

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II-Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

Stressreaktion des Pankreas

Hat die Hämoxxygenase-1 (HSP32) eine protektive Wirkung auf die akute experimentelle Pankreatitis?

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

vorgelegt von
Tobias Gebhardt
aus
Wiesbaden

München 2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Wagner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Hoffmann
Prof. Dr. R. Gärtner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. C. Schäfer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2007

Meinen Eltern Gisela und Dieter,
welche mir gemeinsam mein Studium ermöglicht haben,
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis | IV |
| Tabellenverzeichnis | VI |
| 1. Gegenstand und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 1 |
| 2. Einleitung und Grundlagen | 4 |
| 2.1. Anatomie und Physiologie des Pankreas..... | 4 |
| 2.1.1. Allgemeine Anatomie | 4 |
| 2.1.2. Allgemeine Physiologie | 5 |
| 2.1.3. Exokrines Pankreas und dessen funktionelle Anatomie | 5 |
| 2.1.4. Physiologie des exokrinen Pankreas | 6 |
| 2.2. Ätiologie und Pathogenese der akuten Pankreatitis | 9 |
| 2.2.1. Ätiologie | 9 |
| 2.2.2. Pathophysiologische Modelle und Pathogenese der Pankreatitis .. | 10 |
| 2.2.3. Pathophysiologische Vorgänge in der Frühphase | 12 |
| 2.2.3.1. Sekretorische Blockade | 13 |
| 2.2.3.2. Frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung..... | 13 |
| 2.2.3.3. Immunologische Reaktion im Rahmen der akuten Pankreatitis | 17 |
| 2.3. Oxidativer Stress und zellulärer Schutz | 18 |
| 2.4. Hitzeschockproteine..... | 19 |
| 2.4.1. Expression und Aufgabe von Hitzeschockproteinen..... | 19 |
| 2.4.2. Hitzeschockproteingruppen..... | 20 |
| 2.4.3. Genetische Regulation der HSP-Synthese | 22 |
| 2.4.4. Induktion von Hitzeschockproteinen im Pankreas | 22 |
| 2.5. Hämoxygenase-1 (HO-1/HSP32)..... | 23 |
| 2.5.1. Charakterisierung der Hämoxygenase..... | 23 |
| 2.5.2. Formen und Funktionen der Hämoxygenase..... | 24 |
| 2.5.3. Struktur der Porphyrine und Einfluß von synthetischen Metalloporphyrinen wie Kobalt-Protoporphyrin (CoPP) | 26 |
| 2.5.4. Die Hämoxygenase als ein protektives Protein..... | 28 |
| 3. Ergebnisse | 31 |
| 3.1. Proteinexpression und Regulation von Hitzeschock-Proteinen im Pankreas..... | 31 |
| 3.1.1. Nachweis verschiedener HSPs im Pankreashomogenat nativ und nach Hyperthermie-Präkonditionierung..... | 31 |
| 3.1.2. CoPP induziert die HSP32-Expression im Pankreas | 35 |
| 3.1.3. Auswirkungen von Caerulein und Caerulein-induzierter Pankreatitis auf die HSP-Expression | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Biochemische Messungen und statistische Analysen..... | 45 |
| 3.2.1. Einfluss der Präkonditionierung auf die Trypsinaktivität in Pankreashomogenaten..... | 47 |
| 3.2.1.1. Validierung der Trypsinbestimmung..... | 47 |
| 3.2.1.2. Bestimmung von Trypsin in Pankreashomogenaten..... | 49 |
| 3.2.2. Einfluss der Präkonditionierung auf die Sekretion von Lipase und Amylase | 50 |
| 3.2.3. Ödembildung und relativer Wassergehalt..... | 53 |
| 3.3. Histologische und makroskopische Morphologie..... | 54 |
| 4. Diskussion | 61 |
| 5. Zusammenfassung | 71 |
| 6. Methoden | 72 |
| 6.1. Präkonditionierungen | 72 |
| 6.1.1. Präkonditionierung durch Hyperthermie..... | 72 |
| 6.1.2. Präkonditionierung durch CoPP..... | 72 |
| 6.2. Organentnahme des Pankreas zur Analyse der Proteinexpression | 73 |
| 6.3. Induktion einer akuten experimentellen Pankreatitis..... | 74 |
| 6.4. Pankreasödem | 75 |
| 6.5. Enzymaktivitätsmessungen..... | 75 |
| 6.5.1. Enzymaktivitätsmessung von Amylase..... | 75 |
| 6.5.2. Enzymaktivitätsmessung von Lipase | 76 |
| 6.5.3. Bestimmung von Trypsin in Pankreashomogenaten..... | 78 |
| 6.6. Western-Blotting zum Proteinnachweis | 80 |
| 6.6.1. Erstellung von Zellproben | 80 |
| 6.6.2. Quantitative Proteinbestimmung..... | 81 |
| 6.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 81 |
| 6.6.4. Transfer der Proteine auf Nitrozellulose..... | 82 |
| 6.6.5. Immunchemischer Nachweis von Proteinen..... | 83 |
| 6.6.6. Immunchemischer Nachweis von unterschiedlichen Proteinen auf gleicher Nitrozellulosemembran (Stripping) | 83 |
| 6.7. Histologische Untersuchungen | 84 |
| 6.7.1. Hämatoxylin/Eosin-Färbung..... | 84 |
| 6.8. Statistische Auswertungen..... | 84 |
| 7. Materialien | 86 |
| 7.1. Chemikalien und Reagenzien | 86 |
| 7.1.1. Narkose (Hyperthermie)..... | 86 |
| 7.1.2. Caeruleinpankreatitis | 86 |
| 7.1.3. Protein-Bestimmung | 86 |
| 7.1.4. Hämatoxylin/Eosin-Färbung (Histologie)..... | 86 |

| | |
|---|------------|
| 7.1.5. Amylase-Bestimmung | 87 |
| 7.1.6. Lipase-Bestimmung | 87 |
| 7.1.7. Trypsin-Bestimmung | 87 |
| 7.1.8. SDS-Probenaufbereitung | 88 |
| 7.1.9. Western-Blotting | 91 |
| 7.2. Technische Geräte und Materialien | 94 |
| 7.2.1. Technische Geräte..... | 94 |
| 7.2.2. Materialien | 95 |
| 7.3. Versuchstiere | 95 |
| 8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen | 96 |
| 9. Literaturverzeichnis | 99 |
| 10. Danksagung | 121 |
| 11. Lebenslauf | 122 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------------|---|----|
| Abb. 1 | <i>Anatomische Verhältnisse des Pankreas</i> | 4 |
| Abb. 2 | <i>Azinuszelle mit Schaltstücken und Ausführungsgang</i> | 6 |
| Abb. 3 | <i>Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Azinuszelle</i> | 7 |
| Abb. 4 | <i>Pathophysiologische Phänomene in der Frühphase der akuten Pankreatitis</i> | 13 |
| Abb. 5 a/b | <i>Physiologische Schutzmechanismen vor Selbstverdauung und Störungen bei hereditärer Pankreatitis</i> | 14 |
| Abb. 6 | <i>Immunantwort im Rahmen einer akuten Pankreatitis</i> | 17 |
| Abb. 7 | <i>Katalytische Reaktion der Hämoxygenase</i> | 24 |
| Abb. 8 | <i>Nomenklatur der Porphyrine</i> | 27 |
| Abb. 9 | <i>Cobalt (III) Protoporphyrin IX chloride [C₃₄H₃₂CoN₄O₄Cl]</i> | 28 |
| Abb. 10 | <i>Darstellung der Spezifität der Antikörper und der Einfluss von Hyperthermie auf die Expression von HSP32 und HSP70 im Pankreas und der Leber</i> | 32 |
| Abb. 11 | <i>Einfluss von Hyperthermie auf die Expression von HSP25/27 im Pankreas und der Leber</i> | 34 |
| Abb. 12 | <i>Einfluss der Präkonditionierung mit CoPP auf die Induktion von HSP32 im Vergleich mit HSP70</i> | 35 |
| Abb. 13 | <i>Dosisabhängige Induktion von HSP32 durch CoPP-Präkonditionierung (Dose response)</i> | 37 |
| Abb. 14 a/b | <i>Einfluss von Hyperthermie und CoPP im Vergleich auf HSP25/27 und 32 im Pankreas</i> | 38 |
| Abb. 15 | <i>Die Induktion von HSP25 nach CoPP-Präkonditionierung mit steigender Dosis</i> | 40 |
| Abb. 16 | <i>Auswirkung von Caerulein, Hyperthermie und CoPP auf das Expressionsmuster von HSP32 und HSP70 im Vergleich</i> | 42 |
| Abb. 17 | <i>Western Analyse mit Anti-HSP32 und die Auswirkungen von Trägerlösungen auf die HSP32-Expression</i> | 44 |
| Abb. 18 | <i>Messung der Zunahme der Fluoreszenz bei definierten Standard-Trypsinkonzentrationen</i> | 48 |
| Abb. 19 | <i>Kalibriergerade aus den ermittelten Steigungen der Standardkonzentrationen</i> | 48 |
| Abb. 20 | <i>Trypsinaktivität im Pankreasgewebe</i> | 49 |
| Abb. 21 | <i>Aktivität der Lipase im Serum der Versuchstiere</i> | 51 |
| Abb. 22 | <i>Aktivität der Amylase im Serum der Versuchstiere</i> | 52 |
| Abb. 23 | <i>Relativer Wassergehalt des Pankreas (Feuchtgewicht)</i> | 53 |
| Abb. 24 | <i>Darstellung des OP-Situs eines Tieres ohne CoPP-Präkonditionierung nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis</i> | 55 |
| Abb. 25 | <i>Darstellung des OP-Situs eines Tieres ohne CoPP-Präkonditionierung nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis</i> | 56 |

| | | |
|----------------|---|----|
| Abb. 26 | <i>Darstellung des OP-Situs eines durch CoPP-Präkonditionierung vorbehandelten Tieres nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis</i> | 57 |
| Abb. 27 | <i>Darstellung des OP-Situs eines durch CoPP-Präkonditionierung vorbehandelten Tieres nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis</i> | 58 |
| Abb. 28 | <i>Darstellung von nativem Pankreasgewebe eines Versuchstieres</i> | 59 |
| Abb. 29 | <i>Darstellung von Pankreasgewebe eines Versuchstieres 6h nach Caerulein-induzierter Pankreatitis</i> | 59 |
| Abb. 30 | <i>Darstellung von Pankreasgewebe eines Versuchstieres 6h nach Caerulein-induzierter Pankreatitis und 24h nach CoPP-Präkonditionierung</i> | 60 |
| Abb. 31 | <i>Reaktion des Lipase-Farbtests</i> | 77 |
| Abb. 32 | <i>Berechnung der Lipaseaktivität</i> | 77 |
| Abb. 33 | <i>Fluorimetrische Umsetzung des Substrats durch Trypsin</i> | 79 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabelle 1 | <i>Häufigste Faktoren und Ursachen als Auslöser einer Pankreatitis.....</i> | 9 |
| Tabelle 2 | <i>Die bekanntesten und wichtigsten Gruppen der Hitzeschock-Proteine</i> | 21 |
| Tabelle 3 | <i>Übersicht über die Isoformen der Hämoxygenase</i> | 26 |
| Tabelle 4 | <i>Verdünnungen der verwendeten Antikörper zum immunochemischen Nachweis der HSPs.....</i> | 31 |
| Tabelle 5 | <i>Vorbehandlungen der Versuchstiere in einzelnen Versuchsgruppen.....</i> | 45 |
| Tabelle 6 | <i>Verwendete Reagenzien in einzelnen Versuchsgruppen</i> | 73 |
| Tabelle 7 | <i>Reagenzien des enzymatischen Farbttests (nach Roche)</i> | 76 |
| Tabelle 8 | <i>Darstellung der eingesetzten Standardtrypsinkonzentrationen</i> | 80 |
| Tabelle 9 | <i>Darstellung der Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele</i> | 82 |

1. Gegenstand und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die akute Pankreatitis ist in den Industrieländern eine relativ häufig vorkommende Erkrankung des Pankreas mit einer Inzidenz von 20 bis 100 Fällen pro 100.000 Menschen jährlich.

Das Ursachenspektrum ist breit gefächert (s. *Abschnitt 2.2.1.*) und der Krankheitsverlauf in mehr als $\frac{3}{4}$ der Fälle mild und selbstlimitierend. In etwa 20 bis 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. Es wurden zwar in den letzten Jahren Konzepte etabliert, wie z.B. die sekretorische Blockade, die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung oder andere pathologische Vorgänge (s. *Abschnitt 2.2.3.*), 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 des Klinikums Großhadern erforscht die Stressreaktion des Pankreas, 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.

Es können offensichtlich mehrere Hitzeschockproteine (HSPs) im Pankreas durch Präkonditionierung mit verschiedenen Methoden induziert werden, so dass sich die Frage nach der Bedeutung individueller HSPs in diesem Organ stellt. Es finden sich in der Literatur zumindest zahlreiche Hinweise dafür, dass verschiedene Hitzeschockproteine in anderen Systemen protektive Wirkung zeigen, wobei der genaue Mechanismus immer noch nicht gut verstanden ist.

Durch die eingehende Untersuchung der Stressreaktion konnte bereits gezeigt werden, dass Hitzeschockproteine, wie z.B. HSP27 oder HSP70, im Tiermodell gegenüber einer akuten Pankreatitis protektiv wirken [Kubisch et al. 2004, Schäfer

et al. 2005] und dass verschiedene Präkonditionierungen, wie zum Beispiel die Hyperthermie-Präkonditionierung und auch die akute Pankreatitis selbst (s. *Abschnitt 2.4.4.*), zur Expression von Hitzeschockproteinen, wie zum Beispiel HSP70, im Pankreas führen [Wagner et al. 1996].

Die Expression wird durch Stress in großen Mengen induziert und die Überexpression führt zu erhöhter Widerstandsfähigkeit gegenüber Hitze oder anderen Stressfaktoren in einer Reihe von Zelllinien [Kubisch et al. 2004]. HSP27 ist offensichtlich an der Regulation des Zytoskeletts, insbesondere des Aktins, beteiligt, indem die Überexpression zu einer Stabilisierung der Aktin-Mikrofilamente führt [Schäfer et al. 1999, Kubisch et al. 2004].

Neben der Untersuchung von HSP27 und HSP70, die nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, steht besonders HSP32 (Hämoxygenase-1) [Ewing und Maines 1991] und dessen Bedeutung im Rahmen der akuten Pankreatitis im Vordergrund. Dies gilt nicht zuletzt deshalb, weil dieses Hitzeschockprotein relativ gut definierte und biochemisch beeinflussbare Funktionen hat, so dass die selektive Hemmung und Aktivierung dieses HSPs Aussagen bezüglich seiner Bedeutung für die Stressreaktion bei der Pankreatitis zulassen. Auch ist der Einfluss auf die akute Pankreatitis anhand spezifischer Parameter, wie Enzymaktivitäten (Amylase, Lipase, Trypsin) oder morphologische Veränderungen (Histologie, Ödembildung), gut im Verlauf zu dokumentieren und soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Im Pankreas wird HSP32/HO-1 in der Spätphase durch Caerulein induziert [Fu et al. 1997, Sato et al. 1997]. Es existieren allerdings keine Daten zur Induktion in der Frühphase der akuten Pankreatitis oder zur Induktion durch Hyperthermie. Durch zuletzt genannte Methode lassen sich Vergleiche zu anderen HSPs, wie z.B. HSP27 oder HSP70, welche in unserer Arbeitsgruppe eingehender untersucht wurden, ziehen [Kubisch et al. 2004, Ploessl et al. 2005, Schäfer et al. 2005].

Untersuchungen über mögliche protektive Effekte der HO-1 im Pankreas liegen ebenfalls nicht vor. Da die HO-1 zur Anhäufung antioxidativ wirkender Metabolite wie Biliverdin und Bilirubin führt [Elbirt und Bonkovsky 1999], erscheint eine wichtige Rolle der HO-1 für die Stressreaktion bei der akuten Pankreatitis zumindest aufgrund theoretischer Erwägungen durchaus plausibel, da oxidativer Stress bei der Entstehung der akuten Pankreatitis sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle spielt [Schulz et al. 1999]. Sauerstoffradikale können mit einer Vielzahl von zellulären

Molekülen wie Lipiden und Proteinen interagieren und zu Funktionsbeeinträchtigung führen. Nachdem oxidativer Stress sehr wahrscheinlich einen wichtigen Pathomechanismus bei der Entstehung der akuten Pankreatitis, zumindest im Tiermodell darstellt, ist die Funktion der HO-1, Zellen vor oxidativem Stress zu schützen, folglich sehr interessant (s. *Abschnitt 2.3.*).

Darüber hinaus lässt sich die HO-1, im Unterschied zu anderen Hitzeschockproteinen, biochemisch mit verschiedenen Porphyrinen entweder hemmen (Zink-Protoporphyrin, Zinn-Protoporphyrin) oder aktivieren (Kobalt-Protoporphyrin) (s. *Abschnitt 2.5.3.*) und ist dadurch gut regulierbar [Amersi et al. 1999]. Diese Induktionsmöglichkeit stellt sich im Gegensatz bei anderen HSPs (z.B. HSP70) nicht dar, so dass sich hier eine sehr spezifische Darstellung der Auswirkungen und der Effekte auf die akute Pankreatitis, sowie der pharmakologischen Induktionsmöglichkeit bietet, welche im Weiteren dargestellt werden soll.

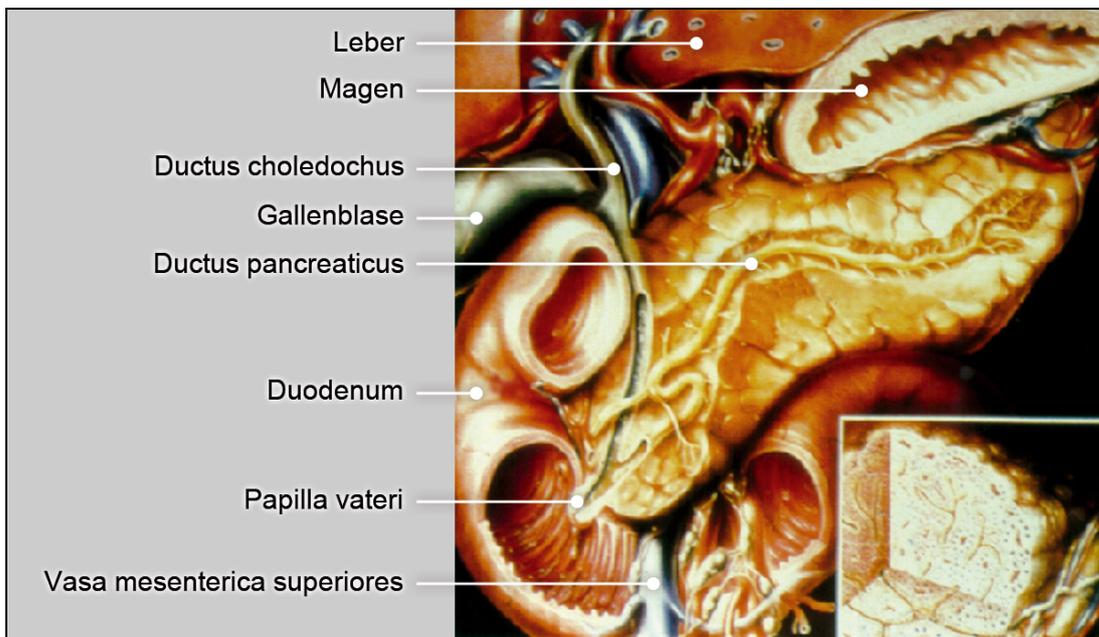
2. Einleitung und Grundlagen

2.1. Anatomie und Physiologie des Pankreas

2.1.1. Allgemeine Anatomie

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) als zentrales Organ für die Verdauung und die Regulation des Blutzuckers ist eine exokrine und endokrine Drüse und liegt retroperitoneal in Höhe des zweiten Lendenwirbels hinter dem Magen. Sie gliedert sich in Kopf (Caput), Körper (Korpus) und Schwanz (Cauda). Der Kopf liegt im oberen Anteil des Duodenum, dem duodenalen C, das dünnere Ende mit dem Pankreasschwanz im Bereich des Milzhilus. Ihr Gewicht ist etwa 70 g bis 90 g, sie ist knapp 15 bis 20 cm lang, aber nur etwa 3 cm dick.

Abb. 1 Anatomische Verhältnisse des Pankreas



In der Bauchspeicheldrüse befinden sich kleine Drüsenläppchen, die das Pankreassekret produzieren. Die Drüsenläppchen geben das Sekret in feine Gänge ab, die sich zur Mitte der Bauchspeicheldrüse hin in einen großen Hauptausführungsgang, den Ductus pancreaticus, vereinen. Dieser Pankreasgang mündet zu 80% mit dem Ausführungsgang der Gallenblase in die Papilla vateri (Papilla duodeni major) des Duodenums und ist von einer zarten Kapsel aus kollagenem Bindegewebe umgeben. Die Blutversorgung erfolgt durch zahlreiche kleinere Äste der Arteria mesenterica superior und des Truncus Coeliacus (A. splenica, A. gastroduodenalis).

2.1.2. Allgemeine Physiologie

Das Pankreas ist ein zentrales Organ für die Verdauung und die Regulation des Blutzuckers und 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. Dabei ist für die vorliegende Arbeit 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.

2.1.3. Exokrines Pankreas und dessen funktionelle Anatomie

Das exokrine Pankreas des Menschen ist eine seröse, lobulär gegliederte Drüse. Diese Lappen wiederum sind aus kleineren Lobuli zusammengesetzt, die mehrere Gangverzweigungen enthalten, an deren Enden sich beerenförmige Drüsenendstücke, die so genannten Azinuszellen, angliedern. Diese stellen die morphologische und funktionelle Grundeinheit dar (s. *Abb. 2*).

Die pyramidenförmige Azinuszelle ist ungefähr 12-15 µm hoch und begrenzt mit ihrer durch Mikrovilli besetzten apikalen Membran das Azinulumen. Die hauptsächlich apikal körnige Struktur ist bedingt durch die azidophilen Zymogengranula. Deren Menge ist vom Funktionszustand der Zelle abhängig.

Die Azini sind dicht nebeneinander gepackt, das azinäre Lumen variiert im Durchmesser in Abhängigkeit der Sekretionsphase. Im Interstitium der benachbarten Azini befinden sich Fibrozyten, zwischen denen eingebettet die Aufzweigungen der Blutgefäße und der Nerven verlaufen. Diese enden mit ihren

Synapsen an der basalen Plasmamembran der azinären Zelle, wobei sie von deren Basallamina umhüllt werden. Jeder Azinus ist über das Schaltstück mit den intralobulären und den in Bindegewebssepten verlaufenden interlobulären Gängen verbunden. Die Schaltstücke sind relativ lang und münden direkt in die Ausführungsgänge (s. Abb. 2).

Abb. 2 Azinuszelle mit Schaltstücken und Ausführungsgang



Die Ausführungsgänge bestehen aus einem allmählich an Höhe zunehmenden prismatischen Epithel. Sie beginnen bereits intralobulär, die großen interlobulären Gänge besitzen in der breiten bindegewebigen Hülle kleine, in die Ausführungsgänge mündende, mukoide Drüsen. Die multiplen Ausführungsgänge führen schließlich in den Hauptausführungsgang, den Ductus pancreaticus, der in der Pars descendens des Duodeni auf der Papilla duodeni major mündet. Ein sehr variabler akzessorischer Ductus pancreaticus accessorius mündet in den Hauptgang oder selbständig in das Duodenum [Bockman et al. 1983, Ingbar 1993].

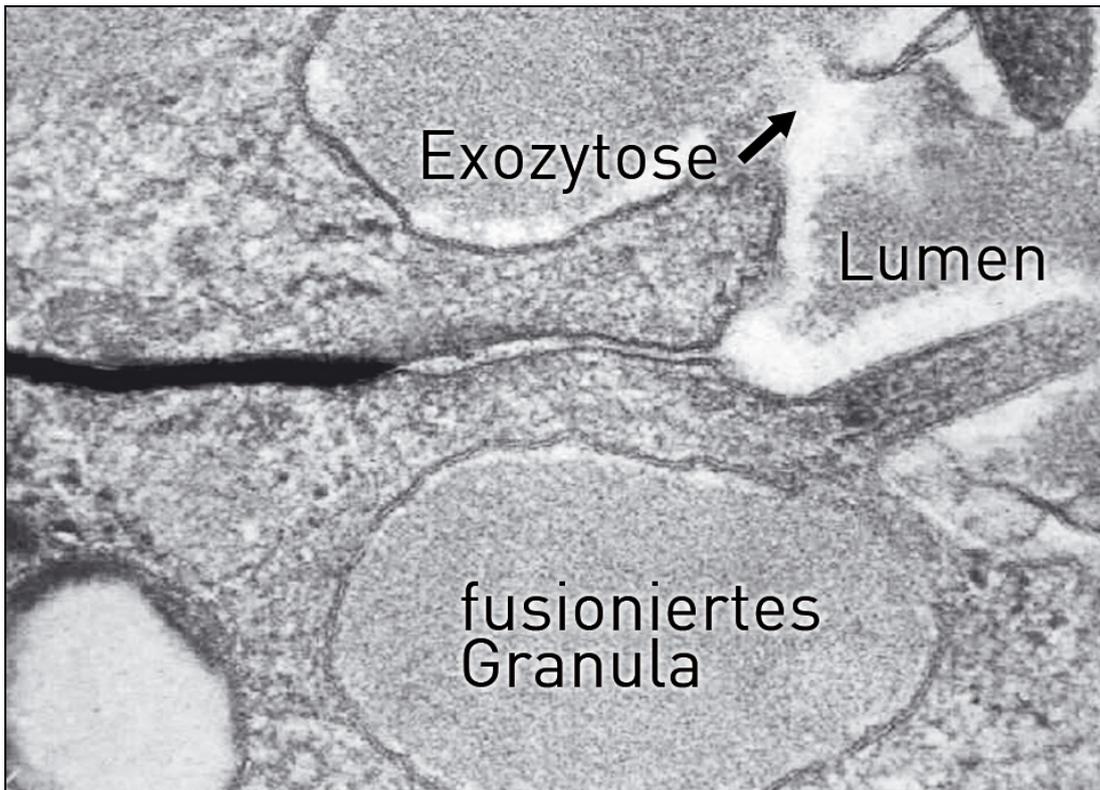
2.1.4. Physiologie des exokrinen Pankreas

Die Hauptfunktion des exokrinen Pankreas und der pankreatischen Azinuszellen ist die Synthese, Speicherung und Sekretion von Verdauungs- und anderen Enzymen. Das Pankreas des Menschen bildet täglich ca. 1,0 l bis 1,5 l blutisotones Sekret.

Das Sekret hat einen pH von 8,0 bis 8,4 und enthält Wasser, Elektrolyte wie Natrium und Kalium, Anionen (Hydrogencarbonat, bis zu 125 mmol/l) und Enzyme, wie Peptidasen (Trypsin (Trypsinogen), Chymotrypsin (Chymotrypsinogen), Carboxypeptidase), Lipasen (Lipase, Phospholipasen, Cholinesterase), Ribonukleasen und α -Amylase.

Die Verdauungs- bzw. Proenzyme werden im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und von dort zum Golgi-Apparat transportiert. Die intrazelluläre Speicherung der Enzyme erfolgt in so genannten Zymogengranula, 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 Enzyme in die Lumina der Azini kommt, gleichzeitig findet eine intensive Neusynthese statt [Williams 1995, Williams et al. 1997].

Abb. 3 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Azinuszelle



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 [Adler et al. 1991, Niederau et al. 1994].

Üblicherweise unterteilt man die exokrine Pankreassekretion in eine interdigestive (basale) und in eine digestive (prandiale bzw. postprandiale) Phase. Die interdigestive Sekretion findet man bei Nahrungskarenz bzw. dann, wenn die aufgenommene Nahrung bereits vom Magen verdaut und von Jejunum und Ileum resorbiert worden ist. Sie ist charakterisiert durch zyklische Aktivitätsschwankungen, assoziiert mit dem Rhythmus der interdigestiven Motilität des oberen Gastrointestinaltraktes. Die digestive Phase setzt schon vor der eigentlichen Nahrungsaufnahme ein, nämlich bereits bei Vorstellung, Geruch und Anblick von Speisen. Bei unmittelbarem Kontakt des Magens und des Dünndarms mit der Nahrung bzw. mit dem Chymus wird sie verstärkt. Sie ist gekennzeichnet durch die Ausschüttung großer Mengen an Wasser, Hydrogencarbonat und Pankreasenzymen [Singer 1983].

Die Kontrolle über die Sekretion des exokrinen Pankreas unterliegt also neuralen, hormonalen und auch parakrinen Mediatoren [Solomon 1987]. Unter physiologischen Bedingungen existiert folglich im Gesamtorganismus eine Vielzahl an stimulatorischen und inhibitorischen Regulationsmechanismen der Pankreasfunktion. Diese bestimmen im Zusammenspiel die sekretorische Leistung des exokrinen Pankreas insgesamt [Singer 1983]. Das normale exokrine Pankreas zeigt folglich nicht eine konstitutive, sondern eine regulierte Sekretion, bei der die Sekretionsprodukte in Abhängigkeit von extrazellulären Einflüssen synthetisiert und nach Modifikation innerhalb der intrazellulären Kompartimente in die Zymogengranula verpackt und exozytotisch freigesetzt werden [Palade 1975]. Über transmembranöse und intrazelluläre Signalvermittlung erfolgt so eine Adaptation der exokrinen Pankreasfunktion an die kurzfristigen, aber auch langfristigen Veränderungen der Umweltbedingungen, wie beispielsweise die Zusammensetzung der Nahrung [Morisset und Webster 1972, Webster et al. 1972, Kotler und Levine 1979].

2.2. Ätiologie und Pathogenese der akuten Pankreatitis

2.2.1. Ätiologie

Der Begriff „akute Pankreatitis“ beschreibt eine Vielzahl unterschiedlicher Entzündungsformen des exokrinen Pankreas, die sich hinsichtlich Klinik, Morphologie und Ätiologie unterscheiden, wobei viele pathogenetische Faktoren, die den Verlauf dieser Erkrankung beeinflussen, zum größten Teil noch unbekannt sind.

Tabelle 1 Häufigste Faktoren und Ursachen als Auslöser einer Pankreatitis

| | |
|--|--|
| Metabolisch | Alkohol Medikamente (z.B. <i>Thiazide, Diuretika</i>) Hypertriglycidämie / Hyperlipoproteinämie Hyperkalzämie Genetische Ursachen |
| Mechanisch | Gallensteine Iatrogen (z.B. <i>ERCP</i>) Trauma Pankreastumor / Papillentumor Kongenitale Anomalien Sphinkter oddi Dysfunktion |
| Vaskulär | Schock Embolien Polyarteriitis nodosa |
| Infektiös | Mumps Coxsackie virus <i>M. Pneumoniae</i> Parasiten Gifte |
| Hereditäre Formen <i>(sind meistens häufiger Ursache einer chronischen Pankreatitis)</i> | Trypsinogen-Gen SPINK 1 CFTR |

Wie andere Organe auch, reagiert das Pankreas dabei recht einförmig auf eine ganze Reihe unterschiedlicher schädlicher Einflüsse und Noxen. Das klinische Bild der akuten Pankreatitis variiert von einer milden Verlaufsform mit interstitiellen Ödemen und „*restitutio ad integrum*“, bis hin zur schweren Verlaufsform mit

Multiorganversagen und Sepsis, was sich besonders in der schweren nekrotisierenden oder hämorrhagischen Form der Erkrankung manifestiert.

Die akute Pankreatitis weist keine einheitliche Ätiologie auf, sondern kann durch unterschiedliche Noxen ausgelöst werden (s. *Tab. 1*). Häufigste Ursachen der akuten Pankreatitis sind Gallengangssteine (obstruktive Störungen) und Alkoholabusus. Seltener Ursachen sind unter anderem Medikamente, Toxine, ERCP (iatrogene Ursache) und Tumore. Bei der chronischen Pankreatitis ist Alkoholabusus die häufigste Ursache. Zusätzlich gibt es auch genetische Ursachen, die die Prädisposition für eine chronische Pankreatitis erhöhen können [Nam und Murthy 2003].

2.2.2. Pathophysiologische Modelle und Pathogenese der Pankreatitis

In experimentellen Modellen der Erkrankung gibt es zahlreiche Faktoren, welche eine Pankreatitis auslösen können, einbegriffen biliäre Obstruktion, die direkte toxische Schädigung durch Ethanol und andere Toxine (wie z.B. Pharmaka), die ischämische Schädigung, die Schädigung durch freie Radikale, Hypertriglyceridämie, Hypercalcämie, eine Permeabilitätszunahme des Pankreasganges und Hyperstimulation der Drüse sowie genetische Ursachen.

Die klassische Hypothese besagt, dass die biliäre Pankreatitis durch die Passage eines Gallensteins durch das terminale bilio-pankreatische Gangsystem verursacht werden kann, wobei gelegentlich eine Inkarzeration im ampullären Bereich auftritt. Dieses Konzept basiert auf Opie's „Obstruktionstheorie“ von 1901 [Opie 1901]. Diese Theorie basierte auf dem bei zwei an Pankreatitis verstorbenen Patienten erhobenen, autoptischen Nachweis von Gallensteinen, welche die Papilla major verschlossen. Allerdings findet sich ein gemeinsamer Ausführungsgang von Pankreas- und Gallenwegen, welcher lang genug wäre, einen Gallereflux im Falle einer steinbedingten Okklusion der Papille zu erlauben, nur bei weniger als 20% der Bevölkerung.

Weitere obstruktive Ursachen sind z.B. Trauma oder Tumor, welche mit einer intraduktalen Druckerhöhung und einem duktalem Permeabilitätsanstieg einhergehen können. Durch die Abflussbehinderung des Pankreassekretes im Ductus pancreaticus ist die Ausschleusung der Pankreasproenzyme aus der

Azinuszelle gestört. Die Folge ist eine intrapankreatische Aktivierung dieser Enzyme und somit Autodigestion des Organs [Steer 1997].

Hauptvertreter der direkten toxischen Schädigung, ist die akute Alkoholpankreatitis [Apte und Wilson 2003]. Ursprung der alkoholinduzierten Pankreatitis ist die Azinuszelle. Schon lange ist bekannt, dass Alkohol in Pankreasazinuszellen ganz ähnlich wie in Hepatozyten metabolisiert werden kann [Clemente et al. 1977]. Es gibt Hinweise, dass Alkoholmetabolite, zum Beispiel durch oxidativen Stress, zur Schädigung von Azinuszellen bis zu Nekrosen führen können. Dies wiederum führt zur Freisetzung von Chemokinen (z.B. MIP-1) und Zytokinen (z.B. TNF- α) durch die Azinuszellen [Grady et al. 1997, Gukovskaya et al. 1997, Brady et al. 1999, Han et al. 2000] (s. *Abschnitt 2.2.3.3*). Oxidativem Stress sind auch unterschiedliche Effekte auf die Pankreassekretion, die Pankreasgangpermeabilität und den Druck im Pankreasgang zugeschrieben worden. Die Daten hierzu sind allerdings widersprüchlich.

Aufgrund des aktuellen Kenntnisstandes scheint also ein direkter toxischer Effekt von Alkohol und seinen Metaboliten bei entsprechend (genetisch oder durch Cofaktoren) disponierten Patienten eine pathologische Sequenz auszulösen. Diese beginnt mit der Azinuszellschädigung bis zur Nekrose und mündet in der Freisetzung entzündlicher Mediatoren mit Stimulation des Immunsystems und Rekrutierung von Makrophagen und Lymphozyten, in akuten rezidivierenden Entzündungen sowie der Aktivierung von pankreatischen Sternzellen und konsekutiver Fibrose. Neben genetischen Faktoren spielt zum Beispiel Rauchen eine Rolle und scheint das Risiko für die Entstehung alkoholischer Pankreatitiden und für die Fibrose sowie Verkalkungen des Pankreas zu erhöhen [Hartwig et al. 2000].

Offensichtlich müssen zum Alkohol noch weitere, entweder äußere oder auch interne (genetische) Faktoren hinzukommen, da nur ein kleiner Teil der Alkoholiker Pankreatitiden entwickelt [Dreiling und Koller 1985, Steinberg und Tenner 1994]. Die bislang bekannten genetischen Ursachen der chronischen Pankreatitiden scheinen bei Alkoholikern nicht wesentlich häufiger aufzutreten, so dass wesentliche Polymorphismen möglicherweise noch nicht gefunden wurden.

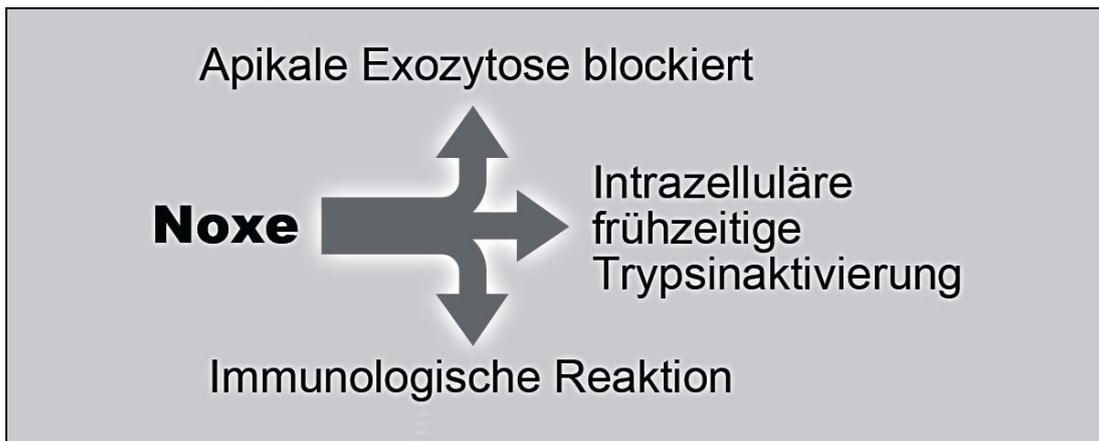
Mehrere genetische Ursachen für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis wurden in den letzten Jahren beschrieben. Whitcomb et al. zeigten, dass

Mutationen im kationischen Trypsinogenen (PRSS1) für die hereditäre Pankreatitis (s. *Abschnitt 2.2.3.2.*) verantwortlich sein können [Whitcomb et al. 1996 und 1999]. Mutationen im pankreatischen sekretorischen Trypsin Inhibitor (SPINK1) [Witt et al. 2000] oder dem „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) [Cohn et al. 1998] können offensichtlich die Prädisposition für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis erhöhen.

2.2.3. Pathophysiologische Vorgänge in der Frühphase

Abhängig vom auslösenden Faktor entwickelt sich die pathogenetische Sequenz der akuten Pankreatitis entweder aus der direkten Azinuszellschädigung, wie dies vor allem bei metabolischen Ursachen zu erwarten ist oder über vorzeitige Aktivierung von Enzymen und deren Übertritt in den interstitiellen Bereich des Pankreasgewebes. Über eine dieser beiden Sequenzen mündet das Krankheitsgeschehen in die gemeinsame Endstrecke der pathomorphologischen Schädigung. Möglicherweise kommt es bei verschiedenen Faktoren sogar von Anfang an zu einer Überlagerung der intraduktalen Gangpermeabilitätsstörung und direkten Azinuszellschädigung.

Um die pathophysiologischen Vorgänge genauer zu beschreiben, wurden in den letzten Jahren konkrete praxisrelevante Konzepte entwickelt und es hat sich ein Konzept der Pathophysiologie etabliert, welches erlaubt, für die Frühphase der akuten Pankreatitis drei entscheidende Phänomene (s. *Abb. 4*) zu definieren [Steer 1997, Grendell 1997]. Es wurde publiziert, dass es zu Beginn einer akuten Pankreatitis zur sekretorischen Blockade [Saluja et al. 1999] (s. *Abschnitt 2.2.3.1.*), zur frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung [Saluja et al. 1997, Hofbauer et al. 1998, Saluja et al. 1999] (s. *Abschnitt 2.2.3.2.*) und letztlich durch die Bildung proinflammatorischer Mediatoren zu einer immunologischen Antwort auf die pathophysiologischen Vorgänge kommt [Grady et al. 1997, Brady et al. 1999] (s. *Abschnitt 2.2.3.3.*).

Abb. 4 Pathophysiologische Phänomene in der Frühphase der akuten Pankreatitis

2.2.3.1. Sekretorische Blockade

Die sekretorische Blockade zu Beginn der Entstehung einer akuten Pankreatitis ist ein bereits seit längerem bekanntes Phänomen. Man versteht darunter, dass die Sekretionsantwort nach Stimulation mit bestimmten Sekretagoga, wie Cholezystokinin (CCK), biphasisch verläuft. Nach Erreichen der maximal sekretorisch 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 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 [Schäfer und Williams 2000, Kubisch et al 2004].

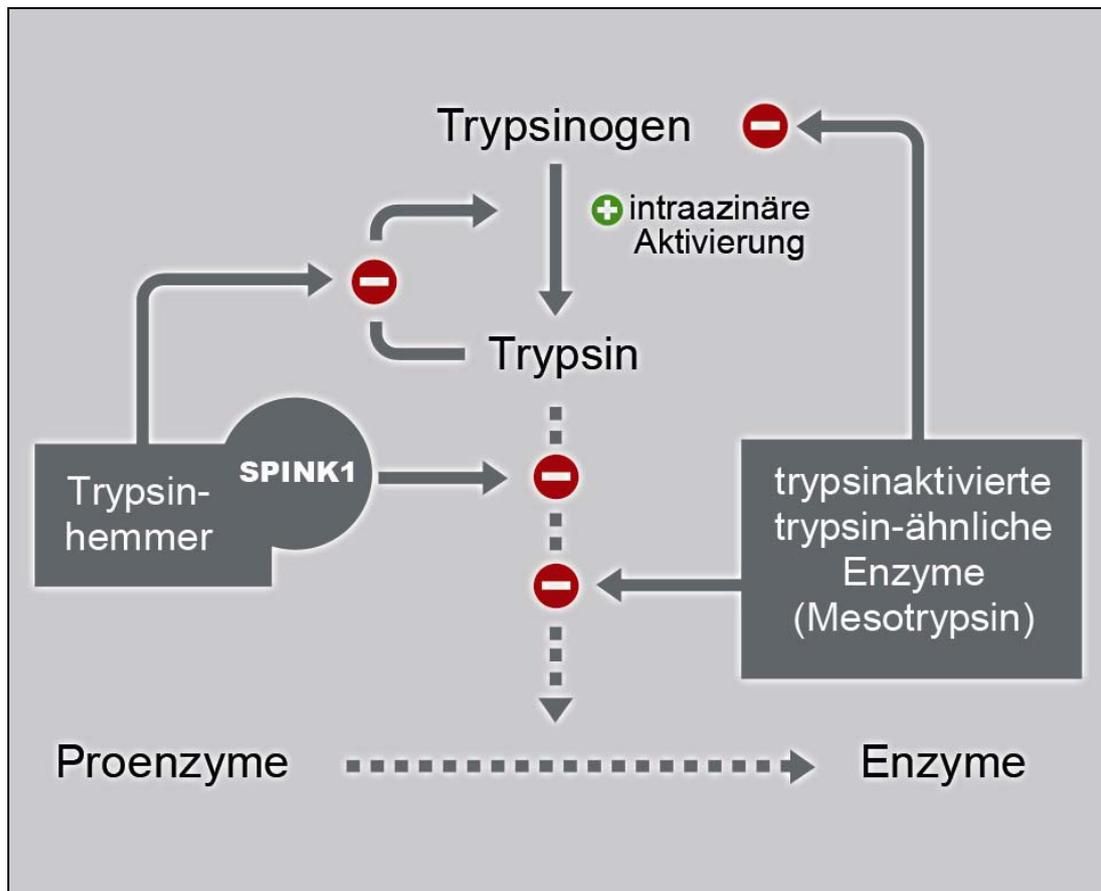
2.2.3.2. Frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung

Ein weiteres wichtiges Ereignis ist die frühzeitige, intrazelluläre (intraazinäre) Aktivierung von Verdauungsenzymen, insbesondere von Trypsinogen zum proteolytischen Enzym Trypsin. Dieses Konzept wird schon lange diskutiert, da es bei der Pankreatitis zu einem Selbstverdau des Pankreas kommen kann.

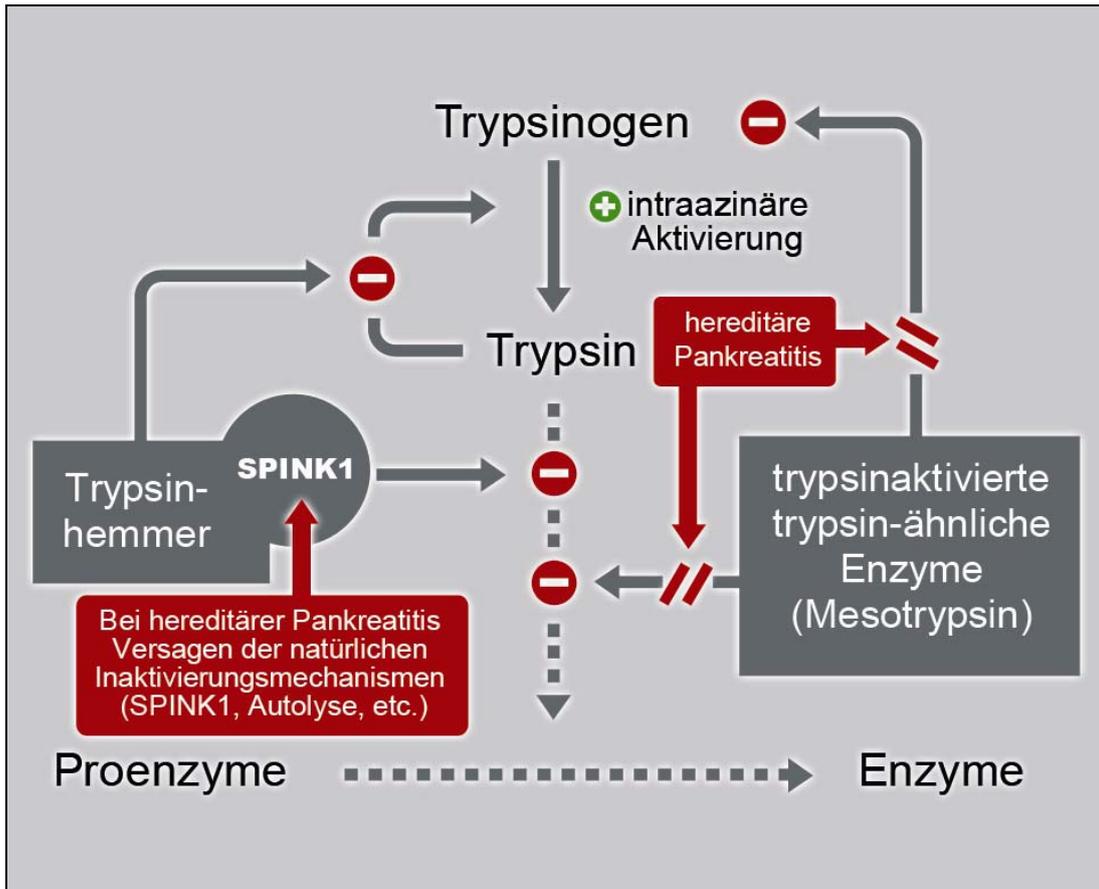
Physiologischerweise erfolgt die Aktivierung der Verdauungsenzyme überwiegend nach Erreichen des Duodenums. Trypsinogen wird von der Enterokinase des Dünndarmepithels durch Abspaltung eines Peptides zu Trypsin aktiviert. Trypsin aktiviert dann die übrigen Proenzyme (proteolytische Kaskade).

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 und zum anderen wird die Selbstverdauung des Pankreas durch kleinere Mengen intraazitär aktivierten Trypsins physiologischerweise durch verschiedene protektive Mechanismen verhindert (s. Abb. 5 a/b).

Abb. 5 a/b Physiologische Schutzmechanismen vor Selbstverdauung und Störungen bei hereditärer Pankreatitis



a) Modell der intrazellulären Mechanismen gegen frühzeitige Trypsinaktivierung. Dazu gehören neben einem sauren pH-Wert in den Zymogengranula, der Serinproteaseninhibitor Typ KAZAL I (SPINK1), der reversibel bis zu 20% des Trypsins blockieren kann, welches durch vorzeitige Aktivierung von Trypsinogen anfällt und die Autolyse durch Trypsin verhindert. Des Weiteren gibt es trypsinaktivierte trypsinähnliche Enzyme, wie Mesotrypsin, die Trypsinogen degradieren, sowie unspezifische Antiproteasen im Pankreasparenchym wie α -1-Antitrypsin oder α -2-Makroglobulin [Lerch und Gorelick 2000].



b) Mutationen im Trypsinogenen bewirken einen verminderten Abbau durch Mesotrypsin bzw. Mutationen im SPINK-Gen können die trypsinhemmende Aktivität reduzieren.

Durch die Klonierung des Gendefektes der hereditären Pankreatitis konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Aktivierbarkeit des Trypsinogens (frühzeitige Trypsinaktivierung) offensichtlich rezidivierende Schübe akuter Pankreatitiden verursachen kann [Whitcomb et al. 1996, Teich et al. 1998]. Die hereditäre Pankreatitis ist eine seltene Erkrankung mit autosomal dominantem Erbgang. Bei betroffenen Patienten kommt es bereits im Kindesalter zu rezidivierenden Pankreatitisschüben mit Entwicklung einer chronischen Pankreatitis. Mindestens zwei Mutationen im Gen des kationischen Trypsinogens sind inzwischen bei Familien mit hereditärer Pankreatitis beschrieben. Man vermutet, dass eine Mutation (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 weiterer Verdauungsenzyme bereits intrazellulär möglich wird [Whitcomb et al. 1996, Grendell 1997]. Die zweite Mutation (Asp21Iso) führt dagegen möglicherweise zu einer verstärkten Aktivität des Trypsins in saurem Milieu, was eine gesteigerte Aktivität in den Zymogengranula ebenfalls

erklären könnte [Teich et al. 1998, Keim et al. 1999]. Diese Arbeiten zeigen, dass Trypsinmutationen ausreichend für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis sein können. Auch wurde eine Mutation (N34S) im Gen des Trypsinhemmers SPINK1 (Serin Protease Inhibitor Typ KAZAL I) bei familiär gehäuften Pankreatitisfällen und bei Kindern mit idiopathischer chronischer Pankreatitis gefunden, aber auch in 2% der Kontrollpersonen, so dass gefolgert wird, dass diese Mutation eher krankheitsmodifizierend als -verursachend ist [Witt et al. 2000 und 2002, Threadgold et al. 2002, Keim 2002, Whitcomb 2002].

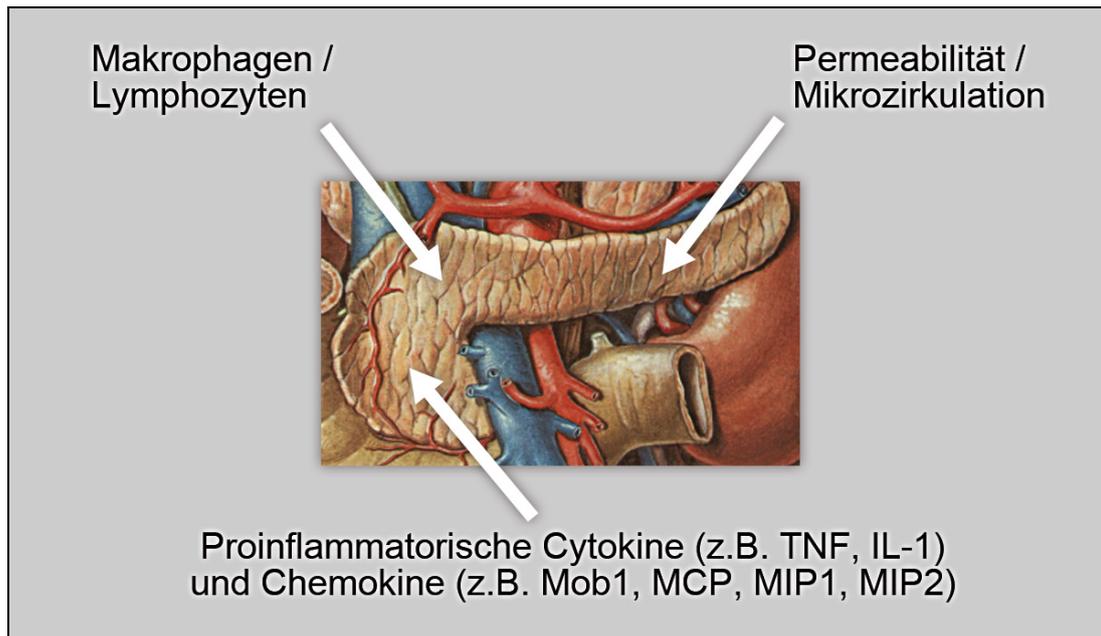
Weitere Arbeiten an isolierten Azinuszellen und im *in vivo* Modell der akuten Pankreatitis haben gezeigt, dass der zellpermeable Cathepsin B Hemmstoff E-64d/CA-074Me die durch Caerulein induzierte Aktivierung von Trypsin komplett hemmen kann [Saluja et al. 1997, Teich et al. 1998, Keim et al. 1999]. Inzwischen gibt es auch Daten von Experimenten mit Cathepsin B -/- knock-out Mäusen, welche zeigen, dass die Caerulein-induzierte, intrazelluläre Trypsinaktivierung bei diesen Mäusen um bis zu 90% reduziert ist. Allerdings wird die Pankreatitis nur lokal abgeschwächt, aber nicht verhindert. Die systemischen Auswirkungen z.B. auf die Lunge sind dagegen nicht verändert [Halang et al. 2000].

Wie es allerdings zur intrazellulären Trypsinaktivierung kommt, ist noch unklar. Eine Hypothese besagt, dass es, möglicherweise im Zusammenhang mit der Störung der Sekretion, zu einer Fusion von Lysosomen und Zymogengranula kommt („Kokolisationshypothese“). Die lysosomale Protease Cathepsin B soll Trypsinogen durch proteolytische Spaltung zum Trypsin aktivieren und so die gesamte proteolytische Kaskade in Gang setzen [Steer et al. 1987, Niederau und Grendell 1988]. Die „Kokolisationshypothese“ ist allerdings nicht uniform akzeptiert. So konnte elektronenmikroskopisch mittels Immunogold-Markierung gezeigt werden, dass Cathepsin B und Verdauungsenzyme auch in gesundem Pankreasgewebe bereits teilweise in den gleichen Organellen vorkommen [Willemer et al. 1990]. Kokolisation lysosomaler und sekretorischer Verdauungsenzyme wurde außerdem nach Stimulation mit Bombesin, welches keine Pankreatitis auslöst, beschrieben [Grady et al. 1996]. Bombesin führt auch zu einer Trypsinaktivierung in einem zu Caerulein vergleichbaren Ausmaß. Des Weiteren haben Trypsin- bzw. Proteasehemmstoffe den klinischen Verlauf der akuten Pankreatitis nicht günstig beeinflussen können [Buchler et al. 1993].

2.2.3.3. Immunologische Reaktion im Rahmen der akuten Pankreatitis

Neben der lokalen Schädigung des Pankreas mit sekretorischer Blockade und wahrscheinlich frühzeitiger intrazellulärer Aktivierung von Verdauungsenzymen, ist inzwischen auch klar, dass der Schweregrad der akuten Pankreatitis ganz entscheidend von einer, im Rahmen der Pankreatitis ablaufenden, immunologischen Reaktion abhängt.

Abb. 6 Immunantwort im Rahmen einer akuten Pankreatitis



So ist schon länger bekannt, dass es im Verlauf der akuten Pankreatitis zur systemischen Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten kommt, welche nicht nur im Pankreas sondern auch in anderen Organen, wie zum Beispiel der Lunge, eine entzündliche Reaktion in Gang setzen [Norman et al. 1995]. Entsprechend sind auch die Serumspiegel diverser entzündlich aktiver Zytokine, wie TNF- α [Hughes et al. 1996], weiterer Zytokine [Brady et al. 1999] und auch von Chemokinen [Grady et al. 1997], Interleukin 1 β (IL-1 β) [Fink und Norman 1997], IL-6 [Gross et al. 1993] oder Platelet activating factor (PAF) [Zhou et al. 1993] bei der akuten Pankreatitis erhöht, die die Schädigung abhängig von den ihnen entgegengesetzten Abwehrstrategien des Pankreasgewebes in unterschiedlicher Ausprägung ablaufen lassen.

Zunächst galt die Herkunft dieser Zytokine von Makrophagen als gesichert, bis klar geworden ist, dass die Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse nicht nur selbst auf

Zytokine reagieren, sondern diese im Rahmen der Stressantwort bei der Pankreatitis auch selbst synthetisieren kann [Gukovskaya et al. 1997].

Azinuszellen können aber nicht nur Zytokine synthetisieren und freisetzen, sondern auch chemotaktisch wirksame Chemokine als Stressantwort produzieren [Luster 1998]. Somit ist die Bauchspeicheldrüse aktiv an der entzündlichen Reaktion im Rahmen der Pankreatitis durch Chemokin vermittelte Anreicherung des Pankreasgewebes mit weißen Blutzellen, sowie deren Aktivierung durch Zytokine beteiligt.

2.3. Oxidativer Stress und zellulärer Schutz

In normalen biologischen Prozessen werden in Zellen mit ihren Kompartimenten laufend freie Radikale gebildet. Unter oxidativem Stress, worunter man die Imbalance zwischen dem ansteigendem Gehalt an Pro-Oxidantien (z.B. reaktive Sauerstoff-Zwischenstufen; reactive oxygen intermediates; ROI) und dem folglich abnehmenden Gehalt an antioxidativen Schutzfaktoren (Proteinen) versteht, wird die Formation dieser Radikale enorm gesteigert. Ein Absinken des Gehaltes an Antioxidantien wie z.B. Glutathion, Ascorbinsäure oder α -Tocopherol (Vitamin E) hat die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffzwischenstufen [Halliwell und Gutteridge 1990] zur Folge.

Diese Sauerstoff-Intermediate können sich wegen ihrer hohen Reagibilität potentiell toxisch verhalten. Die Imbalance durch zu hohe $O\cdot$ Produktion und abnehmenden Schutzfaktoren erzeugt als Folge einen unkontrollierten oxidativen Stress mit zellschädigenden Effekten wie z.B. Lipidperoxidation [Rice-Evans und Burdon 1993] und dadurch Membranbeschädigungen [Ferrali et al. 1992], DNA-Strangbrüche [Ames 1989] sowie Proteinveränderungen [Neuzil et al. 1993] und spielt bei der Entstehung der akuten Pankreatitis sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle [Rau et al. 2000]. Sauerstoffradikale können mit einer Vielzahl von zellulären Molekülen wie Lipiden und Proteinen interagieren und zu Funktionsbeeinträchtigung führen [Nonaka et al. 1990]. Freie Sauerstoffradikale können außerdem durch Hemmung des Energiestoffwechsels zur ATP-Depletion bei akuter experimenteller Pankreatitis führen [Luthen et al. 1995].

Um dem oxidativen Stress entgegenzusteuern, haben Zellen und Gewebe eine Vielzahl von antioxidativ wirkenden Mechanismen entwickelt, die bei eventueller Anreicherung von reaktiven Sauerstoffzwischenstufen, oder bei zellulären

Reperaturvorgängen aktiviert werden. Dazu zählen intrazelluläre Antioxidantien wie die Katalase, welche Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff konvertiert, die Superoxid-Dismutase (SOD), welche Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid konvertiert, α -Tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure und Glutathion (GSH). Auch HSP32/HO-1 hat vermutlich antioxidative Eigenschaften.

Rau et al. konnten in experimentellen Modellen zeigen, dass die Antioxidantien wie Glutathion und antioxidativ wirkende Enzyme wie Katalase und Superoxid-Dismutase (SOD) einen positiven Effekt auf den Schweregrad der Pankreatitis haben können [Rau et al. 2000]. Allerdings genügt oxidativer Stress allein nicht, um eine akute Pankreatitis auszulösen [Fu et al. 1997, Rau et al. 2000].

2.4. Hitzeschockproteine

2.4.1. Expression und Aufgabe von Hitzeschockproteinen

Hitzschock-Gene (heat shock protein, HSP) ist die Bezeichnung für eine Klasse von entsprechenden Genen und ihrer Proteine welche in allen bisher untersuchten Spezies sehr stark konserviert sind. Die bedeutende Klasse von Stressproteinen wurde zuerst 1962 von Ritossa in der Speicheldrüse der Fruchtfliegenlarve *Drosophila Melanogaster* entdeckt [Ritossa 1962]. Es wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Zelltemperatur von 25°C auf 30°C eine Anhäufung von Formationen an speziellen Regionen auf polytenen (übergroßen) Chromosomen der Larve induziert. Diese Formationen reflektieren Transkriptionsaktivitäten von speziellen Genen, welche eine Gruppe von Proteinen codieren, die aufgrund ihrer gesteigerten Genexpression nach Hitzeeinwirkung als Hitzeschockproteine (HSP) bezeichnet wurden [Tissieres et al. 1974, Lindquist und Craig 1988].

Obwohl die HSPs ursprünglich anhand der Induktion durch gesteigerte Temperaturen benannt wurden und die ausgeprägte Thermotoleranz der Zellen die wichtigste und bekannteste Auswirkung der Hitzeschock-Proteine darstellt [Landry et al. 1989], kann die Expression dieser Proteine aber auch durch nahezu jede andere Art von Stress induziert werden, wie beispielsweise mechanischer Stress, oxidativer Stress, toxisch-metabolischer Stress etc. [Morimoto et al. 1992]. Diese Proteine werden deshalb auch als Stressproteine 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. Es wurde später auch demonstriert, dass thermischer Stress, welcher die Synthese von HSP induzieren kann, Schutz vor nachfolgendem nichtthermischem Stress verleiht [Currie 1987, Bellmann et al. 1995].

HSPs sind aber nicht nur für die (pathophysiologische) Stressreaktion wichtig, sondern erfüllen auch in normalem Zellstoffwechsel zahlreiche physiologische Funktionen [Morimoto et al. 1992, Pockley 2001]. Eine häufig beobachtete Funktion von Hitzeschockproteinen ist ihre Wechselwirkung mit anderen Proteinen. HSPs können diese Proteine in eine korrekte Konformation (Ordnung der Proteinfaltung) überführen. Zum Beispiel wirken HSP60 und HSP70 zusammen, um entstehenden Peptiden bei der Translation die Einnahme ihrer korrekten Tertiärstruktur zu ermöglichen. Wegen dieser Begleitfunktion, die auch unter physiologischen Bedingungen wahrgenommen werden [Minowada und Welch 1995], sind sie auch als Begleitproteine (chaperone proteins) oder „Chaperone“ bezeichnet worden.

2.4.2. Hitzeschockproteingruppen

Hitzeschockproteine umfassen eine ganze Reihe verschiedener Familien (s. Tab. 2), welche strukturell nicht miteinander verwandt sind. Die Bezeichnung und Klassifizierung rührt vom apparenten Molekulargewicht der jeweiligen Proteine her, (z.B. HSP32 ist ein 32 kDa Protein), also unter anderem HSP90, HSP70, HSP60, HSP32 oder HSP25/27 [Hartl et al. 1996, Rakonczay et al. 2003].

Die Familienmitglieder besitzen funktionelle Homologien in verschiedenen Kompartimenten der Zelle. Während es eine große Ähnlichkeit zwischen gleichen HSP in verschiedenen Organismen gibt, z.B. teilen sich *Escherichia coli* DnaJ und das humane HSP70 ungefähr 50% Sequenzgleichheit [Caplan et al. 1993], gibt es offensichtlich keine Sequenzhomologie zwischen verschiedenen Familien (z.B. zwischen HSP60 und HSP70).

Tabelle 2 Die bekanntesten und wichtigsten Gruppen der Hitzeschock-Proteine

| Familie | Proteine | Lokalisation in der Zelle | Funktionen |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------|--|
| kleine HSPs | Ubiquitin | Zytosol / Nukleus | Beteiligt am nicht-lysosomalen Proteinabbau |
| | HSP10 | Mitochondrien | Co-Chaperon von HSP60 |
| | α B-Crystallin | Zytosol | Verbunden mit zytoskelettalen Elementen (Stabilisierung) |
| | HSP27 | Zytosol / Nukleus | Stabilisierung der Microfilamente, Regulation des Actin-Zytoskeletts |
| | HSP32 | Zytosol | Hämoxygenase-1, Hämkatabolismus, Antioxidative Eigenschaften |
| HSP40 | HSP40 | Zytosol / Nukleus | Co-Chaperon von HSP70 |
| HSP60 | HSP60 | Mitochondrien | Gebunden an teilweise gefaltete Polypeptide (assistiert korrekte Faltung), in pankreatischen Zymogen Granula |
| HSP70 | HSP72 (HSP70) | Zytosol / Nukleus | Durch starken Stress (Hyperthermie) induzierbar |
| | HSP73 (HSC70) | Zytosol / Nukleus | Konstitutiv exprimiert |
| | GRP75 | Mitochondrien | Beteiligt an der Translokation von Vorläuferproteinen durch die mitochondriale Membran |
| | GRP78 | Endoplasmatisches Retikulum | Spielt eine Rolle bei der Zusammensetzung sekretorischer Proteine |
| HSP90 | HSP90 α | Zytosol | Wichtige Rolle in der Steroid-Rezeptor Funktion |
| | HSP90 β | Zytosol | Wichtige Rolle in der Steroid-Rezeptor Funktion |
| | GRP94 | Endoplasmatisches Retikulum | Calcium-bindendes Chaperon |
| HSP100 | HSP100 | Zytosol / Nukleus | Beteiligt an der Auflösung von Aggregaten und der Erleichterung der Proteolyse, Thermotoleranz |

Das GRP (Glucose regulated protein) ist nicht speziell durch Hitzeschock induziert, sondern durch Glucosemangel.

2.4.3. Genetische Regulation der HSP-Synthese

Die Regulation der Expression der Hitzeschock-Gene erfolgt größtenteils auf Transkriptionsebene durch Bindung eines Hitzeschock-Transkriptionsfaktors (heat shock factor; HSF) an eine DNA-Sequenz im Promoterbereich (heat shock response element; HSRE) [Leppä und Sistonen 1997, Cotto und Morimoto 1999].

Nach wie vor ist die Signaltransduktion, welche der Induktion von HSP zugrunde liegt, nur teilweise erforscht. Der HSF, welcher die Transkription reguliert und konstitutiv exprimiert wird, liegt in ungestressten Zellen in monomerer und inaktiver Form vorliegt und muss zu seiner Aktivierung phosphoryliert werden. Drei Monomere müssen sich zu einem Trimer zusammenfügen und es muss eine Translokation aus dem Zytosol in den Zellkern erfolgen [Baler et al. 1993].

Sehr wahrscheinlich besteht eine negative Feedback-Regulation zwischen HSP und dem HSF. HSP bindet HSF, stabilisiert somit seine monomere Form und hemmt so seine transkriptionelle Aktivität. Wenn durch Stress die Akkumulation denaturierter Proteine steigt, bindet das HSP mit höherer Affinität an diese Proteine, um ihre Aggregation zu verhindern und die Rückfaltung in den nativen Zustand zu unterstützen. Somit steht weniger HSP zur Hemmung der HSF-Aktivität zur Verfügung, was zu einer Derepression der HSP-Transkription führt [Nieto-Sotelo et al. 1990].

2.4.4. Induktion von Hitzeschockproteinen im Pankreas

Die HSP der großen zytoprotektiven Familien werden im Pankreas konstitutiv exprimiert oder induziert [Schäfer und Williams 2000].

Es wurde bereits vor einigen Jahren mittels metabolischer Markierung azinärer Proteine mit ³⁵S-Methionin gezeigt, dass auch Azini auf eine Erhöhung der Umgebungstemperatur (Hyperthermie) mit der Expression ganz bestimmter Proteine reagieren [Wagner et al. 1996, Strowski et al. 1997]. Insbesondere fand sich eine starke Hochregulation von HSP70 Isoformen (HSP72). Die Quantität von HSP72 war nach 3-6h signifikant angestiegen und blieb 12-24h erhöht. Daneben wurden aber auch Proteine von 92, 59, 58 und 30 kDa gefunden, welche ebenfalls verstärkt nach Hyperthermie exprimiert wurden. Auch wurde in vorausgehenden Versuchen HSP60 schwach induziert. Dieses Phänomen ließ sich in gleicher Weise nach Ganzkörperhyperthermie (die Körperkerntemperatur der Versuchstiere wurde auf 42°C für 20 min erhöht) im Pankreas *in vivo* zeigen [Tashiro et al. 2002].

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Präkonditionierung durch Hyperthermie zu einer Protektion bei einer experimentellen Pankreatitis und damit zur Abschwächung des Schweregrades derselben führt, was nicht nur für das Modell der Caeruleinpankreatitis gilt [Frossard 1999, Grise et al. 2000, Weber H et al. 2000]. Als möglicher Mechanismus der Protektion durch HSP wird eine Reduzierung der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung (s. *Abschnitt 2.2.3.2.*) nach Caerulein Hyperstimulation diskutiert [Frossard et al. 2002, Bhagat et al. 2002].

HSPs werden auch bei Pankreatitis ohne Präkonditionierung im Pankreas hochreguliert [Weber CK et al. 1995, Bhagat et al. 2002]. So wurde die Expression von HSP32 nach Induktion einer akuten Pankreatitis durch Caerulein beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Caerulein induzierte akute Pankreatitis mit einem signifikanten Ansteigen der Expression von HSP32/HO-1 im Pankreasgewebe, beginnend etwa 12-24h nach den ersten Zeichen eines intestinalen Pankreasödems. Es konnte zwar nicht ausgeschlossen werden, dass infiltrierende Phagozyten in das Pankreasgewebe zur ansteigenden Expression beigetragen haben, aber es ist wahrscheinlicher, dass das ansteigende HO-1 *in vivo* den Pankreaszellen zuzuordnen ist [Sato et al. 1997]. Für die Frühphase der akuten Pankreatitis ließen sich in der aktuellen Literatur bisher keine Daten finden.

Der zeitliche Ablauf dieser selektiven Induktion im Pankreasgewebe *in vivo* könnte die Antwort auf und Anpassung an die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (s. *Abschnitt 2.3.*) in den frühen Stadien der akuten Pankreatitis widerspiegeln [Schoenberg et al. 1995].

2.5. Hämoxygenase-1 (HO-1/HSP32)

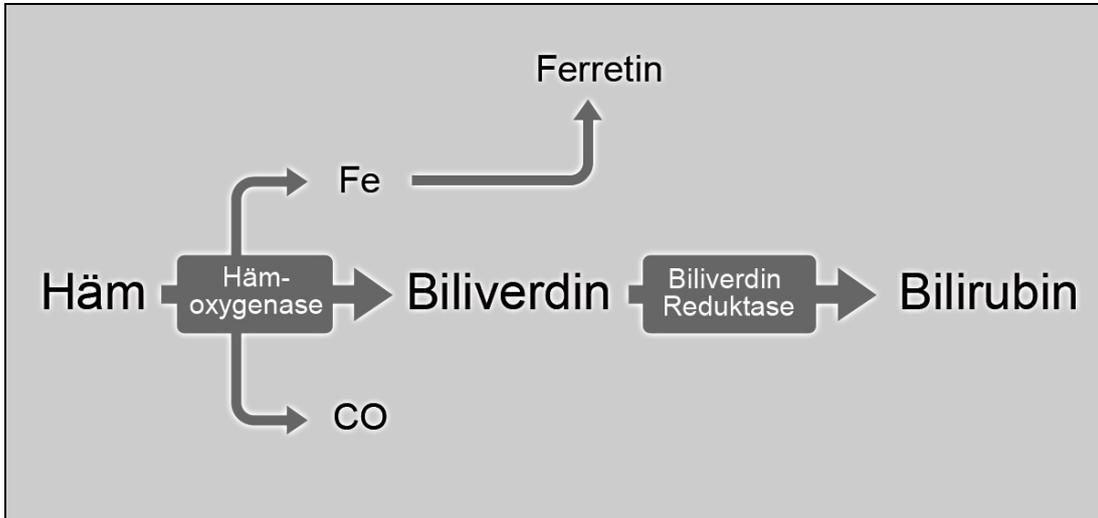
2.5.1. Charakterisierung der Hämoxygenase

Die Hämoxygenase (HO) gehört zu den Monooxygenasen. Sie katalysiert den ersten Schritt des Abbaus von Häm zu Gallepigmenten. Das bekannteste Beispiel dafür ist der Hämoglobinabbau aus Erythrozyten, der hauptsächlich in Milz und der Leber stattfindet. Die biochemischen Grundlagen dieser Abbauvorgänge wurden in den vergangenen 20 Jahren weitgehend geklärt [Maines 1988 und 1992].

Von großer Bedeutung in der Regulation biologischer Systeme ist dabei die Degradation des Häm zu Biliverdin (s. *Abb. 7*) unter Freisetzung von Eisen und der

Bildung von Kohlenmonoxid [CO]. Das Biliverdin wird anschließend durch die Biliverdin-Reduktase (ein zytosolisches Enzym) zu Bilirubin konvertiert.

Abb. 7 Katalytische Reaktion der Hämoxigenase



Schematische Darstellung des Abbaus der Hämgruppe:

Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim oxidativen Abbau des Häm zu Biliverdin und äquimolaren Mengen an Kohlenstoffmonoxid (CO) und Eisen. Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Wiedergewinnung des Eisens aus dem Hämoglobin alternder Erythrozyten und beim Abbau anderer Hämproteine. Das lineare Tetrapyrrol Biliverdin wird im Folgenden sofort durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert [Choi und Alam 1996].

Dem Bilirubin wird eine Bedeutung als physiologisch wirksame antioxidative Substanz zugeschrieben [Stocker et al. 1987 und 1990]. Sowohl durch die Mediatorfunktion von CO als auch durch das antioxidative Potential von Bilirubin könnte Hämoxigenase im Pankreas daher unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle spielen. Daten aus der Literatur zeigen, dass die HO-1 durch Exposition mit verschiedenen Formen von oxidativem Stress induziert wird und dass dieses Enzym zellulären Schaden verhindern, sowie gegen oxidativen Stress schützen kann [Stocker 1990] (s. *Abschnitt 2.5.4.*).

2.5.2. Formen und Funktionen der Hämoxigenase

Die Hämoxigenase Typ1 (HO-1) ist die induzierbare, ubiquitär im Organismus vorkommende Isoform und hat ein Molekulargewicht von 32 kDa [Maines et al. 1986], während das später entdeckte Isoenzym mit Hauptvorkommen in Gehirn und Hoden als Hämoxigenase Typ2 (HO-2) mit 36 kDa bezeichnet wurde. Nach Klonierung und Sequenzierung dieser beiden Isoformen wurde durch Homologie-

Screening eine dritte Enzymvariante (HO-3) mit 33 kDa entdeckt, deren biochemische Charakterisierung bislang noch aussteht [McCoubrey et al. 1997].

Die Gene für HO-1 [Shibahara et al. 1989] und HO-2 [McCoubrey und Maines 1994, McCoubrey et al. 1995] sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, dennoch weisen sie grundsätzlich eine ähnliche Struktur und Homologie in der Aminosäuresequenz von 40% auf. Durch ein sehr langes Intron sind jedoch die HO-2 Gene nahezu doppelt so groß wie das HO-1 Gen.

HO-1 ist durch eine Vielzahl von strukturell nicht verwandten, pharmakologischen und chemischen Agenzien, sowie durch Variation des Zellzustandes, wie z.B. Hitzeschock und anderen Formen von zellulärem Stress (Stickstoffmonoxid) in zahlreichen Zelltypen induzierbar. In vielen Geweben und Zellkulturen steigt die HO-1 mRNA Expression durch die Behandlung mit dem natürlichen Substrat Häm sowie mit verschiedenen Metallen und Xenobiotika (Fremdstoffen), endokrinen Faktoren und synthetischen Metalloporphyrinen und Metallprotoporphyrinen [Alam et al. 1994]. Darunter sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS oder reactive oxygen intermediates, ROI), Endotoxine, Cytokine wie TNF- α , UV-Licht, Natriumarsenit, Hyperoxie und Glutathionmangel von besonderer Bedeutung [Keyse und Tyrrell 1989]. Die Induzierbarkeit des HO-1/HSP32-Gens dient höchstwahrscheinlich als Schutz der Zellen gegen Stress, insbesondere oxidativen Stress wie z.B. Hitzeschock und Entzündungen [Choi und Alam 1996, Otterbein und Choi 2000].

HO-2 ist hauptsächlich im zentralen Nervensystem (Gehirn), Leber, Milz, Gefäßsystem und Reproduktionsorganen (z.B. Hoden) exprimiert und scheint nicht induzierbar zu sein [McCoubrey und Maines 1994, McCoubrey et al. 1997]. Studien an HO-2 knock-out Mäusen weisen darauf hin, dass CO, durch HO-2 produziert, als Signalmolekül wirken und somit eine Aufgabe in der Signaltransduktion haben kann [Zakhary et al. 1997].

Die HO-3 wird ebenfalls konstitutiv exprimiert, wobei die katalytische Aktivität sehr niedrig ist. HO-3 wirkt möglicherweise hauptsächlich als Häm-bindendes Protein [McCoubrey et al. 1997, Elbirt und Bonkovski 1999].

Tabelle 3 Übersicht über die Isoformen der Hämoxxygenase

| | HO-1 (HSP32) | HO-2 | HO-3 |
|-------------------|---|--|---|
| Chromosom | 22q12 | 16p13.3 | ? |
| Gen | Ratte: 6830 bp Mensch: ~ 14.000 bp 5 Exons, 4 Introns Heat shock elements Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren | Ratte: 12563 bp 5 Exons, 4 Introns Glucocortikoid- response element (GRE) | ? |
| Protein | Ratte: 289 AS, MW 33.005 Mensch: 288 AS, MW 32.818 | Ratte: 315 AS, MW 35.762 Mensch: 315 AS, MW 36.033 ca. 40% Homologie mit HO-1 | Ratte: MW ~ 33.000 ca. 90% Homologie mit HO-2 |
| Vorkommen | Induzierbar Leber, Milz, Pankreas | Konstitutiv ZNS (Gehirn), Hoden, Leber, Milz | Konstitutiv Gehirn, Hoden, Leber, Milz, Thymus, Niere, Prostata, Herz |
| Regulation | <i>Aktivierung durch:</i> Häm, Hitze Neurotoxische Metalle (Cadmium) Viren, Bakterientoxine Stress: physiologisch und pathologisch <i>Normales Vorkommen:</i> Zellwachstum und Entwicklung | Keine Stimuli oder Regulatoren bekannt (Glukokortikoide nur während der Entwicklung) | Regulation nicht bekannt <i>Nur schwache Häm-katalyse</i> |

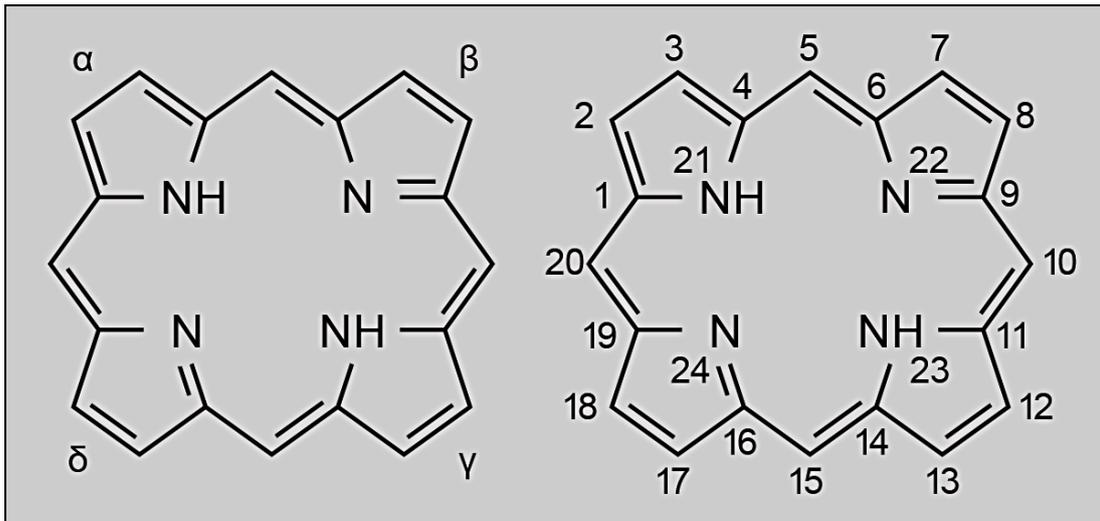
2.5.3. Struktur der Porphyrine und Einfluß von synthetischen Metalloporphyrinen wie Kobalt-Protoporphyrin (CoPP)

Metalloporphyrine, in welchen das zentrale Eisenatom z.B. gegen Zinn²⁺- (Sn), Zink²⁺- (Zn), Chrom²⁺- oder Mangan²⁺- Ionen ausgetauscht wurde, wirken als potente kompetitive Inhibitoren der Hämoxxygenase [Rosenberg et al. 1989].

Im Gegensatz dazu induziert Kobalt-Protoporphyrin (CoPP) *in vivo* die Hämoxygenase. Es ist also prinzipiell von der Beschaffenheit des zentralen Metallatoms abhängig, ob ein Metalloporphyrin hemmende oder induzierende Eigenschaften *in vivo* besitzt [Kappas und Drummond 1986].

Die HO-1 Aktivität lässt sich also mit Metalloporphyrinen positiv (CoPP) und negativ (SnPP, ZnPP) regulieren.

Abb. 8 Nomenklatur der Porphyrine



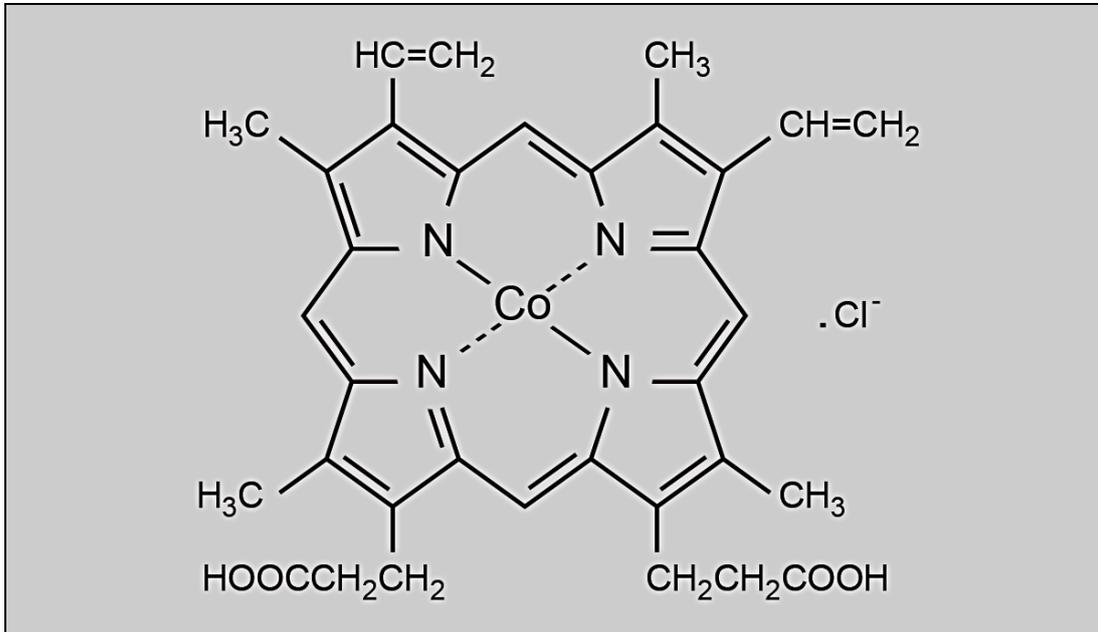
Die vier Pyrrolringe werden mit A, B, C und D bezeichnet. Die Nummerierung und Zuordnung der Positionen der Porphyrinsubstituenten folgt den Richtlinien der „International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry“ (IUPAC/IUB). Wie rechts in der Abbildung ersichtlich, werden die Ringatome des Tetrapyrrolysystems, die C- und N-Atome, von 1 bis 24 durchnummeriert.

Synthetisiert wird die Hämgruppe aus den Grundstoffen Succinyl-CoA (einem Zwischenprodukt des Citratzyklus) und Glycin. Der die Geschwindigkeit bestimmende Schritt dieser Synthese (das „Schrittmacherenzym“) bildet die δ -Aminolävulinat-Synthetase (ALAS).

Während anorganisches Zinn (Sn) und Sn-Protoporphyrin Vertreter metallischer Sorten repräsentieren, deren Effekte auf die Häm-Degradation eher supprimierend waren, bildet anorganisches Kobalt (Co) oder Co-Protoporphyrin (CoPP) (s. Abb. 9) ein Musterbeispiel der Elemente, dessen biologische Aktivitäten, im Gegensatz dazu, sehr gute Protoporphyrin-Chelatbildner sind. Anorganisches Kobalt in einer Einzeldosis induziert die Hämoxygenase in der Leber, üblicherweise mit einem Peak nach 16h und einem Absinken nach 48-72h. Dies ist mit einem gleichzeitigem Sinken und transientser Verminderung des Cytochrom P-450 Levels assoziiert, gefolgt von einem überschießendem „rebound“ Anstieg der δ -ALS-Synthaseaktivität

über hochnormale Werte, bevor sich die gesamte Reaktion wieder normalisiert [Maines und Kappas 1974, 1975].

Abb. 9 Cobalt (III) Protoporphyrin IX chloride [$C_{34}H_{32}CoN_4O_4Cl$]



Dagegen verursacht eine einzelne äquimolare Dosis von Co-Protoporphyrin eine im Maß wesentlich größere Induktion der Hämoxxygenase in der Leber. Diese „Antwort“ persistiert auch für eine längere Zeitspanne, nämlich etwa für 3-5 Wochen, in den behandelten Tieren. Co-Protoporphyrine sind hierbei ein starker und lang wirkender Induktor der Hämoxxygenase. Ein ausgeprägtes Absinken der δ -ALS-Synthaseaktivität begleitet diese Reaktion. Als Konsequenz dieser anhaltenden dualen Aktionen auf Hämsynthese und Degradation, erfolgt eine tiefe Abnahme des Cytochrome P-450 Levels [Drummond und Kappas 1982].

2.5.4. Die Hämoxxygenase als ein protektives Protein

Die HO-1/HSP32 ist ein Hitzeschock-Protein und damit ein Stressprotein, dass unter anderem durch oxidative Schädigungen der Zelle induziert wird [Keyse und Tyrrell 1989, Nascimento et al. 1993, Schulz et al. 1999]. Von physiologischer Relevanz sind das Biliverdin und das Bilirubin, die *in vitro* in der Lage sind, mit hoher Effizienz Peroxyl-Radikale einzufangen [Stocker et al. 1987, Dennery et al. 1995]. Durch die Bildung von Biliverdin entsteht ein starkes Antioxidans, welches freie Sauerstoffradikale einfangen kann, wobei das Bilirubin Superoxid-Anionen neutralisieren kann und somit viele Substrate vor Peroxidation bei der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oder organischen Hydroperoxiden schützt. Dies ist

wahrscheinlich für die protektive Wirkung der HO-1 wichtig. Die antioxidativen Eigenschaften des Bilirubins wurden durch verschiedene Studien belegt. So konnte an isolierten Rattenherzen ein kardioprotektiver Effekt, sowohl durch Stimulation der HO-1, als auch durch exogenes Bilirubin im Ischämie-Reperfusion-Modell gezeigt werden [Clark et al. 2000]. Dennery stellte im Tiermodell einen protektiven Effekt erhöhter Plasmaspiegel an unkonjugiertem Bilirubin gegen Hyperoxie vermittelte oxidative Schädigung fest [Dennery et al. 1995]. In HO-1 defizienten knock-out Mäusen zeigte sich entsprechend, dass die Anfälligkeit von Hepatozyten und Fibroblasten gegenüber oxidativem Stress deutlich erhöht war. Kultivierte Fibroblasten dieser Mäuse produzierten hohe Spiegel an freien Sauerstoffradikalen und zeigten starke Cytotoxizität durch Prooxidanzien. Die Gabe von Endotoxin verursachte in den knock-out Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren vermehrte Leberzellnekrose durch oxidative Schädigung und eine höhere Mortalität durch endotoxischen Schock. Darüber hinaus entwickelten die Mäuse eine Eisenmangel-Anämie mit Eisenablagerung in Leber und Niere, die zur chronischen Entzündung der Organe führte [Vile et al. 1994, Poss und Tonegawa 1997].

Die HO-1 Expression lässt sich durch Veränderungen des intrazellulären Gehaltes des Antioxidanten Gluthation beeinflussen. Ein Zusammenhang zwischen dem antioxidativen Glutathion-Gehalt (GSH) und der Hämoxigenase-Induktion konnte in kultivierten Fibroblasten von Ratten [Ketterer et al. 1988] festgestellt werden. Bei einer Zellexposition durch Streßagentien wie z.B. Häm oder Wasserstoffperoxid erfolgt eine Verminderung des zellulären GSH-Gehaltes. Diese Verminderung des Antioxidanten wird durch eine Inhibierung der HO-1-Aktivität noch erhöht. Lautier zeigte unter Verwendung des Glutathion-Inhibitorstoffes *D,L*-Buthionin-S,R-sulfoxin ein komplettes Aufbrauchen des intrazellulären GSH-Gehaltes und einen daraus resultierenden Anstieg der HO-1 [Lautier et al. 1992]. In Tieren, welche mit hohen Konzentrationen von Caerulein behandelt wurden, fiel der gesamte pankreatische Glutathion-Gehalt während der Frühphase der akuten ödematösen Pankreatitis ab [Luthen et al. 1994]. Daraus kann man schließen, dass ein Abfall des intrazellulären GSH, verursacht durch reaktive oxygene Radikale, einen Weg repräsentiert, die Expression von HO-1 im Rahmen einer akuten Pankreatitis zu steigern.

Unter hypoxischen Bedingungen wird die HO-1 ebenfalls induziert, wobei der molekulare Mechanismus dieser Induktion noch nicht bekannt ist. Als Grundlage des Regulationsweges wird die Zellschädigung durch den Mangel an Sauerstoff

angenommen und die dadurch verbundene Ausschüttung von freien Radikalen. Die durch die Radikale erzeugte Veränderung des Zellzustandes bewirkt eine Anschließung des zellulären Schutzsystemes und damit die Anschließung der HO-1.

3. Ergebnisse

3.1. Proteinexpression und Regulation von Hitzeschock-Proteinen im Pankreas

Es konnte durch vorangegangene eingehende Untersuchungen der Stressreaktion bereits aufgezeigt werden, dass Hitzeschockproteine im Tiermodell gegen eine Pankreatitis protektiv wirken (s. *Abschnitt 2.4.*). Während HSP25/27 und HSP70 von der Arbeitsgruppe Pankreas der Medizinischen Klinik II im Klinikum Großhadern bereits eingehend untersucht wurden, stand für diese Arbeit besonders die Expression von HSP32 im Pankreas, sowie dessen Bedeutung für die akute Pankreatitis im Vordergrund.

3.1.1. Nachweis verschiedener HSPs im Pankreashomogenat nativ und nach Hyperthermie-Präkonditionierung

Zur genauen Beschreibung und Analyse des Expressionsmusters pankreatischer Hitzeschockproteine im Pankreasgewebe, wie auch zum Nachweis der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden die SDS-Gel Elektrophorese und die Western Analyse, wie in *Methoden 6.6.* beschrieben, durchgeführt. Zum immunochemischen Nachweis der verschiedenen Hitzeschockproteine wurden spezifische primäre Antikörper verwendet.

Tabelle 4 Verdünnungen der verwendeten Antikörper zum immunochemischen Nachweis der HSPs

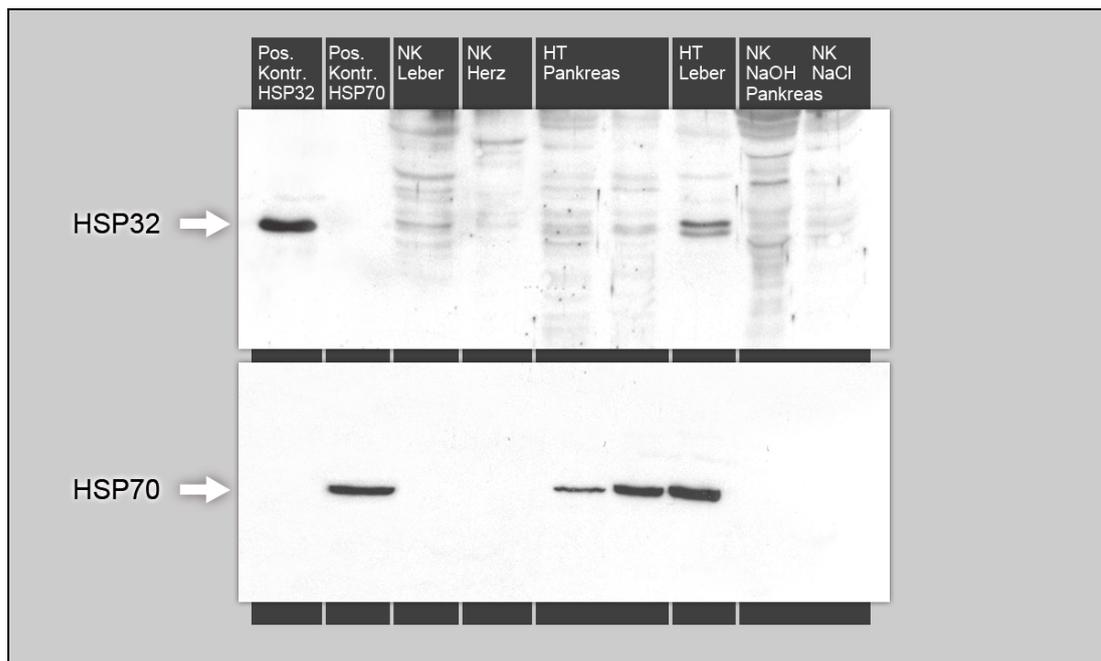
| Antikörper | Verdünnung |
|----------------------|------------|
| Anti-HSP25 | 1:2000 |
| Anti-HSP32 | 1:5000 |
| Anti-HSP60 | 1:6000 |
| Anti-HSP70 | 1:1000 |
| Sekundäre Antikörper | 1:10000 |

Die primären Antikörper wurden analog den in der *Tabelle 4* angegebenen Verdünnungen eingesetzt und nach dem Waschvorgang mit den jeweils dazugehörigen sekundären, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten,

Immunglobulin G Antikörpern inkubiert. Diese Bindung wurde mit dem ECL-System (s. *Materialien 7.1.9.*) erfasst und auf Film dargestellt.

Zunächst wurden die Expression und die Regulation der Expression von Hitzeschockproteinen in verschiedenen Organen, wie Pankreas, Leber und Herz untersucht und vergleichend dargestellt. Zur Regulation wurde zum einen die Hyperthermie-Präkonditionierung (s. *Abschnitt 2.4.4. und Methoden 6.1.1.*) und zum anderen die Präkonditionierung mit CoPP (s. *Abschnitt 2.5.3. und Methoden 6.1.2.*) eingesetzt. Es wird in den Abbildungen jeweils als interner Standard und zur Prüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper rekombinantes Protein der jeweiligen Hitzeschockproteine mit aufgetragen (*weiße Pfeile*). In einigen Abbildungen wird auch ein Protein-Standard-Marker für die jeweiligen Molekulargewichte als Referenzmarkierung mit definierten Molekulargewichten auf der linken Seite der Abbildung angegeben (*schwarze Pfeile*).

Abb. 10 Darstellung der Spezifität der Antikörper und der Einfluss von Hyperthermie auf die Expression von HSP32 und HSP70 im Pankreas und der Leber



Jeweils 20 µg Protein aus Herz (*Bahn 4*), Pankreas (*Bahn 5 und 6, 8 und 9*) und Leber (*Bahn 3 und 7*) von unbehandelten Kontrolltieren (NK) (*Bahn 3 und 4*), von Kontrolltieren (NK Pankreas), welche mit den Trägersubstanzen des CoPP bzw. Caerulein, [NaOH] (*Bahn 8*) und [NaCl] (*Bahn 9*) behandelt wurden, oder Tieren die mit Hyperthermie (HT) vorbehandelt wurden (*Bahn 5 bis 7*), wurden pro Bahn aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als interner Standard und zur Prüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden rekombinantes HSP32 (*Pos. Kontr. HSP32, Bahn 1, 25 ng*) oder

Pankreasgewebe mit Hyperthermie präkonditionierter Tiere (*Pos. Kontr. HSP70, Bahn 2, 25 ng*) als Positivkontrolle ebenfalls aufgetragen.

Die Membran wurde zunächst mit einem spez. Anti-HSP32 Antikörper (*oberes Panel*) in einer Konzentration von 1:5000 markiert, Konzentration des sekundären AK 1:10000. Anschließend wurden die Antikörper durch Stripping (Herunterwaschen) entfernt und die Membran dann mit einem spez. HSP70 Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 markiert (*unteres Panel*), die Konzentration des sekundären Ak war auch hier wieder 1:10000 (Erläuterungen siehe Text).

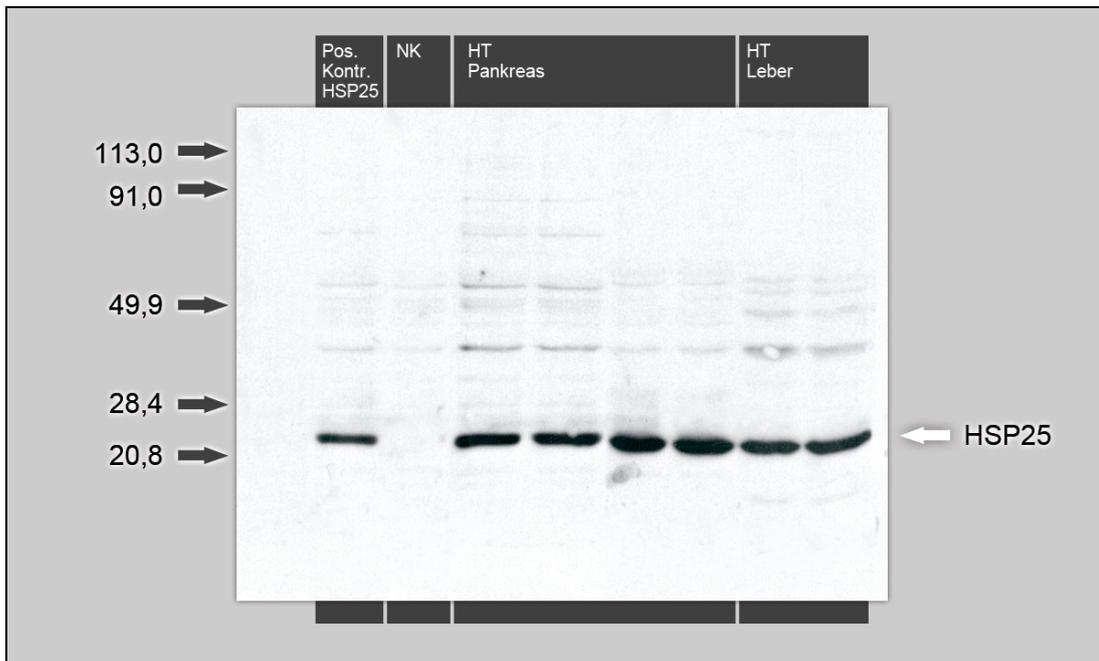
In *Abbildung 10* ist gezeigt, dass die Hyperthermie-Vorbehandlung keinen Einfluss auf die Expression von HSP32 im Pankreas hat.

Im *oberen Panel* der Western-Analyse mit Anti-HSP32 von Leber und Pankreas der Ratte zeigt sich weder nativ (Negativkontrolle), noch nach Präkonditionierung durch Hyperthermie, eine HSP32-Expression im Pankreas. Im Unterschied dazu kann in der Leber eine geringe vorhandene konstitutive Expression, mit geringfügiger zusätzlicher Induktion durch Hyperthermie-Präkonditionierung nicht ausgeschlossen werden (*vgl. Bahn 3 mit Bahn 7 im oberen Panel, sowie mit Abb. 12*).

Im *unteren Panel* wurde nach „Strippen“ (*s. Methoden 6.6.6.*) dieselbe Membran mit einem spezifischen Anti-HSP70 Antikörper markiert. Hierbei zeigt sich eine Induktion der Expression von HSP70 durch Hyperthermie-Vorbehandlung. Die mit rekombinantem HSP32 beladene Positivkontrolle ergibt dagegen kein Signal, so dass durch diese Abbildung auch die Spezifität und Sensitivität der Antikörper nachgewiesen werden kann.

In der im Folgenden gezeigten *Abbildung 11* konnte, ergänzend zur zuvor gezeigten *Abbildung 10*, mittels eines Anti-HSP25/27 Antikörpers die Expression von HSP25/27 im Pankreas charakterisiert werden. Bei sehr schwacher konstitutiver Expression konnte eine Hochregulation im Pankreas durch die Hyperthermie-Präkonditionierung beobachtet und damit Ergebnisse der Literatur nachvollzogen werden [Schäfer et al. 1999, Tashiro et al. 2002].

Abb. 11 Einfluss von Hyperthermie auf die Expression von HSP25/27 im Pankreas und der Leber



Jeweils 20 µg Protein von Tieren die mit Hyperthermie vorbehandelt wurden, wurden pro Bahn aufgetragen (*Pankreas Bahn 3 bis 6; Leber Bahn 7 und 8*), die Proteine per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als interner Standard und zur Prüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden rekombinantes HSP25 (*Pos. Kontr. HSP25, Bahn 1*). Als Negativkontrolle (*NK*) dienten Pankreas-Proben unbehandelter Kontrolltiere (*Bahn 2*). Gezeigt ist eine Auswahl aus 5 voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Membran wurde mit einem spezifischen Anti-HSP25 Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 markiert, Konzentration des sekundären Antikörpers 1:10000 (Erläuterungen siehe Text).

HSP60 gehört zu den Hitzeschockproteinen, das schon in größerem Ausmaß konstitutiv im Pankreas vorliegt [Wagner et al. 1996]. Deshalb wurde in weiteren Versuchen auch der Einfluss von Hyperthermie-Präkonditionierung auf die Proteinexpression von HSP60 untersucht. Es zeigte sich, dass HSP60 eher in der Leber verstärkt exprimiert wird, wogegen durch eine Hyperthermie sich die Expression von HSP60 im Pankreas nicht mehr sichtbar steigern lässt. Die Präkonditionierung durch Hyperthermie scheint im Pankreas also nur eine geringe Rolle bei der Induktion von HSP60 zu spielen (Daten nicht gezeigt).

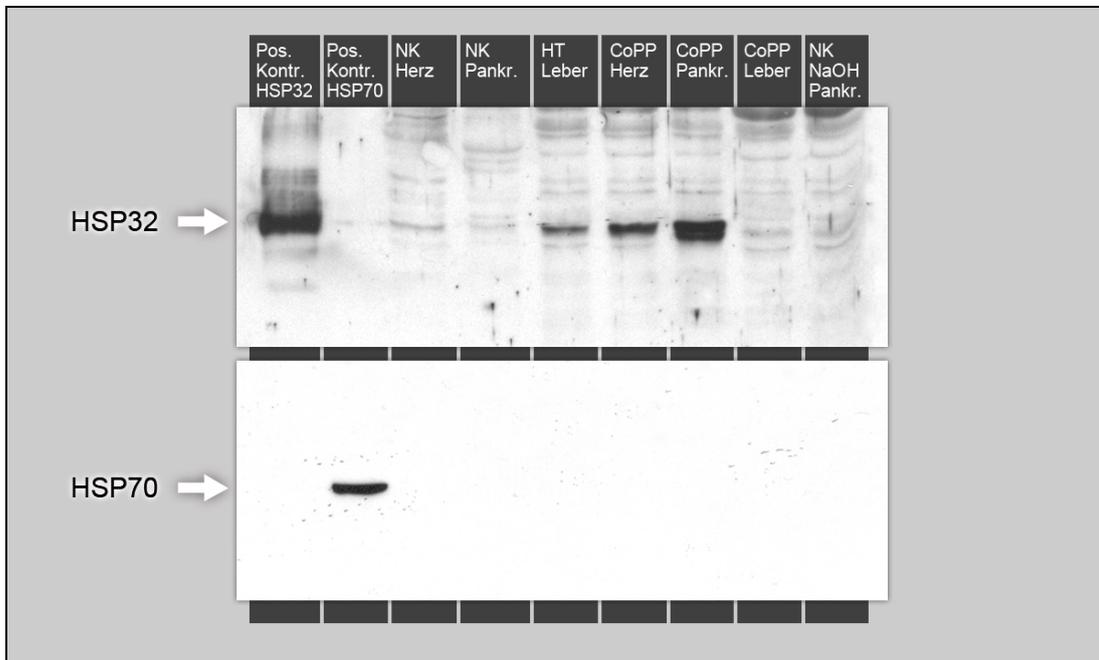
HSP90 ist ein Hitzeschockprotein welches in vielen Geweben konstitutiv vorliegt [Tashiro et al. 2002]. Im Pankreas dagegen ließ sich in unseren Versuchen keine genuine Expression feststellen. Durch thermalen Stress war in unserem Versuch

nur eine schwache Expression im Pankreasgewebe feststellbar (Daten nicht gezeigt).

3.1.2. CoPP induziert die HSP32-Expression im Pankreas

Als nächster Schritt wurden Metalloporphyrine als Werkzeuge eingesetzt (s. *Abschnitt 2.5.3.*) und Versuchstiere mit CoPP in verschiedenen Konzentrationen (s. *Tab. 5 unter 3.2.*) behandelt. Der Versuchsaufbau erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Amersi et al., in denen die Metalloporphyrine, zur Hochregulierung von HO-1 zur Protektion der Rattenleber bei Ischämie und Reperfusionsschädigung, verwendet wurden [Amersi et al. 1999].

Abb. 12 Einfluss der Präkonditionierung mit CoPP auf die Induktion von HSP32 im Vergleich mit HSP70



Jeweils 20 µg Protein aus Herz, Pankreas (*Pankr.*) und Leber (*Bahn 3 bis 5*) von unbehandelten Kontrolltieren (*NK*) oder Tieren die mit 5 mg CoPP i.p. vorbehandelt wurden (*CoPP, Bahn 6 bis 8*), wurden pro Bahn aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als interner Standard und zur Prüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden rekombinantes HSP32 (*Pos. Kontr. HSP32, Bahn 1*) oder Pankreasgewebe mit Hyperthermie präkonditionierter Tiere (*Pos. Kontr. HSP70, Bahn 2*) als Positivkontrolle ebenfalls aufgetragen. Zusätzlich wurde noch eine Negativkontrolle (*NK NaOH Pankr., Bahn 9*) verwendet.

Die Membran wurde zunächst mit einem spez. Anti-HSP32 Antikörper (*oberes Panel*) in einer Konzentration von 1:5000 markiert, Konzentration des sekundären AK 1:10000. Anschließend wurden die Antikörper durch Stripping (Herunterwaschen) entfernt und die

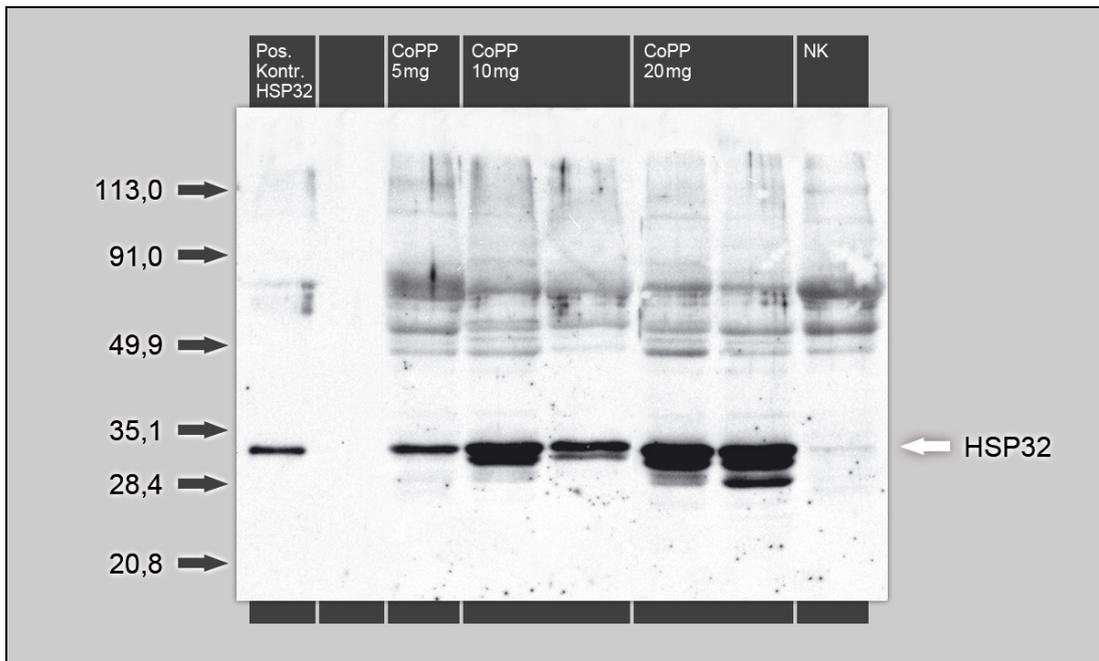
Membran dann mit einem spez. HSP70 Antikörper markiert (*unteres Panel*) (Erläuterungen siehe Text).

In *Abbildung 12* ist der Effekt der CoPP-Präkonditionierung auf die HSP32-Expression dargestellt. Im *oberen Panel* der Western Analyse mit spezifischen Anti-HSP32/HO-1 Antikörpern zeigt sich, dass HO-1 im nativen Pankreas (*NK Pankr.*) und im nativen Herz (*NK Herz*) konstitutiv nicht nachweisbar exprimiert wird, wogegen in der Leber (*NK Leber*), wie schon in *Abbildung 10* gezeigt, eine geringe Expression nachweisbar scheint.

24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 5 mg CoPP/kg Körpergewicht zeigt sich eine deutliche Expression von HSP32 in Herz, Pankreas und der Leber, wobei die stärkste Induktion im Pankreas zu finden ist (*Bahn 7*). Dass der Träger bzw. das Lösungsmittel [NaOH], in welchem CoPP zur Applikation gelöst wird, keinen Einfluss auf die HSP32 Expression hat, lässt sich in *Bahn 9* nachvollziehen. Hier wurden die Versuchstiere nur mit einer dem CoPP-Träger äquivalenten Menge an [NaOH] vorbehandelt. Es lässt sich dabei keine Induktion durch den Trägerstoff nachweisen (*vgl. auch Abb. 17*).

Im *unteren Panel* zeigt sich nach dem Strippen und Markierung derselben Membran (*s. Methoden 6.6.6.*) mit einem spezifischen Anti-HSP70 Antikörper vergleichend keine konstitutive Expression von HSP70 und keine Induktion der Expression nach Präkonditionierung mit CoPP. Auch hier nimmt wiederum das Lösungsmittel von CoPP, [NaOH], keinen Einfluss auf die Proteinexpression (*Bahn 9*).

Abb. 13 Dosisabhängige Induktion von HSP32 durch CoPP-Präkonditionierung (Dose response)



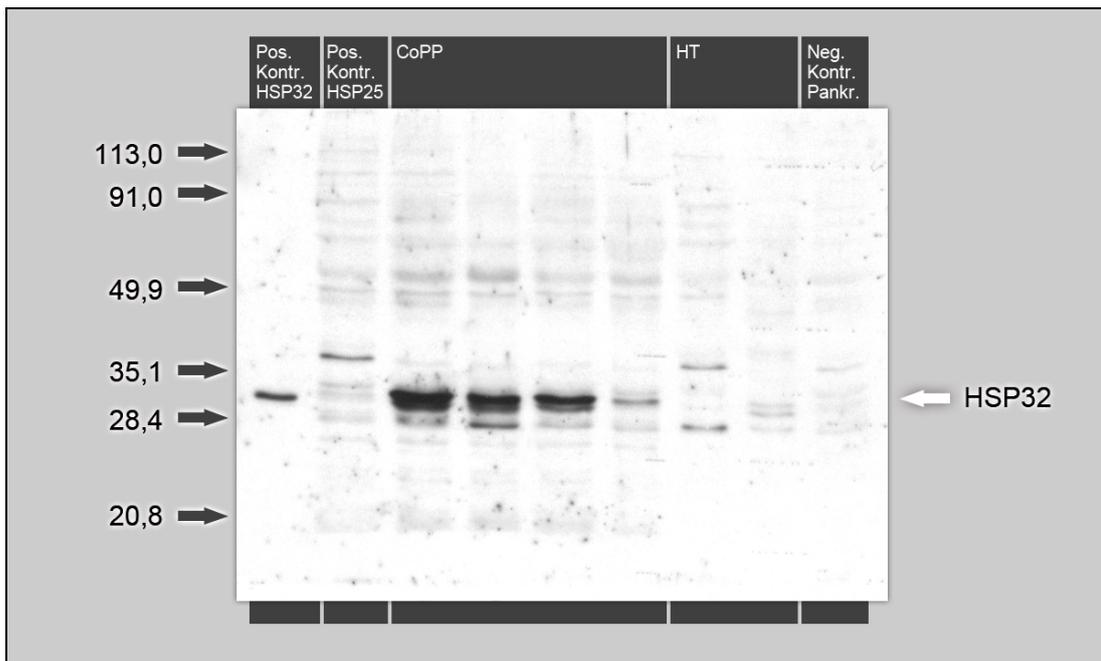
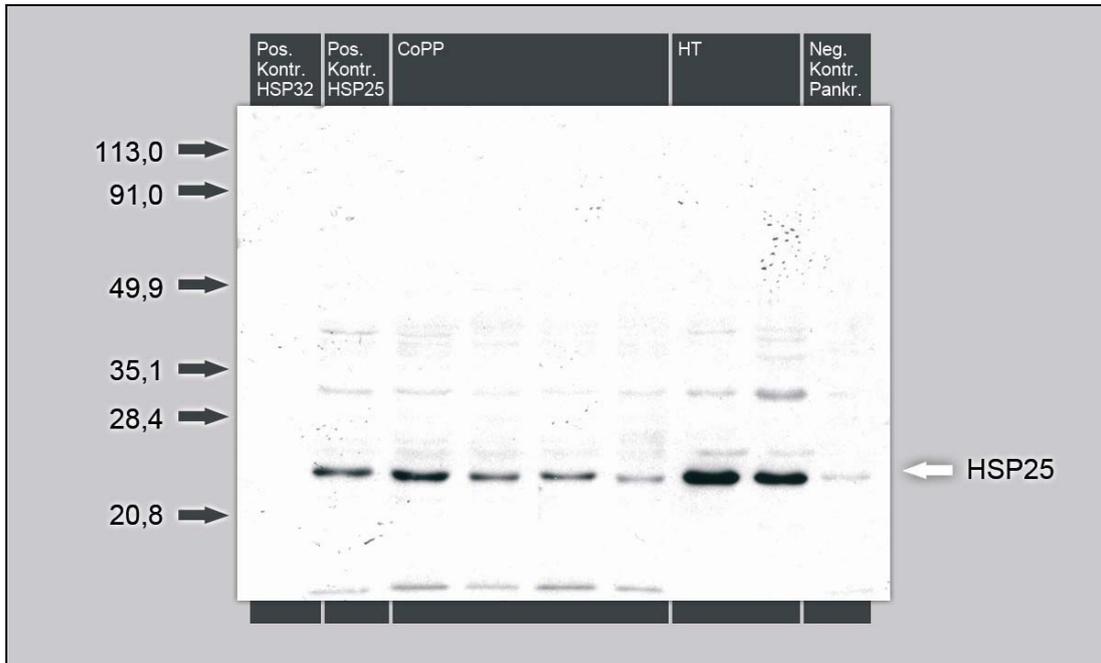
Jeweils 20 µg Protein aus Pankreashomogenat von Tieren, welche mit CoPP 5 mg (*Bahn 3*), 10 mg (*Bahn 4 und 5*) und 20 mg (*Bahn 6 und 7*) i.p. vorbehandelt wurden, wurden pro Bahn aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als interner Standard und zur Prüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurde rekombinantes HSP32 (*Pos. Kontr. HSP32, Bahn 1, 25 ng*) als Positivkontrolle ebenfalls aufgetragen.

Die Membranen wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-HSP32 Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 markiert, Konzentration des sekundären AK 1:10000 (Erläuterungen siehe Text).

In der oben gezeigten *Abbildung 13* ist die dosisabhängige Induktion der Proteinexpression (Dose response) von HSP32 nach CoPP-Präkonditionierung dargestellt. In der Western Analyse mit spezifischen Anti-HSP32/HO-1 Antikörper 24h nach i.p. Applikation von 5, 10 oder 20 mg CoPP ist eine dosisabhängig zunehmende Expression von HSP32 im Pankreas demonstriert.

Im Weiteren soll ergänzend noch der vergleichende Einfluss von CoPP auf HSP25/27 untersucht werden. Hierbei auch im direkten Vergleich zwischen beiden vorbeschriebenen Präkonditionierungen. Für die Bestimmung eines Expressionsmusters wurden die Versuchstiere einer Hyperthermie- bzw. CoPP-Präkonditionierung unterzogen und 24h später die HSP-Expression in Pankreashomogenaten untersucht.

Abb. 14 a/b Einfluss von Hyperthermie und CoPP im Vergleich auf HSP25/27 und 32 im Pankreas



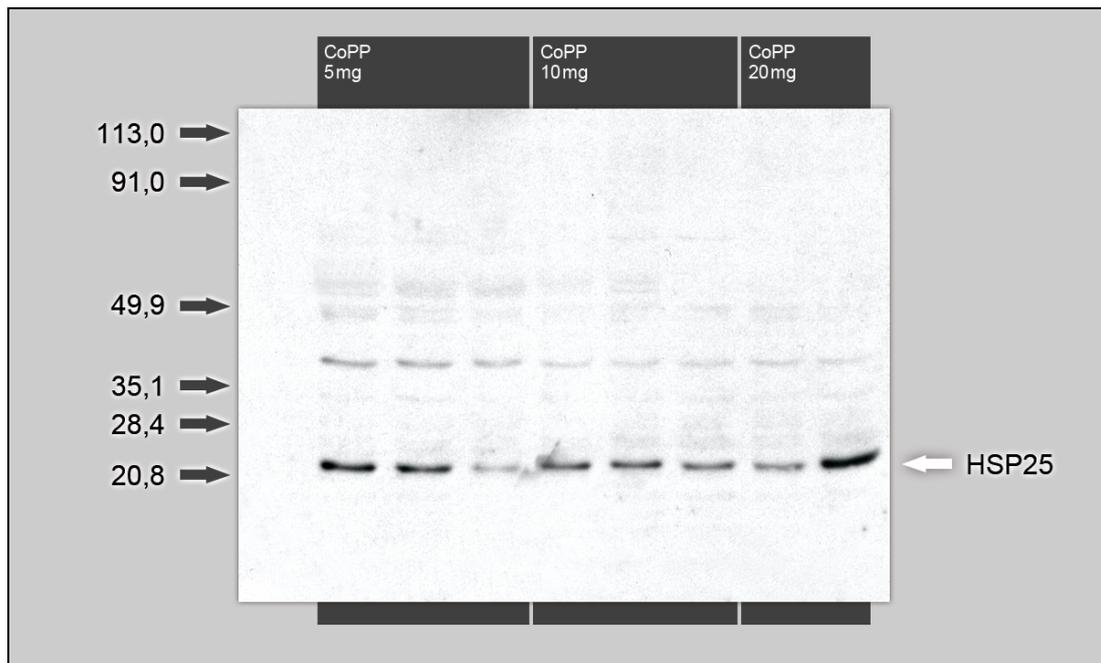
Jeweils 20 µg Protein von Tieren, die mit 5 mg CoPP i.p. vorbehandelt wurden (*CoPP, Bahn 3 bis 6*), wurden pro Bahn aufgetragen, die Proteine per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als interner Standard und zur Prüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden rekombinantes HSP25 (*Pos. Kontr. HSP25, Bahn 2, 20 ng*) oder Pankreasgewebe mit Hyperthermie präkonditionierter Tiere (*Bahn 7 und 8, 25 ng*) als Positivkontrolle ebenfalls aufgetragen. Zusätzlich wurde noch eine Negativkontrolle (*NK Pankr., Bahn 9*) verwendet. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-HSP25 Antikörper (*Abb. 14 a*) in

einer Konzentration von 1:5000 markiert, Konzentration des sekundären AK 1:10000. Anschließend wurden die Antikörper durch Stripping (Herunterwaschen) entfernt und die Membran dann mit einem spezifischen HSP32 Antikörper markiert (*Abb. 14 b*). Das schwache Signal in Bahn 6 scheint durch die Auftragung weniger Protein bedingt zu sein und ist wohl hier eher als Auftragsfehler zu werten bzw. resultiert aus einer stärkeren Verdünnung.

Auf der jeweils linken Seite der Abbildungen wurden die Molekulargewichte durch einen Protein-Standard-Marker (*schwarze Pfeile*), die mitgelaufenen Positivkontrollen jeweils mit *weißen Pfeilen* auf der rechten Seite markiert. Als Positivkontrollen (*die beiden linken Bahnen*) diente rekombinantes Protein, als Negativkontrolle (*äußerst rechte Bahn*) diente unbehandeltes natives Pankreasgewebe.

In *Abbildung 14 a* sieht man das Expressionsmuster von HSP25/27 in den Pankreasproben, sowohl 24h nach CoPP-Präkonditionierung, als auch 24h nach Hyperthermiebehandlung (*vgl. Abbildung 11*). Im Unterschied zur Induktion durch Hyperthermie, lässt sich kein eindeutiger Nachweis einer CoPP induzierten HSP25-Expression erbringen. Die Expression bei den mit CoPP behandelten Tieren dürfte vielmehr der konstitutiven HSP25-Expression im Pankreas entsprechen [Schäfer et al. 1999]. Dies gilt analog auch für *Abbildung 15*, in der eine Expression von HSP25 durch CoPP-Präkonditionierung auch mit steigenden CoPP-Dosen nicht belegt werden kann.

In *Abbildung 14 b* zeigt sich nach dem erneuten Waschen, Entfernen des spezifischen HSP25 Antikörpers (Strippen) und erneuter Markierung derselben Membran mit einem spezifischen Anti-HSP32 Antikörper, wiederum keine Expression bzw. Hochregulierung von HSP32/HO-1 nach Hyperthermiebehandlung, aber erneut eine Expression nach CoPP-Vorbehandlung. Dabei stellt sich in *Bahn 6* ein schwächeres Expressionssignal dar. Wegen des geringen Expressionssignals im Western auch von HSP25 in *Abbildung 14 a* in dieser Probe, muss hier von einer geringeren Proteinmenge vorab ausgegangen werden.

Abb. 15 Die Induktion von HSP25 nach CoPP-Präkonditionierung mit steigender Dosis

Jeweils 20 µg Protein aus Pankreashomogenat von Tieren, die mit 5 mg (*Bahn 1 bis 3*), 10 mg (*Bahn 4 bis 6*) und 20 mg (*Bahn 7 und 8*) CoPP i.p. vorbehandelt wurden (*CoPP, Bahn 1 bis 3*), wurden pro Bahn aufgetragen, die Proteine per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-HSP25 Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 markiert, Konzentration des sekundären AK 1:10000. Das schwächere Signal ist am ehesten durch eine geringere aufgetragene Proteinmenge zu begründen.

Da in *Abbildung 14 a* eine HSP25 Expression in allen Bahnen zu sehen ist, ist in *Abbildung 15* noch einmal das Expressionsmuster mit unterschiedlichen Mengen CoPP (Dose response) mit spezifischen Anti-HSP25 Antikörper nach Applikation von CoPP i.p. in einer Auswahl aus 10 voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt. Nach Gabe von 5, 10 oder 20 mg CoPP stellt sich hier keine signifikante Hochregulierung von HSP25 im Pankreas dar, die unterschiedlichen Intensitäten in *Bahn 3, 6 und 7* sind wohl eher auf verschiedene Experimente und Schwankungen in den aufgetragenen Proteinmengen zurückzuführen. Dies zeigt, dass HSP25 genuin im Pankreas vorkommt, aber nicht auf die CoPP-Präkonditionierung anspricht, also pharmakologisch durch CoPP nicht beeinflussbar ist.

Da sich zeigen lässt, dass sich HSP70 durch CoPP-Präkonditionierung nicht beeinflussen lässt, wurde nun auch das in Verbindung mit HSP70 oft auftretende HSP60 untersucht. Es wurde die HSP60-Expression auf unterschiedliche CoPP-Mengen (5, 10 und 20 mg/kg KG) 24h nach i.p. Applikation beurteilt und auch hier

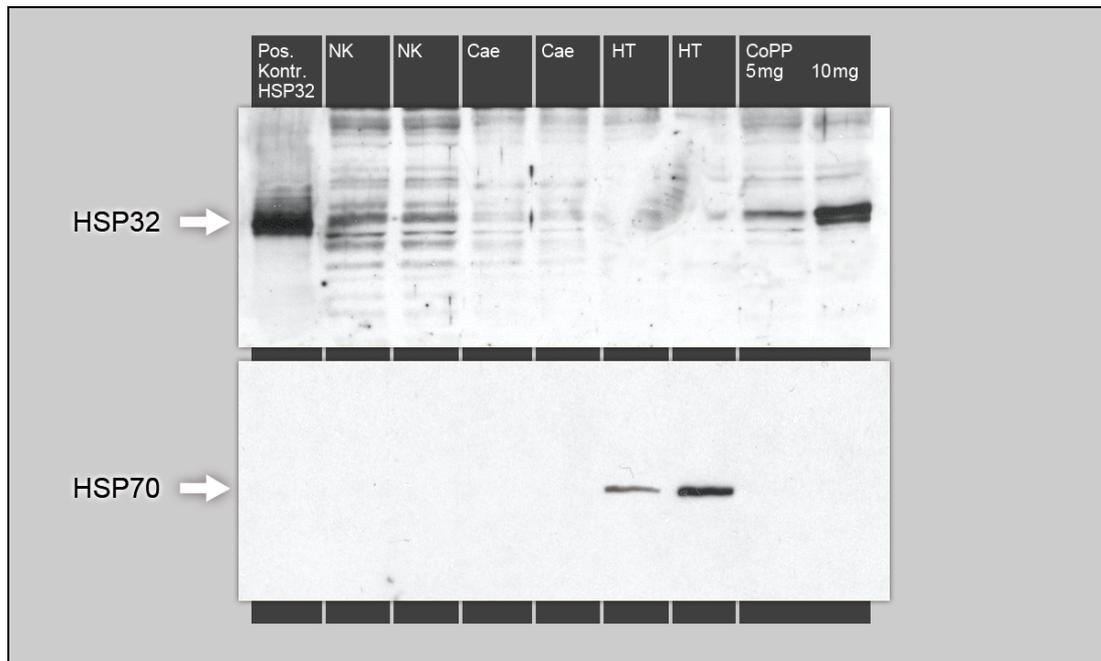
konnte keine spezifische Reaktion bzw. dosisabhängige Expression (Hochregulierung) 24h nach CoPP-Präkonditionierung nachweisbar gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3. Auswirkungen von Caerulein und Caerulein-induzierter Pankreatitis auf die HSP-Expression

Die Induktion einer experimentellen akuten Pankreatitis erfolgte in Anlehnung an die Vorarbeiten von Sato und Fu [Sato et al. 1997, Fu et al. 1997] und analog der Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe [Kubisch et al. 2004, Schäfer et al. 2005] standardmäßig durch Verwendung von Caerulein (pGlu-Gln-Asp-Tyr(SO₃H)-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) (s. *Methoden* 6.3.). Dabei handelt es sich um ein Decapeptid und Cholezystokinin (CCK) Analogon, das sich von diesem nur durch zwei zusätzliche Aminosäuren unterscheidet, die sich im Anschluss an das für die biologische Aktivität zwingend notwendige Heptapeptid befinden. Die Wirkungen von Caerulein und CCK auf das Pankreas sind annähernd identisch [Lampel und Kern 1977].

Nachdem in den vorangegangenen Western-Analysen der Nachweis der spezifischen pharmakologischen Induktion von HSP32 durch CoPP und HSP70 durch Hyperthermie vergleichend dargestellt und erbracht wurde, soll nun der Einfluss von Caerulein bzw. der akuten Pankreatitis auf verschiedene Expressionsmuster gezeigt werden. Interessant ist dabei, dass vorhergehende Studien nach 12h bzw. 24h eine Induktion von HO-1 durch Caerulein beschreiben [Fu et al. 1997, Sato et al. 1997]. In dieser Arbeit wird dagegen die Frühphase nach 6h untersucht und dargestellt.

Abb. 16 Auswirkung von Caerulein, Hyperthermie und CoPP auf das Expressionsmuster von HSP32 und HSP70 im Vergleich



Jeweils 20 µg Protein aus Pankreashomogenat von unbehandelten Kontrolltieren (*Bahn 2 und 3*) als Negativkontrolle (*NK*), von Tieren, welche mit Caerulein 50 µg/kg KG (*Bahn 4 und 5*), Hyperthermie (*Bahn 6 und 7*) oder Tieren die mit CoPP 5 mg (*Bahn 8*) und 10 mg (*Bahn 9*) i.p. vorbehandelt wurden, pro Bahn aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als interner Standard und zur Prüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurde rekombinantes HSP32 (*Pos. Kontr. HSP32, Bahn 1*) als Positivkontrolle ebenfalls aufgetragen.

Die Membran wurde zunächst mit einem spez. Anti-HSP32 Antikörper (*oben*) in einer Konzentration von 1:5000 markiert, Konzentration des sekundären AK 1:10000.

Anschließend wurden die Antikörper durch Stripping (Herunterwaschen) entfernt und die Membran dann mit einem spez. HSP70 Antikörper in der Konzentration 1:1000 markiert (*unten*) (Erläuterungen siehe Text).

In *Abbildung 16* wird zuerst die Wirkung von Caerulein auf die HSP32- und HSP70-Expression im Pankreas ohne Präkonditionierung, wie noch einmal vergleichend, der Einfluss der verschiedenen Vorbehandlungen mit Hyperthermie und CoPP, dargestellt. Es sind zum einen Kontrolltiere ohne Vorbehandlung abgebildet (*Bahn 2 und 3*), wie auch Tiere nach Induktion einer akuten experimentellen Pankreatitis durch 5-malige stündliche Applikation von Caerulein ohne Vorbehandlung (*Bahn 4 und 5*), sowie entweder jeweils 24h nach der Präkonditionierung mit Hyperthermie bzw. mit CoPP (*Bahnen 6 bis 9*).

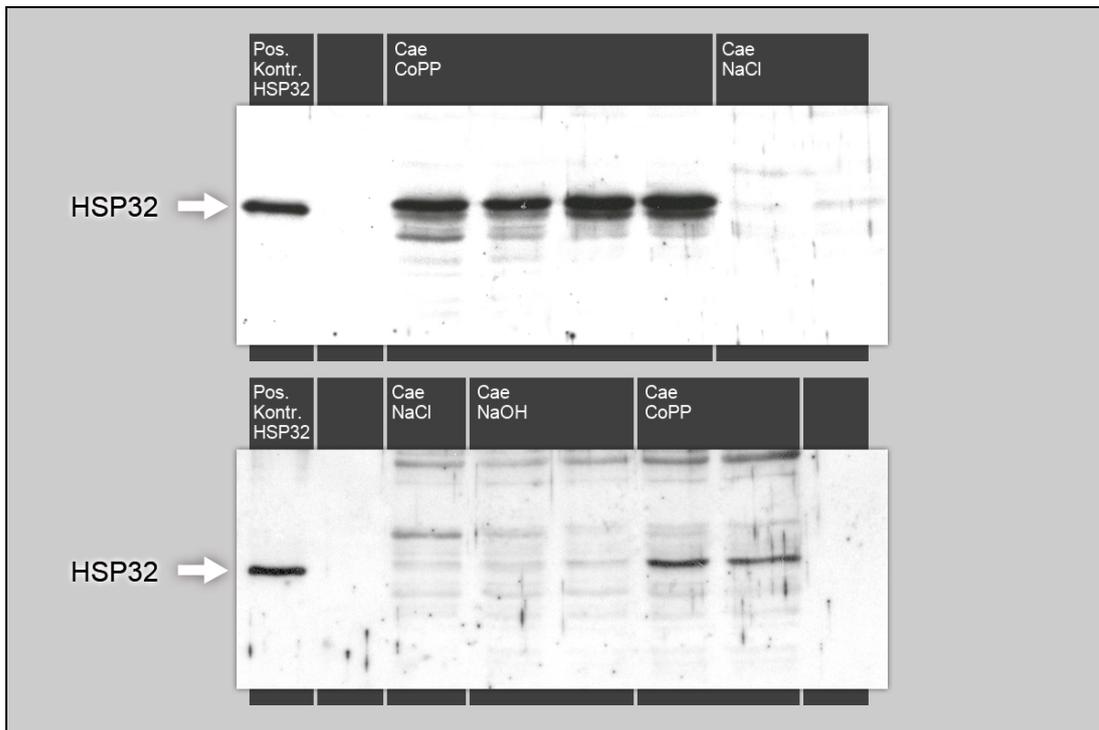
Das Expressionsmuster in der Western Analyse in *Abbildung 16* im *oberen Panel* mit Anti-HSP32 zeigt für Caerulein in der Frühphase nach 6h keinen messbaren Einfluss auf die Expression von HSP32 im Pankreas. Weder im unbehandelten Pankreasgewebe (NK), noch 6h nach induzierter Pankreatitis durch Caerulein (Cae) oder 24h nach Präkonditionierung durch Hyperthermie (HT), zeigt sich eine HSP32-Expression im Pankreas. CoPP-Präkonditionierung führt dagegen nach 24h dosisabhängig zu einer starken HSP32-Induktion, dieses auch wie zuvor schon beschrieben mit einer Dose response. Die Banden in der NK Bahn entsprechen nicht dem Molekulargewicht der Positivkontrolle bzw. resultieren aus der Überbelichtung und sind somit als unspezifisch anzusehen.

Der Einfluss von Hyperthermie ist, dargestellt im *unteren Panel*, wie schon vorher gezeigt und so erwartet, nur auf HSP70 gegeben. Die unterschiedliche Ausprägung der HSP70 Induktion bei den beiden Proben ist durch Schwankungen im Ausmaß der durch Hyperthermie vermittelten Induktion der HSP70-Proteinexpression einerseits und durch Schwankungen der aufgetragenen Proteinmenge zu erklären.

Eine Induktion von HO-1 durch Caerulein, wie in vorhergehenden Studien nach 12h bzw. 24h beschrieben, lässt sich hierbei nach 6h also nicht nachweisen und scheint wohl in der Frühphase der akuten Pankreatitis durch Caerulein noch nicht messbar, was den Daten in der Literatur entspricht [Fu et al. 1997, Sato et al. 1997].

Abbildung 17 zeigt abschließend zwei repräsentative Western Analysen von Tieren, jeweils während einer akuten, durch Caerulein induzierten Pankreatitis und nach Präkonditionierung mit CoPP bzw. den Trägerlösungen [NaOH] und [NaCl].

Abb. 17 Western Analyse mit Anti-HSP32 und die Auswirkungen von Trägerlösungen auf die HSP32-Expression



Jeweils 20 µg Protein aus Pankreashomogenat von Tieren, welche mit Caerulein 50 µg/kg KG und mit CoPP 5 mg i.p. vorbehandelt wurden (*Bahnen 3 bis 6 oben und Bahn 6 und 7 unten*), von Tieren, welche mit Caerulein 50 µg/kg KG und mit [NaCl] (*Bahn 7 und 8 oben und Bahn 3 unten*), sowie [NaOH] (*Bahn 4 und 5 unten*), jeweils in äquimolarer Konzentration zu den Trägersubstanzen, pro Bahn aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als interner Standard und zur Prüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurde rekombinantes HSP32 (*Pos. Kontr. HSP32, Bahn 1, 25 ng*) als Positivkontrolle ebenfalls aufgetragen. Gezeigt ist eine Auswahl aus 10 voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Membranen wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-HSP32 Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 markiert, Konzentration des sekundären Antikörpers war 1:10000 (Erläuterungen siehe Text).

In den *beiden Panels* wird gezeigt, dass eine experimentelle akute Pankreatitis, durch supramaximale Gabe von Caerulein ausgelöst, nach 6h noch keine nachweisbare Hochregulierung der HSP32-Expression bedingt, wogegen die 24h zuvor mit CoPP vorbehandelten (präkonditionierten) Tiere eine deutliche HSP32-Expression zeigen. Es ist dargestellt, dass die Trägerlösungen [NaOH] oder [NaCl], welche zur Lösung von CoPP oder Caerulein benötigt werden, sowie der Vorgang der Injektion als „mechanischer Stress“ hierbei die HSP32-Induktion allein nicht beeinflussen. Nun soll im folgenden Abschnitt die Qualität der Induktion und die

Auswirkung auf spezifische Parameter des Pankreas und der Pankreatitis evaluiert werden.

3.2. Biochemische Messungen und statistische Analysen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine gezielte pharmakologische Induktion von HSP32/HO-1 mit CoPP möglich ist und dass die Präkonditionierung mit Metalloprotoporphyrinen im Besonderen die Expression von HSP32, aber nicht die anderer HSPs beeinflusst, wurde nun der pharmakologische Einfluss der HSP32/HO-1 auf die spezifischen biochemischen Parameter des Pankreas, sowie die Auswirkungen auf den Verlauf der durch Caerulein induzierten Pankreatitis untersucht und im folgenden Abschnitt dargestellt.

Um die Wirkung einer Präkonditionierung mit CoPP auf die akute Pankreatitis und den Effekt der Überexpression von HSP32/HO-1 auf die Schwere der akuten Pankreatitis vergleichend zu untersuchen und genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene pankreasspezifische biochemische Parameter, wie die Konzentrationen der Enzyme Amylase und Lipase im Blutserum der Versuchstiere, sowie Trypsin im Pankreasgewebe und der relative Flüssigkeitsgehalt im Pankreas selbst im Verlauf des Versuches erhoben und in den folgenden Abbildungen vergleichend dargestellt. Die Versuchstiere wurden, wie in *Tabelle 5* beschrieben, unterschiedlich vorbehandelt.

Tabelle 5 Vorbehandlungen der Versuchstiere in einzelnen Versuchsgruppen

| | | | |
|-------------------------|-----------|---------------|--------------------|
| Kontrollgruppe 1 | 0,9% NaCl | Ø | Ø |
| Kontrollgruppe 2 | 0,9% NaCl | 5 mg/kg CoPP | Ø |
| Versuchsgruppe 1 | Ø | 5 mg/kg CoPP | 50 µg/kg Caerulein |
| Versuchsgruppe 2 | Ø | 10 mg/kg CoPP | 50 µg/kg Caerulein |
| Versuchsgruppe 3 | Ø | 20 mg/kg CoPP | 50 µg/kg Caerulein |
| Versuchsgruppe 4 | 0,9% NaCl | Ø | 50 µg/kg Caerulein |

Die Kontrollgruppen erhielten 24h vor der Parameterbestimmung eine Vorbehandlung entweder mit 0,9% [NaCl] oder mit CoPP, bzw. beidem, da [NaCl] hier als Verdünnungsmedium von [CoPP/NaOH] verwendet wurde, bzw. der Injektionsvorgang im Sinne des mechanischen Stresses als Einflussmöglichkeit ausgeschlossen werden musste. Eine akute experimentelle Pankreatitis durch

Caerulein wurde in diesen Gruppen nicht induziert, um für die Auswertung Nativdaten zu erhalten.

Die Tiere der Versuchsgruppen wurden dementsprechend jeweils 24h vor Versuchsbeginn mit 5, 10 oder 20 mg/kg KG CoPP i.p. oder ebenfalls einer äquivalenten Menge an 0,9% [NaCl] i.p. präkonditioniert bzw. behandelt (s. *Methoden* 6.1.2.). Die Versuchsgruppen bekamen im Unterschied zur Kontrollgruppe jedoch am Versuchstag stündliche intraperitoneale Injektionen, welche die supramaximale Konzentration an Caerulein von 50 µg/kg KG enthielten (s. *Methoden* 6.3.), welche zu einer gesteigerten Trypsinaktivität, zu einer steigenden Lipase- und Amylaseaktivität im Serum, sowie zu einem steigenden Wassergehalt (Ödembildung) im Pankreasgewebe führten.

Da die Induktion einer Pankreatitis dosisabhängig ist, wurde durch unsere Arbeitsgruppe zunächst die genaue Menge an Caerulein ermittelt, die nötig ist, um eine experimentelle akute Pankreatitis zu induzieren und damit sowohl auf biochemischer, wie auch auf histologischer Ebene charakteristische Veränderungen hervorzuheben. Zuerst wurde eine Dosis von 10 µg/kg KG Caerulein verwandt, bei welcher es aber lediglich zu einer geringfügigen Veränderung der biochemischen Parameter kam, histologische Veränderungen konnten dabei kaum beobachtet werden (nicht gezeigt). Deshalb wurde die Caeruleindosis auf 50 µg/kg KG oder 100 µg/kg KG erhöht. Hierbei zeigten sich die erwarteten biochemischen und histologischen Veränderungen aller Parameter. Es stellte sich heraus, dass sich bei der Dosis von 50 µg/kg KG die pankreasspezifischen Parameter (Trypsin, Lipase, Amylase, relativer Wassergehalt (Ödembildung) und histologische Veränderungen) signifikant verändern und die weitere Steigerung der Caeruleinmenge zwar zu etwas stärkeren Veränderungen der pankreatitisspezifischen Parameter führte, aber kein weiterer statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten war (im Vgl. mit 50 µg/kg KG). Deshalb wurden alle weiteren Experimente mit der Gabe eines Bolus von 50 µg/kg KG durchgeführt, um eine akute Pankreatitis auszulösen (s. *Methoden* 6.3.).

In den *Abschnitten* 3.2.1.2., 3.2.2. und 3.2.3. sind die unterschiedlichen Auswirkungen auf die oben genannten biochemischen Parameter nach Induktion einer akuten Pankreatitis in der Frühphase sowie die Beeinflussung durch eine zuvor erfolgte CoPP-Präkonditionierung graphisch dargestellt (s. *Methoden* 6.8.).

3.2.1. Einfluss der Präkonditionierung auf die Trypsinaktivität in Pankreashomogenaten

Der intrazellulären Trypsinaktivierung in der Frühphase der akuten Pankreatitis kommt eine zentrale Bedeutung zu. Dieses beschreibt 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 (s. *Abschnitt 2.2.3.2.*).

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. Für den Einfluss einer CoPP-Präkonditionierung und des dadurch gebildeten HSP32 auf die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung lagen bislang *in vivo* im Modell der akuten experimentellen Caerulein-induzierten Pankreatitis keine Daten vor.

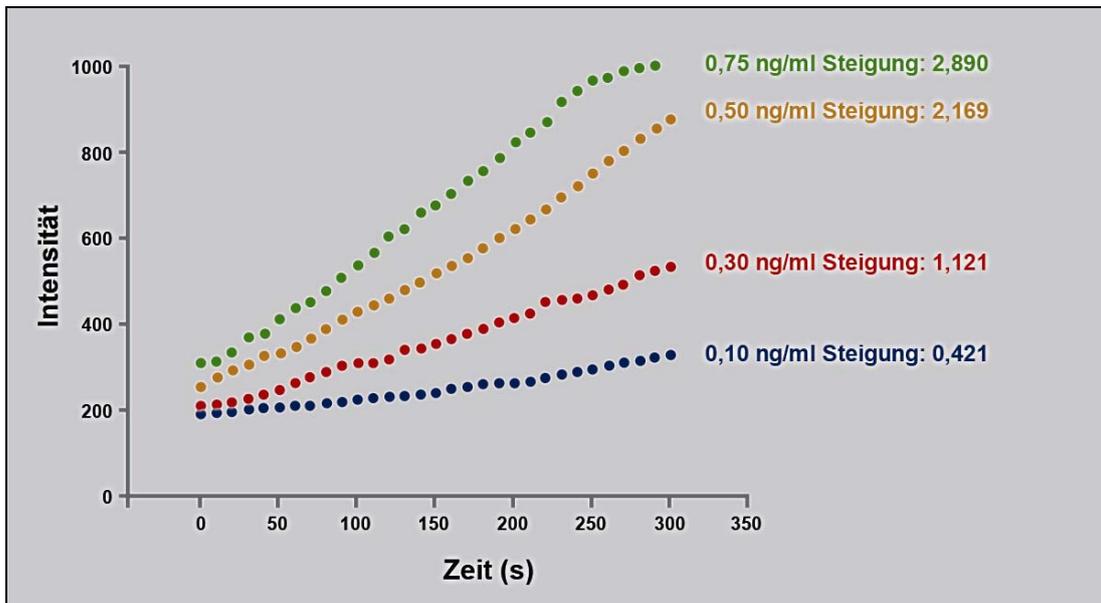
3.2.1.1. Validierung der Trypsinbestimmung

Die Methodik zur Trypsinbestimmung und die Messung der Aktivität wurden in unserer Arbeitsgruppe 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 Fluoreszenzmessung erfolgte analog der Beschreibung im Kapitel *Methoden 6.5.3.*

Vor jeder Messung von Pankreasproben wurden Standardkonzentrationen von Trypsin vermessen, um eine Standardkurve (Steigung gegen Trypsinkonzentration) zu erstellen, damit die Konzentration an Trypsin in den zu vermessenden Proben berechnet werden konnte. Hierfür wurden Standards mit definierten, vorbestimmten Trypsinkonzentrationen (z.B. 0,1 ng/ml; 0,3 ng/ml; 0,5 ng/ml; 0,75 ng/ml) hergestellt und vermessen (s. *Methoden 6.5.3.*).

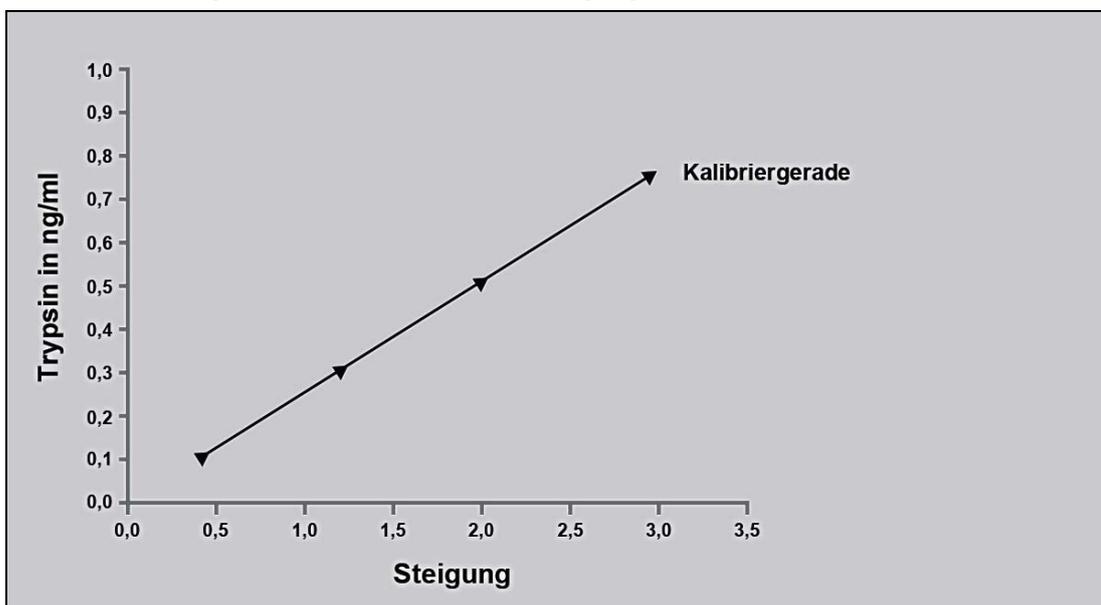
Aus den erhaltenen Geraden der vermessenen, verschieden konzentrierten Standards, wurden die jeweiligen Steigungen ermittelt (s. *Abb. 18*).

Abb. 18 Messung der Zunahme der Fluoreszenz bei definierten Standard-Trypsinkonzentrationen



Beispiel einer Messung der Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit, abhängig von unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen.

Abb. 19 Kalibriergerade aus den ermittelten Steigungen der Standardkonzentrationen



Darstellung einer Kalibriergerade, die sich ergibt, wenn die Steigungen der einzelnen Intensitätsgeraden gegen die jeweils entsprechende Trypsinkonzentration aufgetragen werden (vgl. Abb. 18).

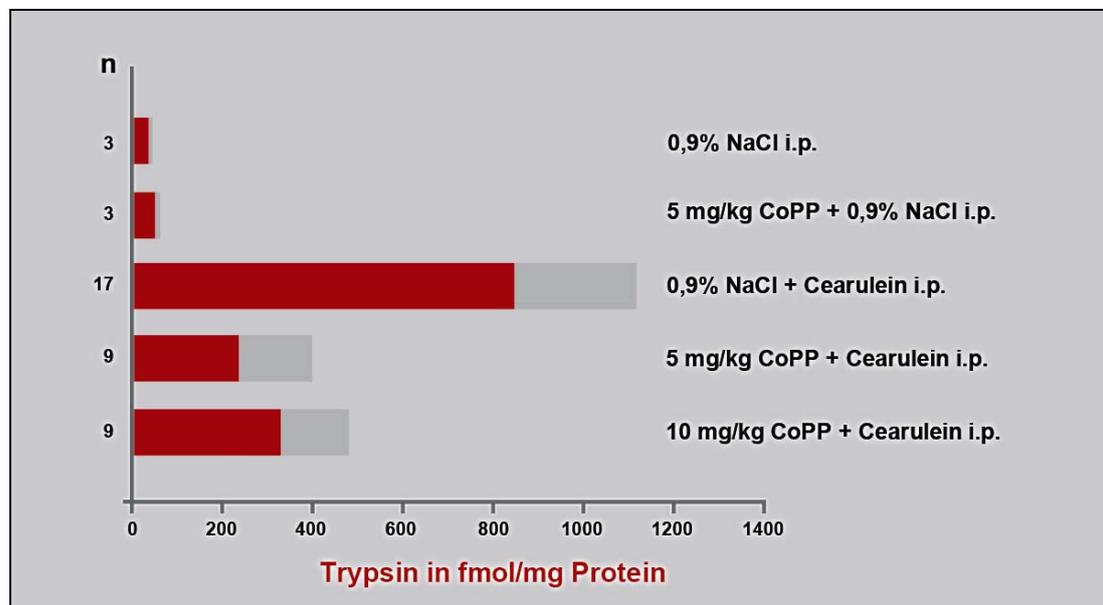
Die berechneten Geradensteigungen wurden dann gegen die dazugehörigen Trypsinkonzentrationen in ng/ml in einem Koordinatensystem aufgetragen (s. Abb. 19). Zur Berechnung des Trypsingehaltes der Pankreasproben, wurden die

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 jeweilige Verdünnungsfaktor mit in das Ergebnis eingerechnet werden, um die tatsächliche Trypsinkonzentration in der Probe zu erhalten.

3.2.1.2. Bestimmung von Trypsin in Pankreashomogenaten

In *Abbildung 20*, ist graphisch die pankreatische Trypsinaktivität dargestellt. Sechs Stunden nach Versuchsbeginn erkennt man einen deutlichen Anstieg der Aktivität der Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollgruppen (*vgl. mittleren Balken mit Balken 1 und 2 oben*), was die Ausprägung der induzierten akuten Pankreatitis beschreibt. Dabei besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren mit und ohne Präkonditionierung ($p < 0,01$), wobei der größte Effekt hier bei der Präkonditionierung mit 5 mg/kg CoPP zu sehen ist (*vgl. hierzu mittleren Balken mit den Balken 4 und 5 unten*).

Abb. 20 Trypsinaktivität im Pankreasgewebe



Die Ergebnisse sind bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt; die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe ist unter (n) angegeben. Balkenbezeichnung 1-5 von oben nach unten.

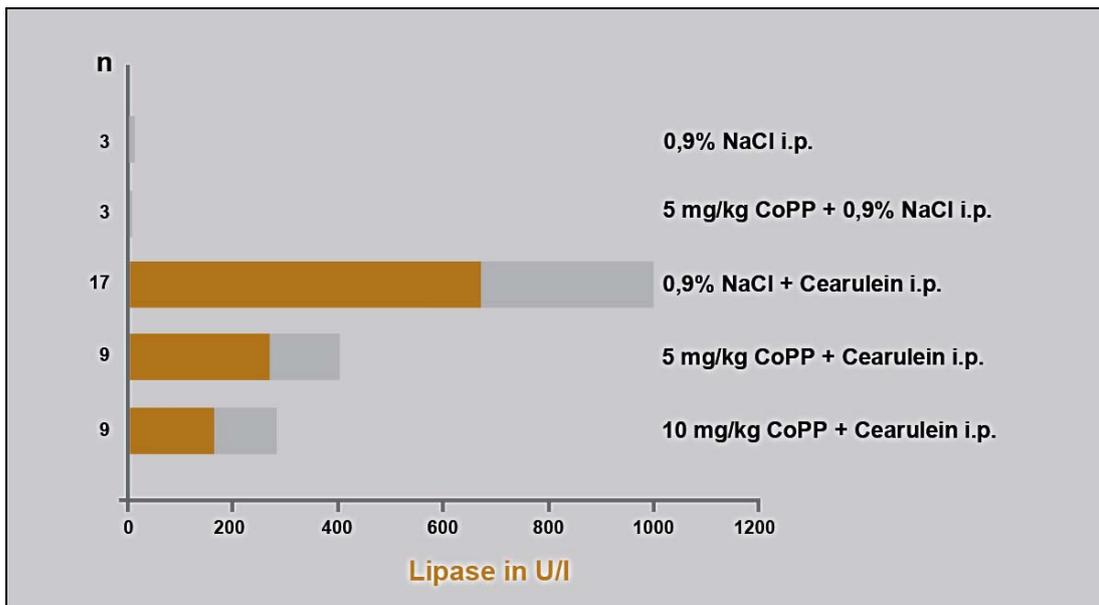
Bei der Trypsinbestimmung (s. *Abb. 20*) nach Induktion einer Caeruleinpankreatitis lässt sich für die nicht CoPP-präkonditionierten Versuchstiere (*Anzahl n = 17, Balken 3*), ein Mittelwert von 845,65 fmol/mg Protein bei einer Standardabweichung von 266,32 und einer SEM von 64,59 angeben.

Die Werte von mit CoPP vorbehandelten Versuchstieren ergaben nach Induktion einer Caeruleinpankreatitis bei 5 mg/kg CoPP (*Balken 4*) einen Mittelwert von 234,40 fmol/mg mit einer Standardabweichung von 161,09 und einer SEM von 53,70 und für 10 mg/kg CoPP (*Balken 5*) einen Mittelwert von 328,18 fmol/mg mit einer Standardabweichung von 150,60 und einer SEM von 50,20. In beiden Versuchsgruppen betrug die Anzahl der Versuchstiere $n = 9$.

Die Caerulein-induzierte Trypsinaktivität in Pankreashomogenaten war in beiden CoPP-Versuchsgruppen (*Balken 4 oder 5*) signifikant niedriger ($p < 0,001$) im Vergleich mit der Gruppe, welche nur mit [NaCl] vorbehandelt wurde (*Balken 3*). Vergleicht man dabei beide CoPP-Gruppen untereinander, zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,220$).

3.2.2. Einfluss der Präkonditionierung auf die Sekretion von Lipase und Amylase

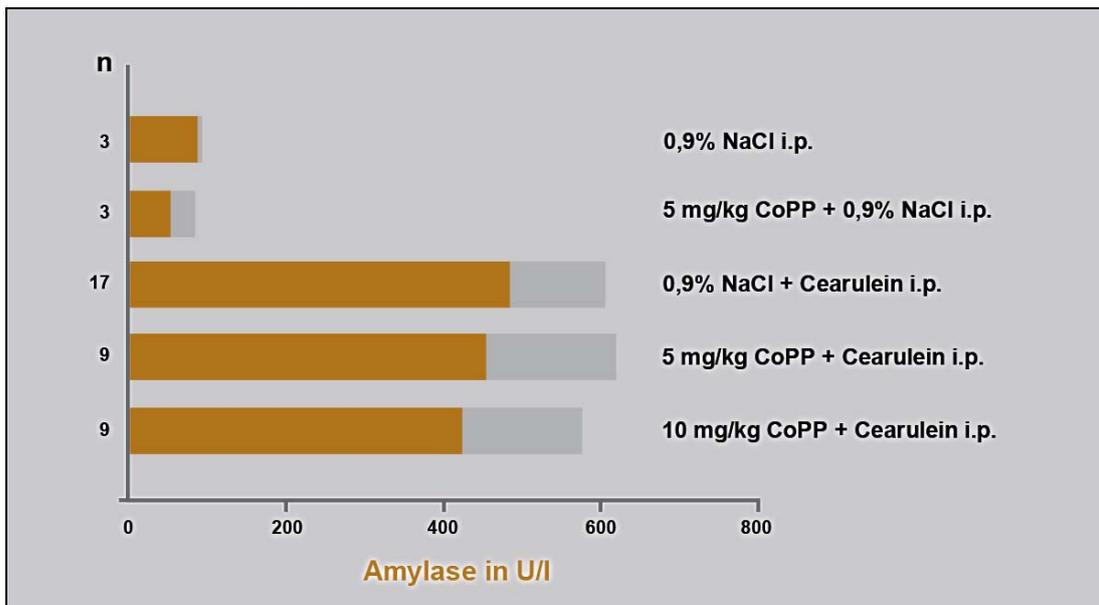
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Präkonditionierung mit Metalloprotoporphyrinen im besonderen die Expression von HSP32 und damit die Trypsinaktivität im Pankreashomogenat beeinflusst, wurde untersucht, inwiefern sich die Lipase- und Amylasesekretion, sowie die jeweilige Enzymaktivität im Blutserum nach Induktion einer akuten Pankreatitis in der Frühphase, durch eine zuvor erfolgte CoPP-Präkonditionierung, beeinflussen lassen.

Abb. 21 Aktivität der Lipase im Serum der Versuchstiere

Die Ergebnisse sind bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt; die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe ist unter (n) angegeben. Balkenbezeichnung 1-5 von oben nach unten.

Bei der Lipasebestimmung (s. Abb. 21) nach Induktion einer Caeruleinpankreatitis lässt sich für die nicht mit CoPP präkonditionierten Versuchstiere (*Balken 3*) ein Mittelwert von 668,88 U/l bei einer Standardabweichung von 327,21 und einer SEM von 79,36 angeben. Die Werte der mit CoPP vorbehandelten Versuchstieren ergaben nach Induktion einer Caeruleinpankreatitis bei 5 mg/kg CoPP (*Balken 4*) einen Mittelwert von 268,66 U/l mit einer Standardabweichung von 131,48 und einer SEM von 43,83 und für 10 mg/kg CoPP (*Balken 5*) einen Mittelwert von 163,88 mit einer Standardabweichung von 116,23 und einer SEM von 38,74. In beiden Versuchsgruppen betrug die Anzahl der Versuchstiere $n = 9$.

Dabei ergibt sich für den Vergleich der nur mit [NaCl] vorbehandelten Tiere mit 5 mg/kg CoPP (*Balken 3 mit 4*) ein statistisch signifikanter Unterschied von $p = 0,002$. Der Caerulein-induzierte Anstieg der Lipaseaktivität war in beiden CoPP Versuchsgruppen signifikant geringer als im Vergleich mit der Versuchsgruppe mit NaCl Vorbehandlung ($p < 0,001$). Der Vergleich der Gruppen 5 mit 10 mg/kg KG CoPP (*Balken 4 mit 5*) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Abb. 22 Aktivität der Amylase im Serum der Versuchstiere

Die Ergebnisse sind bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt; die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe ist unter (n) angegeben. Balkenbezeichnung 1-5 von oben nach unten.

Bei der Amylasebestimmung (s. Abb. 22) nach Induktion einer Caeruleinpankreatitis lässt sich für die nicht mit CoPP präkonditionierten Versuchstiere (*Balken 3*) ein Mittelwert von 483,18 U/l bei einer Standardabweichung von 122,62 und einer SEM von 29,74 angeben.

Die Werte der mit CoPP vorbehandelten Versuchstieren ergaben nach Induktion einer Caeruleinpankreatitis bei 5 mg/kg CoPP (*Balken 4*) einen Mittelwert von 452,89 U/l mit einer Standardabweichung von 164,00 und einer SEM von 54,67 und für 10 mg/kg CoPP (*Balken 5*) einen Mittelwert von 423,22 U/l mit einer Standardabweichung von 151,44 und einer SEM von 50,48. In beiden Versuchsgruppen betrug die Anzahl der Versuchstiere $n = 9$.

Im Unterschied zu den Effekten von Caerulein auf die Trypsinaktivierung und die Serumlipase-Werte zeigte die CoPP-Vorbehandlung keinen Effekt auf die Caerulein-induzierte Amylase-Erhöhung ($p = 0,599$ für 5 mg/kg und $p = 0,285$ für 10 mg/kg).

Auch der direkte Vergleich beider CoPP-präkonditionierten Gruppen untereinander (*Balken 4 mit 5*) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,695$).

Die Aktivität von Lipase (s. Abb. 21) und Amylase (s. Abb. 22) im Serum ist im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich um ein vielfaches erhöht (vgl. jeweils

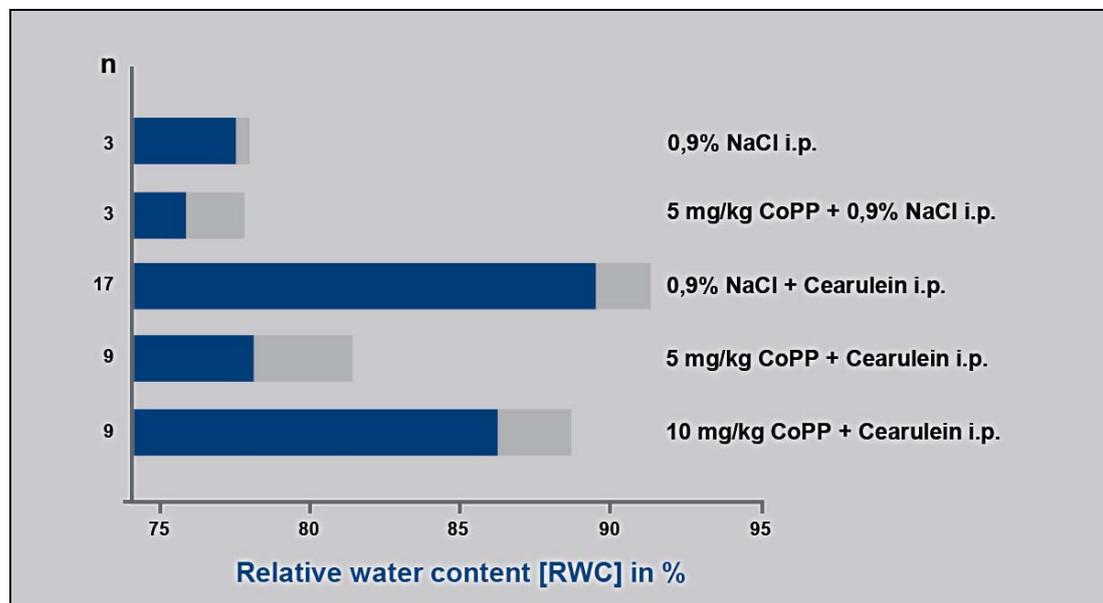
Balken 3 mit Balken 1 und 2), was in den durchgeführten Versuchen die Qualität der Ausprägung der akuten Pankreatitis nach 6h sehr gut beschreibt. Die eigentliche Verabreichung bzw. manuelle Injektion des Caerulein bzw. [NaCl / NaOH] scheint als traumatische Ursache hierbei keinen Einfluss zu nehmen (*siehe jeweils Balken 1 und 2*).

3.2.3. Ödembildung und relativer Wassergehalt

In *Abbildung 23* (vgl. *mittleren Balken mit Balken 1 und 2*) kann man die deutliche Zunahme des Feuchtgewichts 6 Stunden nach einer durch Caerulein induzierten akuten Pankreatitis bei den Versuchsgruppen erkennen. Dieses entspricht der Entstehung eines Pankreasödems im Rahmen der frühen Entzündungsreaktion. Es wurde das Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht (nach 48h) dargestellt, der Flüssigkeitsgehalt als prozentualer Anteil am Pankreasgewebe angegeben.

Auch hier fand sich ein signifikanter Unterschied zur CoPP-Vorbehandlung (vgl. *mittleren Balken mit Balken 4 und 5*). Der größte Effekt zeigt sich, wie bei der Trypsinaktivität (s. *Abb. 20*), wiederum bei 5 mg/kg KG CoPP (*Balken 4*), hier stellte sich die geringste Ödembildung dar.

Abb. 23 Relativer Wassergehalt des Pankreas (Feuchtgewicht)



Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt; die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe ist unter (n) angegeben. Balkenbezeichnung 1-5 von oben nach unten.

Diese Daten passen auch sehr gut zu den makroskopischen und mikroskopischen Bildern in denen sich dieser Effekt sehr gut nachvollziehen lässt (s. *Abschnitt 3.3.*).

Bei der Bestimmung des relativen Wassergehaltes (RWC) nach Induktion einer Caeruleinpankreatitis lässt sich für die nicht mit CoPP präkonditionierten Versuchstiere (Anzahl $n = 17$, Balken 3) ein Mittelwert von 89,59% bei einer Standardabweichung von 1,76% und einer SEM von 0,47 angeben.

Die Werte der mit CoPP vorbehandelten Versuchstiere ergaben nach Induktion einer Caeruleinpankreatitis bei 5 mg/kg CoPP (Balken 4) einen Mittelwert von 77,00% mit einer Standardabweichung von 5,91% und einer SEM von 1,97 und für 10 mg/kg CoPP (Balken 5) einen Mittelwert von 86,23% mit einer Standardabweichung von 2,41% und einer SEM von 0,8. In beiden Versuchsgruppen betrug die Anzahl der Versuchstiere $n = 9$.

Im direkten Vergleich je einer CoPP-Versuchsgruppe (Balken 4 oder 5) mit der Gruppe, welche nur mit [NaCl] vorbehandelt wurde (Balken 3), ließ sich jeweils ein signifikanter Unterschied von $p < 0,001$ beobachten. Der Vergleich beider CoPP-Gruppen untereinander (Balken 4 mit 5) zeigt in diesem Fall einen deutlichen stärkeren Effekt nach Vorbehandlung mit 5 mg/kg Copp im Vergleich zu 10 mg CoPP ($p < 0,001$).

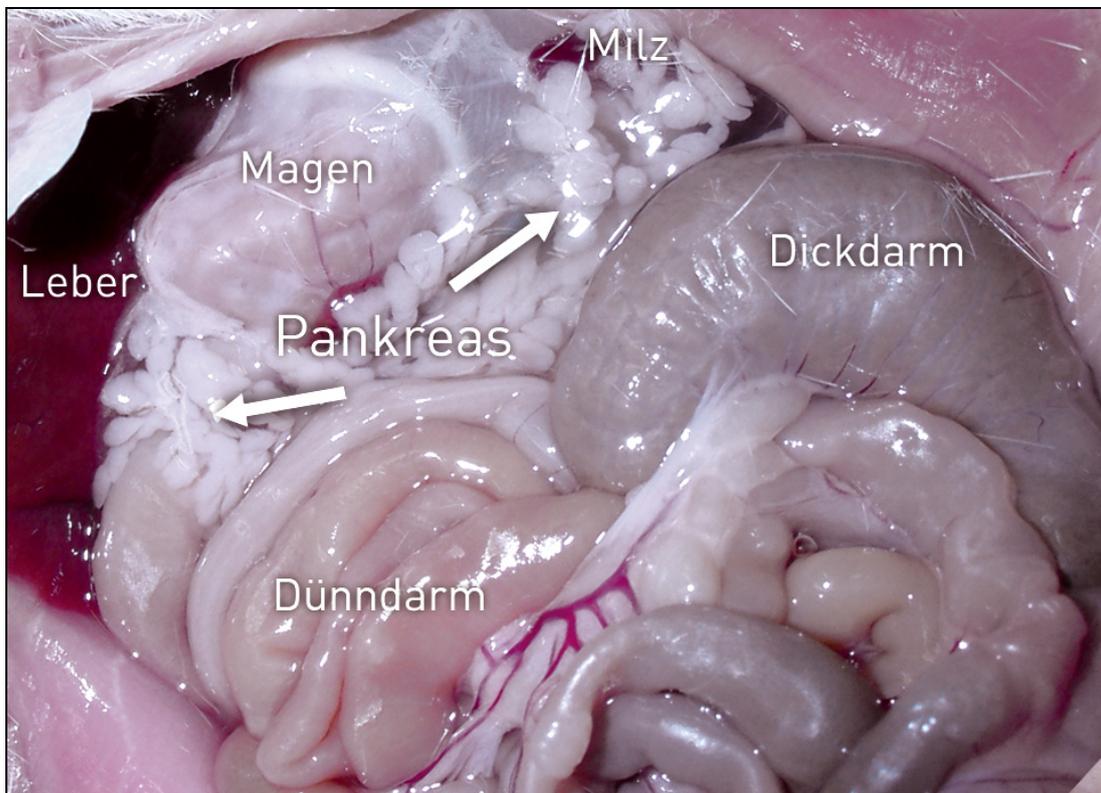
Bei der Präkonditionierung der Gruppe der Versuchstiere mit 10 mg/kg CoPP fällt im Vergleich mit der Gruppe, welche mit 5 mg/kg CoPP vorbehandelt wurden, eine sehr starke Zunahme des Feuchtgewichtes auf. Somit scheint der protektive Effekt der höheren CoPP-Dosierung geringer zu sein. Bei den biochemischen Messungen ließ sich dies nicht so beobachten (s. *Abbildungen 20 bis 22*). Möglicherweise werden die protektiven Effekte der CoPP-Präkonditionierung durch toxische Effekte der höheren Dosierung zum Teil aufgehoben [Dennery 2000].

3.3. Histologische und makroskopische Morphologie

In den morphologischen Analysen wurde die Auswirkung einer Caerulein-induzierten Pankreatitis im Vergleich zur CoPP-Präkonditionierung in der Frühphase dokumentiert. Hierbei konnte schon, wie in den oben genannten biochemischen Messungen angedeutet, eine deutliche Reduktion der histologischen Parameter, wie z.B. die Ödemgröße, im Vergleich zu Tieren die keine CoPP-Präkonditionierung erhalten haben, beobachtet werden.

Die morphologischen und histologischen Veränderungen nach einer akuten Pankreatitis wurden in Pankreasgewebe beschrieben, welches während Präparation und Resektion, sowie im Rahmen von Autopsien gewonnen wurde (s. *Methoden* 6.2.). Es zeigten sich hierbei in den milden akuten Formen, dass größtenteils die Veränderungen im Pankreasödem lagen, während schwere Pankreatitiden sich durch Nekrose, Hämorrhagie, Abszeß und Flüssigkeitsansammlungen auszeichneten. In dieser Arbeit wurde das Bild einer akuten Pankreatitis in der Frühphase (6h) dargestellt.

Abb. 24 Darstellung des OP-Situs eines Tieres ohne CoPP-Präkonditionierung nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis

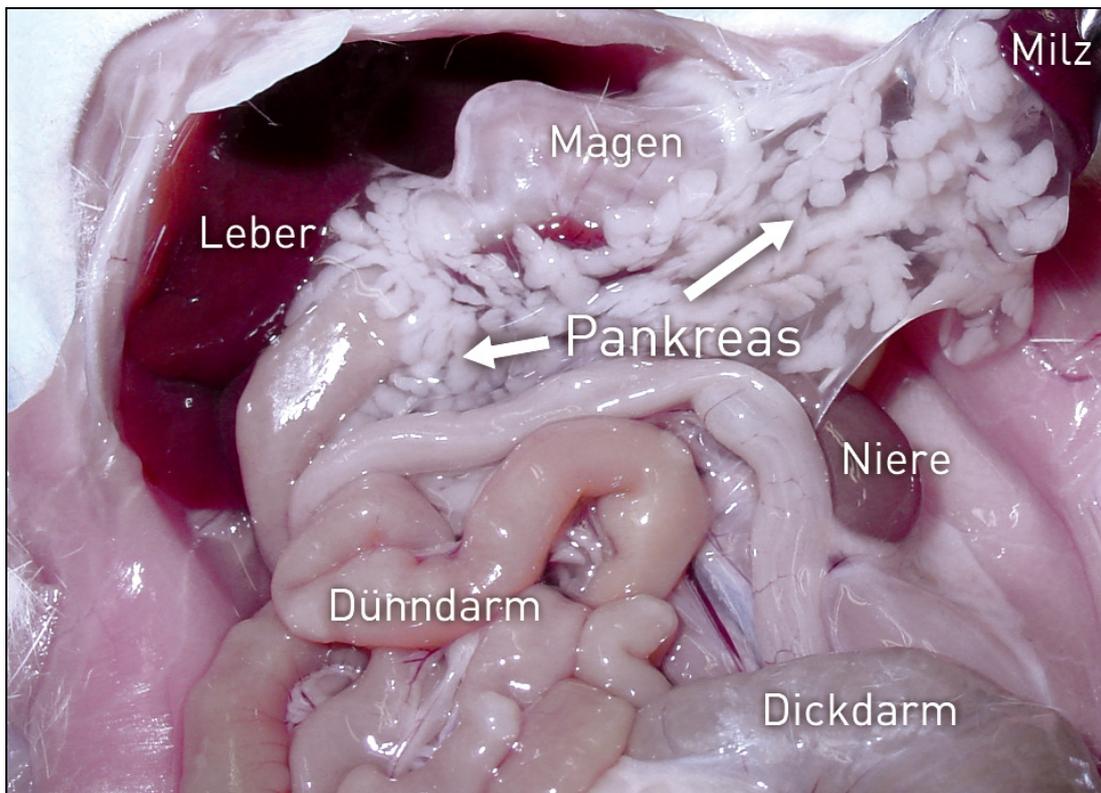


Dargestellt ist ein abdomineller Situs ohne CoPP-Präkonditionierung (24h nach [NaCl] i.p.) und 6h nach Caerulein-Gabe. Die weißen Pfeile bezeichnen das stark ödematös veränderte Pankreasgewebe.

Auf den *Abbildungen 24 bis 27* ist jeweils ein geöffnetes Abdomen während eines Versuches bei den Versuchstieren (Ratten) dargestellt. Die Organe sind zur besseren Orientierung beschriftet, die weißen Pfeile bezeichnen in den jeweiligen Bildern das Pankreasorgan.

Die Tiere auf den *Abbildungen 24 und 25* wurden jeweils 24 Stunden vor Induktion einer akuten experimentellen Pankreatitis mit einer dem CoPP äquivalenten Menge an Trägerlösung [NaCl / NaOH], die Tiere auf den *Abbildungen 26 und 27* mit 5 mg/kg KG CoPP (s. *Methoden 6.1.2.*) vorbehandelt. Zur Induktion der akuten Pankreatitis bekamen die Versuchstiere am Versuchstag stündlich (insgesamt 5-mal) eine intraperitoneale Injektion, welche die supramaximale Konzentration an Caerulein von 50 µg/kg KG enthielt (s. *Methoden 6.3.*).

Abb. 25 Darstellung des OP-Situs eines Tieres ohne CoPP-Präkonditionierung nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis

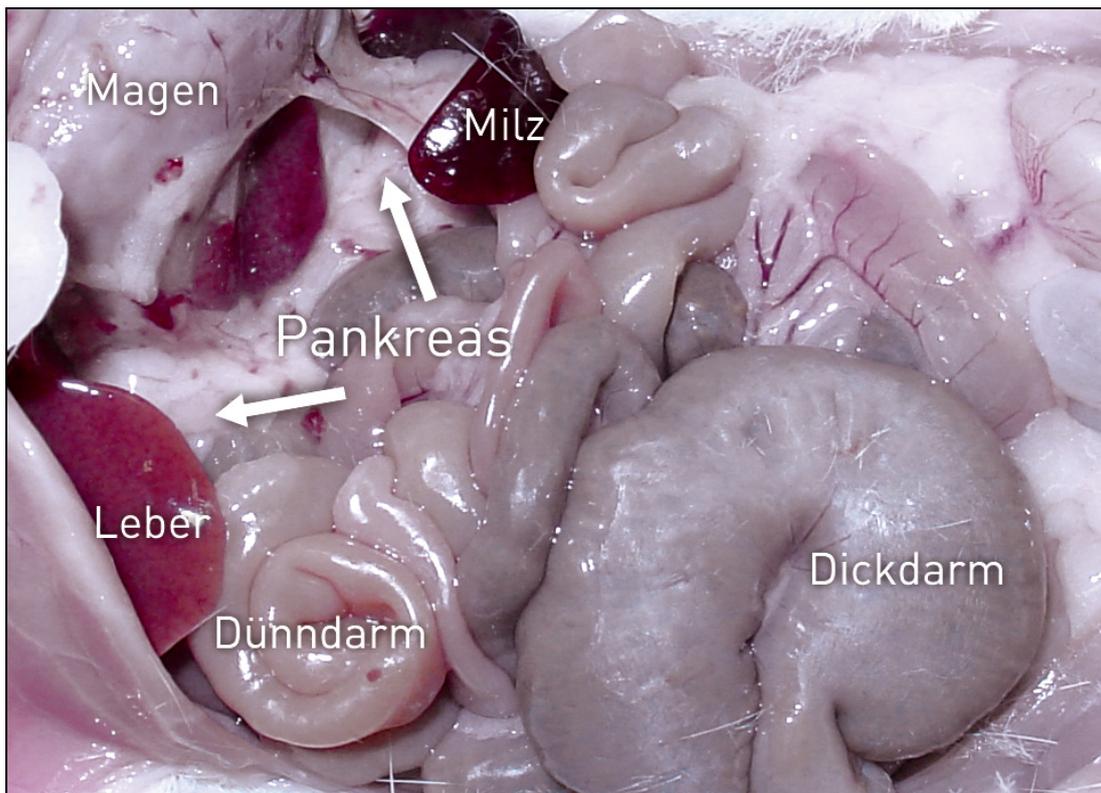


Dargestellt ist ein abdomineller Situs ohne CoPP-Präkonditionierung (24h nach [NaCl] i.p.) und 6h nach Caerulein Gabe. Die weißen Pfeile bezeichnen das stark ödematös veränderte Pankreasgewebe.

Im direkten Vergleich der jeweiligen OP-Situs kann man makroskopisch deutlich die verstärkte Ödembildung bei den Tieren ohne CoPP-Vorbehandlungen sehen (*weiße Pfeile auf Abb. 24 und 25*). Es ist eine stärkere Flüssigkeitsansammlung im Abdomen feststellbar und das Pankreas wirkt größer in seiner Substanz und ödematös aufgequollen.

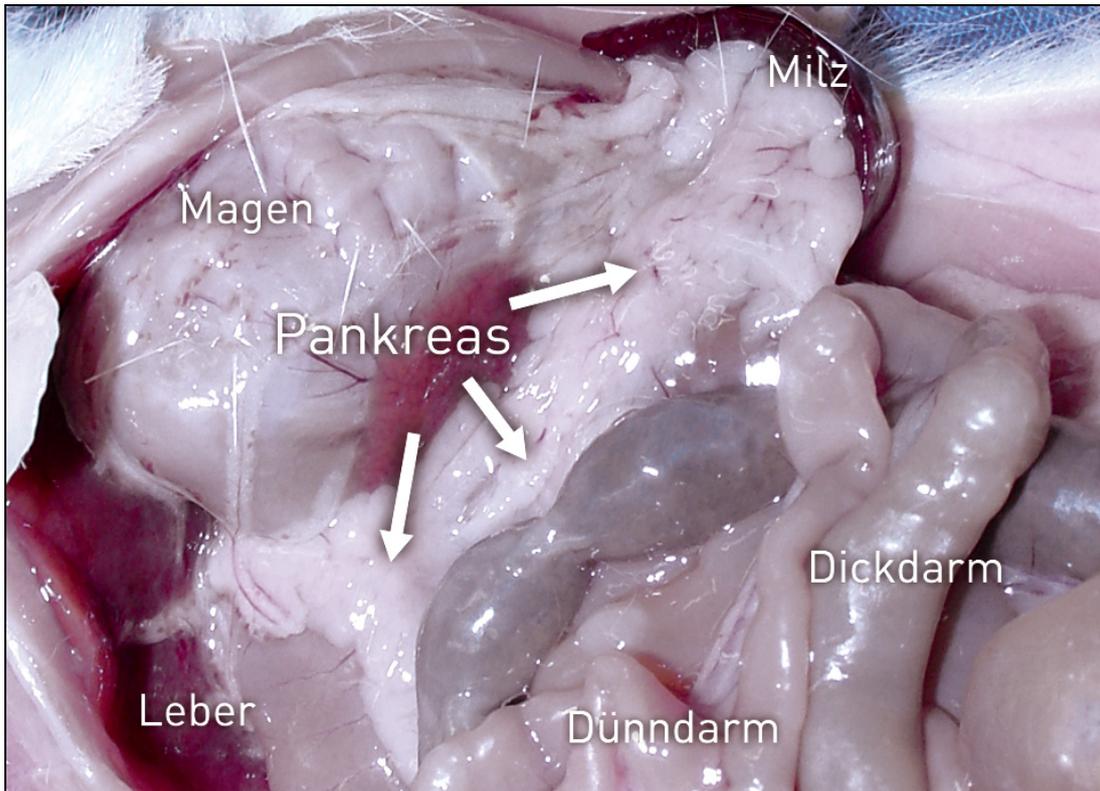
Im Gegensatz dazu erscheint die Ödembildung im Pankreas nach der CoPP-Vorbehandlung in den *Abbildungen 26 und 27*, trotz gleicher Behandlung mit Injektionen derselben Konzentration an Caerulein, makroskopisch nur sehr gering ausgebildet bzw. nicht vorhanden. Es zeigt sich also hier, was das makroskopische Bild betrifft, eine gewisse Protektion gegenüber einer durch Caerulein induzierten Pankreatitis.

Abb. 26 Darstellung eines OP-Situs eines durch CoPP-Präkonditionierung vorbehandelten Tieres nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis



Dargestellt ist ein abdominaler Situs 24h nach intraperitonealer CoPP-Präkonditionierung mit 5 mg/kg CoPP und 6h nach Caerulein Gabe. Die weißen Pfeile bezeichnen hierbei, im Vergleich zu den nicht präkonditionierten Tieren (*vgl. Abb. 24 und 25*), gering verändertes Pankreasgewebe.

Abb. 27 Darstellung eines OP-Situs eines durch CoPP-Präkonditionierung vorbehandelten Tieres nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis



Dargestellt ist ein abdomineller Situs 24h nach intraperitonealer CoPP-Präkonditionierung mit 5 mg/kg CoPP und 6h nach Caerulein Gabe. Die weißen Pfeile bezeichnen hierbei, im Vergleich zu den nicht präkonditionierten Tieren (vgl. Abb. 24 und 25), nur gering verändertes Pankreasgewebe.

Das mikroskopische Bild in den *Abbildungen 28 bis 30* bestätigt die makroskopische Aussage. Auch hier kann man durch die Präkonditionierung eine Verminderung des histologischen Schweregrades im Rahmen der Gewebsveränderungen in der Frühphase der Caerulein-induzierten Pankreatitis erkennen. Im Vergleich des nativen Pankreasgewebes mit den Pankreatitisbildern (vgl. *Abb. 28 mit Abb. 29 und 30*) stellt sich eine deutlichere Gewebsveränderung bei den Tieren ohne Präkonditionierung dar. Die größten Unterschiede zeigen sich dabei am deutlichsten in der Ausprägung des Gewebeödems. Größere Zellschäden lassen sich hierbei in der Frühphase nur vereinzelt ausmachen.

Abb. 28 Darstellung von nativem Pankreasgewebe eines Versuchstieres

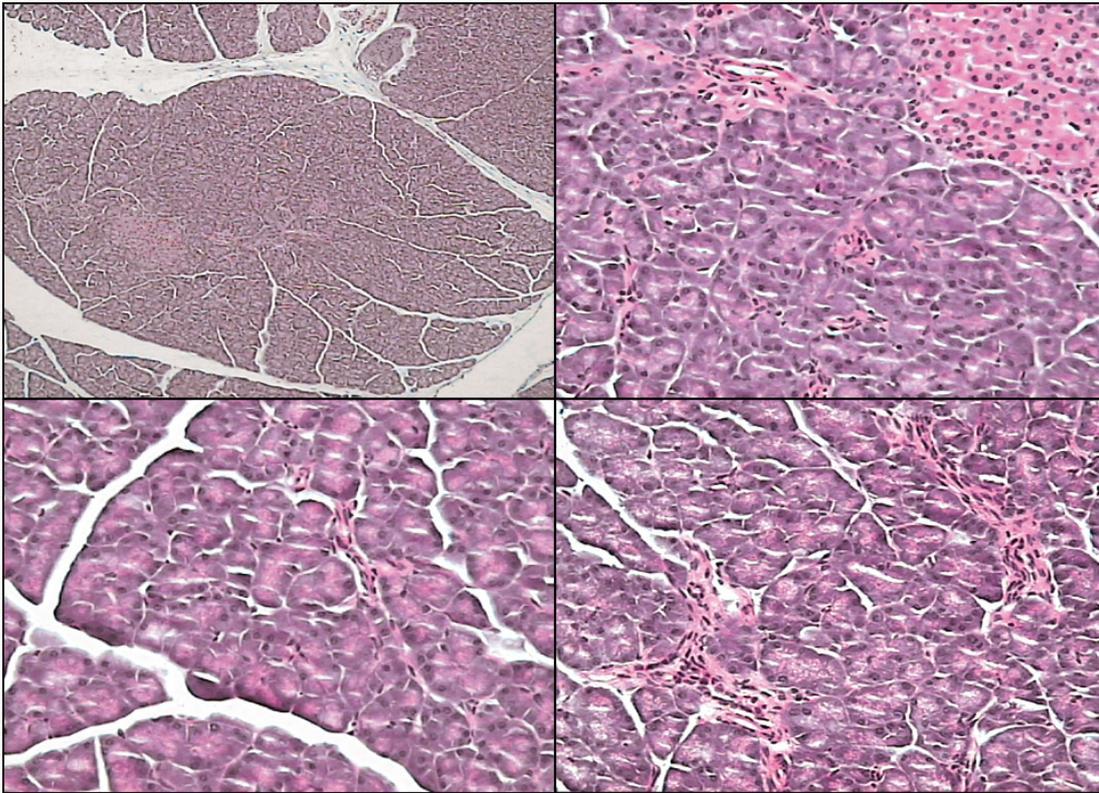


Abb. 29 Darstellung von Pankreasgewebe eines Versuchstieres 6h nach Caerulein-induzierter Pankreatitis

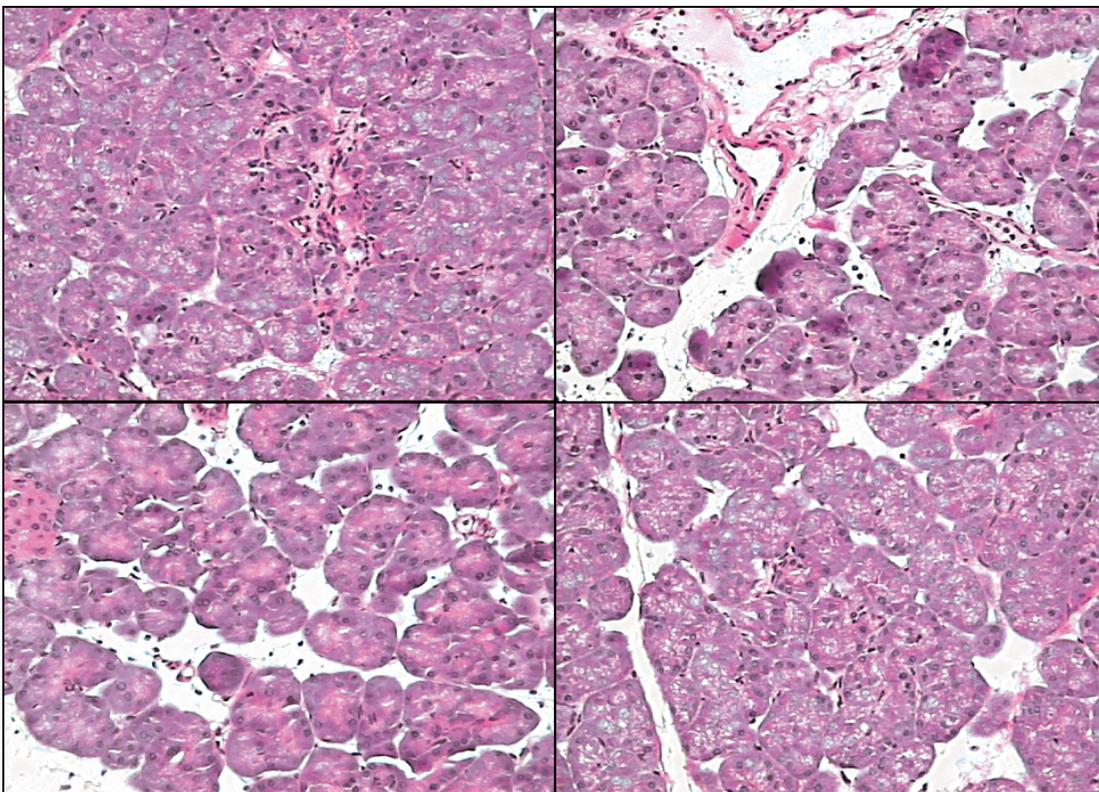
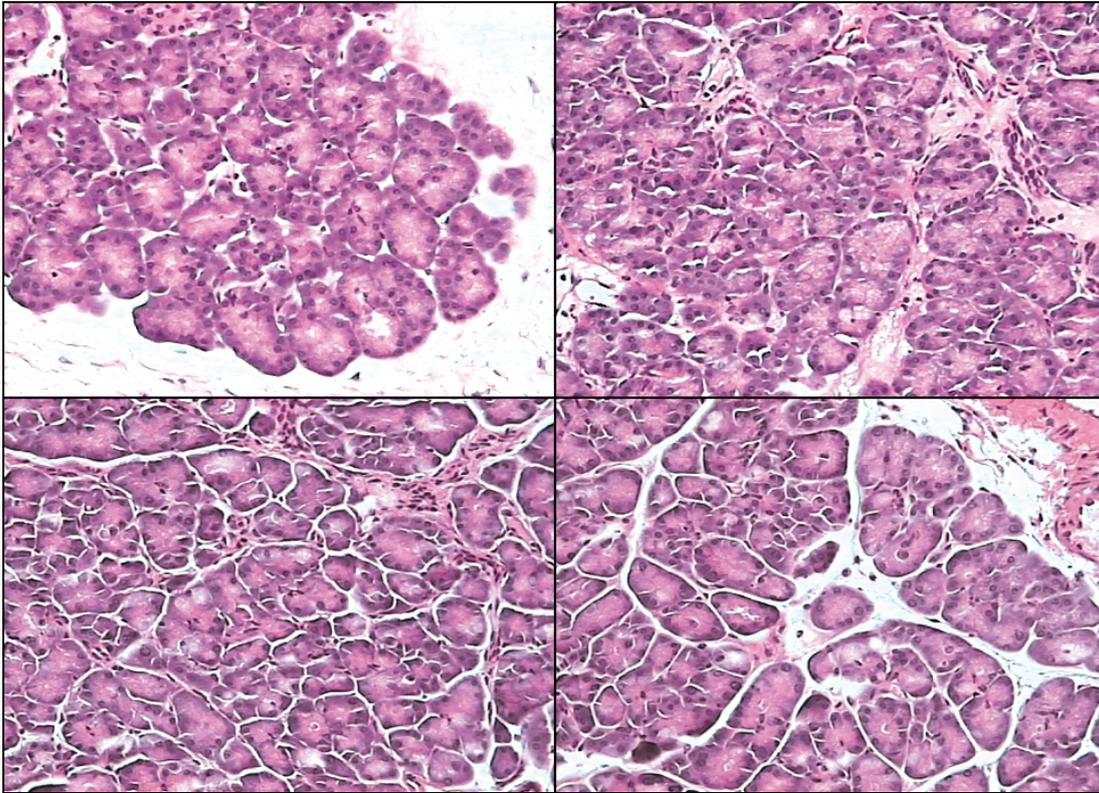


Abb. 30 Darstellung von Pankreasgewebe eines Versuchstieres 6h nach Caerulein-induzierter Pankreatitis und 24h nach CoPP-Präkonditionierung



4. Diskussion

Die Untersuchung der Stressreaktion der Bauchspeicheldrüse bildet die Grundlage der vorliegenden Arbeit, mit dem Ziel die Mechanismen, die zur Entstehung einer akuten Pankreatitis führen, noch besser zu verstehen. Zu den typischen Ursachen, die zu einer akuten Pankreatitis führen, wie z.B. Alkoholabusus, eingeklemmte Gallensteine oder die Einnahme bestimmter Medikamente, kann eine Pankreatitis auch iatrogen ausgelöst werden, wie 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 demnach eine klinische anwendbare Form der Präkonditionierung und damit der induzierbaren Protektion von größtem Nutzen. Präkonditionierung als Möglichkeit einer Organschädigung vorzubeugen, sowie das Ausmaß der Schädigung zu reduzieren, eignet sich dabei selten zur Protektion von spontan erworbenen bzw. auftretenden Erkrankungen. Hingegen ist sie eine durchaus sinnvolle Methode, um z.B. iatrogen verursachte Schädigungen, wie z.B. bei der durch die ERCP induzierten Pankreatitis, zu minimieren [Raeburn et al. 2001, Cleveland et al. 2001].

In vorangegangenen Studien konnte bereits belegt werden, dass eine Präkonditionierung oder Prästimulation durch geeignete Stressoren, wie z.B. die Hyperthermie, geeignet ist, eine akute Pankreatitis, zumindest im Tiermodell, zu verhindern oder wenigstens deutlich abzuschwächen. Es wurde dabei von verschiedenen Arbeitsgruppen der Beweis erbracht, dass diese Methode in Verbindung mit der Induktion und Expression von Hitzeschock- oder Stressproteinen steht und im Pankreas Schutz vor einer akuten Pankreatitis bietet [Wagner et al. 1996, Bhagat et al. 2000 und 2002, Frossard et al. 2002]. Die Induktion von Hitzeschockproteinen, besonders von HSP70 und HSP32, aber auch HSP27, ist an vielen verschiedenen Organsystemen in unterschiedlichen Studien über die Regulations- und Schutzmechanismen an *in vivo* sowie *in vitro* Modellen untersucht worden und nach Präkonditionierung auch protektiv wirksam [Elbirt et al. 1999, Immenschuh und Ramadori 2000, Otterbein und Choi 2000]. Im Pankreas sind insbesondere HSP70 und HSP27 bezüglich Ihrer protektiven Wirkung untersucht und beschrieben worden [Wagner et al. 1996, Bhagat et al. 2000 und 2002, Frossard et al. 2002, Kubisch et al. 2004].

Die Induktion durch einen Stressreiz wie Ischämie oder Hyperthermie ist dabei einer der wichtigen Mechanismen bei der Präkonditionierung [Redaelli et al. 2001,

Frossard et al. 2002, Jaeschke 2003]. Auch bei der Ischämie-Reperfusionsschädigung (IRS) am Herzen konnte eine Hyperthermie-Präkonditionierung die Infarktgröße deutlich verringern [Donnelly et al. 1992, Plumier und Currie 1996] und besaß im Rahmen von Ischämien im Bereich des ZNS ein protektives Potential [Franklin et al. 2005]. Dieses Verfahren der Hyperthermie-Präkonditionierung ist jedoch klinisch schlecht einsetzbar.

In dieser Arbeit wurde die Induktion und Regulation der HSP32/HO-1, einem Vertreter der intrazellulären Stress- bzw. Hitzeschockproteine, unter experimentellen Stressbedingungen, wie der durch Caerulein induzierten, akuten Pankreatitis, untersucht. HO-1 ist, wie auch schon *in Abschnitt 2.5.* beschrieben, durch Häm, wie auch eine Vielzahl anderer Substanzen, wie Schwermetalle, Endotoxine, Hitzeschock, Zytokine oder Prostaglanine induzierbar [Choi und Alam 1996]. Neben der Rolle der Hämdegradation, kann eine Überexpression von HO-1 eine defensive Rolle gegen oxidativen Stress unter Entzündungs- oder Irritationsbedingungen spielen [Nath et al. 1992, Vogt et al. 1995 und 1996] und hat sich in verschiedenen Zelltypen als protektiv gegen oxidativen Stress erwiesen [Wong und Wispe 1997]. Am Herzen ist dieser protektive Effekt bislang am besten beschrieben. So ist der myokardiale Schaden nach IRS bei transgenen Mäusen, die menschliches HO-1-Gen erhalten haben, verringert. Die Induktion des Enzyms durch exogenes Häm reduziert die Infarktgröße [Yet et al. 2002].

Um einen begründeten Effekt nun einem einzelnen HSP, wie HSP32/HO-1 zuzuschreiben, kann man dieses entweder durch Überexpression, wie in dieser Arbeit durchgeführt, oder durch Hemmung [Amersi et al. 1999] beeinflussen. Die HO-1 lässt sich im Unterschied zu anderen Hitzeschockproteinen, biochemisch mit verschiedenen Porphyrinen entweder hemmen (Zink-Protoporphyrin (ZnPP), Zinn-Protoporphyrin (SnPP)) [Labbe et al. 1999], oder wie in *Abschnitt 2.5.3.* dargestellt, durch Kobalt-Protoporphyrin (CoPP) aktivieren. So konnte zum Beispiel in Vorarbeiten gezeigt werden, dass die IRS (Ischämie-Reperfusionsschäden) von transplantierten Lebern im Modell von übergewichtigen Zucker Ratten (genetically fat Zucker rats) durch Induktion der HO-1 mit Kobalt-Protoporphyrin reduziert und durch Hemmung der HO-1 mit Zink-Protoporphyrin verstärkt werden kann [Lee et al. 1996, Amersi et al. 1999]. In diesen Studien wurde dabei eine konstitutive HO-1 Expression in Leberzellen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte in unserem Versuchsaufbau keine konstitutive HSP32-Expression im Pankreasgewebe

nachgewiesen werden (s. *Abb. 12*). Auch andere Studien zeigen keine bzw. nur eine sehr geringe konstitutive Expression im Pankreasgewebe [Sato et al. 1997, Fu et al. 1997]. Deshalb lag der Fokus der vorliegenden Arbeit entsprechend auf der Induktion und Expression von HSP32/HO-1 mit CoPP und nicht auf der Suppression mit SnPP oder ZnPP.

Es wurden dazu Möglichkeiten der pharmakologischen Induktion des HSP32/HO-1 untersucht und angewandt. Kobalt gehört, wie in der Literatur beschrieben, zu den potenten Induktoren der HO-1 [Maines 1988]. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern HSP32/HO-1 im Pankreas exprimiert wird und durch Kobalt-Protoporphyrin (CoPP) induzierbar ist. CoPP induzierte dabei den Anstieg der HO-1 Proteinexpression im Pankreasgewebe analog anderer Studien, in denen bei *in vivo* Experimenten mit Mäusen, durch CoPP-Injektion, ein Anstieg der HO-1 Proteinexpression nach 24h in der Milz, der Leber und der Niere nachgewiesen werden konnte [Woo et al. 1998, Amersi et al. 1999]. Eine Theorie besagt, dass CoPP über die Verschiebung des oxidativen Gleichgewichtes durch Reduktion der intrazellulären GSH Konzentration mit konsekutivem Anstieg der freien Peroxidkonzentration die HO-1 mRNA Expression induziert [Dennerly 2000].

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich 24 Stunden nach intraperitonealer Gabe von 5 mg CoPP eine deutliche Proteinexpression unter anderem in Pankreas, Leber und Herz (s. *Abb. 12*). Die Induktion und Expression konnte im weiteren Verlauf dosisabhängig gesteigert werden, mit maximaler Expression bei ca. 20 mg/kg CoPP i.p. (s. *Abb. 13*), so dass man von einer Dosisabhängigkeit (Dose Response) sprechen kann. Einen ähnlichen Effekt konnte auch Sato et al [Sato et al. 1997] in Pankreas β TC3-Zellen nachweisen, indem er diese mit verschiedenen Stressoren wie CdCl_2 , Diethylmaleat (DEM) oder H_2O_2 , welches Sauerstoffradikale freisetzt, in steigender Konzentration inkubierte und eine Zeit- sowie dosisabhängige Steigerung der HO-1-Expression darstellte.

Die Auswirkungen auf die Parameter der experimentellen Pankreatitis zeigten in dieser Arbeit allerdings eher eine biphasische Antwort mit maximalen Effekten bei 5 mg und geringerer Reduktion des Schweregrades bei höheren Dosierungen (vgl. *Abb. 20 bis 22 in Abschnitt 3.2.*). Das Lösungsmittel von CoPP [NaOH], hatte dabei, wie auch [NaCl] als Lösungsmittel von Caerulein, keinen Einfluss auf die HSP32-Expression. Genauso wenig beeinflusste die mechanische Injektion als traumatische Ursache die Proteinexpression.

Im Unterschied zur Hyperthermie-Präkonditionierung stellte sich heraus, dass die Präkonditionierung mit CoPP spezifisch zur Induktion von HSP32/HO-1 führt und in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen (s. *Abschnitt 3.1.2.*) keinen Einfluss auf die Expression von HSP70, HSP25/27 und HSP60 im Pankreasgewebe hat. Die Präkonditionierung mit CoPP erlaubt also in dem in dieser Arbeit angewandten Modell, isoliert die Effekte der Expression von HSP32 auf die Pankreatitis zu beobachten, da eine spezifische pharmakologische Regulation möglich ist. Auch zeigen die gewonnenen Daten, dass die in den Versuchen verwendeten Antikörper sensitiv und spezifisch sind.

Vergleicht man dagegen die vorher beschriebene Methode der Hyperthermie-Präkonditionierung als etablierte experimentelle Methode [Wagner et al 1996], mit der Induktion und Expression von HSP32 im Pankreas, zeigt sich zwar ein deutlicher Effekt auf die Expression anderer Hitzschockproteine wie HSP70, HSP60, HSP 90 und HSP25/27 einzeln oder in Kombination, nicht jedoch auf HSP32 im Pankreas. Es zeigte sich dagegen eine Hyperthermie-induzierte Induktion der HSP32-Expression in der Leber (s. *Abb. 10*). Passend zu diesen Daten wurde eine Hyperthermie-induzierte Expression von HSP32 in Leber und Niere auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden. In diesen Organen wird die Hämoxxygenase-1 (HSP32) durch Hyperthermie in den Mechanismus der Präkonditionierung mit einbezogen und induziert [Amersi et al. 1999, Redaelli et al. 2001 und 2002].

Es zeigt sich also, dass die Hyperthermie-Präkonditionierung mehrere HSPs hochregulieren kann und die Untersuchung des Effektes einzelner HSPs problematisch ist, da die Effekte der verschiedenen induzierten HSPs nicht oder nur schwer getrennt werden können.

HSP32/HO-1 kann neben CoPP auch durch andere Agenzien, wie durch oxidativen Stress [Applegate et al. 1991, Tyrrell und Basu-Modak 1994] sowie z.B. durch Caerulein i.p. im Pankreasgewebe induziert werden [Fu et al. 1997]. Es wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass Caerulein auf mRNA Ebene die Expression von HSP32/HO-1 mRNA im Pankreas rasch und koordiniert hochreguliert, dabei konnte aber zuerst der Anstieg von TNF- α und die Infiltration von Makrophagen nachgewiesen werden [Norman et al. 1995]. Das Ausmaß der Proteinbildung stieg in *in vivo* Experimenten mit Mäusen in der Frühphase der akuten, Caerulein-induzierten Pankreatitis (bis 6h) nur sehr gering an [Fu et al. 1997] und führte erst 7-12h nach Caeruleininjektion auch auf Proteinebene zur deutlich nachweisbaren

Expression von HSP32 im Pankreas. Passend zu unseren Beobachtungen haben Sato et al. ergänzend festgestellt, dass HSP32 nur in sehr niedrigen Basisspiegeln im Pankreas *in vivo* und in Azinuszellen *in vitro* exprimiert wird [Sato et al. 1997]. Die Caerulein-induzierte akute Pankreatitis war hier mit einem signifikanten Ansteigen der Expression von pankreatischem HSP32 erst 12-24 Stunden nach den ersten Zeichen von intestinalem Ödem im Pankreas der Versuchstiere (Ratten) verbunden. Der zeitliche Verlauf dieser selektiven Induktion von HO-1 im Pankreas *in vivo* spiegelt wahrscheinlich eine anlagebedingte Reaktion (Antwort) auf die Bildung von reaktiven oxidativen Radikalen in der Frühphase der akuten Pankreatitis wider [Schoenberg et al. 1992 und 1995, Luthen et al. 1995].

In dieser Arbeit wurden auf dieser oben genannten Grundlage die Effekte von Caerulein in einem experimentellen Versuchsaufbau auf die HSP32-Expression untersucht. Hier zeigte sich, dass in diesem System Caerulein innerhalb von 6h (Frühphase) nicht zu einer nachweisbaren Proteinexpression von HSP32/HO-1 im Pankreas führt (s. Abb. 16 und 17). Somit ist das gewählte System der pharmakologischen Präkonditionierung mit CoPP in dieser Arbeit gut geeignet, für die individuelle Analyse der Effekte der Induktion von HSP32/HO-1 auf den Verlauf der Caerulein induzierten Pankreatitis. Dies ist im Unterschied zur Hyperthermie-Präkonditionierung von Vorteil, da durch diese mehrere Hitzeschockproteinklassen (z.B. HSP70, HSP25/27 und HSP60) induziert werden können [Redaelli et al. 2001 und 2002, Jaeschke 2003]. Auch ist in der hier gewählten Methode durch die Caeruleingabe alleine noch keine Expression von HSP32/HO-1 nachweisbar, da die Tiere vor Beginn der ausschließlich durch Caerulein-induzierten Proteinexpression getötet werden.

Wie in der Einleitung schon erläutert, stellt die intrazelluläre Aktivierung von Trypsin ein zentrales Phänomen für die pathophysiologischen Vorgänge in der Frühphase der akuten Pankreatitis dar. 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 intrazellulär stattfindende Aktivierung von Verdauungsenzymen dabei eine entscheidende Rolle spielt [Saluja et al. 1999, Whitcomb et al. 1999, Bhagat et al. 2000]. 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 [Leach et al. 1991, Saluja et al. 1999, Whitcomb et al. 1999]. Auf diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der protektive Effekt auf die akute Pankreatitis durch eine vorangegangene CoPP-Präkonditionierung und die damit verbundene Expression von HSP32/HO-1 in einer Änderung dieser initial in der Zelle ablaufenden schädlichen Trypsinogenaktivierung liegt [Witt et al. 2001]. Dafür wurde ein Modell gewählt, mit dem es möglich war, die intrazelluläre Aktivität von Trypsin und die Sekretion darzustellen und zu quantifizieren (s. *Abschnitt 3.2.1. und Methoden 6.5.3*).

Betrachtet man die Auswirkung der CoPP-Präkonditionierung auf die Trypsinaktivierung in dieser Arbeit (s. *Abb. 20*), so zeigt sich eine direkte Inhibierung der frühzeitigen und intrazellulären Aktivierung von Trypsin nach Gabe supramaximaler Caerulein-Konzentrationen, mit ähnlichen Phänomenen, wie denen der in der Literatur beschriebenen Versuchen mit HSP27 [Schäfer et al. 2000, Kubisch et al. 2004]. Auch Bhagat et al. konnten zeigen, dass eine Protektion in Zusammenhang mit einer Reduktion der Trypsinogenaktivierung steht [Bhagat et al. 2000]. Im Pankreashomogenat, welches von präkonditionierten Tieren gewonnen wurde, konnte eine schwächere Aktivierung des intrazellulären Trypsins beobachtet werden, als dies bei den Zellen der Fall war, welche von Ratten isoliert wurden, die nicht zuvor präkonditioniert waren. Zusammen mit der ebenfalls in dieser Arbeit beobachteten starken Expression von HSP32 kann dies als Indiz dafür gewertet werden, dass der Mechanismus der Protektion gegen die Entstehung einer Pankreatitis in der verringerten Aktivierung des intrazellulären Trypsins zu sehen ist.

Der Mechanismus durch den HSP32 dabei in die Caerulein-induzierte intrazelluläre Trypsinaktivierung eingreift, bleibt dabei allerdings weiter unklar. Viele Arbeitsgruppen nehmen an, dass der Prozess der intrazellulären Trypsinaktivierung durch eine Colokalisation von Trypsinogen und anderen Zymogenen mit lysosomalen Hydrolasen insbesondere Cathepsin B in instabilen intrazellulären Organellen hervorgerufen wird [Gorelick et al. 1992, Saluja et al. 1997]. Experimente an Cathepsin B *-/-* knock-out Mäusen zeigten, dass die Caerulein induzierte, intrazelluläre Trypsinaktivierung bei diesen Mäusen um bis zu 90% reduziert gegenüber Wildtypmäusen, aber nicht gänzlich verschwunden ist [Saluja et al. 1997].

Im Folgenden wurden dann in weiteren experimentellen Gruppen die Entwicklung typischer Pankreatitisparameter, wie die Amylase und Lipase im Serum untersucht. Dabei wurden unbehandelte Kontrolltiere, mit Tieren, welche lediglich 5-malig Caerulein i.p. erhielten und Tieren die 24h vor Caeruleingabe mit 5 oder 10 mg/kg CoPP i.p. prästimuliert worden waren, verglichen. Hier zeigte sich bei den spezifischen Pankreasenzymen nach Induktion einer Pankreatitis ein deutlicher Anstieg der Enzymaktivität, wobei sich für die Präkonditionierung bezüglich der biochemischen Parameter der Pankreatitis eine Verringerung des Schweregrades der Caerulein-induzierten Pankreatitis dokumentieren lässt. Dies gilt insbesondere für die Verringerung der intrapancreatischen Serum-Lipase. Auch Kubisch et al. konnten mit einer Caerulein-induzierten Pankreatitis einen deutlichen Lipase- und Amylaseanstieg nachweisen [Kubisch et al. 2004].

Die Aktivität von Lipase (s. Abb. 21) und Amylase (s. Abb. 22) im Serum ist im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich um ein vielfaches erhöht, was in den durchgeführten Versuchen die Qualität der Ausprägung der akuten Pankreatitis in der Frühphase sehr gut beschreibt. Auch lässt sich anhand der gemessenen Parameter die Auswirkung einer Präkonditionierung der Versuchstiere darstellen. Man kann hierbei den Einfluss und die teilweise deutliche Reduktion der Pankreatitisparameter im Vergleich zu Tieren, die keine CoPP-Präkonditionierung erhalten haben, beobachten. Damit zeigt sich, dass die Präkonditionierung mit CoPP auch hier eine Milderung der akuten Pankreatitis bewirken kann. Im Vergleich der für die Pankreatitis spezifischen Parameter zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe zeigt sich eine deutliche Reduktion des Parameters Lipase ($p < 0,01$) mit dem Unterschied zur Amylase, deren Serumspiegel nach wie vor sehr hoch waren und sich nicht signifikant veränderten ($p > 0,05$), wobei jeweils der größere Effekt bei beiden Enzyme durch die Präkonditionierung mit 10 mg/kg CoPP zu verzeichnen ist. Dabei stellt sich hier deutlich eine fehlende Korrelation zwischen Schweregrad und Enzymwerten dar. Diese fehlende Korrelation zwischen der Höhe der Serum-Amylase und -Lipase findet sich analog auch im klinischen Alltag bei Patienten mit akuter Pankreatitis. Im Unterschied zur Präkonditionierung mit CoPP zeigt sich nach Induktion von HSP27 eine deutliche Reduktion der Aktivität beider Enzyme [Schäfer und Williams 2000, Kubisch et al. 2004].

Eine Steigerung der CoPP-Dosis führte zwar zu einer stärkeren HSP32-Expression (Dose response), was aber im Falle der Enzymaktivität die Wirkung jedoch nur für

die Lipaseaktivität verstärken konnte. Die eigentliche Verabreichung bzw. manuelle Injektion als traumatisches Ereignis, scheint auch hier, wie zuvor im Rahmen der Proteinexpression schon beschrieben, keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter zu haben.

Unter den etablierten experimentellen Bedingungen wurde ebenfalls untersucht, inwiefern die Präkonditionierung mit CoPP zu einer morphologischen Beeinflussung während einer Pankreatitis führt. Es zeigte sich im direkten Vergleich der jeweiligen präparierten Situs makroskopisch und mikroskopisch deutlich bei den nicht präkonditionierten Tieren eine verstärkte Gewebeödembildung im Pankreas (s. *Abb. 24 bis 27*), was für eine stärker ausgeprägte Pankreatitis in der Frühphase sprechen könnte. Dieses lässt sich auch durch die graphische Darstellung des relativen Wassergehaltes bekräftigen (s. *Abb. 23*). Die präkonditionierten Tiere zeigten sowohl makroskopisch, als auch wiederum in der graphischen Darstellung einen reduzierten Wassergehalt. Der stärkste Effekt zeigte sich hier bei 5 mg/kg CoPP, ließ sich aber nicht durch steigende CoPP-Gabe verstärken. Es gibt also Anzeichen einer der HO-1 zugerechneten Protektion (protektive Effekte), welche aber nicht mit steigender Expression korreliert, d.h. es gibt hier wohl ein Induktionsoptimum, wobei bei weiterer Steigerung höchstwahrscheinlich toxische Effekte von CoPP zum Tragen kommen. Auch wurden von Dennery zelltoxische Effekte durch eine starke Induktion mit CoPP beschrieben [Dennery 2000].

Der genaue Mechanismus der Protektion durch HSP32 im Pankreas ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. HSP32 kann die Kernbindung von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren reduzieren [Uchinami et al. 2002] und die antioxidative Kapazität der Zellen steigern [Bauer und Bauer 2002]. Beide Effekte können dadurch eine mildere inflammatorische Antwort bewirken [Arai et al. 2001]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoffmonoxid (CO), ein Nebenprodukt der HO-1 Aktivität, die p38 MAP-Kinase als Schlüsselmechanismus der CO-vermittelten Protektion gegen eine IRS aktiviert [Amersi et al. 2002, Katori et al. 2002]. Auch antagonisiert HO-1 durch das als Radikalfänger wirksame Biliverdin und Bilirubin sowohl den von freien Radikalen hervorgerufenen Zellschaden, als auch die Leukozytenadhäsionen [Hayashi et al. 1999].

Noch ist nicht eindeutig geklärt, ob die durch Präkonditionierung hervorgerufene Protektion wirklich durch HSPs vermittelt wird, da die Präkonditionierung auch noch andere Effekte haben kann, an denen HSPs nicht beteiligt sind. Sie könnten mit der

Protektion assoziiert sein, ohne diese zu vermitteln [Bhagat et al. 2002]. Ebenso kann Stress, welcher die HSP-Expression induziert, auch nicht-HSP-spezifische Effekte haben, bzw. mehrere HSPs induzieren und somit eine Kombination von diesen darstellen [Schäfer et al. 2005]. Aufgrund des jedoch engen zeitlichen Verhältnisses zwischen der Induktion und beobachteter Protektion, ist anzunehmen, dass die HSPs eine zentrale Rolle für die protektive Wirkung der Präkonditionierung spielen. Es wurde von Kubisch et al. mit Hilfe der Generierung einer transgenen Mauslinie, die HSP27 im Pankreas überexprimiert, gezeigt, dass eine einzelnes HSP Schutz vor Caerulein-induzierter Pankreatitis bilden kann. Diese Überexpression führt zu erhöhter Widerstandsfähigkeit gegenüber Hitze oder anderen Stressfaktoren in einer Reihe von Zelllinien [Schäfer et al. 1999, Schäfer und Williams 2000, Kubisch et al. 2004]. HSP27 stellt ein Phosphoprotein dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation und Stabilisierung des Zytoskeletts, insbesondere des F-Aktins, wobei eine HSP27 Überexpression zu einer Stabilisierung der Aktin-Mikrofilamente [Schäfer et al. 1999, Kubisch et al. 2004] und zu einer Verbesserung der Proteinfaltung in der Zelle führt [Ethrige et al. 2000]. Damit wird eine vermehrte Toleranz des Zytoskeletts gegenüber Stress erreicht, da hohe Dosierungen von CCK oder Caerulein zu negativen Veränderungen des Aktinzytoskellets führen und damit zu einer Unterbindung der Exozytose von Zymogengranula aus den Azinuszellen in die Pankreasgänge. Die Überexpression von HSP27 bewirkt dabei eine Stabilisierung der Aktin-Mikrofilamente und inhibiert damit die negativen Folgen von unphysiologisch hohen Konzentrationen von Caerulein.

Weitere Studien haben bewiesen, dass eine Inhibition, bzw. Blockierung von HSPs auch zum Auslöchen der Protektion führen kann und somit die Voraussetzung der durch HSP vermittelten „Stresstoleranz“ eine verstärkte Aktivität oder Expression ist [Bhagat et al. 2002, Frossard et al. 2002]. 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 des Schweregrades der akuten experimentellen Pankreatitis aufzeigen. Es 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].

Es gilt also, dass der verstärkte Einfluss der HSPs auf die Zelle zu einer verbesserten Dissaggregation von stressbedingt denaturierten Proteinen und zu einer vermehrten Stabilisierung, bzw. Reparatur von zellulären Strukturen, wie Mikrofilamenten und Zentromeren, sowie von zellulären Prozessen, wie Transkription, Splicing und Translation während eines zweiten Stresses führt [De Maio 1999]. HSPs reduzieren außerdem die Bindung von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren im Zellkern und erhöhen die antioxidative Kapazität der Zellen [Jaeschke 2003].

Insgesamt ist die durchgeführte Prästimulation mit CoPP eine weitere Methode zur Protektion durch Hitzeschockproteine ähnlich der zuvor schon beschriebenen Hyperthermiebehandlung [Wagner et al. 1996, Frossard et al. 1999 und 2002, Bhagat et al. 2000 und 2002]. Nach einer Hyperthermiebehandlung konnten sowohl im Pankreasgewebe, als auch in den Azinuszellen eine Reihe von HSPs nachgewiesen werden, wobei im Gegensatz zu HSP32 der Effekt der Hyperthermie auf die Expression von HSP70 besonders ausgeprägt ist. Da HSP70 unter normalen Bedingungen nicht exprimiert wird und erst durch ein einwirkendes Stressereignis gebildet wird, könnte man HSP70 den hauptsächlich protektiven Effekt zuschreiben, wobei HSP70, im Gegensatz z.B. zu HSP25/27, HSP32 oder HSP60 im Pankreas das einzig nur unter Stressbedingungen exprimierte HSP zu sein scheint [Wagner et al. 1996]. Das zytoprotektive Potential von HSP32 und HSP70 wird durch die Hochregulation eines weiteren Hitzeschockproteins (HSP25/27) unterstützt [Schäfer et al. 1999]. Ähnlich wie bei anderen Hitzeschockproteinen, wird die Expression des schon genuin (konstitutiv) vorliegenden HSP25/27 durch Stress und Hyperthermie reguliert und durch letztere stark exprimiert. Somit könnte ein Synergismus von HSP70 und HSP27 für das zytoprotektive Potential vorliegen [Schäfer et al. 1999, Schäfer und Williams 2000, Kubisch et al. 2004] und somit scheint neben HSP32 und HSP70 auch HSP27 ein protektives Potential gegenüber Stressereignissen im Rahmen der akuten Pankreatitis aufzuweisen.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass der Überexpression des „Stressproteins“ und Antioxidans HSP32/HO-1 im Pankreasgewebe, während einer akuten Pankreatitis, wohl eine Bedeutung als protektives Agens bei der experimentellen akuten Pankreatitis zuzukommen scheint. Es wurde auf dem Hintergrund der in der Einleitung beschriebenen Mechanismen gezeigt, dass dieses Enzymsystem eine protektive Rolle in Pankreaszellen durch eine pharmakologische Prästimulation, d.h. Aktivierung vor Einsetzen der Schädigung, spielen kann. Das Ausmaß der HO-1 Induktion durch oxidativen Stress und die weite Streuung des Enzyms in verschiedenen Geweben, verbunden mit den biologischen Aktivitäten der katalytischen Beiprodukte, CO, Eisen und Bilirubin, legen nahe, dass die HO-1 Induktion ein Teil der generellen Antwort auf oxidativen Stress ist und dass dieses Enzym eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase spielt.

Das antioxidative Potential von HO-1 mildert den Zellschaden und erhöht die Widerstandsfähigkeit gegen oxidative Beschädigung. Es zeigt sich aus den gewonnenen Beobachtungen, dass eine CoPP-Präkonditionierung ein potentes Präkonditionierungsmodell, auch wegen der spezifisch pharmakologisch kontrollierbaren Induktion, für die akute experimentelle Pankreatitis darstellt und dass es durchaus einen Zusammenhang zwischen diesem und der dadurch hervorgerufenen verstärkten Expression von Hitzeschockproteinen und der Protektion des Pankreas gibt.

6. Methoden

6.1. Präkonditionierungen

6.1.1. Präkonditionierung durch Hyperthermie

Für die Hyperthermiebehandlung wurden die Versuchstiere narkotisiert. Für die Einleitung der Anästhesie wurden die Sprague-Dawley Ratten in einem Glas-Exsikkator mit 4% Isofluran (Forene[®]) in Sauerstoff über einen Isofluran Vaporisator narkotisiert. Die eigentliche Narkose erfolgte unter Einsatz von Xylazin (Rompun[®] 2%) in einer Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht und Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®] 10%) in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht. Die Verabreichung des Narkotikums erfolgte intraperitoneal [Ploessl et al. 2004].

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 etwa fünf Minuten erfolgte die intraperitoneale Verabreichung von 1 ml isotonischer Kochsalzlösung über einen Butterfly, um das Dehydrieren der Tiere zu vermeiden.

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

24 Stunden nach der Hyperthermiebehandlung erfolgte die Entnahme des Pankreas wie nachfolgend unter *Methoden* 6.2. beschrieben [Wagner et al. 1996].

6.1.2. Präkonditionierung durch CoPP

Für die Anästhesie wurden die Ratten in einem Glasexsikkator mit 4% Isofluran in Sauerstoff über einen Isofluran Vaporisator betäubt.

Die Metalloporphyrine wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Amersi et al. und Sato K et al. zur intraperitonealen Injektion gelöst und aliquotiert [Amersi et al. 1999, Sato K et al. 2001].

Das in 0,2 M [NaOH] aliquotierte Metalloporphyrin (5 mg/ml) wurde lichtgeschützt bei -80°C gelagert und zur intraperitonealen Gabe aufgetaut und mit 0,9% [NaCl] auf 1 mg/ml bzw. 2,5 mg/ml verdünnt. Die intraperitoneale Gabe des Cobaltprotoporphyrins beziehungsweise des Trägergemisches [NaOH/NaCl] in einer

Kontrollgruppe, erfolgte 24 Stunden vor der Induktion einer akuten experimentiellen Pankreatitis (s. *Methoden 6.3.*) und der darauf folgenden Pankreas- und Serumentnahme (s. *Methoden 6.2.*). Die Bolusinjektion erfolgte mit verschiedenen Mengenzusammensetzungen. Für die Kontrollgruppen bestand die Injektionszusammensetzung nur aus der Verdünnung des CoPP [NaCl], bzw. dem Trägergemisch [NaOH], um den jeweiligen Einfluss desselben zu dokumentieren. CoPP selbst wurde in aufsteigenden Konzentrationen, alle im rechten oberen Quadranten des Bauches, injiziert. Genauere Einzelheiten sind in *Tabelle 6* zusammengefasst.

Tabelle 6 *Verwendete Reagenzien in einzelnen Versuchsgruppen*

| Versuchstiere | 0,9% NaCl | NaOH | CoPP |
|------------------|-----------|-------|-------------|
| Kontrollgruppe 1 | ∅ | ∅ | ∅ |
| Kontrollgruppe 2 | mg/kg KG | ∅ | ∅ |
| Kontrollgruppe 3 | mg/kg KG | 0,2 M | ∅ |
| Versuchsgruppe 1 | mg/kg KG | 0,2 M | 5 mg/kg KG |
| Versuchsgruppe 2 | mg/kg KG | 0,2 M | 10 mg/kg KG |
| Versuchsgruppe 3 | mg/kg KG | 0,2 M | 20 mg/kg KG |

6.2. Organentnahme des Pankreas zur Analyse der Proteinexpression

Für die Probengewinnung wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 150-250 g verwendet und in einem Glas-Exsikkator mit Isofluran für 1,5 min betäubt und anschließend durch Dekapitation getötet und ausgeblutet. Das Blut wurde für die Enzymassay's (s. *Methoden 6.5.1. und 6.5.2.*) aufgefangen und gekühlt (4°C) bei 14000 rpm 15 min zentrifugiert. Das Blutserum wurde abpipettiert und auf Eis gelagert, das Pelett verworfen. Anschließend erfolgte ein Bauchschnitt, der Bauchraum wurde geöffnet und das Pankreas dargestellt. Es folgte ein Foto des Organs *in situ*, die zügige Entnahme des Pankreas und das Überführen in eine Schale mit gekühlter, physiologischer Kochsalzlösung 0,9% [NaCl]. Nach erneutem Fotografieren erfolgten die Entfernung von Fettgewebe und Lymphknoten, das Zerteilen in mehrere Stücke für verschiedene Proben, sowie die Entnahme von anderen Organen (Leber, Niere, Herz).

6.3. Induktion einer akuten experimentellen Pankreatitis

Zur Induktion einer experimentellen akuten Pankreatitis wurden die Tiere über Nacht nüchtern gelassen. Die Versuchstiere bekamen am Versuchstag stündlich eine intraperitoneale Injektion, welche die supramaximale Konzentration an Caerulein von 50 µg/kg KG enthielt. Caerulein, ein Decapeptid und Cholezystokinin Analogon, verursacht bei supraphysiologischen Konzentrationen eine akute Pankreatitis in Ratten [Lampel und Kern 1977]. Über einen Zeitraum von 5 Stunden wurde stündlich ein Bolus nach Kurznarkose (4% Isofluran (Forene®) und Sauerstoff) in das linke untere Abdomen injiziert, um eine sekretagog induzierte Pankreatitis auszulösen.

Für die Herstellung einer Caerulein-Stock-Lösung von 1 mg/ml wurde lyophilisiertes Caerulein in der entsprechenden Menge 0,9% [NaCl] gelöst, in Portionen aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt. Für die Injektion wurde eine entsprechende Menge an Caerulein mit einer Konzentration 50 µg/ml durch Verdünnung mit 0,9% [NaCl] hergestellt.

In der Versuchsgruppe erfolgte die Gabe von Caerulein 24 Stunden nach der CoPP-Präkonditionierung. In jeder Versuchsgruppe wurden bei Kontrolltieren als Negativkontrolle eine vergleichbare isotonische Kochsalzlösung verwendet und i.p. injiziert.

Eine Stunde nach der letzten erfolgten Caerulein- bzw. 0,9% [NaCl]-Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und dabei das Blut aufgefangen und bei 4°C und 14000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Serum wurde zur Bestimmung pankreasspezifischer Enzyme verwendet.

Die Pankreata wurden entnommen (s. *Methoden 6.2.*) und es folgte eine Gewichtbestimmung des Organs und die Bestimmung des Pankreasödems (s. *Methoden 6.4.*).

Das Pankreas wurde in physiologischer Kochsalzlösung auf Eis in mehrere Stücke geteilt, zum Teil sofort in flüssigem Stickstoff [N₂] schockgefroren und bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80°C aufbewahrt oder sofort zur Probenerstellung verwendet.

Es folgte eine Fixation in Formalin für histologische Schnitte, eine Aufnahme in 500 µl Homo-Puffer (s. *Materialien 7.1.8.*) für die SDS-Probenaufbereitung und eine

Aufnahme von 0,05 g Gewebe in 1000 µl MOPS-Puffer (s. *Materialien 7.1.7.*) zur Trypsinbestimmung.

6.4. Pankreasödem

Für die Bestimmung des Pankreasödems wurde ein Stück Pankreasgewebe kurz auf Filterpapier zum Abtrocknen gelegt, in ein zuvor ausgewogenes Reaktionsgefäß gegeben, gewogen und anschließend bei 90°C für 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.

6.5. Enzymaktivitätsmessungen

6.5.1. Enzymaktivitätsmessung von Amylase

Die α -Amylaseaktivität im Blutserum der Versuchstiere wurde mit dem Phadebas[®] Amylase Test nach Herstellerangaben [Arbeitsanweisung, Phadebas Amylase Test, 1994, Pharmacia AB, Uppsala, Schweden] gemessen. Dieser ist ein Verfahren, das sich zur schnellen und einfachen Aktivitätsbestimmung in einer Serumprobe eignet.

Er basiert auf der Verwendung von Stärke als Substrat, an die kovalent blaue Farbstoffmoleküle gebunden sind. Das Substrat selbst ist aufgrund seiner Quervernetzung in Wasser schwer löslich. Die Amylase spaltet das Substrat in kleinere, in Wasser lösliche Fragmente. Die Konzentration an farbigen Fragmenten und somit die Absorption der überstehenden Lösung, welche im Photometer durch Extinktionsmessung bei 620 nm bestimmt wurde, steht in direktem Zusammenhang mit der Amylaseaktivität, welche so, ausgehend von einer Kalibrierungsreihe, abgeschätzt werden kann.

Zur Durchführung wurde eine Phadebas[®]-Tablette in 14 ml Amylase-Puffer unter ständigem Rühren gelöst. Zu 10 µl einer Serumprobe der Versuchstiere bzw. 10 µl Aqua dest. als Nullabgleichprobe, werden 1020 µl oben genannter Reagenz gegeben, mit dem Vortex-Mixer gemischt und danach bei 37°C inkubiert.

Nach 10 min Inkubation wird die Reaktion durch die Zugabe von 300 µl Stopplösung 0,5 M [NaOH] (4°C) gestoppt. Jedes Tube wird mit 4 ml Aqua dest. verdünnt und erneut im Vortex-Mixer gemischt.

Nach der Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm werden 1000 µl des Überstands in eine Küvette vorsichtig abpipettiert und die Absorption am UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gegen den Nullabgleich (Blindwert) gemessen. Die Aktivität bzw. die Aktivitätskonzentration kann aus der vorgegebenen Kalibrierkurve abgelesen werden [Arbeitsanweisung, Phadebas Amylase Test, 1994].

6.5.2. Enzymaktivitätsmessung von Lipase

Die Messung der Lipasekonzentration (Aktivität) erfolgt mit dem Lipase-Kit (LIP) der Firma Roche Diagnostics nach Herstellerangaben. Das Lipase Kit beruht auf einem enzymatischen *in vitro* Test zur quantitativen Bestimmung von Lipase im Blutserum der *in vivo* Versuche.

Lipasen sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 47000 Dalton. Sie sind definiert als Triglycerid-Hydrolasen, die die Spaltung von Triglyceriden zu Diglyceriden mit nachfolgender Bildung von Monoglyceriden und Fettsäuren katalysieren. Die Pankreaslipase gehört neben der α -Amylase seit langem zu den differentialdiagnostisch wertvollsten klinisch-chemischen Parametern bei Pankreaserkrankungen.

Tabelle 7 Reagenzien des enzymatischen Farbtests (nach Roche)

| | | | |
|------------------|--------|--------------|--------|
| Reagenz 1 | Puffer | Colipase | Cholat |
| Reagenz 2 | Puffer | Farbsubstrat | Cholat |

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

Die Methode nach Roche beruht auf der Spaltung eines mit Gallensäuren emulgierten spezifischen Lipasefarbsubstrats, dem 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methyl-resorufin)-ester. Mit der eingesetzten Kombination aus Gallensäuren und Colipase wird das Pankreasenzym spezifisch erfasst. Bei Abwesenheit von Colipase wird praktisch keine Lipaseaktivität nachgewiesen. Die Colipase aktiviert nur die Pankreaslipase, nicht andere im Serum vorkommende lipolytische Enzyme. Durch den hohen Anteil an Cholaten ist sichergestellt, dass im Serum vorkommende Esterasen aufgrund der hohen Grenzflächenladung nicht mit dem Farbsubstrat reagieren können. Das Testprinzip beruht auf einem enzymatischen Farbttest.

Abb. 31 Reaktion des Lipase-Farbtests

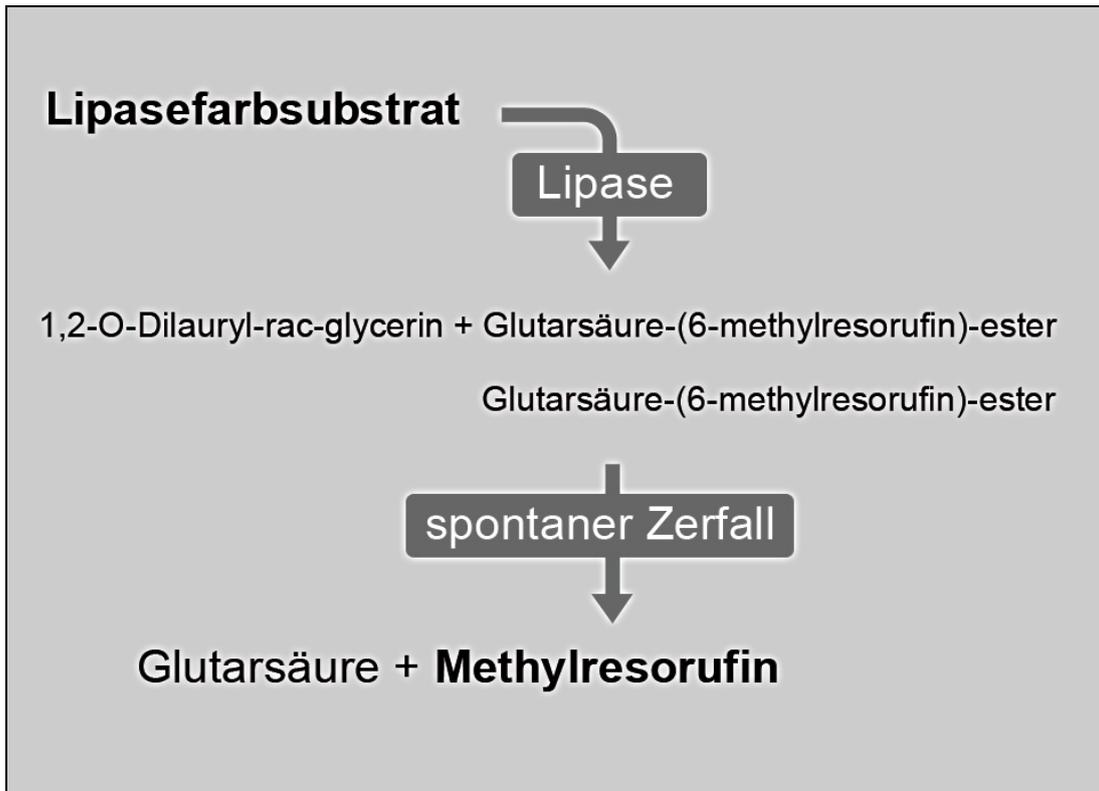


Abb. 32 Berechnung der Lipaseaktivität

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

V_G \rightarrow Gesamtvolumen (in μl): **1610 μl**

V_P \rightarrow Probenvolumen (in μl): **10 μl**

ϵ (570nm) \rightarrow molarer Extinktionskoeffizient: **48,35**

d \rightarrow Küvettendurchmesser (in cm): **1 cm**

Δt \rightarrow Messzeitraum (in Minuten): **1,5 min**

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

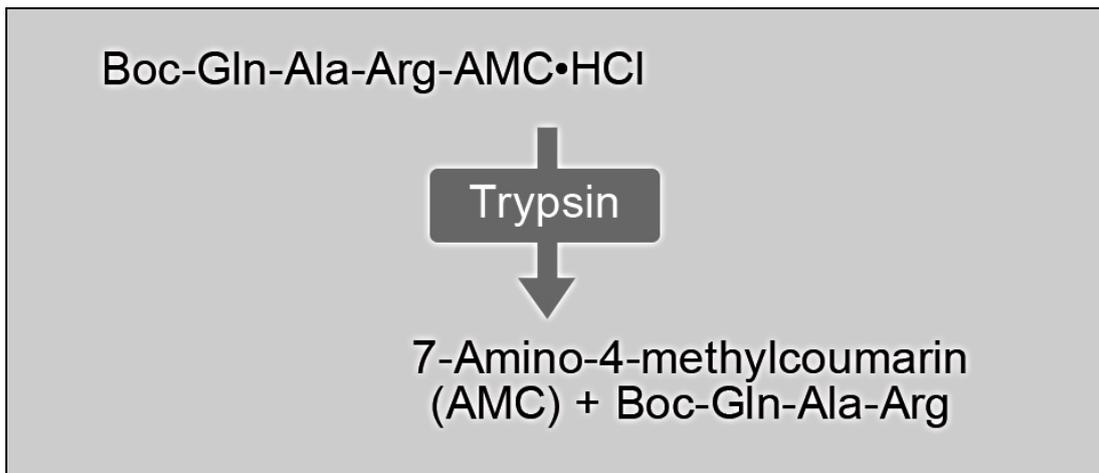
Die Serumproben der Versuchstiere wurden nach Entnahme bei 14000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Zu 1 ml Reagenz 1 wird 10 µl dieser Probe hinzugegeben und dann für 5 min bei 37°C gewärmt. Durch Zugabe von 600 µl der Reagenz 2 wird die Reaktion gestartet und nach 1 min mit der Messung begonnen.

Das Lipasefarbsubstrat wird unter katalytischer Einwirkung von Lipase in alkalischer Lösung zu 1,2-O-Dilauryl-rac-glycerin und einem instabilen Zwischenprodukt, dem Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester, gespalten. Dieser zerfällt in alkalischer Lösung spontan in Glutarsäure und dem Farbstoff Methylresorufin (s. *Abb. 31*). Die Farbintensität des gebildeten roten Farbstoffs, welcher sich direkt proportional der Lipaseaktivität verhält, wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm in einem Zeitraum von 90 Sekunden gemessen.

6.5.3. Bestimmung von Trypsin in Pankreashomogenaten

Die Bestimmung der Trypsinaktivität erfolgte aus frischem Pankreasgewebe der Versuchstiere, welches nach Entnahme homogenisiert wurde. Zur Bestimmung wurde 0,05 g Pankreasgewebe in 1 ml eiskaltem (4°C) MOPS-Puffer aufgenommen und mit einem Handhomogenisator mechanisch zerkleinert, um das Gewebe zu schonen. Die Gewebetrümmer wurden bei 4°C mit 3000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand sofort für die Vermessung (Trypsin-Assay) verwendet.

Die Messung der Aktivität erfolgte fluorimetrisch mit einem Lumineszenz Spectrometer (Perkin Elmer) mit Hilfe des Substrates [Boc-Glu-Ala-Arg-MCA•HCl] nach der Methode von Kawabata et al. [Kawabata et al. 1988, Hofbauer et al. 1998, Saluja et al. 1999].

Abb. 33 Fluorimetrische Umsetzung des Substrats durch Trypsin

Die Messung beruht auf einer Umsetzung des Substrates mit Trypsin, wobei das oben genannte Substrat durch Trypsin, nicht aber durch Trypsinogen, gespalten wird und wodurch eine fluoreszierende Verbindung entsteht. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm, die Lichtemission wurde bei einer Emissionswellenlänge von 440 nm in Quarzküvetten, sowie der Anstieg der Intensität der Fluoreszenz über die Zeit wurde alle 10 Sekunden nachfolgend über einen Zeitraum von 300 s fluorimetrisch gemessen. Aus der Differenz 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 Abstand (Delta F) 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:

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

Die Trypsinaktivität wurde aus der Steigung der Standardkurve errechnet (s. *Abschnitt 3.2.1.1.*, *Abb. 18 und 19*), welche vor der Vermessung der Proben mit definierten Trypsinkonzentrationen (Standardkonzentrationen) erstellt wurde (s. *Tab. 8*).

Tabelle 8 Darstellung der eingesetzten Standardtrypsinkonzentrationen

| | | | | |
|--|----------------------|-----------|-----------|------------|
| Kalibrierkonzentration | 0,1 ng/ml | 0,3 ng/ml | 0,5 ng/ml | 0,75 ng/ml |
| Menge der Verdünnung | 10 µl | 30 µl | 50 µl | 7,5 µl |
| Verdünnung | 10 ng/ml | 10 ng/ml | 10 ng/ml | 100 ng/ml |
| Trypsin wurde als Stockreagenz auf 10 mg/ml aliquotiert. Die Verdünnungen wurden mit TAB-Puffer (s. <i>Materialien 7.1.7.</i>) wie folgt erstellt: | | | | |
| 1:100 Verdünnungen | 100 µg/ml ► 1 µg/ml | | | |
| 1:10 Verdünnungen | 100 ng/ml ► 10 ng/ml | | | |

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

Zur Vermessung der Kalibriergeraden wurden 900 µl TAB mit 100 µl Substrat und der entsprechenden Menge an Verdünnung angesetzt und vermessen.

Zur Vermessung der Proben wurden 700 µl TAB mit 100 µl Substrat und 200 µl Probe angesetzt. Bei zu hoher Intensität der Probe wurde diese entsprechend mit TAB für die Vermessung verdünnt und anschließend der Verdünnungsfaktor hinterher mit in das Ergebnis eingerechnet, um die tatsächliche Trypsinkonzentration in der Probe zu erhalten.

Der Proteingehalt wurde mit einem Protein-Assay (s. *Materialien 7.1.3.*) bestimmt und die Trypsinaktivität in femtomol pro Milligramm Protein angegeben.

6.6. Western-Blotting zum Proteinnachweis

6.6.1. Erstellung von Zellproben

Zur Erstellung der Proben für das Western-Blotting wurde eine Gewebeprobe in 500 µl gekühltem Homopuffer mit pH 7,4 (s. *Materialien 7.1.8.*) und Proteaseinhibitor aufgenommen und bei 4°C mit einem Polytron (Homogenisator) zerkleinert und aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde daraufhin mit einer Kühlzentrifuge bei 4°C, 14000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, wobei das Pellet jeweils verworfen wurde. Anschließend erfolgte die Proteinquantifizierung aus dem klaren Überstand mit dem Bradford Protein Assay.

Die Proben für die Proteinelektrophorese wurden mit SDS-Puffer (Laemmli-Puffer) angefärbt und mit Homogenisatpuffer auf eine Proteinendkonzentration von 2 mg/ml aliquotiert.

6.6.2. Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch mit dem Bradford Protein Assay [Bradford 1976, BioRad Protein Determination, Laboratory Manual 1979].

Sie beinhaltet die Zugabe von einem Dye-Reagenz zur Proteinlösung und anschließender Messung bei 595 nm in einem Spektralphotometer. Die Farbveränderungen entstehen als Antwort auf verschiedene Proteinkonzentrationen und der Vergleich mit einer Standardkurve liefert eine relative Messung der Proteinkonzentration.

Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant 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.

Vor der Proteinelektrophorese wurden die Proteinproben denaturiert und negativ geladen durch Zugabe von Laemmli-Puffer und anschließendem Kochen der Proben für 5 Minuten (s. *Methoden 6.6.3.*).

6.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels denaturierter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (s. *Materialien 7.1.9.*) nach der Methode von Laemmli [Laemmli 1970]. Bei dieser Methode werden Proteine in Laemmli-Puffer (SDS-Puffer) durch Erhitzen und Kochen für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend in einem elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Das geschieht durch Anlagerung des negativ geladenen Detergens SDS an die hydrophoben Regionen dieser Proteine. Dadurch erhalten die Proteine eine stark negative Ladung, die ihre Eigenladung überlagert, so dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nur von ihrem Molekulargewicht, also der Größe, abhängig ist. Das Molekulargewicht lässt sich nach der Auftrennung

mit einem Protein-Standard-Marker ermitteln (Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range, BioRad, München).

Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 10%-SDS-Trenngelen, die mit Sammelgelen überschichtet wurde (s. Tab. 9).

Das Trenngel wurde so in die Gelkammern eingefüllt, dass noch etwa 3 cm bis zur oberen Glaskante frei blieben. Zur Ausbildung einer ebenen Oberfläche wurde die Lösung sofort mit 0,1% SDS oder Methanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das SDS vorsichtig abgeschüttet, das Trenngel mit dem Sammelgel bis zur oberen Glaskante überschichtet und ein Gelkamm eingesetzt.

Tabelle 9 Darstellung der Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele

| Bestandteile | Trenngel | Sammelgel |
|-------------------|-----------------|-----------------|
| Trenngelpuffer | 4,0 ml (pH 8,8) | Ø |
| Sammelgelpuffer | Ø | 2,5 ml (pH 6,8) |
| Aqua dest. | 6,7 ml | 5,9 ml |
| 30% Polyacrylamid | 5,3 ml | 1,6 ml |
| 10% APS | 25,0 µl | 60 µl |
| TEMED | 12,5 µl | 20 µl |

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Gelkamm entfernt und die Gelkammern sowie die Apparatur mit Laufpuffer (1x) aus SDS-Laufpuffer-Stammlösung (10x) gefüllt. Danach wurden 10 µl (20 µg) der in Laemmli-Puffer (SDS-Puffer) gelösten Proben sowie ein Protein-Standard-Marker in die entsprechenden Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer platziert und die Auftrennung der Proteine erfolgte für 75 min bei 150 V.

6.6.4. Transfer der Proteine auf Nitrozellulose

Anschließend wurden die im Gel befindlichen, nun immobilisierten Proteine mittels Blotting-Technik in einer Blot-Kammer, welche Transferpuffer (1x) aus Transfer-Puffer-Stammlösung (10x) (Blotting-Puffer) enthält, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dabei wandern die negativ geladenen Proteine in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und damit aus dem Gel auf die Membran. Die

Temperatur während des Transfers wurde bei 4°C gehalten. Der Transfer erfolgte bei 300 mA (80-130 V) für 60 min.

6.6.5. Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran in Blocklösung auf dem Kreisschüttler für 60 min und 30 U/min bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und anschließend mehrfach mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper in TBS-T und 2% Top-Block bzw. Non-Fat Dry Milk inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an die Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Überkopffrotator. Am nächsten Tag wurde die Membran zur Entfernung ungebundener Antikörper für 30 min bei Pufferwechsel in Waschlösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem gegen den Primäantikörper gerichteten und Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur. Es schloss sich wiederum ein Waschschrift für jeweils 10 min in Waschlösung mit dreifachem Pufferwechsel an. Danach erfolgte die ECL-Detektion (Amersham) nach Angaben des Herstellers.

Das Prinzip der „verstärkten Chemilumineszenz Reaktion“ beruht auf einer Lichtemission, welche anhand der Schwärzung von Röntgenfilmen semiquantitativ ausgewertet werden kann. Zur ECL-Detektion wurden je 0,5 ml der Luminol enthaltenen zwei ECL-Lösungen vermischt, auf die Proteinseite der Nitrozellulose gegeben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Membran wurde dann über verschiedene Zeiträume in einer Dunkelkammer auf Röntgenfilme gelegt, welche anschließend entwickelt wurden.

Die korrekte Lage der erwarteten Signale auf den Röntgenfilmen wurde einerseits durch Vergleich mit dem Protein-Standard-Marker auf der Membran und andererseits durch das Mitlaufen einer Positivkontrolle, welche zur Überprüfung der korrekten Höhe der Signale verwendet wurde, festgestellt.

6.6.6. Immunchemischer Nachweis von unterschiedlichen Proteinen auf gleicher Nitrozellulosemembran (Stripping)

Um auf einer Membran verschiedene HSPs bei gleichem Laufmuster mit unterschiedlichen Antikörpern zum direkten Vergleich nachzuweisen, wurde das „Membran-Stripping“ angewandt. Die jeweilige Membran wurde, nach der

Übertragung der Signale des ersten primären Antikörpers auf Röntgenfilme, im auf 50°C erwärmten Stripping-Puffer (s. *Materialien 7.1.9.*) für 30 min bei leichter Bewegung im Überkopffrotator gewaschen. So konnten die primären Antikörper schonend entfernt werden, ohne die Proteine bzw. das Proteinverteilungsmuster aus der Membran zu lösen. Danach erfolgte das zweimalige Waschen in TBST-Puffer für jeweils 10 min und das erneute Blocken in Blocklösung auf dem Kreisschüttler für 30 min und 30 U/min bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen erneut abzusättigen und anschließend mehrfach mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem neuen primären Antikörper in TBS-T und 2% Top-Block bzw. Non-Fat Dry Milk inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten dann wie oben beschrieben.

6.7. Histologische Untersuchungen

6.7.1. Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Histologische Schnitte des Pankreas wurden am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Großhadern in 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.

6.8. Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgt mit Sigma Stat, Version 2.03 (SYSTAT Software Inc., Chicago, IL), die graphischen Auswertungen und Abbildungen wurden mit Sigma Plot, Version 7.0 durchgeführt.

Die Ergebnisse werden jeweils mit den Mittelwerten und den zugehörigen Standardabweichungen standard error of means (SEM) dargestellt, sowie die Größe der Versuchsgruppen jeweils auf der x-Achse neben den Graphen angegeben. Die einzelnen Proben aus einem Experiment werden jeweils z.B. doppelt oder dreifach gemessen und daraus ein Mittelwert (mean) gebildet. Bei mehreren Experimenten werden dann die jeweils ermittelten Mittelwerte wiederum verwendet, um die Standardabweichung zu ermitteln.

Die Signifikanz der Ergebnisse wird mit dem one sample t-test oder dem student's t-test. Dabei wird $p < 0,05$ und $p < 0,01$ als statistisch signifikant betrachtet.

7. Materialien

7.1. Chemikalien und Reagenzien

7.1.1. Narkose (Hyperthermie)

| | |
|--|------------------------------|
| Isofluran, Forene [®] | Abott, Wiesbaden |
| Ketaminhydrochlorid, Ketavet [®] (100 mg/ml) | Pharmacia & Upjohn, Erlangen |
| Xylazin, Rompun [®] 2% | BayerVital, Leverkusen |

7.1.2. Caeruleinpankreatitis

| | |
|--|-------------------------------------|
| Caerulein (MW 1352.4) | Sigma Aldrich, München |
| Cobalt(III)-Protoporphyrin IX Chlorid (MW 654.61) | Frontier Scientific, Lancashire, UK |
| Isotone Kochsalzlösung 0,9% [NaCl] | Braun, Melsungen |
| Natriumhydroxid [NaOH] (MW 40.0) | Sigma Aldrich, München |

| |
|--|
| CoPP Lösung (Stock-Lösung) |
| CoPP gelöst in 0,2 M [NaOH] mit einer Konzentration von 5 mg/ml |
| <i>pH-Titration auf pH 7,4</i> |
| <i>Zur Präkonditionierung: Verdünnt in isotoner Kochsalzlösung 0,9% [NaCl] auf 1 mg/ml</i> |

7.1.3. Protein-Bestimmung

| | |
|---|-----------------------------------|
| Serum Albumin, bovines (BSA) | Fluka, Biochemie, Buchs, Schweiz |
| Bradford Protein Assay (Dye Concentrate) | BioRad Laboratories, Hercules, CA |

7.1.4. Hämatoxylin/Eosin-Färbung (Histologie)

| | |
|-----------------|------------------------------|
| Paraformaldehyd | Merck Biosciences, Darmstadt |
|-----------------|------------------------------|

| |
|--|
| PBS gepuffertes Formalin |
| Paraformaldehyd 4% in phosphatgepuffertes Kochsalzlösung (PBS) (s. <i>Materialien 7.1.8.</i>) |
| <i>pH-Titration auf pH 7,4</i> |

7.1.5. Amylase-Bestimmung

| | |
|---|---------------------------------------|
| Natriumchlorid [NaCl] (MW 58.44) | Sigma Aldrich, München |
| Natriumdihydrogenphosphat [NaH ₂ PO ₄] (MW 119.98) | Fluka, Biochemie, Buchs, Schweiz |
| Natriumhydroxid [NaOH] (MW 40.0) | Sigma Aldrich, München |
| Phadebas® Amylase Assay | Phadebas Pharmacia, Uppsala, Schweden |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Amylase Puffer | |
| [NaCl] | 0,05 M |
| [NaH ₂ PO ₄] | 0,02 M |
| mit Aqua dest. | ad 500 ml |
| <i>pH-Titration auf pH 7,4</i> | |
| Stopp-Lösung | |
| [NaOH] | 0,5 M |
| mit Aqua dest | ad 250 ml |

7.1.6. Lipase-Bestimmung

| | |
|-------------------------|-----------------------------|
| (LIP) Lipase Farb Assay | Roche Diagnostics, Mannheim |
|-------------------------|-----------------------------|

7.1.7. Trypsin-Bestimmung

| | |
|---|------------------------|
| Calciumchlorid [CaCl ₂] (MW 110.98) | Sigma Aldrich, München |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |

| | |
|--|---------------------------------|
| Sucrose (MW 342.3) | Sigma Aldrich, München |
| Magnesiumsulfat [MgSO ₄ •7H ₂ O] (MW 246.4) | Sigma Aldrich, München |
| MOPS [C ₇ H ₁₅ NO ₄ S] (MW 209.3) | Sigma Aldrich, München |
| Natriumchlorid [NaCl] (MW 58.44) | Sigma Aldrich, München |
| Serum Albumin, bovines (BSA) | Fluka Biochemie, Buchs, Schweiz |
| Substrat [Boc-Glu-Ala-Arg-MCA•HCl] | Bachem, Heidelberg |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Trizma®-Base [C ₄ H ₁₁ NO ₃] (MW 121,1) | Sigma Aldrich, München |
| Trypsin (8.300 U/mg) | Sigma Aldrich, München |

| | |
|--|-----------|
| MOPS-Homogenisatpuffer | |
| Sucrose | 250 mM |
| MOPS | 5 mM |
| [MgSO ₄] | 1 mM |
| mit Aqua dest. | ad 100 ml |
| <i>pH-Titration auf pH 6,5</i> | |
| Trypsin-Assay-Puffer (TAB-Puffer) | |
| TrisBase | 50 mM |
| [NaCl] | 150 mM |
| [CaCl ₂] | 1 mM |
| BSA | 0,1 mg/ml |
| mit Aqua dest. | ad 100 ml |
| <i>pH-Titration auf pH 8,1</i> | |

7.1.8. SDS-Probenaufbereitung

| | |
|---|------------------------|
| Benzamidin [C ₇ H ₈ N ₂ •HCl] (MW 156.6) | Sigma Aldrich, München |
|---|------------------------|

| | |
|--|-----------------------------------|
| β -Mercaptoethanol [C ₂ H ₆ OS] (MW 78.1) | Sigma Aldrich, München |
| Brij 35, 30% Lösung | Sigma Diagnostics, St.Louis, USA |
| Bromphenolblau | Sigma Aldrich, München |
| DTT (D ₂ -Dithiothreitol) (MW 154.2) | Sigma Aldrich, München |
| EGTA [C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀] (MW 380.2) | Sigma Aldrich, München |
| Glycerol [C ₃ H ₈ O ₃] (MW 92.1) | Sigma Aldrich, München |
| β -Glycerophosphat [C ₃ H ₇ PO ₆] (MW 172.1) | Sigma Aldrich, München |
| Kaliumchlorid [KCl] (MW 74.6) | Sigma Aldrich, München |
| Kaliumhydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄] (MW 136.1) | Sigma Aldrich, München |
| Natriumchlorid [NaCl] (MW 58.4) | Sigma Aldrich, München |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | BioRad Laboratories, Hercules, CA |
| Natriumhydrogenphosphat [Na ₂ HPO ₄] (MW 142.0) | Sigma Aldrich, München |
| Natriumfluorid [NaF] (MW 42.0) | Sigma Aldrich, München |
| Natriumorthovanadate [Na ₃ VO ₄] (MW 183.9) | Sigma Aldrich, München |
| Proteinase Inhibitor Cocktail Set | Calbiochem, La Jolla, CA |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Trizma [®] -Base (MW 121.1) Trizma [®] -HCl (MW 157.6) | Sigma Aldrich, München |

| Proteinase Inhibitor Cocktail Set | |
|---|-------------|
| AEBSF 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonylfluorid | 500 μ M |
| Aprotinin | 150 nM |
| E-64, Protease Inhibitor | 1 μ M |
| EDTA, Dinatrium | 0,5 mM |
| Leupeptin, Hemisulfat | 1 μ M |
| | |

| Homogenisatpuffer (Homo-Puffer) | |
|--|----------------|
| Glycerophosphat | 50 mM |
| Benzamidin | 2 mM |
| Brij 35, 30% Lösung | 0.03% |
| Glycerol | 5% |
| EGTA | 1 mM |
| [Na ₃ VO ₄] | 2 mM |
| [NaF] | 1 mM |
| DTT | 1 mM |
| β-Mercaptoethanol | 0,1% |
| mit PBS pH 7,4 | ad 50 ml |
| <i>Vor Gebrauch: Proteinase Inhibitor Cocktail Set (100 µl / 10 ml) hinzugeben</i> | |
| Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) | |
| [NaCl] | 0,14 M |
| [KCl] | 2,7 mM |
| [Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O] | 10 mM |
| [KH ₂ PO ₄] | 1,8 mM |
| mit Aqua dest. | ad 1000 ml |
| <i>pH-Titration auf pH 7,4</i> | |
| Laemmli-Puffer (SDS-Puffer) | |
| TrisHCl | 0,2 M (pH 6,8) |
| Glycerol | 40% |
| SDS | 8% |
| β-Mercaptoethanol | 10% |
| Bromphenolblau | 0,2% |

7.1.9. Western-Blotting

| | |
|---|-----------------------------------|
| 10% Ammoniumperoxidsulfat (APS) | Sigma Aldrich, München |
| 30% Acrylamid / Bisacrylamid Solution | BioRad Laboratories, Hercules, CA |
| β -Mercaptoethanol [C ₂ H ₆ OS] (MW 78.1) | Sigma Aldrich, München |
| Blotting grade Blocker (Non-Fat dry milk) | Sigma Aldrich, München |
| Bromphenolblau | Sigma Aldrich, München |
| DTT (D ₂ -Dithiothreitol) (MW 154.3) | Sigma Aldrich, München |
| ECL [®] -Western Blotting Detection System | Amersham Biosciences, UK |
| Glycin [C ₂ H ₅ NO ₂] (MW 75.1) | Sigma Aldrich, München |
| Glycerol [C ₃ H ₈ O ₃] (MW 92.1) | Sigma Aldrich, München |
| Kaliumchlorid [KCl] (MW 74.56) | Sigma Aldrich, München |
| Methanol [CH ₃ OH] | Merck Biosciences, Darmstadt |
| Natriumchlorid [NaCl] (MW 58.44) | Sigma Aldrich, München |
| Prestained SDS-PAGE Standards | BioMol, München |
| Protein-Standard-Marker | BioRad Laboratories, Hercules, CA |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | BioRad Laboratories, Hercules, CA |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin TEMED | BioRad Laboratories, Hercules, CA |
| Salzsäure [HCl] | Merck Biosciences, Darmstadt |
| Top-Block | Fluka Biochemie, Buchs, Schweiz |
| Trizma [®] -Base (MW 121.1) Trizma [®] -HCl (MW 157.6) | Sigma Aldrich, München |
| Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate Tween [®] 20 (MW 216.6) | Sigma Aldrich, München |

| | |
|-----------------------|-----------|
| Trenngelpuffer | |
| TrisBase | 1,5 M |
| SDS | 0,014 M |
| mit Aqua dest | ad 250 ml |

| | |
|---|------------|
| <i>pH-Titration auf pH 8,8</i> | |
| Sammelgelpuffer | |
| TrisBase | 0,5 M |
| SDS | 0,014 M |
| mit Aqua dest. | ad 250 ml |
| <i>pH-Titration auf pH 6,8</i> | |
| SDS-Laufpuffer-Stammlösung | |
| TrisBase | 25 mM |
| Glycin | 0,2 M |
| SDS | 10 mM |
| mit Aqua dest. | ad 1000 ml |
| Transfer-Puffer-Stammlösung (Blotting-Puffer) | |
| TrisBase | 25 mM |
| Glycin | 0,2 M |
| SDS | 30 mM |
| Methanol | 5 M |
| mit Aqua dest. | ad 1000 ml |
| Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline, TBS) + Tween (TBS-T) | |
| TrisBase | 25 mM |
| [NaCl] | 150 mM |
| [KCl] | 2,5 mM |
| Tween® 20 | 0,25% |
| mit Aqua dest. | ad 1000 ml |
| <i>pH-Titration auf pH 7,5</i> | |
| | |

| Blocklösung | |
|--------------------------------|---------|
| TBS-T | |
| Non-Fat Dry Milk / Top Block | 5% |
| Waschlösung | |
| TBS-T | |
| Non-Fat Dry Milk / Top Block | 2% |
| Strippingpuffer | |
| β -Mercaptoethanol | 100 mM |
| SDS | 20 mM |
| ad 100ml TrisHCl | 62,5 mM |
| <i>pH-Titration auf pH 6,8</i> | |

| Antikörper und Proteine | |
|---|---------------------------------|
| Anti-HSP25 [SPA-801] monoklonaler Kaninchen IgG-Antikörper | StressGen Biotech, Victoria, CA |
| Anti-Hämoxygenase-1(Anti-HSP32) [OSA-150] polyklonaler Kaninchen IgG-Antikörper | StressGen Biotech, Victoria, CA |
| Anti-Hämoxygenase-1(Anti-HSP32) [OSA-111] monoklonaler Maus IgG-Antikörper | StressGen Biotech, Victoria, CA |
| Anti-HSP60 [SPA-806] monoklonaler Maus IgG-Antikörper | StressGen Biotech, Victoria, CA |
| Anti-HSP70 [SPA-810] monoklonaler Maus IgG-Antikörper | StressGen Biotech, Victoria, CA |
| Anti-Kaninchen (Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper) monoklonaler Esel IgG-Antikörper | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Anti-Maus (Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper) monoklonaler Ziege IgG-Antikörper | Amersham Biosciences, Freiburg |

| | |
|--|---------------------------------|
| Recombinantes [von Ratten] [SPP-730] HSP32 (Hämoxygenase-1) | StressGen Biotech, Victoria, CA |
|--|---------------------------------|

7.2. Technische Geräte und Materialien

7.2.1. Technische Geräte

| | |
|---------------------------------------|--|
| Analysenwaage (Sartorius research) | Sartorius, Göttingen, |
| Reagenzwasser System (Aqua dest.) | Millipore, Molsheim, Frankreich |
| Blot-Kammer | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA |
| Elektrophorese-Apparatur | Amersham Biosciences, UK |
| Hamiltonspritze | Hamilton Company, Rena, Nevada, USA |
| Homogenisator | Schütt Labortechnik, Göttingen |
| Inkubator GFL 1083 | GFL, Burgwedel |
| Isofluran Vaporator 19.3 | Dräger, Lübeck |
| Kühlzentrifüge 541712 | Eppendorf, Hamburg |
| Lumineszenz Spectrometer LS50B | Perkin Elmer Instruments, Rodgau |
| Magnetrührer RTC basic | IKA Werke, Staufen |
| MiniSpin-Zentrifuge | Eppendorf, Hamburg, |
| Minigelapparatur | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA |
| ph-Meter InoLab pH Level 1 | WTW, Weilheim |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Polytron Homogenisator | Kinematica AG, Littau/Luzern, Schweiz |
| Power Supply (Elektrophorese) | Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK |
| Schüttelblock | Heidolph, Kelheim |
| Spektralphotometer Ultrospec 3100 pro | Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, UK |
| Überkoprotator Rocky 3D | Fröbel Labortechnik, Lindau |
| Vortex Mixer 2020 | neo Lab |
| Zentrifuge EBA 12R | Hettich Zentrifugen, Bern, Schweiz |

7.2.2. Materialien

| | |
|--|--|
| Einmal-Küvetten, UV | Sarstedt, Nümbrecht, |
| Eppendorf-Röhrchen | Eppendorf, Hamburg |
| Film (Hyperfilm [®]) | Amersham Pharmacia Biotech, UK |
| Gel-Blotting Papier | Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel |
| Halbmikro-Fluoreszenz-Küvetten | Hellma, Mülheim |
| Nitrozellulosemembran Protran [®] | Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel |
| Petrischalen | Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, Frankreich |
| Quarzglas SUPRASIL [®] | Hellma, Mülheim, |
| Tubes (Falcon [®]) | Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, Frankreich |

7.3. Versuchstiere

Für die Präparation des Pankreas, die Präkonditionierungen, sowie die Hyperthermie- und Caeruleinversuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld, D) mit einem Körpergewicht von 150-250 g verwendet.

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).

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------|--|
| Abb. | Abbildung(en) |
| Ag | Antigen |
| Ak | Antikörper |
| APS | Ammoniumperoxidsulfat |
| ARDS | adult respiratory distress syndrome |
| bp | Basenpaare |
| BPA | Bradford Protein Assay |
| BSA | Rinder Serum Albumin |
| °C | Grad Celsius |
| CCK | Cholezystokinin |
| CO | Kohlenmonoxid |
| CoPP | Kobalt (Co)-Protoporphyrin |
| d | Tag(e) |
| DIC | Disseminierte intravasale Gerinnung |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz |
| ERCP | Endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie |
| f | femto |
| g | Gramm |
| h | Stunde(n) |
| HO | Hämoxygenase |
| HRP | Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) |
| HSRE | heat shock response element |
| HSF | heat shock factor (Hitzeschockfaktor) |

| | |
|------------|--|
| HSP | Hitzeschockprotein; Synonym: Stressprotein |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| i.p. | intraperitoneal |
| IRS | Ischämie-Reperfusionsschaden |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| µg | Mikrogramm |
| µm | Mikrometer |
| M | Molar [mol/l] |
| min | Minute |
| ml | Mililiter |
| MOPS | 3-(N-Morpholino) propansulfonic acid |
| MW | Molekulargewicht |
| n | Anzahl der verwendeten Versuchstiere/Versuchseinheit |
| NK | Negativ Kontrolle |
| PAGE | Polyacrylamid Gel Elektrophorese |
| PBS | Phosphat gepufferte Kochsalzlösung |
| Pos.Kontr. | Positiv Kontrolle (Western Blotting) |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulphate) |
| SEM | standard error of means (Standardabweichung) |
| Sn | Zinn |
| spez. | spezifisch(en) |
| Tab. | Tabelle |
| TAB | Trypsin Assay Buffer |
| TBS | Tris buffered saline |

| | |
|-------------|---|
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| rpm | rounds per minute |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Hydroniumionen [H ₃ O ⁺] |
| RT | Raumtemperatur |
| U | Unit, Enzymspezifische Angabe |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Strahlung im ultravioletten Bereich |
| V | Volt |
| Vgl. / vgl. | Vergleich / vergleiche |
| Zn | Zink |

9. 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** Feb; 100(2): 537-543

Alam J, Cai J, Smith A

Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals.

J Biol Chem. **1994** Jan; 269(2): 1001-1009

Alam J

Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals.

J Biol Chem. **1994** Oct; 269(40): 25049-25056

Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW

Up regulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury.

J Clin Invest. **1999** Dec; 104(11): 1631-1639

Amersi F, Shen XD, Anselmo D, Melinek J, Iyer S, Southard DJ, Katori M, Volk HD, Busuttil RW, Buelow R, Kupiec-Weglinski JW

Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway.

Hepatology. **2002** Apr; 35(4):815-823

Ames BN

Endogenous DNA damage as related to cancer and aging.

Mutat Res. **1989** Sep; 214(1): 41-46

Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM

Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells.

Cancer Res. **1991** Feb; 51(3): 974-978

Apte MV, Wilson JS

Alcohol-induced pancreatic injury.

Best Pract Res Clin Gastroenterol. **2003** Aug; 17(4): 593-612

Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ

Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning.

Liver Transpl. **2001** Apr; 7(4): 292-299

Baler R, Dahl G, Voellmy R

Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1.

Mol Cell Biol. **1993** Apr; 13(4): 2486-2496

Bauer M, Bauer I

Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress.

Antioxid Redox Signal. **2002** Oct; 4(5): 749-758

Bellmann K, Wenz A, Radons J, Burkart V, Kleemann R, Kolb H

Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro.

J Clin Invest. **1995** Jun; 95(6): 2840-2845

Bhagat L, Singh VP, Hietaranta AJ, 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** Jul; 106(1): 81-89

Bhagat L, Singh VP, Song AM, van Acker GJ, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK

Thermal stress-induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats.

Gastroenterology. **2002** Jan; 122(1): 156-165

Bockman DE, Boydston WR, Parsa I

Architecture of human pancreas: Implications for early changes in pancreatic disease.

Gastroenterology. **1983** Jul; 85(1): 55-61

Bradford MM

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem. **1976** May; 72: 248-254

Brady M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos J, Slavin J

Cytokines and acute pancreatitis.

Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol. **1999** Jul; 13(2): 265-289

Buchler M, Malfertheiner P, Uhl W, Scholmerich J, Stockmann F, Adler G, Gaus W, Rolle K, Beger HG

Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group.

Gastroenterology. **1993** Apr; 104(4): 1165-1170

Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG

Eukaryotic homologues of Escherichia coli DnaJ: A diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins.

Mol Biol Cell. **1993** Jun; 4(6): 555-563

Choi AM, Alam J

Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury.

Am J Respir Cell Mol Biol. **1996** Jul; 15(1): 9-19

Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R

Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. **2000** Feb; 278(2): H 643-651

Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R

Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress.

Biochem J. **2000** Jun; 348 Pt 3: 615-619

Clemente F, Durand S, Laval J, Thouvenot JP, Ribet A

Ethanol metabolism by rat pancreas. Presence and level modifications of ethanol oxidizing systems.

Gastroenterol Clin Biol. **1977**; 1(1): 39-48

Cleveland JC, Raeburn C, Harken AH

Clinical applications of ischemic preconditioning: from head to toe.

Surgery. **2001 Jun**; 129(6): 664-647

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS

Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis.

N Engl J Med. **1998 Sep**; 339(10): 653-658

Cotto JJ, Morimoto RI

Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors.

Biochem Soc Symp. **1999**; 64: 105-118

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 Aug**; 19(8): 795-808

De Maio A

Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams.

Shock. **1999 Jan**; 11(1): 1-12

Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK

Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia.

Free Radic Biol Med. **1995 Oct**; 19(4): 395-404

Dennery PA

Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury.

Curr Top Cell Regul. **2000**; 36: 181-199

Donnelly TJ, Sievers 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 Feb**; 85(2): 769-778

Dreiling DA, Koller M

The natural history of alcoholic pancreatitis: update 1985.

Mt Sinai J Med. **1985 May**; 52(5): 340-342

Drummond GS, Kappas A

The cytochrome P-450-depleted animal: an experimental model for in vivo studies in chemical biology.

Proc Natl Acad Sci USA. **1982** Apr; 79(7): 2384-2388

Elbirt KK, Bonkovsky HL

Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role.

Proc Assoc Am Physicians. **1999** Sep; 111(5): 438-447

Ethridge RT, Ehlers RA, Hellmich MR, Rajaraman S, Evers BM

Acute pancreatitis results in induction of heat shock proteins 70 and 27 and heat shock factor-1.

Pancreas. **2000** Oct; 21(3): 248-256

Ewing JF, Maines MD

Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: Heme oxygenase 2 is not a heat shock protein.

Proc Natl Acad Sci USA. **1991** Jun; 88(12): 5364-5368

Ferrali M, Signorini C, Ciccoli L, Comporti M

Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil.

Biochem J. **1992** Jul; 285 (Pt 1): 295-301

Fink GW, Norman JG

Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin 1 family of genes during experimental acute pancreatitis.

Cytokine. **1997** Dec; 9(12): 1023-1027

Franklin TB, Krueger-Naug AM, Clarke DB, Arrigo AP, Currie RW

The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system.

Int J Hyperthermia. **2005** Aug; 21(5): 379-392

Frossard JL

Heat shock protein 70 (HSP70) prolongs survival in rats exposed to hyperthermia.

Eur J Clin Invest. **1999** Jun; 29(6): 561-562

- Frossard JL**, Bhagat L, Lee HS, Hietaranta AJ, Singh VP, Song AM, Steer ML, Saluja AK
Both thermal and non-thermal stress protects against caerulein induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas.
Gut. **2002** Jan; 50(1): 78-83
- Fu K**, Sarras MP Jr, De Lisle RC, Andrews GK
Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during caerulein-induced acute pancreatitis.
Am J Physiol. **1997** Sep; 273 (3 Pt 1): G 696-705
- Gorelick FS**, Modlin IM, Leach SD, Carangelo R, Katz M
Intracellular proteolysis of pancreatic zymogens.
Yale J Biol Med. **1992** Sep-Oct; 65(5): 407-420; discussion 437-440
- Grady T**, Dabrowski A, Williams JA, Logsdon CD
Stress-activated protein kinase activation is the earliest direct correlate to the induction of secretagogue-induced pancreatitis in rats.
Biochem Biophys Res Commun. **1996** Oct; 227(1): 1-7
- Grady T**, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD
Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis.
Gastroenterology. **1997**; 113(6): 1966-1975
- Grendell JH**
Acute pancreatitis.
Curr. Opin. Gastroenterol. 13, **1997**: 381-385
- Grise K**, Kim F, McFadden D
Hyperthermia induces heat-shock protein expression, reduces pancreatic injury, and improves survival in necrotizing pancreatitis.
Pancreas. **2000** Aug; 21(2):120-125
- Gross V**, Leser HG, Heinisch A, Scholmerich J
Inflammatory mediators and cytokines-new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis?
Hepatogastroenterology. **1993** Dec; 40(6): 522-530

Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ

Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis.

J Clin Invest. **1997**; 100(7): 1853-1862

Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J

Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis.

J Clin Invest. **2000 Sep**; 106(6): 773-781

Halliwell B, Gutteridge JM

The antioxidants of human extracellular fluids.

Arch Biochem Biophys. **1990**; 280(1): 1-8

Han B, Klonowski-Stumpe H, Luthen R, Schreiber R, Haussinger D, Niederau C

Menadione-induced oxidative stress inhibits cholecystokinin-stimulated secretion of pancreatic acini by cell dehydration.

Pancreas. **2000 Aug**; 21(2): 191-202

Hartl FU

Molecular chaperones in cellular protein folding.

Nature. **1996 Jun**; 381(6583): 571-579

Hartwig W, Werner J, Ryschich E, Mayer H, Schmidt J, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E

Cigarette smoke enhances ethanol-induced pancreatic injury.

Pancreas. **2000 Oct**; 21(3): 272-278

Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M

Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme.

Circ Res. **1999 Oct**; 85(8): 663-671

Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML.

Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats.

Am J Physiol. **1998** Aug; 275(2 Pt 1): G 352-362

Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, Kotb M, El-din AB, Mann L, Gaber AO

Anti-TNFalpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat.

Am J Surg. **1996** Feb; 171(2): 274-280

Immenschuh S, Ramadori G

Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target.

Biochem Pharmacol. **2000** Oct; 60(8): 1121-1128

Ingbar DF

Extracellular matrix as a regulator of epithelial polarity, cell growth and tissue pattern.

In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA (editors)

The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease. New York, Raven press, **1993**: 351-367

Jaeschke H

Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **2003** Jan; 284(1): G 15-26

Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, Southard D, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW

Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway.

Transplantation. **2002** Jan; 73(2): 287-292

Kappas A, Drummond GS

Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins.

J Clin Invest. **1986** Feb; 77(2): 335-339

Kawabata S, Miura T, Morita T, Kato H, Fujikawa K, Iwanaga S, Takada K, Kimura T, Sakakibara S

Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin.

Eur J Biochem. **1988** Feb; 172(1): 17-25

Keim V, Hoffmeister A, Kurth T, Niels T, Mössner J

Trypsinogen variant N21I in hereditary pancreatitis is characterized by a higher stability in acidic environment but not by increased resistance to autolysis.

Gastroenterology. **1999**; 116: A 1137

Keim V

Genetic risk factors in pancreatic diseases-significance for general practice

Med Klin (Munich). **2002** May; 97(5): 278-284

Ketterer B

Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis.

Mutat Res. **1988** Dec; 202(2): 343-361

Ketterer B, Meyer DJ, Tan KH

The role of glutathione transferase in the detoxication and repair of lipid and DNA hydroperoxides.

Basic Life Sci. **1988**; 49: 669-674

Keyse SM, Tyrrell RM

Heme oxygenase is the major 32 kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite.

Proc Natl Acad Sci USA. **1989** Jan; 86(1): 99-103

Kotler DP, Levine GM

Reversible gastric and pancreatic hypo secretion after long-term total parenteral nutrition.

New England J Med. **1979** Feb; 300(5): 241-242

Kubisch C, Dimagno MJ, Tietz AB, Welsh MJ, Ernst SA, Brandt-Nedelev B, Diebold J, Wagner AC, Göke B, Williams JA, Schaefer C

Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced pancreatitis.

Gastroenterology. **2004 Jul**; 127(1): 275-286

Labbe RF, Vreman HJ, Stevenson DK

Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission.

Clin Chem. **1999 Dec**; 45(12): 2060-2072

Laemmli UK

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature. 1970 **Aug**; 227(5259): 680-685

Lampel M, Kern HF

Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue.

Virchows Arch A Pathol Anat Histol. **1977 Mar**; 373(2): 97-117

Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA

Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells.

J Cell Biol. **1989 Jul**; 109(1): 7-15

Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM

Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene.

Carcinogenesis. **1992 Feb**; 13(2): 227-232

Leach SD, Modlin IM, Scheele GA, Gorelick FS

Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin.

J Clin Invest. **1991 Jan**; 87(1): 362-366

Lee PJ, Alam J, Wiegand GW, Choi AM

Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia.

Proc Natl Acad Sci USA. **1996 Sep**; 93(19): 10393-10398

Leppä S, Sistonen L

Heat shock response-pathophysiological implications.

Ann Med. **1997 Feb**; 29(1): 73-78

Lerch MM, Gorelick FS

Early trypsinogen activation in acute pancreatitis.

Med Clin North Am. **2000 May**; 84(3): 549-563

Lindquist S, Craig EA

The heat-shock proteins.

Annu Rev Genet. **1988**; 22: 631-677

Luster AD

Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation.

N Engl J Med. **1998 Feb**; 338(7): 436-445

Luthen RE, Neuschwander-Tetri BA, Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH

The effect of L-buthionine-[S,R]-sulfoximine on the pancreas in mice. A model of weakening glutathione-based defence mechanisms.

Int J Pancreatol. **1994 Aug**; 16(1): 31-36

Luthen RE, Niederau C, Grendell JH

Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats.

Am J Physiol. **1995 Apr**; 268(4 Pt 1): G 592-604

Maines MD, Kappas A

Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity.

Proc Natl Acad Sci USA. **1974 Nov**; 71(11): 4293-4297

Maines MD, Kappas A

Cobalt stimulation of heme degradation in the liver. Dissociation of microsomal oxidation of heme from cytochrome P-450.

J Biol Chem. **1975 Jun**; 250(11): 4171-4171

Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK

Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible.

J Biol Chem. **1986 Jan**; 261(1): 411-419

Maines MD

Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications.

FASEB J. **1988 Jul**; 2(10): 2557-2568

Maines MD

Heme Oxygenase and Heme Degrading Systems. In Heme Oxygenase: Clinical Applications and Functions.

ed. Maines, MD pp. 63-108. Boca Raton: CRC Press. **1992**

McCoubrey WK, Maines MD

The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2.

Gene. **1994 Feb**; 139(2): 155-161

McCoubrey WK, Eke B, Maines MD

Multiple transcripts encoding heme oxygenase-2 in rat testis: developmental and cell-specific regulation of transcripts and protein.

Biol Reprod. **1995 Dec**; 53(6): 1330-1338

McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD

Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis.

J Biol Chem. **1997 May**; 272(19): 12568-12574

McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD

Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3.

Eur J Biochem. **1997 Jul**; 247(2): 725-732

Minowada G, Welch WJ

Clinical implications of the stress response.

J Clin Invest. **1995** Jan; 95(1): 3-12

Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K

Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses.

J Biol Chem. **1992** Nov; 267(31): 21987-21990

Morisset JA, Webster PD

Effects of fasting and feeding on protein synthesis by the rat pancreas.

J Clin Invest. **1972** Jan; 51(1): 1-8

Nam JH, Murthy S

Acute pancreatitis-the current status in management.

Expert Opin Pharmacother. **2003** Feb; 4(2): 235-241

Nascimento AL, Luscher P, Tyrrell RM

Ultraviolet A (320-380 nm) radiation causes an alteration in the binding of a specific protein/protein complex to a short region of the promoter of the human heme oxygenase 1 gene.

Nucleic Acids Res. **1993** Mar; 21(5): 1103-1109

Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME

Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat.

J Clin Invest. **1992** Jul; 90(1): 267-270

Neuzil J, Gebicki JM, Stocker R

Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants.

Biochem J. **1993** Aug; 293 (Pt 3): 601-606

Neuzil J, Stocker R

Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin.

FEBS Lett. **1993** Oct; 331(3): 281-284

Niederau C, Grendell JH

Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment.

J Clin Invest. **1988**; 81(1): 229-236

Niederau C, Lüthen R, Heintges T

Effects of CCK on pancreatic function and morphology.

Ann NY Acad Sci. **1994** Mar; 713: 180-198

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** Aug; 62(4): 807-817

Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T

Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offence and defence systems.

Digestion. **1990**; 47(3): 130-137

Norman JG, Fink GW, Franz MG

Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression.

Arch Surg. **1995** Sep; 130(9): 966-970

Otterbein LE, Choi AM

Heme oxygenase: colours of defence against cellular stress.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **2000** Dec; 279(6): L1029-1037

Opie EL

The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis.

John Hopkins Hosp.Bull. 12, **1901**: 182-188

Opie EL

The relation of cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis.

John Hopkins Hosp.Bull. 12, **1901**: 19-21

Palade G

Intracellular aspects of the process of protein synthesis.

Science. **1975** Aug; 189(4200): 347-358

Ploessl I, Gallmeier E, Schaefer C, Bilzer M, Bittmann I, Goke B, Wagner ACC
ANP preconditioning does not increase protection against experimental pancreatitis, observed after general anaesthesia and jugular vein catheterization.

Pancreas. **2004** Mar; 28(2): 166-173

Plumier JC, Currie RW

Heat shock-induced myocardial protection against ischemic injury: a role for Hsp70?

Cell Stress Chaperones. **1996** Apr; 1(1): 13-17

Pockley AG

Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents?

Expert Rev Mol Med. **2001** Sep; 2001: 1-21

Poss KD, Tonegawa S

Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells.

Proc Natl Acad Sci USA. **1997** Sep; 94(20): 10925-10930

Raeburn CD, Cleveland JC Jr, Zimmerman MA, Harken AH

Organ preconditioning.

Arch Surg. **2001** Nov; 136(11): 1263-1266

Rakonczay Z Jr, Takacs T, Boros I, Lonovics J

Heat shock proteins and the pancreas.

J Cell Physiol. **2003** Jun; 195(3): 383-391

Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nussler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG

Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?

Ann Surg. **2000** Mar; 231(3): 352-360

Redaelli CA, Wagner M, Kulli C, Tian YH, Kubulus D, Mazzucchelli L, Wagner AC, Schilling MK

Hyperthermia-induced HSP expression correlates with improved rat renal isograft viability and survival in kidneys harvested from non-heart-beating donors.

Transpl Int. **2001** Dec; 14(6): 351-360

Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T, Ledermann M, Baer HU, Dufour JF
Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1.
Hepatology. **2002** May; 35(5): 1082-1092

Rice-Evans C, Burdon R
Free radical-lipid interactions and their pathological consequences.
Prog Lipid Res. **1993**; 32(1): 71-110

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

Rosenberg DW, Drummond GS, Kappas A
The in vitro and in vivo inhibition of intestinal heme oxygenase by tin-protoporphyrin.
Pharmacology. **1989**; 39(4): 224-229

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

Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML
Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic
acini.
Am J Physiol. **1999**; 276(4 Pt 1): G 835-842

Sato H, Siow RC, Bartlett S, Taketani S, Ishii T, Bannai S, Mann GE
Expression of stress proteins heme oxygenase-1 and -2 in acute pancreatitis and
pancreatic islet betaTC3 and acinar AR42J cells.
FEBS Lett. **1997** Mar; 405(2): 219-223

Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Sevigny J,
Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FH, Soares MP
Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of
mouse-to-rat cardiac transplants.
J Immunol. **2001** Mar; 166(6): 4185-4194

Schäfer C, Clapp P, Welsh MJ, Benndorf R, Williams JA

HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells.

Am J Physiol. **1999** Dec; 277(6 Pt 1): C 1032-1043

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): 1-9

Schäfer C, Tietz AB, Göke B

Pathophysiology of acute experimental pancreatitis: lessons from genetically engineered animal models and new molecular approaches.

Digestion. **2005** May; 71(3): 162-172

Schoenberg MH, Buchler M, Beger HG

The role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis.

Free Radic Biol Med. **1992**; 12(6): 515-522

Schoenberg MH, Birk D, Beger HG

Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis.

Am J Clin Nutr. **1995** Dec; 62(6 Suppl): 1306 S-1314 S

Schulz HU, Niederau C, Klonowski-Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H

Oxidative stress in acute pancreatitis.

Hepatogastroenterology. 1999 Sep-Oct; 46(29): 2736-2750

Shibahara S, Sato M, Muller RM, Yoshida T

Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter.

Eur J Biochem. **1989** Feb; 179(3): 557-563

Singer MV

Latency of pancreatic fluid secretory response to intestinal stimulants in the dog.

J Physiol. **1983** Jun; 339: 75-85

Solomon TE

Control of exocrine pancreatic secretion.

In Johnson LR (editor): Physiology of the gastrointestinal tract
New York, Raven press, 1987

Steer ML, Meldolesi J

The cell biology of experimental pancreatitis.

New Engl J Med. 1987; 316(3): 144-150

Steer ML

Pathogenesis of acute pancreatitis.

Digestion. 1997; 58 Suppl 1: 46-49

Steinberg W, Tenner S

Acute Pancreatitis.

New England Journal of Medicine. 1994 Apr; 330(17): 1198-1210

Stocker R, Glazer AN, Ames BN

Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin.

Proc Natl Acad Sci USA. 1987 Aug; 84(16): 5918-5922

Stocker R

Induction of heme oxygenase as a defence against oxidative stress.

Free Radic Res Commun. 1990; 9(2): 101-112

Stocker R, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN

Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin.

Methods Enzymol. 1990; 186: 301-309

Strowski MZ, Sparmann G, Weber H, Fiedler F, Printz H, Jonas L, Göke B, Wagner AC

Caerulein pancreatitis increases mRNA but reduces protein levels of rat pancreatic heat shock proteins.

Am J Physiol. 1997 Oct; 273(4 Pt 1): G 937-945

Tashiro M, Ernst SA, Edwards J, Williams JA

Hyperthermia induces multiple pancreatic heat shock proteins and protects against subsequent arginine-induced acute pancreatitis in rats.

Digestion. 2002; 65(2): 118-126

Teich N, Mossner J, Keim V

Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis.

Hum Mutat. **1998**; 12(1): 39-43

Threadgold J, Greenhalf W, Ellis I, Howes N, Lerch MM, Simon P, Jansen J, Charnley R, Laugier R, Frulloni L, Olah A, Delhaye M, Ihse I, Schaffalitzky de Muckadell OB, Andren-Sandberg A, Imrie CW, Martinek J, Gress TM, Mountford R, Whitcomb D, Neoptolemos JP.

The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease.

Gut. **2002** May; 50(5): 675-681

Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM

Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs.

J Mol Biol. **1974** Apr; 85(3): 389-398

Tyrrell RM, Basu-Modak S

Transient enhancement of heme oxygenase 1 mRNA accumulation: a marker of oxidative stress to eukaryotic cells.

Methods Enzymol. **1994**; 234: 224-235

Uchinami H, Yamamoto Y, Kume M, Yonezawa K, Ishikawa Y, Taura K, Nakajima A, Hata K, Yamaoka Y

Effect of heat shock preconditioning on NF-kappaB/I-kappaB pathway during I/R injury of the rat liver.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **2002** Jun; 282(6): G 962-971

Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM

Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts.

Proc Natl Acad Sci USA. **1994** Mar; 91(7): 2607-2610

Vogt BA, Alam J, Croatt AJ, Vercellotti GM, Nath KA

Acquired resistance to acute oxidative stress. Possible role of heme oxygenase and ferritin.

Lab Invest. **1995** Apr; 72(4): 474-483

Vogt BA, Shanley TP, Croatt A, Alam J, Johnson KJ, Nath KA

Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury.

J Clin Invest. **1996** Nov; 98(9): 2139-2145

Wagner AC, Weber H, Jonas L, Nizze H, Strowski M, Fiedler F, Printz H, Steffen H, Göke B

Hyperthermia induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rats.

Gastroenterology. **1996** Nov; 111(5): 1333-1342

Weber CK, Gress T, Muller-Pillasch F, Lerch MM, Weidenbach H, Adler G

Supramaximal secretagogue stimulation enhances heat shock protein expression in the rat pancreas.

Pancreas. **1995** May; 10(4): 360-367

Weber H, Wagner AC, Jonas L, Merkord J, Hofken T, Nizze H, Leitzmann P, Göke B, Schuff-Werner P

Heat shock response is associated with protection against acute interstitial pancreatitis in rats.

Dig Dis Sci. **2000** Nov; 45(11): 2252-2264

Webster PD, Singh M, Tucker PC, Black O

Effects of fasting and feeding on the pancreas.

Gastroenterology. **1972** Apr; 62(4): 600-605

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD

Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene.

Nat Genet. **1996**; 14(2): 141-145

Whitcomb DC

Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis.

Gut. **1999** Sep; 45(3): 317-322

Whitcomb DC

How to think about SPINK and pancreatitis.

Am J Gastroenterol. **2002** May; 97(5): 1085-1088

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

Signal transduction and intracellular signaling in pancreatic acinar cells.

Current opinion in Gastroenterology. **1995**; 11: 397-401

Williams JA, Groblewski GE, Ohnishi H, Yule DI

Stimulus-secretion coupling of pancreatic digestive enzyme secretion.

Digestion. **1997**; 58 Suppl 1: 42-45

Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M
Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis.

Nat Genet. **2000 Jun**; 25(2): 213-216

Witt H, Simon P, Lerch MM

Genetic aspects of chronic pancreatitis

Dtsch Med Wochenschr. **2001 Sep**; 126(36): 988-993

Witt H

The SPINK in chronic pancreatitis: similar finds, different minds.

Gut. **2002 May**; 50(5): 590-591

Wong HR, Wispe JR

The stress response and the lung.

Am J Physiol. **1997 Jul**; 273(1Pt1): L 1-9

Woo J, Iyer S, Cornejo MC, Mori N, Gao L, Sipos I, Maines M, Buelow R

Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32).

Transpl Immunol. **1998 Jun**; 6(2): 84-93

Yet SF, Melo LG, Layne MD, Perrella MA

Heme oxygenase 1 in regulation of inflammation and oxidative damage.

Methods Enzymol. **2002**; 353: 163-176

Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH

Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide.

Proc Natl Acad Sci USA. **1997** Dec; 94(26): 14848-14853

Zhou W, Levine BA, Olson MS

Platelet-activating factor: a mediator of pancreatic inflammation during cerulein hyperstimulation.

Am J Pathol. **1993** May; 142(5): 1504-1512

10. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Andreas Wagner herzlich danken für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die hervorragenden Möglichkeiten des selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens, sowie der sehr guten Betreuung der Arbeit. Seine kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit, wie auch die motivierenden Diskussionen und Gespräche waren mir eine große Hilfe und haben den Fortgang der Arbeit entscheidend beeinflusst.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. Claus Schäfer, der mich in meiner Arbeit sehr unterstützt 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 Dr. Irmgard Plössl und Frau Dr. med. Constanze Kubisch möchte ich mich für die Einarbeitung und die Einweisung in experimentelle Techniken im Labor, die hervorragende Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen, die freundliche und geduldige Unterstützung herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich mit beigetragen haben. Ein weiterer Dank gilt Frau Claudia Jäger für ihre Hilfsbereitschaft beim experimentellen Arbeiten.

Mein Dank gilt allen Kollegen des Arbeitskreises für ihre Hilfsbereitschaft und für das überaus angenehme Klima im Labor, Herrn Prof. Dr. med. Joachim Diebold für die Hilfe bei der Anfertigung histologischer Präparate und der Deutschen Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Sebastian Fiedler und Tobias Brandt für Ihre Unterstützung bei technischen und graphischen Problemen, sowie all meinen Freunden für ihre Hilfe, Aufmunterung und Unterstützung, nicht nur während der Doktorarbeit, bedanken.

Danken möchte ich ganz besonders auch meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für die anhaltende Unterstützung, die mir das Medizinstudium und diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben und auf deren Rückhalt ich jederzeit bauen konnte.

11. Lebenslauf

Zur Person

Tobias Gebhardt

geboren am 09.08.1974 in Wiesbaden

ledig

Schulausbildung

| | |
|-----------|---|
| 1980-1984 | Grundschule in Homburg/Saar |
| 1984-1985 | Gymnasium Vaterstetten bei München |
| 1985-1992 | Gymnasium Oberalster, Hamburg |
| 1992-1994 | Gymnasium Adolfinum, Bückeberg, Niedersachsen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife |

Wehrdienst

| | |
|-----------|--|
| 1994-1996 | Wehrdienst im Gebirgsjägerbataillon 233 in Mittenwald, Bayern Ausbildung im Sanitätsdienst und in der Bergrettung |
| 1996 | Erfolgreicher Abschluss an der Offizierschule des Heeres in Hannover |

Universitäre Ausbildung

| | |
|-----------|---|
| 1997-2004 | Studium der Humanmedizin an der LMU, München |
| Aug. 2000 | Ärztliche Vorprüfung an der LMU |
| Aug. 2001 | Erstes Staatsexamen an der LMU |
| Sep. 2003 | Zweites Staatsexamen an der LMU |
| Nov. 2004 | Drittes Staatsexamen an der LMU Ärztliche Prüfung (Gesamtnote 2,33) und Approbation als Arzt |

Beruflicher Werdegang

| | |
|----------------|---|
| seit Feb. 2005 | Assistenzarzt in der Allgemein- und Viszeralchirurgie, Akademisches Lehrkrankenhaus der LMU, Klinikum München-Neuperlach |
|----------------|---|