

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -

**Die Rolle des Wachstumsfaktors Activin A bei der Organ-
regeneration nach Caerulein-induzierter Pankreatitis der Ratte**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Brunnberg, Uta
aus Lippstadt
2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. H. L. Serve
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. M. M. Lerch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. H. L. Serve

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. M. M. Lerch

ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle des Wachstumsfaktors Activin A bei der Organregeneration nach Caerulein-induzierter Pankreatitis der Ratte

Brunnberg, Uta

Activine, Mitglieder der TGF- β -Familie, sind an verschiedenen Vorgängen bei der Organentwicklung und an Reparaturmechanismen in Geweben beteiligt. Im Pankreas regulieren sie die endokrine und die exokrine Entwicklung des fetalen Pankreas und sind auch an der Aufrechterhaltung der β -Zell-Funktion im adulten Pankreas beteiligt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von Activin A im Regenerationsprozess nach Caerulein-induzierter akuter Pankreatitis der Ratte untersucht. Im Verlauf dieser Pankreatitis kommt es zu erhöhten Apoptose- und Proliferationsraten. Nach Stimulation mit Caerulein wurde eine erhöhte Expression von Activin A in den Azinuszellen gefunden. Diese ist anscheinend das Ergebnis eines Wechsels von der Inhibin- α Synthese zur Synthese von Inhibin- β A Untereinheiten. Aus zwei dieser Untereinheiten entsteht Activin A. Die zeitgleiche Expression von Activinrezeptoren auf den Azinuszellen lässt auf einen autokrinen Stimulationsmechanismus schließen.

Experimente an isolierten Azinuszellen der Ratte zeigten eine vermehrte DNA-Synthese nach Stimulation mit Activin A. Auch die Inkubation mit den Interleukinen IL-1 β und IL-6 hatte einen aktivierenden Effekt auf die Azinuszell-Proliferation und induzierte die endogene Activin-Expression an den isolierten Azinuszellen. Dies zeigt eine mögliche Funktion von Interleukinen als Trigger der autokrinen Activin-Stimulation.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Activin A nicht ausschließlich im endokrinen Pankreas von Bedeutung ist, sondern auch eine Rolle in der Kontrolle der Azinuszell-Proliferation spielt und eine Funktion im Regenerationsprozess des exokrinen Pankreas nach akuter ödematöser Pankreatitis der Ratte besitzt.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2007

Aktenzeichen der tierexperimentellen Genehmigung: 23.0835.1.0

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Die akute Pankreatitis	4
1.1.1	Definition, Inzidenz, Einteilung und Mortalität	4
1.1.2	Ätiologie	5
1.1.3	Klinik der akuten Pankreatitis	5
1.1.4	Diagnostik und Beurteilung des Schweregrades	6
1.1.5	Therapie	7
1.2	Pathophysiologische Mechanismen im Verlauf der akuten Pankreatitis	8
1.2.1	Intraazinäre Aktivierung von proteolytischen Enzymen	9
1.2.2	Störungen der Mikrozirkulation	11
1.2.3	Leukozyteninfiltration, Freisetzung von Zytokinen und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies	11
1.2.4	Regeneration des Gewebes	12
1.3	Aufbau und Funktion von Activinen, Inhibinen und Follistatin	12
1.4	Pankreatitisinduktion durch hormonelle Hyperstimulation im Tiermodell	15
1.5	Fragestellung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2	Geräte	19
2.1.3	Software und Statistik	20
2.1.4	Puffer, Medien und Lösungen	21
2.1.5	Antikörper, Assays und rekombinante Proteine	23
2.1.6	Oligonukleotide	24
2.2	Tiermodell	25
2.2.1	Versuchstiere	25
2.2.2	Isolation von Pankreasazinuszellen	25
2.2.3	Operationsverfahren	26
2.2.4	Induktion einer akuten Caerulein-induzierten Pankreatitis bei der Ratte	28

2.3	Proteinchemische Methoden	28
2.3.1	Herstellung von Pankreashomogenaten.....	28
2.3.2	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	29
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.3.4	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)	29
2.3.5	Immunoblot.....	30
2.3.6	Detektion mit dem ECL-Verfahren.....	30
2.3.7	Herstellung von Zelllysaten aus Pankreasazinuszellen	31
2.3.8	Bestimmung der Amylasesekretion nach <i>in vitro</i> Stimulation mit Cholezystokinin	31
2.4	Molekularbiologische Methoden	33
2.4.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	33
2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA.....	33
2.4.3	RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion)	33
2.4.4	Gelelektrophorese	34
2.5	Bestimmung von Proliferation und Apoptose	34
2.5.1	BrdU-Proliferationstest an isolierten Azini	34
2.5.2	Bestimmung der Apoptoserate an Kryoschnitten.....	35
2.5.3	Bestimmung der Proliferationsrate durch PCNA-Markierung an Paraffinschnitten.....	35
2.6	Immunfluoreszenzmikroskopie	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Apoptose und Proliferation im Verlauf der Pankreatitis	38
3.2	RNA-Expressionsanalyse von Faktoren des Activin/Inhibin-Systems und ihrer Rezeptoren während der akuten Pankreatitis	39
3.3	Activin und Activin-Rezeptor IIB Expression während der akuten Pankreatitis	41
3.4	Activin und Activin-Rezeptor Expression an isolierten Azinuszellen des Pankreas	44
3.5	Stimulation der Proliferation von Azini des Rattenpankreas durch Activin A	46
3.6	Blockade der Interleukin-induzierten Azinuszellproliferation durch Follistatin	49

4	Diskussion	51
4.1	Apoptose und Proliferation während der Pankreatitis	52
4.2	Activin-Expression im Verlauf der Pankreatitis: Ein autokriner proliferationsfördernder Mechanismus im exokrinen Anteil?	53
4.3	Funktion von Follistatin während der Pankreatitis	55
4.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	56
5	Literaturverzeichnis	58
6	Danksagung	71
7	Lebenslauf.....	72

Anhang: Tierversuchsgenehmigung

1 Einleitung

1.1 Die akute Pankreatitis

1.1.1 Definition, Inzidenz, Einteilung und Mortalität

Die akute Pankreatitis ist definiert als eine meist nicht infektiöse Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Die Inzidenz der Neuerkrankungen liegt in Deutschland bei etwa 15,6/100.000 im Jahr [1], weltweit gibt es deutliche Unterschiede in der Inzidenz, sie liegt zum Beispiel in Finnland bei etwa 74/100.000 [2]. In den letzten 30 Jahren konnte allerdings durchgehend eine steigende Inzidenz beobachtet werden [3]. Erklärbar ist dies vor allem durch die Zunahme der Sensitivität und Spezifität der klinischen Diagnostik. Mit der flächendeckenden Einführung des Phadebas-Tests zur Bestimmung des Amylasespiegels im Serum verdoppelte sich die Inzidenz [4].

Die akute Pankreatitis kann in unterschiedlichen Schweregraden verlaufen, die von einer vollständigen Regeneration des Organs bis zur oft tödlich verlaufenden nekrotisierenden Form mit Beteiligung verschiedener anderer Organsysteme reichen. Zu welchem Zeitpunkt und von welchen Faktoren der Verlauf der Pankreatitis beeinflusst wird, ist nicht bekannt. Auch kann zu Beginn der Erkrankung mit keiner Methode eine sichere Aussage über Schweregrad und Verlauf gemacht werden. Ein Teil der Patienten entwickelt eine chronische Pankreatitis, in deren Verlauf das Organ zunehmend fibrosiert und seine exokrine und endokrine Funktion verliert.

Im klinischen Verlauf lassen sich für die akute Pankreatitis nach der Atlanta-Klassifikation zwei Formen unterscheiden, deren Auftreten unabhängig von der Ätiologie der Erkrankung ist: die milde Verlaufsform mit selbstlimitierendem, komplikationslosem Verlauf und die schwere Pankreatitis, die mit Organversagen und lokalen Komplikationen (Nekrosen, Abszessen, Pseudozysten) einhergeht [5]. Die prospektive Single Center Studie von S. Bank zeigte für den Untersuchungszeitraum 1978 bis 1997 eine stetige Abnahme der Mortalität von

13,5% (1978 bis 1982) auf 5% (1993 bis 1997) [6]. Gründe für die Abnahme der Mortalität sind nicht die Einführung einer spezifischen medikamentösen Therapie der akuten Pankreatitis, sondern vielmehr die intensivmedizinische Überwachung von Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis mit intensivierter supportiver Therapie, die Zunahme der Sensitivität der Diagnosestellung durch bildgebende (Detektion von Nekrosen mittels Computertomographie) und laborchemische Verfahren (wie die Bestimmung des c-reaktiven Proteins) sowie die eher abwartende Haltung im Hinblick auf eine chirurgische Interventionen bei der Ausbildung von Nekrosen.

1.1.2 Ätiologie

Die akute Pankreatitis wird durch unterschiedliche Noxen verursacht. In 40 bis 50% wird eine Choledocho- oder Cholezystolithiasis gefunden. Alkoholabusus ist die zweithäufigste Ursache für die Entstehung einer akuten Pankreatitis (20 bis 40%). Unklar bleibt, ob Alkohol im Exzess als pathogenetischer Faktor für eine akute Pankreatitis betrachtet werden kann oder ob sich der Alkoholkonsum nur in einem vorgeschädigtem Organ, im Sinne einer chronischen Pankreatitis, als akuter Schub äußert. Neben seltenen Ursachen wie Stoffwechselerkrankungen, Systemerkrankungen, Infektionen, medizinischen Eingriffen, Medikamentennebenwirkungen und Intoxikationen bleibt die Ätiologie der akuten Pankreatitis in 10 bis 30% ungeklärt [7, 8]. In jüngster Zeit wurden als pathogenetische Faktoren für die akute Pankreatitis mit familiärer Häufung mehrere dominant vererbte krankheitsrelevante Punktmutationen im Trypsinogen-Gen, sowie in dem Protease-Inhibitor-Gen SPINK-1 mit am ehesten krankheitsmodifiziertem Charakter identifiziert [9].

1.1.3 Klinik der akuten Pankreatitis

Die akute Pankreatitis präsentiert sich vor allem durch starke, kontinuierliche, teils bohrende Schmerzen im Oberbauch, die häufig gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen, oftmals begleitet von Übelkeit, Erbrechen und Fieber. Bei der klini-

schen Untersuchung lassen sich die Schmerzen bei 20% der Patienten auch im linken phreniko-kostalen Winkel (Mallet-Guy'sches Zeichen) oder am Rücken im linken kostovertebralen Winkel (Mayo-Robson'sches Zeichen) lokalisieren. Das Abdomen ist meist nicht hart, sondern von gummiartiger Konsistenz. Es kommt bei einem Teil der Patienten zu einer reflektorischen Paralyse einzelner Darmabschnitte oder sogar zum Vollbild des paralytischen Ileus. Ein frühes klinisches Zeichen hierfür ist das geblähte Abdomen der Patienten und der tympanitische Klopfeschall über dem Kolon transversum (Goblet-Guyot'sches Zeichen). Es tritt häufig eine Erhöhung der Pankreasenzyme Lipase und Amylase im Blut und Urin auf [10]. Diese Befunde erlauben keine Einschätzung des klinischen Verlaufs und der Prognose. Innerhalb der ersten 3 bis 4 Tage entscheidet sich der klinische Verlauf [11]. Eine entzündliche Mitbeteiligung der benachbarten Organe bzw. Organsysteme erschwert unter Umständen den Verlauf. In einigen Fällen kann trotz akuter Pankreatitis eine normwertige Serumamylase bestimmt werden. Hierbei handelt es sich meist um Patienten mit einer langjährigen chronischen Pankreatitis, bei denen keine Amylase mehr aus dem Pankreas freigesetzt wird oder um eine vollständige Zerstörung des Pankreas bei schwerer Nekrose. Bei der akuten Pankreatitis kommt es in Abhängigkeit vom Schweregrad der Organschädigung zu einer erheblichen Sequestration in den sogenannten „Dritten Raum“. Dieser Volumenverlust kann zu einem hypovolämischen bzw. bei Blutungen zu einem hämorrhagischen Schock führen [12]. Über die Hälfte aller Patienten mit akuter Pankreatitis weisen Zeichen einer Lungenfunktionsstörung, meist in Form einer Hypoxie, auf. Etwa ein Fünftel der Patienten erleidet ein akutes Nierenversagen [13].

1.1.4 Diagnostik und Beurteilung des Schweregrades

Der erste Schritt zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose akute Pankreatitis ist die Bestimmung der Serumlipase, wobei die absolute Höhe der Lipase nichts über das Ausmaß oder den Schweregrad der Erkrankung aussagt. In der bildgebenden Diagnostik steht die Sonographie aufgrund ihrer raschen Verfügbarkeit an erster Stelle. Als Gold-Standard für den Nachweis von Pankreasnekrosen gilt derzeit die kontrastmittelverstärkte Computertomografie. Die Vermei-

dung von jodiertem Kontrastmittel sowie die bessere Darstellungsmöglichkeit der Pankreasgangstruktur und einer möglichen biliären Obstruktion lassen allerdings die Kernspintomographie an Bedeutsamkeit gewinnen [14].

Wichtig ist die Identifizierung der Patienten (ca. 20 bis 25%), die einen schweren Verlauf der akuten Pankreatitis erleiden werden. Hier hilft eine Kombination von klinischen und laborchemischen Parametern, deren Veränderungen frühzeitig das Auftreten einer der typischen Organkomplikationen bei der akuten Pankreatitis anzeigen. Viele dieser Kriterien wurden bereits 1976 durch Ranson definiert [15] und im Laufe der Zeit ergänzt [14, 16].

<i>Bei Aufnahme</i>	<i>Im Verlauf</i>
Alter > 55 Jahre	Hämatokritabfall > 10% des Ausgangswertes
Leukozyten > 16000/ μ l	Kreatinin > 170 mmol/l
Serumglukose > 200 mg/dl	Harnstoffanstieg > 5 mg/dl
LDH > 350 U/l	Serumkalzium < 2 mmol/l
ALT > 120 U/l	pO ₂ arteriell < 60 mmHg
Fieber > 38,5°C rektal	Flüssigkeitsdefizit > 6 l
Body Mass Index >30 kg/m ²	CRP > 150 mg/l
	Serumalbumin < 32 g/l
	Urinausfuhr < 50 ml/h
	Schock, Tachykardie

Tabelle 1: Parameter, die mit einer ungünstigen Prognose bei akuter Pankreatitis assoziiert sind.

1.1.5 Therapie

Zur Therapie einer akuten Pankreatitis zählt in jedem Fall die stationäre Einweisung, um die in kurzen Abständen notwendigen Verlaufskontrollen durchführen zu können. Eine Nahrungskarenz nimmt wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Verlauf der akuten Pankreatitis, wird aber vom Patienten als subjektive Erleich-

terung gegen die Übelkeit empfunden. Eine Zusammenfassung von fünf prospektiv randomisiert durchgeführten Studien zeigt, dass eine enterale Ernährung einer parenteralen Ernährung aufgrund signifikant geringerer systemischer Komplikationen, Infektionen und Mortalität vorgezogen werden sollte [17-21]. Eine Magensonde sollte nur bei der Therapie eines paralytischen Ileus oder zur enteralen Ernährung gelegt werden. In England wird seit 1999 aufgrund klinischer Studien [22] eine antibiotische Prophylaxe bei Patienten mit beginnender schwerer akuter Pankreatitis durchgeführt. Wichtig sind ausreichende Flüssigkeitssubstitution (bis zu >10 Liter täglich), Schmerztherapie, Sauerstoffgabe bei Bedarf und Kontrolle der Urin-Ausfuhr [16, 23]. Die Einführung der supportiven intensivmedizinischen Therapie und die rasche endoskopische Entfernung von eingeklemmten Gallensteinen sind wichtige Erfolge bei der Senkung der Letalität der akut nekrotisierenden Pankreatitis [24]. Bis heute steht keine spezifische medikamentöse Therapie der akuten Pankreatitis zur Verfügung. Sowohl eine Hemmung der Proteasenaktivität als auch eine Hemmung der Pankreassekretion in kontrollierten Studien müssen als erfolglos bewertet werden.

Um die Regenerationsvorgänge des exokrinen Pankreasgewebes nach akuter Pankreatitis besser zu verstehen und möglicherweise in Zukunft durch Beschleunigung des Prozesses auf diesem Wege Einfluss auf den Verlauf einer akuten Pankreatitis nehmen zu können, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Rolle des Wachstumsfaktors Activin A im Verlauf der Regeneration des exokrinen Pankreasgewebes.

1.2 Pathophysiologische Mechanismen im Verlauf der akuten Pankreatitis

Bis heute sind die pathophysiologischen Mechanismen, die zu einer akuten Pankreatitis führen, nicht vollständig verstanden. Ebenso ist unklar, weshalb die Pankreatitis in manchen Fällen einen milden, selbstlimitierenden Verlauf nimmt und ausheilt, in einigen Fällen jedoch schwerwiegend verläuft und mit Organ-

versagen sowie lokalen Komplikationen (Nekrosen, Abszessen, Pseudozysten) einhergeht.

1.2.1 Intraazinäre Aktivierung von proteolytischen Enzymen

In verschiedenen experimentellen Modellen der akuten Pankreatitis wird als eines der initialen Ereignisse die Blockade der Sekretion von Pankreasenzymen beschrieben, während die Synthese der Enzyme andauert. Die Aktivierung dieser proteolytischen Enzyme führt dann zur Autodigestion (Selbstverdauung) des Pankreas [25].

Eine Autodigestion wird *in vivo* durch verschiedene protektive Mechanismen verhindert [26]:

- (1) Speicherung der Proenzyme in speziellen Zellorganellen, die sich im Milieu von den im Zytosol herrschenden Bedingungen unterscheiden und so die Autoaktivierung verhindern. Erst die Fusion der Vesikelmembran mit der apikalen Plasmamembran der Azinuszelle setzt die sekretorischen Enzyme ins Lumen frei.
- (2) Proteasen werden mit einem Aktivierungspeptid am N-terminalen Ende synthetisiert, das bis zur Abspaltung durch Enterokinase im Dünndarm eine Aktivierung verhindert.
- (3) Proteaseinhibitoren (z.B. α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, SPINK-1) bilden Komplexe mit den Verdauungsenzymen und werden mit ihnen in den Darm transportiert, so dass eine vorzeitige Aktivierung von Proteasen keine Zellschädigung verursachen kann.

Wodurch die Proteasen initial aktiviert werden ist nicht geklärt. Lerch et al. konnten zeigen, dass der Beginn des Entzündungsgeschehens im Bereich der Azinuszelle liegt und nicht, wie bisher angenommen, im Bereich des Ductus Wirsingianus und seiner Ausläufer [27]. Bei der ödematösen Pankreatitis entwickelt sich eine ödematöse Auflockerung der Kollagenfaserstruktur zwischen den Azinuszellen und in den Lobularsepten. Zell-Nekrosen betreffen den exokrinen und endokrinen Anteil der Drüse und sind unterschiedlich stark ausgebildet. In histologischen Bildern lässt sich eine signifikante Zunahme von Vakuolen fest-

stellen. Die Vakuolisierung beruht auf einer ausgeprägten Erweiterung der Zisternen des endoplasmatischen Retikulums, die lysosomale Enzyme enthalten. Es finden sich erweiterte Interzellularspalten, in die Zymogengranula nun ebenfalls sekretieren können und somit ihren Inhalt von Verdauungsproteasen in die Interzellularflüssigkeit befördern. Bei der Exozytose der Verdauungsenzyme spielen zwei Komponenten des Zytoskeletts eine wichtige Rolle: Erstens wurde beim Mikrofilament Aktin eine deutliche Verlangsamung bei der Fusion von Zymogengranula und der apikalen Plasmamembran nachgewiesen [28]. Die zweite Struktur sind Mikrotubuli, welche für den Transport zur Zellmembran zuständig sind. In der experimentellen Initialphase der Pankreatitis kann ein schneller Zerfall der Strukturen gezeigt werden [29].

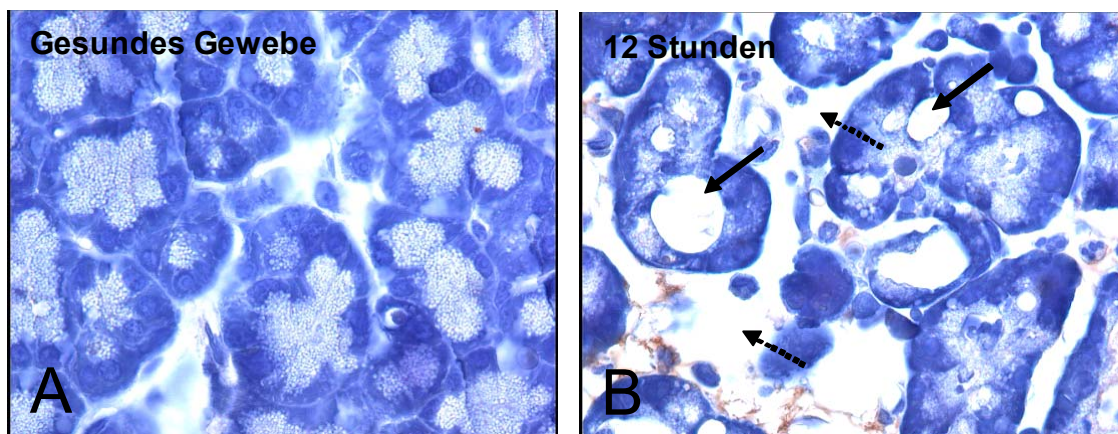


Abbildung 1: Lichtmikroskopisch sichtbare morphologische Veränderungen beim Vergleich zwischen gesundem Gewebe (**A**) mit Gewebe nach Caerulein-induzierter akuter Pankreatitis (**B**). Beide Abbildungen zeigen exokrines Pankreasgewebe der Ratte nach Hämatoxylin-Übersichtsfärbung (nach Mayer) von Paraffinschnitten. Bei der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis entwickelt sich eine ödematöse Auflockerung der Kollagenfaserstruktur zwischen den Azinuszellen und in den Lobularsepten (gestrichelte Pfeile). Es lässt sich eine deutliche Zunahme von Vakuolen feststellen (schwarze Pfeile).

1.2.2 Störungen der Mikrozirkulation

Die Freisetzung der Pankreasenzyme schädigt das Endothel der Gefäße und das interstitielle Gewebe ebenso wie die Azinuszellen [30-32]. Veränderungen der Mikrozirkulation einschließlich Vasokonstriktion, kapillärer Stase, herabgesetzter Sauerstoffversorgung und Ischämie wurden in den verschiedenen experimentellen Tiermodellen in der Frühphase der Pankreatitis beobachtet. Diese Veränderungen führen zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße und damit zum interstitiellen Ödem. Durch die vaskuläre Schädigung kann es zu einem kompletten Erliegen der lokalen Mikrozirkulation kommen und damit zu einer Potenzierung der Schädigung des Pankreasgewebes.

1.2.3 Leukozyteninfiltration, Freisetzung von Zytokinen und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

In der Frühphase der akuten Pankreatitis konnte sowohl mikroskopisch als auch mittels Indium-111 markierter Leukozyten eine ausgeprägte Infiltration des Pankreas mit Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten gezeigt werden [33-35]. Die Aktivierung von Komplement und die darauf folgende Freisetzung des Faktors C5a spielen bei der Rekrutierung dieser inflammatorischen Zellen eine wichtige Rolle, obwohl es auch Hinweise darauf gibt, dass C5a an antiinflammatorischen Prozessen beteiligt ist [36].

Die Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen führt zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Tumor-Nekrose-Faktor, Interleukine 1, 6 und 8), Arachidonsäuremetaboliten (Prostaglandine, Leukotriene und Thrombozyten-aktivierender Faktor), proteolytischen und lipolytischen Enzymen sowie zur Bildung von freien Radikalen. Diese Substanzen beeinflussen die lokale Mikrozirkulation, führen zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße und induzieren Thrombosenbildung und Hämorrhagie, die dann zur Nekrose des Pankreasgewebes führen kann.

1.2.4 Regeneration des Gewebes

Die aktivierten Pankreasenzyme, die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und die Freisetzung der inflammatorischen Mediatoren führen zu einer raschen Vergrößerung der Gewebeschadens und zur Nekrose. Allerdings nimmt die Mehrzahl der akuten Pankreatitiden einen selbstlimitierenden Verlauf und heilt vollständig aus. Die Faktoren, die für die Begrenzung des Gewebeschadens sorgen und zur Regeneration des Organs führen, sind bisher weitgehend unbekannt.

Die Regeneration entzündeter epithelialer Organe erfordert das koordinierte Zusammenspiel von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Diese werden sowohl von den Zellen des betroffenen Organs als auch von den infiltrierenden Leukozyten sezerniert. Unter den Faktoren, die die Proliferation von Epithelzellen anregen, spielen die durch Zytokine induzierten Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle. Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, richten ihr Augenmerk auf einen dieser Wachstumsfaktoren und seine physiologischen Gegenspieler: Die Funktion von Activin A, einem Wachstumsfaktor der TGF β -Familie, sowie die Rolle von Inhibinen und Follistatin, die eine dem Activin A entgegenstehende Aktivität zeigen, wurden im Zusammenhang mit der Regeneration des exokrinen Pankreasgewebes nach akuter Pankreatitis näher untersucht.

1.3 Aufbau und Funktion von Activinen, Inhibinen und Follistatin

Activine sind Proteine von der Struktur eines Dimers, die zur Superfamilie der TGF β -Wachstumsfaktoren gehören. Diese Familie umfasst eine strukturell ähnliche, multifunktionelle Gruppe von Botenstoffen, die Wachstum und Differenzierung verschiedener Zelltypen in einer Reihe von biologischen Systemen regulieren [37]. Die Dimerisierung der Inhibin- β -Untereinheiten A und B führt zu homo- bzw. heterodimeren Activinen (β A- β A, β B- β B, β A- β B), während die Dimerbil-

dung zwischen Inhibin- α und Inhibin- β -Untereinheiten zur Bildung von Inhibinen (α - β A, α - β B) führt. Diese sind in vielen Geweben für die Antagonisierung der Activin-Signale verantwortlich. Bekannt sind mittlerweile auch weitere β -Untereinheiten (β C, β D und β E) [38, 39].

Die biologische Aktivität wird über einen aus zwei Untereinheiten bestehenden transmembranen Rezeptorkomplex vermittelt, der eine intrazelluläre Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität aufweist [40]. Die initiale Bindung über die konstitutiv exprimierten Typ II Rezeptoren (ActR II oder ActR IIB) führt zur Rekrutierung von Typ I Rezeptoren (ActR I und ActR IB), die dann durch Phosphorylierung in ihrer juxtamembranären Glycin-/Serin-reichen Region aktiviert werden. Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt durch Phosphorylierung und Dimerisierung von „Rezeptor regulierten“ SMAD-2 und SMAD-3 Proteinen, die dann eine Verbindung mit SMAD-4 eingehen und in den Zellkern translozieren, wo dieser Komplex an der transkriptionellen Regulierung von Zielgenen beteiligt ist [41, 42].

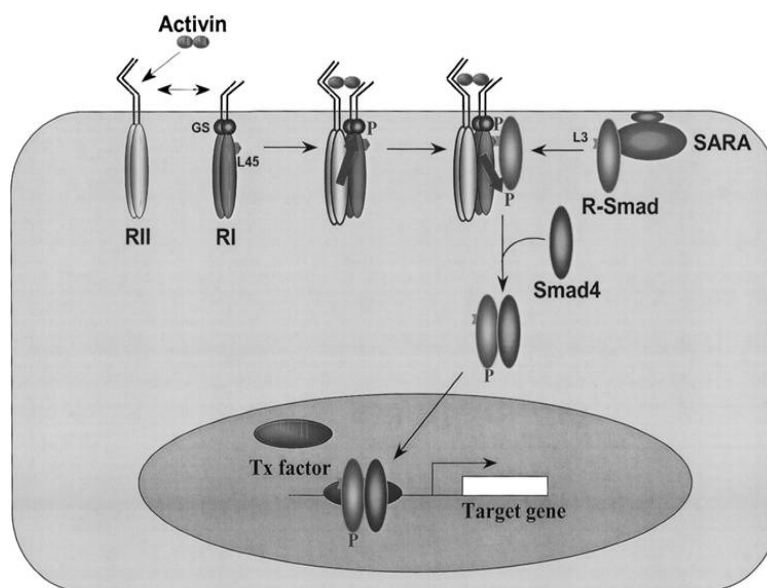


Abbildung 2: Der Activin Signalweg

Die Activinbindung an den Typ II Rezeptor (RII) führt zur Rekrutierung des Typ I Rezeptors (RI) und zur Formation des Rezeptorheterodimerkomplexes. In diesem Komplex wird der Typ I Rezeptor an der GS-Domäne (GS) durch den konstitutiv exprimierten Typ II Rezeptor phosphoryliert und dadurch aktiviert. Der Typ I Rezeptor ist dann in der Lage, Smad2 und 3 (R-Smad) zu binden und zu phosphorylieren. Die Smad2 Aktivierung wird durch SARA unterstützt, durch das

Smad2 dem Rezeptorkomplex präsentiert wird. Nach Phosphorylierung dissoziiert R-Smad vom Rezeptorkomplex und assoziiert mit Smad4. Der daraus resultierende Smad-Komplex transloziert in den Zellkern und bindet an DNA. Abhängig von den Transkriptionsfaktoren, mit denen sie interagieren, sind Smad-Proteine in der Lage, die Expression ihrer Zielgene zu stimulieren oder zu supprimieren.[41]

Auch Inhibine sind im Stande, an die Activin-Rezeptoren ActR II und IIB zu binden, allerdings ist ihre Affinität zum Rezeptor um etwa das Zehnfache geringer [43]. Die antagonistischen Funktionen von Activin und Inhibin können durch die synthetisierte Menge des Liganden und durch die Rezeptorbindung reguliert werden. Zudem scheinen spezifische Inhibin-Rezeptoren (p120 InhBP und Betaglycan) zu existieren, die Activinsignale durch Zersetzung des Komplexes in nicht funktionstüchtige Teile unterbrechen können [44, 45]. Ein weiterer Activin-Antagonist ist das Glykoprotein Follistatin. Dessen antagonistische Wirkung basiert auf hydrophoben Aminosäuren im N-terminalen Ende von Follistatin, die eine lokale Neutralisierung von Activin durch irreversible Bindung ermöglichen [46]. Follistatin, das in einer Reihe von Geweben gebildet wird [47], assoziiert mit Heparan-Sulfat-Ketten von Proteoglykanen auf der Oberfläche von Zielzellen, wo die Bindung von Activin zur Internalisierung durch Endozytose und späteren proteolytischen Degradation führt [48-50].

Activine, Inhibine und Follistatin bilden ein physiologisches regulatorisches Dreieck in Fortpflanzungsorganen; zusätzlich konnten in den letzten Jahren weitere Funktionen in anderen Geweben und Organen nachgewiesen werden, z.B. in der Differenzierung der endokrinen Pankreaszellen, in der Morphogenese der Knochen [51] und der Kontrolle der Wundheilung der Epidermis [52]. Diese Ergebnisse stellen Activine in die Position eines Wachstumsfaktors, der auf der einen Seite bedeutend für die Entwicklung von Organen ist, auf der anderen Seite aber auch eine wichtige Rolle in Wundheilungs- und Regenerationsprozessen spielt. Deswegen konzentrierten sich die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit darauf, herauszufinden, ob Activin auch im Pankreas, wo seine Rolle im endokrinen Anteil bereits gut charakterisiert ist, eine Funktion während der Regeneration nach akuter Pankreatitis einnimmt.

1.4 Pankreatitisinduktion durch hormonelle Hyperstimulation im Tiermodell

Zur Untersuchung der Regenerationsprozesse nach akuter Pankreatitis erscheint das Modell der experimentell induzierten Pankreatitis an der Ratte als besonders geeignet, da die Erkrankung hier einen recht milden, selbstlimitierenden Verlauf nimmt und normalerweise komplett ausheilt.

Dem Prinzip der Hyperstimulation durch Caerulein (einem Cholezystokininanalogon) liegt die durch Skorpiongift induzierte Pankreatitis beim Menschen zugrunde. Gallagher fand ein gehäuftes Auftreten einer Pankreatitis in Trinidad in Zusammenhang mit einem Skorpionstich durch die Spezies *Tityus trinitatis* [53]. Nähere Untersuchungen im Tiermodell bei Hunden haben ergeben, dass Skorpiongift eine ödematöse und eine hämorrhagisch nekrotisierende Pankreatitis verursacht [54, 55]. Beim Menschen gibt es zwei seltene Formen der akuten Pankreatitis, die direkt mit dem Hyperstimulationsmodell vergleichbar sind: Vergiftungsformen durch Cholinesterase hemmende Insektizide (Phosphorsäureester) und der Stich eines Trinidad Skorpions [53].

Bereits 1895 wurde von Mouret erstmals beschrieben, dass eine exzessive neuronale Stimulation eine Vakuolenbildung in Azinuszellen und eine Schädigung am exokrinen Pankreas bewirkt [56]. Lampel, Adler und Kern haben das Modell der supramaximalen Hormonstimulation mit Caerulein an der Ratte charakterisiert und standardisiert [57, 58]. Durch die intravenöse Infusion des Cholezystokininanalogons Caerulein in einer Dosis von 5 bis 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht pro Stunde, die ungefähr 50-fach höher als die maximal stimulierende Dosis ist, lässt sich bei der Ratte eine akute ödematöse Pankreatitis induzieren. Unter der Stimulation wird die Exozytose an der luminalen Azinuszellmembran blockiert und es lassen sich zahlreiche intrazelluläre Vakuolen im Verlauf beobachten. In diesen Vakuolen sind Verdauungsenzyme und lysosomale Enzyme lokalisiert. Für die Blockade der Exozytose ist ein verändertes Zytoskelett verantwortlich [29, 59, 60]. Die intraperitoneale Injektion von Caerulein liefert mit der intravenösen Infusion vergleichbare Ergebnisse. Auch bei Katzen, Hunden

und Hamstern führt die supramaximale Stimulation durch Caerulein zur ödematösen, akuten Pankreatitis [61, 62]. Die subkutane oder intraperitoneale Injektion von Caerulein mündet bei Mäusen in eine akute nekrotisierende Pankreatitis [63]. Der Schweregrad der Erkrankung ist höher als bei der Ratte und reicht dosis-abhängig von einer milden interstitiellen Entzündung bis zur Ausbildung einer schweren Nekrose.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die Regulation der Regeneration des Pankreas nach akuter Pankreatitis ist derzeit noch nicht vollständig verstanden. Die Analyse der relevanten Mechanismen kann möglicherweise zu neuen therapeutischen Ansätzen in der Therapie der akuten Pankreatitis führen.

Activine, Mitglieder der TGF- β -Großfamilie, sind an einer Vielzahl von Funktionen in der Entwicklung von Organen und an Reparaturvorgängen in Geweben beteiligt. Im Pankreas reguliert Activin A die endokrine sowie auch die exokrine Entwicklung des fetalen Pankreas aus Progenitorzellen [64, 65], außerdem ist es in die Aufrechterhaltung der β -Zell-Funktion im adulten Pankreas eingebunden [66].

Die Frage, ob Activine darüber hinaus eine Rolle in der Pathophysiologie und in Regenerationsprozessen des exokrinen Pankreas nach akuter Pankreatitis der Ratte spielen, ist Gegenstand der hier dargestellten Untersuchungen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid	Bio-Rad, München
Aether	Sigma, Taufkirchen
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Amplification Diluent	NEN, Köln
Amyl-Gemisch (Amylase)	Roche Diagnostics, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Beta-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Bisbenzimid	Höchst, Frankfurt
Biotin N-Hydroxy-Succinimide Ester	Amersham Pharmacia, Freiburg
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
BSA-c basic blocking solution	Aurion, Wageningen, Niederlande
Caerulein (Takus)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Cholezystokinin (CCK, sulphatiert)	Sigma, Taufkirchen
Collagenase (Lot # 14007)	Serva, Heidelberg
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Cytochalasin B	Calbiochem, New York, USA
DAPI	Sigma, Taufkirchen
DME-Medium	Sigma, Taufkirchen
dNTP`s	Invitrogen, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
ECL Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
EGF (Maus)	Sigma, Taufkirchen
ET-G7PNP	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Formamid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Gewebegläschen (Rollrand-Gläser mit PE-Schnappdeckel)	Bender und Holbein AG
Hämatoxylin	Sigma, Taufkirchen
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Hyperfilm-MB	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen Nunclon, Dänemark Sarstedt, Nümbrecht Falcon, U.K.
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Marker DNA (100 bp Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe
Monovette mit EDTA Zusatz (2.7 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Natriumpyrophosphat	Merck, Darmstadt
Nembutal (Pentobarbital)	Lilly, Basel, Schweiz
Nitrozellulose-Blotting Membran	Amersham Pharmacia, Freiburg
OCT Tissue Tek Compound	Sakura Finetek, Japan
Oligo dT Primer	Invitrogen, Karlsruhe
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Perfusorspritzen (50 ml)	Braun, Melsungen

Physiologische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
Reagenzröhrchen	15ml, 50ml, Falcon, U.K.
Serumröhrchen (7.5 ml Monovette)	Sarstedt, Nümbrecht
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
SDS-page Molekulargwichtsstandard	Bio-Rad, München
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase I	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Bio-Rad, Giessen
Triethylphosphat	Aldrich, Steinheim
Tris-Base	Amersham Pharmacia, Freiburg
Tris-HCl	Amersham Pharmacia, Freiburg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trizol	Biozol, Eching
Trypan Blau	Serva, Heidelberg
Trypsin Inhibitor	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tyramid, Fluorescein konjugiert	NEN, Köln
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen waren von höchstem käuflichen Reinheitsgrad und stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (Eppelheim), Amersham Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg), Riedel-de-Häen (Seelze), Bio-Rad (Hercules, USA) oder Merck (Darmstadt).

2.1.2 Geräte

Elektrophoreseapparaturen	Keutz Laborgeräte, GbR, Kreuzkirchen Bio-Rad, München
ELISA Reader	MR 5000; Dynatech, Denkendorf

Fluorometer	Spectra Gemini Max, S/N G02052, Molecular Devices , Sunnyvale, USA
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf Hamburg
Mikroskope	Nikon Phasenkontrast-2, Kamera F-301, Nikon Olympus OM, Kamera SC 35 Typ 12, Olympus
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiomat mit Axiovision
Photometer	LKB Biochrom, Ultrospec II, Modell 4050, Cambridge, U.K. COBAS BIO, Programmversion 8326, Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz Beckmann, München
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Proteintransferapparaturen	"Semidry " Blot-Apparatur; Bio-Rad, München
Netzteil	Power Pac 200/300, Bio-Rad, München
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermocycler	TRIO Thermoblock, Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge	Beckmann L8-60M, Rotoren SW 40, Ti 70.1, München
Zellkultur	Brutschrank B5060 Ek/CO2, Heraeus, Hanau
Waage	Typ Ulm Sartorius, Analytic AC 210 S
Wasserbad	GFL mbH, Typ 1004, Burgwedel
Homogenisator	Typ 853202, Braun, Melsungen
Perfusoren	Perfusor Sekundenura, Braun, Melsungen
Schüttelmixer	IKA Works, inc., MS1 Minishaker, Wilmington, USA

2.1.3 Software und Statistik

AxioVision	Carl Zeiss, Oberkochen
Cell Explorer 2000	BioSciTec, Frankfurt
Gelscan 5.0	BioSciTec, Frankfurt
PhotoImpact 6.0	Ulead Systems, Torrance, USA

SigmaPlot for Win SPSS, Chicago, USA

SigmaStat for Win SPSS, Chicago, USA

Die Ergebnisse repräsentieren, falls nicht anders angegeben, die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten; deren Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung dar.

2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) und der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen. Fötales Kälberserum (FCS, Sigma) wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch für 30 min auf 56°C erhitzt.

Dulbecco's Modified Eagle

Medium (DMEM) mit 4.5 mg/ml Glukose,
 10 % FCS,
 2 mM Glutamin,
 1 mM Natriumpyruvat

Modified Eagle Medium

(MEM) mit 10 % FCS,
 2 mM Glutamin,
 1 mM Natriumpyruvat

Zellisolationsmedium

(DMEM) mit 2 mM Glutamin,
 1% BSA,
 10% FCS,
 0.2%Trypsin-Inhibitor (Soybean)

Einfriermedium 90 % FCS,
 10 % DMSO

Laemmli-Puffer (3 x) 187.5 mM Tris/HCl pH 6.8,
 6 % SDS,

	30 % Glycerin, 0.01 % Bromphenolblau, 3 % β -Mercaptoethanol
NET (10 x)	100 mM Tris/HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl, 0.5 % Tween 20
PBS	13.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 80.9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 (HCl)
SD-Transblot	50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.004 % SDS, 40 mM Glycin, 20 % Methanol
TAE-Puffer	40 mmol/l Tris Base, 20 mmol/l Natriumacetat, 1 mmol/l EDTA
Tris-Glycin-SDS (10 x)	248 mM Tris/HCl pH 7.5, 1918 mM Glycin, 1 % SDS
Triton X-Lysepuffer	50mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 % Triton X-100 jeweils frisch hinzugeben: 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin, 2 mM PMSF, 0,02 % Trypsininhibitor,

10 mM Natriumpyrophosphat,
100 mM Natriumfluorid

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

2.1.5 Antikörper, Assays und rekombinante Proteine

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper zur Detektion im Western Blot und in der Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

<i>Antikörper</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenz</i>
Inhibin-βA	Maus MAK Clone E4	Oxford Bio-Innovation, Oxford, UK
ActR II	Maus MAK Clone 149/1	NeoMarkers, Union City, USA
E-Cadherin	Maus MAK Clone 36 gegen die c-terminale Domäne	Transduction Lab., San Diego, USA
PCNA	Maus MAK Clone PC10	DAKO, Hamburg

Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Die im Western Blot und in der Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten sekundären Antikörper (Schaf gegen Maus IgG und Ziege gegen Kaninchen IgG) waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert und wurden von Amersham Pharmacia (Freiburg), DAKO (Hamburg) oder Vector (Burlingame, USA) bezogen.

2.1.5.3 Rekombinante Proteine

Activin A (Ratte)	R&D Systems, Wiesbaden
Follistatin (Maus)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-6 (Mensch)	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
IL-1β (Ratte)	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

TGF- β (Mensch)	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
KGF (Mensch)	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

2.1.5.4 Assays

Activin A Elisa Assay	Serotec, Oxford, UK
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
BrdU-Assay	RPN 250, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
ApopTag Kit	Serologicals Corporation, Norcross, USA

2.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

	<i>Primersequenz</i>	<i>PCR Produktlänge (Basenpaare)</i>
Inhibin- β A	5'-ggcaagttgctggattatag-3' 5'-cccacatgaagctttctgat-3'	245
Inhibin- α	5'-atggtgatccagccgtctctg-3' 5'-gctgggaaaaggatggcctgg-3'	265
ActR I	5'-gctgtggagtgtgccaagggg-3' 5'-ttggtggtgatgagcccttc-3'	250
ActR IIb	5'-cgggagtgcactactacaacgcc-3' 5'-ttgcagaaattgccttcacagcag-3'	430
Follistatin	5'-atggtctgcgccaggcac-3' 5'-ggttgttcttctgttcattcggc-3'	340
GAPDH	5'-caatgcacctgcaccaccaa-3' 5'-tcaccaccctgttgctgta-3'	530

Tabelle 3: Verwendete Primerpaare.

GAPDH diente bei allen Versuchen als interne Kontrolle. Der jeweils erstgenannte Primer entspricht dem sense Strang, der zweite dem antisense Strang.

2.2 Tiermodell

2.2.1 Versuchstiere

Für alle durchgeführten Versuche wurden männliche Wistar-Ratten von Charles River (Sulzbach) mit einem Körpergewicht von 200g bis 300g verwendet. In der zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Medizinischen Fakultät der WWU wurden die Tiere nach den geltenden Tierversuchsbestimmungen in Nalgene Käfigen bei einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Sie hatten unbeschränkten Zugang zu Wasser und Standardfutter. Zwölf Stunden vor Beginn des Versuches wurde zwecks Standardisierung der Versuche das Futter entzogen, Wasser stand weiter unbeschränkt zur Verfügung.

2.2.2 Isolation von Pankreasazinuszellen

Zur Vorbereitung des Zellisolutionsmediums wurden 20 mg Kollagenase auf 10 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) im 20 ml Erlenmeyerkolben im Wasserbad auf 37°C vortemperiert. Die DMEM-Lösung wurde mit 0.02% Trypsininhibitor und 0.2% BSA versetzt. Das Medium wurde mit 100% O₂ begast; die pH-Einstellung erfolgte auf 7.35. Pro Rattenpankreas wurden etwa 50-75 ml DMEM mit 0.02% Trypsininhibitor und 0.2% BSA als Waschpuffer für die frisch isolierten Zellen angesetzt. Das Medium wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt und anschließend unter dauerndem Schütteln (Magnetrührer) mit 95% O₂ begast. Zur Entnahme des Pankreasgewebes wurde nach Durchführung einer Äthernarkose die Bauchdecke des Tieres eröffnet, das Pankreas entnommen und in eine Petrischale überführt. Das Pankreas wurde in der Petrischale mit Skalpell und Pinzette zerkleinert und die Gewebestücke in den mit vortemperierten DMEM gefüllten Glaskolben überführt. Das mechanisch zerkleinerte Gewebe wurde für 15 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 5 Minuten wurden mit einer 1 ml Eppendorfpipette mit leicht angeschnittener blauer Spitze die Zellen mechanisch durch Auf- und Abpipettieren für ca. 1 Minute vereinzelt. Nach 10 und nach 15 Minuten wurden die Zellen

erneut mit kleiner werdendem Spitzendurchmesser in gleicher Weise behandelt. Anschließend wurden die Zellaggregate in ein 50 ml Reagenzgefäß überführt und für 3 Minuten mit O₂ begast. Der Verdau erfolgte für weitere 30 Minuten im Wasserbad. Die Zellen wurden bei 600 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in ca. 4 ml DMEM resuspendiert. Die entstehende Zellsuspension wurde durch einfache Gaze filtriert und in ein Spitzröhrchen überführt. Die Zellen mussten vor der Stimulation für 15 bis 30 Minuten ruhen. Die Stimulation erfolgte in einem Stimulationsvolumen von 3 bis 5 ml in 15 ml Reagenzgefäßen für die angegebenen Zeitpunkte.

2.2.3 Operationsverfahren

Unter Pentobarbitalnarkose wurde den Ratten ein 2-3 cm langer Hautschnitt in der Medianlinie submandibulär gesetzt. Die Vena jugularis interna wurde freipräpariert, angeschnitten und ein Jugularvenenkatheter vorgeschoben. Dieser wurde mit 3 Nähten fixiert. Anschließend erfolgte der Wundverschluss. Der Katheter wurde auf dem Rücken der Ratte mit Leukosilk befestigt, so dass er nicht beschädigt werden konnte. Die Tiere konnten sich im Käfig frei bewegen und hatten freien Zugang zu Wasser.

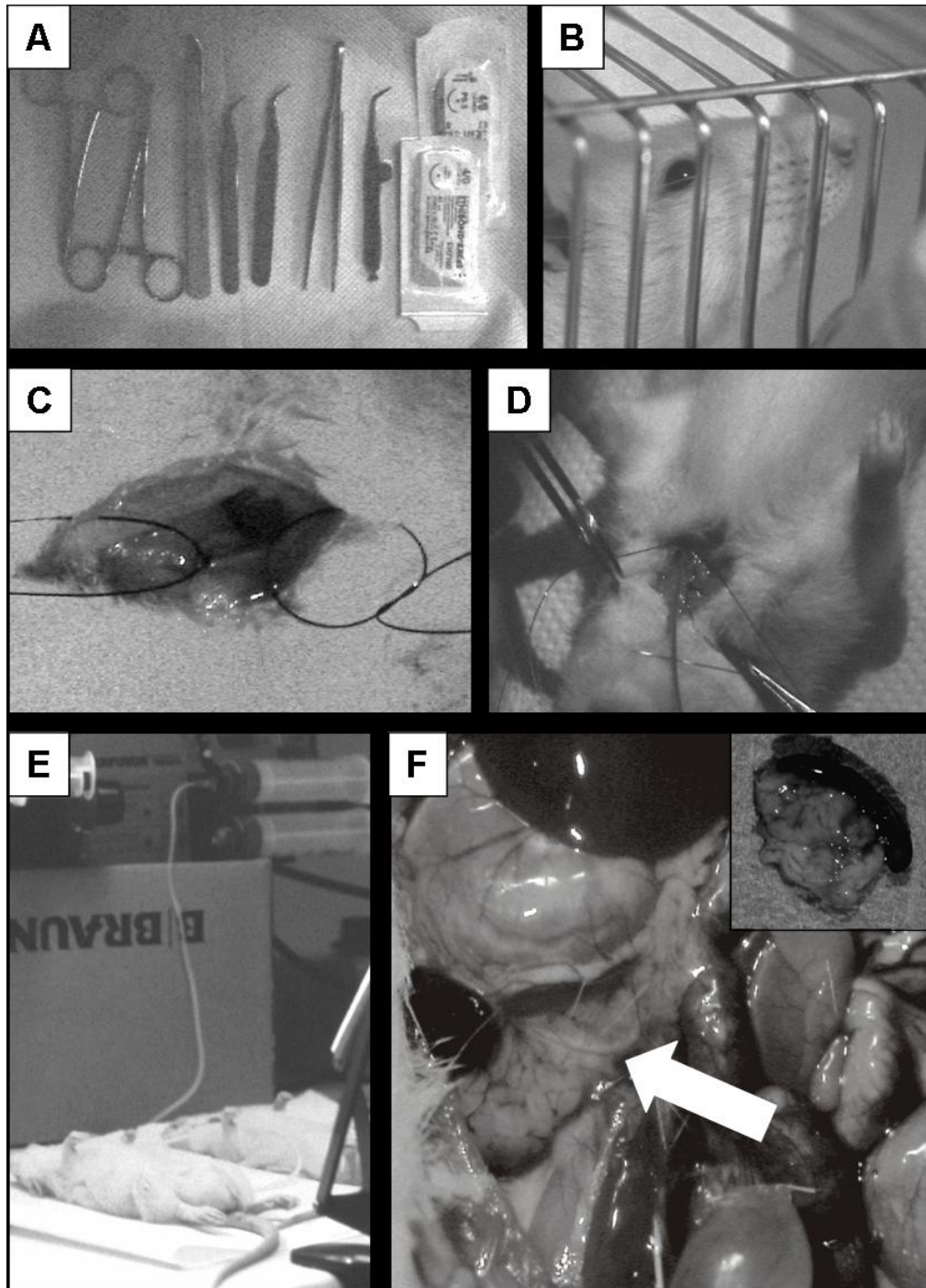


Abbildung 3: Induktion einer Caerulein induzierten Pankreatitis

(A) Abbildung der benötigten Geräte, (B) männliche Wistar Ratte, (C) freipräparierte Vena jugularis externa, (D) Fixierung des eingelegten Polyethylenkatheters, (E) Infusion von supramaximaler Caerulein-Lösung, (F) Situs einer Ratte nach 2-stündiger Infusion von Caerulein in supramaximaler Konzentration; **weißer Pfeil:** ödematöses Pankreas, **Insert:** entnommenes Pankreas mit Milz.

2.2.4 Induktion einer akuten Caerulein-induzierten Pankreatitis bei der Ratte

Den Ratten wurden über den unter Kapitel 2.2.3 beschriebenen intravenösen Zugang supramaximale (10 µg/kg Körpergewicht/Stunde) Caerulein-Konzentrationen appliziert. Eine Infusion mit physiologischer Kochsalzlösung diente als Kontrolle. Diese Methode wurde für Pankreatitisinduktionen von bis zu 24 Stunden Dauer durchgeführt. Zur Induktion einer Pankreatitis von über 24 Stunden Dauer wurde das Caerulein (40µg/kg Körpergewicht) zweimalig im Abstand von 6 Stunden (zu den Zeitpunkten -3 Stunden und +3 Stunden) intraperitoneal injiziert. Auch hier dienten Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurden die Tiere unter Aethernarkose durch Ausbluten getötet. Das Pankreas wurde rasch auf Eis entnommen und nach Entfernung des Fettwebes aufgeteilt. Ein Teil wurde in OCT-Medium (Tissue Tek) für Kryoschnitte eingebettet, ein anderer Teil in Paraformaldehyd für Paraffineinbettung konserviert. Ein weiterer Teil wurde in flüssigem Stickstoff für spätere proteinchemische Untersuchungen und RNA-Präparation tiefgefroren.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Pankreashomogenaten

Das nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrorene und anschließend bei -80°C gelagerte Pankreas wurde in einem Volumen von 4 ml Triton-X-100 Lysepuffer in einem Glas-Homogenisator mit 10 Hüben homogenisiert. Das Volumen aller Proben wurde mit Lysepuffer auf 6 ml angeglichen, um das Ödem auszugleichen. Das so gewonnene Lysat wurde in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei 4°C für 30 Minuten in einer Tischkühlzentrifuge bei 14000 rpm vom Zelldetritus gereinigt.

2.3.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der Bio-Rad Protein-Assay modifiziert nach Bradford nach den Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode der Proteinbestimmung wird nicht durch hier zur Zellyse eingesetzten Detergenzien gestört und ist in Mikrotiterplatten ebenso wie in Küvetten durchführbar [67]. Die O.D. der 1:100 verdünnten Lysate wurde bei 570 nm gegen 490 nm gemessen und auf den BSA-Standard (100 bis 1000 µg Protein) bezogen. Die Bestimmung erfolgte, um die Zunahme der extrazellulären bzw interstitiellen (durch das Ödem verursachten) Proteinmenge auszugleichen.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach dem Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [68]. Das Detergenz SDS komplexiert Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur und versieht sie mit einer negativen Ladung, die ihre Wanderung im Gel entsprechend ihres Molekulargewichts bestimmt. Es wurden 7.5%-ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von 10% APS und TEMED gestartet.

Die Elektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. [69]. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Blau gefärbt oder zum Proteintransfer auf Nitrozellulose geblottet.

2.3.4 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Zur Immunodetektion von Proteinen wurden diese nach der Elektrophorese aus den SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen transferiert [70]. Der Transfer erfolgte in einer semidry Blot-Apparatur durch Anlegen eines elektrischen Feldes von 150-200 mA für 2 Stunden. Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2g/l in 2% (w/v) TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert und die Membran mit H₂O entfärbt.

2.3.5 Immunoblot

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrocellulose zu verhindern, wurde diese vor der Inkubation mit Gelatine abgesättigt. Die Membran wurde über Nacht mit 0.2% Gelatine in NET inkubiert, danach mehrfach mit NET gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurden monoklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden Antikörperlösungen auf 1µg/ml in NET Gelatine (0.2%) mit 0.02 % Natriumazid eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET Gelatine mit 0.02 % Natriumazid verdünnt. Die Antikörperlösungen wurden bei 4°C gelagert und gegebenenfalls mehrfach verwendet.

Der Blot wurde für eine Stunde bei RT mit der Antikörperlösung inkubiert, danach dreimal für 10 min mit NET gewaschen. Anschließend wurde der Blot für eine Stunde bei RT mit dem zweiten Antikörper (in NET/Gelatine) inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte spezie-spezifische Antikörper verwendet.

Der Blot wurde erneut mindestens dreimal für 10 Minuten mit NET gewaschen und die markierten Banden anschließend mit dem ECL-Verfahren sichtbar gemacht.

2.3.6 Detektion mit dem ECL-Verfahren

Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mit dem ECL (Enhanced Chemoluminescence)-Kit (Amersham) durch Chemolumineszenz. Das Enzym Peroxidase setzt das Substrat Wasserstoffperoxid um, der dabei freiwerdende Sauerstoff katalysiert die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu. Die Oxidation transferiert Luminol auf ein höheres Energieniveau, bei dem Rückfall in den Grundzustand wird Energie als Chemolumineszenz frei. Durch die Oxidation von Luminol in Gegenwart von "Enhancern" wird die Menge des emittierten Lichtes erhöht und zugleich die Emission verlängert [71].

Zur Detektion wurde der Blot in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 im Dunkeln unter Schwenken für eine Minute inkubiert. Anschließend wurde der

Blot auf Whatman-Papier abgetupft, auf polyethylenbeschichtetes Papier gelegt und mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt. Der Blot wurde dann sofort auf einem Röntgenfilm für verschiedene Zeiten (eine Minute bis eine Stunde) -in Abhängigkeit der Stärke der Chemolumineszenz- exponiert. Sollte derselbe Blot ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch etwa 20-minütige Inkubation mit einem speziellen Puffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS) bei 50°C entfernt werden. Anschließend wurde der Blot in NET gewaschen, erneut geblockt und wie oben beschrieben behandelt.

2.3.7 Herstellung von Zelllysaten aus Pankreasazinuszellen

Zur Untersuchung zellulärer Proteine wurde ein Lysepuffer mit dem ionischen Detergenz Triton X-100 verwendet. Zellen wurden vor der Lyse mit PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer versetzt. Nach Zugabe des Lysepuffers in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) wurde die Lyse durch mechanischen Stress (vortexen sowie auf- und abpipettieren auf Eis) unterstützt. Nach Abzentrifugation unlöslicher Zellbestandteile (10 Minuten, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

2.3.8 Bestimmung der Amylasesekretion nach *in vitro* Stimulation mit Cholezystokinin

Um Vitalität und Antwort auf physiologische Stimuli der Azinuszellen nach der Isolation durch Kollagenaseverdau zu verifizieren, wurde die Ausschüttung des Enzyms Amylase nach Stimulation mit dem Sekretanalogon Cholezystokinin (CCK) im Zellüberstand gemessen. Die nach dem oben beschriebenen Protokoll gewonnenen Zellen wurden in Reagenzgefäße aufgeteilt, für 30 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen und dann für bis zu 24 Stunden bei 37°C (5%CO₂) inkubiert. Nach 0, 12 und 24 Stunden wurde jeweils eine definierte Menge der gesamten Zellen abgenommen und mit folgenden CCK-

Konzentrationen für 30 Minuten bei 37°C stimuliert: CCK 10^{-6} M, CCK 10^{-7} M, CCK 10^{-8} M, CCK 10^{-9} M, CCK 10^{-10} M, CCK 10^{-11} M, CCK 10^{-12} M [72, 73]. Als physiologische Zellantwort wurde eine hyperbolische Kurve mit einer Sekretionsblockade im Bereich hoher Konzentrationen (10^{-6} M), eine maximale Sekretionsantwort im Bereich physiologischer CCK- Konzentrationen (10^{-10} M) sowie ein Erliegen der Sekretionsleistung für Konzentrationen niedriger als 10^{-12} M gewertet [74]. Die Stimulation mit supramaximalen Konzentrationen von CCK (10^{-6} M) führt zu einer intrazellulären Proteaseaktivierung vergleichbar den auf zellulärer Ebene ablaufenden Prozessen einer akuten Pankreatitis. [75].

Bei der Versuchsdurchführung wurden die Zellen nach der Stimulation für 30 Sekunden bei 500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in einem Triton X-100 Lysepuffer lysiert. In beiden Lösungen wurde die Amylaseaktivität bestimmt. Die Enzymaktivität wurde mithilfe des Zentrifugalanalysators Cobas Bio und dem zugehörigen Test-Kit (Bio 75 TAP) bestimmt. Der Messung liegt die enzymatische Umwandlung der 4,6-p-nitrophenyl- α -p-Maltoheptaosidase (ET-G7PNP) zugrunde. Die Messung dieser Farbreaktion erfolgte bei 405 nm. Der Versuchsansatz erfolgte als Dreifachansatz, ebenso die Messung der Farbreaktion. Bei allen Enzymbestimmungen wurden Leer- und Kontrollwert parallel mitgeführt.

Die stimulierte Amylase-Sekretion der Zellen errechnete sich aus dem Verhältnis gemessene Amylaseaktivität im Überstand gegen Gesamt-Amylaseaktivität in Überstand und Zellpellet.

Die Vitalität der Zellen wurde durch einen Trypan-Blau-Assay überprüft. Dabei lässt nur die beschädigte Zellmembran toter Zellen den Azofarbstoff ins Zytosol eindringen, während vitale Zellen das Trypanblau ausschließen und im Lichtmikroskop damit blass gegen den blauen Hintergrund erscheinen. Für die Sekretionsstudien wurden nur Zelllösungen verwendet, in denen 95% der Azinuszellen vital waren.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Bestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten mit Hilfe des DNA-Farbstoffs Propidiumjodid (50ng/ml) an 1:10 verdünnten Lysaten. Absorption und Emission wurden bei 350 nm bzw. 630 nm gemessen. Die gemessenen relativen Fluoreszenzen wurden auf einen DNA-Standard (1 ng bis 10 mg DNA) bezogen.

2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde aus dem tiefgefrorenen Pankreasgewebe bzw. aus frisch isolierten Azinuszellen nach der „single step“-Methode mit TRIzol (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und die Qualität der Präparation anschließend durch Elektrophorese auf einem 1,2% Agarose/Formaldehyd-Gel und Ethidiumbromid-Färbung überprüft.

2.4.3 RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion)

Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe der „SuperScript II Reverse Transcriptase“ (Invitrogen) nach den Richtlinien des Herstellers. Mit dem Enzym Reverse Transkriptase, und Oligo dT-Primern wurde zunächst eine komplementäre cDNA synthetisiert. In anschließenden PCR-Reaktionen wurden mit einer Taq-Polymerase (Invitrogen) und den in Kapitel 2.1.6 angegebenen spezifischen Primern relevante DNA-Abschnitte amplifiziert [76]. Im Thermocycler wurden 28 bis 32 Zyklen bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Denaturierung: 20 Sekunden bei 94°C
- Annealing: 20 Sekunden bei 44 bis 48°C
- Elongation: 60 Sekunden bei 68°C
- Finale Elongation: 5 Minuten bei 68°C

Durch die gleichzeitige Amplifikation eines „housekeeping“ Gens (wie z.B. GAPDH) aus derselben DNA-Probe (multiplex PCR) konnte bei verschiedenen

DNA-Proben eine semiquantitative Aussage zur Expression des jeweiligen untersuchten Gens gemacht werden.

2.4.4 Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2% verwendet. Als Puffer diente TAE-Puffer. Da unter Elektrophoresebedingungen die Nucleotide der Nukleinsäure als Polyanion vorliegen, bewegt sich die DNA entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

Nach Abschluss der Elektrophorese kann die Nukleinsäure im Gel durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt und so im UV-Licht visualisiert und dokumentiert werden.

Die semiquantitative Analyse erfolgte durch Vergleich der Expressionsintensität der jeweiligen spezifischen mRNA (messenger RNA) relativ zur GAPDH mRNA. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe des Photoprint Photodokumentationssystems und computergestützter densitometrischer Analyse mit Gelscan 5.0 (BioSciTec, Frankfurt).

2.5 Bestimmung von Proliferation und Apoptose

2.5.1 BrdU-Proliferationstest an isolierten Azini

Nach Stimulation frisch isolierter Azini über 12 bzw. 24 Stunden mit TGF- β 1 (5 ng/ml), Activin A (10 ng/ml), Follistatin (10 ng/ml), IL-1 β (5 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) und CCK (1 μ M und 100 pM) wurde die BrdU-Inkorporation als Maß für die DNA-Synthese bestimmt. Der Gebrauch des BrdU-Proliferationstestes erfolgte nach Protokollvorschrift des Herstellers. Bei 5-Brom-2'-desoxy-Uridin (BrdU) handelt es sich um modifiziertes Uridin, das während der DNA-Synthese inkorporiert wird und anschließend durch einen Peroxidase-gekoppelten monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden kann. Der Antikörper reagiert da-

bei in einer enzymatischen Farbreaktion mit Tetramethylbenzidin, welche bei λ 450 nm mit dem EILISA-Reader (2500, Dynatech) gemessen werden kann.

2.5.2 Bestimmung der Apoptoserate an Kryoschnitten

Etwa 5 μ m dicke Kryoschnitte des Gewebes wurden auf Polylysin beschichteten Objektträgern 60 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, in eisgekühltem Aceton für 30 Sekunden fixiert und anschließend in eisgekühltem Fixationspuffer für 90 Minuten nachfixiert. Die Schnitte wurden nachfolgend dreimal mit PBS für je 5 Minuten gewaschen, 30 Minuten in PBS-Natriumborhydrid inkubiert und nochmals mit PBS gewaschen. Zur Markierung der apoptotischen Zellen erfolgte die Markierung freier 3`OH-DNA-Enden mit der Terminalen Deoxynukleotid Transferase (TdT) Methode unter Verwendung von Fluorescein konjugierten Digoxigenin Nukleotiden. Hierzu wurde das ApopTag Kit (Serologicals Corporation) nach Herstellerangaben eingesetzt. Zur Markierung aller Zellkerne wurden die Schnitte nach Markierung der apoptotischen Kerne für 30 Sekunden in DAPI-Puffer inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen, mit Moviol unter Deckgläschen eingebettet und im Dunkeln über Nacht getrocknet. Die Auswertung erfolgte computergestützt mit Cell Explorer 2000 (BioSciTec). Die Apoptoserate wurde als prozentuales Verhältnis der Fluorescein markierten Kernen zu DAPI-positiven Kernen ausgedrückt.

2.5.3 Bestimmung der Proliferationsrate durch PCNA-Markierung an Paraffinschnitten

Zur Markierung des „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) wurde der monoklonale Antikörper mouse-anti-rat PCNA Klon PC10 (Ready-to-use DAKO N-series, DAKO, Köln) eingesetzt. Die Färbung erfolgte analog des in Kapitel 2.6 beschriebenen Protokolls, allerdings wurde auf die Tyramid-Amplifikation verzichtet. Die Quantifizierung erfolgte computergestützt mithilfe des Cell Explorer 2000 (BioSciTec). Die Proliferationsrate wurde als prozentuales Verhältnis der PCNA markierten Kerne zu den DAPI-positiven Kernen ausgedrückt.

2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Paraffinschnitte (2-4 μm) von Rattenpankreasgewebe wurden nach folgendem Protokoll mit Xylen entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert:

- Schnitte für jeweils 5 Minuten in Xylol (100%) geben (2x)
- Schnitte für jeweils 5 Minuten in Ethanol (100%) geben (2x)
- Schnitte 1x für 5 Minuten in Ethanol (70%) geben
- Schnitte bis zum nächsten Schritt in PBS geben

Das Gewebe auf dem Objektträger wurde mit einem DAKO- Pen umrandet und anschließend mit PBS bedeckt. Anschließend wurden die Schnitte mit Aurion BSA (Verdünnung 1:10 in PBS) für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Danach folgte die Inkubation mit dem primären monoklonalen Antikörper anti-Inhibin- βA (Serotec, Clone E4, Verdünnung 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) über Nacht bei 4 °C und am nächsten Morgen für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte zur Inhibition der gewebeeigenen Peroxydaseaktivität für 10 Minuten in eine Lösung aus 50 ml Methanol und 1 ml Wasserstoffperoxid gegeben. Es folgte ein Waschgang mit Aqua dest., anschließend zwei weitere mit PBS. Danach wurden die Schnitte mit einem sekundären peroxidasegekoppeltem Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wiederum mit PBS gewaschen. Es folgte eine zehnminütige Inkubation mit Fluorescein konjugiertem Tyramid (1:50 verdünnt in Amplification Diluent) bei Raumtemperatur. Durch die Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA), erstmals beschrieben 1989 durch Bobrow [77], kann die Antigenmarkierung bis zu 100-fach verstärkt werden. Nach Oxidation durch die Peroxidase binden die aktivierten Tyramin-Moleküle rasch kovalent an die elektronenreichen Aminosäuren der Proteine in der unmittelbaren Umgebung der Antigenmarkierung.

Im Anschluss an die Tyramid-Inkubation wurden die Schnitte wiederum in PBS gewaschen und danach mit DAPI (Verdünnung 1:10.000 in PBS) zur Anfärbung der Zellkerne für 15 Sekunden inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS

wurden die Schnitte unter Vermeidung von Luftbläschen mit Vectashield Mounting Medium for Fluorescence (Vector) vorsichtig eingedeckelt.

3 Ergebnisse

3.1 Apoptose und Proliferation im Verlauf der Pankreatitis

Zur Untersuchung der Regenerationsprozesse im Verlauf einer akuten Pankreatitis wurde die Zellerneuerung im exokrinen Pankreas durch Bestimmung der Apoptose- und Proliferationsrate quantifiziert. Wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, wurde zur Induktion einer Pankreatitis männlichen Wistar-Ratten für 4, 12 bzw. 24 Stunden eine supramaximale Caeruleinkonzentration infundiert (10 µg/kg Körpergewicht pro Stunde); längere Pankreatitisepisoden (48, 96 und 168 Stunden) wurden durch intraperitoneale Injektionen von Caerulein (40µg/kg Körpergewicht zu den Stunden -3 und +3) induziert.

Zu den oben genannten Zeitpunkten wurden die Tiere getötet, das Pankreasgewebe entnommen und als Kryo-Gewebe bzw. in Paraffinblöckchen konserviert. Die Apoptoserate wurde an Kryoschnitten des Gewebes mittels eines TUNEL Assays detektiert. Zeitgleich mit der höchsten Entzündungsaktivität (bis 12 Stunden nach Induktion) wurde eine bis zu viermal höhere Apoptoseaktivität im Vergleich zur basalen Apoptoserate gefunden. Diese liegt bei etwa 0,75% in gesundem, unbehandeltem Pankreasgewebe (Stunde 0; Abbildung 4). Während der Erholungsphase nach akuter Pankreatitis ließ sich bis etwa 7 Tage nach Induktion weiterhin eine leicht erhöhte Apoptoserate von etwa 2% nachweisen.

Im Pankreasgewebe zeigte sich durch Detektion von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ein stetiger Anstieg von einer basalen Proliferationsrate von 0,25% bis auf ein Maximum von etwa 4% 96 Stunden nach Induktion der Pankreatitis. Nach 168 Stunden wurde wieder annähernd die basale Proliferationsrate erreicht (Abbildung 4). Die morphologische Analyse der TUNEL und PCNA gefärbten Schnitte zeigte, dass nach Caerulein-induzierter Pankreatitis Apoptose- und Proliferationsprozesse hauptsächlich in den Azinuszellen nachweisbar waren.

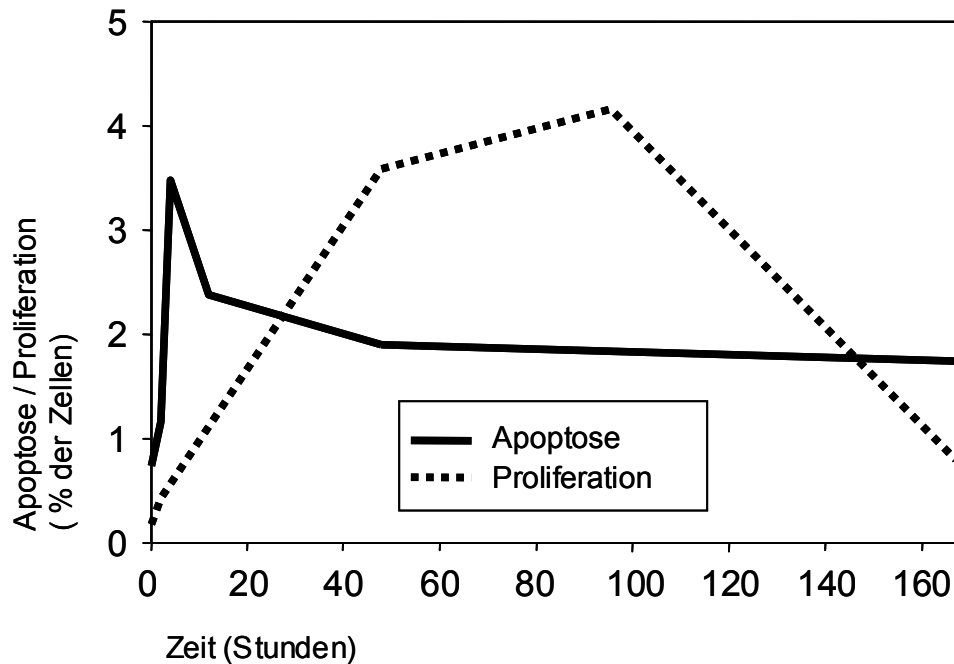


Abbildung 4: Apoptose- und Proliferationsraten im Verlauf einer Caerulein-induzierten Pankreatitis

Zur Bestimmung der Apoptose wurden Gefrierschnitte von Rattenpankreatisgewebe mittels eines TUNEL-Assays gefärbt, zur Bestimmung der Proliferation erfolgte eine PCNA-Färbung. Die Raten wurden als Ratio der im TUNEL-Assay positiven bzw. PCNA-positiven Zellkerne gegen alle (durch DAPI-Markierung sichtbar gemachten) Zellkerne berechnet. Während der frühen Phase der höchsten Entzündungsaktivität bis 12 Stunden nach Beginn der Pankreatitis sieht man eine etwa vierfach erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur basalen Apoptoserate bei unbehandelten Tieren. Die Proliferationsrate steigt im Vergleich dazu langsamer an. Sie erreicht nach 96 Stunden ihren Maximalwert und fällt in den folgenden 72 Stunden wieder nahezu auf Normalwerte ab. Es wurden jeweils mindestens 5000 Zellkerne pro Schnitt gezählt. Die Ergebnisse beruhen auf Versuchen von drei verschiedenen Tieren pro Zeitpunkt.

3.2 RNA-Expressionsanalyse von Faktoren des Activin/Inhibin-Systems und ihrer Rezeptoren während der akuten Pankreatitis

Pankreasgewebe von Caerulein-stimulierten Ratten und Kontrolltieren wurde zur Präparation von RNA benutzt. Die RNA wurde zur weiteren Analyse in c-

DNA umgeschrieben. Danach wurden PCR-Expressionsanalysen sowohl der Inhibin- α und - β Untereinheiten als auch der Activinrezeptoren I und IIB (ActR-I und ActR-IIB) durchgeführt. Die Multiplex PCR mit GAPDH-Primern diente zur internen Kontrolle. Die densitometrischen Analysen der spezifischen PCR-Produkte wurden bezugnehmend auf die Menge an GAPDH korrigiert. Die Analyse der ActR-I und ActR-IIB mRNA Level zeigte einen vorübergehenden Rückgang der Expression zu den Zeitpunkten 4 Stunden und 12 Stunden nach Induktion der Pankreatitis gefolgt von einem leichten Anstieg zu späteren Zeitpunkten (Abbildung 5). Innerhalb des frühen Zeitintervalls (4 bis 12 Stunden) bedingt die intrazelluläre Aktivierung von Zymogengranula eine Gewebsdegradation und Ödembildung kombiniert mit der immunologischen Antwort auf inflammatorische Stimuli. Während dieser Akutphase der Pankreatitis steigt die Expression der Inhibin- β A Untereinheiten bis zu sechsfach mit einem Maximum bei 24 Stunden an und geht in den folgenden 24 Stunden rasch auf nahezu basale Werte zurück. Die Synthese der Inhibin- α Untereinheiten, die einen inhibitorisch wirksamen Liganden der Activin-Familie bilden, wird parallel dazu um etwa 70% reduziert und ist nach 48 Stunden mit einer leicht überschießenden Tendenz wiederhergestellt. Diese Daten deuten an, dass sich während des frühen Verlaufes der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis der Ratte die Zusammensetzung von Inhibin- α und Inhibin- β A Untereinheiten zu Dimeren insofern ändert, als dass vermehrt β A- β A Dimere (Activin A) und weniger α - β A Dimere (Inhibin A) entstehen, während die Expression der Activin-Rezeptoren mRNA nur leicht erhöht ist. Die gezeigten Daten beruhen auf drei repräsentativen Analysen dreier unabhängiger Versuche.

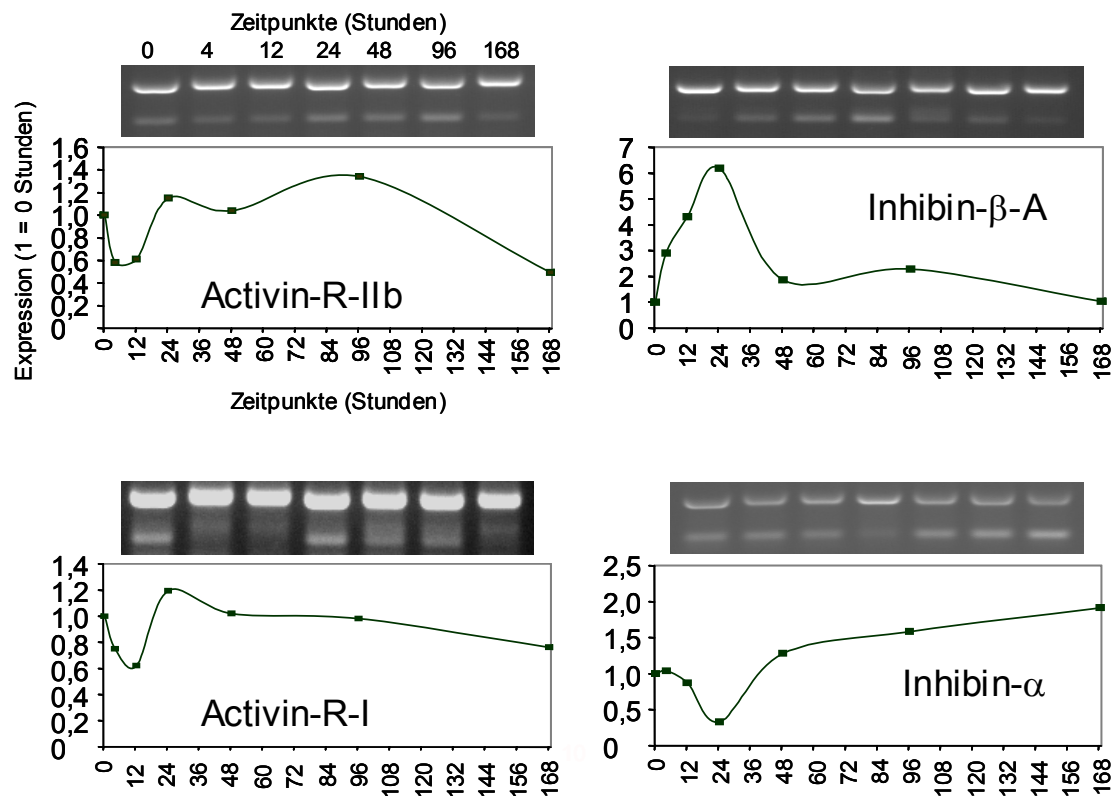


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Inhibin- α , - β A, Act-R I, IIb RNA-Expression im Verlauf der Pankreatitis anhand von RT-PCR-Analysen

RNA wurde aus Pankreasgewebe von Caerulein-infundierten Ratten (0 bis 168 Stunden) und Kontrolltieren präpariert. Die RT-PCR-Reaktion wurde mit spezifischen Primern für Inhibin- α , - β A, Act-R I, IIb sowie GAPDH-Primern als interne Kontrolle durchgeführt. Die jeweils obere Bande zeigt die GAPDH-Expression, die jeweils untere die spezifische Inhibin- α , - β A, ActR-I, und -IIb Expression. Unter den PCR-Banden sind die Expressionsdaten graphisch dargestellt. Die Erläuterung der Expressionsverläufe findet sich im Text.

3.3 Activin und Activin-Rezeptor IIB Expression während der akuten Pankreatitis

Eine Activin A Expression im Rattenpankreas ist unter physiologischen Bedingungen vor allem in den β -Zellen vorbeschrieben [78]. Über eine Änderung der Expression im Verlauf der Pankreatitis ist bisher nichts bekannt. Aus diesem Grunde wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Paraffin-

schnitten von Rattenpankreasgewebe nach Caerulein-induzierter Pankreatitis durchgeführt. Die Färbungen mit einem monoklonalen anti-Inhibin- β A Antikörper zeigten im gesunden Kontrollgewebe eine Expression, die fast ausschließlich auf die β -Zellen der Inseln und auf die Pankreasgangzellen beschränkt war, wohingegen kaum eine Expression in den Azinuszellen zu erkennen war (Abbildung 6A und 7B). Während die spezifische Anfärbung der Inselzellen im Rahmen der akuten Pankreatitis leicht reduziert erscheint (Abbildung 6B), sieht man einen moderaten Anstieg der Inhibin- β A-Expression im exokrinen Pankreasgewebe nach 24 Stunden (Abbildung 7C) und einen starken Anstieg 48 Stunden (Abbildung 6B und 7D) nach Beginn der Caerulein-Applikation. Diese Ergebnisse stehen mit den RT-PCR-Analysen im Einklang und geben Hinweise darauf, dass Azinuszellen während der akuten Pankreatitis transient Activin A synthetisieren.

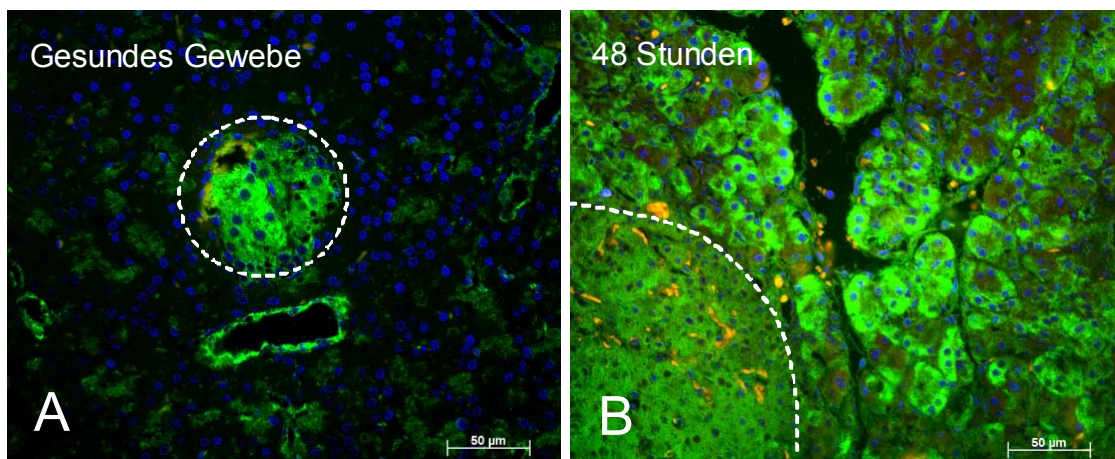


Abbildung 6: Inhibin- β A-Expression in gesundem Rattenpankreasgewebe und 48 Stunden nach Caerulein-induzierter Pankreatitis (400-fache Vergrößerung)

(A) Die Immunfluoreszenzmikroskopie der Paraffinschnitte (gefärbt mit einem monoklonalen Anti-Inhibin- β A-Antikörper) von Kontrolltieren zeigt eine Inhibin- β A-Expression in Inselzellen (umrandet durch die weiße gestrichelte Linie) und Gangzellen, dagegen fast keine Anfärbung der Azinuszellen.

(B) Nach 48 Stunden zeigt sich eine Zunahme der Expression in Azinuszellen, die Expression in den Inselzellen erscheint leicht vermindert.

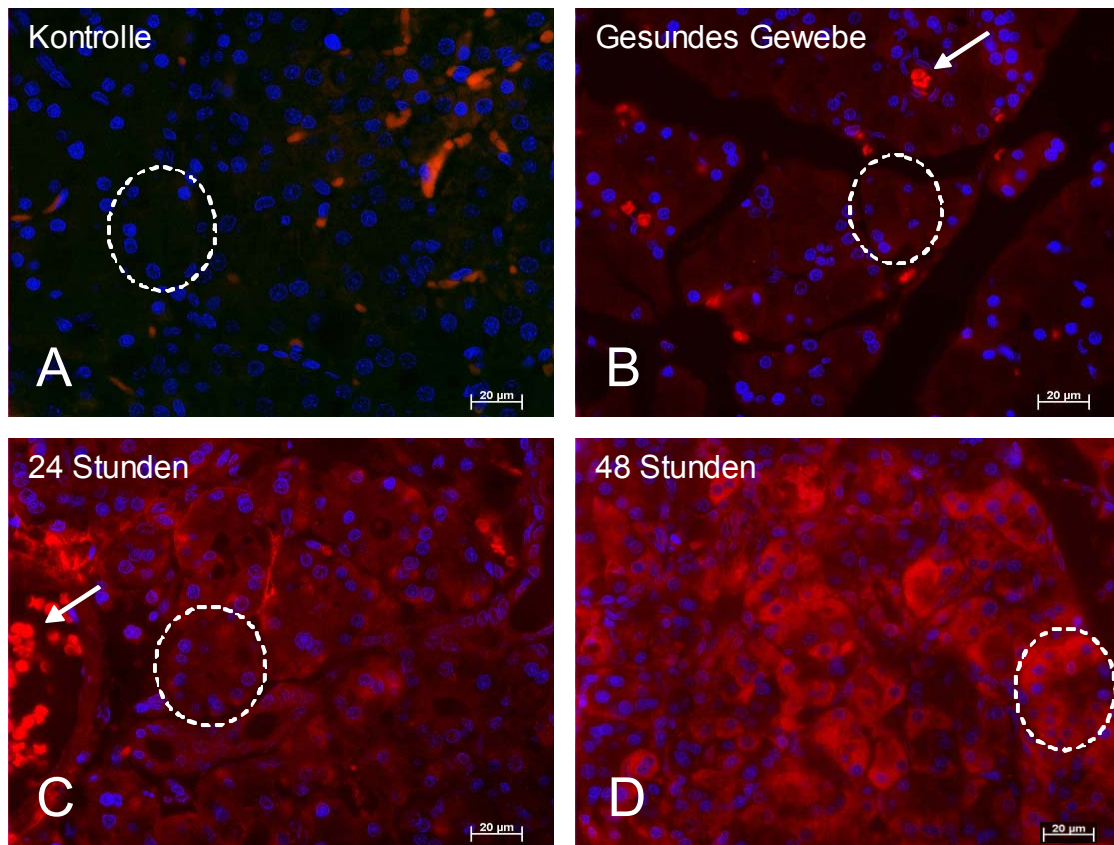


Abbildung 7: Inhibin- β A-Expression in gesundem Rattenpankreasgewebe und 48 Stunden nach Caerulein-induzierter Pankreatitis (630-fache Vergrößerung)

Die Immunfluoreszenz-Abbildungen zeigen in höherer Vergrößerung als Abb. 3 die Expression von Inhibin- β A in exokrinem Rattenpankreasgewebe.

(A) zeigt die Kontrolle. Hier wurde statt des primären monoklonalen anti-Inhibin- β A-Antikörpers Maus-IgG in gleicher Konzentration verwendet.

(B) zeigt gesundes exokrines Rattenpankreasgewebe, in dem fast keine Expression von Inhibin- β A zu erkennen ist.

(C und D) zeigen exokrines Gewebe 24 bzw. 48 Stunden nach Induktion der Pankreatitis, hier sieht man eine Zunahme der Fluoreszenz in den Azinuszellen im Vergleich zum Kontrollgewebe, wobei die Reaktion nach 48 Stunden stärker als nach 24 Stunden ausfällt.

Die weiß gestrichelte Linie umrandet jeweils einen Azinus, die weißen Pfeile zeigen auf Blutgefäße mit unspezifisch fluoreszierenden Erythrozyten.

Die biologische Aktivität von Activin A wird über einen aus zwei Untereinheiten bestehenden transmembranen Rezeptorkomplex vermittelt [40]. Die initiale Bindung erfolgt über die Typ II Rezeptoren (ActR II oder ActR IIB). Da kein für die Immunfluoreszenz geeigneter Antikörper gegen diese Rezeptoren zur Verfü-

gung stand, wurde die Expression des Activin-Rezeptors IIB mittels Western-Blot-Analysen an Pankreas-Homogenat von Caerulein-infundierten Ratten untersucht. Hier zeigte sich eine Induktion der Expression des Activin-Rezeptors IIB 12 und 48 Stunden nach Induktion der Pankreatitis (Abbildung 8). E-Cadherin diente als Kontrolle, da dieses Protein wie vorbeschrieben während der Pankreatitis nicht durch aktivierte intrazelluläre Proteasen degradiert wird [79].

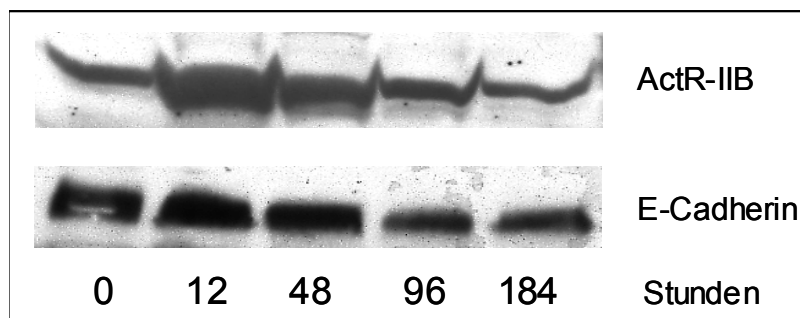


Abbildung 8: Expression des Activin-Rezeptor IIB im Verlauf der Pankreatitis

Die Expression des Activin-Rezeptors Act-R IIB wurde an Gewebe-Lysaten von gesundem Rattenpankreas sowie an Gewebelysaten von Caerulein-infundierten Tieren (zu den Zeitpunkten 12, 48, 96 und 184 Stunden) mittels Western Blot Analyse untersucht. Es wurde ein monoklonaler anti-ActR-IIB-Antikörper verwendet. Man sieht eine konstitutive Expression des Rezeptors mit erhöhter Expression 12 und 48 Stunden nach Beginn der Pankreatitis.

3.4 Activin und Activin-Rezeptor Expression an isolierten Azinuszellen des Pankreas

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie und der Western Blots legen nahe, die mRNA-Synthese der Inhibin Untereinheiten und der Activin-Rezeptoren an isolierten Azinuszellen zu untersuchen, um auf diese Weise nachzuweisen, ob die Expression tatsächlich im exokrinen Pankreasanteil stattfindet. Durch einen Kollagenase-Verdau von Pankreasgewebe lässt sich eine Suspension aus Azini und vereinzelt Azinuszellen herstellen. Es wurden Azi-

nuszellen nach Caerulein-induzierter Pankreatitis zu den Zeitpunkten 12 Stunden, 48 Stunden und 96 Stunden nach Induktion präpariert. Diese isolierten Azini stellen funktionstüchtige sekretorische Einheiten vitaler exokriner Zellen dar. Ihr polarer Phänotyp und ihre an Stimuli gekoppelte Sekretion bleibt nach Präparation für mehrere Stunden erhalten. Aus dieser Zell-Suspension wurde jeweils mRNA präpariert und anschließend wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Vergleichbar mit den Ergebnissen, die in den Analysen des Gesamtpankreashomogenats gefunden wurden, zeigte sich auch hier eine Induktion der Inhibin- β A Expression nach Hyperstimulation mit Caerulein, während die RNA-Synthese des funktionellen Antagonisten Inhibin- α zu den Zeitpunkten 12 und 48 Stunden vermindert war.

Für eine Activin A vermittelte funktionstüchtige Signaltransduktion werden Activinrezeptoren des Typs I und IIB benötigt. Es wurde eine Expression des Activinrezeptors IIB in den Azinuszellen der Kontrolltiere gefunden, in der Phase der akuten Entzündung (12 Stunden nach Induktion) zeigte sich jedoch eine verminderte Expression, die dann in der Proliferationsphase (48 Stunden nach Induktion) wieder zunahm. Die Activinrezeptor I Expression war dagegen, korrelierend zur Activin A Expression, sowohl nach 12 als auch nach 48 Stunden erhöht (Abbildung 9). Die vermehrte Expression sowohl des Liganden als auch des Rezeptors im gleichen Zelltyp 12 bis 48 Stunden nach Induktion der Pankreatitis legt einen möglichen autokrinen Aktivierungsmechanismus nahe.

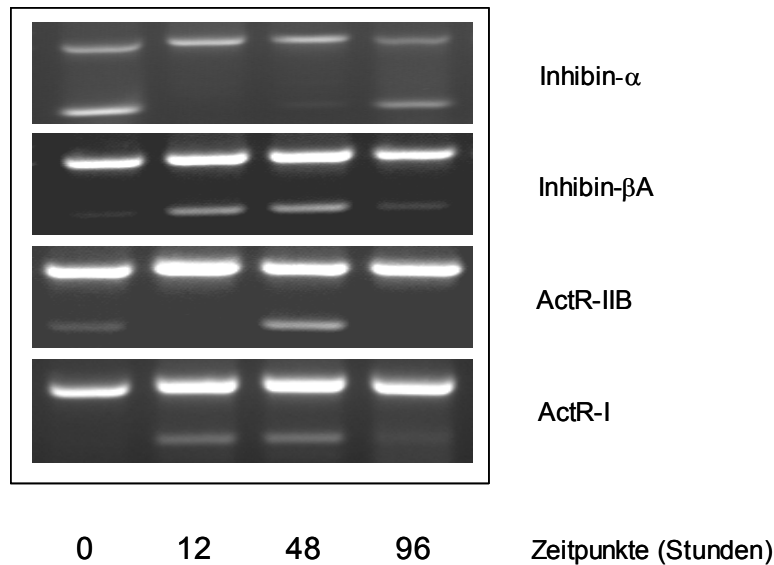


Abbildung 9: Simultane Expression von Activin und Activin-Rezeptoren in isolierten Azinuszellen der Ratte

RNA wurde aus isolierten Azini von Caerulein-infundierten Ratten (12 bis 96 Stunden) und Kontrolltieren präpariert. Die RT-PCR-Reaktion wurde mit spezifischen Primern für Inhibin- α , β A, ActR-I und -IIB sowie GAPDH-Primern als interne Kontrolle durchgeführt. Die jeweils obere Bande zeigt die GAPDH-Expression, die jeweils untere die spezifische Inhibin- α , β A, ActR-I bzw. -IIB Expression. Die Induktion der Inhibin- β A Untereinheiten und die Reduktion der Inhibin- α -mRNA in der Zeit zwischen 12 und 48 Stunden lässt an eine vermehrte Synthese von Activin A auf Kosten einer verminderten Synthese von Inhibin A in den ersten 48 Stunden der Pankreatitis denken. Während die Expression des Activinrezeptors I direkt mit der Expression des Inhibin- β A Untereinheit korreliert, tritt eine Expression des Rezeptors IIB erst nach 48 Stunden wieder auf. Die vermehrte Expression sowohl des Liganden als auch des Rezeptors im gleichen Zelltyp 12 bis 48 Stunden nach Induktion der Pankreatitis belegt eine autokrine Stimulation der Azinuszellen.

3.5 Stimulation der Proliferation von Azini des Rattenpankreas durch Activin A

Eine zeitgleiche Expression von Activin A und Activinrezeptoren in Azini könnte auf einen Mechanismus der autokrinen Stimulation innerhalb der pankreatischen Azinuszellen hindeuten. So könnte Activin A die Proliferation von Azinus-

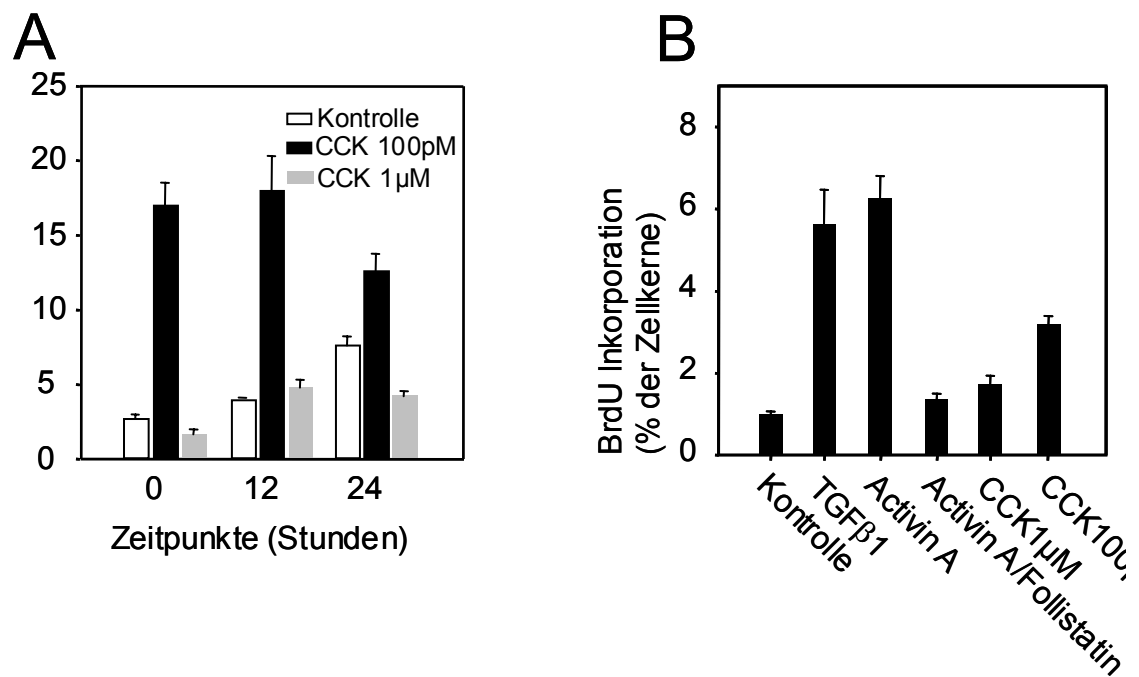
zellen stimulieren. Um diese Hypothese zu untersuchen, kultivierten wir durch Kollagenaseverdau frisch isolierte Rattenazini in Zellkulturmedium bei 37°C. Die Vitalität der Zellen und ihre physiologische Sekretionsleistung, gekoppelt an CCK-Stimulation, wurde durch Messung der Amylasesekretion nach 12 und 24 Stunden *in vitro*-Kultivierung untersucht (Abbildung 10A). Es wird vermutet, dass Azinuszellen etwa 25% ihrer gespeicherten Gesamtamylasemenge nach Stimulation mit physiologischen CCK-Konzentrationen (100pM) freisetzen. Im Gegensatz dazu führt eine Hyperstimulation mit supramaximalen Mengen an CCK (1µM) zur intrazellulären Aktivierung von Zymogenen und verhindert die Amylasesekretion.

Es wurden frisch isolierte Azini für 12 Stunden in Gegenwart von TGF-β1 (5ng/ml), Activin A (10ng/ml) und 1µM oder 100pM CCK inkubiert und die BrdU-Inkorporation als Marker für die DNA-Synthese gemessen (Abbildung 10B). Vergleichbar mit der TGF-β1 Stimulation zeigte die Inkubation mit Activin A eine etwa sechsfach erhöhte DNA-Synthese im Vergleich zu Kontrollen. Durch Zugabe von 10ng/ml Follistatin konnte der proliferative Effekt von Activin A vollständig aufgehoben werden. Die BrdU-Aufnahme war auch in CCK-stimulierten Zellen leicht erhöht: etwa dreifach bei physiologischer und etwa 1,7-fach bei supraphysiologischer Stimulation. Jedoch ist fraglich, ob die CCK-Stimulation (bzw. die Stimulation mit dem CCK-Analogon Caerulein in den *in vivo* Versuchen) für den beobachteten etwa achtfachen Anstieg an PCNA-positiven Zellen im Verlauf der Pankreatitis allein verantwortlich ist. Es erscheint vielmehr wahrscheinlich, dass die Stimulation der Proliferation durch den gezeigten autokrinen Mechanismus hervorgerufen wird.

Eine weitere Frage war, welche Mechanismen als Auslöser für die Aktivierung dieser autokrinen Stimulation verantwortlich sind. Da die Pankreatitis als entzündliche Erkrankung mit Infiltration von Leukozyten und Freisetzung von Zytokinen einhergeht, kamen diese zunächst als mögliche Trigger der Zellregeneration in Frage. Makhija et al. fanden Hinweise darauf, dass eine Reihe von proinflammatorischen Mediatoren in die Entstehung von Gewebeschäden im Pankreas involviert sind [80]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die IL-6 und IL-1β Konzentrationen im Serum von Caerulein infundierten Ratten ansteigen

[81]. Aus diesem Grund wurden diese beiden Interleukine zunächst auch als mögliche Trigger der Induktion der Activin A-Expression in Azinuszellen in Betracht gezogen, es wurde also untersucht, ob die Inkubation von Azinuszellen mit IL-6 und IL-1 β einen Effekt auf die BrdU-Inkorporation hat. Während die DNA-Synthese nach 12 Stunden Inkubation etwa dreifach erhöht war, fand sich nach 24 Stunden ein noch stärkerer Effekt mit einer Erhöhung der Synthese um etwa das fünf- bzw. sechsfache (Abbildung 10C).

Korrelierend mit der erhöhten DNA Synthese konnte jedoch auch die Induktion einer Activin-Expression nachgewiesen werden. Nach 12-stündiger Stimulation von Azinuszellen mit IL-6 bzw. IL-1 β konnte eine etwa sechsfache Erhöhung der Inhibin- β A mRNA-Expression gezeigt werden (Abbildung 10D). Die beiden Zytokine sind also anscheinend in der Lage, einen stimulierenden Effekt auf die DNA-Synthese durch Induktion der Activin A Synthese auszulösen. Dies legt eine zentrale Rolle dieser Zytokine nicht nur in der Funktion als proinflammatorische Mediatoren, sondern auch in der Kontrolle der Regenerationsmechanismen des Pankreas nahe.



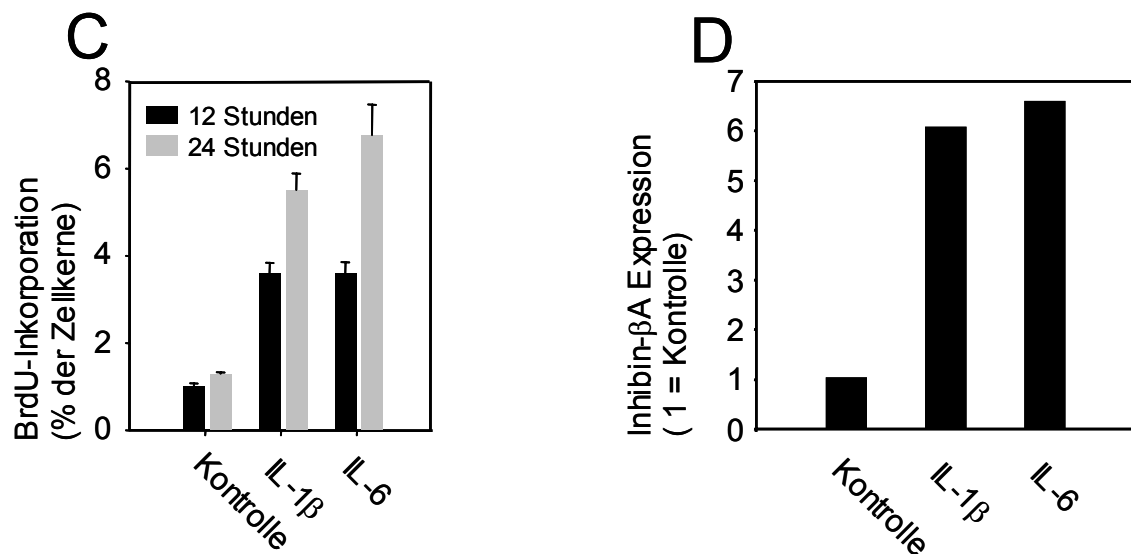


Abbildung 10: Stimulation der Proliferation von Azinuszellen durch Activin und die Interleukine IL-1 β und IL-6

(A) Isolierte Azinuszellen, die in Zellkulturmedium für 12 bzw. 24 Stunden kultiviert wurden, zeigten eine physiologisch normale Amylasesekretion nach Stimulation mit physiologischen CCK-Konzentrationen. Im Bereich der CCK-Hyperstimulation zeigte sich dagegen eine Blockade der Sekretion.

(B) Die Messung der BrdU-Inkorporation 12 Stunden nach Stimulationsbeginn mit TGF- β 1, Activin und CCK deuten daraufhin, dass Activin und TGF- β 1 proliferative Stimuli in Azinuszellen darstellen.

(C) Die 12-stündige Stimulation mit IL-1 β und IL-6 zeigt eine proliferative Aktivität dieser Zytokine an Azinuszellen, die nach weiteren 12 Stunden Inkubation noch weiter ansteigt.

(D) In der RT-PCR-Analyse von mRNA (bzw. cDNA) isolierter Azinuszellen zeigte sich eine erhöhte Expression von Inhibin- β A nach 12-stündiger Inkubation mit IL-1 β und IL-6.

3.6 Blockade der Interleukin-induzierten Azinuszellproliferation durch Follistatin

Um die Hypothese zu prüfen, dass IL-1 β und IL-6 einen autokrinen Activin A Mechanismus induzieren, wurden mit diesen Interleukinen stimulierte isolierte

Pankreaszellen in Gegenwart oder Abwesenheit des Activin-Antagonisten Follistatin inkubiert. Während Follistatin keinen antagonistischen Effekt auf die Kontrollzellen oder die mit TGF- β 1 behandelten Zellen hatte, zeigte sich im Falle von IL-6 eine Verminderung der DNA-Synthese um etwa 46%, im Falle von IL-1 β um etwa 35%. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Activin A an der Stimulation der Proliferation von Azinuszellen durch die Interleukine IL-1 β und IL-6 beteiligt ist (Abbildung 11).

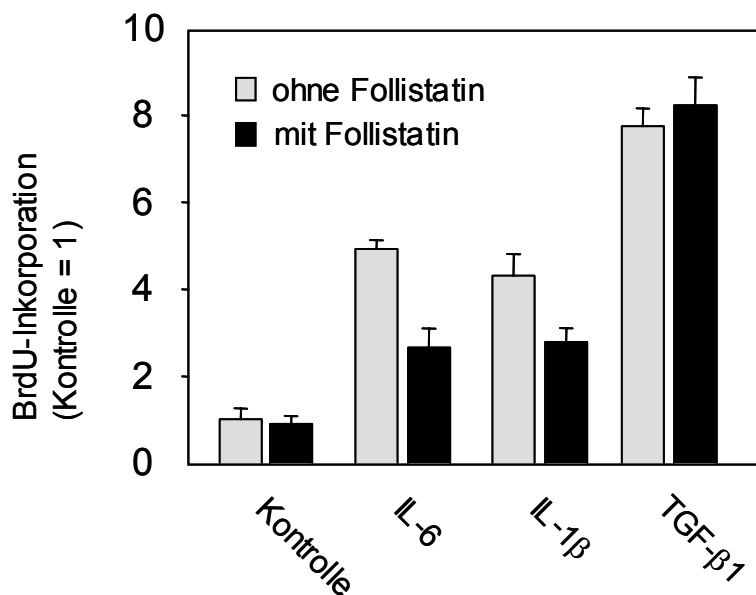


Abbildung 11: Darstellung der BrdU-Inkorporation nach Stimulation von Azinuszellen mit IL-1 β , IL-6 und TGF- β 1 in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Follistatin

Die DNA-Synthese in mit IL-1 β und IL-6 stimulierten Azinuszellen wird durch Follistatin abgeschwächt, während die DNA-Synthese in mit TGF- β 1 stimulierten Zellen von Follistatin nicht beeinflusst wird.

4 Diskussion

Das Activin/Inhibin/Follistatin-System ist ein komplexes regulatorisches System, in welchem Activin Signale, extrazellulär kontrolliert durch Inhibine und Follistatin, verschiedenste zelluläre Funktionen beeinflussen. Das Bild von Activin als gonadalem Hormon, das hauptsächlich in der Entwicklung der Follikel von Bedeutung ist, hat sich erweitert. Es gibt immer mehr Hinweise, dass Activine und Activin-Rezeptoren in einer Reihe von verschiedenen Geweben koexprimiert werden und dort wichtige regulatorische Funktionen in einem großen Spektrum lokaler Prozesse einnehmen [82].

Im Pankreas finden sich hauptsächlich zwei unterschiedliche Zelltypen: endokrine Inselzellen und exokrine Azinuszellen, die beide von der gleichen embryonalen Anlage abstammen [83]. Activin A induziert in Kombination mit Betacellulin die endokrine Differenzierung von fetalen Pankreasepithelzellen [64] und führt in den β -Zellen zu einem Anstieg der PAX4 Genexpression, einem wesentlichen Transkriptionsfaktor bei der Differenzierung von β -Zellen [84]. Diese Ergebnisse belegen eine wichtige Rolle von Activinen in der Organ-Entwicklung des Pankreas.

Die Frage, ob Activine darüber hinaus eine Rolle in der Pathophysiologie und in Regenerationsprozessen des exokrinen Pankreas nach akuter Pankreatitis spielen, ist Gegenstand der hier dargestellten Untersuchungen, denn bis heute ist weitgehend unklar, weshalb die Pankreatitis in manchen Fällen einen milden, selbstlimitierenden Verlauf nimmt und ausheilt, in einigen Fällen jedoch schwerwiegend verläuft und mit Organversagen sowie lokalen Komplikationen (Nekrosen, Abszessen, Pseudozysten) einhergeht.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Activin A im exokrinen Pankreasanteil nach Caerulein-induzierter Pankreatitis der Ratte exprimiert wird. Auch Activin-Rezeptoren konnten auf den Azinuszellen nachgewiesen werden, so dass anscheinend während der Regenerationsphase ein autokriner Stimulations-Mechanismus die Regenerationsvorgänge beschleunigt. Experimente an isolierten Azinuszellen

der Ratte zeigten eine vermehrte DNA-Synthese nach Stimulation mit Activin A. Auch die Inkubation mit den Interleukinen IL-1 β und IL-6 hatte einen aktivierenden Effekt auf die Azinuszell-Proliferation und induzierte die endogene Activin-Expression an isolierten Azinuszellen der Ratte. Dies zeigt eine mögliche Funktion von Interleukinen als Trigger der autokrinen Activin-Stimulation in Azinuszellen.

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse im Einzelnen eingegangen und ihre Bedeutung im Gesamtzusammenhang diskutiert.

4.1 Apoptose und Proliferation während der Pankreatitis

Während der chronischen Pankreatitis kann morphologisch eine erhöhte Apoptoserate in Azinuszellen, jedoch nicht in den Inselzellen beobachtet werden [85]. Dies stimmt mit der klinischen Beobachtung überein, dass die endokrine Funktion noch lange erhalten bleibt und erst im Endstadium der Erkrankung nachlässt [85]. Der relative Schutz der endokrinen Zellen und damit der endokrinen Funktion unterstützt die These, dass die progrediente chronische Pankreatitis zunächst vor allem eine Erkrankung der exokrinen Drüse ist. In dem hier benutzten experimentellen Modell der akuten Pankreatitis der Ratte wurden erhöhte Apoptose- und Proliferationsraten vor allem in den Azinuszellen gefunden. Das lässt vermuten, dass die akute wie auch die chronische Pankreatitis zunächst hauptsächlich Störungen im exokrinen Pankreas hervorruft, was dann mit einem vorübergehenden Anstieg der Azinuszellerneuerung vergesellschaftet ist.

4.2 Activin-Expression im Verlauf der Pankreatitis: Ein autokriner proliferationsfördernder Mechanismus im exokrinen Anteil?

Unter physiologischen Bedingungen wurde in den hier dargestellten Untersuchungen im Rattenpankreas eine Activin A Expression in Inselzellen und in Gangzellen nachgewiesen, dagegen wurde nur eine sehr geringe Expression in Azinuszellen gefunden. Die Synthese von Inhibin- β A Untereinheiten wurde im Rattenpankreas schon in β -Zellen und auch in nicht- β -Zellen beschrieben, im humanen Pankreas in Insulin-positiven β -Zellen [86]. Die Stimulation dieser Pankreasinseln in Zellkultur mit Activin A induziert die Insulin Sekretion in Gegenwart von Glukose. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Activin in den Inselzellen eine Rolle in der Regulation des Glukose-Gleichgewichts spielt [87]. In diesem Kontext könnte die in den Inselzellen (in der Immunfluoreszenz) beobachtete reduzierte Expression 48 Stunden nach Beginn der Pankreatitis bedeuten, dass die Insulin Sekretion zu diesem Zeitpunkt reduziert ist. Dieser Effekt könnte möglicherweise erklären, warum bei Patienten mit Pankreatitis hyperglykämische Stoffwechsellagen entstehen.

Die starke Induktion der Expression von Activin A in den Azinuszellen dagegen erfüllt anscheinend eine ganz andere Funktion: Die Stimulation der Regeneration in Azinuszellen nach Entzündung. Azinuszellen zeigen unter physiologischen Bedingungen eine Expression von Inhibin- α Untereinheiten, die eine residuelle Activin-Produktion durch Heterodimerbildung mit Inhibin- β A im Gleichgewicht halten könnten. Während der akuten ödematösen Pankreatitis der Ratte hingegen führt dann die beobachtete verminderte Bildung von Inhibin- α und der gleichzeitige Anstieg der Synthese von Inhibin- β A Untereinheiten zu einer Verlagerung der Dimer-Bildung von Inhibin weg, zu Activin A. Die Mechanismen, die diese unterschiedliche Produktion von Inhibin- α und - β Untereinheiten regulieren, sind derzeit noch weitgehend unbekannt, jedoch konnten cAMP-responsive-elements (CRE) sowie AP-1/TPA-responsive-elements in der Promoterregion der Inhibin- α und - β Untereinheiten identifiziert werden [88, 89]. Ein

neues, für die transkriptionelle Regulation wichtiges CRE Element innerhalb der Inhibin- β A Promoterregion konnte beschrieben werden [88]. Außerdem werden die Proteine der AP-1-Familie als wichtige Regulatoren in der PKA und PKC-abhängigen Inhibin- β A Genregulation diskutiert [88]. In ovariellen Granulosazellen konnte gezeigt werden, dass der FSH/PKA-Signalweg vor allem die Bildung von α - β Untereinheiten zu Heterodimeren (Inhibinen), der PKC-Signalweg bevorzugt die Bildung von β - β Untereinheiten zu Homodimeren (Activinen) unterstützt [90]. In Stromazellen des Markes konnten Shao et al. zeigen, dass auch die Stimulation mit TNF- α und IL-1 die endogene Activin A Expression steigert, jedoch konnte bisher keine regulatorisch wirksame Promoterregion für diesen Effekt identifiziert werden [91, 92]. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stimulationsversuchen von Azinuszellen mit IL-1 β und IL-6 wurde auch eine erhöhte Expression von endogenem Activin A gefunden, das auf diese Weise anscheinend einen proliferationsfördernden autokrinen Mechanismus stimuliert. Verglichen mit der Activin-Stimulation wurde eine verzögerte proliferative Antwort gemessen, möglicherweise begründet durch einen Mechanismus einer „Doppel-Induktion“: Zuerst eine Interleukin-vermittelte Induktion der Synthese von Inhibin- β -Untereinheiten, anschließend die Stimulation einer autokrinen Activin A Schleife. Eine klinische Relevanz von Activin in entzündlichen Prozessen ist bereits diskutiert worden, muss in ihren Einzelheiten aber noch näher untersucht werden [93-95]. Die Induktion der Expression von Activin wurde bereits in entzündlichen Prozessen beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit T-Zellen oder zeitgleich ausgeschütteten Zytokinen diese Hochregulierung vermittelt [96, 97]. In der Entwicklung des Gewebeschadens bei akuter Pankreatitis konnte für eine Vielzahl entzündlicher Mediatoren eine Beteiligung am Fortschreiten der Erkrankung vom lokalisierten Gewebeschaden bis hin zum SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) gezeigt werden. Vor allem die Interleukine IL-1, IL-6, IL-8, ebenso TNF- α und PAF (Platelet Activating Factor) [80] sind als proinflammatorische Mediatoren identifiziert worden. Für die Myofibroblasten des Pankreasstromas konnte als Antwort auf proinflammatorische Stimuli eine starke IL-6 Ausschüttung gezeigt werden [98]. Außerdem wurde beschrieben, dass IL-6-Knock-out-Mäuse nicht nur eine höhe-

re Mortalitätsrate nach Caerulein-induzierter akuter Pankreatitis aufweisen, sondern auch schwerere Gewebeschäden im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen davontragen [99]. All diese Ergebnisse und auch die Beobachtungen von Zytokin-induzierter Stimulation der Activin-Synthese im Rahmen dieser Arbeit unterstützen die These, dass Zytokine wie IL-1 und IL-6 nicht nur für wichtige proinflammatorische Signale in der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis verantwortlich sind, sondern gleichzeitig auch in der Lage sind, die Induktion der Reparaturvorgänge im betroffenen exokrinen Pankreasgewebe auszulösen.

4.3 Funktion von Follistatin während der Pankreatitis

Follistatin ist in einer Reihe von biologischen Systemen als Gegenspieler von Activinen bekannt [52, 100, 101]. Die Funktion von Follistatin könnte im Rahmen einer Pankreatitis im exokrinen Pankreasgewebe darin bestehen, eine Überstimulation der Proliferation von Azinuszellen durch Activin A zu verhindern. In vielen unterschiedlichen Geweben wird die Expression von Follistatinen durch verschiedene Faktoren, die Activine selbst eingeschlossen, reguliert. Das Activin/Follistatin-System erscheint als ein komplex reguliertes System, das unterschiedliche zelluläre Funktionen kontrolliert. In den verschiedenen biologischen Systemen differieren die Regulationsmechanismen des Activin/Follistatin-Systems deutlich. In der Leber zum Beispiel führt die Gabe von Activin A *in vivo* zur Reduktion der Lebermasse und inhibiert die Hepatozyten Proliferation *in vitro* [102, 103]. Frühere Studien nutzten Follistatin, um den antiproliferativen Effekt von Activin auf die Hepatozyten aufzuheben [104]; zudem konnte durch intravenöse Gabe von Follistatin eine ansteigende DNA-Synthese in der Rattenleber nach (Hemi-)Hepatektomie gezeigt werden [105]. Ähnliche Untersuchungen über die Funktion des Activin/Follistatin-Systems in renalen Tubuluszellen nach Ischämie und Reperfusion zeigten eine erhöhte Activin A Produktion, die zur Steigerung des tubulären Schadens führte und die Proliferation der Tubuluszellen inhibierte [100]. Die intravenöse Gabe von Follistatin steigerte die renale Regeneration durch Blockierung der Funktion des endoge-

nen Activins [106]. In den beiden zuletzt beschriebenen Organen scheint Activin daher den Regenerationsprozess zu verlangsamen. Eine konträre Situation findet sich in der Wundheilung nach einer Hautverletzung. In transgenen, Follistatin überexprimierenden Mäusen wurden schwere Störungen in der Wundheilung gefunden, dagegen sah man in Activin transgenen Mäusen eine beschleunigte Wundheilung und Narbenbildung [52, 107]. Die Anwesenheit von Activin in Wundgewebe scheint für das Ergebnis der Reparaturprozesse und damit für die Heilung fördernd zu sein.

Wie diese gegenteiligen Effekte in den unterschiedlichen Zelltypen ihre Ziele erreichen ist bisher weitgehend unbekannt. An den komplexen Signalwegen sind sicher Rezeptoren wie zum Beispiel die TGF- β -Rezeptoren und auch die „Bone Morphogenic Proteins“ (BMPs) beteiligt, von denen bekannt ist, dass sie an den intrazellulären Smad-Signalkaskaden, durch die die Activin-Signale vermittelt werden, beteiligt sind.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von Activin A im Regenerationsprozess nach Caerulein-induzierter akuter Pankreatitis der Ratte untersucht. Im Verlauf dieser experimentell erzeugten Pankreatitis kommt es zu erhöhten Apoptose- und Proliferationsraten. Nach Stimulation mit Caerulein, einem Cholezystokinin-Analogon, wurde eine erhöhte Expression von Activin A in den Azinuszellen gefunden. Diese sind anscheinend das Ergebnis eines Wechsels von der Inhibin- α Synthese zur Synthese von Inhibin- β A Untereinheiten. Die zeitgleiche Expression von Activinrezeptoren auf den Azinuszellen lässt auf einen autokrinen Stimulationsmechanismus schließen.

Experimente an isolierten Azinuszellen der Ratte zeigten eine vermehrte DNA-Synthese nach Stimulation mit Activin A. Auch die Inkubation mit den Interleukinen IL-1 β und IL-6 hatte einen aktivierenden Effekt auf die Azinuszell-Proliferation und induzierte die endogene Activin-Expression an isolierten Azi-

nuszellen der Ratte. Dies zeigt eine mögliche Funktion von Interleukinen als Trigger der autokrinen Activin-Stimulation in Azinuszellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung des Activin/Follistatin-Systems als lokaler Regulator von Geweberegenerationsvorgängen.

Follistatin scheint eine zusätzliche regulatorische Komponente zu repräsentieren, deren mögliche Funktion darin besteht, eine Überstimulation der proliferativen Antwort zu verhindern und den Prozess im Gleichgewicht zu halten.

Zukünftige Arbeiten können helfen, die Einzelheiten dieses komplexen regulatorischen Systems besser zu verstehen und herauszufinden, inwieweit sich die Ergebnisse auf die humane Pankreatitis übertragen lassen sowie eventuell mögliche Richtungen für therapeutische Interventionen aufzuzeigen.

5 Literaturverzeichnis

1. Assmus, C., et al., *Epidemiology of acute pancreatitis in a defined German population*. *Digestion*, 1996. **57**: p. 217 (abstract).
2. Jaakkola, M. and I. Nordback, *Pancreatitis in Finland between 1970 and 1989*. *Gut*, 1993. **34**(9): p. 1255-60.
3. Lankisch, P.G. and P.A. Banks, *Pancreatitis*. 1997, Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
4. Wilson, C. and C.W. Imrie, *Changing patterns of incidence and mortality from acute pancreatitis in Scotland, 1961-1985*. *Br J Surg*, 1990. **77**(7): p. 731-4.
5. Bradley, E.L., 3rd, *A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992*. *Arch Surg*, 1993. **128**(5): p. 586-90.
6. Bank, S., *Clinical course of acute pancreatitis: what has changed in recent years?*, in *Acute Pancreatitis: Novel Concepts in Biology and Therapy*, M.W. Büchler, Uhl, W., Friess, P., Malfertheiner, P., Editor. 1999, Blackwell Science: Berlin, Vienna. p. 163-169.
7. Steer, M.L., *Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis*, in *The exocrine pancreas. Biology, pathophysiology and diseases*, V.L.W.G.e. al., Editor. 1993, Raven Press: New York. p. 581-591.
8. Kelly, T.R., *Gallstone pancreatitis: the timing of surgery*. *Surgery*, 1980. **88**(3): p. 345-50.

9. Etemad, B. and D.C. Whitcomb, *Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments*. Gastroenterology, 2001. **120**(3): p. 682-707.
10. Whitcomb, D.C., *Early trypsinogen activation in acute pancreatitis*. Gastroenterology, 1999. **116**(3): p. 770-2.
11. Beger, H.G., et al., *Natural course of acute pancreatitis*. World J Surg, 1997. **21**(2): p. 130-5.
12. Muller, M.K. and M. Albrecht, *[Systemic complication of acute pancreatitis. Incidence and pathogenetic possibilities]*. Med Klin (Munich), 1994. **89**(6): p. 324-9.
13. Ranson, J.H., et al., *Objective early identification of severe acute pancreatitis*. Am J Gastroenterol, 1974. **61**(6): p. 443-51.
14. Adler, G. and H. Woehle, *[Diagnosis and therapy of acute pancreatitis]*. Internist (Berl), 2005. **46**(2): p. 131-44.
15. Ranson, J.H., K.M. Rifkind, and J.W. Turner, *Prognostic signs and nonoperative peritoneal lavage in acute pancreatitis*. Surg Gynecol Obstet, 1976. **143**(2): p. 209-19.
16. Imrie, C.W., *Classification of acute pancreatitis and the role of prognostic factors in assessing severity of disease*. Schweiz Med Wochenschr, 1997. **127**(19): p. 798-804.
17. Eatock, F.C., et al., *Nasogastric feeding in severe acute pancreatitis may be practical and safe*. Int J Pancreatol, 2000. **28**(1): p. 23-9.

18. Powell, J.J., et al., *Randomized controlled trial of the effect of early enteral nutrition on markers of the inflammatory response in predicted severe acute pancreatitis*. Br J Surg, 2000. **87**(10): p. 1375-81.
19. Windsor, A.C., et al., *Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute phase response and improves disease severity in acute pancreatitis*. Gut, 1998. **42**(3): p. 431-5.
20. Kalfarentzos, F., et al., *Enteral nutrition is superior to parenteral nutrition in severe acute pancreatitis: results of a randomized prospective trial*. Br J Surg, 1997. **84**(12): p. 1665-9.
21. McClave, S.A., et al., *Comparison of the safety of early enteral vs parenteral nutrition in mild acute pancreatitis*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1997. **21**(1): p. 14-20.
22. Powell, J.J., et al., *Survey of antibiotic prophylaxis in acute pancreatitis in the UK and Ireland*. Br J Surg, 1999. **86**(3): p. 320-2.
23. Mayerle, J., P. Simon, and M.M. Lerch, *Medical treatment of acute pancreatitis*. Gastroenterol Clin North Am, 2004. **33**(4): p. 855-69, viii.
24. Frakes, J.T., *Biliary pancreatitis: a review. Emphasizing appropriate endoscopic intervention*. J Clin Gastroenterol, 1999. **28**(2): p. 97-109.
25. Steer, M.L., *Pathogenesis of acute pancreatitis*. Digestion, 1997. **58** Suppl 1: p. 46-9.
26. Lerch, M.M., et al., *[Role of protease activation in pathophysiology of acute pancreatitis]*. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, 1998. **115**: p. 421-6.

27. Lerch, M.M., et al., *Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells*. *Gastroenterology*, 1992. **103**(1): p. 205-13.
28. Kelly, R.B., *Microtubules, membrane traffic, and cell organization*. *Cell*, 1990. **61**(1): p. 5-7.
29. Jungermann, J., et al., *Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(2 Pt 1): p. G328-38.
30. Prinz, R.A., *Mechanisms of acute pancreatitis. Vascular etiology*. *Int J Pancreatol*, 1991. **9**: p. 31-8.
31. Klar, E., et al., *Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy*. *Br J Surg*, 1990. **77**(11): p. 1205-10.
32. Toyama, M.T., et al., *Ischaemia-reperfusion mechanisms in acute pancreatitis*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1996. **219**: p. 20-3.
33. Rinderknecht, H., *Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation?* *Int J Pancreatol*, 1988. **3**(2-3): p. 105-12.
34. Kingsnorth, A., *Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis*. *Gut*, 1997. **40**(1): p. 1-4.
35. Sweiry, J.H. and G.E. Mann, *Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1996. **219**: p. 10-5.

36. Bhatia, M., et al., *Complement factor C5a exerts an anti-inflammatory effect in acute pancreatitis and associated lung injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G974-8.
37. Ling, N., et al., *Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin*. Nature, 1986. **321**(6072): p. 779-82.
38. Fang, J., et al., *Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **228**(3): p. 669-74.
39. Oda, S., et al., *Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in Xenopus*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **210**(2): p. 581-8.
40. Pangas, S.A. and T.K. Woodruff, *Activin signal transduction pathways*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(8): p. 309-14.
41. Chen, Y.G., et al., *Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin*. Exp Biol Med (Maywood), 2002. **227**(2): p. 75-87.
42. Kawabata, M., et al., *Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **886**: p. 73-82.
43. Mathews, L.S., W.W. Vale, and C.R. Kintner, *Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in Xenopus embryos*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1702-5.
44. Chong, H., et al., *Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system*. Endocrinology, 2000. **141**(7): p. 2600-7.

45. Lewis, K.A., et al., *Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 411-4.
46. Sidis, Y., et al., *Follistatin: essential role for the N-terminal domain in activin binding and neutralization*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17718-26.
47. Shimasaki, S., et al., *Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(4): p. 651-9.
48. Shimonaka, M., et al., *Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit*. Endocrinology, 1991. **128**(6): p. 3313-5.
49. Nakamura, T., et al., *Follistatin, an activin-binding protein, associates with heparan sulfate chains of proteoglycans on follicular granulosa cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19432-7.
50. Nakamura, T., et al., *Activin-binding protein from rat ovary is follistatin*. Science, 1990. **247**(4944): p. 836-8.
51. Merino, R., et al., *Control of digit formation by activin signalling*. Development, 1999. **126**(10): p. 2161-70.
52. Wankell, M., et al., *Impaired wound healing in transgenic mice overexpressing the activin antagonist follistatin in the epidermis*. Embo J, 2001. **20**(19): p. 5361-72.
53. Gallagher, S., H. Sankaran, and J.A. Williams, *Mechanism of scorpion toxin-induced enzyme secretion in rat pancreas*. Gastroenterology, 1981. **80**(5 pt 1): p. 970-3.

54. Bartholomew, C., et al., *Pancreatic response to Tityus trinitatis venom*. West Indian Med J, 1974. **23**(1): p. 41-3.
55. Pantoja, J.L., et al., *Production of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog using venom of the scorpion, Buthus quinquestriatus*. Dig Dis Sci, 1983. **28**(5): p. 429-39.
56. Mouret, J., *Contribution à l' étude des cellules glandulaires (pancreas)*. J Anat Physiol, 1895. **31**: p. 221-236.
57. Adler, G., T. Hupp, and H.F. Kern, *Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat*. Virchows Arch A Pathol Anat Histol, 1979. **382**(1): p. 31-47.
58. Lampel, M. and H.F. Kern, *Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue*. Virchows Arch A Pathol Anat Histol, 1977. **373**(2): p. 97-117.
59. Lerch, M.M., et al., *Luminal endocytosis and intracellular targeting by acinar cells during early biliary pancreatitis in the opossum*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2222-31.
60. O'Konski, M.S. and S.J. Pandol, *Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell*. J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1649-57.
61. Renner, I.G. and J.R. Wisner, Jr., *Ceruletide-induced acute pancreatitis in the dog and its amelioration by exogenous secretin*. Int J Pancreatol, 1986. **1**(1): p. 39-49.

62. Adler, G., Kern, H.F., Scheele, G.A., *Experimental models and concepts in acute pancreatitis*, in *The exocrine pancreas. Biology, pathophysiology and diseases*, V.L. Go, Editor. 1993, Raven Press: New York. p. 407-421.
63. Niederau, C., L.D. Ferrell, and J.H. Grendell, *Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin*. *Gastroenterology*, 1985. **88**(5 Pt 1): p. 1192-204.
64. Demeterco, C., et al., *A role for activin A and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(10): p. 3892-7.
65. Zhang, Y.Q., et al., *Inhibition of activin signaling induces pancreatic epithelial cell expansion and diminishes terminal differentiation of pancreatic beta-cells*. *Diabetes*, 2004. **53**(8): p. 2024-33.
66. Luisi, S., et al., *Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications*. *Eur J Endocrinol*, 2001. **145**(3): p. 225-36.
67. Redinbaugh, M.G., Turley, R.B. , *Adaption of the biochonic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions*. *Anal. Biochem*, 1986. **153**: p. 267-271.
68. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**: p. 680-685.
69. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. **3**: p. 18.49-18.54.

70. Gershoni, J., Palade, G.E., *Protein blotting: principles and applications*. Anal Biochem, 1983. **131**: p. 1-15.
71. Thorpe, G.H., et al., *Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays*. Clin Chem, 1985. **31**(8): p. 1335-41.
72. Duan, R.D. and J.A. Williams, *Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 1): p. G401-8.
73. Williams, J.A., M. Korc, and R.L. Dormer, *Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini*. Am J Physiol, 1978. **235**(5): p. 517-24.
74. Grady, T., et al., *Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 1): p. G1010-7.
75. Saluja, A.K., et al., *Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. G835-42.
76. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
77. Bobrow, M.N., et al., *Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays*. J Immunol Methods, 1989. **125**(1-2): p. 279-85.

78. Ide, M., et al., *Localization of Activin A/EDF in the Normal and Diabetic Rat Pancreas: Immunohistochemical and In Situ Hybridization Studies*. *Endocr Pathol*, 1996. **7**(3): p. 229-236.
79. Briehar, W.M. and B.M. Gumbiner, *Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of Xenopus animal caps*. *J Cell Biol*, 1994. **126**(2): p. 519-27.
80. Makhija, R. and A.N. Kingsnorth, *Cytokine storm in acute pancreatitis*. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2002. **9**(4): p. 401-10.
81. Leser, H.G., et al., *Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 1991. **101**(3): p. 782-5.
82. Welt, C., et al., *Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002. **227**(9): p. 724-52.
83. Edlund, H., *Developmental biology of the pancreas*. *Diabetes*, 2001. **50** **Suppl 1**: p. S5-9.
84. Ueda, Y., *Activin A increases Pax4 gene expression in pancreatic beta cell lines*. *FEBS Lett*, 2000. **480**(2-3): p. 101-5.
85. Bateman, A.C., et al., *Apoptosis and proliferation of acinar and islet cells in chronic pancreatitis: evidence for differential cell loss mediating preservation of islet function*. *Gut*, 2002. **50**(4): p. 542-8.

86. Ogawa, K., et al., *Expression of alpha, beta A and beta B subunits of inhibin or activin and follistatin in rat pancreatic islets*. FEBS Lett, 1993. **319**(3): p. 217-20.
87. Florio, P., et al., *Activin A stimulates insulin secretion in cultured human pancreatic islets*. J Endocrinol Invest, 2000. **23**(4): p. 231-4.
88. Ardekani, A.M., J.C. Romanelli, and K.E. Mayo, *Structure of the rat inhibin and activin betaA-subunit gene and regulation in an ovarian granulosa cell line*. Endocrinology, 1998. **139**(7): p. 3271-9.
89. Pei, L., et al., *Regulation of the alpha inhibin gene by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate after transfection into rat granulosa cells*. Mol Endocrinol, 1991. **5**(4): p. 521-34.
90. Miyanaga, K., et al., *Differential control of activin, inhibin and follistatin proteins in cultured rat granulosa cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **194**(1): p. 253-8.
91. Shao, L.E., et al., *Contrasting effects of inflammatory cytokines and glucocorticoids on the production of activin A in human marrow stromal cells and their implications*. Cytokine, 1998. **10**(3): p. 227-35.
92. Shao, L., et al., *Regulation of production of activin A in human marrow stromal cells and monocytes*. Exp Hematol, 1992. **20**(10): p. 1235-42.
93. Hubner, G., et al., *Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease?* Lab Invest, 1997. **77**(4): p. 311-8.

94. Hubner, G. and S. Werner, *Serum growth factors and proinflammatory cytokines are potent inducers of activin expression in cultured fibroblasts and keratinocytes*. Exp Cell Res, 1996. **228**(1): p. 106-13.
95. Yu, E.W., et al., *Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies*. Clin Exp Immunol, 1998. **112**(1): p. 126-32.
96. Abe, M., et al., *Interleukin-1 beta enhances and interferon-gamma suppresses activin A actions by reciprocally regulating activin A and follistatin secretion from bone marrow stromal fibroblasts*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**(1): p. 64-8.
97. Abe, M., et al., *Potent induction of activin A secretion from monocytes and bone marrow stromal fibroblasts by cognate interaction with activated T cells*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(2): p. 347-52.
98. Shimada, M., et al., *IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 861-8.
99. Cuzzocrea, S., et al., *Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice*. Cytokine, 2002. **18**(5): p. 274-85.
100. Maeshima, A., et al., *Involvement of the activin-follistatin system in tubular regeneration after renal ischemia in rats*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(8): p. 1685-95.
101. Blumenfeld, Z. and M. Ritter, *Inhibin, activin, and follistatin in human fetal pituitary and gonadal physiology*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **943**: p. 34-48.

102. Takabe, K., et al., *Interruption of activin A autocrine regulation by antisense oligodeoxynucleotides accelerates liver tumor cell proliferation*. Endocrinology, 1999. **140**(7): p. 3125-32.
103. Schwall, R.H., et al., *Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro*. Hepatology, 1993. **18**(2): p. 347-56.
104. Yasuda, H., et al., *Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1491-6.
105. Kogure, K., et al., *A single intraportal administration of follistatin accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats*. Gastroenterology, 1995. **108**(4): p. 1136-42.
106. Maeshima, A., Y. Nojima, and I. Kojima, *The role of the activin-follistatin system in the developmental and regeneration processes of the kidney*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(4): p. 289-98.
107. Munz, B., et al., *Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair*. Embo J, 1999. **18**(19): p. 5205-15.

6 Danksagung

Am Ende dieses -zugegebenermaßen etwas längeren- Weges zum Dokortitel gilt es vielen Menschen zu danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Markus M. Lerch für die Überlassung des Themas und besonders für seine Unterstützung und Anleitung auf dem Gebiet der Immunfluoreszenzmikroskopie, die dazu beigetragen haben, dass diese Methode eindeutig zu meiner „Lieblingsmethode“ avancierte.

Prof. Dr. Hubert L. Serve und PD Dr. Carsten Müller-Tidow für ihren Einsatz und ihre Hilfe, meine Promotion zu einem guten Ende zu bringen.

Dr. Ullrich Weiß, Dr. Julia Mayerle und Dr. Jürgen Schnekenburger für ihre kompetente Betreuung, ihre Geduld, interessante Abende auch außerhalb des Labors und dafür, dass sie mein Interesse an Wissenschaft und Forschung geweckt haben.

Den vielen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für ihre Unterstützung, fachliche Anleitung, die gute Zusammenarbeit und das -meist-harmonische Arbeitsklima.

Dr. Annika Kramer, mit deren Hilfe diese Arbeit erst Gestalt und Format angenommen hat.

Meinem „Soester“ Freundeskreis, insbesondere Ursula Balkenhol, für zahlreiche schöne Abwechslungen außerhalb der Klinik, aber auch Motivationshilfe zur passenden Zeit.

Und natürlich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Oma für ihre andauernde Unterstützung, ihr Verständnis und ihr Interesse an meiner Arbeit: Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

7 Lebenslauf

Uta Brunenberg
Weseler Str. 23
48151 Münster

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 18.09.1974
Geburtsort: Lippstadt

Schulbildung:

1981 bis 1985 Petri-Grundschule, Soest
1985 bis 1994 Aldegrever-Gymnasium, Soest, Abschluss: Abitur

Freiwilliges soziales Jahr:

1994 bis 1995 Dreifaltigkeitshospital, Lippstadt

Medizinische Ausbildung:

1995 bis 1996 Ausbildung zur Rettungssanitäterin an der Rettungsschule des DRK, Münster

04/1996 bis 10/ 2002 Studium der Humanmedizin an der WWU Münster

03/1998 Ärztliche Vorprüfung

03/1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

09/2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2001 bis 09/2002 Praktisches Jahr (am Universitätsklinikum Münster und am Kantonspital Winterthur, Schweiz)

10/2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

seit 04/2003 Ärztin im Praktikum / Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik und Poliklinik A des Universitätsklinikums Münster, Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster, 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn
Prof. Dr. med. M. M. Lerch
Medizinische Klinik und Poliklinik
Innere Medizin B der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 29/2000)

11. Mai 2000

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 23.02.2000, hier eingegangen am
16.03.2000

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Lerch,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

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.

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Prof. Dr. med. M. M. Lerch
Medizinische Klinik und
Poliklinik B der
Westf. Wilhelms-Universität
Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

Herr
Dr. med. Stefan Turi
Medizinische Klinik und
Poliklinik B der
Westf. Wilhelms-Universität
Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1, 5, 6, 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2, 10, 11, 14, 21, 64 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum 31. 05. 2003.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

218 Mäuse und
654 Ratten.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

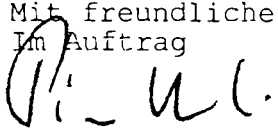
Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag


Dr. Piontkowski