogenisatpuffer*

Sucrose	250 mM
MOPS	5 mM
MgSO ₂	1 mM
pH 6,5	

Trypsin-Assay-Puffer (TAB-Puffer)

TrisBase	50 mM
NaCl	150 mM
CaCl ₂	1 mM
BSA	1 mg/ml
pH 8,1	

6.6.5 AZINUS-ZELLISOLIERUNG*HEPES-Ringer-Puffer*

Glucose	22 mM
Nicht essentielle. Aminosäuren	20x
Glutamin	2 mM
NaCl	0,127 M
MgCl ₂	0,565 mM
KCl	4,7 mM
Na ₂ HPO ₄	0,55 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂	1,275 mM
pH 7,45-7,48	

Krebs-Ringer-Puffer

Glucose	22 mM
Nicht essent. Aminosäuren	20x
Glutamin	2 mM
NaCl	0,110 M
MgCl ₂	1,13 mM
KCl	4,7 mM
Na ₂ HPO ₄	0,55 mM
NaHCO ₃	32,5 mM
CaCl ₂	0,51 mM
pH 7,35-7,4	

Collagenase-Lösung

10 ml KBR
 25 mg BSA
 3000 U Collagenase

Wasch-Lösung

10 ml KBR
 100 mg BSA

Sedimentationslösung

50 ml KBR
 2 g BSA

Inkubationslösung

200 ml HBR
200 mg BSA

6.6.6 HÄMATOXYLIN/EOSIN-FÄRBUNG*PBS gepuffertes Formalin*

Paraformaldehyd 4%
in PBS
pH 7,4

6.7 DNA UND MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS

Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range	BioMol, München, Deutschland
1 kb plus DNA Leiter	PeqLab, Erlangen, Deutschland

6.8 OLIGONUKLEOTIDE**6.8.1 PCR - DNA****ELA-HSP70**

sense 5' CAC GCT GGC TGA GAA AGA GGA GTT 3'
antisense 5' CAG AGG GAG CCG GAG AGC AAG AGG 3'

HSP70-HGH

sense 5' GAG TGC CGG CCT TGT TCT GTC TTT 3'
antisense 5' GTG CGG TTG CCC TGG TCG TT 3''

6.9 ANTIKÖRPER UND PROTEINE

Hase Anti-HSP25 Monoklonaler Antikörper	StressGen, Kanada
Hase Anti-HSP32 Monoklonaler Antikörper	StressGen, Kanada
Maus Anti-HSP60 Monoklonaler Antikörper	StressGen, Kanada
Maus Anti-Hsp70 Monoklonaler Antikörper	StressGen, Canada
Maus Anti-Hsp90 Monoklonaler Antikörper	StressGen, Canada
Maus Ig, HRP-linked Whole Antikörper	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Hase Ig, HRP-linked Whole Antikörper	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
HeLa Cell Lysate (heat Shocked)	StressGen, Canada

6.10 VEKTOR

pcDNA3.1/V5-His B MCS

Invitrogen, Freiburg

pcDNA3.1-V5-His-TOPO

Invitrogen, Freiburg

6.11 BAKTERIENSTÄMMEOne Shot[®] TOP10 Chemically Competent E.coli

Invitrogen, Freiburg

7 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

%(m/V)	Massenprozent
%(V/V)	Volumenprozent
° C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
p	Piko (10 ⁻¹²)
n	Nano (10 ⁻⁹)
f	Femto (10 ⁻¹⁵)
A	Azinuszelle
abs.	absolut
8-Br-cGMP	8-Bromoguanin-3',5'-cyclisches Monophosphat
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
Azini	Azinuszellen
BNP	Brain oder B-Typ Natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCK	Cholezystokinin
CCK-A	Cholezystokininrezeptor - A
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dendroaspis Natriuretisches Peptid
dNTP	dATP, dCTP, dGTP oder dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
ELP	Elastase Promotor
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GRP	Glucose regulated protein
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
hGH	humanes Wachstumshormon
(HO)-1	Hämoxygenase-1
HSF	Heat Shock Transkriptionsfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
Int	Intensität
IP ₃	Inositoltriphosphat
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K _n	Kontrolle negativ
K _p	Kontrolle positiv
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase

M	Molarität (mol/l)
m	Milli (10^{-3})
MAP	Mittlerer Arteriendruck
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NC	Nitrocellulose
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Natriuretische Peptide
NPR	Natriuretischer Peptidrezeptor
P	Pankreas
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	Polycarbonat
PCA ₁	Procarboxypeptidase A ₁
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	potentia Hydrogenii
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PP	Proteinphosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SPINK	Serine Protease Inhibitor Type KAZAL I
TAP	Trypsinogen activated peptide
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TFA	Trifluoressigsäure
TNF α	Tumor Nekrose Faktor- α
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
Verd.	Verdünnung
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

8 LITERATURVERZEICHNIS

Adler G, Beglinger C, Braun U, Reinshagen M, Koop I, Schafmayer A, Rovati L, Arnold R. Interaction of the cholinergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 1991;100:537-543

Allen DE, Gellai M. Cardioinhibitory effect of atrial natriuretic peptide in conscious rats. *Am J Physiol.* 1987;252(3 Pt 2):R610-R616

Amsterdam A, Jamieson JD. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells I. Dissociation Technique and Morphologic. *J Cell Biol.*1974;63:1037-1056

Amsterdam A, Jamieson JD. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells II. Functional Characteristics of Separated Cells. *J Cell Biol.*1974;63:1057-1073

Amsterdam A, Jamieson JD. Structural and Functional Characterization of Isolated Pancreatic Exocrine Cells. *Proc Nat Acad Sci.* 1972;69(10):3028-3032

Baskar JF, Smith PP, Nilaver G, Jupp RA, Hoffmann S, Peffer NJ et al. The enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter determines cell type-specific expression in transgenic mice. *J Virol.* 1996;70(5):3207-3214

Bhatia E, Chondhuri G, Sikora SS, Landt O, Kage A, Becker M, Witt H. Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology* 2002;123(4):1020-1025

Becker J, Craig EA. Heat-shock proteins as molecular chaperons. *Eur J Biochem.* 1994;219:11-23

Bialek R, Willemer S, Arnold R et al. Evidence of intracellular activation of serine proteases in acute cerulein-induced pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 1991;26:190-196

Bhagat L, Singh VP, Song AM, van Acker GJ, Agrawal S, Steer ML et al. Thermal stress induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 2002;122(1):156-165

Bhagat L, Singh VP, Hietaranta A, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK. Heat shock protein 70 prevents secretagogue-induced cell injury in the pancreas by preventing intracellular trypsinogen activation. *J Clin Invest.* 2000;106(1):81-89

Bilzer M, Witthaut R, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of ischemia/reperfusion injury in the rat liver by atrial natriuretic peptide. *Gastroenterology* 1994;106(1):143-151

Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Prolonged antagonism of alpha 1-adrenergic vasoconstriction in the rat liver by atrial natriuretic peptide. *Gastroenterology* 1995;108(3):803-811

Brady M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos J, Slavin S. Cytokines and acute pancreatitis. *Baillière's Clin Gastroenterol.* 1999;13:265-289

Buchler M, Malfertheiner P, Uhl W, Scholmerich J, Stockmann F, Adler G et al. Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German pancreatitis Study Group. *Gastroenterology* 1993;104(4):1165-1170

BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group. Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim.* 1993;27(1):1-22

Chabot JG, Morel G, Belles-Isles M, Jeandel L, Heisler S. ANF and the exocrine pancreas: ultrastructural autoradiographic localization in acinar cells. *Am J Physiol.* 1988;254:E301-E309

Chabot JG, Morel G, Kopelman H, Belles-Isles M, Heisler S. Atrial natriuretic factor and exocrine Pancreas: autoradiographic localisation of binding sites and ultrastructural evidence for internalization of endogenous ANF. *Pancreas* 1987;2(4):404-413

Chen Q, Yu K, Srevens JL. Regulation of the cellular stress response by reactive electrophiles. The role of covalent binding and cellular thiols in transcriptional activation of the 70-kilodalton heat shock protein gene by nephrotoxic cysteine conjugates. *J Biol Chem.* 1992;267(34):24322-24327

Chi SH, Mestril R. Stable expression of a human HSP70 gene in a rat myogenic cell line confers protection against endotoxin. *Am J Physiol.* 1996;270(4Pt1):C1017-C1021

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-159

Cleveland JC, Raeburn CD, Harken AH. Clinical application of ischemic preconditioning: from head to toe. *Surgery* 2001;129(6):664-667

Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG, Jr. Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 1993;87(3):963-971

Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res.* 1988;63(3):543-549

Currie RW. Effects of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stress-induced (heat shock) proteins in isolated and perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19(8):795-808

Currie MG, Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fok KF, Adams SP et al. Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). *Science* 1984;223:67-69

de Bold A.J., Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats life. *Sci.*1981;28:89-94

de Bold A.J. Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. *Can J Physiol Pharmacol.*1982;60:324-330

de Bold A.J. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 1985;230:767-770

Donnelly TJ, Sieyers RE, Vissern FL, Welch WJ, Wolfe CL. Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation* 1992;85(2):769-778

Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:321-347

Ellis RJ. The molecular chaperon concept. *Semin Cell Biol.* 1990; 1(1):1-9

Fink GW, Norman JG. Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin-1 family of genes during experimental acute pancreatitis. *Cytokine* 1997;9(12):1023-1027

Frossard JL, Bhagat L, Lee HS, Hietaranta AJ, Singh VP, Song AM, Steer ML, Saluja AK. Both thermal and non-thermal stress protect against caerulein induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas. *Gut.* 2002 Jan;50(1):78-83.

Gerbes AL, Nathrath W, Cantin M, Denecke H. Presence of atrial natriuretic factor pro-hormone in enterochromaffin cells of the human large intestine. *Gastroenterology* 1991;101(2):424-429

Gerbes AL, Vollmar AM, Kiemer AK, Bilzer M. The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver. *Hepatology* 1998;28(5):1309-1317

Gerwig T, Meißner H, Bilzer M, Arnoldt H, Kiemer AK, Vollmar AM, Gerbes AL. Atrial natriuretic peptide preconditioning protects against hepatic preservation injury by attenuating apoptotic and necrotic cell death. *J Hepatol.* 2003;39(3):341-348

Gorelick FS, Adler G, Kern HF. Cerulein-induced pancreatitis. *The pancreas:biology, pathobiology and disease.* 2nd edition. V.L.W. Go et al., editors. Raven Press. New York, USA.1993:501-526

Grady T, Mah`moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol.* 1998;275(5Pt1):G1010-G1017

Grady T, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD. Chemokine gene expression in rat pancreatic acini cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113(6):1966-1975

Grendell JH. Acute Pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol.* 1997;13:381-385

Groban L, Cowley AW, Jr., Ebert TJ. Atrial natriuretic peptide augments forearm capillary filtration in humans. *Am J Physiol.* 1990;259(1 Pt2):H258-H263

Gross V, Leser HG, Heinisch A, Scholmerich J. Inflammatory mediators and cytokines – new aspects of the pathophysiology and assesment of severity of acute pancreatitis? *Hepato-gastroenterology* 1993;40(6):522-530

Hagenbuchle O, Schibler U, Petrucco S, Van Tuyle GC, Wellauer PK. Expression of mouse Amy-2a-alpha-amylase genes is regulated by strong pancreas specific promoters. *J Mol Biol.* 1985; 185(2):285-293

Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest.* 2000;106(6):773-781

Halangk W, Krüger B, Ruthenbürger, Stürzebecher J, Albrecht E, Lippert H, Lerch MM. Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;282:G367-G374

Hammer RE, Swift GH, Ornitz DM, Quaife CJ, Palmiter RD, Brinster RL et al. The rat elastase I regulatory element is an enhancer that directs correct cell specificity and developmental onset of expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 1987;7(8):2956-2967

Harrison-Bernard LM, Vari RC, Holleman WH, Trippodo NC, Barbee RW. Chronic vs. acute haemodynamic effects of atrial natriuretic factor in conscious rats. *Am J Physiol.* 1991;260(1 Pt 2):R247-R254

Hartl FU. Molekular chaperons in cellular protein folding. *Nature* 1996;381:571-580

Hartl FU, Martin J, Neupert W. Protein folding in the cell: the role of molekular chaperons Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Strukt.* 1992;21:293-322

Heath DI; Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* 1993;34(1):41-45

Heisler S, Kopelman H, Chabot JG, Morel G. Atrial natriuretic factor and exocrine pancreas: effects on the secretory process. *Pancreas* 1987;2:243-251

Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L Bhatia M, Lee HS et al. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol.* 1998;275:G352-G362

Hu RM, Levin ER, Pedram A, Frank HJ. Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor. *J Biol Chem.* 1992;267:17384-17389

Huang LE, Zhang H, Bae SW, Liu AY. Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response. Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1994;269(48):30718-30725

Hughes CB, Gaber LW, Kotb M, Mohey el-Din AB, Pabst M, Gaber AO. Induction of acute pancreatitis in germ-free rats: evidence of a primary role for tumor necrosis factor-alpha. *Surgery* 1995;117(2):201-205

Hughes CB, Henry J, Kotb M, Lobaschevsky A, Sabek O, Gaber AO. Induction of acute pancreatitis in germ-free rats: evidence of a primary role for tumor necrosis factor-alpha. *Surgery* 1995;117(2):201-205

Kald B, Kald A, Ihse I, Tagesson C. Release of platelet-activating factor in acute experimental pancreatitis. *Pancreas* 1993;8(4):440-442

Karne S, Gorelick FS. Ethio-pathogenesis of acute pancreatitis. *Surg Clin North Am.* 1999;79(4):699-710

Kawabata S, Miura T, Morita T, Kato H, Fujikawa K, Iwanaga S et al. Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *Eur J Biochem.* 1988;172(1):17-25

Keim V. Genetic risk factors in pancreatic diseases – significance for general practice. *Med Klin (Munich).* 2002;97(5):278-284

Keim V, Hoffmeister A, Kurth T, Niels T, Mössner J. Trypsinogen variant N211 in hereditary pancreatitis is characterized by a higher stability in acidic environment but not by increased resistance to autolysis. *Gastroenterology* 1999;116:A1137

Kiemer AK, Gerbes AL, Bilzer M, Vollmar AM. The atrial natriuretic peptide and cGMP: novel activators of the heat shock response in rat livers. *Hepatology* 2002;35(1):88-94

Kiemer AK, Kulhanek-Heinze S, Gerwig T, Gerbes AL, Vollmar AM. Stimulation of p38 MAPK by hormonal preconditioning with atrial natriuretic peptide. *World J Gastroenterol.* 2002;8(4):707-711

Kiemer AK, Weber NC, Furst R, Bildner N, Kulhanek-Heinze S, Vollmar AM. Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF-alpha –induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circ Res.* 2002;90(8):874-881

Kiemer AK, Vollmer AM. The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:iii68-iii70

Kiemer AK, Vollmer AM. Autocrine regulation of inducible nitric-oxid synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem.* 1998;273:13444-13451

Koedood M, Fichtel A, Meier P, Mitchell PJ. Human cytomegalovirus (HCMV) immediate early enhancer/promotor specificity during embryogenesis defines target tissues of congenital HCMV infection. *J Virol.* 1995; 69(4):2194-2207

Krüger B, Weber IA, Albrecht E, Mooren F, Lerch MM. Effect of Hyperthermia on Premature Intracellular Trypsinogen Activation in the Exocrine Pancreas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282(1):159-165

Kruse F, Rose SD, Swift GH, Hammer RE, MacDonald RJ. Cooperation between elements of an organspecific transcriptional enhancer in animals. *Mol Cell Biol.* 1995;15(8):1023-1034

Kruse F, Rose SD, Swift GH, Hammer RE, MacDonald RJ. An endocrine-specific element is an integral component of an exocrine-specific pancreatic enhancer. *Genes Dev.* 1993;7(5):774-786

Kruse F, Komto CT, Michnoff CH, MacDonald RJ. The cell specific elastase I enhancer comprises two domains. *Mol Cell Biol.* 1988;8(2):893-902

Kubisch C, Dimagno MJ, Titz AB, Welsh MJ, Ernst SA, Brandt-Nedelev B, Diebold J, Wagner AC, Göke B, Williams JA, Schäfer C. Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced pancreatitis. *Gastroenterology* 2004;127(1):275-286

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685

Langenickel T, Pagel I, Hohnel K, Dietz R, Willenbrock R. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Am J Physiol heart Circ Physiol.* 2000;278:H1500-H1506

Lasson A, Ohlsson K. Protease inhibitors in acute pancreatitis: Correlation between biochemical changes and clinical course. *Scand J Gastroenterol.* 1984;19:779-786

Leach SD, Modlin im, Scheele GA, et al. Intrazellular activation of distetive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest.* 1991;87:362-366

Lepock JR. Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage. *Int J Hyperthermia* 2003;19(3):252-266

Lerch MM, Gorelick FS. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Med Clin North Am.* 2000;84(3):549-563

Lerch MM. The role of cystein proteases in intracellular pancreatic serine protease activation. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:403-411

Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991;101(3):782-785

Levin ER, Frank HJ. Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor. *Am J Physiol.* 1991;261:R453-R457

Levin E.R., Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998 ;339 :321-328

Lisy O, Jougasaki M, Heublein DM, Schirger JA, Chen HH, Wennberg PW et al. Renal actions of synthetic dendroaspis natriuretic peptide. *Kidney Int.* 1999;56:502-508

Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-677

- Lindquist S.** The Heat-Shock response. *Ann Rev Biochem.* 1986;55:1151-1191
- Luster AD.** Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation . *N Engl J Med.* 1998;338(7):436-445
- Luthen R, Niederau C, Grendell JH.** Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats. *Am J Physiol.* 1995; 268:G592-G604
- Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH.** Overexpression of the rat inducible 70 kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1446-1456
- Mathew A, Morimoto RI.** Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann NY Acad Sci.* 1998;851:99-111
- Matz JM, Blake MJ, Tatelman HM, Lavoie KP, Holbrook NJ.** Charakterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1995; 296(1 Pt 2):R38-R47
- Misono KS, Fukumi H, Grammer RT, Inagami T.** Rat atrial natriuretic factor : complete amino acid sequence and disulfid linkage essential for biological activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 ;119 :524-529
- Mivechi NF, Murai T, Hahn GM.** Inhibitors of tyrosine and Ser/Thr phosphatases modulate the heat shock response. *J Cell Biochem.* 1994;54(2):186-197
- Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K.** Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem.* 1992;267(31):21987-21990
- Mullis KB, Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-350
- Murthy KK, Thibault G, Garcia R, Gutkowska J, Genest J, Cantin M.** Degradation of atrial natriuretic factor in the rat. *Biochem J.* 1986;240(2):461-469

Murthy KK, Thibault G, Schiffrin EL, Garcia R, Chartier L, Gutkowska J et al. Disappearance of atrial natriuretic factor from circulation in the rat. *Peptides* 1986;7(2):241-246

Nakamoto M, Shapiro JI, Shanley PF, Chan L, Schreir RW. In vitro and in vivo protective effect of atriopeptin III on ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 1987;80:698-705

Nam JH, Murthy S. Acute pancreatitis – The current status in management. *Expert opin Pharmacother.* 2003;4(2):235-241

Natori S, King A, Hellwig A, Weiss U, Iguchi H, Tsuchiya B et al. Chromogranin B (secretogranin I), a neuroendocrine-regulated secretory protein, is sorted to exocrine secretory granules in transgenic mice. *EMBO J.* 1998; 17(12):3277-3289

Nemer M, Chamberland M, Sirois D, Argentin S, Drouin J, Dixon RA et al. Gene structure of human cardiac hormone precursor, pronatriodilatin. *Nature* 1984;312:654-656

Niederau C, Lüthen R, Heintges T. Effects of CCK on Pancreatic Function and Morphology. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Mar 23;713:180-198

Niederau C, Grendell JH. Intracellulare vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment. *J Clin Invest.* 1988;82(1):229-236

Niederau C, Ferrell LD, Grendall JH. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology* 1985;88:1192-1204

Nieto-Sotelo J, Wiederrecht G, Okuda A, Parker CS. The Yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* 1990;62(4):807-817

Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg.* 1995;130(9):966-970

Nover L. Molekular cell biology of the heat stress response II. *Naturwissenschaften*. 1990;77(7):310-316

Nover L. Molekular cell biology of the heat stress response I. *Naturwissenschaften*. 1990;77(8):359-365

Opie EL. The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. *John Hopkins Hosp Bull*. 1901;12:182-188

Opie EL. The relation of cholelithiasis to disease of pancreas and to fat necrosis. *John Hopkins Hosp Bull*. 1901;12:19-21

Ornitz DM, Hammer Re, Davison BL, Brinster RL, Palmiter RD. Promotor and enhancer elements from the rat elastase I gene function independently of each other and of the heterologous enhancers. *Mol Cell Biol*. 1987;7(10):3466-3472

Palaparti A, Li Y, Anand-Srivastava MB. Inhibition of atrial natriuretic peptide (ANP) C receptor expression by antisense oligodesoxynucleotides in A10 vascular smooth-muscle cells is associated with attenuation of ANP-C-receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *Biochem J*. 2000;346Pt2:313-320

Ploessl I, Gallmeier E, Schäfer C, Bilzer M, Bittmann I, Göke B, Wagner ACC. ANP preconditioning does not increase protection against experimental pancreatitis, observed after general anesthesia and jugular vein catheterization. *Pancreas* 2004;28(2):166-173

Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G et al. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1854-1860

Quaife CJ, Pinkert CA, Ornitz DM, Palmiter RD, Brinster RL. Pancreatic neoplasia induced by ras expression in acinar cells of transgenic mice. *Cell* 1987;48(6):1023-1034

Raeburn CD, Cleveland JC, Zimmermann MA, Harken AH. Organ preconditioning. *Arch Surg*. 2001;136(11):1263-1266

Rakonczay Z Jr., Takács T, Boros I, Lonovics J. Heat shock proteins and the pancreas. *Journal of cellular Physiology* 2003;195:383-391

Ralhan R, Kaur J, Chelvi T, Singh SP, Zeba H. Heat stress stimulates high affinity GTPase in cervical carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995;27(3):263-269

Ritossa FA. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-573

Rosenzweig A, Seidman CE. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:229-255

Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury rat pancreatic acini. *Am J Physiol.* 1999;276:G835-G842

Saluja AK, Steer ML. Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation. *Digestion* 1999;60 Suppl.1:27-33

Saluja AK, Donovan EA, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML. Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology.* 1997;113(1):304-310

Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress [published errata appear in *Mol Cell Biol* 1993;13(5):3122-3123 and 1993;13(6):3838-3839. *Mol Cell Biol.* 1993;13(3):1392-1407]

Schäfer C, Williams JA. Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: Possible roles in normal function and disease. *J Gastroenterol.* 2000;35:1-9

Schäfer C, Ross SE, Bragado MJ, Groblewski GE, Ernst SA, Williams JA. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/HSP27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J Biol Chem.* 1998;273:24173-24180

Schäfer C, Clapp P, Welsh MJ, Benndorf R, Williams JA. HSP27 expression regulates CCK-induced changes in the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells. *Am J Physiol.* 1999;277:C1032-C1043

Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, Lisy O, Jougasaki M, Wennberger PW et al. Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc.* 1999;74:126-130

Schmidt EV, Christoph G, Zeller R, Leder P. The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 1990;10(8):4406-4411

Schmidt J, Fernandez-del Castillo C, Rattner DW, Lewandrowski KB, Meßmer K, Warshaw AL. Hyperoncotic ultrahigh molecular weight dextran solutions reduce trypsinogen activation, prevent acinar necrosis, and lower mortality in rodent pancreatitis. *Am J Surg.* 1993;165:40-44

Schneider A, Suman A, Rossi L, Barmada MM, Beglinger C, Parvin S, Suttar S, Ali L, Khan AK, Gyr N, Whitcomb DC. SPINK 1/PSTI mutations are associated with tropical pancreatitis and type II diabetes mellitus in Bangladesh. *Gastroenterology* 2002;123(4):1026-1030

Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of «urodilatin», a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr.* 1988;66:752-759

Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001;181(2):160-166

Shaw SG, Weidmann P, Hodler J, Zimmermann A, Paternostro A. Atrial natriuretic peptide protects against acute ischemic renal failure in the rat. *J Clin Invest.* 1987;80:1232-1237

Steer ML. The early intraacinar cell events which occur during acute pancreatitis. *Pancreas* 1998;17(1):31-37

Steer ML. Pathogenesis of acute Pancreatitis. *Digestion* 1997;58 Suppl.1:46-49

Steer ML, Saluja AK. Experimental acute pancreatitis : studies of the early events that leads to cell injury. *The pancreas:biology, pathobiology and disease. 2nd edition.* V.L.W. Go et al., editors. Raven Press. New York, USA.1993:479-682

Steer ML, Meldolesi J. The cell biology of experimental pancreatitis. *N Eng J Med.* 1987;316(3):144-150

Strowski MZ, Sparmann G, Weber H, Fiedler H, Printz H, Jonas L, Göke B, Wagner AC. Cerulein pancreatitis increases mRNA but reduces protein levels of rat pancreatic heat shock proteins. *Am J Physiol.* 1997;273(4Pt1):G937-945

Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 ;168 :863-870

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988 ; 332 :78-81

Swift GH, Kruse F, MacDonald RJ, Hammer RE. Differential requirements for cell-specific elastase I enhancer domains in transfected cells and transgenic mice. *Genes Dev.* 1989;3(5):687-696

Teich N, Mössner J, Keim V. Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. *Hum Mutat.* 1998;12 (1):39-43

Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.* 1999; 5. Auflage: 371-375

Valentin JP, Ribstein J, Mimran A. Nicardipine and atrial natriuretic factor increase whole body vascular permeability in rats. *J Hypertens Suppl.* 1988;6(4):S303-S305

Van Acker GJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML. Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 ;283(3):G794-800.

Venugopal J. Cardiac natriuretic peptides—hope or hype. *J.Clin.Pharm.Ther.* 2001;26:15-31

Viedema JA, Perez-Mateo M, Dominguez JE, Carballo F. Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut* 1992; 33(9):1264-1267

Vollmar AM, Schulz R. Atrial natriuretic peptide inhibits nitric oxide synthesis in mouse macrophages. *Life Sci.* 1995;56(7):PL149-PL155

Vollmar AM. Influence of atrial natriuretic peptide on thymocyte development in fetal thymic organ culture. *J Neuroimmunol.* 1997;78(1-2):90-96

Vollmar AM, Kiemer AK. Immunomodulatory and cytoprotective Function of Atrial natriuretic Peptide. *Critical Reviews in Immunology* 2001;21(6):473-485

Wagner A. Pankreaserkrankungen in: Gastroenterologie systematisch. Göke B und Arnold R (Hrsg) UNI-MED, 1999;1. Auflage – Bremen:269-270

Wagner AC, Weber H, Jonas L, Nizze H, Strowski M, Fiedler F et al. Hyperthermie induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1996;111(5):1333-1342

Welch WJ. Mammalian Stress response:Cell Physiology, Structure/Function of Stress Proteins, and Implications for Medicine and Disease. *Physiological Reviews* 1992;72 (4):1063-1081

Westwood JT, WU C. Activation of Drosophila heat shock factor: conformational change associated with a monomer-to-trimer transition. *Mol Cell Biol.* 1993;13(6):3481-3486

Whitcomb DC. How to think about SPINK and pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(5):1085-1088.

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD et al. Hereditary pancreatitis is caused by mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996;14(2):141-145

Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, Sossenheimer MJ, Barua PS; Zhang Y et al. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 1996;110(6):1975-1980

Whitcomb DC. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 1999;116:770-772

Willemer S, Bialek R, Adler G. Localization of lysosomal and digestive enzymes in cytoplasmic vacuoles in caerulein-pancreatitis. *Histochemistry* 1990;94(2):161-170

Williams JA, Groblewski G, Ohnishi H, Yule D. Stimulus-Secretion Coupling of pancreatic digestive enzyme secretion. *Digestion.* 1997;58(Suppl.1):42-45

Williams JA. Signal transduction and intracellular signaling in pancreatic acinar cells. *Current Opinion in Gastroenterology.* 1995;11:397-401

Williams JA, Blevins GT, Jr. Cholecystokinin and the regulation of pancreatic acinar cell function. *Physiological Reviews.* 1993;73(4):701-723

Williams JA, Murray K, Dormer RL. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am Physiol Soc.* 1978;

Wynn RM, Davie J, Cox R, Chuang D. Molekular Chaperons: Heat-shock protein, foldases, and matchmakers. *J Lab Clin Med.* 1994;31-36

You CH, Chey WY. Atropine abolishes the potentiation effect of secretin and cholecystokinin-octapeptide on exocrine pancreatic secretion in humans. *Pancreas* 1988;3:99-104

Zhou W, Levine BA, Olson MS. Platelet-activating factor: a mediator of pancreatic inflammation during cerulein hyperstimulation. *Am J Pathol.* 1993;142(5):1504-1512

9 DANKSAGUNG

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Andreas Wagner herzlich danken für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung, die hervorragenden Möglichkeiten des selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens und der sehr guten Betreuung der Arbeit. Die zahlreichen Diskussionen und Gespräche waren mir eine große Hilfe und haben den Fortgang der Arbeit entscheidend beeinflusst.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. med. Claus Schäfer, der meine Arbeit während meiner ganzen Tätigkeit sehr unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für Anliegen aller Art hatte. Seine zahlreichen Anregungen und Tipps haben mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit sehr geholfen.

Bei Frau Claudia Jäger, Frau Dipl.-Biologin Konstanze Lenhard, Frau Dr. med. Constanze Kubisch, Herrn Dr. med. Eike Gallmeier und Frau Dr. med. Anne Tietz möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die freundliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben und für das überaus angenehme, herzliche und freundschaftliche Klima im Labor.

Des Weiteren gilt mein Dank:

Allen Kollegen des Arbeitskreises für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre,

Herrn Harald Schmidt für die tatkräftige Unterstützung bei der Generierung der transgenen Maus und

der Deutschen Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Mein Dank gilt besonders meiner Familie sowie all meinen Freunden für ihre Hilfe, Aufmunterung und Unterstützung, nicht nur während der Doktorarbeit.

10 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Irmgard Plößl
geboren am 09. Januar 1976 in Amberg
ledig

Schulausbildung

1982-1995 Volksschule Raigering in Amberg
Erasmus-Gymnasium in Amberg

Hochschulstudium

November 1995-April 1996 Studium der Chemie an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg

Mai 1996-April 2000 Studium der Pharmazie an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg

September 1998 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

April 2000 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Juni 2001 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Juli 2001 Approbation zur Apothekerin

Praktisches Jahr

Mai 2000-Oktober 2000 Fortuna Apotheke, Köln

November 2000-April 2001 Apotheke der Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken, Wiesbaden

Beruf

Mai 2001 Sonnen-Apotheke, Amberg

August 2001-Oktober 2001 Sonnen-Apotheke, Gräfelfing

November 2001-Oktober 2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der
Medizinischen Klinik II, Klinikum
Großhadern, München

seit 15. Oktober 2003 Apotheke des GPR Klinikum, Rüsselsheim