

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B
- Komm. Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. K. Hengst -

**Charakterisierung einer Cerulein-induzierten Pankreatitis in der
rezessiven gelben (e/e) Maus mit einer funktionellen Defizienz für den
Melanocortin-1-Rezeptor**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Dirk Oliver Wennmann

aus Dinslaken

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. W. Domschke

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. R. Schaefer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.10

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B
- Komm. Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med K. Hengst -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. W. Domschke
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. R. Schaefer

Zusammenfassung

Charakterisierung einer Cerulein-induzierten Pankreatitis in der rezessiven gelben (e/e) Maus mit einer funktionellen Defizienz für den Melanocortin-1-Rezeptor

Dirk Oliver Wennmann

Ziel der Experimente ist der Vergleich der Cerulein-induzierten Pankreatitis zwischen gelben rezessiven (e/e) Mäusen und Wildtypmäusen. Gelbe rezessive (e/e) Mäuse haben eine funktionelle Defizienz des Melanocortin 1 Rezeptors. Bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen ergeben sich Hinweise für eine milder verlaufende Pankreatitis, obwohl der Ausfall eines in der Literatur als antiinflammatorisch beschriebenen Rezeptors einen schwereren Verlauf hätte erwarten lassen. Bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen ließ sich kein signifikanter Anstieg der Serum-Amylase während der Pankreatitis beobachten; histologisch fanden sich Zeichen einer Pankreatitis. In der Lunge der gelben rezessiven (e/e) Mäuse ließ sich eine systemische Komponente der Pankreatitis in Form von histologischen Veränderungen und einer Zunahme der MPO-Aktivität nachweisen. Die Frage nach demjenigen Zelltyp, über den der MC1-Rezeptor seinen Einfluss auf die Pankreatitis ausübt, lässt sich abschließend nicht beantworten. Im Western-Blot gelang der Nachweis des MC1-Rezeptors im Pankreas nicht. Eine epitheliale Expression des MC1-Rezeptors im Pankreas ist in der Literatur nicht beschrieben. Auf Leukozyten ließ sich der MC1-Rezeptor in der Immunfluoreszenz im Pankreasgewebe während der Entzündung in den Experimenten nachweisen. Die Expression des MC1-Rezeptors auf Leukozyten ist in der Literatur ausführlich dargestellt. In verschiedenen experimentellen Ansätzen zu Entzündungsreaktionen in der gelben rezessiven (e/e) Maus und zur Rolle des MC1-Rezeptors ergeben sich Hinweise, dass der MC1-Rezeptor keine Schlüsselrolle im Entzündungsgeschehen spielt, und möglicherweise andere Rezeptoren wie der MC3-Rezeptor von größerer Bedeutung sind.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.10

Aktenzeichen tierexp. Genehmigung: 50.0835.1.0 (G 29/2000)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie der Pankreatitis	1
1.2 Biochemische Aspekte der akuten Pankreatitis	2
Abbildung 1.1: Enzymsynthese im Pankreas	3
Abbildung 1.2: Pathologische Prozesse in der Azinuszelle	4
1.3 Tiermodelle der akuten Pankreatitis	2
1.4 Proteasenaktivierung in der akuten Pankreatitis	5
Abbildung 1.3: Trypsinogenaktivierung	5
1.5 Leukozyten in der akuten Pankreatitis	8
1.6 Melanocortin-Rezeptoren	11
1.6.1 Melanocortin 1 Rezeptor (MC1-Rezeptor)	11
1.6.2 Melanocortin 2 Rezeptor	13
1.6.3 Melanocortin 3 Rezeptor	13
1.6.4 Melanocortin 4 Rezeptor	13
1.6.5 Melanocortin 5 Rezeptor	13
1.7 Die Liganden der Melanocortin-Rezeptoren	14
1.8 Antagonisten der MC-Rezeptoren (AGOUTI)	15
Abbildung 1.4: Melanocortin-Peptide	15
1.9 Antiinflammatorische Eigenschaften des Melanocortinsystems	16
1.10 Mäuse mit einer funktionellen Defizienz des Melanocortin 1 Rezeptors	17
Abbildung 1.5: Aminosäuresequenz des Melanocortin 1 Rezeptors	18
Abbildung 1.6: trunkierter Melanocortin 1 Rezeptor	18

2 Zielsetzung der Arbeit

3 Material

3.1 Geräte	21
3.2 Enzyme, Substrate, Antikörper und Primer	22
3.2.1 Substrate für Enzymaktivitätsmessungen im Fluorometer	22
3.2.2 Enzyme	22
3.3 Puffer, Medien und Lösungen	22
3.4 Versuchstiere	24

3.5 Chemikalien	24
4 Methoden	25
4.1 Tierhaltung	25
4.2 Induktion einer Caerulein-Pankreatitis bei der Maus	25
4.3 Probengewinnung	25
4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	26
4.5 Isolierung von Mauspankreasazini	26
4.6 Gewinnung von Pankreashomogenaten	27
4.7 Proteinkonzentrationsbestimmung	27
4.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
4.9 Immunoblot	28
4.10 Immunhistochemie	29
4.11 Enzymaktivitätsmessungen	30
4.11.1 Messung der Amylaseaktivität im Serum	30
4.11.2 Messung der Amylaseaktivität im Pankreashomogenat	30
4.11.3 Messung der Trypsinaktivität im Pankreashomogenat	30
4.11.4 Messung des Trypsinogens im Pankreashomogenat	31
4.11.5 Messung der Elastaseaktivität im Pankreashomogenat	31
4.11.6 Messung der Cathepsin B Aktivität im Pankreashomogenat	31
4.11.7 Messung der Cathepsin B Aktivität im Serum	32
4.12 Aufreinigung von Antikörpern aus Hühnereigelb	32
4.13 Statistische Analyse	32
4.14 Messung der Myeloperoxidaseaktivität (MPO) im Lungenhomogenat	33
5 Ergebnisse der Experimente	34
5.1 Charakterisierung der Cerulein-induzierten Pankreatitis bei Wildtyp- und gelben rezessiven (e/e) Mäusen	34
5.2 Aktivität der Serum-Amylase in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	34
Abbildung 5.1: Amylaseaktivität im Serum.	35

5.3 Amylaseaktivität im Pankreashomogenat in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	35
Abbildung 5.2: Amylaseaktivität im Pankreashomogenat.	36
5.4 Morphologische Veränderungen des Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	37
5.4.1 Makroskopische Veränderungen des Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	37
5.4.2 Histologische Veränderungen des Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	37
5.4.2.1 Haematoxylin-Eosin Färbung des Pankreas	37
Abbildung 5.3: HE Färbung des Pankreas vor und nach der Behandlung mit Cerulein	38
Abbildung 5.4: HE Färbung des Pankreas vor und nach der Behandlung mit Cerulein	39
5.5 Systemischer Schaden in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	39
5.5.1 Haematoxylin-Eosin Färbung der Lunge	39
Abbildung 5.5: HE Färbung der Lungen vor nach Behandlung mit Cerulein	40
5.5.2 Messung der Myeloperoxidase im Lungenhomogenat	41
Abbildung 5.6: Myeloperoxidaseaktivität im Lungenhomogenat	42
5.6 Trypsin- und Trypsinogenaktivität im Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	42
Abbildung 5.7: Trypsinogen im Pankreashomogenat	43
Abbildung 5.8: Trypsin im Pankreashomogenat	44
Abbildung 5.9: Trypsinaktivierung	45
5.7 Cathepsin B Aktivität im Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	45
Abbildung 5.10: Cathepsin B Aktivität im Serum	46
Abbildung 5.11: Cathepsin B Aktivität im Pankreashomogenat	47
5.8 Elastaseaktivität im Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis	47
Abbildung 5.12: Elastase Aktivität im Pankreashomogenat	48
5.9 Lokalisation von iNOS in der Cerulein-induzierten Pankreatitis mittels indirekter Immunfluoreszenz	48
Abbildung 5.13: Indirekte Immunfluoreszenz iNOS im Pankreashomogenat	49
5.10 Lokalisation von neutrophilen Granulozyten im Pankreasgewebe mittels indirekter Immunfluoreszenz der Myeloperoxidase	50

Abbildung 5.14: Indirekte Immunfluoreszenz Myeloperoxidase im Pankreashomogenat.	51
5.11 Lokalisation des MC1-Rezeptors in der Cerulein-induzierten Pankreatitis mittels indirekter Immunfluoreszenz	51
Abbildung 5.15: Indirekte Immunfluoreszenz MC1-Rezeptor im Pankreas	52
5.12 Immunisierung und Aufreinigung eines Antikörpers gegen den MC1-Rezeptor	53
Abbildung 5.16: Auftrennung der Hühner-AK gegen den MC1-Rezeptor nach dem Molekulargewicht im Coomassie gefärbten Polyacrylamid-Gel	54
5.12.1 Testung des IgY-Antikörpers im Westernblot	54
5.12.2 Nachweis eines Proteins durch den Hühner-(IgY)-Antikörper im Pankreashomogenat	54
Abbildung 5.17: Western Blot; Pankreashomogenate; Hühner-(IgY)-Antikörper	55
5.12.3 Nachweis eines Proteins durch den Hühner-(IgY)-Antikörper im Azinuszellen	55
Abbildung 5.18: Western Blot; Azinuszellhomogenate	56
6 Diskussion	57
6.1 Charakterisierung der Cerulein-induzierten Pankreatitis in der gelben rezessiven (e/e) Maus	59
6.2 MC1-Rezeptor-Expression in der Pankreatitis	66
6.3 Antiinflammatorische Aktivität des MC1-Rezeptors	68
6.4 Einfluss von Entzündungszellen auf die Pankreatitis	71
6.5 Die Rolle anderer Melanocortinrezeptoren in der Entzündung / Gelbe rezessive (e/e) Mäuse im Tiermodell	73
7 Zusammenfassung	76
8 Literaturverzeichnis	78
9 Abkürzungen	91
10 Danksagung	93
11 Lebenslauf	93
12 Abstract	96
13 Anhang	97

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie der Pankreatitis

Die Entzündung der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) ist eine der häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen. An der akuten Verlaufsform erkranken in Deutschland jährlich etwa 15-40 Menschen pro 100 000 Einwohner [39; 47]. Klinisch lässt sich neben der akuten ödematösen Verlaufsform eine chronische unterscheiden, deren Inzidenz mit zwei bis zehn Fällen pro 100 000 Einwohner pro Jahr beziffert werden kann [5; 67; 93]. Die häufigste Ursache einer akuten Bauchspeicheldrüsenentzündung (Pankreatitis) ist bei Männern auf Alkoholkonsum zurück zu führen, bei Frauen dominieren Gallensteine [53]. Neben diesen Ursachen spielen Schock [136], stumpfes Trauma, operative Eingriffe, Medikamente (z.B. Azathioprin, Furosemid, Valproinsäure), Toxine [42], Bakterien (z.B. Salmonellen), Viren (z.B. Mumps), Fettstoffwechselstörungen und Hyperkalzämie [35] eine ätiologische Rolle. In den letzten Jahren hat der Anteil der „idiopathischen“ Pankreatitiden zugunsten der hereditären Formen abgenommen. Insbesondere spielen hier Mutationen im kationischen Trypsinogen-Gen sowie im Gen des Serinproteasen-Inhibitors vom Kasal-Typ (SPINK) eine Rolle [124].

Die genaue Pathogenese der akuten, ödematösen, nichtinfektiösen Pankreatitis ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Die bisherigen Erkenntnisse beruhen auf Beobachtungen in Tiermodellen und bei isolierten Zellen. Schon sehr früh hat sich die Vorstellung eines Selbstverdaus (Autodigestion) des Organs durchgesetzt. Bereits 1896 stellte Chiari den Selbstverdau durch die eigenen Verdauungsenzyme in den Mittelpunkt der Betrachtung [27].

Zurzeit wird die vorzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymvorstufen (Zymogene) in den Zymogengranula der Azinuszellen, in denen die Zymogene gespeichert werden, als einer der ersten Schritte im Verlauf der Erkrankung angesehen [12].

1.2 Biochemische Aspekte der akuten Pankreatitis

Die Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse synthetisieren Verdauungsenzyme in einer inaktiven Form als sogenannte Zymogene und speichern diese in intrazellulären Transportvesikeln, die als Zymogengranula bezeichnet werden. Die Azinuszellen werden durch Botenstoffe wie Acetylcholin oder Cholecystokinin (CCK) angeregt, die Zymogene mittels Exozytose aus den Zellen herauszuschleusen [113; 137]. Dazu bindet Acetylcholin und Cholecystokinin an Transmembranrezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind [13]. Cholecystokinin (CCK), ein gastrointestinales Hormon, bindet an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Es sind zwei verschiedene Cholecystokinin-Rezeptoren, Typ A und Typ B, bekannt. Der Typ A Rezeptor vermittelt eine kalziumabhängige Signaltransduktionskaskade, die Wirkung des Typ B Rezeptors ist noch nicht geklärt.

Die Azinuszelle gibt die Verdauungsenzyme durch Exozytose in das Gangsystem ab. Von dort gelangen die Enzyme passiv in das Duodenum. Kalzium spielt auf der Ebene der Zelle eine entscheidende Rolle als Second Messenger, indem die Konzentration an freiem Kalzium in der Zelle den Mechanismus der Exozytose steuert [135].

1.3 Tiermodelle der akuten Pankreatitis

Zur Erforschung der Pathogenese der Pankreatitis sind verschiedene Tiermodelle entwickelt worden, da Azinuszellen in der Zellkultur sehr schnell ihre physiologische Funktion verlieren und nicht mehr hormonell zur Sekretion von Verdauungsenzymen angeregt werden können [30]. Verschiedene Modelle wurden entwickelt, die allerdings die komplexen Abläufe im Menschen nur unzureichend imitieren können. Alle haben zur Aufklärung verschiedener Aspekte der Pankreatitis beigetragen. Zu diesen Modellen gehört das Hyperstimulationsmodell nach Adler und Lampel [2; 74], die Cholin-defiziente und mit Ethionin supplementierte Diät [127], die Taurocholol-induzierte Pankreatitis [76] und das Gallengangs-Obstruktionsmodell [80].

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit dem Hyperstimulationsmodell nach Adler und Lampel erzielt. Die Pankreatitis ist bei gelben rezessiven (e/e)

Mäusen und C57BL6 Mäusen im Alter zwischen 12 und 20 Monaten, bei einem Gewicht von 25-30 g, nach 18 stündigem Fasten bei unbegrenztem Zugriff auf Wasser induziert worden. Die Induktion der Pankreatitis erfolgt durch sieben intraperitoneale Injektionen von Cerulein in einer Dosis von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht pro Stunde. Einer Kontrollgruppe wird parallel 0.9 % NaCl Lösung intraperitoneal appliziert. Dieses Tiermodell ist ideal geeignet, um eine akute ödematöse Pankreatitis zu induzieren, weil es minimal-invasiv ist, zu einer signifikanten Aktivierung von Trypsinogen im Pankreas führt, und es Pankreatitis-typische lokale und systemische Veränderungen, wie Amylaseaktivitätserhöhung im Serum und systemische Entzündungszeichen, hervorruft. Diese Symptome sind auch beim Menschen von Bedeutung. Im Rahmen dieses Tiermodelles kommt es zu einer Dissoziation der Azinuszellen durch Auflösung der Zell-Zell-Kontakte [77] und zu einer Bildung von intrazellulären Vakuolen [79]. Diese Veränderungen können auch in der Pankreatitis beim Menschen beobachtet werden.

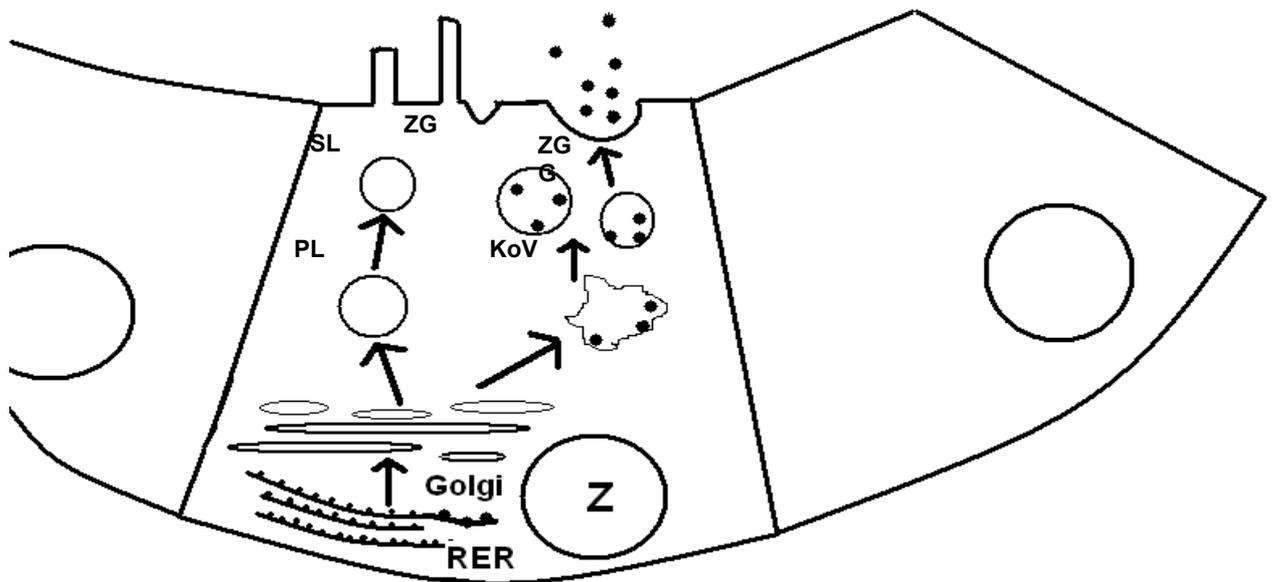


Abbildung 1.1: Enzymsynthese und -sekretion im exokrinen Pankreas

- Z: Zellkern
 RER: Raues endoplasmatisches Retikulum
 Golgi: Golgi-Komplex

- PL: Primäres Lysosom
 S: Sekundäres Lysosom
 KoV: Kondensierende Vakuole
 ZG: Zymogengranula

Die Synthese der Proteine erfolgt im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER). Die sekretorischen Proteine werden in kondensierenden Vakuolen verpackt und reifen zu Zymogengranula, die am apikalen Pol in das Gangsystem des Pankreas exozytiert werden.

Im Tiermodell der Cerulein-induzierten Pankreatitis kommt es zu einer supramaximalen Stimulation des Pankreas. Die Störung des Kalziumsignalweges durch supramaximale Mengen an Cerulein, stellt eine mögliche Erklärung für den Mechanismus der Entstehung der akuten Pankreatitis im Tiermodell dar [16; 135].

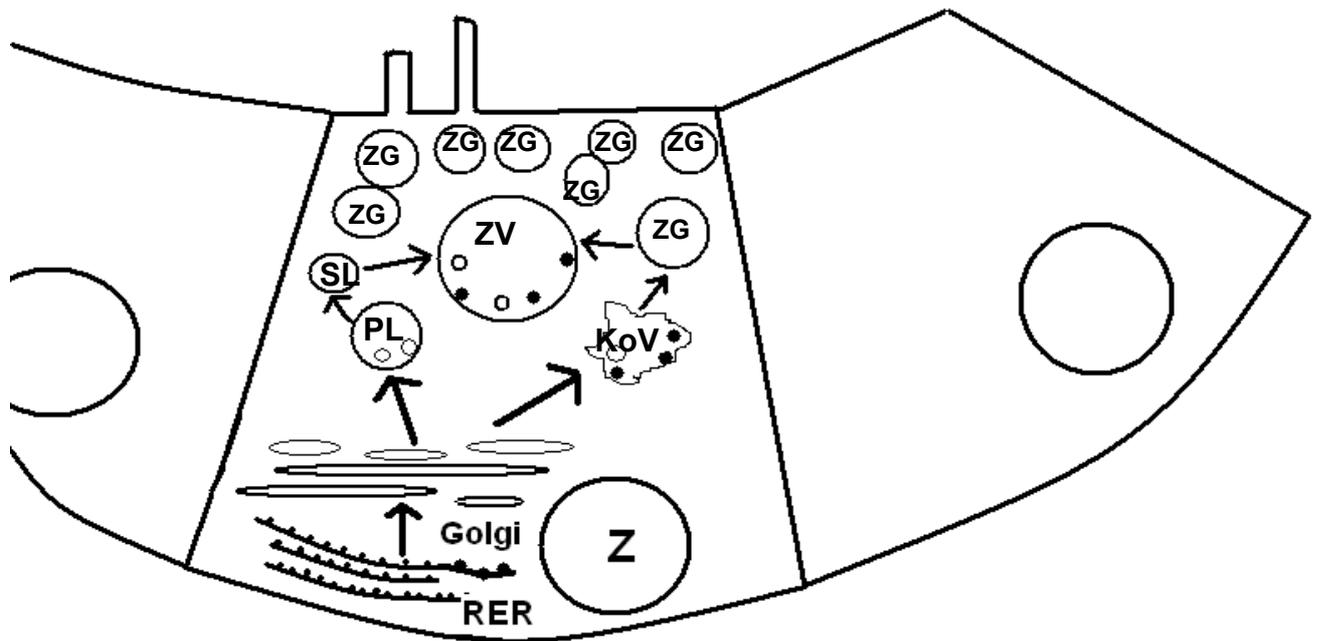


Abbildung 1.2: Pathologische Prozesse in der Azinuszelle

- Z: Zellkern
 RER: Raues endoplasmatisches Retikulum
 Golgi: Golgi-Komplex
 PL: Primäres Lysosom
 S: Sekundäres Lysosom
 KoV: Kondensierende Vakuole

ZG: Zymogengranula

Die Enzymsekretion wird in der Initialphase der Pankreatitis blockiert. Als Folge kommt es zu einer Anreicherung der Azinuszelle mit Zymogengranula. Die lysosomalen Hydrolasen (weiße Punkte) werden zu den sekretorischen Proteinen (schwarze Punkte) in den zytoplasmatischen Vakuolen umverteilt. In diesen Vakuolen kommt es zur Aktivierung der Verdauungsenzymvorstufen.

1.4 Proteasenaktivierung in der akuten Pankreatitis

Trypsin gehört zur Gruppe der Serinproteasen, die in Azinuszellen des Pankreas synthetisiert und als inaktive Vorstufe in Form von Trypsinogen in das Ausführungsgangsystem des Pankreas und letztendlich in das Darmlumen sezerniert wird. Die Idee, dass Verdauungsenzyme eine bedeutende Rolle in der akuten Pankreatitis spielen, ist bereits vor 100 Jahren postuliert worden [27]. Trypsinogen wird im Darmlumen durch Enterokinase in aktives Trypsin überführt. Enterokinase spaltet vom Trypsinogen ein 10 Aminosäuren großes Peptid am N-terminalen Ende des Proteins ab, das als „Trypsinogen Activation Peptide“ (TAP) bezeichnet wird [61]. Das aktivierte Trypsin kann anschließend Enzymvorstufen aus dem Pankreas in ihre aktiven Formen überführen.

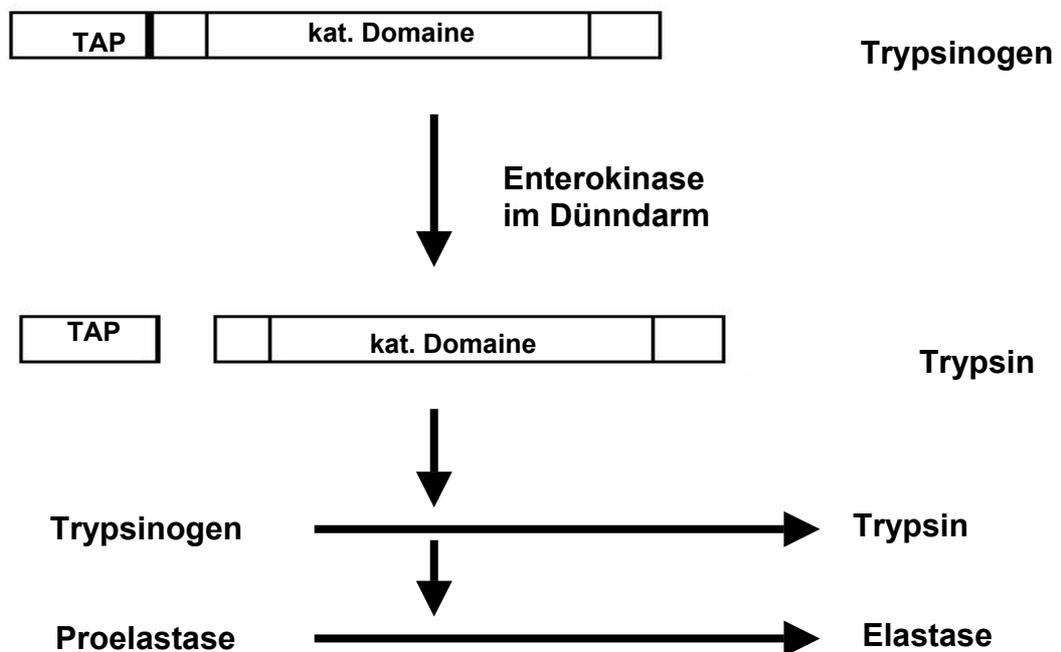


Abbildung 1.3: Trypsinogenaktivierung

Vom Trypsinogen wird im Dünndarm von der Enterokinase ein Peptid (TAP, trypsinogen activation peptide) abgespalten. Aktiviertes Trypsin kann weitere Enzymvorstufen in aktive Peptide überführen.

Der erste Schritt der intrazellulären Zymogenaktivierung während der Pankreatitis ist nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die Trypsinaktivierung in Vakuolen, die in der akuten Pankreatitis in den Azinuszellen vorkommen (s.o.), stattfindet [72; 140]. Ein weiterer Hinweis für die Aktivierung des Trypsinogens in diesen Vakuolen ist der Nachweis von Trypsinogen Activation Peptide in den beschriebenen Vakuolen [108]. Experimente mit Protease-Inhibitoren, die gezielt die Trypsinaktivität hemmen, zeigten eine Verringerung des Schweregrades der Pankreatitis [75].

Die hereditäre Pankreatitis hat ihren Ursprung in Mutationen des kationischen Trypsinogen-Gens. Bei der Mutation R122H wird Trypsin für die Autolyse durch Trypsin resistent; dies trägt vermutlich zur Entstehung der hereditären Pankreatitis bei [122].

Fluoreszenzmikroskopisch kann die Trypsinogenaktivierung in isolierten Azinuszellen dargestellt und Minuten nach dem Kontakt der Zellen mit supramaximalen Dosen von Cerulein beobachtet werden. In den Azinuszellen kann der Ort der Aktivierung weiter auf das Kompartiment der Sekretgranula eingegrenzt werden [72]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Rolle des Trypsinogens/Trypsins und der Azinuszellen in der akuten Pankreatitis.

Neue Ergebnisse zeigen, dass Trypsin in der Kaskade der intrazellulären Aktivierung von Trypsinogen möglicherweise nicht so entscheidend ist wie zuvor angenommen, da eine vollständige Inhibition von intrazellulärem Trypsin mit hochspezifischen Enzyminhibitoren die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin nicht beeinflusst. Außerdem wird beobachtet, dass nach dem Entfernen der Trypsin-Inhibitoren, 80% des Trypsins direkt durch Trypsin abgebaut wird [55]. Trypsin könnte also einen protektiven Einfluss ausüben, indem es aktive Verdauungsenzyme, einschließlich aktiven Trypsins, abbaut.

Nach älteren Hypothesen ist eine Fehlsortierung von Enzymen in Azinuszellen für die Trypsinogenaktivierung verantwortlich. Die Theorie, dass in den

Azinuszellen eine genaue Sortierung der synthetisierten Enzyme stattfindet kann neueren Untersuchungen nach nicht aufrecht erhalten werden. Man nahm an, dass die Verdauungsenzymvorstufen in den apikalen Pol der Zelle befördert werden, um in den Zymogengranula bis zu ihrer Sekretion in das Ausführungssystem zwischengespeichert zu werden, während lysosomale Enzyme gezielt zu den Lysosomen transportiert werden [36].

Zu den lysosomalen Proteinen gehört die Cystein Proteinase Cathepsin B. Von diesem Enzym ist bekannt, dass es Trypsinogen in Trypsin überführen kann. [36] Durch Zentrifugieren können aus Gewebshomogenaten subzelluläre Fraktionen aufgetrennt werden. Auf diese Weise können die Zymogengranula in einer Fraktion angereichert werden. Trennt man die Zymogengranula aus dem Pankreas von Cerulein behandelten Mäusen oder Ratten auf, findet man hier Cathepsin B [107]. Daher wurde postuliert, dass in der Cerulein induzierten Pankreatitis eine Umverteilung von Cathepsin B von den Lysosomen in die Zymogengranula stattfindet und es dort zu einer Trypsinogenaktivierung kommt. Das aktive Trypsin kann anschließend andere Verdauungsenzymvorstufen aktivieren, die im aktiven Zustand für den zellulären Schaden verantwortlich sind.

Bei Cathepsin B-defizienten Mäusen ist während der akuten Pankreatitis eine signifikant niedrigere intrazelluläre Trypsinogenaktivierung festgestellt worden. Ergebnisse aus diesem Tiermodell deuteten darauf hin, dass die intrazelluläre Trypsinogenaktivierung möglicherweise durch eine Kollokalisierung von Trypsinogen und Cathepsin B in den Zymogengranula hervorgerufen wird. Das Ausmaß der Nekrose im Pankreas ist durch die Defizienz von Cathepsin B und die damit einhergehende Verringerung der Trypsinogen-Aktivierung nur gering verändert. Die systemische Entzündung, die an der Entzündungsreaktion der Lunge ermittelt worden ist, ist bei den Cathepsin B defizienten Mäusen nicht geringer ausgeprägt [56].

Um die Rolle von Cathepsin B im menschlichen Pankreas zu erforschen, ist menschliches Pankreasgewebe durch Zentrifugation in Fraktionen aufgetrennt worden. In gesundem Gewebe wurde eine Kollokalisierung von Trypsin und Cathepsin B gefunden. Auch beim Menschen ist Cathepsin B in der Lage,

Trypsinogen in Trypsin zu überführen. Die Kolo-kalisation zeigt, dass die Umverteilung von Cathepsin B in die Zymogengranula für den Start der Pankreatitis nicht erforderlich ist, weil auch unter physiologischen Bedingungen die Enzyme im gleichen subzellulären Bereich vorkommen [125].

Die genaue Rolle von Cathepsin B ist weiter unklar, möglicherweise spielen weitere lysosomale Cathepsine (H, B, L oder andere) eine Rolle in der intrazellulären Verdauungsenzymaktivierung.

1.5 Leukozyten in der akuten Pankreatitis

Neue Untersuchungen zeigen die Bedeutung der Infiltration des Pankreas durch Leukozyten für die Entstehung einer akuten Pankreatitis. Während ältere Untersuchungen die Infiltration des Pankreas als ein spätes Ereignis in der Pankreatitis ansehen, kann die Untersuchung von Mayerle et al. [89] zeigen, dass schon in der ersten Stunde der Cerulein-induzierten Pankreatitis in der Ratte Leukozyten das Organ infiltrieren. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Elastase aus Granulozyten eine Rolle in der Auflösung der Zell-Zell-Kontakte und damit in der Infiltration des Organs mit Leukozyten spielt.

Im Verlauf einer Pankreatitis sind nach kurzer Zeit neben den Azinuszellen auch eine ganze Reihe weiterer Zelltypen involviert. Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten können mit den Azinuszellen interagieren. Von geschädigten Azinuszellen produzierte Zytokine aktivieren Leukozyten, die ihrerseits Zytokine sezernieren und zu einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) führen. Die im Pankreas gebildeten Zytokine gelangen in hoher Konzentration in das Pfortadersystem. Kupffer-Zellen werden aktiviert und produzieren proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1. Dieser „Zytokin-Boost“ führt zum Einen zu einer hohen Syntheserate von Akute-Phase-Proteine in der Leber, zum Anderen triggern die Zytokine eine Entzündung der Lunge [48]. Diese Entzündung der Lunge ist durch eine Infiltration mit Neutrophilen Granulozyten charakterisiert.

Der Kontakt der Leukozyten zu Endothelzellen wird über Proteine wie das „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) vermittelt. Unter physiologischen

Bedingungen wird ICAM-1 in den Endothelzellen nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert. Kommt es zur Entzündung, wird ICAM-1 in den Endothelzellen vermehrt synthetisiert. ICAM-1 knockout Mäuse zeigen eine schwächer ausgeprägte Entzündung des Pankreas und der Lunge [41].

Die Bedeutung des Verhältnisses von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen für den Schweregrad der Pankreatitis wird in IL-10 knockout Mäusen deutlich. Diese Mäuse zeigen in der Cerulein induzierten Pankreatitis eine geringere Entzündung der Lunge. Die Entzündung des Pankreas verläuft in knockout- und Wildtypmäusen gleich stark [49]. Diese Ergebnisse erlauben die Hypothese, dass das entzündete Pankreas Zytokine in die Zirkulation entlässt, die für die systemische Entzündungsreaktion und damit auch für die Entzündung der Lunge verantwortlich sind.

Die Azinuszellen selbst sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu bilden und damit die Entzündungsreaktion zu triggern. So ist bekannt, dass Azinuszellen TNF- α und IL-8 bilden können [102]. Diese Zytokine führen zur Infiltration durch Leukozyten in das Pankreas [41].

Die Cerulein-induzierte Pankreatitis ist bei Ratten induziert worden, die zuvor mit Neutrophilen-Serum behandelt worden sind. Die Trypsinaktivität im Pankreas und die Amylaseaktivität im Serum ist bei diesen Neutrophilen depletierten Ratten signifikant erniedrigt [52].

Die gleiche Arbeitsgruppe hat bei NADPH-Oxidase-defizienten und bei Myeloperoxidase-defizienten Mäusen mittels Cerulein eine Pankreatitis induziert. Das Fehlen der NADPH-Oxidase bei den Mäusen führt zu signifikant niedrigeren Trypsinaktivitäten im Pankreas. Außerdem steigt die Serumamylaseaktivität bei den NADPH-Oxidase-defizienten Mäusen signifikant geringer an. Die Myeloperoxidase-defizienten Mäuse zeigen einen mit Wildtypmäusen vergleichbaren Anstieg der Trypsinaktivität im Pankreas [52].

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Infiltration des Pankreas mit neutrophilen Granulozyten die Trypsinaktivität beeinflusst. Mittels Antikörpern gegen TAP kann gezeigt werden, dass die Trypsinogenaktivierung in den Azinuszellen des Pankreas stattfindet. Die Versuche mit NADPH-Oxidase defizienten Mäusen lassen Rückschlüsse darauf zu, dass möglicherweise reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) die Trypsinaktivität in Azinuszellen des Pankreas steuern. Diese Beobachtungen decken sich mit Beobachtungen in verschiedenen Pankreatitis Tiermodellen zu ROS [100; 123].

Um festzustellen, ob die Depletion der Neutrophilen durch Anti-Neutrophilen-Serum oder das Ausschalten der Kupfferzellen in der Leber den Schweregrad der akuten Cerulein-induzierten Pankreatitis verändern, und ob sich diese Effekte gegenseitig verstärken oder summieren, sind Mäuse mit Anti-Neutrophilen-Serum und Gadolinium-Chlorid behandelt worden. Gadolinium-Chlorid dient zur Inaktivierung der Kupffer-Zellen. Diese Gruppe ist mit Mäusen verglichen worden, die jeweils nur mit Anti-Neutrophilen-Serum oder Gadolinium-Chlorid behandelt worden sind. Die Depletion der Neutrophilen verringert den Schweregrad der Pankreatitis und den Lungenschaden. Die Inaktivierung der Kupffer-Zellen zeigt einen geringeren Effekt als die Depletion der Neutrophilen. Mäuse mit inaktivierten Kupffer-Zellen zeigen geringere Konzentrationen an IL-6 und IL-10. Der protektive Effekt der Neutrophilen-Depletion wird durch Inaktivierung der Kupffer-Zellen nicht verstärkt, auch kombinieren sich die Effekte nicht in ihrem Einfluss auf die Pankreatitis. Diese Experimente unterstreichen die Bedeutung der Entzündungszellen in der akuten Pankreatitis [98].

Die Analyse der Pankreatitisparameter von MRP14-Knockout-Mäusen im Tiermodell der Cerulein-induzierten Pankreatitis, zeigt einen verringerten Gewebsschaden, Ausbleiben eines Ödems und verringerte Trypsinaktivität im Pankreasgewebe. MRP 14 wird von neutrophilen Granulozyten gebildet und an die Umgebung abgegeben. MRP14 wirkt im Komplex mit dem Protein MRP8. Aufgereinigte MRP8/14 Komplexe sind in der Lage, Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Dieser Vorgang ist calciumabhängig. Die Zugabe von extrazellulärem Calcium macht den Vorgang reversibel. MRP8/14 spielt eine entscheidende Rolle in der Infiltration des Pankreas mit Granulozyten durch die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte der Azinuszellen. Das Fehlen des Proteins MRP14 führt neben einer geringeren Infiltration des Pankreas mit Granulozyten auch zu geringeren Trypsinaktivitäten im Pankreas [109].

Die neuen Erkenntnisse zur Bedeutung der Leukozyten in der Entstehung einer akuten Pankreatitis rücken diese Zellen vermehrt in den Mittelpunkt der Betrachtung.

1.6 Melanocortin-Rezeptoren

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der Cerulein-induzierten Pankreatitis bei rezessiven gelben (e/e) Mäusen. Diese Mäuse besitzen eine funktionelle Defizienz für den MC1-Rezeptor.

Es sind zur Zeit fünf Melanocortin-Rezeptoren bekannt (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R und MC5R). Sie gehören alle zu einer Gruppe von G-Protein gekoppelten, sieben Transmembrandomänen umfassenden Rezeptoren [28]. Die Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden, führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und damit zu einem Anstieg des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) [103].

Ein Anstieg des cAMP führt zur Aktivierung der Proteinkinase A, die verschiedene Proteine der Zelle phosphoryliert, unter anderem das „cAMP Response Element Binding Protein“, das in seinem aktivierten Zustand als Promotor an die DNA binden kann und somit Einfluss auf die Translation der DNA nimmt.

Melanocortinrezeptoren sind an ihrem N-terminalen Ende glykosyliert [1; 139].

1.6.1 Melanocortin 1 Rezeptor (MC1-Rezeptor)

Der Rezeptor besteht aus 317 Aminosäuren, die sieben Transmembrandomänen bilden und mit einem heterotrimeren G-Protein intrazellulär gekoppelt sind [103]. Die größte Affinität des Rezeptors besteht zum Liganden α -MSH, gefolgt von ACTH, β -MSH und γ -MSH.

Die Interaktion von α -MSH und dem MC1-Rezeptor spielt für die Pigmentation der Haut und der Haare eine entscheidende Rolle [105].

Melanocyten sind in der Lage, cAMP-abhängig rotes oder gelbes Phaeomelanin sowie schwarzes bzw. braunes Eumelanin zu bilden. Bei hoher Konzentration an cAMP wird in der Zelle das Enzym Tyrosinase durch die Proteinkinase A aktiviert. Tyrosinase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der

Synthese von Eumelanin [119]. Bindet α -MSH an MC1R auf Melanocyten steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration und folglich die Aktivität der Proteinkinase A, die dann die Tyrosinase aktiviert. Eumelanin wird in sogenannten Melanosomen gespeichert und an die umgebenden Keratinozyten weitergegeben. Für die Pigmentation ist das Eumelanin von größerer Bedeutung als das Phaeomelanin. Die Pigmentation der Keratinozyten schützt die DNA gegen den schädlichen Einfluss der ultravioletten Strahlung und damit den Organismus vor Karzinogenese. [126]. Das Verhältnis von Eumelanin und Phaeomelanin bestimmt die Hautfarbe und die Haarfarbe. Blasse Menschen mit einem geringen Gehalt an Eumelanin sind sonnenempfindlicher und haben ein erhöhtes Risiko an Hautkrebs zu erkranken. [97].

Neben der Adenohypophyse stellt die Haut selber einen großen Teil des α -MSH her. Es wird berichtet, dass Keratinozyten, Melanozyten und Langerhans-Zellen α -MSH produzieren [23]. Die genannten Zellen produzieren α -MSH in Abhängigkeit von ultravioletter Strahlung. α -MSH kann seine Wirkung daher nicht nur zentral von der Hypophyse kommend ausüben, sondern auch para- bzw. autokrin wirken [133].

Neben der Wirkung auf die Melanogenese hat der MC1-Rezeptor Einfluss auf das Immunsystem und die Entzündungsreaktion. Die Lokalisation auf vielen Zellen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems wie Makrophagen/Monozyten [120], Lymphozyten [6] mit antigenpräsentierender und zytotoxischer Funktion, neutrophilen Granulozyten [19], Astrozyten und Endothelzellen [57] zeigt die Bedeutung dieses Rezeptors.

Beim Menschen konnten in der nordeuropäischen und australischen Bevölkerung mehr als 30 verschieden Allele des MC1-Rezeptorgens nachgewiesen werden [104]. Einige Mutationen sind mit heller Hautfarbe und roten Haaren verbunden und werden überdurchschnittlich häufig bei Melanom-Patienten gefunden. Diese Mutationen erhöhen das Risiko an Hautkrebs zu erkranken um das Doppelte [97].

1.6.2 Melanocortin 2 Rezeptor

Der Melanocortin 2 Rezeptor besitzt ACTH als Liganden. ACTH bewirkt in der Nebennierenrinde eine Produktion von Steroidhormonen.

1.6.3 Melanocortin 3 Rezeptor

Der Melanocortin 3 Rezeptor wird im Gehirn exprimiert, wo er eine besondere Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme spielen soll. Melanocortin-3-defiziente Mäuse zeigen eine Störung ihrer Energiehomöostase und einen Anstieg der Körperfettmasse [24]. Dieser Rezeptor hat wie der MC1-Rezeptor Einfluss auf den Ablauf des Entzündungsgeschehens [45]. In der Literatur gibt es einen Verweis auf die Expression des MC3-Rezeptors im Pankreas [132]. Neuere Experimente zeigen auch einen Einfluss auf das Immunsystem (siehe Diskussion).

1.6.4 Melanocortin 4 Rezeptor

Der Melanocortin 4 Rezeptor wurde im Gehirn nachgewiesen. Hier spielt er ähnlich dem Melanocortin 3 Rezeptor eine wichtige Rolle in der Energiehomöostase [62].

Der Rezeptor hat Einfluss auf das sexuelle Verhalten und auf die Erektion [130]. Einflüsse auf das Entzündungsgeschehen sind nicht bekannt.

1.6.5 Melanocortin 5 Rezeptor

Der Melanocortin 5 Rezeptor lässt sich vor allem auf exokrinen Drüsen, z.B. im Pankreas, nachweisen [129]. Er findet sich auch auf B- und T-Lymphozyten [17; 121].

Die Affinität ist zum α -MSH am höchsten, dann folgt ACTH, und mit der niedrigsten Affinität bindet das γ -MSH.

Die direkte Zerstörung des Genlocus bei Mäusen erzeugt Tiere, die eine gestörte Thermoregulation aufweisen und vermindert Lipide aus ihren Talgdrüsen ausscheiden [26]. Hinweise auf eine Einflussnahme auf Entzündungsreaktionen sind nicht bekannt.

1.7 Die Liganden der Melanocortin-Rezeptoren

1977 ist erstmals ein Vorläufermolekül von ACTH/ α -MSH und β -lipotropin/ β -MSH in AtT-20 Tumorzellen aus der Hypophyse isoliert worden [85]. Das Proopiomelanocortin-Gen wurde 1979 zum ersten Mal geklont [90].

Das Protein Proopiomelanocortin (POMC) wird in Zellen der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) gebildet.

Die Adenohypophyse steht unter der Kontrolle hypothalamischer Kerngebiete. Diese Kerngruppen produzieren Releasing- oder Inhibiting-Hormone, die über axialen Transport zur Eminentia mediana gelangen und dort in ein Kapillarsystem entlassen werden. Diese Hormone gelangen dann über Portalgefäße zur Adenohypophyse, in der sie ein zweites Kapillarnetz durchströmen und ihre Zielzellen erreichen.

Neben der Hypophyse produzieren auch Zellen des Nucleus arcuatus, Nucleus tractus solitarii und des Hirnstammes POMC. In der Peripherie ist POMC-mRNA in Lymphozyten, Monozyten, Keratinozyten und Melanozyten nachgewiesen worden [14; 21; 22; 114; 115; 117]. Die Zellen, die im Hypothalamus und in der Hypophyse POMC produzieren, werden auch POMC-Zellen genannt.

POMC durchläuft nach der Translation eine Reihe von enzymatischen Veränderungen, die unter dem Namen Posttranslationales-Processing zusammengefasst werden [54]. Das System beruht auf dem Prinzip, dass das Vorläufermolekül (Precursor), in diesem Fall das POMC, durch Proteasen in kleinere aktive Proteine/Peptide gespalten wird [112]. Die aktiven Peptide werden von der Zelle freigesetzt. Die Enzyme, die für die intrazelluläre Spaltung des POMC verantwortlich sind, gehören zur Familie der Serin-Proteinasen. Sie werden als Precursor-Convertasen bezeichnet (PCs). In den POMC Zellen der Hypophyse sind in hoher Konzentration PC1 und PC2 nachgewiesen worden. Sie befinden sich in den Granula, die auch die Spaltprodukte des POMC enthalten. PC1 ist für die Spaltung des POMC in ACTH und β -LPH verantwortlich, PC2 spaltet POMC in α -MSH und β -Endorphin.

PC1 und PC2 werden in verschiedenen Regionen der Adenohipophyse in unterschiedlichen Mengen produziert [8]. Dadurch können unterschiedliche Regionen der Adenohipophyse unterschieden werden, z.B. die Pars intermedia der Hypophyse, in der vor allem α -MSH und β -Endorphin produziert werden, und in der entsprechend PC2 von den Zellen synthetisiert wird [87]. ACTH, α -MSH, β -Endorphin, β -LPH, β -MSH und γ -MSH sind Spaltprodukte des POMC. Alle Melanocortin Peptide besitzen eine gemeinsame Sequenz von vier Aminosäuren His-Phe-Arg-Trp, die in allen Spaltprodukten enthalten ist.

1.8 Antagonisten der MC-Rezeptoren (AGOUTI)

Es sind zwei Proteine bekannt, die als Antagonisten an Melanocortin-Rezeptoren wirken. Agouti („agouti signaling protein“) wirkt als kompetitiver Antagonist mit hoher Affinität am MC1-Rezeptor [95; 96]. Mäuse, die das dominante Agouti-Allel „lethal yellow“ tragen, zeigen eine stärkere Entzündungsantwort als Kontrolltiere [83].

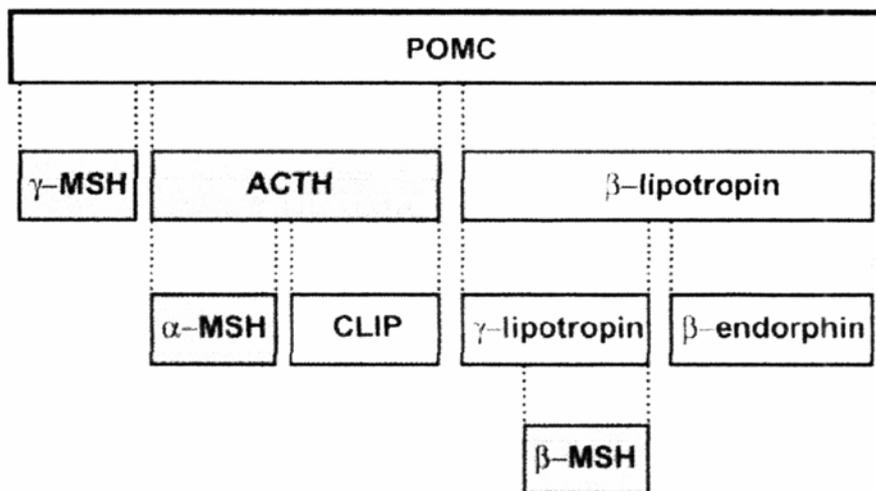


Abbildung 1.4: Melanocortin-Peptide

Entstehung durch Posttranslationales-Processing des POMC; CLIP: corticotropin-like intermediate lobe peptide (nach Catania et al., 2004)

1.9 Antiinflammatorische Eigenschaften des Melanocortinsystems

Es gibt Hinweise für die Expression des Melanocortin-1-Rezeptors auf vielen verschiedenen Zellen des Immunsystems [6; 9; 19; 57; 117; 120; 142]. Deshalb ist schon lange angenommen worden, dass α -MSH über diesen Rezeptor Einfluss auf das Immunsystem nimmt, zumal α -MSH die höchste Affinität zum MC1-Rezeptor aufweist.

Verschiedene Experimente haben diese Annahme bestätigt und gezeigt, dass α -MSH über den Melanocortin-1-Rezeptor antiinflammatorische Eigenschaften besitzt [64].

Bis zur Entdeckung, dass α -MSH über den MC1 Rezeptor die Aktivierung des Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) inhibiert und über diesen Weg die antiinflammatorische Wirkung ausübt, war der Wirkungsmechanismus des Peptids auf das Immunsystem unklar [86].

NF- κ B ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der zur Rel-Familie gehört. Das Protein liegt im Zytoplasma im inaktiven Zustand an Proteine der Familie I κ B (Inhibitor kappa B) gebunden vor [88]. Durch verschiedene äußere Einflüsse wird das Dimer aus NF- κ B und I κ B phosphoryliert und anschließend ubiquitiert. Das ubiquitierte I κ B wird in Proteasomen abgebaut, und das freigesetzte NF- κ B hat die Möglichkeit in den Zellkern zu gelangen und dort als Transkriptionsfaktor an Promotoren der DNA zu binden.

NF- κ B wirkt als Transkriptionsfaktor auf eine Vielzahl von Genen. Es werden Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren des hämatopoetischen Systems und die Inducible-Nitric-Oxide-Synthase (iNOS) beeinflusst [116].

α -MSH moduliert die NF- κ B -Aktivität über I κ B. Über die Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle durch α -MSH wird der Abbau des I κ B vermindert und damit die Wirkung des NF- κ B begrenzt [86]. Der begrenzende Effekt des α -MSH auf die Produktion von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren ist in Monozyten/Makrophagen- und Mikrogliazelllinien untersucht worden. α -MSH inhibiert die Produktion von TNF- α in Monozyten/Makrophagen-Zelllinien, die mit

Lipopolysacchariden behandelt worden sind [120]. Mikrogliazellen, die mit Lipopolysacchariden behandelt und zusätzlich mit α -MSH inkubiert werden, produzieren weniger TNF- α , NO und IL-6 als Kontrollgruppen [31].

Im Gegenzug wird IL-10 vermehrt gebildet [10] und Endothel-Adhäsionsmoleküle, die für die Einwanderung von Entzündungszellen in Gewebe von Bedeutung sind, auf den Endothelzellen vermindert exprimiert. [111].

1.10 Mäuse mit einer funktionellen Defizienz des Melanocortin 1 Rezeptors

Der MC1-Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Pigmentation der Haut und der Farbe von Haaren bei Mäusen. Bei Mäusen mit einer homozygoten Mutation im Genom lässt sich die Funktion dieses Rezeptors eindrucksvoll zeigen. Diese Mäuse tragen eine homozygote Punktmutation im Gen für den MC1-Rezeptor, die zum vollständigen Verlust der Funktion dieses Proteins führt.

Diese Mutation ereignet sich spontan im C57BL/6Ha Stamm. Lebensfähigkeit, Lebensalter, Fertilität, Körpergewicht und Tumorzinzidenz sind bei den Tieren normal [58].

Das Gen des MC1-Rezeptors in zur Familie der Muridae gehörigen Nagetieren hat keine Introns und ist 948 Basenpaare groß. Eine Deletion des Basenpaares an der Stelle 549 führt zu einer Rasterschubmutation, die zu einem frühzeitigen Stopp-Codon führt, so dass die Translation des Proteins 12 Codons nach der Deletion frühzeitig abbricht und ein funktionsloses Protein von den Zellen exprimiert wird [105]. Das verkürzte Protein bricht nach der vierten Transmembrandomäne ab. Im funktionsfähigen Zustand besitzt das Protein sieben Transmembrandomänen und gehört zu der Gruppe der so genannten Serpentine-Rezeptoren. Das Protein kann nicht mehr an G-Proteine binden und damit auch keinen Einfluss auf den cAMP Gehalt der Zelle nehmen.

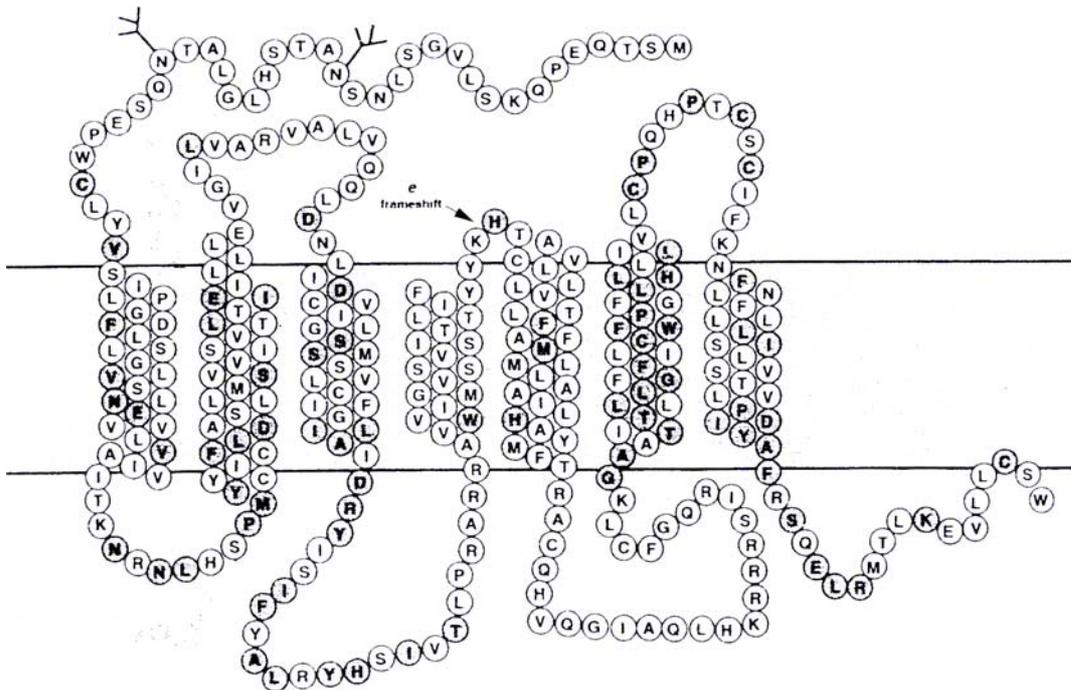


Abbildung 1.5: Aminosäuresequenz des Melanocortin-1-Rezeptors

Eingezeichnet ist die Stelle in der Sequenz, an der die Frameshiftmutation ansetzt; das Protein läuft noch 12 Aminosäuren weiter bis es auf Grund eines Stoppcodons (UAG), das aus der Frameshiftmutation resultiert, abbricht (nach Robbins et al. [105])

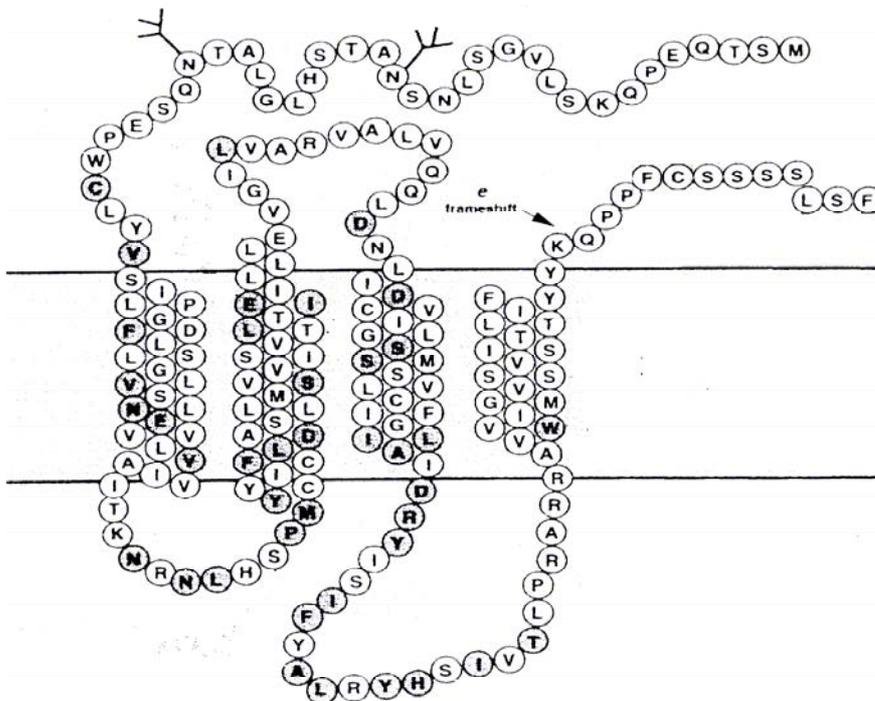


Abbildung 1.6: trunktierter Melanocortin-1-Rezeptor (nach Robbins et al. [105])

Diese Mäuse werden im Englischen als yellow recessive (e/e) mice, gelbe rezessive (e/e) Mäuse, bezeichnet. Sie zeigen eine gelbe Fellfarbe als Ausdruck der ausbleibenden Eumelaninproduktion und der damit überwiegender Phaeomelaninproduktion in den Haarfollikeln. Die Tiere zeigen eine schwarze Hautfarbe, zusätzlich sind ihre Augen schwarz [105].

Neben den Auswirkungen auf die Fellfarbe sollten die Tiere auch die anderen Funktionen des Rezeptors, zum Beispiel auf den Ablauf von Entzündungen, verloren haben. Diese Tiere sind ideal geeignet, um die Funktionen des Rezeptors im Immunsystem der Tiere zu erforschen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die möglichen Ursachen für die akute ödematöse Pankreatitis sind nicht genau bekannt. In der Literatur finden sich Hinweise dafür, dass α -MSH einen günstigen Effekt auf die Cerulein-induzierte Pankreatitis bei Ratten hat [65]. Da die Abläufe der Pankreatitis nicht genau bekannt sind, ist der Einfluss des α -MSH von Interesse. Dieses Peptid ist ein Ligand des Melanocortin-1-Rezeptors.

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der Cerulein-induzierten Pankreatitis im Tiermodell der akuten Pankreatitis bei rezessiven gelben (e/e) Mäusen. Diese Mäuse besitzen eine funktionelle Defizienz für den MC1-Rezeptor. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um den Rezeptor, der u.a. für die antiinflammatorischen Eigenschaften von α -MSH verantwortlich gemacht wird.

Zur Charakterisierung der Pankreatitis werden Aktivitäten von Amylase, Cathepsin B, Trypsin und Trypsinogen im Serum und im Pankreashomogenat, gemessen. Die Ausprägung der Pankreatitis wird immunhistochemisch und histologisch untersucht.

Es sollen die Zelltypen bestimmt werden, über die der Melanocortin 1 Rezeptor Einfluss auf die Pankreatitis nimmt. Eine epitheliale Expression des MC1-Rezeptors im Pankreasgewebe ist in der Literatur nicht beschrieben. Um den Einfluss des MC1-Rezeptors im Pankreasgewebe zu untersuchen, muss die epitheliale Expression dieses Proteins geklärt werden. Von Bedeutung ist, ob die Wirkung des Rezeptors auf die Pankreatitis über Zellen abläuft, die in das Organ während der Entzündung einwandern, oder ob der Rezeptor direkt im Organ exprimiert wird, und in der Frühphase der Pankreatitis Einfluss nehmen kann.

3 Material

3.1 Geräte

Cykler	Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg
Drehinkubator	Heidolph, Berlin
Elisa reader	Dynatech MR 5000, Dynatech Laboratories, Stuttgart
Fluorometer	Spectra Gemini Max, S/N G02052, Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizblock	Grant Instruments, Cambridge, GB
Homogenisator:	Fa. B.Braun Melsungen AG, Typ 853202, D-3508 Melsungen
Kühlschränke -80°C	Forma Scientific, Bosch, Gerlingen
Küvettenphotometer Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer RFT	Ikamag, Staufen
Mikroskop	Diaphot 200, Nikon, Düsseldorf
pH-Meter	pH Meter 761 Calimatic, Knick, Berlin
Plastikartikel und chirurgisches Material	Greiner, Cornig, Nalgene, Braun, Ethicon
Pipetten 10-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Protein Elektrophorese Kammer	Keutz Laborgeräte GbR, Kreuzkirchen
Stromversorgung Power Pac 300	Bio Rad, München
Schüttelwasserbad 1092	GFL, Burgwedel
Trans-Blot SD Semi-Dry	Bio Rad, München
Ultramikrotom Ultratome	LKB, S
Ultraschallstab Sonicator W-375	Heat-Systems-Ultrasonics, Inc
Vortexer	VF2, Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Waagen	Analytic AC 210S, BL 600 Sartorius, Göttingen

DAPI-Puffer:	0.0001 % (w/v) DAPI in PBS
Laemmli-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris pH 6.8, 20 % (v/v) Glycerin, 0.2 (w/v) Bromphenolblau, 4 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol
NET	150 mM Natriumchlorid, 5 mM Na-EDTA, 50 mM Tris pH 7.5, 0.5 % (v/v) Triton-X-100
Ponceaulösung	0.2 % (w/v) Ponceau S, 2 % (w/v) Trichloressigsäure
TAE-Puffer	Tris 1199 mM, EDTA 30 mM, Eisessig 601,5 mM, pH 8,0
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0.0375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
Tris-Puffer	100 mM Tris pH 8.0, 5 mM Calciumchlorid
Tris-Glycin-SDS	248 mM Tris pH 8.0, 1.918 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
PBS (phosphate buffered saline)	137 mM Natriumchlorid, 27 mM Kaliumchlorid, 81 mM Natriumhydrogenphosphat, 15 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7.4
PBS-Natriumborhydrid	1% (w/v) Natriumborhydrid in PBS, Haltbarkeit 1 Stunde

DMEM

DMEM F12, C-71317, PromoCell

3.4 Versuchstiere

gelbe rezessive (e/e) Mäuse

Dr. T. Brzoska, Klinik für
Dermatologie, Universität
Münster

C57BL6 Mäuse (Wildtyp WT Mäuse)

BRL, Basel, Schweiz

3.5 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham (Amersham Life Science, Braunschweig), Merck, Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Polysciences, Becton Dickinson oder Sigma mit dem Reinheitsgrad p.A. eingesetzt.

Caerulein Pankreatitis

Takus 40µg, Farmitalia Carlo Erba GmbH,
79100 Freiburg,

Narkose

Pentobarbital

Formaldehyd:

Formaldehyde 16% Ultrapure Cat#18814,
Polysciences Inc

4 Methoden

4.1 Tierhaltung

C57BL6 und gelbe rezessive (e/e) Mäuse wurden im universitätseigenen Tierstall in speziellen Schalen bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere wurden zur Induktion der Pankreatitis in den laboreigenen Tierraum überführt. Zur Adaption an die dortigen Verhältnisse wurden die Tiere drei Tage an den Raum gewöhnt. Die Tiere mussten 18 Stunden vor der Induktion bei unbegrenztem Zugang zu Wasser fasten bevor ihnen die Pankreatitis induziert wurde.

4.2 Induktion einer Pankreatitis durch supramaximale Cerulein-Injektion bei der Maus

Gelben rezessiven (e/e) Mäusen bzw. C57BL6 (Wildtyp) Mäusen im Alter zwischen 12 und 20 Monaten, bei einem Körpergewicht von 25 bis 30 g, wurde nach 18 stündigem Fasten, bei unbegrenztem Zugriff auf Wasser, durch intraperitoneale Injektion von Cerulein eine akute ödematöse Pankreatitis induziert. Die Cerulein-Dosis betrug 50 µg/kg/Körpergewicht pro Stunde. Die Tiere erhielten 7 Injektionen in Intervallen von 60 min.

4.3 Probengewinnung

Die Tiere wurden nach 10, 24 und 56 Stunden durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital in einer Dosis von 6 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Das Abdomen der Tiere wurde längs entlang der Linea alba eröffnet und das Pankreas entnommen. Zur Gewinnung von Blut wurde der linke Ventrikel des Herzens punktiert und die Tiere starben durch Ausbluten. Das Blut wurde zur Gewinnung von Serum bei 4°C zentrifugiert. Das Serum wurde bei -80°C gelagert.

Das entnommene Pankreas wurde von Fettgewebe befreit und zum größten Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Kleinere Teile wurden in 4%igem Formaldehyd zur mikroskopischen Weiterverarbeitung gegeben.

4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung der Proben wurden die Gewebe in Paraffin eingebettet. 5 µm dicke Gewebsschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin nach der Methode von Meyer gefärbt.

4.5 Isolierung von Mauspankreasazini

Vor der Organentnahme fasteten die Tiere mindestens 7 Stunden. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Modifiziert nach Grosfils et al. wurde das Organ unverzüglich entnommen und dann in einen 25 ml Erlenmeyerkolben mit 6 ml auf 37°C vorgewärmtes Inkubationsmedium (DMEM) überführt [51]. Das Medium wurde zuvor mit Sauerstoff begast und mit 1 mg Collagenase versetzt. Die Zerkleinerung des Organs erfolgte mit einer Schere in ungefähr 3 mm große Stücke, die siebeneinhalb Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 Grad und 100 rpm inkubiert wurden. Anschließend wurde das Organ weiter mit einer Schere zerschnitten und das Organ siebeneinhalb Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert.

Das Medium wurde dekantiert und mit 6 ml kollagenasehaltigen Medium versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 15 min im Schüttelwasserbad (100 rpm) bei 37°C. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Pankreasazini durch Pipettieren mit einer 1 ml Pipette vereinzelt. Dabei nutzte man Pipettenspitzen, die auf 2 mm, 1 mm und 0,5 mm aufgeschnitten wurden. Nach der Filtration des Mediums mit den suspendierten Azini durch doppelt gelegte Gaze, wurden die Zellen mit Medium resuspendiert und 20 Sekunden bei 200 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wiederholte sich. Die Azini wurden dann mit Medium im Schüttelwasserbad bei 37°C für 30 Minuten äquilibriert und konnten zur RNA-Gewinnung oder als Homogenat im Western-Blot eingesetzt werden.

Mikroskopisch konnten die Zellen anhand ihrer Granula als Azinuszellen identifiziert werden. Mit der Trypan-Blau-Färbung konnte die Vitalität der gewonnenen Zellen überprüft werden. Lebende intakte Zellen lassen sich nicht anfärben. Für dieses Färbung werden 1 ml Medium mit Azini und 1 ml Trypan-Blau gemischt und 60 µl unter eine Neubauer-Zählkammer gegeben.

4.6 Gewinnung von Pankreashomogenaten

Die Gewebeprobe wurde über mehrere Stunden aufgetaut und in 1 ml eisgekühltes PBS mit Hilfe eines Homogenisators nach Potter der Weite S mit zehn Schüben homogenisiert. Das Homogenat wurde mit einem Ultraschallstab bei einem Tastverhältnis von 35% zweimal 30 Sekunden behandelt, hierbei wurde das Homogenat auf Eis gekühlt. Dieses Homogenat wurde für 5 Minuten bei 16000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, auf einen Proteingehalt von 27 mg/ml eingestellt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Homogenat lagerte bei -80°C.

4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford [15] der Firma Biorad (München) (Bradford-Assay) verwendet. Hierbei macht man sich die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brillant Blue G-250 bei der Bindung an Proteine zu Nutze. Bindet der Farbstoff an Proteine, liegt das Absorptionsmaximum bei 595 nm. Ohne Proteine liegt es bei 465 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration. Als Standard wurden BSA-Lösungen mit Proteinkonzentrationen zwischen 1 mg/ml und 1000 mg/ml genutzt.

4.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das anionische Detergenz SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) bindet an die hydrophoben Regionen von Proteinen und löst damit eine Veränderung der Tertiärstruktur der Proteine aus. Die negativ geladenen Sulfat-Gruppen des SDS ragen aus dem Protein heraus. Die negative Ladung überdeckt die Eigenladung der mit SDS behandelten Proteine vollständig. Im Polyacrylamidgel können die so veränderten Proteine nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt werden, da sie sich durch ihre negative Ladung in einem Spannungsfeld zur Anode bewegen [73].

Das Trenngel enthält zwischen 7 und 15 % (w/v) Acrylamid, 0,2-0,4 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 370 mM Tris pH 8,8. Der Acrylamidgehalt kann zur Veränderung der Auflösung des Trenngels variiert werden.

Das Sammelgel setzt sich aus 3 % (w/v) Acrylamid, 0,15 % (w/v) Bisacrylamid, 125 mM Tris pH 6,8 und 0,1 % (w/v) SDS zusammen.

0.5 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat und 0.05 % (w/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) lösen die Polymerisation des Gels aus.

Die Gelbildung beruht auf einer durch Radikale ausgelösten Polymerisation von monomeren Acrylamid mit dem quervernetzenden Bisacrylamid. Die für den Start benötigten Radikale werden vom Ammoniumperoxodisulfat und dem TEMED bereitgestellt.

Die Gewebshomogenate wurden zu gleichen Teilen mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Die Elektrophorese fand in den Mini- Protean 3 Elektrophoresis System von Bio Rad in Tris-Glycin-SDS-Puffer statt.

Die Proteine wurden aus dem SDS-Gel auf Nitrocellulosemembranen (Amersham Life Science, Braunschweig) transferiert, um diese mit Antikörpern nachweisen zu können. Die Übertragung fand in einer Semidry-Blotkammer zwischen jeweils drei Whatmanpapieren statt, die mit Transferpuffer getränkt worden waren. Auf die Gelfläche von 1 cm² wirken 1 mA, der Transfer dauerte eine Stunde. Die Membran wurden in NET-Puffer bei 4°C gelagert.

4.9 Immunoblot

Die Membran (siehe 4.8) wurde auf Raumtemperatur gebracht und eine Stunde in NET-0.2% (w/v) Gelatine auf einem Schüttler inkubiert, um die unspezifische Bindung des Antikörpers an Proteine zu verhindern. Die Membran mit dem Antikörper wurde für eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde in NET-0.2 (w/v) Gelatine 1:1000 verdünnt. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen behandelte man die Membran anschließend mit NET 3 x 5 Minuten. Der spezifische sekundäre Antikörper war mit Peroxidase gekoppelt und wurde 1:10000 in NET-0.2 (w/v) verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde auf dem Schüttler. Anschließend wurde die

Membran 2 x 5 min in NET und 1 x 5 min in PBS gewaschen. Die Membran verblieb bis zum anschließenden Nachweis der markierten Proteine in PBS.

Zur Detektion der antikörpermarkierten Proteine wurde die Membran mit dem ECL-Kit von Amersham behandelt. Die Peroxidase, die am sekundären Antikörper gebunden ist, spaltet Wasserstoffperoxid. Der dabei freiwerdende Sauerstoff oxidiert Luminol unter Chemilumineszenz. Die Membran wurde auf polyethylenbeschichtetes Papier gelegt und mit Folie luftblasenfrei abgedeckt. Mit der Membran wurde ein Röntgenfilm exponiert, wobei sich die Expositionszeit nach der Stärke der Chemilumineszenz richtete.

4.10 Immunhistochemie

Die für die Immunhistochemie vorgesehenen Paraffinschnitte wurden zuerst entparaffiniert. Nacheinander wurden die Schnitte 2 x 10 Minuten in Xylol 100 %, 2 x 10 Minuten in Ethanol 100 %, 2 x 5 min in Ethanol 70 % dann 2 x 5 Minuten in PBS vom Paraffin befreit. Zur Demaskierung wurden die Schnitte in Stoffmark II (AC1D1C) 10 Minuten im Schnellkochtopf bei Enddruck gekocht. Die Schnitte kühlten dann in PBS auf Raumtemperatur ab. Zur weiteren Demaskierung wurden die Schnitte in 1 % Natriumborhydrid PBS 10 Minuten inkubiert. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, behandelten wir die Schnitte entweder 1 Stunde mit Blockingsolution von Sano Chemia, oder 30 Minuten mit 2,5 % BSA (Aurion).

Der erste Antikörper wurde über Nacht bei 4°C auf den Gewebsschnitten belassen. Die Gewebsschnitte wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wird der Antikörper 3 x 5 Minuten mit PBS ausgewaschen. Der sekundäre mit Cy 3 gekoppelte spezifische Antikörper wurde 1:200 verdünnt 1 Stunde bei Raumtemperatur auf den Gewebsschnitten belassen. Durch eine 3 x 5 Minuten dauernde Behandlung mit PBS wurde nicht gebundener Antikörper entfernt.

Zur besseren Orientierung im Gewebe wurde die DNA mit DAPI markiert, indem man die Gewebsschnitte 10 Sekunden mit DAPI behandelte. Überschüssiges DAPI wurde durch 3 x 5 Minuten waschen mit PBS entfernt. Die Einbettung der

Gewebsschnitte erfolgte in PBS 0,05 % Natriumazid, anschließend konnte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop beginnen.

4.11 Enzymaktivitätsmessungen

Amylase, Trypsin, Elastase und Cathepsin B wurden fluorometrisch gemessen. Die Pankreashomogenate wurden auf gleichen Proteingehalt angeglichen und 50 µl in die Wells einer 96 Well-Platte pipettiert. Dazu wurden 50 µl des entsprechenden Substrats gegeben. Die Substrate werden enzymespezifisch gespalten. Durch diesen Eingriff in die Struktur des Substrats wird dieses für Anregungswellen empfindlich.

Im Fluorometer werden für das entsprechende Substrat die Anregungswellenlänge und die Emmissionswellenlänge eingestellt. Für R110-Substrate galten folgende Einstellungen: Ex 485 nm, Cutoff 420 nm, Em 460 nm. Alle zwei Minuten wurden die Proben im Fluorometer über enzymabhängige Zeiträume gemessen. Die Steigung der Kinetik ist proportional zur Konzentration der gemessenen Enzyme.

Von den gemessenen Werten wurden die Hintergrundfluoreszenzen abgezogen.

4.11.1 Messung der Amylaseaktivität im Serum

50 µl verdünntes Serum wurden mit 50 µl Substrat in Wells einer 96 Well-Platte gegeben. Die Messung beruht auf dem EnzChek Amylase Assay Kit von Molecular Probes (MoBiTec). Die Proben wurden bei 37°C in Fluorometer über eine Stunde inkubiert, alle zwei Minuten erfolgte eine Messung.

4.11.2 Messung der Amylaseaktivität im Pankreashomogenat

Zur Messung der Amylase wurden jeweils 50 µl Homogenat und 50 µl Substrat in die Wells einer 96 Well-Platte gegeben. Zur Messung der Amylase wurde das EnzChek Amylase Assay Kit von Molecular Probes (MoBiTec) verwendet.

4.11.3 Messung der Trypsinaktivität im Pankreashomogenat

Trypsin wurde über die Spaltung des Substrats R110 IPA gemessen. Die Extinktion beträgt für R110-IPA 485 nm, der Cutoff 515 nm und die Emission 530 nm. Als Puffer wurde ein spezieller Messpuffer (Tris-Puffer) verwendet. Zu den 50 µl Homogenat wurden 50 µl Substrat mit einer Konzentration von 20 µM gegeben, so dass im Well eine Substratkonzentration von 10 µM vorlag. Die Kinetik wurde über eine Stunde im auf 37°C aufgewärmten Fluorometer gemessen, wobei alle zwei Minuten eine Messung erfolgte.

4.11.4 Messung des Trypsinogens im Pankreashomogenat

Um das Trypsinogen zu messen, wurde das Trypsinogen zuerst mit Enterokinase in Trypsin überführt. Von diesem Wert wurde der zuvor ermittelte Wert an Trypsin abgezogen, um auf den endgültigen Trypsinogenwert schließen zu können.

Zu 50 µl Enterokinase mit einer Konzentration von 200 U/ml wurden 50 µl Homogenat gegeben. Die 96-Well-Platte wurde dann mit den Proben 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Substrat R110-IPA in einer Konzentration von 30 µM zugesetzt, um eine Endkonzentration des Substrats in den Wells von 10 µM zu erreichen. Die Proben wurden 1h bei 37°C im Fluorometer inkubiert, wobei alle 2 Minuten eine Messung der Kinetik erfolgte. Nach Messung des Trypsin- und Trypsinogenwertes konnte die Trypsinaktivierung in Prozent errechnet werden.

4.11.5 Messung der Elastaseaktivität im Pankreashomogenat

Elastase wird mit dem Substrat R110-Ala4 gemessen. Zur Messung der Elastase wird Tris-Puffer als Messpuffer verwendet. Zu 50 µl Pankreashomogenat wurden 50 µl Substrat gegeben, so dass die Endkonzentration des Substrates im Well 10 µM betrug.

Die Messung der Kinetik erfolgte im auf 37°C aufgewärmten Fluorometer über eine Stunde, alle 2 Minuten fand eine Messung der Proben statt.

4.11.6 Messung der Cathepsin B-Aktivität im Pankreashomogenat

Zur Messung der Cathepsin B Aktivität wird ein spezieller Messpuffer verwendet. Cathepsin B ist in der Lage, Substrat R110 Phen-Arg zu spalten. 50 μ l Pankreashomogenat wurden mit 50 μ l Substrat in den Wells der 96-Well-Platten gemischt. Das Substrat hatte in den Wells eine Endkonzentration von 10 μ M.

Die Kinetik wurde im Fluorometer bei 37°C mit Messungen der Fluoreszenz alle 2 Minuten über eine Stunde bestimmt.

4.11.7 Messung der Cathepsin B Aktivität im Serum

Hierzu wurden 50 μ l Serum mit 50 μ l Substrat R110 Phen-Arg in den Wells der Fluorometerplatten gemischt. Als Messpuffer diente der Cathepsin Messpuffer. Die Endkonzentration des Substrat betrug 10 μ M in den Wells.

Im 37°C warmen Fluorometer wurde die Kinetik der Reaktion durch Messungen in zweiminütigen Abständen über 60 Minuten bestimmt.

4.12 Aufreinigung von Antikörpern aus Hühnereigelb

Das Hühnereigelb wurde auf Raumtemperatur gebracht und mit 2 Teilen 100mM PBS versetzt. Die erhaltene Lösung wurde eins zu eins mit Chloroform versetzt, gut durchmischt und 30 Minuten bei 4°C und 1000xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 12 % (w/v) Polyethylen-Glycol im Verhältnis 1:1 versetzt. Unter der wässrigen Phase findet sich eine proteinhaltige Phasen, in der untersten Phase fand sich Lecithin. Die wässrige Phase wurde wie oben beschrieben 30 min zentrifugiert, und das Pellet in 1/6 der Hühnereigelb-Ausgangsmenge in 100 mM PBS resuspendiert.

Die Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit 100 % Glycerol versetzt und bei -20°C gelagert.

4.13 Statistische Analyse

Die Induktion der Pankreatitis ist an Mäusegruppen mit einer Gruppenstärke von jeweils 5 Tieren durchgeführt worden. 5 (e/e) Mäuse sind mit Cerulein behandelt worden, 5 (e/e) Mäuse dienen als Kontrolle. Die gleiche Gruppierung

ist auch bei den C57BL6-Mäusen durchgeführt worden. Die Tiere dieser ersten Serie sind 10 Stunden nach der letzten Cerulein-Injektion getötet worden. Frühere und spätere Zeitpunkte der Tötung der Tiere wurden mit 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Diese Gruppen lassen sich nicht statistisch auswerten. Signifikante Unterschiede in den Diagrammen mit $p < 0.05$ sind mit einem Stern gekennzeichnet.

4.14 Messung der Myeloperoxidaseaktivität (MPO) im Lungenhomogenat

Das Lungengewebe wurde aufgetaut und auf Eis mit Hilfe eines Homogenisators nach Potter der Weite S mit zehn Schüben in Potassium Phosphat Puffer (pH 7,4; Sigma Aldrich) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 mM Potassium Phosphat Puffer (pH 6,0) mit 0,5 % (w/v) Cethyltrimethylammoniumbromid resuspendiert. Die Suspension wurde 4 mal gefroren und aufgetaut. Mit dem Sonicater wurde die Suspension zwei Mal für 10 Sekunden bei einem Tastverhältnis von 30% behandelt. Die Lösung wurde dann für 10 min bei 4°C mit 20.000 g zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden mit 200 µl 50 mM Potassium Phosphat Puffer (pH 6,0), der mit 0,53 mM O-dianisidin und 0,15 mM H₂O₂ versetzt ist, gemischt. Der initiale Anstieg der Absorption bei 450 nm wurde bei Raumtemperatur mit dem Dynatech MR 5000 Elisa reader gemessen. Das Ergebnis wurde in Units ausgedrückt, dies basiert auf der Oxidation von 1 µmol H₂O₂ pro Unit MPO pro Minute und mg Protein.

5 Ergebnisse der Experimente

5.1 Charakterisierung der Cerulein-induzierten Pankreatitis bei Wildtyp- und gelben rezessiven (e/e) Mäusen

Bei Wildtyp- und gelben rezessiven (e/e)-Mäusen erfolgte durch siebenmalige intraperitoneale Injektion von Cerulein (50 µg/Kg KG) die Induktion einer akuten Pankreatitis. Als Kontrollen fungierten Mäuse mit intraperitonealer Injektion physiologischer Kochsalzlösung. Vier Stunden nach der letzten i.p.-Injektion wurden die Tiere narkotisiert (siehe unter Methoden 4.3), und anschließend erfolgte die Entnahme von Organen und Blutserum für weitere Experimente.

Im Verlauf der Induktion verstarb kein Versuchstier. Die unten angegebenen Werte für die Enzymaktivitäten sind gemittelte Werte, wenn nicht anders angegeben.

Die durch Cerulein-Injektionen ausgelöste Pankreatitis verläuft bei der hier verwendeten Konzentration für die Mäuse nicht tödlich und führt zu einer restitutio ad integrum.

5.2 Aktivität der Serum-Amylase in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

Die Messung der Amylaseaktivität im Serum ist ein wichtiger Standardparameter der Pankreatitis. Die Serumamylaseaktivität ist bei einer akuten Pankreatitis signifikant erhöht. Bei der Pankreatitis tritt dieses Enzym im Pankreas in das Blut über [56].

Das Blutserum für die Amylasemessung wurde 10 Stunden nach der ersten Injektion von Cerulein gewonnen. Cerulein-behandelte Wildtyptiere zeigten als Ausdruck der Entzündung des Pankreas einen Anstieg der Serumamylase von im Mittel 12.4 U/ml auf 33.4 U/ml. Bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen, die mit Cerulein behandelt wurden, fand sich kein Anstieg der Serumamylase. Die mit NaCl behandelten (e/e) Mäuse der Kontrollgruppe zeigten hier eine Amylaseaktivität von 11.7 U/ml, die mit Cerulein behandelten (e/e) Mäuse zeigten keinen Anstieg (8.1 U/ml). Der Unterschied in den beiden mit Cerulein behandelten Gruppen war signifikant ($p < 0.05$).

Vor dem Hintergrund dieses Ergebnisses wurden weitere pankreasspezifische Enzyme im Homogenat und im Serum gemessen, um die akute Pankreatitis weiter zu charakterisieren.

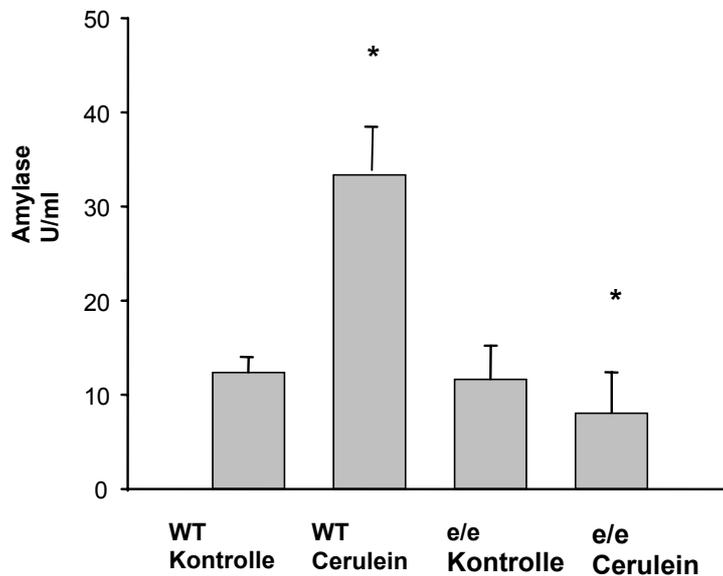


Abbildung 5.1: Amylaseaktivität im Serum.

Die Serumamylaseaktivität steigt bei Wildtypmäusen, die mit Cerulein behandelt wurden, an. Bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen kam es nach der Behandlung mit Cerulein zu keinem Anstieg der Aktivität der Amylase im Serum. Der Serumamylaseaktivitätsunterschied zwischen Wildtypmäusen und gelben rezessiven (e/e) Mäusen ist mit $p < 0.05$ signifikant.

5.3 Amylaseaktivität im Pankreashomogenat in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

Eine der ersten morphologisch sichtbaren Veränderungen während der Pankreatitis ist die Sekretionsblockade der Zymogengranula am apikalen Zellpol der Azinuszellen. Es kommt zu einer Anhäufung der Verdauungsenzyme in den Azinuszellen. In Pankreashomogenaten lassen sich als Ausdruck der Sekretionsblockade erhöhte Aktivitäten der Verdauungsenzyme messen. Aus den entnommenen Organen der Versuchstiergruppen wurden Homogenate erstellt.

Die Amylaseaktivität stieg in der Gruppe der Wildtypmäuse als Ausdruck einer Sekretionsblockade von 1 mU/mg Protein auf 3.7 mU/mg Protein. In der Kontrollgruppe der gelben rezessiven (e/e) Mäuse fand sich eine erhöhte Grundaktivität an Amylase (2.3 mU/mg Protein). Der Anstieg der Amylase nach der Induktion der Pankreatitis blieb bei den Tieren aus. Hier wurde ein Wert von 2.5 mU/mg Protein gemessen. Die Kontrollgruppe und die Pankreatitisgruppe unterschieden sich bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen im Bezug auf die Amylaseaktivität im Pankreashomogenat nicht.

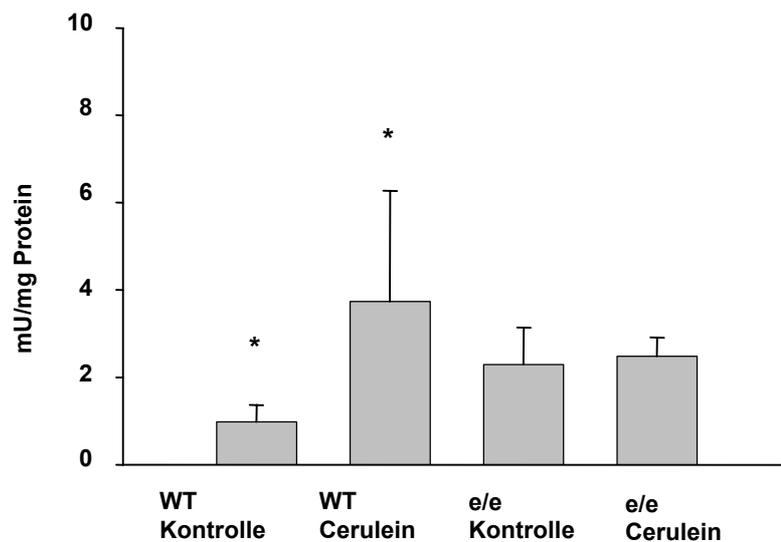


Abbildung 5.2: Amylaseaktivität im Pankreashomogenat.

Die Amylaseaktivität stieg bei Wildtypmäusen im Pankreashomogenat nach der Ceruleinbehandlung an. Bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen blieb der Aktivitätsanstieg aus. Der Anstieg der Amylaseaktivität bei den Wildtypmäusen war mit $p < 0.05$ signifikant.

5.4 Morphologische Veränderungen des Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

5.4.1 Makroskopische Veränderungen des Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

Pankreasgewebe von Cerulein-behandelten Mäusen erschien vergrößert, aufgequollen und ödematös verändert. Organeinblutungen zeigten sich makroskopisch nicht.

5.4.2 Histologische Veränderungen des Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

5.4.2.1 Haematoxylin-Eosin Färbung des Pankreas

Haematoxylin-Eosin-Färbungen dienen der weiteren Charakterisierung der Pankreatitis. Dazu wurden Gewebsschnitte von Kontrollmäusen und rezessiven gelben (e/e) Mäusen, jeweils mit NaCl oder Cerulein behandelt, gefärbt. Die Gewebsschnitte wurden auf die charakteristischen morphologischen Veränderungen der ödematösen Pankreatitis untersucht.

Histologisch fanden sich charakteristische Zeichen für eine ödematöse Entzündung des Pankreas bei WT-Tieren, die mit Cerulein behandelt wurden. Die Azinuszellen zeigten große prominente Vakuolen. Die Gefäße im Organ waren weitgestellt. Die Interzellularspalten waren im Vergleich zum gesunden Pankreas erweitert. Monozyten und neutrophile Granulozyten infiltrierten das Organ. Diese ließen sich sowohl in den Venolen als auch zwischen den Azinuszellen nachweisen.

Histologisch ließ sich bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen in der Kontrollgruppe ein morphologisch unauffälliger Pankreas mit regulärem Aufbau der Azini beobachten.

In der Pankreatitisgruppe der gelben rezessiven (e/e) Mäuse und der Wildtypmäuse fiel das interstitielle Ödem auf, das sich in den erweiterten Interzellularspalten ausdrückte. Die Gefäße zeigten eine deutliche

Vasodilatation. Im Gewebe der mit Cerulein behandelten Tiere ließen sich eingewanderte Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen nachweisen. Die Azinuszellen waren mit Zymogengranula angefüllt und wiesen am apikalen Zellpol Vakuolen auf. Diese aufgezählten Veränderungen waren sowohl bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen als auch bei den Wildtypmäusen nachweisbar. Die Ausprägung des Ödems, der Infiltration mit Entzündungszellen, und die Vakuolisierung der Zellen, war bei den Wildtyptieren ausgeprägter. Das ausgeprägtere Ödem zeigte sich an den weiteren Interzellularspalten. Die Azinuszellen der gelben rezessiven (e/e) Mäuse zeigten eine geringere Anzahl an Vakuolen am apikalen Zellpol.

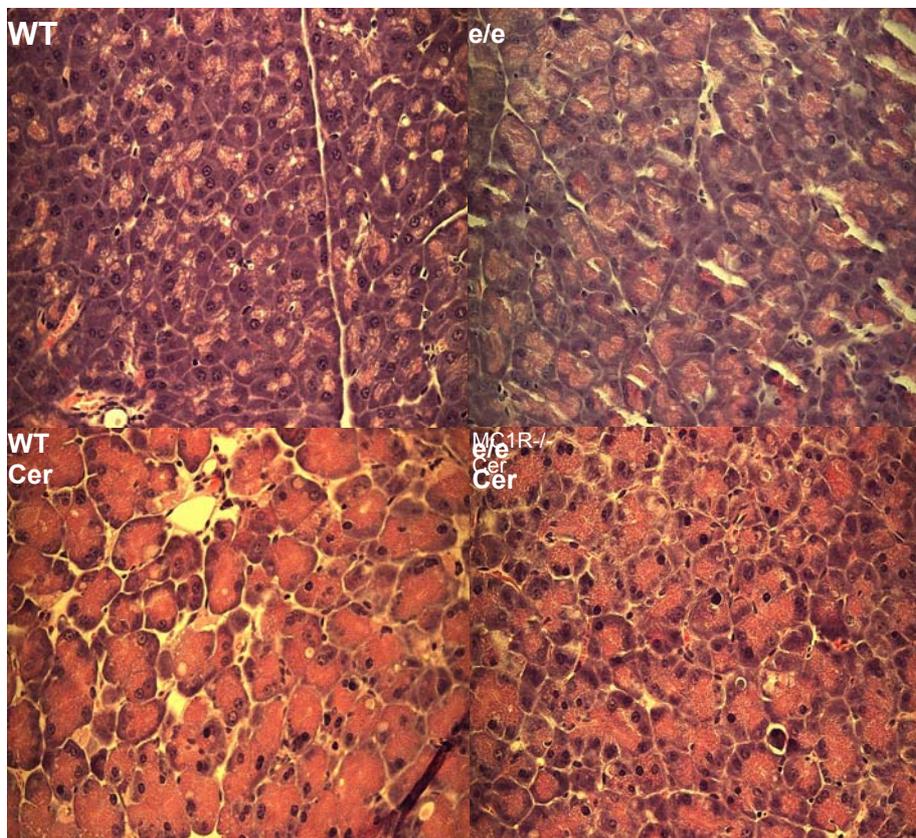


Abbildung 5.3: HE Färbung des Pankreas (40x) vor und nach der Behandlung mit Cerulein. Gewebsschnitte von Mäusen, die mit Cerulein behandelt wurden, zeigen Zeichen einer Pankreatitis. Das Gewebe zeigte ein deutliches interzelluläres Ödem. In den Azinuszellen fanden sich Vakuolen. WT: Wildtyp; e/e: gelbe rezessive (e/e) Mäuse; Cer: Cerulein

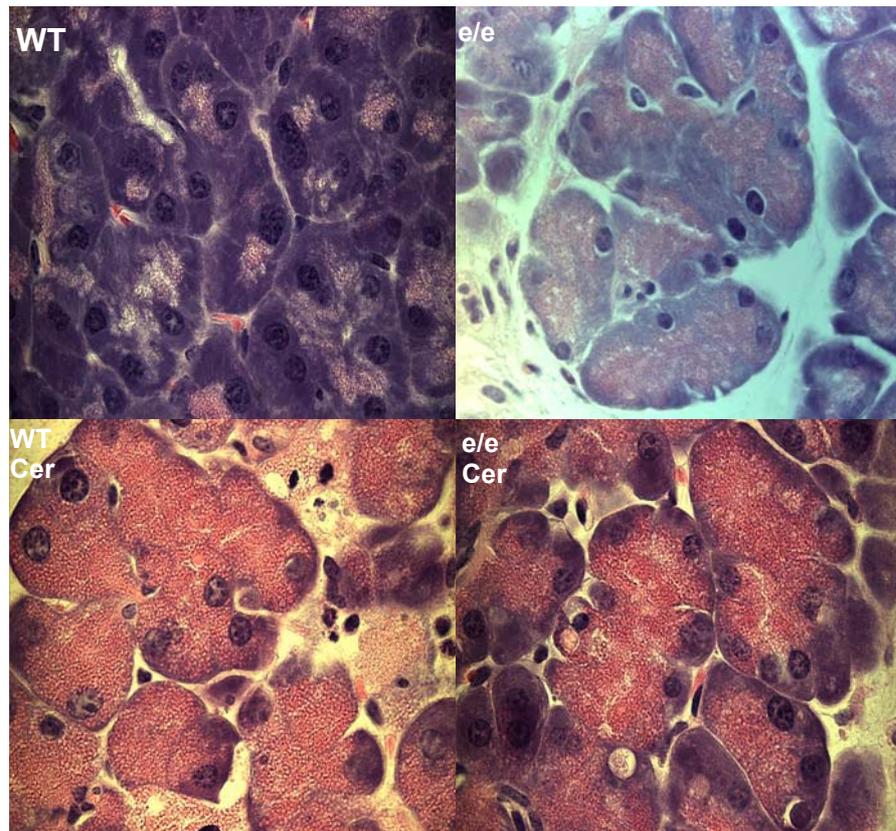


Abbildung 5.4: HE Färbung des Pankreas (100 x) vor und nach der Behandlung mit Cerulein
 Gewebsschnitte von Mäusen, die mit Cerulein behandelt wurden, zeigen Zeichen einer Pankreatitis. Das Gewebe zeigte ein deutliches interzelluläres Ödem. In den Azinuszellen fanden sich Vakuolen. Die Azinuszellen waren mit Zymogengranula angefüllt. WT: Wildtyp; e/e: gelbe rezessive (e/e) Maus; Cer: Cerulein

5.5 Systemischer Schaden in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

5.5.1 Haematoxylin-Eosin Färbung der Lunge

Eine Pankreatitis kann systemische Auswirkungen haben. Im Rahmen dieser systemischen Reaktion (SIRS) kommt es zu einer Entzündungsreaktion der

Lunge, die im Extremfall in einem ARDS (engl. acute respiratory distress syndrome) münden kann. Um diese Reaktion bei den Versuchstieren zu untersuchen, sind Gewebsschnitte der Lungen mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt worden.

Die Lungen der Wildtyptiere und der gelben rezessiven (e/e) Tiere der Kontrollgruppe zeigten im gesunden Zustand einen regelrechten Aufbau.

Die Lungen der Tiere, die mit Cerulein behandelt worden waren, zeigten histologisch Zeichen einer Entzündung. Das Gewebe war hyperämisch. Die Kapillaren der Alveolen waren dilatiert. Die Wände der Alveolen waren durch Entzündungszellen und ein Ödem verbreitert. Vereinzelt fanden sich Infiltrationen von Entzündungszellen in den Alveolen. Die Lungen der Wildtypmäuse und der gelben rezessiven (e/e) Mäuse waren im Rahmen der generalisierten Reaktion verändert.

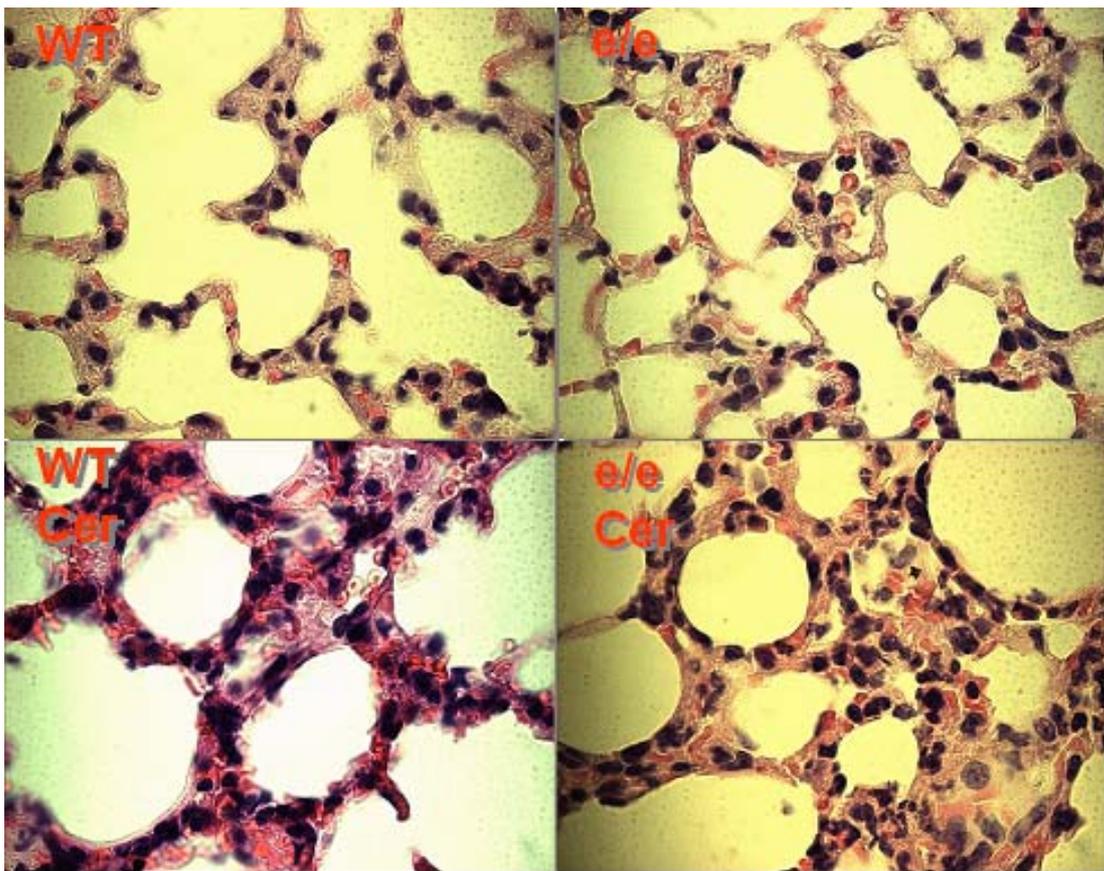


Abbildung 5.5: Lungengewebe, Färbung mit Haematoxylin-Eosin (40x); das Lungengewebe von Tieren, die mit Cerulein behandelt wurden, zeigten Zeichen einer Entzündung, wie

Hyperämie, Verbreiterung der Alveolarsepten und Einwanderung von Entzündungszellen, WT: Wildtyp; e/e: gelbe rezessive (e/e) Maus; Cer: Cerulein

5.5.2 Messung der Myeloperoxidase im Lungenhomogenat

Um die systemischen Auswirkungen der Fehlfunktion des Rezeptors in den gelben rezessiven (e/e) Mäusen beim Ablauf der Pankreatitis zu messen, wurden die Lunge entnommen, homogenisiert und die Aktivität der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten gemessen.

Die Messungen wiesen erhöhte Myeloperoxidaseaktivitäten in den Tieren mit Cerulein-induzierter Pankreatitis auf. Bei Wildtyp- und den gelben rezessiven (e/e) Mäusen war der Anstieg der Myeloperoxidaseaktivität in den Lungenhomogenaten nach der Induktion der Pankreatitis im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht signifikant. Tendenziell zeigten Tiere mit einer Pankreatitis erhöhte Werte an Myeloperoxidase. Dies galt sowohl für die Wildtypiere als auch für die gelben rezessiven (e/e) Mäuse.

Bei den gesunden Wildtypieren fand sich eine durchschnittliche Aktivität von 2458 mU/mg Protein in den Lungenhomogenaten. Nach der Behandlung stieg die Aktivität auf 4242 mU/mg Protein. Bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen erfolgte analog zu den Wildtypieren ein Anstieg von durchschnittlich 1915 mU/mg Protein auf 2498 mU/mg Protein.

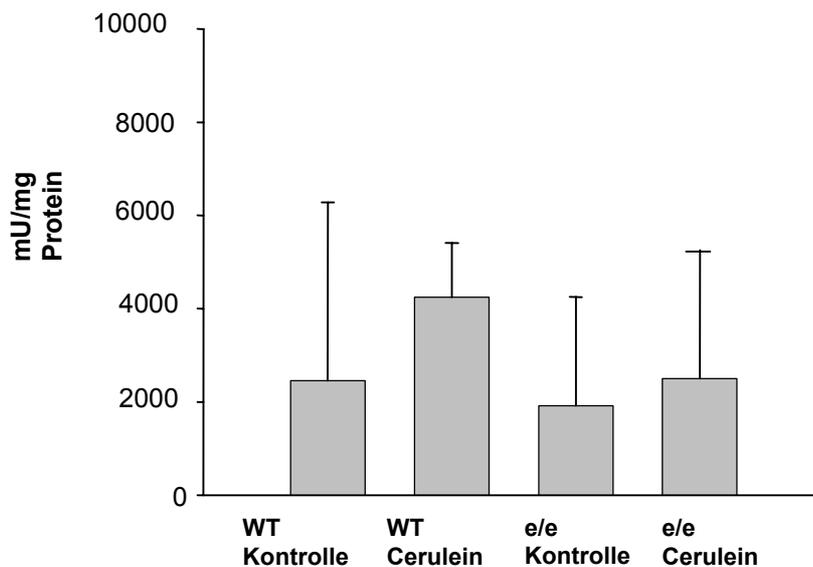


Abbildung 5.6: Myeloperoxidaseaktivität im Lungenhomogenat

Die Aktivität der Myeloperoxidase in den Lungen von Mäusen, die mit Cerulein behandelt wurden, steigt an;

5.6 Trypsin- und Trypsinogenaktivität im Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

Die gemessene Aktivität des Trypsins nahm bei den mit Cerulein behandelten Tieren signifikant zu. Diese Beobachtung ließ sich sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den rezessiven gelben (e/e) Tieren machen. Es gab keinen Unterschied bei der Grundaktivität des Trypsins in den Kontrollgruppen. Der Anstieg der Trypsinaktivität verhielt sich bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen und Wildtyptieren gleich. Die Trypsin-Aktivität stieg bei den Wildtyptieren von 1182 RFU/mg auf 4838 RFU/mg. Bei den gelben rezessiven (e/e) Tieren stieg die Aktivität in der Trypsinmessung von 1435 RFU/mg auf 6587 RFU/mg.

Für die Messung des Trypsinogens wurde das Pankreashomogenat mit Enterokinase inkubiert. Dieses Enzym überführt durch Abspaltung von TAP Trypsinogen in Trypsin und erlaubt Aussagen über den gesamten Trypsinogengehalt des Pankreas.

Die gesunden Wildtyptiere zeigten eine Aktivität von 6874 RFU/mg. Mit Cerulein behandelte Wildtyptiere zeigten Aktivitäten von 15040 RFU/mg. Bei den gelben

rezessiven (e/e) Mäuse ließen sich Aktivitäten in der Kontrollgruppe von 14077 RFU/mg messen. Gelbe rezessive (e/e) Mäuse mit Pankreatitis zeigten im Pankreas eine Aktivität von 16310 RFU/mg.

Das Verhältnis zwischen Trypsin und Trypsinogen wurde bestimmt. Daraus konnte auf das Maß der Trypsinaktivierung geschlossen werden. Die Trypsinaktivierung bezeichnet den Teil an Trypsinogen, der aktiv als Trypsin im Organ vorliegt. Ein erhöhter Anteil an aktivem Trypsin lässt Rückschlüsse auf die Verdauungsenzymaktivierung im Organ zu.

Bei den gesunden Tieren ließ sich fast keine vorzeitige Aktivierung des Trypsinogens feststellen. Diese Beobachtung galt sowohl für Wildtyptiere als auch für die gelben rezessiven (e/e) Mäuse. Bei diesen Tieren lag 0.5 % des Trypsinogens im Organ als Trypsin vor. Wurde bei den Tieren eine Pankreatitis induziert, fanden sich in Übereinstimmung mit der Literatur Werte über 1 % (siehe Diskussion). Es gab keinen Unterschied zwischen den Wildtyptieren und den gelben rezessiven (e/e) Tieren. In beiden Gruppen wurde beim Ablauf der Pankreatitis vermehrt Trypsinogen in Trypsin überführt.

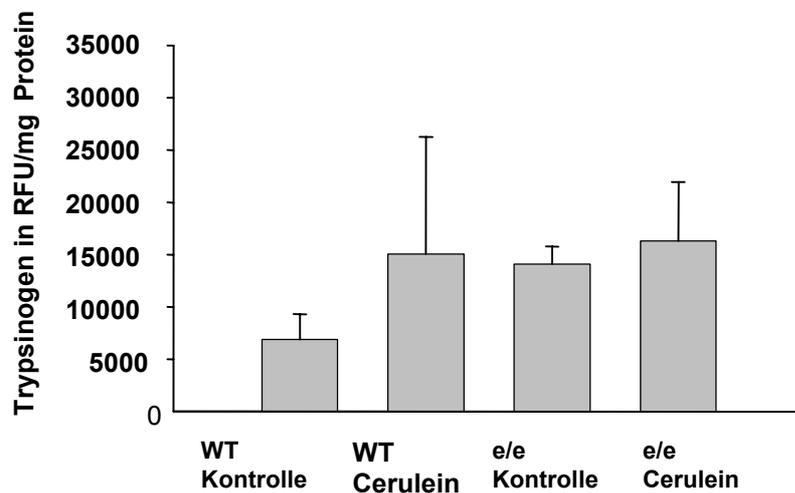


Abbildung 5.7: Trypsinogen im Pankreashomogenat

Die gesunden Wildtyptiere zeigten eine Aktivität von durchschnittlich 6874 RFU/mg. Mit Cerulein behandelte Wildtyptiere zeigten Aktivitäten von durchschnittlich 15040 RFU/mg. Bei den gelben

rezessiven (e/e) Mäuse ließen sich Aktivitäten in der Kontrollgruppe von 14077 RFU/mg messen. Gelbe rezessive (e/e) Mäuse mit Pankreatitis zeigten im Pankreas eine Aktivität von 16310 RFU/mg Protein;

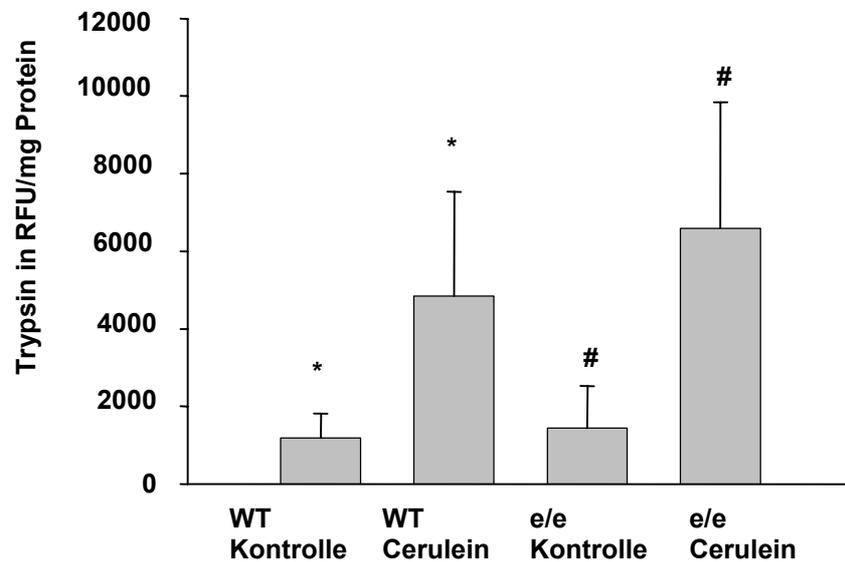


Abbildung 5.8: Trypsin im Pankreashomogenat

Die gemessene Aktivität des Trypsins nahm bei den mit Cerulein behandelten Tieren signifikant zu. Diese Beobachtung ließ sich sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den rezessiven gelben (e/e) Tieren machen. Es gab keinen Unterschied bei der Grundaktivität des Trypsins in den Kontrollgruppen. Der Anstieg der Trypsinaktivität verhielt sich bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen und Wildtyptieren gleich. Die Trypsin-Aktivität stieg bei den Wildtyptieren von 1182 RFU/mg auf 4838 RFU/mg. Bei den gelben rezessiven (e/e) Tieren stieg die Aktivität in der Trypsinmessung von 1435 RFU/mg auf 6587 RFU/mg. (#. * Signifikanz, $p < 0,05$);

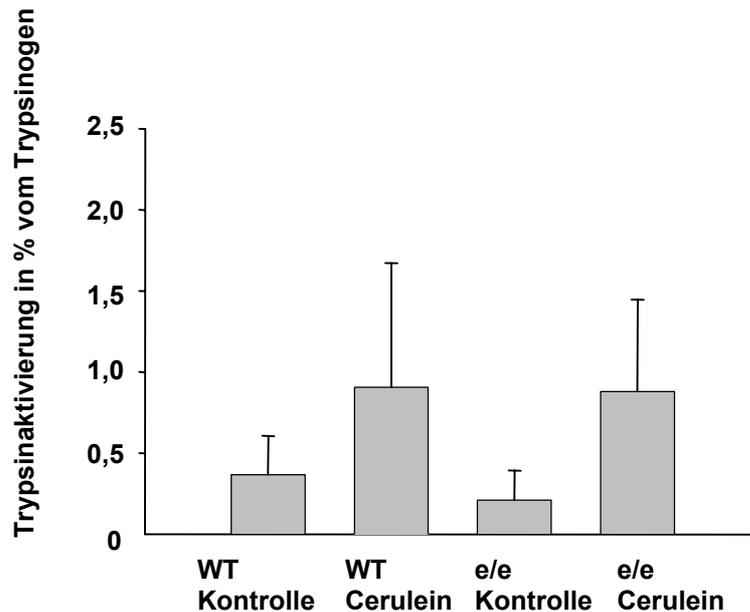


Abbildung 5.9: Trypsinaktivierung

Das Verhältnis zwischen Trypsin und Trypsinogen wurde bestimmt (Trypsinaktivierung). Damit wird der Teil an Trypsinogen bezeichnet, der aktiv als Trypsin im Organ vorlag. Ein erhöhter Anteil an aktiven Trypsin lässt Rückschlüsse auf die Verdauungsenzymaktivierung im Organ zu. Bei den gesunden Tieren ließ sich fast keine vorzeitige Aktivierung des Trypsinogens feststellen. Diese Beobachtung galt sowohl für Wildtyptiere als auch für die gelben rezessiven (e/e) Mäuse. Bei diesen Tieren lag 0.5 % des Trypsinogens im Organ als Trypsin vor. Wurde bei den Tieren eine Pankreatitis induziert, fanden sich Werte über 1 %. Es gab keinen Unterschied zwischen den Wildtyptieren und den gelben rezessiven (e/e) Tieren; Ergebnis nicht signifikant;

5.7 Cathepsin-B-Aktivität im Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

Verschiedene Experimente zeigen eine mögliche Rolle der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B in der vorzeitigen Verdauungsenzymaktivierung. Cathepsin B kann Trypsinogen in Trypsin überführen. Dies wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt (siehe unter Einleitung 1.3).

Während sich der Gehalt des Cathepsin B bei den Wildtyptieren in der Kontrollgruppe nicht vom Gehalt der Pankreatitis-Gruppe unterschied, fand man

bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen ein ganz anderes Bild. Hier war das Cathepsin B bei den Tieren mit der Pankreatitis doppelt so hoch ($p < 0.05$). Zwischen den Kontrollgruppen der Wildtyptiere und den gelben rezessiven (e/e) Tieren fand sich kein Unterschied.

In den Pankreashomogenaten der gesunden Wildtypiere ließ sich eine durchschnittliche Cathepsin-B-Aktivität von 580 RFU/mg messen. Die Aktivität stieg nach der Behandlung mit Cerulein auf 616 RFU/mg. Bei den gesunden gelben rezessiven (e/e) Mäusen ließ sich eine Aktivität von 805 RFU/mg messen. Wurden die gelben rezessiven (e/e) Mäuse mit Cerulein behandelt, konnte im Homogenat des Pankreas eine mittlere Aktivität von 2069 RFU/mg gemessen werden.

Zusätzlich zum Cathepsin B im Homogenat wurde das Cathepsin B im Serum gemessen. Hierbei zeigte, dass sich die Aktivität des Cathepsin B im Serum der gesunden Mäuse in beiden Gruppen nicht unterschied. Die Cathepsin B-Aktivität stieg während der Pankreatitis nicht an. Diese Beobachtung konnte für die Wildtypmäuse als auch für die gelben rezessiven (e/e) Mäuse gemacht werden.

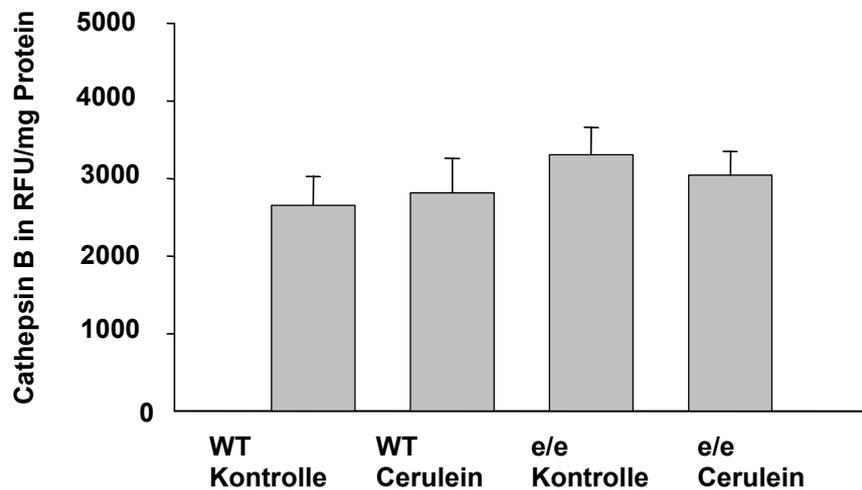


Abbildung 5.10: Cathepsin B Aktivität im Serum

Die Serumaktivität des Cathepsin B lag bei allen Gruppen auf konstanten Niveau;

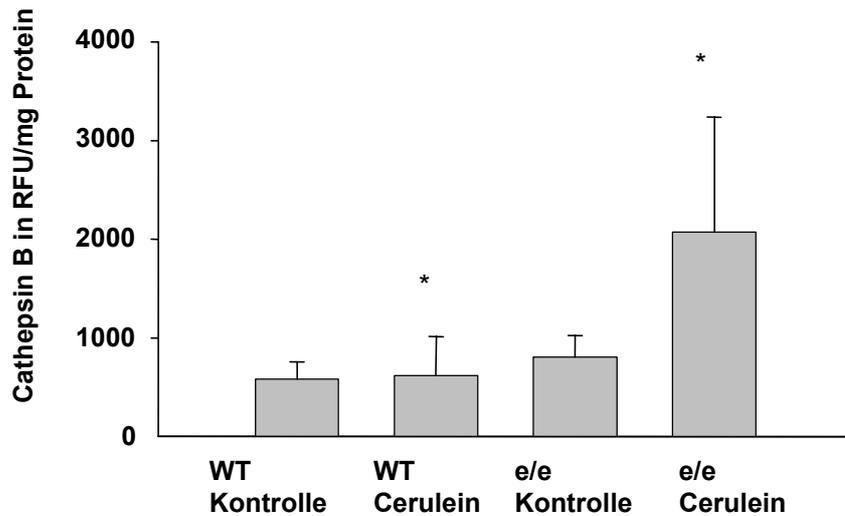


Abbildung 5.11: Cathepsin B Aktivität im Pankreashomogenat

Wildtypmäuse (WT Kontrolle) zeigten eine durchschnittliche Aktivität von 580 RFU/mg Protein. Der Wert stieg bei Wildtypmäusen nach der Induktion der Pankreatitis (WT Cerulein) auf durchschnittlich 616 RFU/mg Protein. Gelbe rezessive (e/e) Mäuse (e/e Kontrolle) zeigten in der Kontrollgruppe eine Grundaktivität von 805 RFU/mg Protein. Gelbe rezessive (e/e) Mäuse mit Cerulein - induzierter Pankreatitis (e/e Cerulein) wiesen eine Aktivität von durchschnittlich 2069 RFU/mg Protein auf. Der Unterschied zwischen den Pankreatitisgruppen der zwei Mausstämme war mit $p < 0.05$ signifikant.

5.8 Elastaseaktivität im Pankreas in der Cerulein-induzierten Pankreatitis

Elastase wird mit der Entstehung von Nekrosen in der Pankreatitis in Verbindung gebracht. Studien mit elastasespezifischen Peptidinhibitoren zeigen eine Verringerung der Pankreatitis im Tiermodell. Trypsin kann Proelastase in Elastase überführen. Aktive Elastase stellt ein Enzym dar, das für die Schädigung des Pankreas durch vorzeitige Verdauungsenzymaktivierung eine Rolle spielt. Die Bedeutung der Pankreaselastase bei der Entstehung der akuten Pankreatitis ist nicht eindeutig geklärt.

In allen Gruppen fand sich ein konstanter Gehalt an Elastase in den Homogenaten. Die Menge dieses Enzyms stieg während der Pankreatitis sowohl bei den Wildtypmäusen als auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen nicht signifikant an.

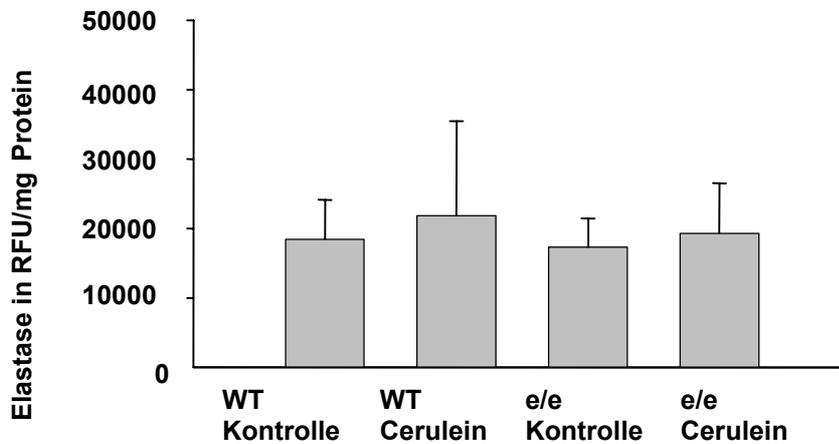


Abbildung 5.12: Elastase Aktivität im Pankreashomogenat

In allen Gruppen fand sich ein konstanter Gehalt an Elastase in den Homogenaten. Die Aktivität dieses Enzyms stieg während der Pankreatitis sowohl bei den Wildtypmäusen als auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen kaum an;

5.9 Lokalisation von iNOS in der Cerulein-induzierten Pankreatitis mittels indirekter Immunfluoreszenz

Der MC1-Rezeptor beeinflusst den Ablauf von Entzündungen. Er nimmt dabei über den intrazellulären Signalweg des NF κ B Einfluss auf Apoptose und Expression von Proteinen, die zellulären Stress anzeigen und damit wichtige Aufgaben im Verlauf des Entzündungsgeschehens haben. Zu diesen Proteinen gehört auch die induzierbare Form der Stickstoffoxidsynthase (iNOS). Dieses Protein wird direkt von den Azinuszellen synthetisiert.

Das Enzym iNOS wurde von den Azinuszellen des Pankreas nach der Induktion der Pankreatitis mittels Cerulein exprimiert. Dies ließ sich sowohl bei den Wildtypmäusen als auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen zeigen. Das

Ausmaß der Expression erschien auch nach wiederholten Experimenten in der Gruppe der (e/e) Mäuse nach Cerulein-Applikation geringer ausgeprägt zu sein. Gesunde Tiere zeigten in beiden Gruppen erwartungsgemäß keine Expression der iNOS. Azinuszellen waren der Zelltyp, in dem die iNOS in der Pankreatitis hochreguliert wurde. Das Signal war im Zytoplasma der Zellen lokalisiert.

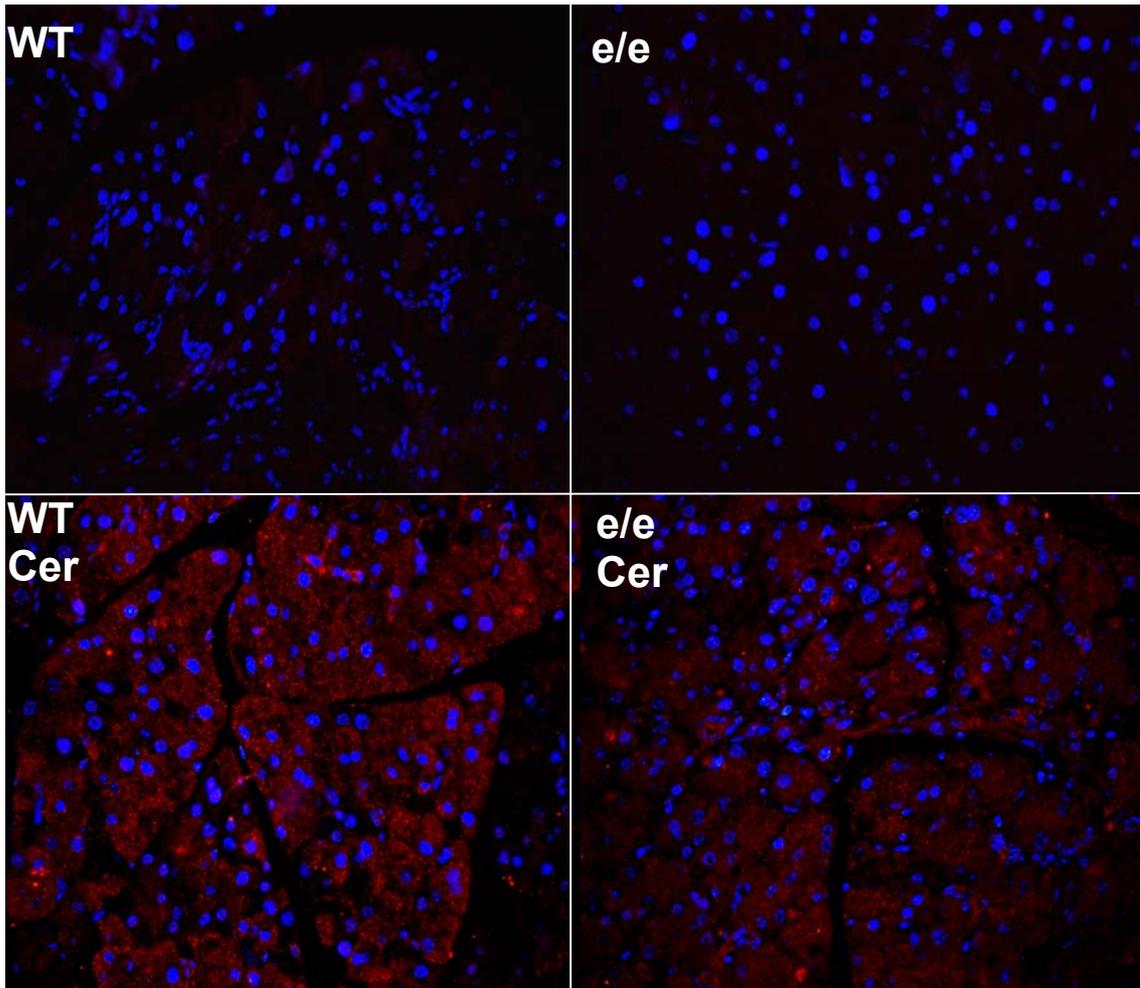


Abbildung 5.13: Indirekte Immunfluoreszenz iNOS im Pankreashomogenat

Pankreasgewebe, das von Tieren gewonnen wurde, die mit Cerulein behandelt wurden, zeigten eine Expression der iNOS. Pankreasgewebe von mit NaCl behandelten Mäusen der Kontrollgruppe zeigte keine Expression der iNOS.

WT: Wildtypmauspankreas; WT Cer: Wildtypmauspankreas nach Induktion der Pankreatitis mittels Cerulein; e/e: Pankreasgewebe einer gelben rezessiven (e/e) Maus; e/e Cer: gelbe rezessive (e/e) Maus mit Cerulein induzierter Pankreatitis

5.10 Lokalisation von neutrophilen Granulozyten im Pankreasgewebe mittels indirekter Immunfluoreszenz der Myeloperoxidase

Neutrophile Granulozyten exprimieren das Enzym Myeloperoxidase. Über die Markierung dieses Enzyms mittels Antikörpern können diese Zellen im Pankreasgewebsschnitten sichtbar gemacht werden.

Im nicht entzündeten Pankreas der Wildtypmäuse und der gelben rezessiven (e/e) Mäuse ließ sich keine Myeloperoxidase anfärben. In den Gewebsschnitten aus entzündlich veränderten Pankreas ließ sich Myeloperoxidase anfärben. Das Signal fiel mit eingewanderten Zellen zusammen. Die Zellkerne zeigten in der Dapi-Färbung die typische Form segmentkerniger Granulozyten. Die Granulozyten befanden sich vor allem in Gefäßen und hatten zum Teil das Pankreasgewebe infiltriert. Pankreasgewebsschnitte von gesunden Mäusen zeigten keine Signale der Myeloperoxidase (Bilder nicht gezeigt).

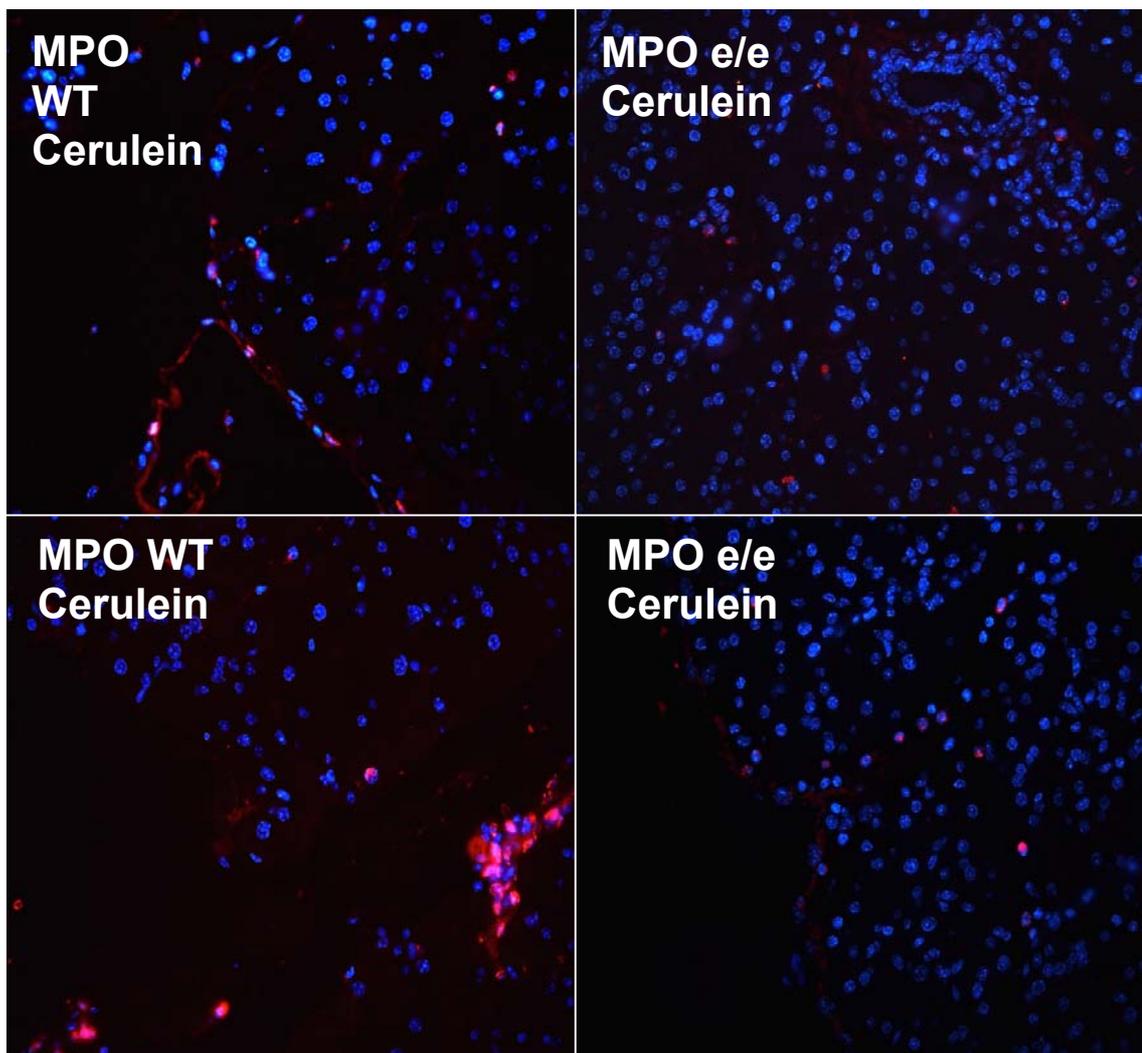


Abbildung 5.14: Indirekte Immunfluoreszenz Myeloperoxidase (MPO) im Pankreashomogenat. Granulozyten wurden über ihre Expression der Myeloperoxidase angefärbt. Sowohl im Gewebe der Wildtypmäuse (WT) als auch im Gewebe der gelben rezessiven (e/e) Mäuse konnten, nach der Behandlung mit Cerulein, neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Der Antikörper gegen die Myeloperoxidase ist an einen roten Fluoreszenzmarker gekoppelt und erscheint rot. Alle Gewebsschnitte zeigen Pankreasgewebe aus Mäusen, die zuvor mit Cerulein behandelt wurden. Es wurden auch Pankreasgewebsschnitte aus gesunden Mäusen beider Gruppen behandelt. Hier zeigten sich keine Signale der Myeloperoxidase (nicht gezeigt).

5.11 Lokalisation des MC1-Rezeptors in der Cerulein-induzierten Pankreatitis mittels indirekter Immunfluoreszenz

Zum Nachweis des MC1-Rezeptors im Pankreas wurden Gewebsschnitte von Wildtyptieren und rezessiven gelben (e/e) Mäusen mit einem Antikörper inkubiert, der gegen den MC1-Rezeptor gerichtet war. Es wurden sowohl Gewebe von gesunden, als auch von mit Cerulein behandelten Tieren mit dem Antikörper inkubiert.

In den Geweben von gesunden Tieren konnte kein spezifisches Signal nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In Gewebsschnitten von Tieren, die mit Cerulein behandelt worden sind, konnte ein spezifisches Signal in eingewanderten neutrophilen Granulozyten gezeigt werden. Dieses Signal konnte in Wildtypmäusen als auch in gelben rezessiven (e/e) Mäusen nachgewiesen werden.

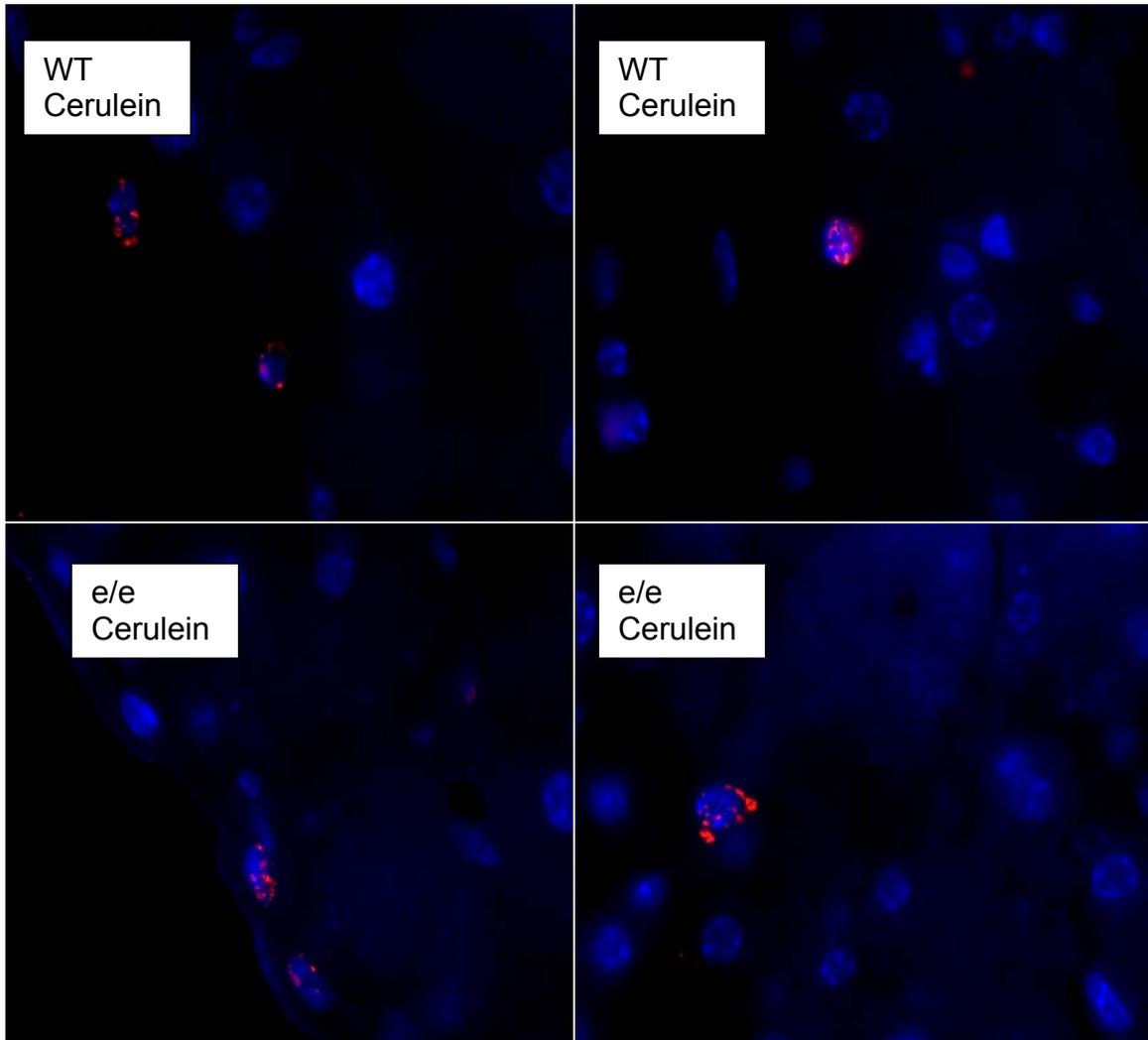


Abbildung 5.15: Indirekte Immunfluoreszenz MC1-Rezeptor im Pankreas

Auf Granulozyten, die das Pankreas in der Entzündung infiltrieren, konnte der MC1-Rezeptor mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für den Wildtypstamm (WT Cerulein), als auch für die gelben rezessiven (e/e) Mäuse (e/e Cerulein), die mit Cerulein behandelt wurden.

5.12 Immunisierung und Aufreinigung eines Antikörpers gegen den MC1-Rezeptor

Über die Expression des MC1-Rezeptors im Pankreas finden sich keine Angaben in der Literatur. Der Nachweis des Rezeptors auf Melanozyten und auf immunkompetenten Zellen, deutet darauf hin, dass dieses Protein nicht nur Aufgaben im Bereich der Pigmentierung von Haut und Haaren hat, sondern auch den Ablauf des Entzündungsgeschehens beeinflusst. Mit dem Antikörper sollte der Frage nachgegangen werden, ob der MC1-Rezeptor im Pankreas, speziell in welchem Zelltyp, exprimiert wird. Geklärt werden sollte, ob ortständige Zellen, wie zum Beispiel die Azinuszellen oder Fibroblasten das Protein exprimieren, oder ob Entzündungszellen, die in der Pankreatitis in das Organ einwandern, das Protein exprimieren.

Hühner wurden mit einem Peptid, das einem Teil der Aminosäuresequenz des MC1 Rezeptors entspricht, immunisiert. Aus dem Hühnereigelb konnte ein polyklonaler Antikörper der Klasse IgY aufgereinigt werden. Die Qualität der Aufreinigung ist mit Hilfe von Coomassiegelen überprüft worden, bevor der Antikörper in der Immunhistochemie und im Westernblot getestet wurde. Die aus dem Hühnereigelb aufgereinigten Antikörper gehören zur Klasse IgY. Dies entspricht der IgG Antikörperklasse der Säugetiere. Die Antikörper haben ein Molekulargewicht von ungefähr 150 kD. Bei der Aufreinigung erhält man größtenteils getrennte Fragmente des Antikörpers.



Abbildung 5.16: Auftrennung der Hühner-AK gegen den MC1-Rezeptor nach dem Molekulargewicht im Coomassie gefärbten Polyacrylamid-Gel
Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau
Zwischen 32.5 kD und 83 kD finden sich die aus dem Hühnereigelb aufgereinigten Proteine.

5.12.1 Testung des IgY-Antikörpers im Westernblot

Um MC1-Rezeptoren in gesunden und entzündeten Organen nachzuweisen, wurden Pankreashomogenate mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine der Homogenate wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Antikörper gegen den MC1-Rezeptor inkubiert.

Aus den Sequenzierungsdaten ist für den MC1-Rezeptor ein molekulares Gewicht von 35 kD zu entnehmen. Der kommerzielle Antikörper gegen den humanen MC1-Rezeptor von Abcam^R lieferte im Westernblot eine Bande bei 43kD. Dieser Unterschied wird mit der Glykosylierung des Rezeptors begründet. Zusätzlich wurden hoch aufgereinigte Azinuszellen aus Pankreasgewebe homogenisiert und für Westernblotanalysen weiter verwendet.

5.12.2 Nachweis eines Proteins durch den Hühner-(IgY)-Antikörper im Pankreashomogenat

Bei 45 kD wurde in den Homogenaten aus allen Gruppen ein Protein spezifisch vom Hühner-(IgY)-Antikörper erkannt. Sowohl die gelben rezessiven (e/e) Mäuse als auch die Wildtypmäuse zeigten in den Homogenaten aus gesunden Organen ein deutliches Signal. In den mit Cerulien behandelten Gruppen zeigte sich ein schwächeres Signal bei 45 kD im Verhältnis zu den Kontrollgruppen. Die Proben waren vor der Verarbeitung für den Western Blot auf einen gleichen Proteingehalt von 2,67 mg Protein pro ml angeglichen worden.

Das vom Antikörper erkannte Protein hat ein Molekulargewicht von 45 kD; in den mit Cerulein behandelten Tieren wurde das Protein im Pankreas herunterreguliert.

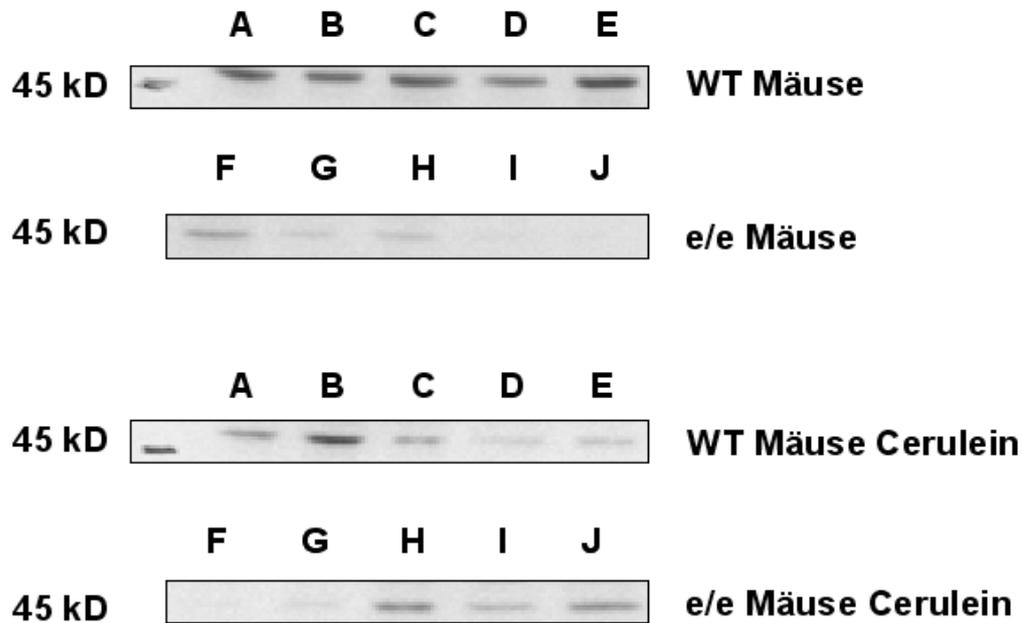


Abbildung 5.17: Western Blot; Pankreashomogenate; Hühner-(IgY)-Antikörper

A-E: WT Mäuse

F-J: gelbe rezessive (e/e) Mäuse

Mit dem Hühner-(IgY)-Antikörper konnte in Homogenaten aus Pankreasgewebe, sowohl bei WT Mäusen als auch bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen, ein Protein bei 45 kDa nachgewiesen werden. Die Signalintensität war bei den Tieren, die mit Cerulein behandelt wurden schwächer.

5.12.3 Nachweis eines Proteins durch den Hühner-(IgY)-Antikörper im Azinuszellen

Abbildung 5.17 zeigt das Ergebnis eines Westernblot mit Beladung des SDS-Gels mit Azinuszell-Homogenaten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der von hier aufgereinigte Antikörper sowohl im Pankreashomogenat als auch im Azinuszell-Homogenat an einem Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa bindet.

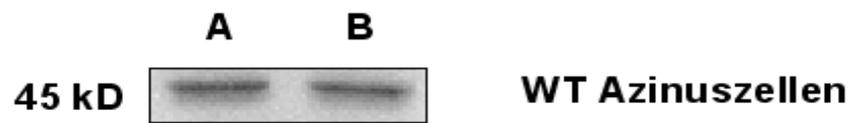


Abbildung 5.18: Western Blot; Azinuszellhomogenate

A, B unterschiedliche Azinuszellhomogenate; Mit dem Hühner-(IgY)-Antikörper konnte ein Protein bei 45 kDa nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Die Pathogenese der akuten ödematösen Pankreatitis ist unklar. Während ältere Experimente und Untersuchungen zur hereditären Pankreatitis eine vorzeitige Proteasenaktivierung in den Vordergrund stellen [12; 50; 75; 124; 131; 141], zeigen neuere Experimente die Bedeutung infiltrierender Leukozyten [7; 89; 109]. Zentraler Gegenstand der Forschung zur vorzeitigen Proteasenaktivierung ist das Enzym Trypsinogen/Trypsin. Die intrazelluläre Sortierung des lysosomalen Enzyms Cathepsin B wird ebenfalls für das initiale Ereignis der ödematösen Pankreatitis verantwortlich gemacht. Allerdings zeigen alle bisher aufgestellten Modelle zur akuten ödematösen Pankreatitis Schwächen. So kann Cathepsin B Trypsinogen in Trypsin überführen, welches wiederum am Beginn einer intrazellulären Enzymaktivierung stehen könnte, allerdings findet man nicht nur während der Pankreatitis eine Co-Lokalisation der Enzyme in den Zymogen-Granula, sondern auch unter physiologischen Bedingungen [125; 140].

Untersuchungen von Halangk et al. zeigen, dass Trypsin möglicherweise einen protektiven Einfluss auf den Verlauf der Pankreatitis nehmen kann, indem aktives Trypsin direkt durch Trypsin abgebaut wird [55].

Das Peptid α -MSH hat in verschiedenen Tiermodellen gezeigt, dass es modulierenden Einfluss auf den Ablauf des Entzündungsgeschehens hat. Peptide die Einfluss auf das Entzündungsgeschehen nehmen sind von besonderem Interesse, da sie einen tieferen Einblick in die Abläufe ermöglichen und mögliche Interventionsmöglichkeiten aufdecken. α -MSH wirkt über Melanocortin-Rezeptoren auf Entzündungszellen [6; 9; 19; 57; 117; 120; 142]. Der Einfluss des α -MSH auf die Pankreatitis ist in einem Pankreatitismodel der Ratte untersucht worden.

Intraperitoneal appliziertes α -MSH führt im Tiermodell der Cerulein-induzierten Pankreatitis der Ratte zu einer milder verlaufenden Form der akuten

ödematösen Pankreatitis [65]. In diesen Experimenten führt die intraperitoneale Gabe von α -MSH vor der Induktion der Pankreatitis mittels Cerulein zu verringerten Amylaseaktivitäten im Serum, zu einem geringeren Ödem des Pankreas, zu geringeren Myeloperoxidaseaktivitäten im Pankreas und zu abgeschwächten mikroskopischen Veränderungen. α -MSH bewies auch in anderen Tiermodellen antiinflammatorische Aktivität [63]. Im Entzündungsmodell des Mausgehirns durch Lipopolysaccharide zeigte sich nach Applikation von α -MSH eine verringerte Aktivierung von NF-kappaB. Das Peptid α -MSH ist von pharmakologischem Interesse, und eine Anwendung bei entzündlichen Erkrankungen beim Menschen wird erforscht. Ceriani et al. zeigen zum Beispiel im Modell der Maus zur rheumatoiden Arthritis, dass der Einsatz von α -MSH gleichwertig zum Einsatz von Corticosteroiden ist [20]. α -MSH führt zu einer geringeren klinischen und histologischen Ausprägung der experimentellen Arthritis in der Maus im Vergleich zu nicht behandelten Tieren. Zusätzlich zeigen die Tiere einen geringeren Gewichtsverlust.

α -MSH zeigte im globalen Ischämie-Modell der Ratte einen neuroprotektiven Einfluss [38]. Ratten die nach einer Ischämie des Gehirns mit α -MSH behandelt wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Zahl an vitalen Neuronen als Tiere, die mit Kochsalzlösung behandelt wurden. Zusätzlich war die astrozytäre Proliferation als Ausdruck der postischämischen Entzündungsreaktion verringert.

Die gelbe rezessive (e/e) Maus stellt eine Möglichkeit dar, den Einfluss des Liganden-Rezeptorsystems α -MSH-MC1-Rezeptor auf die akute ödematöse Cerulein-induzierte Pankreatitis in der Maus zu erforschen. α -MSH bindet mit höchster Affinität an den Melanocortin 1-Rezeptor. Über den MC1-Rezeptor soll die antiinflammatorische Eigenschaft des α -MSH vermittelt werden. Weitere Hinweise für die Wirkung des α -MSH und des MC1-Rezeptor auf das Entzündungsgeschehen geben die Lokalisation des MC1-Rezeptors auf Leukozyten und die Wirkung des MC1-Rezeptors auf das NF- κ B.

Durch eine Basendeletion mit anschließender Rasterschubmutation im MC1-Rezeptor Gen, exprimieren die gelben rezessiven (e/e) Mäuse einen funktionslosen MC1-Rezeptor, der nicht mehr an G-Proteine binden und damit

keinen Einfluss auf Stoffwechselfvorgänge innerhalb der Zelle nehmen kann. Das verkürzte Protein bricht nach der vierten Transmembrandomäne ab. Im funktionsfähigen Zustand besitzt das Protein sieben Transmembrandomänen und gehört zu der Gruppe der sogenannten Serpentine-Rezeptoren. Das Protein kann nicht mehr an G-Proteine binden und damit auch keinen Einfluss auf den cAMP Gehalt der Zelle nehmen [105].

Eindrucksvoll zeigt sich der Funktionsverlust des Proteins an der Fellfarbe der Mäuse, da der MC1-Rezeptor der Maus auch Einfluss auf die Fellfarbe nimmt [105]. α -MSH wirkt über den MC1-Rezeptor auf die cAMP-Konzentration der Zellen. Bei hohen cAMP-Konzentrationen wird vermehrt das dunkle Eumelanin gebildet. Sinkt die cAMP-Konzentration wird das rötliche Phaeomelanin gebildet [119].

α -MSH kann in den gelben rezessiven (e/e) Mäusen über den MC1-Rezeptor keine Wirkung mehr entfalten. Somit kann die Pankreatitis bei Mäusen untersucht werden, bei denen die Wirkung von endogenen α -MSH über den MC1-Rezeptor nicht mehr stattfindet. Gelbe rezessive (e/e) Mäuse in der Cerulein-induzierten Pankreatitis sind damit ein Modell für die Funktion von α -MSH und des MC1-Rezeptors in der akuten Pankreatitis.

6.1 Charakterisierung der Cerulein-induzierten Pankreatitis in der gelben rezessiven (e/e) Maus

Zentraler Punkt der Arbeit ist die Fragestellung, welchen Einfluss der Funktionsverlust des MC1-Rezeptors auf die Induktion einer Pankreatitis mittels Cerulein in der gelben rezessiven (e/e) Maus hat.

Die gelben rezessiven (e/e) Mäuse zeigten bei der Induktion der Pankreatitis durch Cerulein keinen Anstieg der Serum-Amylaseaktivität. Bei Wildtypmäusen konnte bei der Induktion der Pankreatitis mit Cerulein ein signifikanter Anstieg der Serumamylaseaktivität festgestellt werden. Dieser Anstieg ist mit dem Zelluntergang und der gestörten Sekretion während der Pankreatitis zu erklären. Der Anstieg von Amylase und Lipase im Serum ist charakteristisch bei einer akuten Pankreatitis. Mäuse, die an einer ödematösen Pankreatitis durch Ceruleininduktion erkranken, zeigen als Ausdruck der Entzündung einen

Anstieg der Serum-Amylaseaktivität [7; 56; 91]. Beim Menschen nutzt man, neben der Lipaseaktivität, die Amylaseaktivität im Serum, um die Diagnose Pankreatitis zu stellen. Die in den Experimenten gemessenen Werte der Serum-Amylaseaktivität liegen bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen im Bereich der Kontrollgruppen und würden keine akute Pankreatitis bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen vermuten lassen. Halangk et al. 2000 fanden in der Cerulein-induzierten Pankreatitis der Maus, acht Stunden nach der Induktion, im Serum eine Amylaseaktivität von 45 U/ml Serum [56]. Die Kontrollgruppe der Experimente, die mit NaCl behandelt wurde, zeigte Werte um 10 U/ml Serum. Norkina et al. 2006 konnten einen Anstieg der Serumamylaseaktivität in der Kontrollgruppe von 10 U/ml auf 60 U/ml Serum 12 Stunden nach der Pankreatitisinduktion mittels Cerulein bei der Maus demonstrieren [91]. Anna et al. 2002 zeigten bei Wildtypmäusen in der Cerulein-induzierten Pankreatitis eine Vervierfachung der Amylaseaktivität im Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit NaCl-Lösung behandelt wurde [7]. Die Serumamylaseaktivität in den im Ergebnisteil beschriebenen Experimenten erreichte bei den mit Cerulein behandelten Wildtypmäusen durchschnittlich einen Wert von 33.4 U/ml Serum. Die mit NaCl-Lösung behandelten Mäuse zeigten eine Aktivität von 12.4 U/ml Serum. Diese Werte sprechen im Vergleich mit der Literatur für eine akute Pankreatitis bei den Wildtypmäusen. Anders ist das Bild bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen. Die mit Cerulein behandelten gelben rezessiven (e/e) Mäuse zeigten einen durchschnittlichen Wert von 8.1 U/ml Serum. Diese Serum-Amylaseaktivität spricht gegen eine Pankreatitis bei der gelben rezessiven (e/e) Maus nach der Behandlung mit Cerulein. Die gelben rezessiven (e/e) Mäuse, die als Kontrolle mit NaCl behandelt wurden, zeigten mit durchschnittlich 11.7 U/ml Serum, vergleichbare Amylaseaktivität wie die Kontrollgruppe der Wildtypmäuse.

Zur weiteren Untersuchung wurden von den gelben rezessiven (e/e) Mäusen und den Wildtypmäusen HE-gefärbte Gewebsschnitte angefertigt. Die gelben rezessiven (e/e) Mäuse zeigten histologisch nach Cerulein-Induktion in der HE-Färbung Zeichen einer akuten ödematösen Pankreatitis. Die Veränderungen waren bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen milder ausgeprägt als bei den

Wildtypmäusen, sie zeigten weniger Ödem im Gewebe, geringere Anzahl an Vakuolen in den Azinuszellen und eine verringerte Anzahl an Leukozyten. Typisch für eine akute Pankreatitis sind die Veränderungen der Azinuszellen mit Sekretionsblockade und intrazellulären Vakuolen [107], das interzelluläre Ödem und die Infiltration von Monozyten/Makrophagen und Granulozyten. Es findet sich bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen eine Diskrepanz zwischen den histologischen Bildern, die Zeichen einer Pankreatitis zeigen und der gemessenen Serum-Amylaseaktivitäten.

Die Pankreatitis geht mit systemischen Veränderungen einher. Zytokine aus dem Pankreas aktivieren Hepatozyten und Kupffer-Zellen in der Leber, die ihrerseits Zytokine ausschütten. [48; 49] Die erhöhten proinflammatorischen Zytokinspiegel triggern systemische Entzündungsreaktionen. Eine systemische Komplikation der Cerulein-induzierten Pankreatitis der Maus stellt die Entzündungsreaktion der Lunge im Rahmen eines Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) dar. In die Lunge wandern Granulozyten ein, und es kommt zu einer Gefäßdilataion. Zur Quantifizierung der Entzündungsreaktion der Lunge wird die Myeloperoxidaseaktivität, die von den eingewanderten Granulozyten exprimiert wird, in der Lunge gemessen [40]. Sowohl Wildtypmäuse als auch gelbe rezessive (e/e) Mäuse zeigten erhöhte Myeloperoxidaseaktivitäten in den Lungenhomogenaten als Ausdruck einer Entzündung. Zusätzlich sind HE-Färbungen von Lungengewebschnitten angefertigt worden. Die Gewebsschnitte bestätigten die Entzündungsreaktion der Lungen. Die Lungen der Mäuse, die mit Cerulein behandelt wurden, zeigten ein interalveoläres Ödem, Hyperämie und eine Infiltration von Leukozyten. Die Histologie des Lungengewebes bestätigt die Beteiligung der Lunge im Rahmen des SIRS [11]. Für die Entzündungsreaktion der Lunge werden proinflammatorische Zytokine verantwortlich gemacht [81], die von Azinuszellen und vor allem durch eingewanderte Leukozyten sezerniert werden.

Die gelben rezessiven (e/e) Mäuse entwickeln nach der Applikation von supramaximalem Cerulein eine milde akute ödematöse Pankreatitis. Dies zeigt die Histologie der Organe. Die Pankreatitis unterscheidet sich allerdings bei den

gelben rezessiven (e/e) Mäusen von den Wildtypmäusen. Die Serum-Amylaseaktivität steigt bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen nicht an. Histologisch zeigten die gelben rezessiven (e/e) Mäuse milde Zeichen einer akuten Pankreatitis. Die Entzündungsreaktion der Lunge als Ausdruck der systemischen Auswirkungen der Pankreatitis ist bei Wildtypmäusen und gelben rezessiven (e/e) Mäusen histologisch und durch die Messung der Myeloperoxidase-Aktivität nachweisbar.

Zur Charakterisierung der akuten Pankreatitis wurden im Homogenat des Pankreas der Versuchstiere Enzymmessungen durchgeführt. Es wurden Amylase, Cathepsin B, Trypsinogen, Trypsin und Elastase gemessen. Zusätzlich wurde die Cathepsin B Aktivität im Serum der Mäuse gemessen.

Die Wildtypmäuse zeigten nach der Induktion der Pankreatitis durch Cerulein einen Anstieg der Amylaseaktivität im Pankreashomogenat. Der Aktivitätsanstieg kann auf die Sekretionsblockade zurückgeführt werden. In anderen Arbeiten konnte eine Reduktion der exokrinen Sekretion des Pankreas festgestellt werden, die zu einer Akkumulation von Verdauungsenzymen, bei fortlaufender Proteinbiosynthese, im Pankreas führte [118]. Die neu synthetisierte Amylase wird nicht mehr in das Ausführungsgangsystem des Pankreas abgegeben, sondern in den Azinuszellen gespeichert. Diese Blockade der Sekretion der Verdauungsenzyme ist typisch für eine akute Pankreatitis [68; 92].

Die gelben rezessiven (e/e) Mäuse zeigten in der Pankreatitis in den Pankreashomogenaten eine signifikant erhöhte Cathepsin B-Aktivität. Die Rolle des Cathepsin B in der akuten Pankreatitis ist umstritten. Sicher ist, dass Cathepsin B in vitro Trypsinogen in Trypsin überführen kann. [36]. In einer Versuchsanordnung wurde eine akute Pankreatitis in Cathepsin B defizienten Mäusen induziert. Die Nekrosen in den Organen und die systemische Entzündungsreaktion waren bei diesen Mäusen nicht verringert [56]. Ein Erklärungsansatz für die Auslösung der Pankreatitis durch Cathepsin B sieht eine Umverteilung des Cathepsin B vom lysosomalen in das sekretorische

Kompartiment vor; heute weiß man das Cathepsin B und Trypsin auch unter physiologischen Bedingungen zusammen in gleichen Zellkompartimenten vorliegen können. Eine erhöhte Aktivität des Cathepsin B in den entzündlich veränderten Organen lässt keine Aussage über die Rolle des Cathepsin B in der Startphase der Pankreatitis zu. Zur Überprüfung der Rolle des Cathepsin B in der akuten ödematösen Cerulein-induzierten Pankreatitis muss die genaue Lokalisation des Cathepsin B in den Azinuszellen der gelben rezessiven (e/e) Mäuse in weiterführenden Experimenten dargestellt werden.

Die mit NaCl behandelten gelben rezessiven (e/e) Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyptieren, die mit NaCl behandelt wurden, erhöhte Konzentrationen an Trypsinogen in den Homogenaten. Wildtyptiere zeigten während des Verlaufes der experimentellen akuten Pankreatitis einen Anstieg der Trypsinogenkonzentrationen im Pankreas, die auf eine Blockade der Enzymsekretion [66] zurückzuführen ist. Die Trypsinaktivitäten der gelben rezessiven (e/e) Tiere unterscheiden sich sowohl vor als auch nach der Ceruleinbehandlung nicht von den Wildtyptieren, die mit Cerulein behandelt wurden.

Im Rahmen der Pankreatitis kommt es zur Aktivierung von Trypsinogen in Trypsin. Dieser Vorgang kann sowohl bei den Wildtypmäusen als auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen demonstriert werden. Die Aktivierung des Trypsins in der Pankreatitis in Prozent des Trypsinogens unterscheidet sich bei gelben rezessiven (e/e) Tieren nicht von den Wildtyptieren. In beiden Gruppen ist ungefähr 1% des Trypsinogens von einer Aktivierung, und damit Umwandlung in Trypsin, im Pankreas betroffen. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Halangk et al. 2000. Dort beobachtete man ebenfalls, dass weniger als 1 % des gesamten Trypsinogengehalts im Pankreas an der vorzeitigen intrapankreatischen Umwandlung in aktives Trypsin beteiligt ist [56]. Sicher ist, dass es bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen und Wildtypmäusen keinen Unterschied in der Trypsinaktivität und in der Trypsinogenaktivierung während der Pankreatitis gibt. Damit scheidet als Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Pankreatitis eine Veränderung der Trypsinaktivität und -aktivierung aus. Trypsin wird nach der derzeit meist vertretenen Hypothese eine

zentrale Rolle in der Enzymkaskade der akuten Pankreatitis zugeschrieben (siehe Einleitung).

Die Elastaseaktivitäten unterscheiden sich bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen ebenfalls nicht von den Wildtypmäusen. Dies gilt sowohl für die Kontrollgruppen als auch für die Pankreatitisgruppen.

Die Messung der Cathepsin B-Aktivität im Serum zeigte konstante Aktivitäten sowohl in den mit NaCl behandelten, als auch in den mit Cerulein behandelten Tieren. Dies galt sowohl für gelbe rezessive (e/e) Mäusen wie auch für Wildtypmäuse. Die Cathepsin B Aktivität im Serum ist allerdings kein geeigneter Parameter zur Charakterisierung einer akuten ödematösen Pankreatitis. Cathepsin B verhält sich nach den Beobachtungen in den Experimenten nicht wie Amylase, die während der Entzündung im Prozess der Sekretionsblockade in das Blut übergeht und deren Aktivitätsanstieg auf eine Pankreatitis hinweist. Die Messung von Cathepsin B im Serum von Menschen, die an akuter und chronischer Pankreatitis sowie an duktalem Pankreaskarzinom erkrankt waren, zeigten erhöhte Serumkonzentrationen des Enzyms [82]. Ratten wiesen, während einer Taurocholat-induzierten Pankreatitis, eine Erhöhung der Konzentrationen von Cathepsin B in der Milz auf. Die Erhöhung korrelierte nicht mit dem Amylase-abhängigen Schweregrad der Pankreatitis [84].

Zusammenfassend kann aus den Enzymmessungen bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen auf eine mildere Form einer Pankreatitis geschlossen werden. In der Amylaseaktivität und der Cathepsin B Aktivität finden sich signifikante Unterschiede zwischen gelben rezessiven (e/e) Mäusen und Wildtypmäusen während der Pankreatitis.

Die Mäusestämme unterscheiden sich nicht in den gemessenen basalen Enzymaktivitäten von Amylase, Cathepsin B, Trypsin und Elastase im gesunden Zustand.

Darüber hinaus zeigt sich, dass die Serum-Amylaseaktivität und das histologische Bild des Pankreas Hinweise auf einen schwächeren Verlauf der Cerulein-induzierten Pankreatitis bei der gelben rezessiven (e/e) Maus geben.

Um die Entzündungsaktivität in den Geweben von gelben rezessiven (e/e) Mäusen und Wildtypmäusen darzustellen und zu vergleichen wurde ein Protein im Gewebe markiert, das bekanntlich bei Entzündungsvorgängen in Geweben vermehrt exprimiert wird. Ein solches Protein ist iNOS (inducible nitric oxide synthase).

iNOS gehört zu der Enzymfamilie, zu der die eNOS (endothelial nitric oxide synthase) und die nNOS (neuronal nitric oxide synthase) gehören [4]. NO ist ein bedeutendes Signalmolekül, von dem gezeigt werden konnte, dass es in wichtige physiologische und pathophysiologische Vorgänge im Pankreas involviert ist; so beeinflusst es den Blutfluss [71; 99] und die Sekretion [70; 71] [25]. iNOS wird nicht konstitutiv exprimiert. Immunhistochemisch konnte kein Signal der iNOS im Pankreas gesunder Tiere nachgewiesen werden. Im Pankreas der mit Cerulein behandelten Mäuse konnte dagegen ein Signal im Pankreas nachgewiesen werden. Das Signal war in den Azinuszellen lokalisiert. Das Enzym wird durch extrazelluläre Reize wie Zytokine und Lipopolysaccharide in den Zellen induziert. Die Expression dieses Enzyms im Parenchym des Pankreas, lässt auf eine ablaufende Entzündungsreaktion im Organ schließen. Dies gilt auch für die gelben rezessiven (e/e) Mäuse. Die iNOS Expression im Pankreas der gelben rezessiven (e/e) Mäuse, die mit Cerulein behandelt wurden, ist ein weiterer Hinweis auf die dort ablaufende Entzündung. Al-Mufti et al. zeigten, dass iNOS in der Cerulein-Induzierten Pankreatitis der Ratte im Pankreas exprimiert wird [3]. Allerdings war iNOS in diesen Experimenten, mittels Immunhistochemie, in glatten Muskelzellen der Gefäße und in Endothelzellen des Pankreas nachgewiesen worden. Zusätzlich gelang der Nachweis der iNOS im Westernblot. In den im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten Experimenten wurde iNOS mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das Signal konnte in Azinuszellen detektiert werden. DiMagno et al. weisen auf die kontroversen Meinungen zur Lokalisation der unterschiedlichen NOS im Pankreas hin und zeigten, dass Enzyme der NOS-Familie Einfluss auf die Sekretion im Pankreas haben [32; 33]. Hierbei wurde besonders auf die Bedeutung der eNOS auf die

Stimulierbarkeit des Pankreas hingewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von NOS auf die Sekretion nicht über Azinuszellen wirkt, da eine Blockade der NOS in isolierten Azinuszellen keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der Azinuszellen hatte. In einer Studie wurde allerdings auch von einer Reduktion der Carbachol-stimulierten Amylasesekretion von Azinuszellen nach NOS Inhibition berichtet [143]. Die Wirkung der eNOS soll möglicherweise über die Gefäße und damit über die Durchblutung des Organs vermittelt werden; die Wirkung der nNOS wird möglicherweise über die Nerven des autonomen Nervensystems vermittelt [32].

Hinweise für eine Abhängigkeit der iNOS Expression von α -MSH finden sich in Experimenten zur Cholestase bei der Ratte. Hier wurde, mittels α -MSH-Gentransfer in die Leber, die Aktivität der iNOS in der Leber während einer Cholestase, die durch Ligation des Ductus hepaticus hervorgerufen wurde, herabgesetzt [134].

In einer Zellkultur konnte nachgewiesen werden, dass α -MSH Astrozyten vor LPS/Interferon γ induzierter Apoptose schützt [18]. In den Versuchen konnte demonstriert werden, dass α -MSH zu einer geringeren NO Produktion der Astrozyten führt. Zusätzlich reduziert α -MSH die Expression von iNOS in Astrozyten. Auch diese Arbeit zeigt die Abhängigkeit der iNOS-Expression von der Wirkung des α -MSH. In diesen Experimenten wird der MC4-Rezeptor als möglicher Rezeptor, über den α -MSH seine Wirkung vermittelt beschrieben. Diese Arbeiten verdeutlichen zusätzlich die Abhängigkeit der iNOS-Expression von entzündlichen Vorgängen.

6.2 MC1-Rezeptor-Expression in der Pankreatitis

Der MC1-Rezeptor wird von Zellen des Entzündungssystems exprimiert [6; 9; 19; 57; 117; 120; 142]. Über diese Zellen, die das Pankreas in der Entzündung infiltrieren, kann α -MSH Einfluss auf die Pankreatitis nehmen. In der Literatur findet sich kein Hinweis auf eine Expression des MC1-Rezeptors auf Azinuszellen. Die Azinuszellen stellen den Zelltyp im Pankreas dar, von dem die Cerulein-induzierte Pankreatitis ihren Ursprung nimmt [138]. Eine

Expression des MC1-Rezeptors auf den Azinuszellen würde einen direkten Einfluss des α -MSH auf den Ursprung der Pankreatitis bedeuten. Zur Lokalisation des MC1-Rezeptors im Pankreas wurden im Rahmen dieser Arbeit Hühner mit einem Peptid aus der Aminosäuresequenz des MC1-Rezeptors immunisiert. Aus dem Hühnereigelb wurde ein Antikörper aufgereinigt und Gewebsschnitte und Homogenate des Pankreas im Westernblot mit dem Antikörper inkubiert. Ziel der Versuche war es, den MC1-Rezeptor im Pankreas zu lokalisieren. Es wurden Gewebsschnitte gesunder Organe und Gewebsschnitte an Pankreatitis erkrankter Mäuse mit dem Antikörper behandelt. Mit diesem Antikörper gelang weder im gesunden Organ noch im entzündlich veränderten Organ der Nachweis des Proteins in der Immunfluoreszenz.

Im Westernblot konnte ein Protein in Azinuszell- und Pankreashomogenaten sowohl bei den Wildtypmäusen als auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen nachgewiesen werden. Im Westernblot zeigte sich allerdings bei den Wildtypmäusen als auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen beim gleichen Molekulargewicht eine Proteinbande. Das Molekulargewicht stimmt mit dem in der Literatur angegebenen Molekulargewicht für den MC1-Rezeptor überein. Der Nachweis des Proteins bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen schließt den Nachweis des MC1-Rezeptors aus, weil bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen der Rezeptor durch die Mutation stark verkürzt ist (siehe Einleitung), und damit im Westernblot ein anderes, geringeres Molekulargewicht aufweisen muss. Zur genauen Erklärung muss das markierte Protein in weiterführenden Experimenten isoliert und sequenziert werden. Möglich ist die Detektion eines noch nicht beschriebenen Mitgliedes der MC1-Rezeptor Familie.

Mit einem Antikörper der Firma Chemicon gegen den MC1-Rezeptor wurden Gewebsschnitte des Pankreas von gesunden Mäusen und von an Pankreatitis erkrankten Mäusen behandelt. In diesen Versuchen gelang der Nachweis eines Proteins in Gewebsschnitten des Pankreas in der Pankreatitis. Das Signal kann in neutrophilen Granulozyten lokalisiert werden. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben in der Literatur überein, die eine Expressierung des MC1-Rezeptors auf diesen Zellen beschreibt. Die Beobachtungen legen nahe, dass

das α -MSH Einfluss auf die Pankreatitis über die einwandernden Leukozyten nimmt.

Mittels PCR wurde die Lokalisation des MC1-Rezeptors im Pankreas weiter untersucht. RNA wurde aus Pankreashomogenaten und aus Azinuszellfraktionen gewonnen und in cDNA umgeschrieben.

Der Nachweis der mRNA des MC1-Rezeptors im Pankreas und in Azinuszellpräparationen gelang nicht. Auch in mRNA-Aufreinigungen aus entzündeten Organen ließ sich keine mRNA des MC1-Rezeptors nachweisen. Mit diesen Ergebnissen lässt sich nicht endgültig klären, ob der MC1-Rezeptor im Organ exprimiert wird. Der Nachweis des MC1-Rezeptors gelang auch in Organen, die als Positivkontrollen eingesetzt wurden, nicht. In der Literatur werden RNA-Aufreinigungen aus der Milz als Positivkontrolle für den MC1-Rezeptor genutzt [6]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die eingesetzten Primer für die Nachweisreaktion nicht geeignet waren.

6.3 Antiinflammatorische Aktivität des MC1-Rezeptors

Der Grund für die Induktion einer Pankreatitis bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen ist die Mutation im MC1-Rezeptor Gen dieser Tiere. Die Mäuse exprimieren einen funktionslosen MC1-Rezeptor. Dieser Rezeptor wird in der Literatur für antiinflammatorische Effekte verantwortlich gemacht. Für diese antiinflammatorischen Effekte gibt es folgende Hinweise:

Der MC1 Rezeptor wird auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Es gibt Hinweise für eine Expression auf Monocyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Astrozyten und Mikroglia. [6; 9; 19; 57; 117; 120; 142].

MC1 Rezeptor selektive synthetische Agonisten führen zu einer Downregulation und verminderten Sekretion von ICAM, VCAM und E-selectin bei menschlichen Hautendothelzellen, die mit TNF- α behandelt worden sind [110].

α -MSH zeigte in verschiedenen Studien antiinflammatorische Eigenschaften. Dies gilt auch für die akute ödematöse Cerulein-induzierte Pankreatitis [65]. Der

Mechanismus für die Wirkung auf die Pankreatitis ist nicht bekannt. Manna und Aggarwal zeigten, dass α -MSH einen Transkriptionsfaktor, NF- κ B, herunterreguliert [86]. Die Aktivität von NF- κ B wird von verschiedenen Stimuli, wie z.B. TNF- α und Endotoxinen beeinflusst. NF- κ B wird in vielen Zelltypen exprimiert und reguliert Gene, die das Entzündungsgeschehen regulieren. α -MSH bindet mit höchster Affinität an den MC1-Rezeptor. Dieser Rezeptor wird wie oben beschrieben, mit verschiedenen Zellen des Immunsystems assoziiert. Der MC1-Rezeptor ist an G-Proteine gebunden. Eine Aktivierung des MC1-Rezeptors über α -MSH führt zu einem Anstieg von cAMP und darüber zu einer Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A. NF- κ B kann in Zellen, die mit α -MSH behandelt wurden, nicht mehr im Zellkern nachgewiesen werden und damit dort auch nicht als Promotor für inflammatorische Proteine dienen.

Manna und Aggarwal [86] konnten zeigen, dass der intrazelluläre Transduktionsweg des α -MSH zur Aktivitätsminderung von NF- κ B über intrazelluläres cAMP läuft. Inhibitoren der Proteinkinase A führten in diesem Zusammenhang zu einer verringerten Hemmung des NF- κ B über das α -MSH. Die Erhöhung des cAMP und die Aktivierung der Proteinkinase A führt zu einer Stabilisierung des I κ B α , welches im Zytoplasma an das NF- κ B gebunden ist und die Translokation des NF- κ B in den Zellkern verhindert. Über diesen Weg kann α -MSH antiinflammatorische Eigenschaften entwickeln. Der Link zwischen dem α -MSH und dem antiinflammatorischen Effekt stellt möglicherweise der MC1-Rezeptor dar, der als Liganden mit der höchsten Affinität das α -MSH besitzt und auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird.

Monozyten/Makrophagen wurden mit Lipopolysacchariden (LPS) bei An- und Abwesenheit von α -MSH stimuliert. Die Sekretion des proinflammatorischen TNF- α sinkt in Abhängigkeit von α -MSH. Mittels RT-PCR konnte in den Monozyten/Makrophagen mRNA des MC1-Rezeptors nachgewiesen werden. Die Inkubation von Zelllinien mit deaktivierenden Antikörpern gegen den MC1-Rezeptor führt zu einem Anstieg der TNF- α Sekretion [120]. Die Experimente

zeigten den möglichen antiinflammatorischen Effekt des α -MSH und die mögliche Wirkung über den MC1-Rezeptor.

Im Dextransulfat-Colitismodell der Maus wurde Mäusen α -MSH verabreicht. Die Gabe von α -MSH führte zu einer verringerten Colitis. Die Menge Blut im Kot der Mäuse war signifikant verringert. Die mit α -MSH behandelten Mäuse verloren im Colitismodell weniger Gewicht und produzieren weniger TNF- α [101]. Übereinstimmende Ergebnisse zeigte das Mausmodell der Trinitrobenzosulfatsäure induzierten Colitits [94]. Diesen Ergebnissen zu Folge wirkt α -MSH antiinflammatorisch.

Für den MC1-Rezeptor ist eine große Variabilität im Gen beschrieben. Es gibt große Evidenz dafür, dass diese Variabilität im MC1-Rezeptor Gen für die unterschiedliche Pigmentierung von Haut und Haaren mit verantwortlich ist [37; 59; 60; 106; 128]. Diese genetische Variabilität bestimmt den Effekt des α -MSH auf die Pigmentierung. Nimmt man einen immunsuppressiven Effekt des MC1-Rezeptors an, würde man bei Individuen mit heller Hautfarbe oder roten Haaren einen geringeren immunsuppressiven Effekt von α -MSH erwarten. Es gibt aber keinen Hinweis für einen Zusammenhang zwischen Pigment-Phänotyp und Grad der Immunsuppression. Eine Arbeitsgruppe hat den immunsuppressiven/antiproliferativen Effekt von α -MSH auf menschliche Lymphozyten in vitro untersucht [29]. Dabei wurden Lymphozyten von Probanden mit unterschiedlichen MC1-Rezeptor Varianten auf ihr Ansprechen auf α -MSH untersucht. Überraschenderweise fanden sich keine Unterschiede bezüglich der unterschiedlichen MC1-Rezeptor Varianten. Zwar fand sich ein immunsuppressiver Effekt des α -MSH auf Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation, allerdings war dieser Effekt unabhängig vom MC1-Rezeptor Status. In die Experimente wurden insbesondere MC1-Rezeptor Varianten aufgenommen, von denen man weiß, dass sie beim Menschen niedrige MC1-Rezeptor Aktivitäten aufweisen.

Die Experimente der gleichen Arbeitsgruppe weisen zusätzlich darauf hin, dass der immunsuppressive Effekt des α -MSH möglicherweise in

Makrophagen/Monozyten und B-Lymphozyten über den MC1-Rezeptor vermittelt wird. Zusätzlich besteht möglicherweise ein Effekt des α -MSH bei B-Lymphozyten über den MC3-Rezeptor. Der Nachweis von MC1- und MC3-Rezeptor gelang mittels RT-PCR. MC1-Rezeptor mRNA konnte in Makrophagen/Monozyten und B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten B-Lymphozyten ein positives Signal in der RT-PCR für MC3-Rezeptoren. Der Nachweis von Melanocortin Rezeptoren gelang nicht auf T-Lymphozyten.

Die Autoren weisen auf einen alternativen Signaltransduktionsweg des MC1-Rezeptors hin [34]. Es gibt Hinweise, dass α -MSH über den MC1-Rezeptor nicht nur auf das cAMP wirken kann, sondern auch Einfluss auf einen Calcium-Einstrom in die Zelle hat. Dieser Calcium-abhängige Signaltransduktionsweg konnte in Keratinozyten unter Hemmung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges nachgewiesen werden. Dieser alternative Weg hat ebenfalls immunsuppressive Wirkung, da auch über diesen Weg in den Experimenten eine Verringerung der TNF- α -Sekretion erzielt werden konnte.

Die Mutation der gelben rezessiven (e/e) Mäuse führt dazu, dass der beschriebene antiinflammatorische Effekt des α -MSH über den MC1-Rezeptor nicht wirken kann, da der Rezeptor, über den α -MSH wirken soll, nicht funktionsfähig exprimiert wird. Damit ist zu erwarten, dass die Cerulein induzierte Pankreatitis bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen stärker ausgeprägt verläuft.

Nach den dargestellten Ergebnissen kann aber von einer stärker verlaufenden Pankreatitis nicht gesprochen werden. Die gelben rezessiven (e/e) Mäuse zeigen eine milder verlaufende Pankreatitis. Dies zeigt sich durch eine verringerte Serumamylaseaktivität und schwächer ausgeprägte histologische Veränderungen des Gewebes.

6.4 Einfluss von Entzündungszellen auf die Pankreatitis

Der Einfluss von Entzündungszellen ist immer als ein später Effekt in der akuten Pankreatitis angesehen worden [78; 80]. Neuere Untersuchungen

konnten zeigen, dass Granulozyten schon in der ersten Stunde nach der Ceruleininjektion in der Ratte das Pankreas infiltrieren [89].

In den Gewebsschnitten der gelben rezessiven (e/e) Mäuse und der Wildtypmäuse können in der HE-Färbung Granulozyten nachgewiesen werden. In der Immunfluoreszenz mit dem MC1 Rezeptor Antikörper der Firma Chemicon kann ein Signal auf Granulozyten gezeigt werden. In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise für eine Expression des MC1-Rezeptors auf Granulozyten [19]. In den Versuchen zeigt sich eine Anhäufung von mRNA des MC1-Rezeptors in der RT-PCR in Granulozyten, die zuvor mit Interferon und LPS aktiviert worden waren.

Der fehlende Nachweis des MC1-Rezeptor Proteins im Pankreas in den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten und der fehlende Hinweis auf die epitheliale Expression des MC1-Rezeptors im Pankreas in der Literatur, deuten darauf hin, dass die Veränderungen der gelben rezessiven (e/e) Mäuse in der Pankreatitis, auf die einwandernden Entzündungszellen zurückzuführen sind. Auf eingewanderten neutrophilen Granulozyten kann in den Experimenten der MC1-Rezeptor in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

In das Gewebe einwandernde Entzündungszellen spielen im Verlauf der akuten Pankreatitis möglicherweise eine wichtigere Rolle als früher angenommen. So konnte gezeigt werden, dass Leukozyten-Elastase eine wichtige Rolle in der Entzündung spielt, da Leukozyten-Elastase in der Lage ist die extrazellulären Zell-Zell-Kontakte zwischen den Azinuszellen durch das Spalten von E-Cadherin aufzulösen. Die Leukozyten Elastase stammt aus neutrophilen Granulozyten [89]. Die physiologische Funktion der Entzündungszellen wird durch den MC1-Rezeptorverlust beeinflusst, und die Entzündungszellen können ihre Wirkung auf den Ablauf der Pankreatitis nicht mehr so wie in den Wildtyptieren entfalten. Zwei Tatsachen sprechen aber gegen die Wirkung der Entzündungszellen auf die unterschiedlich verlaufende Pankreatitis in den beiden Versuchstiergruppen.

Zum einen würde eine Fehlfunktion in der zellulären Immunantwort der gelben rezessiven (e/e) Mäuse, die Tiere für alle Arten von Infektionen und Tumorerkrankungen anfällig machen. Für eine Immunsuppression gibt es keine

Hinweise. Die Tiere sind immunkompetent und zeigen keine erhöhte Rate an Tumorerkrankungen [58]. Möglicherweise spielt der MC1-Rezeptor und damit auch der Ausfall der Funktion in den gelben rezessiven (e/e) Mäusen keine bedeutende Rolle im Ablauf von Entzündungen. Hierfür gibt es aus anderen Tierversuchen mit der gelben rezessiven (e/e) Maus weitere Beispiele (siehe unten). Da α -MSH aber in Tierversuchen eine antiinflammatorischen Wirkung entfaltet, muss die Hypothese geklärt werden, ob die antiinflammatorische Wirkung des α -MSH über andere Rezeptoren als den MC1-Rezeptor vermittelt wird.

Desweiteren sollte, auf die hier dargestellten Experimente zur Pankreatitis bezogen, die Fehlfunktion eines antiinflammatorisch wirkenden Proteins die Entzündungsreaktion verstärken. Für eine stärker verlaufende Pankreatitis gibt es bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen in der Cerulein-induzierten Pankreatitis aber keine Hinweise.

6.5 Die Rolle anderer Melanocortinrezeptoren in der Entzündung / Gelbe rezessive (e/e) Mäuse im Tiermodell

In der Literatur finden sich unterschiedliche Beobachtungen der Wirkung des α -MSH auf das Entzündungsgeschehen. Neben den Beobachtungen, dass α -MSH antiinflammatorische Wirkungen besitzt, ist neueren Untersuchungen zu Folge nicht sicher bekannt, über welchen Rezeptor das α -MSH seine Wirkung auf die Zelle vermittelt.

Getting et al. haben den natürlich vorkommenden MC1-Rezeptor-defizienten Mausstamm, die gelben rezessiven (e/e) Mäuse, für die Induktion einer Peritonitis genutzt. Peritonealmakrophagen aus gelben rezessiven (e/e) Mäusen und Wildtypmäusen wurden auf die Expression des MC1-Rezeptors und des MC3-Rezeptors hin untersucht. Die Experimente deuten darauf hin, dass ein funktionsfähiger MC1-Rezeptor für die antiinflammatorischen Effekte des α -MSH nicht notwendig ist, und dass der antiinflammatorische Effekt über den MC3-Rezeptor vermittelt werden könnte. Beide Rezeptoren konnten auf Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden. Die Entzündungsreaktion einer experimentellen Peritonitis ist bei Wildtypmäusen und gelben rezessiven (e/e)

Mäusen gleich stark ausgeprägt. Die Gabe eines nichtselektiven Melanocortin-Agonisten reduzierte in beiden Mausstämmen die induzierte Peritonitis. Die Gabe eines selektiven MC1-Rezeptor-Agonisten beeinflusste die Peritonitis weder in der Wildtyp- noch in der gelben rezessiven (e/e) Maus [43].

Gelbe rezessive (e/e) Mäuse wurden in einem Entzündungsmodell des Gehirns eingesetzt, in dem die Entzündungsreaktion des Gehirns durch systemische Lipopolysaccharide (LPS) untersucht wurde [63]. Dabei wurde den Tieren neben LPS α -MSH verabreicht. α -MSH reduzierte die Entzündungsreaktion über seine Wirkung auf das NF- κ B, das nicht mehr in den Zellkern gelangen konnte, um seine Wirkung als Transkriptionsfaktor auf Gene der Entzündungsreaktion auszuüben. Die Wirkung des α -MSH konnte sowohl bei Wildtyp- als auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen nachgewiesen werden, so dass die Einbeziehung eines weiteren Rezeptors nahe liegt. α -MSH wirkte auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen. Diese Wirkung muss über einen anderen Rezeptor als den MC1-Rezeptor vermittelt werden, da der MC1-Rezeptor bei diesem Mausstamm funktionslos ist.

Im Myokardischämie-Reperfusion-Modell der Maus wurde die antiinflammatorische Wirkung des α -MSH untersucht. Die Mäuse wurden mit einem α -MSH Agonisten behandelt. Die Entzündungszeichen im Myokardischämie-Reperfusion-Modell waren bei Mäusen, die mit dem Agonisten behandelt wurden, signifikant niedriger. Dies gilt auch für die gelben rezessiven (e/e) Mäuse, die in diesem Tiermodell zum Einsatz kamen. Damit kann in diesem Tiermodell die Wirkung des α -MSH Agonisten über den MC1-Rezeptor ausgeschlossen werden. Die MC3-Rezeptor Expression konnte auf Makrophagen im Herzen von Wildtypmäusen und gelben rezessiven (e/e) Mäusen nachgewiesen werden. Auch dieses Experiment legt die antiinflammatorische Wirkung des α -MSH über einen anderen Rezeptor nahe. Möglicherweise kann α -MSH über den MC3-Rezeptor antiinflammatorisch wirken [44].

In einer Zellkulturarbeit konnte gezeigt werden, dass Astrozyten MC4-Rezeptoren exprimieren [18]. Der Nachweis des MC4-Rezeptors gelang sowohl auf Ebene der mRNA mittels RT-PCR, als auch mittels Immunhistochemie. α -MSH wirkte über diesen Rezeptor antiapoptotisch auf Astrozyten, wenn diese mit Interferon und LPS behandelt wurden. Der Nachweis von MC3-Rezeptoren gelang auf Astrozyten nicht. Wie zuvor beschrieben scheint der MC1-Rezeptor im Entzündungsgeschehen des Gehirns keine Rolle zu spielen [63]. Somit zeigen diese Experimente einen weiteren möglichen Rezeptor auf, der die antiinflammatorischen Aktivität des α -MSH vermitteln kann.

In Mausmodellen zur allergischen und nicht-allergischen Entzündungsreaktion der Lunge, konnten im Western Blot auf isolierten Alveolarmakrophagen MC1 – und MC3-Rezeptoren nachgewiesen werden [46]. Die Inkubation mit selektiven MC1- und MC3-Rezeptoragonisten führte nur bei der Anwendung der MC3-Rezeptoragonisten zu einem Anstieg des cAMP-Gehaltes in den Zellen. Auch die Anwendung eines unspezifischen Melanocortinrezeptoragonisten führte zur Erhöhung des cAMP-Gehaltes in den Zellen. Alveolarmakrophagen aus gelben rezessiven (e/e) Mäusen zeigten ebenfalls einen Anstieg des cAMP. Dies verdeutlicht die Möglichkeit der Aktivierung der Zellen über den MC3-Rezeptor, da der MC1-Rezeptor inaktiviert ist.

Im allergischen Entzündungsmodell der Lunge zeigten α -MSH und ein selektiver MC3-Rezeptoragonist antiinflammatorische Wirkung. Diese Wirkung konnte auch in der gelben rezessiven (e/e) Maus nachgewiesen werden. In Mäusen, die keinen MC3-Rezeptor exprimieren, konnte kein antiinflammatorischer Effekt von α -MSH und dem MC3-Rezeptoragonisten nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in einem nicht-allergischen Entzündungsmodell der Lunge der Maus.

Hier wird die antiinflammatorische Wirkung des α -MSH deutlich, die möglicherweise mit einer Aktivierung von MC3-Rezeptoren gekoppelt ist.

Im Mausmodell der Dextran-Natriumsulfat (DSS) Colitis konnte der antiinflammatorische Effekt von α -MSH und dem α -MSH-Abkömmling α -

MSH(11-13) (KPV) gezeigt werden [69; 101]. KPV verhindert in der DSS induzierten Colitis auch bei den gelben rezessiven (e/e) Mäusen den Tod durch dieses Krankheitsbild. Damit kann die Wirkung des KPV nicht über den MC1-Rezeptor vermittelt werden, da dieser in der gelben rezessiven (e/e) Maus inaktiv ist.

7 Zusammenfassung

Die genauen Ursachen für eine ödematöse Pankreatitis sind nicht geklärt. Um den Einfluss des MC1-Rezeptors auf die Pankreatitis zu untersuchen, ist bei gelben rezessiven (e/e) Mäusen eine experimentelle Pankreatitis mit Cerulein induziert worden. Die Induktion der Pankreatitis mittels Cerulein ist ein in der Literatur weit verbreitetes Verfahren, das in der Maus ein Krankheitsbild mit vielen Parallelen zum Entzündungsgeschehen des menschlichen Pankreas hervorruft.

Gelbe rezessive (e/e) Mäuse unterscheiden sich in der Cerulein-induzierten Pankreatitis von Wildtypmäusen. Beide Gruppen entwickeln eine Pankreatitis, die in der Gruppe der gelben rezessiven (e/e) Mäuse sowohl histologisch, als auch laborchemisch milder verläuft.

Der Nachweis des MC1-Rezeptors im Pankreas gelingt weder im Westernblot noch mittels PCR. In der Literatur gibt es keinen Hinweis für eine epitheliale Expression des MC1-Rezeptors im Pankreas.

α -MSH hat in der Literatur eine positive Wirkung auf die Cerulein-induzierte Pankreatitis der Ratte [65]. Weitere Experimente müssen klären, über welchen Rezeptor das α -MSH wirkt und über welchen Zelltyp die Wirkung vermittelt wird. In der Literatur finden sich verschiedene Entzündungsmodelle, die in der gelben rezessiven (e/e) Maus angewandt wurden, um die Auswirkung des Verlustes der MC1-Rezeptorfunktion auf das Entzündungsgeschehen zu untersuchen.

Grundlage dieser Experimente ist die Annahme, dass α -MSH antiinflammatorische Wirkung über den MC1-Rezeptor vermittelt. Auch hierzu gibt es verschiedene experimentelle Daten. Durch die neueren Ergebnisse der Experimente in der gelben rezessiven (e/e) Maus, bestehen Zweifel an der zentralen Rolle des MC1-Rezeptors. Gelbe rezessive (e/e) Mäuse weisen keinen Immundefekt aufweisen, obwohl dieser zu erwarten wäre, wenn ein antiinflammatorisch wirkendes Protein funktionslos ist. Vielmehr zeigen α -MSH und α -MSH-agonistisch wirkende Substanzen auch in der gelben rezessiven (e/e) Maus antiinflammatorisch Wirkung. MC3-Rezeptoren lassen sich ebenfalls auf Zellen, die in das Entzündungsgeschehen eingreifen, nachweisen. Damit rückt ein anderer Melanocortinrezeptor als möglicher Zielrezeptor des α -MSH in den Mittelpunkt. Dies würde auch erklären, warum die Pankreatitis in der gelben rezessiven (e/e) Maus nicht schwerer verläuft als in der Gruppe der Wildtypmäuse.

Mutationen im MC1-Rezeptor Gen bestimmen ganz erheblich die Fellfarbe bei Tieren und Haut-/Haarfarbe beim Menschen. Menschen mit heller Hautfarbe oder roten Haaren, die auf niedrige MC1-Rezeptor Aktivitäten beruhen, müssten durch niedrige Aktivitäten eines antiinflammatorisch wirkenden Proteins einen höheren Grad der Immunsuppression aufweisen. Phänotyp-Genotyp Untersuchungen zeigen keine Hinweise für eine vermehrte Immunsuppression. Untersuchungen an menschlichen Lymphozyten zeigen zwar den antiinflammatorischen Effekt des α -MSH, dieser ist aber unabhängig vom der MC1-Rezeptor-Variante.

Trotzdem können weitere Experimente zur akuten Pankreatitis im Tiermodell der gelben rezessiven (e/e) Maus grundlegende Erkenntnisse zur Pathogenese liefern, da die Experimente darauf hin deuten, dass die Pankreatitis in den gelben rezessiven (e/e) Mäusen in unterschiedlicher Ausprägung verläuft als in Wildtypmäusen. Allerdings verläuft die Entzündung nicht verstärkt, sondern in einer mildereren Form.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Abdel-Malek, Z. A. (2001) Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. Cell Mol Life Sci **58**:S. 434-41.
- 2 Adler, G., Hupp, T., et al. (1979) Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. Virchows Arch A Pathol Anat Histol **382**:S. 31-47.
- 3 Al-Mufti, R. A., Williamson, R. C., et al. (1998) Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis. Gut **43**:S. 564-70.
- 4 Alderton, W. K., Cooper, C. E., et al. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J **357**:S. 593-615.
- 5 Andersen, B. N., Pedersen, N. T., et al. (1982) Incidence of alcoholic chronic pancreatitis in Copenhagen. Scand J Gastroenterol **17**:S. 247-52.
- 6 Andersen, G. N., Hagglund, M., et al. (2005) Quantitative measurement of the levels of melanocortin receptor subtype 1, 2, 3 and 5 and pro-opiomelanocortin peptide gene expression in subsets of human peripheral blood leucocytes. Scand J Immunol **61**:S. 279-84.
- 7 Anna, S. (2002). Neutrophils and NADPH Oxidase mediate interpancreatic Trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. In: (Hrsg): Gastroenterology.
- 8 Benjannet, S., Rondeau, N., et al. (1991) PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. Proc Natl Acad Sci U S A **88**:S. 3564-8.
- 9 Bhardwaj, R., Becher, E., et al. (1997) Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. J Immunol **158**:S. 3378-84.
- 10 Bhardwaj, R. S., Schwarz, A., et al. (1996) Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. J Immunol **156**:S. 2517-21.

- 11 Bhatia, M., Saluja, A. K., et al. (1998) Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. Proc Natl Acad Sci U S A **95**:S. 4760-5.
- 12 Bialek, R., Willemer, S., et al. (1991) Evidence of intracellular activation of serine proteases in acute cerulein-induced pancreatitis in rats. Scand J Gastroenterol **26**:S. 190-6.
- 13 Birnbaumer, L. und Birnbaumer, M. (1995) Signal transduction by G proteins: 1994 edition. J Recept Signal Transduct Res **15**:S. 213-52.
- 14 Blalock, J. E. (1999) Proopiomelanocortin and the immune-neuroendocrine connection. Ann N Y Acad Sci **885**:S. 161-72.
- 15 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**:S. 248-54.
- 16 Bragado, M. J., San Roman, J. I., et al. (1996) Impairment of intracellular calcium homeostasis in the exocrine pancreas after caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. Clin Sci (Lond) **91**:S. 365-9.
- 17 Buggy, J. J. (1998) Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. Biochem J **331 (Pt 1)**:S. 211-6.
- 18 Caruso, C., Durand, D., et al. (2007) Activation of melanocortin 4 receptors reduces the inflammatory response and prevents apoptosis induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma in astrocytes. Endocrinology **148**:S. 4918-26.
- 19 Catania, A., Rajora, N., et al. (1996) The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. Peptides **17**:S. 675-9.
- 20 Ceriani, G., Diaz, J., et al. (1994) The neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits experimental arthritis in rats. Neuroimmunomodulation **1**:S. 28-32.
- 21 Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., et al. (1999) Enhanced expression of melanocortin-1 receptor (MC1-R) in normal human keratinocytes during differentiation: evidence for increased expression of POMC peptides near suprabasal layer of epidermis. J Invest Dermatol **112**:S. 853-60.

- 22 Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., et al. (1999) UV light and MSH receptors. Ann N Y Acad Sci **885**:S. 100-16.
- 23 Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., et al. (1996) Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. Biochim Biophys Acta **1313**:S. 130-8.
- 24 Chen, A. S., Marsh, D. J., et al. (2000) Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. Nat Genet **26**:S. 97-102.
- 25 Chen, T., Zamora, R., et al. (2003) Role of nitric oxide in liver injury. Curr Mol Med **3**:S. 519-26.
- 26 Chen, W., Kelly, M. A., et al. (1997) Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. Cell **91**:S. 789-98.
- 27 Chiari (1896) Selbstverdau des menschlichen Pankreas. Z Heilk.:S. 69-96.
- 28 Cone, R. D. (2000) The melanocortin receptors. Human Press Totowa, NJ.
- 29 Cooper, A., Robinson, S. J., et al. (2005) Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-induced lymphocyte proliferation in humans independently of melanocortin 1 receptor gene status. J Immunol **175**:S. 4806-13.
- 30 De Lisle, R. C. und Bansal, R. (1996) Brefeldin A inhibits the constitutive-like secretion of a sulfated protein in pancreatic acinar cells. Eur J Cell Biol **71**:S. 62-71.
- 31 Delgado, R., Carlin, A., et al. (1998) Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. J Leukoc Biol **63**:S. 740-5.
- 32 DiMagno, M. J., Hao, Y., et al. (2004) Secretagogue-stimulated pancreatic secretion is differentially regulated by constitutive NOS isoforms in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **286**:S. G428-36.
- 33 DiMagno, M. J., Williams, J. A., et al. (2004) Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of caerulein-induced acute pancreatitis in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**:S. G80-7.

- 34 Elliott, R. J., Szabo, M., et al. (2004) alpha-Melanocyte-stimulating hormone, MSH 11-13 KPV and adrenocorticotrophic hormone signalling in human keratinocyte cells. J Invest Dermatol **122**:S. 1010-9.
- 35 Fernandez-del Castillo, C., Harringer, W., et al. (1991) Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. N Engl J Med **325**:S. 382-7.
- 36 Figarella, C., Mischczuk-Jamska, B., et al. (1988) Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid. Activation of human trypsinogen 1. Biol Chem Hoppe Seyler **369 Suppl**:S. 293-8.
- 37 Flanagan, N., Healy, E., et al. (2000) Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. Hum Mol Genet **9**:S. 2531-7.
- 38 Forslin Aronsson, S., Spulber, S., et al. (2006) alpha-Melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global cerebral ischemia. Neuropeptides **40**:S. 65-75.
- 39 Frey, C. F., Zhou, H., et al. (2006) The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. Pancreas **33**:S. 336-44.
- 40 Frossard, J. L., Hadengue, A., et al. (2002) Natural history of long-term lung injury in mouse experimental pancreatitis. Crit Care Med **30**:S. 1541-6.
- 41 Frossard, J. L., Saluja, A., et al. (1999) The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. Gastroenterology **116**:S. 694-701.
- 42 Gallagher, S., Sankaran, H., et al. (1981) Mechanism of scorpion toxin-induced enzyme secretion in rat pancreas. Gastroenterology **80**:S. 970-3.
- 43 Getting, S. J., Christian, H. C., et al. (2003) Redundancy of a functional melanocortin 1 receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides: studies in the recessive yellow (e/e) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor. J Immunol **170**:S. 3323-30.
- 44 Getting, S. J., Di Filippo, C., et al. (2004) MC-3 receptor and the inflammatory mechanisms activated in acute myocardial infarct. J Leukoc Biol **76**:S. 845-53.

- 45 Getting, S. J., Gibbs, L., et al. (1999) POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. J Immunol **162**:S. 7446-53.
- 46 Getting, S. J., Riffo-Vasquez, Y., et al. (2008) A role for MC3R in modulating lung inflammation. Pulm Pharmacol Ther **21**:S. 866-73.
- 47 Gislason, H., Horn, A., et al. (2004) Acute pancreatitis in Bergen, Norway. A study on incidence, etiology and severity. Scand J Surg **93**:S. 29-33.
- 48 Gloor, B., Blinman, T. A., et al. (2000) Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. Pancreas **21**:S. 414-20.
- 49 Gloor, B., Todd, K. E., et al. (1998) Mechanism of increased lung injury after acute pancreatitis in IL-10 knockout mice. J Surg Res **80**:S. 110-4.
- 50 Gorry, M. C., Gabbaizedeh, D., et al. (1997) Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. Gastroenterology **113**:S. 1063-8.
- 51 Grosfils, K., Metioui, M., et al. (1993) Isolation of rat pancreatic acini with crude collagenase and permeabilization of these acini with streptolysin O. Res Commun Chem Pathol Pharmacol **79**:S. 99-115.
- 52 Gukovskaya, A. S., Vaquero, E., et al. (2002) Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. Gastroenterology **122**:S. 974-84.
- 53 Gullo, L., Migliori, M., et al. (2002) An update on recurrent acute pancreatitis: data from five European countries. Am J Gastroenterol **97**:S. 1959-62.
- 54 Hadley, M. E. und Haskell-Luevano, C. (1999) The proopiomelanocortin system. Ann N Y Acad Sci **885**:S. 1-21.
- 55 Halangk, W., Kruger, B., et al. (2002) Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **282**:S. G367-74.
- 56 Halangk, W., Lerch, M. M., et al. (2000) Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. J Clin Invest **106**:S. 773-81.

- 57 Hartmeyer, M., Scholzen, T., et al. (1997) Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone. J Immunol **159**:S. 1930-7.
- 58 Hauschka, T. S., Jacobs, B. B., et al. (1968) Recessive yellow and its interaction with belted in the mouse. J Hered **59**:S. 339-41.
- 59 Healy, E., Flannagan, N., et al. (2000) Melanocortin-1-receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. Lancet **355**:S. 1072-3.
- 60 Healy, E., Jordan, S. A., et al. (2001) Functional variation of MC1R alleles from red-haired individuals. Hum Mol Genet **10**:S. 2397-402.
- 61 Hurley, P. R., Cook, A., et al. (1988) Development of radioimmunoassays for free tetra-L-aspartyl-L-lysine trypsinogen activation peptides (TAP). J Immunol Methods **111**:S. 195-203.
- 62 Huszar, D., Lynch, C. A., et al. (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell **88**:S. 131-41.
- 63 Ichiyama, T., Sakai, T., et al. (1999) Systemically administered alpha-melanocyte-stimulating peptides inhibit NF-kappaB activation in experimental brain inflammation. Brain Res **836**:S. 31-7.
- 64 Ignar, D. M., Andrews, J. L., et al. (2003) Regulation of TNF-alpha secretion by a specific melanocortin-1 receptor peptide agonist. Peptides **24**:S. 709-16.
- 65 Jahovic, N., Arbak, S., et al. (2004) Alpha-melanocyte stimulating hormone has beneficial effects on cerulein-induced acute pancreatitis. Peptides **25**:S. 129-32.
- 66 Jensen, R. T., Lemp, G. F., et al. (1980) Interaction of cholecystokinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. Proc Natl Acad Sci U S A **77**:S. 2079-83.
- 67 Johnson, C. D. und Hosking, S. (1991) National statistics for diet, alcohol consumption, and chronic pancreatitis in England and Wales, 1960-88. Gut **32**:S. 1401-5.
- 68 Jungermann, J., Lerch, M. M., et al. (1995) Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. Am J Physiol **268**:S. G328-38.

- 69 Kannengiesser, K., Maaser, C., et al. (2008) Melanocortin-derived tripeptide KPV has anti-inflammatory potential in murine models of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis **14**:S. 324-31.
- 70 Konturek, J. W., Hengst, K., et al. (1997) Role of endogenous nitric oxide in the control of exocrine and endocrine pancreatic secretion in humans. Gut **40**:S. 86-91.
- 71 Konturek, S. J., Bilski, J., et al. (1993) Role of endogenous nitric oxide in the control of canine pancreatic secretion and blood flow. Gastroenterology **104**:S. 896-902.
- 72 Kruger, B., Lerch, M. M., et al. (1998) Direct detection of premature protease activation in living pancreatic acinar cells. Lab Invest **78**:S. 763-4.
- 73 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:S. 680-5.
- 74 Lampel, M. und Kern, H. F. (1977) Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. Virchows Arch A Pathol Anat Histol **373**:S. 97-117.
- 75 Lasson, A. und Ohlsson, K. (1984) Protease inhibitors in acute human pancreatitis. Correlation between biochemical changes and clinical course. Scand J Gastroenterol **19**:S. 779-86.
- 76 Laukkarinen, J. M., van Acker, G. J., et al. (2007) A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of n-taurocholate. Gut.
- 77 Lerch, M. M., Lutz, M. P., et al. (1997) Dissociation and reassembly of adherens junctions during experimental acute pancreatitis. Gastroenterology **113**:S. 1355-66.
- 78 Lerch, M. M., Saluja, A. K., et al. (1992) Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. Gastroenterology **103**:S. 205-13.
- 79 Lerch, M. M., Saluja, A. K., et al. (1993) Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum. Gastroenterology **104**:S. 853-61.

- 80 Lerch, M. M., Saluja, A. K., et al. (1995) Luminal endocytosis and intracellular targeting by acinar cells during early biliary pancreatitis in the opossum. J Clin Invest **95**:S. 2222-31.
- 81 Leser, H. G., Gross, V., et al. (1991) Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. Gastroenterology **101**:S. 782-5.
- 82 Leto, G., Tumminello, F. M., et al. (1997) Lysosomal aspartic and cysteine proteinases serum levels in patients with pancreatic cancer or pancreatitis. Pancreas **14**:S. 22-7.
- 83 Lipton, J. M., Zhao, H., et al. (1999) Mechanisms of antiinflammatory action of alpha-MSH peptides. In vivo and in vitro evidence. Ann N Y Acad Sci **885**:S. 173-82.
- 84 Maciejewski, R., Burdan, F., et al. (1997) Activity of cathepsins in rat's spleen due to experimentally induced pancreatitis. Acta Physiol Hung **85**:S. 335-45.
- 85 Mains, R. E., Eipper, B. A., et al. (1977) Common precursor to corticotropins and endorphins. Proc Natl Acad Sci U S A **74**:S. 3014-8.
- 86 Manna, S. K. und Aggarwal, B. B. (1998) Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. J Immunol **161**:S. 2873-80.
- 87 Marcinkiewicz, M., Day, R., et al. (1993) Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. Proc Natl Acad Sci U S A **90**:S. 4922-6.
- 88 May, M. J. und Ghosh, S. (1998) Signal transduction through NF-kappa B. Immunol Today **19**:S. 80-8.
- 89 Mayerle, J., Schneckeburger, J., et al. (2005) Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. Gastroenterology **129**:S. 1251-67.
- 90 Nakanishi, S., Inoue, A., et al. (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. Nature **278**:S. 423-7.
- 91 Norkina, O., Graf, R., et al. (2006) Caerulein-induced acute pancreatitis in mice that constitutively overexpress Reg/PAP genes. BMC Gastroenterol **6**:S. 16.

- 92 O'Konski, M. S. und Pandol, S. J. (1990) Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. J Clin Invest **86**:S. 1649-57.
- 93 O'Sullivan, J. N., Nobrega, F. T., et al. (1972) Acute and chronic pancreatitis in Rochester, Minnesota, 1940 to 1969. Gastroenterology **62**:S. 373-9.
- 94 Oktar, B. K., Ercan, F., et al. (2000) The effect of alpha-melanocyte stimulating hormone on colonic inflammation in the rat. Peptides **21**:S. 1271-7.
- 95 Ollmann, M. M., Lamoreux, M. L., et al. (1998) Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. Genes Dev **12**:S. 316-30.
- 96 Ollmann, M. M., Wilson, B. D., et al. (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. Science **278**:S. 135-8.
- 97 Palmer, J. S., Duffy, D. L., et al. (2000) Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? Am J Hum Genet **66**:S. 176-86.
- 98 Pastor, C. M., Vonlaufen, A., et al. (2006) Neutrophil depletion--but not prevention of Kupffer cell activation--decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. World J Gastroenterol **12**:S. 1219-24.
- 99 Patel, A. G., Toyama, M. T., et al. (1995) Role of nitric oxide in the relationship of pancreatic blood flow and exocrine secretion in cats. Gastroenterology **108**:S. 1215-20.
- 100 Peralta, J., Reides, C., et al. (1996) Oxidative stress in rodent closed duodenal loop pancreatitis. Int J Pancreatol **19**:S. 61-9.
- 101 Rajora, N., Boccoli, G., et al. (1997) alpha-MSH modulates experimental inflammatory bowel disease. Peptides **18**:S. 381-5.
- 102 Ramudo, L., Manso, M. A., et al. (2005) Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. Cytokine **32**:S. 125-31.
- 103 Rana, B. K. (2003) New insights into G-protein-coupled receptor signaling from the melanocortin receptor system. Mol Pharmacol **64**:S. 1-4.
- 104 Rees, J. L. (2000) The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. Pigment Cell Res **13**:S. 135-40.

- 105 Robbins, L. S., Nadeau, J. H., et al. (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. Cell **72**:S. 827-34.
- 106 Robinson, S. J. und Healy, E. (2002) Human melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants alter melanoma cell growth and adhesion to extracellular matrix. Oncogene **21**:S. 8037-46.
- 107 Saluja, A., Hashimoto, S., et al. (1987) Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. Am J Physiol **253**:S. G508-16.
- 108 Schmidt, J., Fernandez-del Castillo, C., et al. (1992) Trypsinogen-activation peptides in experimental rat pancreatitis: prognostic implications and histopathologic correlates. Gastroenterology **103**:S. 1009-16.
- 109 Schnekenburger, J. e. a. (2005) The calcium binding, myeloid cell protein MRP14 (S100A9) is essential for pancreatic leukocyte infiltration and the onset of acute experimental pancreatitis. in print.
- 110 Scholzen, T. E., Brzoska, T., et al. (1999) Expression of functional melanocortin receptors and proopiomelanocortin peptides by human dermal microvascular endothelial cells. Ann N Y Acad Sci **885**:S. 239-53.
- 111 Scholzen, T. E., Sunderkotter, C., et al. (2003) Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression. Endocrinology **144**:S. 360-70.
- 112 Seidah, N. G. und Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. Brain Res **848**:S. 45-62.
- 113 Shiratori, K., Chen, Y. F., et al. (1986) Mechanism of increased exocrine pancreatic secretion in pancreatic juice-diverted rats. Gastroenterology **91**:S. 1171-8.
- 114 Slominski, A. und Wortsman, J. (2000) Neuroendocrinology of the skin. Endocr Rev **21**:S. 457-87.
- 115 Slominski, A., Wortsman, J., et al. (2000) Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. Physiol Rev **80**:S. 979-1020.

- 116 Sonis, S. T. (2002) The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. Crit Rev Oral Biol Med **13**:S. 380-9.
- 117 Star, R. A., Rajora, N., et al. (1995) Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone. Proc Natl Acad Sci U S A **92**:S. 8016-20.
- 118 Steer, M. L. (1997) Pathogenesis of acute pancreatitis. Digestion **58 Suppl 1**:S. 46-9.
- 119 Suzuki, I., Cone, R. D., et al. (1996) Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. Endocrinology **137**:S. 1627-33.
- 120 Taherzadeh, S., Sharma, S., et al. (1999) alpha-MSH and its receptors in regulation of tumor necrosis factor-alpha production by human monocyte/macrophages. Am J Physiol **276**:S. R1289-94.
- 121 Taylor, A. und Namba, K. (2001) In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). Immunol Cell Biol **79**:S. 358-67.
- 122 Teich, N., Mossner, J., et al. (1998) Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. Hum Mutat **12**:S. 39-43.
- 123 Telek, G., Scoazec, J. Y., et al. (1999) Cerium-based histochemical demonstration of oxidative stress in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. A confocal laser scanning microscopic study. J Histochem Cytochem **47**:S. 1201-12.
- 124 Threadgold, J., Greenhalf, W., et al. (2002) The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease. Gut **50**:S. 675-81.
- 125 Tooze, J., Hollinshead, M., et al. (1991) Regulated secretion of mature cathepsin B from rat exocrine pancreatic cells. Eur J Cell Biol **56**:S. 187-200.
- 126 Tsatmali, M., Ancans, J., et al. (2002) Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. J Histochem Cytochem **50**:S. 125-33.
- 127 Ugolev, A. M. und Chulkova, T. M. (1962) The phytolytic and zoolytic activity of blood amylase in experimental ethionin pancreatitis. Biull Eksp Biol Med **52**:S. 1021-4.

- 128 Valverde, P., Healy, E., et al. (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. Nat Genet **11**:S. 328-30.
- 129 van der Kraan, M., Adan, R. A., et al. (1998) Expression of melanocortin-5 receptor in secretory epithelia supports a functional role in exocrine and endocrine glands. Endocrinology **139**:S. 2348-55.
- 130 Van der Ploeg, L. H., Martin, W. J., et al. (2002) A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. Proc Natl Acad Sci U S A **99**:S. 11381-6.
- 131 Varallyay, E., Pal, G., et al. (1998) Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. Biochem Biophys Res Commun **243**:S. 56-60.
- 132 Voisey, J. und van Daal, A. (2002) Agouti: from mouse to man, from skin to fat. Pigment Cell Res **15**:S. 10-8.
- 133 Wakamatsu, K., Graham, A., et al. (1997) Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor. Pigment Cell Res **10**:S. 288-97.
- 134 Wang, C. C., Lin, J. W., et al. (2008) alpha-melanocyte-stimulating hormone gene transfer attenuates inflammation after bile duct ligation in the rat. Dig Dis Sci **53**:S. 556-63.
- 135 Ward, J. B., Sutton, R., et al. (1996) Progressive disruption of acinar cell calcium signaling is an early feature of cerulein-induced pancreatitis in mice. Gastroenterology **111**:S. 481-91.
- 136 Warshaw, A. L. und O'Hara, P. J. (1978) Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. Ann Surg **188**:S. 197-201.
- 137 Watanabe, S., Shiratori, K., et al. (1986) Release of cholecystokinin and exocrine pancreatic secretion in response to an elemental diet in human subjects. Dig Dis Sci **31**:S. 919-24.
- 138 Whitcomb, D. C. (1999) Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. Gastroenterology **116**:S. 770-2.
- 139 Wikberg, J. E., Muceniece, R., et al. (2000) New aspects on the melanocortins and their receptors. Pharmacol Res **42**:S. 393-420.

- 140 Willemer, S., Bialek, R., et al. (1990) Localization of lysosomal and digestive enzymes in cytoplasmic vacuoles in caerulein-pancreatitis. Histochemistry **94**:S. 161-70.
- 141 Witt, H., Luck, W., et al. (2000) Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. Nat Genet **25**:S. 213-6.
- 142 Wong, K. Y., Rajora, N., et al. (1997) A potential mechanism of local anti-inflammatory action of alpha-melanocyte-stimulating hormone within the brain: modulation of tumor necrosis factor-alpha production by human astrocytic cells. Neuroimmunomodulation **4**:S. 37-41.
- 143 Wrenn, R. W., Currie, M. G., et al. (1994) Nitric oxide participates in the regulation of pancreatic acinar cell secretion. Life Sci **55**:S. 511-8.

9 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BSA	Bovine Serum Albumin
bp	Basenpaar
°C	Temperatur in Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CCK	Cholecystokinin
DEPC	
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e/e	gelbe rezessive (e/e) Maus(-Gruppe)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
g	Beschleunigung
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICAM	intercellular adhesion molecule
I κ B	Inhibitor kappa B
IgG	Immunglobulin gamma
IL	Interleukine
INOS	induzierbare NO-Synthetase
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
TAP	trypsinogen activation peptide
TNF	Tumornekrosefaktor
L	Liter
MC1- Rezeptor	Melanocortin 1-Rezeptor
MC3-Rezeptor	Melanocortin 3-Rezeptor
NaCl	Natriumchloridlösung

NNOS	neuronale NO-Synthetase
α -MSH	α -Melanocyten stimulierendes Hormon
min	Minute
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
MPO	Myeloperoxidase
γ -MSH	γ -Melanocyten stimulierendes Hormon
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF κ B	nuclear factor κ B
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
POMC	Proopiomelanocortin
RNA	Ribonukleinsäure
RFU	relative Fluorometereinheiten
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
SDS (PAGE)	sodium dodecylsulfate polyarcylamid gel electrophoresis
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
U	Units, Enzymaktivität
μ U	Mikro-Units, Enzymaktivität
μ g	Mikrogramm
VCAM	vascular cell adhesion molecule
WT	Wildtypmäuse(-gruppe)

10 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. W. Domschke für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Ich danke Herrn Dr. Jürgen Schnekenburger für die engagiert Unterstützung bei der Durchführung und Korrektur meiner Doktorarbeit, sowie für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Tobias Meister für seine persönliche Betreuung während der gesamten Doktorarbeit sowie für die Einführung in die praktischen Tätigkeiten sehr herzlich bedanken.

Mein weiterer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht und die mich zu jeden Zeitpunkt ermutigt und unterstützt hat.

11 Lebenslauf

12 Abstracts

(1) Meister T, **Wennmann D**, Broszka T, Domschke W , Schnekenburger.J
Melanocortin-1-receptor dysfunction reduces the severity of a caerulein-
induced acute pancreatitis. Pancreas 2005; 31:455

(2) Meister T, **Wennmann D**, Broszka T, Domschke W , Schnekenburger.J
Die Fehlfunktion des Melanocortin-1-
Rezeptors reduziert das Ausmaß einer Cerulein-induzierten Pankreatitis in e/e-
Mäusen. Z. Gastroenterol. 43, 821 (2005)

(3) Meister T, **Wennmann D**, Broszka T, Domschke W , Schnekenburger.J
Reduced severity of cerulein-induced pancreatitis in recessive yellow (e/e) mice
indicates a proinflammatory function of melanocortin 1-receptor. Gut 55 (Suppl
V) A318 (2006)

13 Anhang

Tierversuchsgenehmigung



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herrn
 Prof. Dr. med. M. M. Lerch
 Medizinische Klinik und Poliklinik B
 Universitätsklinikum Münster
 Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

Dienstgebäude:
 Domplatz 1 - 3
 Telefon: (0251) 411-0
 Durchwahl: 2104
 Telefax: 2115
 Raum: 423
 Auskunft erteilt:
 Kerstin Stichling
 E-Mail:
 kerstin.stichling@bezreg-muenster.nrw.de
 Aktenzeichen:
 50.0835.1.0 (G 29/2000)

12. Mai 2003

Tierschutz

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Verlängerung des Tierversuchs:

„Untersuchungen zur Physiologie und Pathophysiologie der akuten tierexperimentellen ödematösen und hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis. Interaktion von Leukozyten und Epithelzellen bei der experimentellen Pankreatitis: Die Bedeutung von Keratinocyte Growth Factor (KGF), Activin und Interleukinen beim Verlauf der Entzündung und der Regeneration des Epithels.“

Ihr Antrag vom Mai 2003

Mein Genehmigungsbescheid vom 11. Mai 2000 – Az.: 50.0835.1.0 (G 29/2000) –

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Lerch,

gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich entsprechend Ihrem Antrag die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum **31.05.2004**.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski