

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Domschke

**"Mechanismen der  
Radikalentstehung  
in AR42J-Zellen"**

Dissertation zur Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Keiner, Iris

aus Berlin

2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. T. Kucharzik

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Lerch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.09.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Domschke  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. T. Kucharzik  
Koreferent: Prof. Dr. med. M. Lerch

### **ZUSAMMENFASSUNG**

"Mechanismen der Radikalentstehung in AR42J-Zellen"

Keiner, Iris

Die Pathomechanismen der intrazellulären Signaltransduktion in der akuten, humanen Pankreatitis sind in vielen Punkten noch unklar. Die akute experimentelle Pankreatitis zeichnet sich durch einen Anstieg oxidativer Vorgänge („oxidative burst“) aus.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der CCK-induzierten Radikalentstehung anhand einer Zellkultur zu untersuchen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen unterschiedliche Orte der Radikalproduktion in der Signaltransduktion der AR42J-Zelle auf.

Nachdem CCK an seinen Rezeptor gebunden hat, kommt es zur Gi-unabhängigen PKA-Aktivierung. PKA führt zu einer Aktivierung der PLC  $\beta$ . Das entstehende InsP3 erhöht die cytoplasmatische Kalzium-Konzentration durch Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dieses führt neben der Aktivierung von Trypsin zur Entstehung von Radikalen.

Die Atmungskette des Mitochondriums liefert die Hälfte der entstandenen Radikale. Nach Hemmung der mitochondrialen Radikalproduktion zusammen mit der Radikalproduktion durch Kalzium wird die CCK-induzierte Radikalentstehung vollends unterbunden.

In Abwesenheit von NO-Radikalen kommt es zu einer erhöhten Produktion freier Sauerstoffradikale, was für einen protektiven Effekt von NO spricht. Umgekehrt konnte jedoch lediglich im immunhistochemischen Bild ein protektiver Effekt von NO-Donoren gezeigt werden.

Immunhistochemisch konnte auch nachgewiesen werden, dass es nach CCK-Stimulation zur DNA-Oxidation kommt.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Bombesin ähnliche Effekte auf die Radikalentstehung hat wie CCK. Dass Bombesin jedoch nicht, wie CCK, zur Trypsinaktivierung führt, spricht für eine trypsinunabhängige Radikalentstehung.

Die Ergebnisse liefern Erklärungsansätze zur Radikalentstehung. In weitergehenden Arbeiten muß untersucht werden, welche Proteine durch Radikale modifiziert werden. Außerdem muß gezeigt werden, ob die Signaltransduktion der AR42J-Zelle auf isolierte Pankreasazinuszellen übertragbar ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 01.09.2005

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das Pankreas .....	1
1.1.1	Das exokrine Pankreas .....	1
1.1.2	Die Azinuszelle.....	2
1.2.	Die exokrine Pankreassekretion .....	2
1.2.1	Cholecystokinin (CCK).....	2
1.2.2	Cholezystokininrezeptoren.....	3
1.2.3	Die Mechanismen der Signaltransduktion .....	4
1.3.	Die Pankreatitis.....	5
1.3.1	Die akute Pankreatitis .....	5
1.3.2	Pathogenese und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis .....	6
1.3.3	Die Rolle von Kalzium in der Pankreatitis .....	7
1.4	Bedeutung und Funktion von freien Radikalen .....	9
1.4.1	Herkunft von ROS in der Zelle .....	10
1.4.2	Zelluläre Reparaturmechanismen .....	10
1.4.3	Auswirkungen von oxidativem Stress auf das exokrine Pankreas .....	11
1.5	Zellkulturmodell.....	13
1.6	CCK-induzierte Signaltransduktion in AR42J-Zellen.....	14
1.6.1	Der partielle Agonist an CCK-Rezeptoren: JMV-180 .....	14
1.6.2	EGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen .....	14
1.6.3	G-Proteine.....	15
1.6.4	Phospholipase C .....	15
1.6.5	Proteinkinasen .....	16
1.6.5.1	SRC-Kinasen.....	16
1.6.5.2	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen .....	16
1.6.5.3	MAP-Kinasen.....	17
1.6.5.4	Proteinkinase A .....	17
1.6.5.5	Proteinkinase C .....	17
1.7	Interaktionen zwischen NO-Radikalen und ROS .....	18
1.8	Aufgabenstellung.....	19

<b>2.</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>21</b>
2.1	Bezugsquellennachweis .....	21
2.1.1	Geräte und Software .....	21
2.1.2	Chemikalien .....	22
2.1.3	Inhibitoren.....	22
2.1.4	Donatoren.....	23
2.1.5	Fluoreszenzfarbstoffe .....	24
2.2	Medien und Puffer.....	25
2.2.1	Zellkulturmedien.....	25
2.2.2	Stammlösungen und Puffer.....	26
2.3	Zelllinien und Antikörper .....	26
2.3.1	Zelllinie.....	26
2.3.2	Antikörper.....	26
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.1.1	Zellkultur.....	27
3.1.2	Kulturbedingungen .....	27
3.1.3	Einfrieren der Zellen:.....	27
3.1.4	Auftauen der Zellen:.....	28
3.1.5	Medienwechsel und Teilung der AR42J-Zellen.....	28
3.1.6	Aussäen auf 96-Loch-Platten .....	28
3.1.7	Differenzierung der Zellen .....	29
3.2	Quantifizierung der Radikalproduktion .....	29
3.2.1	Messung der Radikalentstehung nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin .....	29
3.2.2	Messung der Radikalentstehung nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin 10-6M unter Zugabe von Inhibitoren .....	30
3.3	Calciummessungen.....	31
3.4	NO-Messungen .....	32
3.5	Auswertung in SIGMAPLOT 4.0 2001.....	33
3.6	Immunhistochemische Detektion .....	33
3.6.1	Einzel-Immunomarkierung .....	33
3.6.2	Mikroskopie und Bildbearbeitung .....	34

4.	Ergebnisse .....	35
4.1	Radikalentstehung nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin .....	35
4.2	Radikalentstehung nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin unter Ausschaltung des Mitochondriums .....	36
4.3	Radikalentstehung in mit Dexamethason differenzierten AR42J-Zellen nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin .....	38
4.4	Oxidative DNA-Schädigung nach CCK-Stimulation .....	39
4.5	Der Radikalfänger N-Acetylcystein senkt die CCK-induzierte Radikalentstehung um 100% .....	41
4.6	Signalwege der CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen .....	42
4.6.1	JMV-180, ein partieller Agonist an CCK-Rezeptoren .....	42
4.6.2	CCK vermittelte, EGF induzierte Radikalentstehung in AR42J-Zellen	43
4.6.3	Die Funktion von G-Proteinen bei der CCK-induzierten Radikalenstehung in AR42J-Zellen .....	45
4.6.4	Die Funktion der Phospholipase C in der CCK-induzierten Radikalenstehung in AR42J-Zellen .....	47
4.6.5	Die Funktion von Tyrosinkinase bei der CCK-induzierten Radikalent- stehung in AR42J-Zellen .....	48
4.6.6	Eine Kombination der Src-Kinasen-Inhibitoren PP-2 und Genistein mit Natriumazid führt nicht zu einer Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung um 100% .....	50
4.6.7	Die Funktion von PI-3-Kinasen bei der Radikalentstehung in AR42J-Zellen .....	51
4.6.8	Die Funktion von MAPK-Kinasen bei der Radikalentstehung in AR42J-Zellen .....	52
4.6.9	Die Funktion von Proteinkinase A in der CCK-induzierten Radikalenstehung in AR42J-Zellen .....	54
4.6.10	Die Funktion der Proteinkinase C in der CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen .....	55
4.7	Kalzium führt zur Freisetzung reaktiver Sauerstoff Spezies .....	57
4.8	Sauerstoffradikale führen nicht zum $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle .....	60

4.9	Der Ca <sup>2+</sup> -Chelator Bapta, AM führt unter Ausschaltung der mitochondrialen Radikalproduktion zu einer Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung um 100% .....	61
4.10	Interaktionen zwischen Stickoxid-Radikalen und Sauerstoffradikalen .....	62
4.10.1	Immunhistochemische Darstellung von NOS I und NOS III in der AR42J-Zelle .....	63
4.10.2	Nach Stimulation der AR42J-Zellen mit CCK und Wasserstoffperoxid entstehen keine Stickoxidradikale .....	64
4.10.3	NOS-Inhibitoren führen zu einem leichten Anstieg von Sauerstoffradikalen .....	65
4.10.4	Der NOS-Donor SNAP führt in einer Messung mit DCF nicht zu einer Reduzierung der Sauerstoffradikale .....	67
4.10.5	Immunhistochemische Darstellung des Rückganges der DNA-Oxidation durch den NO-Donor SNAP .....	68
5.	Diskussion.....	69
6.	Literaturverzeichnis .....	78
7.	Abkürzungen.....	96
8.	Lebenslauf .....	97
9.	Danksagung .....	98



# **1. Einleitung**

Die vorliegende Arbeit soll die Signaltransduktion der CCK-induzierten Radikalentstehung in der AR42J-Zelle untersuchen. Im Folgenden soll neben anatomischen und zellphysiologischen Grundlagen des exokrinen Pankreas zunächst auf bereits erforschte, physiologische Mechanismen der CCK-induzierten Signaltransduktion eingegangen werden. Im Weiteren folgen dann Pathomechanismen in der akuten humanen sowie der akuten experimentellen Pankreatitis.

## **1.1 Das Pankreas**

### **1.1.1 Das exokrine Pankreas**

Die exokrine Azinuszelle des Pankreas ist ein Modellfall für Zellen mit hoher Eiweißsynthese und Sekretion. Durch ihre polare Struktur mit einem basolateralen und einem luminalen Anteil eignet sie sich ideal zur Erforschung grundlegender Sekretionsmechanismen (Palade 1975). Das exokrine Pankreas ist eine Drüse, die aus vielen Tausend, schon makroskopisch sichtbaren Läppchen besteht. Die morphologischen und funktionellen Grundeinheiten in diesen Läppchen bilden die Drüsenendstücke (Azini), die über dünne Röhren (Schaltstücke) an die innerhalb der Läppchen (intralobulär) und im Bindegewebe zwischen den Läppchen (interlobulär) verlaufenden Gänge angeschlossen sind. Jeder dieser Strukturkomponenten wird eine spezifische Funktion zugeordnet, die koordiniert reguliert wird und in ihrer Gesamtheit das Pankreassekret bildet. Dieses besteht hauptsächlich aus im Pankreas inaktiv vorliegenden Vorstufen der Verdauungsenzyme, die im Dünndarm durch das Enzym Enterokinase aktiviert werden (Rinderknecht 1986). Innerhalb des exokrinen Pankreas tragen die verschiedenen Zelltypen zur physiologischen Funktion des Organs bei (Slack 1995). Zu diesen Zellen gehören die sogenannten exokrinen Zellen, auch Pankreas-Azinuszellen genannt, die große Mengen exkretorischen Proteins produzieren und freisetzen, interazinäre Zellen, die für das Recycling der Zymogengranula-Membran an der luminalen Oberfläche der azinären Zellen verantwortlich sind sowie Gangzellen, die die exkretorischen Gänge auskleiden und die Bikarbonat- und Wassersekretion übernehmen (Freedman and Scheele 1994), sowie Fibroblasten und Endothelzellen. Von den hier beschriebenen Zellen machen die Pankreas-Azinuszellen mehr als 85 % des Pankreas Gewebes aus (Lerch 1993). Sie sind auch die am stärksten polarisierten Zellen des Pankreas.

### **1.1.2 Die Azinuszelle**

Die Länge der pyramidenförmig gebauten Azinuszellen beträgt vom apikalen zum basalen Zellpol etwa 12 – 15 µm. Die mit Mikrovilli besetzte apikale Membran begrenzt das Azinulumen. Gegenüber benachbarten Zellen erfolgt ein Abschluß durch Tight junctions. Die Organellen der Azinuszelle weisen eine deutlich polarisierte Verteilung auf. Das Zytoplasma unterhalb und seitlich vom Zellkern ist angefüllt mit den dicht gepackten Profilen des rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER), während der Golgi-Apparat und die Sekretgranula das apikale Zytoplasma ausfüllen. Der Golgi-Apparat erscheint in Schnitten als hufeisenförmige Struktur, die aus abgeflachten membranbegrenzten Zisternen besteht, in deren Umgebung sich zahlreiche Vesikel und verschiedene Reifungsstadien von Sekretgranula befinden. Im Verlauf ihrer Reifung konzentrieren die Sekretgranula ihren Inhalt und bewegen sich in Richtung des apikalen Zellpols. Unmittelbar am apikalen Zellpol werden reife Zymogengranula in unstimulierten Zellen in großer Zahl und dicht gepackt gefunden (Anderson KL et al. 1995).

## **1.2 Die exokrine Pankreassekretion**

Das am häufigsten verwendete Versuchstier zur Untersuchung der Pankreassekretion ist die Ratte. Auf den Azinuszellen dieser Tiere finden sich eine ganze Reihe von Rezeptoren, die die Sekretion von Verdauungsenzymen stimulieren können. Unter anderen gehören hierzu auch die Cholezystokinin-Rezeptoren.

### **1.2.1 Cholecystokinin (CCK)**

Das zuerst entdeckte Cholecystokinin umfaßt 33 Aminosäuren (CCK-33) (Mutt and Jorpes 1968). Das C-terminale Pentapeptid Gly-Trp-Met-Asp-Phe des Cholecystokinins ist dabei strukturidentisch mit dem entsprechenden Abschnitt des Gastrins (Gregory, Tracy et al. 1969). Später wurden weitere Molekularformen des Cholecystokinins mit unterschiedlicher Anzahl von Aminosäuren isoliert (Walsh 1994) (Mutt 1980) (Eysselein, Reeve et al. 1982). Alle Molekularformen enthalten als biologisch aktiven Teil das C-terminale CCK-Oktapeptid (CCK-8). Mit Hilfe immunzytochemischer Methoden konnte gezeigt werden, daß CCK zum größten Teil in endokrinen Zellen der intestinalen Mukosa, den sogenannten I-Zellen,

synthetisiert und in den Blutkreislauf freigesetzt wird (Buffa, Solcia et al. 1976). Neben dieser endokrinen Funktion als gastrointestinales Hormon wurden klein- und großmolekulare Formen von CCK außerdem in Nervenfasern der glatten Muskulatur des Dünndarms sowie im Pankreas nachgewiesen, wo CCK die Funktion eines Neurotransmitters bzw.

Neuromodulators hat (Mutt 1980) (Walsh 1994).

CCK gehört zusammen mit Gastrin zu den Hauptvertretern der „Gastrin-Cholecystokin-Peptidfamilie“. Die CCK-spezifische biologische Aktivität beruht auf der Sulfatierung eines Tyrosinrestes unmittelbar N-terminal zu einer Pentapeptid-Sequenz.

Als biologischer Effekt zur Quantifizierung von CCK wurde die Amylasefreisetzung aus isolierten Pankreasazini der Ratte benutzt (Bruzzone, Halban et al. 1985).

Die Freisetzung von CCK erfolgt unter der Kontrolle einer negativen Feedback-Regulation. In den Ratten wird die CCK-Freisetzung durch eine Reduktion der intraduodenalen Trypsinkonzentration stark stimuliert und bildet so einen wichtigen Bestandteil der Feedback-Regulation der exokrinen Pankreassekretion (Funakoshi, Miyasaka et al. 1988, Green and Lyman 1972, Owyang, Louie et al. 1986). Beim Menschen scheint jedoch die Feedback-Hemmung der CCK-Freisetzung im wesentlichen nicht über die intraduodenale Trypsinkonzentration gesteuert zu werden (Jansen and Lamers 1983; Nagai, Henrich et al. 1989).

Als Antwort auf einen physiologischen Cholezystokin-Stimulus kommt es an der apikalen Membran der Azinuszelle zu Fusions- und Fissionsvorgängen, in deren Verlauf der Inhalt der reifen Zymogengranula in das Lumen der Azinuszelle abgegeben wird. Von hier fließt er gelöst in Wasser und Bikarbonat aus interazinären- und Gangzellen in den Pankreasgang und von dort schließlich ins Duodenum, wo die endgültige Aktivierung durch Enterokinase erfolgt (Kay and Kassell 1971).

### **1.2.2 Cholezystokinrezeptoren**

Pharmakologisch lassen sich zwei Klassen von CCK-Rezeptoren unterscheiden (Adler 1991). CCK-A-Rezeptoren sind auf der Pankreasazinus-Zelle, den Insel-Zellen, glatten Muskelzellen der Gallenblase und verschiedenen neuronalen und muskulären Zellen im Gastrointestinaltrakt sowie in umschriebenen Gehirnbereichen lokalisiert. Diese Rezeptoren weisen einen hochaffinen und einen niedrigaffinen Rezeptorstatus und die typische Struktur eines G-Protein-gekoppelten membranständigen Rezeptors auf. Ob auch die humane

Pankreasazinus-Zelle CCK-A Rezeptoren exprimiert, ist derzeit noch umstritten (Silvente Poirot, Hadjiivanova et al. 1993).

CCK-B-Rezeptoren (brain-type) befinden sich überwiegend in verschiedenen Gehirnarealen (Wank, Harkins et al. 1992).

### 1.2.3 Die Mechanismen der Signaltransduktion

Es gibt 2 Mechanismen, durch die ein chemisches Signal wie das eines Hormons oder Neurotransmitters einen biologischen Effekt in der Zelle verursacht. Das erste System der Signaltransduktion agiert durch intrazelluläre Rezeptoren, die im Zytosol oder Kern lokalisiert sind. Der zweite Mechanismus wird durch einen Liganden, der an einen Rezeptor der Plasmamembran bindet, initiiert. Der Zelloberflächen-Rezeptor reagiert auf einen spezifischen Liganden durch eine Konformationsänderung, die das transmembranäre Signal auslöst. Die Signaltransduktion in der Pankreasazinuszelle reagiert durch diesen zweiten Mechanismus auf CCK. Muscarinerge Rezeptoren haben 7-Transmembran-Rezeptor-Domänen und einen großen cytoplasmatischen Anteil zwischen der fünften und sechsten Domäne. Bei Binden von CCK oder Acetylcholin an den Rezeptor kommt es zu Veränderungen in zytoplasmatischen Regionen, die an G-Proteine gekoppelt sind. Eine Stimulation mit Cholezystokinin führt klassischerweise zu einer Inositol-Triphosphat (IP<sub>3</sub>)- und kalziumabhängigen Stimulation. Cholezystokinin bindet dabei zunächst an einen Rezeptor der basolateralen Membran. Vermittelt durch ein G-Protein kommt es zu einer Aktivierung der membrangebundenen Phospholipase-C. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol in IP<sub>3</sub> und Diacylglycerol (Berridge and Irvine 1989). IP<sub>3</sub> bewirkt eine rasche Freisetzung von Kalzium aus im ER lokalisierten Speichern (Streb, Irvine et al. 1983). Diacylglycerol aktiviert Proteinkinase-C. Dieses Enzym und das freigesetzte Kalzium vermitteln die Fusion und Verschmelzung von Zymogengranula mit der luminalen Zellmembran und somit die Sekretion von Verdauungsenzymen (Gardner, Costenbader et al. 1979; Ederveen, Van Emst-De Vries et al. 1990; Matozaki, Zhu et al. 1991). Die CCK-B-Rezeptor-vermittelte PLC  $\beta$ -Aktivierung wird dabei nicht durch Pertussis-Toxin inhibiert, was eine Aktivierung über ein G<sub>q</sub>-gekoppeltes G-Protein nahelegt (Matzotaki et al. 1988). Die durch cAMP aktivierte Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert spezifische Serylreste einer Reihe von Proteinen ( Löffler 1997). Auch eine Stimulation der PKA kann die PLC  $\beta$  aktivieren, so dass diese ein Kalzium-Signal generiert (Piiper et al. 2000). Diese Antwort könnte durch sequentielle Aktivierung von G<sub>s</sub> und G<sub>i</sub>, mit Hilfe der PKA, vermittelt werden

(Luo et al. 1999) Ferner scheint auch eine PLA<sub>2</sub>-Aktivierung bei der Induktion von Ca<sup>2+</sup> - Oszillationen, welche nachfolgend die Amylasesekretion regulieren, involviert zu sein (Tyunada Y, Owyang C 1993). Somit aktiviert der CCK-B-Rezeptor zwei unterschiedliche Signalwege durch Kopplung an zwei verschiedene G-Proteine (Pommier et al. 1999). Nachdem CCK an einen der CCK-Rezeptoren bindet, läßt sich in den Azinuszellen des Pankreas auch eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine beobachten (Seufferlein et al. 1995). Desweiteren läßt sich die zeit- und dosisabhängige Aktivierung von MAP-Kinase und p74 raf-1 Kinase nachweisen, die unabhängig von einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) erfolgt. Ein mitogenes Potential von CCK konnte in CHO-Zellen detektiert werden, die entweder mit CCK-A- oder CCK-B-Rezeptoren transfiziert wurden. In beiden Zelllinien führt die Stimulation mit CCK-8 zur Aktivierung von p44 MAPK und p42 MAPK (Lutz et al. 1997). CCK kontrolliert somit verschiedene zelluläre Funktionen. Im exokrinen Pankreas ist zum einen der G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionsmechanismus durch die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung eng mit der Regulation der Sekretion ('high affinity receptor') und der Entstehung der experimentellen Pankreatitis ('low affinity receptor') verknüpft. Zum anderen spielt CCK eine wichtige Rolle als Mitogen für Azinuszellen und ist entscheidend an der Organregeneration nach einer Pankreatitis beteiligt (Jurkowska et al. 1992). Das letztere Ereignis ist unabhängig von der G-Protein-gekoppelten Funktion des CCK-Rezeptors und steht vermutlich in Zusammenhang mit der Aktivierung von Tyrosinkinase. Untersuchungen zum 'cross-talk' zwischen dem CCK-Rezeptor und der Tyrosinkinase-vermittelten Signaltransduktion sind deshalb von großer pathophysiologischer Relevanz.

Ob die an Ratten nachgewiesenen Sekretionsmechanismen auch für den Menschen eine Rolle spielen, ist bislang ungeklärt.

## **1.3 Die Pankreatitis**

### **1.3.1 Die akute Pankreatitis**

Die akute Pankreatitis wurde 1984 auf dem Symposium von Marseille als akutes Geschehen definiert, welches typischerweise mit abdominalen Schmerzen und einer Erhöhung der Pankreasenzyme in Blut und Urin sowie Entzündungserscheinungen des Organs einhergeht (Singer, Gyr et al. 1985). Diese rein klinische Definition spiegelt bereits die Grenzen wieder,

die dem Kliniker die Diagnose der Erkrankung und das Verständnis der molekularen und zellulären pathophysiologischen Mechanismen erschweren.

Die akute Schädigung des Pankreas vollzieht sich so schnell, daß die initiiierenden Faktoren bereits abgebaut sind bevor eine Diagnose und ein therapeutisches Eingreifen eingeleitet worden sind.

Die Pathogenese der akuten Pankreatitis ist daher bisher in vielen Punkten unklar. Als wesentlicher Pathomechanismus der akuten Pankreatitis aber gilt die vorzeitige intrapancreane Aktivierung proteolytischer Enzyme. Aber auch diese Annahme ist bisher nicht zweifelsfrei bewiesen (Chiari 1896).

Zu den wichtigsten Ursachen der akuten humanen Pankreatitis zählen Alkohol und Gallenwegserkrankungen (Saluja, Saluja et al. 1986). Je nach Patientengut läßt sich bei bis zu 30 % der Pankreatitiden keine Ursache eruieren. 90 % der akuten Pankreatitiden verlaufen ödematös. In diesen Fällen liegt die Letalität bei 1 %. Die verbleibenden 10 % akuter Pankreatitiden zeigen einen hämorrhagisch nekrotisierenden Verlauf mit einer Letalität von 10-50 %. Eine ödematöse Pankreatitis kann dabei mehr oder weniger rasch in eine nekrotisierende Form übergehen (Isenmann, Buchler et al. 1993).

### **1.3.2 Pathogenese und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis**

Das Pankreas sezerniert mehr als 20 verschiedene Verdauungsenzyme in den Darm und verfügt über eine 13-fach höhere Proteinsyntheseleistung als Leber und retikuloendotheliales System zusammen. Alle Proenzyme werden dabei von Trypsin aktiviert. Eine Autodigestion wird durch verschiedene natürliche Mechanismen verhindert:

Physiologischerweise besitzt das Pankreas verschiedene Mechanismen zum Schutz vor Selbstverdauung. Die membranverdauenden Enzyme werden nur als inaktive Vorstufen synthetisiert; ihre Aktivierung erfolgt erst im Duodenallumen. Die Enzyme in der Azinuszelle werden im Zytoplasma segregiert und in den Zymogengranula zwischengespeichert, so daß auch versehentlich vorzeitig aktivierte Proteasen vom Zytoplasma getrennt bleiben. Darüber hinaus bildet die Azinuszelle selbst auch eine Reihe von Proteaseinhibitoren, die parallel mit den Enzymen sezerniert werden und versehentlich vorzeitig aktivierte Enzyme unverzüglich inaktivieren. Diese natürlichen Mechanismen des Pankreas zum Schutz vor Selbstverdauung werden bei der Entstehung der akuten Pankreatitis außer Kraft gesetzt.

Ausgehend von den hier erwähnten Schutzmechanismen des Pankreas im Hinblick auf einen Organ-Selbstverdau muss eine vorzeitige intrapancreane Aktivierung der Proenzyme als

Schlüsselmechanismus für die Pathogenese der akuten Pankreatitis betrachtet werden (Trapnell 1981; Grant 1986).

Verschiedene Untersuchungen mittels unterschiedlicher Pankreatitis-Modelle haben gezeigt, daß eine Blockierung der sekretagogstimulierten Pankreasenzymsekretion eine Bedeutung im Rahmen der Pathogenese der Pankreatitis hat. Die Hyperstimulation mit Cerulein führt zum Zerfall von Mikrofilamenten und Mikrotubuli (O'Konski and Pandol 1990; Jungermann, Lerch et al. 1995).

Im Rahmen der akuten Pankreatitis entstehen große intrazelluläre Vakuolen, in denen lysosomale- und inaktive Verdauungsenzyme kolokalisiert sind (Niederau and Grendell 1988). Innerhalb dieser Vakuolen aktiviert das lysosomale Enzym Cathepsin-B das Trypsinogen. Diese Aktivierung könnte als Ursprung einer kaskadenartigen Aktivierung weiterer Digestionsenzyme angesehen werden. Nach Ansicht der diese Hypothese unterstützenden Forscher liegt der Ursprung der Pankreatitis in der Pankreas-Azinuszelle selbst (Trapnell 1981; Rinderknecht 1986; Halangk, Lerch et al. 2000).

Zu berücksichtigen bleibt bei dieser Theorie, daß es auch physiologischerweise in einem gewissen Ausmaß zu Kolokalisationen zwischen Lysosomen und Verdauungsenzymen in Vesikeln kommt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Pankreas-Azinuszelle nicht in der Lage ist, die von ihr synthetisierten Enzyme vollständig richtig zu sortieren. Trotz der geringgradigen Fehlsortierung tritt aber physiologischerweise keine Pankreatitis auf (Tooze, Hollinshead et al. 1991; Kukor, Mayerle et al. 2002).

### **1.3.3 Die Rolle von Kalzium in der Pankreatitis**

Intrazelluläres Kalzium spielt eine fundamentale Rolle bei der Regulierung von zahlreichen Enzymaktivitäten und bei der Vermittlung von Hormoneffekten und Wachstumsfaktoren, die eine große Vielfalt an zellulären Prozessen, wie die Muskelkontraktion, Metabolismus, Zell-Differenzierung und Sekretion kontrollieren. Veränderungen der intrazellulären Kalzium-Homöostase ist ein frühes Ereignis in der Entwicklung irreversibler Zellschädigung.

Intrazelluläre Kalzium-Konzentrationen werden auf einem sehr niedrigen Level gehalten.

Diese niedrigen intrazellulären Kalzium-Level (von ~ 100nM) erfordern nicht nur die aktive Beibehaltung eines 10.000-fachen Kalzium-Gradienten an der Plasmamembran, sondern sind auch eine Voraussetzung für die intrazelluläre Signaleigenschaft von Kalzium (Carafoli et al. 1987). Wenn Cholezystokinin an einen Rezeptor der basolateralen Membran gebunden hat, kommt es, vermittelt durch ein G-Protein, zu einer Aktivierung der membrangebundenen

Phospholipase-C. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol in IP<sub>3</sub> und Diacylglycerol (Berridge and Irvine 1989). Die bereits beschriebene Signalkaskade führt zur Sekretion von Verdauungsenzymen (Gardner, Costenbader et al. 1979; Ederveen, Van Emst-De Vries et al. 1990; Matozaki, Zhu et al. 1991). Weiterhin kommt es durch Kalzium zur Aktivierung von Ionenkanälen, wie den Cl<sup>-</sup>-Kanälen an der apikalen Plasmamembran, was zur Acetylcholin (Ach) oder CCK-induzierten Enzym- und Chlorid-reichen Sekretproduktion führt (Park et al. 2001). Abnormale Erhöhungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration sind an dem Zellschaden in vielen Zellen durch eine Vielzahl von Mechanismen maßgeblich beteiligt (Nicotera et al. 1992). Im experimentellen Ratten-Modell zeigte sich, daß erhöhte Serum-Kalzium-Konzentrationen zu einer Steigerung des Serum-Amylase-Levels und des TAP ("tryptinogen-activation-peptide")-Levels im Gewebe, sowie zu morphologischen Zeichen einer Verletzung von Pankreasgewebe führte (Mithofer et al. 1995). In einer anderen Studie wurde an isolierten Pankreasazinus-Zellen der Ratte nachgewiesen, daß sich die intrazelluläre Trypsinogen Aktivierung nach Cerulein oder Carbachol-Stimulation in Anwesenheit von erhöhten Kalzium-Konzentrationen im Puffer verdoppelt (Frick et al. 1997). Auf zellulärem Level sind anhaltende Erhöhungen von azinären intrazellulären Kalzium-Konzentrationen mit Veränderungen in der akuten Pankreatitis assoziiert. Diese erhöhten Kalzium-Konzentrationen können durch ductale Hypertension, Alkohol, Hypoxie, Hyperkalzämie, Hyperlipidämie und verschiedene Drogen bedingt sein (Ward et al. 1995). Diese Beobachtungen führten Ward et al. zu der Annahme, daß erhöhte Konzentrationen von intraazinären, cytosolischen freien Kalzium-Ionen der Auslöser für eine akute Pankreatitis sein könnte (Ward et al. 1995). Weiterhin wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Radikalen und Kalzium untersucht. Die Toxizität von Sauerstoffradikalen könnte ebenfalls durch einen bleibenden Anstieg von Kalzium vermittelt werden. Nach Exposition von Hepatozyten durch das Prooxidant Menandione kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration, die Kalziumveränderungen werden von einer DNA-Fragmentierung und Trypan-Blau-Aufnahme gefolgt (McConkey et al. 1988). Es wurde in Zellsuspensionen gezeigt, dass Sauerstoffradikale einen Anstieg an intrazellulärem Kalzium verursachen (Mirabelli et al. 1989; Nicotera et al. 1988). Weiterhin wurde festgestellt, dass Radikale Kalzium aus Thapsigargin-insensitiven, Ryanodin-sensitiven Speichern freisetzen, wogegen Cerulein, ein CCK-Analogon, in physiologischen Konzentrationen Kalzium vor allem aus Thapsigargin-sensitiven-Speichern freisetzt. (Niederau et al. 1999 ; Klonokowski-Stumpe et al. 1997). Thapsigargin hemmt die aktive Kalziumpumpe des sarko- und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), wodurch es zu einem rapiden Anstieg der



zytosolischen Kalziumkonzentration kommt. Ryanodin schließt den sarkoplasmatischen Ausflusskanal (Feher et al. 1998). Im Gegensatz zu den CCK-Effekten kommt es nach Radikal-induzierten Kalzium-Veränderungen nicht zur luminalen Protein-Sekretion, sondern zum Zelltod (Klonokowski-Stumpe et al. 1997). Radikal-induzierte Kalzium-Oszillationen haben eine niedrigere Frequenz, aber eine ähnliche Amplitude, verglichen mit Cerulein-induzierten Oszillationen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ausmaß, die Herkunft und die Dauer des intrazellulären Kalziumanstieges, sowie die Frequenz der Kalziumoszillationen die Antwort der Azinuszelle auf ein Signal bestimmen. Relativ niedrige und durchgehende Anstiege an intrazellulärem Kalzium mit einer hochfrequenten Oszillation können der Zelle Sekretion signalisieren, während anhaltende Kalzium-Anstiege und niedrigfrequente Oszillationen mit Zellschäden assoziiert sind. Außerdem wird durch den Typ des intrazellulären Speichers, aus dem Kalzium freigesetzt wird, bestimmt, ob die Zelle sezerniert oder stirbt. (Klonokowski-Stumpe et al. 1997).

#### **1.4 Bedeutung und Funktion von freien Radikalen**

„Radikale“ sind atomare oder molekulare Spezies, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in der äußeren Hülle besitzen. Daraus resultiert ihre hohe Reaktivität. „Frei“ bedeutet, dass ein Radikal auch in chemisch freier Form existieren kann.

Es gibt verschiedene biologisch aktive reaktive Sauerstoffspezies, wie das Superoxid-Radikal ( $O_2^-$ ), das bei vielen Autooxidationsreaktionen gebildet wird und Perohydroxyl ( $HO_2$ ), die protonierte Form von  $O_2^-$ . Zwei-Elektronenreduktionen führen zum Wasserstoffsuperoxid ( $H_2O_2$ ) und meist metallkatalysierte Drei-Elektronenreduktionen führen zum Hydroxyl-Radikal ( $HO$ ). Weiterhin gibt es das R-Oxyl-Radikal ( $RO$ ) und das R-Dioxyl-Radikal ( $ROO$ ), beide sind organische Radikale, die z.B. als Alkoxyradikal bei der Lipidoxidation gebildet werden, sowie das R-Hydroperoxid ( $ROOH$ ), welches die protonierte Form von Dioxyradikalen darstellt (Löffler 1997). Radikale vermögen andere Moleküle durch Entzug eines Elektrons oxidativ zu schädigen. DNA-Veränderungen, Proteinmodifikationen und Kettenbrüche in ungesättigten Fettsäuren können die Folge sein. Da biologische Membranen einen hohen Lipidgehalt aufweisen, bewirken derartige Kettenbrüche u. U.

Permeabilitätsveränderungen und Zellschädigungen (Halliwell B. 1991; Sies H. 1991; Sies H. 1997). Weiterhin haben Radikale aber auch eine wichtige Aufgabe als Mediatoren in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, z.B. Apoptose, Alterungsprozesse, kardiovaskuläre Erkrankungen, Gehirndysfunktionen, Entzündungen und

Krebs (Halliwell et al. 1989). Eine pathogenetische Bedeutung solcher radikalbedingter oder radikalvermittelter Zellschädigungen wird für eine Reihe von Krankheiten diskutiert.

#### **1.4.1 Herkunft von ROS in der Zelle**

Die Bildung von ROS findet im Rahmen des enzymgebundenen Elektronentransports statt, der in allen biologischen Systemen einen wichtigen, natürlichen Prozess darstellt. Die meisten Proteine, die den Elektronentransfer katalysieren, sind aus mehreren redoxaktiven Kofaktoren zusammengesetzt (Sharp und Chapman, 1999). Bisher existieren verschiedene Auffassungen darüber, welche Redoxproteine für die ROS-Produktion im Zusammenhang mit der O<sub>2</sub> Sensitivität in der Zelle verantwortlich sind. Neben einigen extra-mitochondrialen Enzymsystemen, darunter die NAD(P)H-Oxidase (Jones et al., 1996; López-Barneo et al., 2001), die Xanthin-Oxidase und das Cytochrom P-450 (Jones et al. 1996), stellt insbesondere die mitochondriale Atmungskette (Chandel et al. 1998; López-Barneo et al. 2001) einen Entstehungsort für ROS dar. Bei Elektronenübertragungsprozessen in der Atmungskette des Mitochondriums entstehen freie Sauerstoff-Radikale. Auch in der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation (Fettsäureoxidation) entsteht H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei einer durch die peroxisomale Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysierten Reaktion. Das entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird durch eine entsprechende peroxisomale Katalase eliminiert (Löffler 1997). Es ist allerdings noch ungeklärt, welches dieser Systeme in Pankreasazinuszellen für den CCK-induzierten ROS-Anstieg mit second-messenger-Funktion verantwortlich ist.

#### **1.4.2 Zelluläre Reparaturmechanismen**

Freie Sauerstoffradikale werden normalerweise durch endogene enzymatische und nicht-enzymatische Systeme und Radikalfänger neutralisiert. Prinzipiell erfolgt die Abwehr auf drei Ebenen: durch Verhinderung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Prävention), durch Verhinderung ihrer Wirkung und schließlich durch Beseitigung und Reparatur der Schäden (Löffler 1997). Die Entstehung vieler reaktiver Sauerstoffspezies verläuft metallkatalysiert. Ungeachtet dieser Tatsache entstehen bei einer Vielzahl durch Metalloenzyme katalysierter sauerstoffabhängiger Reaktionen keine hochreaktiven Sauerstoffradikale. Ein Beispiel hierfür ist die Cytochromoxidase. Offenbar verhindert der spezifische Aufbau des aktiven Zentrums dieser Enzyme im Sinne der Prävention das Entstehen schädigender Sauerstoffspezies. Ein weiterer Aspekt der Prävention liegt darin, dass es eine große Zahl enzymatischer Systeme

gibt, die die Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies niedrig halten. Hierzu gehört beispielsweise die Gruppe der Glutathion-S-Transferasen. Sie katalysieren die Bildung von Thioethern aus Glutathion und reaktiven elektrophilen Verbindungen, beispielsweise Chinonen. Diese sind nicht mehr imstande, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden, sondern werden über entsprechende Transportsysteme in den extrazellulären Raum transportiert (Löffler 1997). Antioxidantien im engeren Sinn inaktivieren reaktive Sauerstoffspezies. Unter den nichtenzymatischen Antioxidantien spielt das alpha-Tocopherol (Vitamin E) eine besondere Rolle. Es ist gut lipidlöslich und vermag die Lipidperoxidationskette zu unterbrechen (Löffler 1997; Sies H 1993). Die Bedeutung der antioxidativen Vitamine in der Verteidigung gegen oxidativen Streß wurde bereits in der kardiovaskulären Physiologie untersucht (Lehr et al. 1994; Ting et al. 1996; Keaney et al. 1996). Es gibt aber nur begrenzt Hinweise darauf, dass antioxidative Vitamine eine Zerstörung des Pankreas in einer Pankreatitis lindern können (Nonaka et al. 1991; Sweiry et al. 1996). Eukaryote Zellen enthalten darüber hinaus sehr effektive enzymatische Systeme zur Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies. Zu ihnen gehören die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase. Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Reaktion von  $O_2^-$  zu Hydrogen Peroxid.  $H_2O_2$  kann das extrem zerstörerische Hydroxyl Radikal (HO) generieren. Daher ist die Regulation des  $H_2O_2$ -Levels durch die Katalase und Glutathion-Peroxidase von großer Bedeutung. Die antioxidative Aktivität der Glutathion-Peroxidase ist an die Oxidation von reduziertem Glutathion (GSH) gebunden. Dieses kann ständig durch die Glutathion-Reduktase reduziert werden (Halliwell B. 1991; Sies H. 1991; Sies H. 1997). GSH ist ein intrazelluläres Schlüssel-Antioxidant und daher auch in das Recycling der Antioxidanzien Vitamin C (Ascorbinsäure), E (alpha-Tocopherol) und beta-Karotin in ihre reduzierte Form involviert. Dadurch wird das reduzierende Milieu in der Zelle beibehalten (Meister A. 1994). Von großer Bedeutung sind schließlich die Reparaturvorgänge, die oxidativ geschädigte Moleküle entfernen und ersetzen. Am wirkungsvollsten sind die Enzyme der DNA-Reparatur, sowie die lipolytischen Enzyme, die dem Ersatz von Membranlipiden dienen (Lu AL et al. 2001).

### **1.4.3 Auswirkungen von oxidativem Stress auf das exokrine Pankreas**

Akute experimentelle Pankreatitis zeichnet sich durch einen rapiden Anstieg oxidativer Vorgänge („oxidative burst“) aus, der mit der Entwicklung eines interstitiellen Ödems und der Aktivierung von Verdauungsenzymen innerhalb der Azinuszellen assoziiert ist. Trotz der

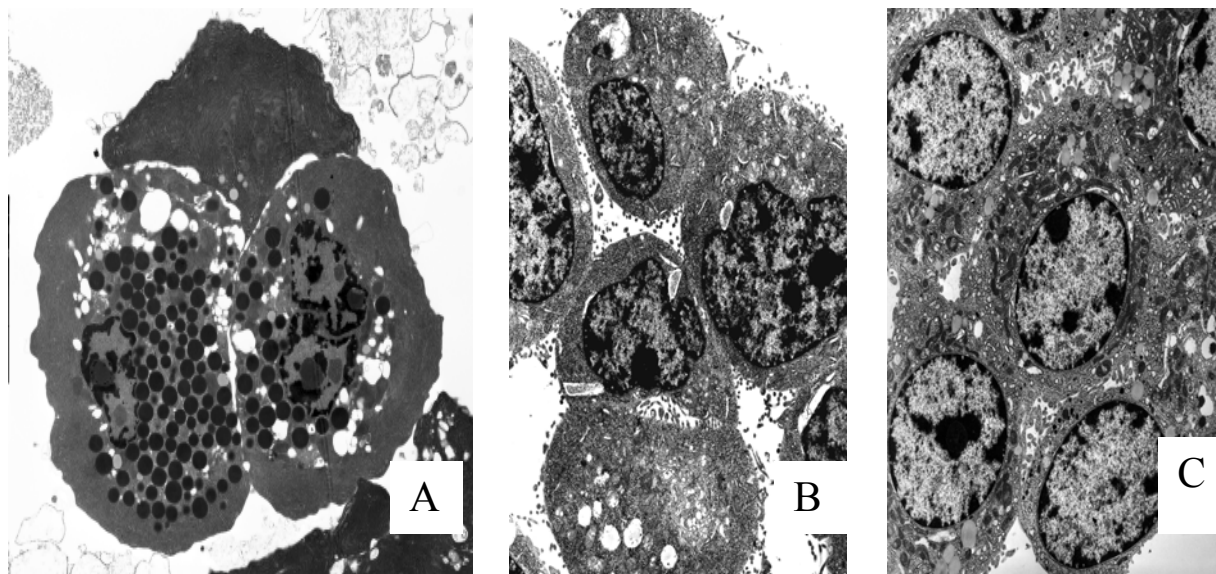
Beobachtung, daß Radikalfänger den Verlauf einer akuten Pankreatitis mildern, ist die Herkunft der reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) und ihre pathophysiologische Funktion weitgehend unbekannt.

Bei einigen Formen der akuten Pankreatitis wird eine pathogenetische Bedeutung von Ischämie-Reperfusionen-Mechanismen diskutiert. (Yamaguchi et al. 1990).

Zur Rolle freier Radikale in der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis wurden in den letzten Jahren zahlreiche Arbeiten publiziert ( Sanfey et al. 1985; Koiwai et al. 1989; Schoenberg et al. 1992, 1994; Dabrowski et al. 1990, 1992; Nonaka et al. 1990; Sweiry et al. 1992; Neuschwander-Tetri et al. 1992; Niederau et al. 1992; Suzuki et al. 1993; Nordback et al. 1993; Furakawa et al. 1994; Closa et al. 1994; Schulz et al. 1994; Braganza et al. 1995; Kikuchi et al. 1997). Aus ihnen geht hervor, dass eine erhöhte Radikalaktivität sowohl im Tiermodell wie auch bei der klinischen Erkrankung nachgewiesen werden kann. Radikale schädigen Biomoleküle in vielfacher Weise. In der DNA können entweder die Desoxyribose oder die verschiedenen Basen modifiziert werden. Oxidative Modifikationen der Desoxyribosen führen zu Strangbrüchen, oxidativer Abbau der verschiedenen Basen zu deren Zerstörung oder Modifikation, so daß Fehlpaarungen die Folge sind. Besonders häufige Basenmodifikationen sind Thymindimerisierungen oder die Entstehung von 8-Hydroxydeoxy-Guanosinresten in der DNA (Hamada et al. 2001) . Diese führen zur Basenpaarung mit Adenin und sind damit mutagen. In Proteinen sind besonders Methionin-, Histidin-, und Tryptophanreste, daneben aber auch die Thiolgruppen von Cysteinen empfindlich gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies. Derartige Reaktionen können beachtliche Veränderungen der biologischen Aktivität der betreffenden Proteine nach sich ziehen. Über die Schädigung von Kohlenhydraten durch oxidativen Streß ist noch nicht sehr viel bekannt. Immerhin weiß man, daß Hyaluronsäure und Proteoglykane oxidativ geschädigt werden können. Besonders gut untersucht ist die Auswirkung auf Lipide, besonders Membranlipide. Hier sind es speziell die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in einer Reihe von charakteristischen, als Lipidperoxidation bezeichneten Reaktionen modifiziert werden (Schoenberg et al. 1989). Es wurden verschiedene Antioxidantien und Radikalfänger beschrieben, die die experimentell induzierten biochemischen Veränderungen wie auch den morphologischen Schweregrad der Erkrankung günstig beeinflussen (Wisner et al. 1988). Da Radikalfänger und Antioxidantien das Ödem und die Entzündung nur marginal beeinflussen und zu vernachlässigenden Einfluss auf die Serum Amylase haben, wird angenommen, dass Antioxidantien nur ein begrenztes Potential in der Behandlung der akuten Pankreatitis besitzen (Schoenberg et al. 1990).

## 1.5 Zellkulturmodell

Für die Versuche wurden adhärenente Rattenpankreas-Azinus-Tumorzellen der Zelllinie AR42J gewählt. Sie wurden aus einem chemisch induziertem pankreatisch-azinärem Karzinom der Ratte isoliert (Jessop et al. 1980). Diese Zelllinie wächst als Monolayer und produziert Amylase und andere exokrine Enzyme nach CCK-Stimulation (Logsdon CD 1986). AR42 J Zellen repräsentieren die erste amphikrine pankreatische Zelllinie, die exokrine und neuroendokrine sekretorische Organellen exprimiert (Rosewicz et al. 1992) und sie besitzen CCK<sub>A</sub> und CCK<sub>B</sub>-Rezeptoren (Christophe et al. 1994). Sie stellen das bisher einzige in vitro System zur Simulation einer Pankreatitis dar. Dexamethason induzierte Differenzierung von AR42J resultiert in einem Anstieg des Granula-Gehaltes und ihres Ansprechens auf CCK. Es wurde bereits gezeigt, daß differenzierte AR42J-Zellen größere Mengen an Amylase und anderen exokrinen Enzymen produzieren (Sachs et al. 1992).



**Abbildung 1:** A: Elektronenmikroskopisches Bild einer humanen Pankreas-Azinuszelle , B: Elektronenmikroskopisches Bild von undifferenzierten AR42J-Zellen, C: differenzierte AR42 J-Zellen (mit 100nM Dexamethason).

## **1.6 CCK-induzierte Signaltransduktion in AR42J-Zellen**

Es wurde bereits gezeigt, daß es nach CCK-Stimulation *in vivo* zur Bildung freier Sauerstoff Spezies kommt ( Sanfey et al. 1985; Koiwai et al. 1989; Schoenberg et al. 1992, 1994). Die Signalwege der CCK-induzierten Radikalentstehung in der Pankreasazinus-Zelle sind weitgehend unklar.

### **1.6.1 Der partielle Agonist an CCK-Rezeptoren: JMV-180**

JMV-180 ist ein CCK-Analogen und stimuliert wie CCK die Amylase-Sekretion durch den CCK-A-Rezeptor in Rattenpankreas-Azinuszellen (Stark et al. 1989, Matozaki et al. 1990; Tsunoda et al. 1996). Vorrausgesetzt, dass beide, CCK und JMV-180 and die gleiche Seite des CCK-A-Rezeptors binden (Stark et al. 1989), kann vermutet werden, dass JMV-180 als ein Agonist für den hochaffinen Zustand und als ein Antagonist für den niedrigaffinen Zustand des Rezeptors agiert (Tsunoda et al. 1996).

### **1.6.2 EGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen**

Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist ein Transmembran-Rezeptor. Wenn EGF an den Rezeptor bindet, kommt es zur Autophosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten. Dieser Vorgang wird durch eine ligandenaktivierte Tyrosinkinase katalysiert. Der EGF-Rezeptor lässt sich durch Tyrphostine spezifisch inaktivieren. Tyrphostine sind eine neue Klasse spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitoren, die von der Struktur des Adenosin abgeleitet sind. ATP bindet in einer katalytischen Tasche innerhalb der Kinasedomäne der Tyrosinkinasen, Tyrphostine sind spezifisch den Bindungstaschen der einzelnen Rezeptoren angepaßt. Für EGFR existiert das hochspezifische Tyrphostin AG 1478. Da CCK eine wichtige Rolle als Mitogen für Azinuszellen spielt und entscheidend an der Organregeneration nach einer Pankreatitis beteiligt ist, was vermutlich in Zusammenhang mit der Aktivierung von Tyrosinkinasen steht (Jurkowska et al. 1992), sind Untersuchungen zum 'cross-talk' zwischen dem CCK-Rezeptor und der Tyrosinkinase-vermittelten Signaltransduktion von großer pathophysiologischer Relevanz.

### 1.6.3 G-Proteine

G-Proteine sind häufig an der hormonellen Signaltransduktion beteiligt. Sie dienen als molekulare Schalter und kommen in zwei unterschiedlichen Zuständen vor, die sich nur durch das jeweils gebundene Guaninnukleotid unterscheiden. In aktiver Form sind sie mit GTP beladen und imstande, eine Reihe unterschiedlicher Proteine zu aktivieren. Es gibt 50 unterschiedliche Isoformen von G-Proteinen, die sich in 3 Untergruppen ( $G_i$ ,  $G_s$  und  $G_q$ ) einteilen lassen, von denen die heterotrimeren, großen G-Proteine für die hormonelle Signaltransduktion von besonderer Bedeutung sind (Kaziro 1991; Lincoln 1993; Löffler 1997). Der CCK-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter 7-Transmembrandomänen-Rezeptor. Dieser aktiviert die heterotrimeren G-Proteine. Die CCK-B-Rezeptor-vermittelte PLC  $\beta$ -Aktivierung wird dabei nicht durch Pertussis-Toxin inhibiert, was eine Aktivierung über ein  $G_q$ -gekoppeltes G-Protein nahelegt (Matzotaki et al. 1988). Pertussis Toxin ist ein Inhibitor des  $G_i$ -Proteins. Es katalysiert die ADP-Ribosylierung von  $G_i$  und löst  $G_i$  von den Rezeptoren.

### 1.6.4 Phospholipase C

Für die Bildung von InsP3 (Inositol-(1,4,5)-triphosphat) aus Phosphoinositoldiphosphat wird eine spezifische Phospholipase, die Phospholipase C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ), benötigt. Ein weiteres Reaktionsprodukt außer InsP3 ist Diacylglycerin (DAG), welches in der Membran zurückbleibt. InsP3 erhöht die cytoplasmatische Kalziumkonzentration durch Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Löffler 1997). Dieses führt im Pankreas zu einer Stimulierung sekretorischer Prozesse. Ein spezifischer Inhibitor der PLC  $\beta$  ist U73122. U73122 ist ein Aminosteroid, welches die Phosphoinositolhydrolyse und das Kalzium-Signal als Antwort auf die CCK-Stimulierung abschwächt (Yule et al. 1993).

## **1.6.5 Proteinkinasen**

### **1.6.5.1 SRC-Kinasen**

Src-Kinasen gehören zur Familie der Tyrosinkinase. Sie sind in normalen Zellen an der intrazellulären Signaltransduktion im Rahmen der Regulation der Proliferation beteiligt, da aber auch postmitotische Zellen eine hohe Aktivität aufweisen können, müssen sie noch andere Funktionen besitzen. Sie dienen als Verbindung zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und ERK (extrazellulär-regulierte Kinase)-Aktivierung. Allerdings ist ihre Rolle in diesem Signalweg hochgradig Rezeptor- und Zell-spezifisch. In manchen Zellen können Lysophosphatidylsäure und Angiotensin-Rezeptoren ERKs über einen Mechanismus aktivieren, der die Tyrosinphosphorylierung von Shc durch Src-Familie-Kinasen beinhaltet (Luttrell et al. 1996 ; Dikic et al. 1996; Daub et al. 1997; Zou et al. 1998). In anderen Zelltypen werden weder Shc noch Src zur ERK-Aktivierung benötigt (Kranenburg et al. 1997). Die Mechanismen, die zur ERK-Aktivierung durch alpha 1-B, alpha2-A adrenerge Rezeptoren, muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren oder Bradykinin-Rezeptoren führen, beinhalten auch Src and Shc. ( Dikic et al. 1996, Della Rocca et al. 1997, Wan et al. 1996). Sie sind wichtig für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Aktivierung von ERKs, die wiederum eine protektive Rolle gegen oxidativen Stress in kardialen Myozyten besitzen (Ryuichi et al. 1997). Ein spezifische Inhibitor von Src-Kinasen ist der selektive und potente Inhibitor Pyrazolopyrimidin (PP-2). Unspezifische Tyrosin-Kinase-Inhibitoren sind Genistein und Herbimycin.

### **1.6.5.2 Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen**

Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) sind Lipid-Kinasen, die Phosphatidylinositole (PtdIns) an der D-3 Position des Inositol-Ringes phosphorylieren. Sie werden aktiviert, indem sie an SH2-Domänen (Src-homologe Domäne) von Proteinen binden. Es wurden in letzter Zeit neue Formen von PI-3-Kinasen gefunden, die direkt durch GPCRs und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen aktiviert werden (Stephens et al. 1994; Thomason et al. 1994; Stoyanov et al. 1995). Der CCK-B-Rezeptor kann z.B. die p85/p110-Pi3-Kinase aktivieren (Hu et al. 1996 ; Saward et al. 1997; Kowalski-Chauvel et al. 1996). Aktivierte PI-3-Kinasen katalysieren das Membranlipid PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-triphosphat). PIP<sub>3</sub> aktiviert daraufhin die Proteinkinase B (PKB).



Spezifische Inhibitoren sind LY 294002 und Wortmannin. LY294002 hat eine ähnliche Struktur wie ATP und ist daher ein stabiler, spezifischer und kompetitiver Inhibitor der PI-3-Kinase. Wortmannin ist weniger spezifisch und instabil in wässrigen Lösungen. Es reagiert kovalent mit einem Lysinrest in der ATP-Bindungstasche der PI-3-Kinase.

### **1.6.5.3 MAP-Kinasen**

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sind für die Induktion der für die mitogene Antwort verantwortlichen Gene von besonderer Bedeutung. Sie werden durch eine Phosphorylierungskaskade aktiviert, wobei das primäre Ereignis die Aktivierung der Raf-Kinase durch ein als Ras bezeichnetes G-Protein ist. Ras ist seinerseits über die Adapterproteine SOS und Grb 2 mit den Rezeptortyrosinkinasen verknüpft. Aktivierte MAPK wandern in den Kern und aktivieren dort durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren. Ein spezifischer MAPK-(Erk-2)-Inhibitor ist PD 98,059. Dieses inhibiert die Phosphorylierung von MAPKK.

### **1.6.5.4 Proteinkinase A**

Die Proteinkinase A (PKA) wird durch cAMP aktiviert und phosphoryliert daraufhin spezifische Serylreste einer Reihe von Proteinen. Beispiele sind Phosphorylase, Glykogensynthase, hormonsensitive Lipase, Myosinkinase und Cholesterinester-Hydrolase (Löffler 1997). Eine Stimulation der PKA kann die PLC  $\beta$  aktivieren, so dass diese ein Kalzium-Signal generiert (Piiper et al. 2000). Diese Antwort könnte durch sequentielle Aktivierung von  $G_s$  und  $G_i$ , mit Hilfe der PKA, vermittelt werden (Luo et al. 1999). Ein spezifischer Inhibitor der PKA ist der PKA-Inhibitor 14-22 Amid.

### **1.6.5.5 Proteinkinase C**

Die Proteinkinase C (PKC)-Familie besteht aus mindestens 12 Mitgliedern, die alle durch Proteolyse und Membranlipide aktiviert werden und denen eine Kalziumabhängigkeit gemeinsam ist. Die Aktivierung der PKC erfolgt in Anwesenheit von Kalzium durch Bindung an Diacylglycerin, welches an der Innenseite der Plasmamembran gebunden ist. Die Substrate der PKC werden an Seryl- bzw. Threonylresten phosphoryliert und ändern damit ihre biologische Aktivität. Substrate sind z.B. der EGF-Rezeptor der dadurch seine Affinität für

EGF vermindert (Transmodulation) und das I-kappaB-Protein, das eine Rolle bei der Transkription spielt (Azzi et al. 1992, Asaoka et al. 1992). Ein spezifischer Inhibitor ist der PKC-Inhibitor (20-28).

## **1.7 Interaktionen zwischen NO-Radikalen und ROS**

Nitrit-Oxid (NO) entsteht durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginine (Hootmann SR 1987). NO wird im Pankreas von NOS 1 und NOS 3 in geringen Mengen produziert und spielt eine Rolle bei der exokrinen Funktion und der Blut-Zirkulation im Pankreas. In der akuten Pankreatitis kommt es zur Induktion von NOS 2 und zur drastischen Steigerung der NO-Freisetzung. Seine physiologischen Aktionen sind vor allem durch cyclisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) vermittelt (Moncada et al. 1993). Im Pankreas steigen intrazelluläre cGMP-Konzentrationen als Antwort auf verschiedene Substanzen, wie Cholezystokinin (Hootmann SR 1987), daher spielt NO eine aktive Rolle in der pankreatischen Sekretion. (Konturek et al. 1994; Konturek et al. 1993). In unterschiedlichen Tiermodellen der Pankreatitis wird NO sowohl eine protektive als auch eine schädigende Wirkung zugeschrieben. Es wurde bereits gezeigt, dass NO einen positiven Effekt auf bestimmte Aspekte in der akuten Pankreatitis hat (Werner et al. 1997; Abe et al. 1995; Toyama et al. 1995). Außerdem mindern NO-Donoren das pankreatische Ödem, intrapancreatische Trypsinogen-Aktivierung und Amylase-Sekretion (Werner et al. 1997). In der Cerulein-induzierten Pankreatitis verstärkt eine Inhibition der NO-Synthase, z.B. durch L-NNA, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NIL) oder durch N-nitro-L-arginine (L-NAME), die durch Cerulein hervorgerufenen entzündlichen Veränderungen des Pankreas (Konturek et al. 1994). Die ungestörte Synthese von endogenem NO spielt eine essentielle Rolle in der Begrenzung der zerstörerischen Mechanismen in der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis und zwar in der frühen und in der Erholungsphase der Pankreatitis (Andrejewska et al. 1999). Im Gegensatz dazu kommt es in der akuten hämorrhagischen Pankreatitis zur Potenzierung des oxidativen Stresses im Pankreas durch NO (Dabrowski et al. 1994).

Eventuell spielen direkte Effekte von NO auf Pankreas-Azinzellen und ihre Sekretion nur eine geringe Rolle in der Pathogenese der akuten Pankreatitis. Der positive Effekt von NO in der akuten Pankreatitis ist durch eine Reduktion in der Leukozyten-Adhäsion und Gewebsinfiltration, sowie durch Modulation der pankreatischen Mikrozirkulation und Gewebsoxygenierung begründet (Werner et al. 1998). Der Mechanismus der NO-Wirkung ist unbekannt.

## 1.8 Aufgabenstellung

Radikale spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen im Organismus (Apoptose, Krebs, neurodegenerative Erkrankungen, chronische Entzündungsreaktionen). In unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass sich bestimmte Proteine in der experimentellen Pankreatitis in vivo oxidativ verändern und die Zahl der modifizierten Proteine im Verlauf der akuten Pankreatitis ansteigt. Nach 48-stündiger Stimulation zeigte sich eine Abnahme des Oxidationsgrades der Proteine auf den Ausgangswert im Kontrolltier. Im in vitro Modell an isolierten Azinuszellen aus dem Rattenpankreas konnte über die gemessene Zeit mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DCF ein deutlicher intrazellulärer Radikalanstieg nach CCK-Stimulation nachgewiesen werden. Die Zunahme war hierbei bei supramaximaler CCK-Stimulation am stärksten. Auch bei physiologischer Stimulation mit CCK war die Fluoreszenz im Vergleich zu unstimulierten Zellen erhöht. In der frühen Phase der akuten Pankreatitis ist die Radikalbildung deutlich gesteigert. Radikale scheinen damit in der Pathogenese der akuten Pankreatitis neben anderen Mechanismen eine wichtige Rolle zu spielen.

Nun soll untersucht werden, welche Mechanismen zur CCK-induzierten Radikalenstehung führen und welche Wechselwirkungen mit NO-Radikalen und Kalzium in der Zelle bestehen. Da die Herstellung isolierter Ratten-Pankreasazinus-Zellen kompliziert und in solch großen Mengen wie für die Versuche erforderlich kaum durchzuführen war, benutzten wir das einzige Zellmodell für Pankreatitis, die bereits erwähnten AR42J-Zellen.

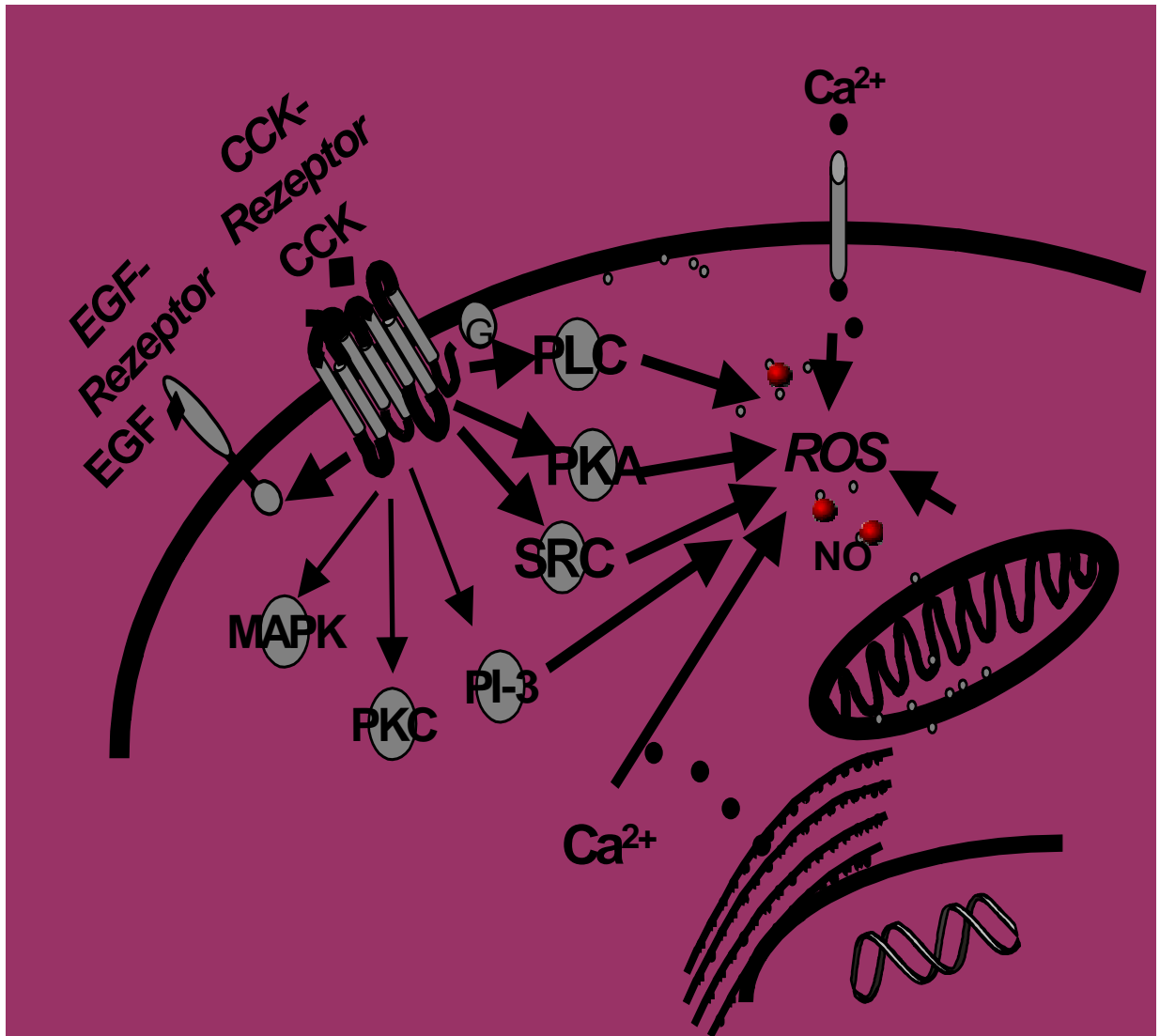


Abb. 2: Mögliche Signalwege in der Pankreasazinuszelle, die zur CCK-induzierten Sauerstoffradikalbildung (ROS) führen, sowie mögliche Interaktionen von Sauerstoffradikalen mit Stickoxidradikalen (NO).

## 2. Materialien

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Geräte und Software

AxioCam 12 bit Digital Mikroskop Kamera	Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
AxioVision multi channel image processing	Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
AxioVision single channel image processing	Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
Dispensor	Eppendorf
Dispensortips	Eppendorf
Datenauswertungssoftware	SigmaPlot 4.0 2001
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axioskop Mikroskop, Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
Fluorimeter	SpectraMax Gemini, S/N G02052, Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Fluorimeter-Software	Softmax pro
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5 B	Du Pont, Bad Homburg, Rotoren SS34, SM24, HB4, GS3, GSA
Mikroskope	Nikon Phasenkontrast-2, Kamera F-301,
Nikon	Olympus
Olympus OM, Kamera SC 35 Typ 12,	Ulead Systems, Inc. Torrance, CA, USA
PhotoImpact 3.0	
Pipetten	Eppendorf Pipetten, 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
Tischzentrifuge	Biofuge 17S, Heraeus, Hanau; Beckmann Zentrifuge J6-MC, USA
Schüttelmixer	MS1 Minishaker IKA <sup>R</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sterilbank	BioGard, the baker company, USA
Waage	Typ Ulm Sartorius, Analytic AC 210S, Sartorius AG, Göttingen

Wasserbad	Typ 1004S, GFL mbH, Burgwedel
96er Well-Platten	greiner, cellstar (steril mit Abdeckplatte)
Zellkultur	Brutschrank B5060 Ek/CO <sub>2</sub> , Heraeus, Hanau
10-cm-Zellkulturschalen	NUNC

### 2.1.2 Chemikalien

Aurion Block (Donkey)	Aurion
Aurion Block BSA	Aurion
Bapta,AM	Molecular Probes
Bombesin	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
CCK-8 ([Tyr(SO <sub>3</sub> H) <sup>27</sup> ]-	Sigma, Taufkirchen
Cholecystokinin Amide, Fragment 26-33)	
CCCP (Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone)	Sigma, Taufkirchen
Cyclosporin	Sigma, Taufkirchen
DAPI	Sigma, Taufkirchen
(4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride Hydrate)	
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
EGF (Human)	Biomol
Glutathion	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Serva, Heidelberg
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Vectashield	Vector

### 2.1.3 Inhibitoren

Inhibitor	Funktion	Hersteller
-----------	----------	------------

AG1478	Tyrphostin, EGF-Rezeptor- Inhibitor	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland
Genistein	Kinase-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
Herbimycin	Kinase-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
JMV-180	partieller Agonist des CCK-Rezeptors	Neosystem S.A. Strasbourg, Frankreich
L-NAME (NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester, Hydrochloride)	NOS-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
L-NIL, Dihydrochloride ([L-N6-(1-Iminoethyl)lysine], DiHCL)	NOS-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
LY 294002	PI-3-Kinasen-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
Pertussis Toxin (PTx)	Gi-Protein-Inhibitor	Sigma
PD 98,059	MAPKK-Inhibitor	Sigma-Aldrich
PKA-Inhibitor 14-22	PKA-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
PKC-Inhibitor 20-28	PKC-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
PP-2	SRC-Kinasen-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
U73122	PLC-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
Wortmannin	PI-3-Kinasen-Inhibitor	Sigma, Taufkirchen

#### 2.1.4 Donatoren

Donor	Funktion	Hersteller
A23187, Free Acid, Streptomyces chartreusensis (Calcium Ionophore)	mobiler Ionen-Carrier, führt zum Ca <sup>2+</sup> -Einstrom ins Cytosol	Calbiochem, Bad Soden
Perhydrol 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Donor von Sauerstoffradikalen	Merck KGaA
SNAP (S-Nitroso-N- acetylpenicillamine)	Donor von Stickoxidradikalen	Calbiochem, Bad Soden

---

Thapsigargin	Inhibitor von endo- und sarkoplasmatischen Ca <sup>2+</sup> -Pumpen, führt zum Ca <sup>2+</sup> -Einstrom ins Cytosol	Calbiochem, Bad Soden
--------------	---	-----------------------

### 2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe

Substrat	Funktion	Hersteller
DAF-FM DA (3-Amino-4-Aminomethyl-2',7'-Difluorescein)	Zell-permeabel, markiert intrazellulär Stickoxid-Radikale	Calbiochem, Bad Soden
FURA-2/AM ( 1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N',-tetraacetic Acid, Pentaacetaoxymethyl Ester)	Zell-permeabel, markiert intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Ionen	Calbiochem, Bad Soden
H <sub>2</sub> DCFDA (2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein Diacetate)	Zell-permeabel, markiert intrazellulär Stickoxid-Radikale	Calbiochem, Bad Soden



## 2.2 Medien und Puffer

### 2.2.1 Zellkulturmedien

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

Das hier aufgeführte Medium mit und ohne Calcium wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma, Taufkirchen
Foetal Calf Serum Gold (FCS)	PAA Laboratories GmbH
L-Glutamin 200MM (100x)	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco (UK)
AR42J-Medium	DMEM 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	70% DMEM 10% FCS 20% DMSO
Hungermedium	DMEM 1% Glutamin
Calciumfreies Medium	HEPES 24,5mM NACL 96mM KCL 6mM NAH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O 2,5mM Glucose 11,5mM Na-Fumarat 5mM Na-Pyruvat 5mM Na-Glutamat 5mM alles von SIGMA

Ca-haltiges Medium: s.o. plus  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,0736g/l (0,5mM) von SIGMA

## 2.2.2 Stammlösungen und Puffer

Die hier aufgeführte Lösungen wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

PBS	13.7 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	80.9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	1.5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4 (HCl)

## 2.3 Zelllinien und Antikörper

### 2.3.1 Zelllinie

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
AR42J	Ratten-Pankreasazinus-Tumorzellen die in der Lage sind, Amylase und andere exokrine Enzyme zu produzieren. Wachsen als Monolayer.	ATCC NUMBER: CRL-1492 (Logsdon CD 1986)

### 2.3.2 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller
Anti- 8-OHG (Goat Anti 8 -Hydroxyguanosine) FITC Donkey Anti Goat	Markiert DNA-Oxidation	Serotec, Prod.-No.: AHP592  Jackson, Prod.-No. 705-095-147

Anti-NOS-Antikörper :	serotec
Anti NOS 1 (nNOS)	N31030
Anti NOS 2 (iNOS)	N32030
Anti Nos 3 (eNOS)	N30030
Anti-Rabbit Cy 3 1:200,	Jackson
	Prod.-No.:111-165-144
Monoclonal Anti-Phosphotyrosine	Sigma, Taufkirchen
(Clone PT-66 mouse)	Prod.-No.: P3300
Goat-Anti-Mouse Cy3	Jackson,
(1:200)	Prod.-No.: 115-165-100

### **3. Methoden**

#### **3.1.1 Zellkultur**

Die Durchführung der Arbeiten erfolgte an einer Sterilbank, wobei Arbeitsflächen sowie verwendete Geräte (Kulturmedienflaschen, Verpackungen etc.) vor Gebrauch mit 70% igem Ethanol oberflächendesinfiziert wurden. Die für die Zellkultur eingesetzten Geräte und Materialien waren sterilisiert bzw. autoklaviert. Lösungen und Medien waren sterilfiltriert.

#### **3.1.2 Kulturbedingungen**

Die Kultivierung der AR42J-Zellen erfolgt bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und einem Kohlendioxidgehalt der Luft von 5 % im AR42J-Medium, bestehend aus DMEM, 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin.

#### **3.1.3 Einfrieren der Zellen**

Das Medium wurde abgesaugt und dann wurde 1x PBS, ca. 5 ml, auf die Zellen gegeben. Dieses wurde wieder abgesaugt und die Zellen wurden zunächst mit 1 ml Trypsin-Na-EDTA-Lösung versetzt und nach ca. 5 min. abgelöst und in ein steriles Falcon mit 10 ml frischem Medium pipettiert. Dann wurden sie zentrifugiert ( 1500 RPM, 1 min.) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1ml Einfriermedium versetzt und in ein beschriftetes 1,5 ml-

Tube gefüllt. Diese wurden langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **3.1.4 Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und auf Eis aufgetaut. Dann wurden sie mit einer sterilen Pipette aufgenommen und in ein steriles Falcon mit 10 ml Medium pipettiert. Das Suspensat wurde dann zentrifugiert (1500 RPM, 1 min.) und der Überstand verworfen. Dann wurde wieder 10 ml AR42J-Medium auf die Zellen gegeben und das Suspensat wurde auf 10-cm-NUNC-Platten aufgetragen

#### **3.1.5 Medienwechsel und Teilung der AR42J-Zellen**

Die adhärent wachsenden Zellen wurden in 10-cm-Platten angezogen, bis sie fast konfluent waren. Der Mediumwechsel erfolgte je nach Konfluenz spätestens nach drei Tagen.

Das medium wurde durch Absaugen des Mediums und der Zugabe von frischem Medium gewechselt, solange die Zellen nicht konfluent gewachsen waren. Bei konfluent gewachsenen Zellen wurde das Medium abgesaugt, mit 5 ml PBS gewaschen und die Zellen durch Inkubation mit 1 ml Trypsin-Na-EDTA-Lösung für 5 min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  abgelöst. Anschließend wurden die Zellen 1:5 auf neue Schalen mit 10 ml, auf ca.  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtem frischen AR42J-Medium aufgeteilt.

#### **3.1.6 Aussäen auf 96-Loch-Platten**

Durch das Trypsinieren der Zellen wurden diese wieder abgelöst und in ein Falcon mit auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten frischem AR42J-Medium gegeben. Zum Ermitteln der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer benutzt. Auf diese wurde ein Deckgläschen gelegt und angepresst. Die Zellsuspension pipettiert man unter das Deckgläschen, zählt die vier Großquadrate aus, teilt durch die Konstante der Zählkammer, multipliziert mit  $10^4$  und erhält die Zellzahl/ml. Die Suspension wurde nun so lange verdünnt, bis 50.000 Zellen pro ml übrig blieben. Mit dem Dispenser wurden nun jeweils  $100\mu\text{l}$  des Suspendates auf die einzelnen Wells gegeben. Zwischendurch wurden die Zellen suspendiert. Die Zellen waren nach 3 Tagen konfluent. Im Anschluss daran konnten sie für die Experimente eingesetzt werden.

### **3.1.7 Differenzierung der Zellen**

Bevor die Zellen auf 96-Loch-Platten ausgesät wurden, wurden 100nM Dexamethason zu dem Zellsuspendat in das Falcon gegeben. Die Zellen wuchsen 3 Tage, bis sie differenziert waren. Der weitere Verlauf nach diesen 3 Tagen erfolgte wie bereits beschrieben.

## **3.2 Quantifizierung der Radikalproduktion**

Die intrazelluläre Produktion von freien Radikalen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde durch die Oxidation von 2,7-Dichlorofluorescein (DCF) nachgewiesen. DCF wird Zellen als Diacetat zugesetzt, das durch die Zellmembran diffundieren kann. Intrazellulär wird das DCF-Diacetat von Esterasen gespalten, für das entstandene DCF ist die Zellmembran nicht mehr permeabel. Freie Radikale oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidieren DCF zu stark fluoreszierendem Dichlorofluorescein (Abb. 3).

Die quantitative Bestimmung der Entstehung freier Sauerstoff Spezies (ROS) wurde mit Hilfe des Fluorometers SPECTRA max GEMINI durchgeführt. 50.000 AR42J-Zellen/well wurden auf 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. 15 Stunden vor den eigentlichen Versuchen wurden die AR42J-Zellen gehungert, indem ihnen das Medium weggenommen wurde und ein Hungermedium auf die Zellen- also DMEM mit 1% Glutamin, aber ohne FCS- gegeben wurde. Die gehungerten AR42J-Zellen wurden dann, bis auf 4 Löcher die als Blank dienen sollten- 30 Minuten vor den Versuchen- mit einer 50µM DCFDA- Lösung inkubiert (Jason et al. 1997). Nach der Inkubation wurde das Inkubationsmedium abgesaugt, dann wurden die Zellen mit 1xPBS gespült und Medium zugegeben. Nach ca. 10 Minuten Stimulation bei 37°C im Inkubator wurde das entstandene fluoreszierende Dichlorofluorescein im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Alle Experimente wurden als 4 fach-Bestimmungen durchgeführt, wobei auf jeder Platte 4 Löcher nicht mit DCF-Diacetat inkubiert wurden, der Durchschnittswert ihrer Eigenfluoreszenz wurde von allen anderen Werten abgezogen. Durch die Einstellung „Wellscan-9-Punkt-Messung“ wurde die zufällige Verteilung der Zellen im einzelnen Well relativiert.

### **3.2.1 Messung der Radikalentstehung nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin**

Die konfluenten AR42J-Zellen in Greiner 96-Loch Platten wurden 15 h in 100µl Hungermedium gehungert. Anschließend wurden sie 30 Minuten mit 50µM DCF inkubiert. Nach dem darauf folgenden Spülen mit PBS wurden sie mit 100µl Stimulationsmedium mit Cholecystokin (CCK-8) bzw. Bombesin beladen. Dazu wurden zunächst Konzentrationsreihen mit CCK bzw. Bombesin hergestellt. Zu diesem Zweck wurde DMEM als Lösungsmittel benutzt dort den in 1xPBS-gelösten Stock aus CCK  $10^{-4}$  M bzw. Bombesin  $10^{-4}$  M hineinpipettiert: CCK bzw. Bombesin in  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-18}$ ,  $10^{-20}$  molarer Konzentration wurden dann in ihrem PBS-Gehalt angeglichen (1% PBS). Als Positivkontrolle wurde Peroxid in 300µM Endkonzentration benutzt, die Negativkontrolle war DMEM mit 1%PBS. Als Variation fügte man zu allen Lösungen einschließlich den Kontrollen 1mM Natriumazid hinzu, um die Radikalentstehung durch die Mitochondrien auszuschalten. Auf immer 4 Löcher mit Zellen wurden mit Hilfe des Dispensors 100µl der jeweiligen Lösung pipetteiert. Nach ca. 10 Minuten Stimulation bei 37°C im Inkubator wurde das entstandene fluoreszierende Dichlorofluorescein im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm, wie bereits beschrieben, gemessen.

### **3.2.2 Messung der Radikalentstehung nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin $10^{-6}$ M unter Zugabe von Inhibitoren**

Die Zellen wurden zusätzlich zur DCF-Lösung 45 Minuten vor der Stimulation mit Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Als Positivkontrolle diente Peroxid in 300µM Endkonzentration. Die Negativkontrolle war DMEM mit 1% PBS. Zusätzliche Kontrollen waren CCK bzw. Bombesin in supramaximaler Konzentration ( $10^{-6}$  M). Zusätzlich wurden in alle Stimulationsmedien 0,1% DMSO hinzugegeben, da Vorversuche gezeigt haben, dass DMSO einen erheblichen Einfluß auf die Radikalentstehung hat und diese konzentrationsabhängig senkt. Nach abgelaufener Inkubationszeit und anschließendem Spülen mit PBS wurden die Zellen wieder 10 min. bei 37°C stimuliert. Dabei wurde das jeweilige Stimulationsmedium mit den Inhibitoren versetzt, da diese zuvor mit dem Inkubationsmedium abgewaschen wurden. Den Stimulationsmedien wurden CCK  $10^{-6}$  M, Bombesin  $10^{-6}$  M,  $H_2O_2$  300 µM, CCK  $10^{-6}$  M + Inhibitor, Bombesin  $10^{-6}$  M + Inhibitor, Negativkontrolle (DMEM + PBS), Negativkontrolle (DMEM + PBS) + Inhibitor zugesetzt. Nach ca. 10 Minuten Stimulation wurde das entstandene fluoreszierende Dichlorofluorescein im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

### 3.3 Calciummessungen

Der intrazelluläre Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator FURA-2 nachgewiesen. FURA-2 wird den Zellen als zell-permeabler Ester zugesetzt, der durch die Zellmembran diffundieren kann. Intrazellulär wird Fura-2/AM von cytoplasmatischen Esterasen gespalten, für das entstandene FURA-2 ist die Zellmembran nicht mehr permeabel. FURA-2 ist ein Calcium-Chelator und fluoresziert nach Bindung mit Calcium. Die quantitative Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde mit dem Fluorometer SPECTRAmax GEMINI durchgeführt. Dafür wurden Pankreas-Azinus-Tumorzellen (AR42J) kultiviert und mit der Neubauer Zählkammer ausgezählt, so dass 50.000 Zellen/ml gleichmäßig auf die 96er-Well-Platten ausgesät werden konnten. Diese beließ man 3 Tage im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ , um die Zellen konfluent wachsen zu lassen. 15 Stunden vor der Messung nahmen wurden die Zellen mit DMEM mit 1% Glutamin gehungert. Die gehungerten AR42J-Zellen wurden dann, bis auf 4 Wells die als Blank dienen sollten, 30 Minuten mit einer  $10\mu\text{M}$  FURA-2,AM- Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Inkubationsmedium abgesaugt, dann wurden die Zellen mit 1xPBS gespült und Medium auf die Zellen gegeben. Danach wurden jeweils 4 Wells mit je  $100\mu\text{l}$  der jeweiligen Reagenz beladen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration konnte quantitativ bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Fluorometer erfasst werden. Die Zellen wurden mit folgenden Reagenzien in DMEM beladen:  $100\mu\text{l}$   $10\mu\text{M}$  Thapsigargin, ein zellpermeabler Tumor-Promotor, der die endo- und sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen inhibiert und so zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Cytosol führt.  $100\mu\text{l}$   $10\mu\text{M}$  Ca-Ionophore, ein mobiler Ionen Carrier, der zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum ins Cytosol führt. Beide dienten als Positivkontrolle. Weiterhin CCK in supramaximaler ( $10^{-6}$  M), Bombesin in supramaximaler Konzentration ( $10^{-6}$  M),  $\text{H}_2\text{O}_2$   $300\mu\text{M}$  und der Radikalfänger N-Acetylcystein in  $20\text{mM}$  Konzentration zusammen mit CCK  $10^{-6}$ M. N-Acetylcystein wurde allerdings bereits zusammen mit dem fluoreszierenden Substrat, FURA-2,AM, vorinkubiert und danach noch einmal mit CCK  $10^{-6}$  M ins Stimulationsmedium gegeben. Das in N-Acetylcystein enthaltene Tripeptid Glutathion besteht aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin und dient in seiner reduzierten Form zur Entgiftung von Peroxiden und zur Aufrechterhaltung des reduzierten Zustands katalytisch wichtiger Cysteinreste. Die Inkubation der Zellen mit  $20\text{mM}$  N-Acetylcystein soll die nach CCK-Stimulation produzierten freien Radikale möglichst quantitativ abfangen. In einer zweiten Messung wurden die Zellen mit CCK  $10^{-6}$  M und PP-2 zusammen mit CCK  $10^{-6}$  M stimuliert. Der SRC-Kinaseinhibitor PP-2 wurde bereits 15 min. vor der Stimulation ins Inkubationsmedium gegeben. Nach ca. 10 Minuten Stimulation wurde

das entstandene fluoreszierende FURA-2 im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 335 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm gemessen. Alle Experimente wurden als 4 fach-Bestimmungen durchgeführt, wobei auf jeder Platte 4 Löcher nicht mit FURA-2/AM inkubiert wurden. Der Durchschnittswert ihrer Eigenfluoreszenz wurde von allen anderen Werten abgezogen. Durch die Wellscan-9-Punkt-Messung wurde die zufällige Verteilung der Zellen im einzelnen Well relativiert. Die Auswertung erfolgte in Sigmaplot, dieses Mal war der 100%-Wert CCK  $10^{-6}$  M und alle anderen Werte sind in Prozent des CCK-Wertes angegeben.

### 3.4 NO-Messungen

Die intrazelluläre Produktion von freien NO-Radikalen wurde durch den Fluoreszenzfarbstoff 3-Amino,4-aminomethyl-2',7'-difluorescein (DAF-FM) nachgewiesen. DAF-FM wird den Zellen als Diacetat zugesetzt, das durch die Zellmembran diffundieren kann. Intrazellulär wird das DAF-FM-Diacetat von intrazellulären Esterasen gespalten, für das entstandene DAF-FM ist die Zellmembran nicht mehr permeabel. Es reagiert mit NO-Radikalen in der Anwesenheit von freien Sauerstoffradikalen zu einem stark fluoreszierendem Triazolo-Fluorescein Analogon (DAF-FM T). Die quantitative Bestimmung der NO-Radikale wurde mit dem Fluorometer SPECTRAMax GEMINI durchgeführt. Dazu wurden Pankreasazinus-Tumorzellen (AR42J) kultiviert und vorher mit der Neubauer Zählkammer ausgezählt, so dass 50.000 Zellen/ml gleichmäßig auf die 96er-Well-Platten ausgesät werden konnten. Diese ließ man 3 Tage im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> konfluent wachsen.

15 Stunden vor den eigentlichen Versuchen wurden die Zellen gehungert. Die gehungerten AR42J-Zellen wurden dann 30 Minuten vor den Versuchen- mit einer 10µM zellpermeablen DAF-FM,DA-Lösung (in DMEM) inkubiert. Dabei wurden wieder 4 Wells als Blank freigelassen. Nach der Inkubation wurde das Inkubationsmedium abgesaugt, dann wurden die Zellen mit 1xPBS gespült und Medium zugegeben. Danach wurden jeweils 4 Wells mit 100µl der jeweiligen Reagenz beladen und die Konzentration der NO-Radikale wurde wieder quantitativ mit dem Fluorometer, bei 37°C, erfasst werden. Dieses Mal wurden die Zellen nach der Inkubation mit den folgenden Reagenzien beladen: 100µl 10µM SNAP, einem NO-Donor, als Positivkontrolle. Weitere Reagenzien waren jeweils 100µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300µM und CCK  $10^{-6}$  M. Außerdem ein Gemisch aus SNAP 10µM und CCK  $10^{-6}$  M. Nach ca. 10 Minuten Stimulation wurde das entstandene fluoreszierende DAF-FM T im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Alle Experimente wurden als 4 fach-Bestimmungen durchgeführt, wobei auf jeder Platte 4



Löcher nicht mit DAF-FM-Diacetat inkubiert wurden, der Durchschnittswert ihrer Eigenfluoreszenz wurde von allen anderen Werten abgezogen. Durch die Einstellung „Wellscan-9-Punkt-Messung“ wurde die zufällige Verteilung der Zellen im einzelnen Well relativiert. Die Auswertung erfolgte als Balkendiagramm mit Fehlerbalken (Standardabweichung) in Sigmaplot. Die Werte sind als RFU (relative Fluoreszenzeinheiten) bei einer Extinktion von 485 nm anzusehen.

### **3.5 Auswertung in SIGMAPLOT 4.0 2001**

Alle Werte der Diagramme sind Mittelwerte aus 4 bis 8 unterschiedlichen Messungen an mindestens zwei verschiedenen Tagen. Jede Messung ist mindestens eine Vierfachbestimmung. Um die in ihrer Stimulierbarkeit von Platte zu Platte unterschiedlich gewachsenen und stimulierbaren Zellen miteinander vergleichen zu können, wurde bei den DCF-Messungen (Sauerstoffradikal-Messungen) als Bezugsgröße die Positivkontrolle 300µM Peroxid herangezogen und diese gleich 100% gesetzt. Alle anderen Werte sind in Prozent dieser Positivkontrolle anzusehen. Bei den FURA-Messungen (Calciummessungen) wurde CCK 10<sup>-6</sup> M als 100%-Bezugsgröße herangezogen. „RFU“ steht für „Relative Fluoreszenzeinheiten“, alle dargestellten Werte sind daher relative Werte. Bei den DAF-Messungen (NO-Radikale) wurden die Werte als RFU bei einer Extinktion von 485nm angegeben. Die Auswertung und graphische Darstellung in Balkendiagrammen erfolgte mit dem Programm Sigmaplot 2001. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte ebenfalls durch Sigmaplot. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels des t-Tests überprüft.

### **3.6 Immunhistochemische Detektion**

#### **3.6.1 Einzel-Immunomarkierung**

Die subkonfluenten, auf 8-Well-Chamber-Slides ausgesäten AR42J-Zellen wurden stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit der Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300µM, einer supramaximalen CCK-Konzentration (CCK 10<sup>-6</sup> M) sowie einer physiologischen CCK-Konzentration (CCK 10<sup>-12</sup> M). Außerdem diente eine Kammer ohne Stimulation als Negativkontrolle. Stimuliert wurden jeweils immer 2 Kammern. Nach der Stimulation wurden die Zellen in den Wells mit 1xPBS bei Raumtemperatur kurz gewaschen. Dann erfolgte die Fixierung mit 4%igem Formalin bei Raumtemperatur für 10-15 Minuten. Nach der Fixierung wurden die Zellen 3 Mal je 30

Minuten lang mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Fc-Rezeptoren mit 2 Tropfen unverdünnter Aurion Blocking Solution blockiert. Dann wurde die Blocking Solution ausgeschlagen und sofort 150µl des jeweiligen primären Antikörpers hinzugegeben. Dabei wurde die untere Reihe von Kammern mit der doppelten Stimulation ausgelassen, sie diente als Sekundäre-Antikörper-Kontrolle für jede Stimulation. Der erste Antikörper wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank und am nächsten Tag noch zwei Stunden bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Dann wurden die Zellen 3 Mal mit 1xPBS je 5 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen in PBS erfolgte die Detektion der gebundenen primären Antikörper. Hierzu wurden 150µl des sekundären Antikörpers in alle Kammern pipettiert und eine Stunde auf den Zellen belassen. Dabei wurden die Zellen wegen des in der sekundären Antikörperlösung enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffes im Dunkeln aufbewahrt. Als Nächstes wurde wieder mit PBS 3 Mal je 5 min. gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte eine Gegenfärbung der Kerne mit 200µl DAPI, welches zuvor 1:10000 in 1xPBS verdünnt wurde. Dazu wurden innerhalb von 10-20 sec. die Tropfen DAPI auf die Zellen gegeben und sofort mit 1xPBS 3 Mal, je 5-10 min., abgewaschen. Im Anschluß wurden die Zellkammern vom Objektträger entfernt. Um die fertig gefärbten Zellen längere Zeit aufbewahren zu können, erfolgte nun die Einbettung in „Vectashield“. Dazu wurden ca. 200µl Vectashield auf den Rand des Objektträgers pipettiert und ein Deckgläschen auf den Objektträger gelegt, so daß alle Kammern mit Vectashield bedeckt waren. Eventuelle Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze ausgestrichen. Die Objektträger mit den Deckgläschen wurden in eine Mappe gelegt, so dass die Fluoreszenz mehrere Wochen erhalten blieb. Die fluoreszierenden Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die Ergebnisse wurden protokolliert und fotografiert.

### **3.6.2 Mikroskopie und Bildbearbeitung**

Die markierten Zellen wurden mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop, ausgestattet mit den entsprechenden Filtern, untersucht. DAPI- und Fluochrom-Markierungen wurden mit einer AxioCam Digitale Mikroskop Kamera und einer AxioVision Multikanal Bildbearbeitung digitalisiert. Die digitale Bearbeitung der Bilder wurde mit PhotoImpact 3.0 durchgeführt.

Die histochemischen Markierungen wurden mit einer 12-bit AxioCam Kamera und einer AxioVision Einkanal Bildbearbeitung aufgenommen. Die gezeigten Bilder sind das Ergebnis sechs unabhängig voneinander durchgeführter Versuche mit vergleichbaren Resultaten.

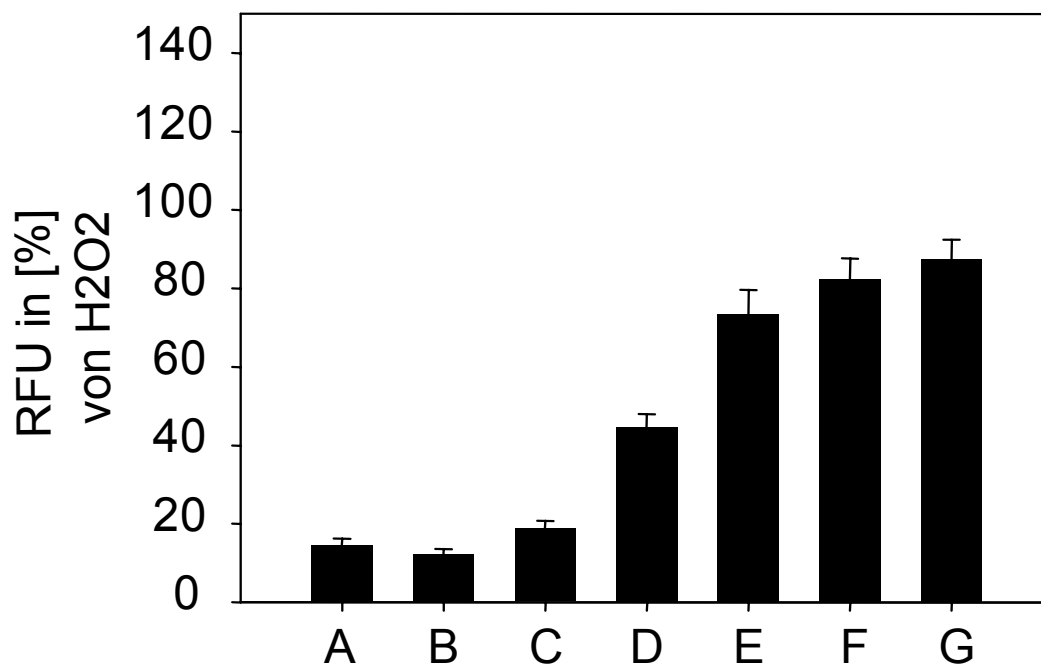
## 4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen, die zur intrazellulären CCK-induzierten Radikalentstehung führen, untersucht. Die dargestellten Diagramme sind das Ergebnis aus jeweils vier bis acht unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

### 4.1 Radikalentstehung nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin

Es wurde bereits *in vitro* gezeigt, daß Pankreasazinuszellen nach CCK-Stimulation Radikale bilden. Daher wurde zunächst die CCK- bzw. Bombesin-induzierte Radikalentstehung in AR42J-Zellen nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden auf 96-Loch-Platten ausgesäte konfluente und 15 h gehungerte AR42J-Zellen zunächst 30 min. mit dem zell-permeablen Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat (DCF-DA) inkubiert. Das DCF-DA diffundiert in die Zelle und wird durch intrazelluläre Esterasen zu dem fluoreszierenden Farbstoff DCF gespalten. Dieses kann die Zelle nicht mehr verlassen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder freie Radikale oxidieren DCF zu stark fluoreszierendem Dichlorfluorescein. Die Positivkontrolle (300µM Wasserstoffperoxid) stellt den 100%-Wert in den Abbildungen dar. Alle anderen Werte sind auf diesen Wert bezogen. Die Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM) zeigt einen Basalwert der Radikalentstehung von bis zu 20% der Positivkontrolle an. Es zeigt sich, daß es nach Stimulation mit CCK konzentrationsabhängig zur Radikalentstehung kommt. Die Radikalenstehung liegt auch nach Stimulation mit einer physiologischen CCK Konzentration (10<sup>-12</sup> M) bei 50% der Positivkontrolle. Nach Stimulation mit einer supramaximalen CCK-Konzentration (10<sup>-6</sup>M) wird die Radikalentstehung auf 60-80% der Positivkontrolle gesteigert. Nach Stimulation der Zellen mit sehr niedrigen Konzentrationen von CCK (10<sup>-18</sup> M, 10<sup>-20</sup> M) kommt es zu keiner vermehrten Radikalentstehung gegenüber der basalen Radikalbildung ohne Stimulation. Das Gleiche gilt für eine Stimulation mit Bombesin: Nach Stimulation mit supramaximaler Bombesin-Konzentration (Bombesin 10<sup>-6</sup> M) liegt die Radikalentstehung bei 60-80% der Positivkontrolle. Auch hier ist eine Konzentrationsabhängigkeit der Radikalbildung festzustellen. Nach Stimulation mit Bombesin 10<sup>-18</sup> M ist gegenüber dem Basalwert der Radikalbildung ohne Stimulation kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen. Bombesin ist ein Neurotransmitter, der in Magen, Duodenum und Jejunum vorkommt. Es zeigt Strukturhomologien zu CCK und wirkt

ähnlich wie CCK über einen 7-Transmembrandomänenrezeptor auf die Enzymsekretion von Pankreasazinuszellen (Löffler 1997).

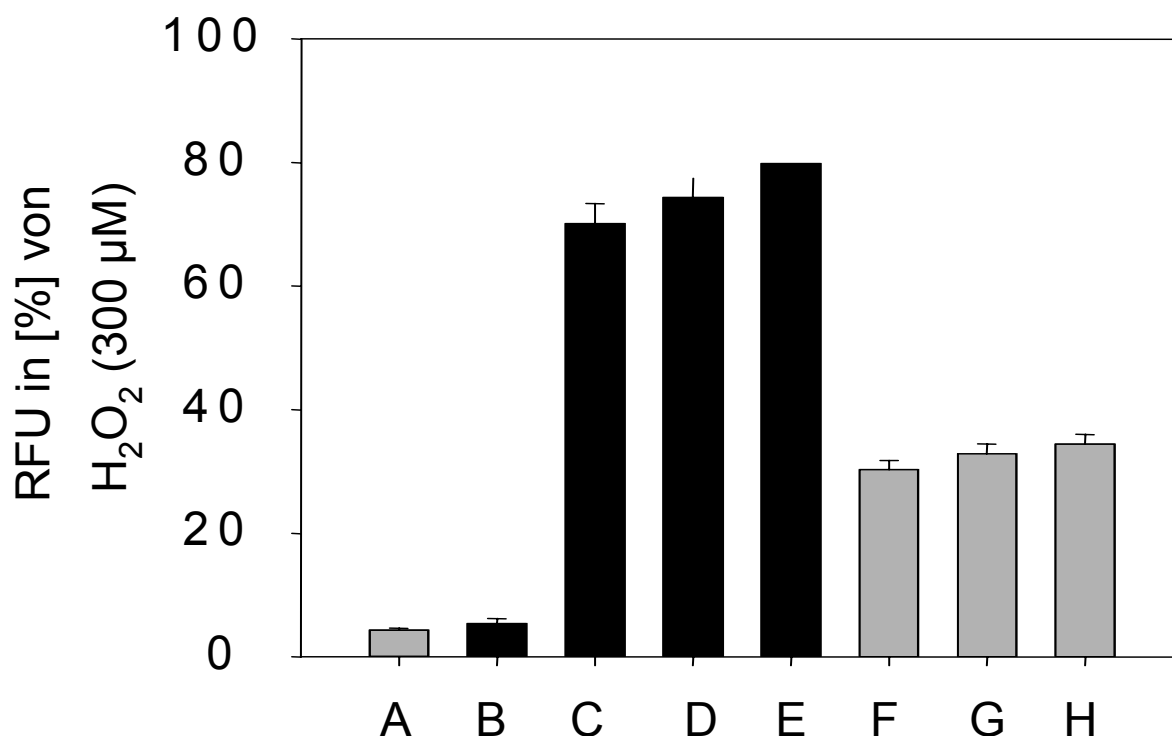


**Abb.4: Konzentrationsabhängige Radikalentstehung nach CCK-Stimulation.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 μM, Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). A: Negativkontrolle, B: CCK 10<sup>-20</sup> M, C: CCK 10<sup>-18</sup> M, D: CCK 10<sup>-14</sup> M, E: CCK 10<sup>-12</sup> M, F: CCK 10<sup>-9</sup> M, G: CCK 10<sup>-6</sup> M.

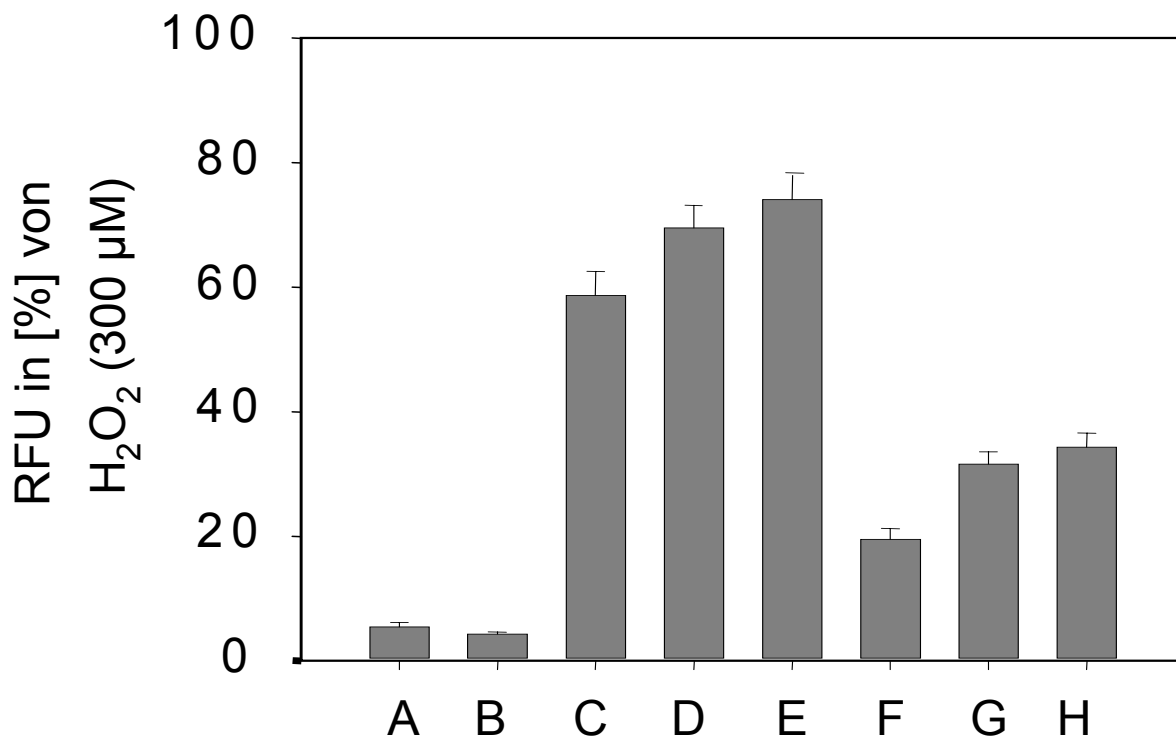
#### 4.2 Radikalentstehung nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin unter Ausschaltung des Mitochondriums

Es ist bekannt, daß in den Mitochondrien der Zelle Radikale entstehen (Masayoshi et al. 1998; Raha et al. 2001). Wir wollten nun untersuchen, wie groß der Anteil der in den Mitochondrien gebildeten Radikale ist. Für diesen Zweck benutzten wir Natriumazid. Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) hemmt wie alle Azide die Elektronentransportkette in der Atmungskette des Mitochondriums, indem es den Elektronentransport der Cytochrom-c-Oxidase inhibiert. Bei NaN<sub>3</sub> handelt es sich um einen nicht-kompetitiven Atmungsketteninhibitor der Cytochrom-c-Oxidase. In hohen Konzentrationen (5-10mM) eingesetzt, erwirkt NaN<sub>3</sub> eine vollständige Komplex IV-Blockade, die mit einer gedrosselten mitochondrialen Respiration einhergeht. Niedrigere NaN<sub>3</sub>-Konzentrationen (<2 mM) vermindern die enzymatischen Geschwindigkeit (V<sub>max</sub>) der Cytochrom-c-Oxidase. Dies führt zu einer partiellen Enzyminhibition. Natriumazid wird eingesetzt, um die Entstehung von mitochondrialen Radikalen von denen, die an der Zellmembran gebildet wurden, unterscheiden zu können. Dazu inkubierte man die konfluent

gewachsenen und 15 Stunden gehungerten AR42J-Zellen 30 min. mit DCFDA. Dabei gab man zu dem DCFDA auf die Hälfte der Platte in jedes Well 1mM Natriumazid. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte das Stimulieren mit CCK  $10^{-6}$  M, CCK  $10^{-9}$  M, CCK  $10^{-12}$  M mit 1mM Natriumazid auf die Zellen, die bereits mit Natriumazid im Inkubationsmedium inkubiert wurden. Die andere Hälfte der Zellen wurden mit CCK  $10^{-6}$  M, CCK  $10^{-9}$  M, CCK  $10^{-12}$  M ohne Natriumazid stimuliert. Auf die gleiche Weise wurde Bombesin an Stelle des CCK eingesetzt. Als Positivkontrolle diente  $300\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxyd, als Negativkontrolle DMEM ohne Zusatz. Nach 10 minütiger Stimulation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde die Platte im Fluorometer gemessen. Nach Auswertung der Daten erkennt man, daß die AR42J-Zellen, auf die wir 1mM Natriumazid gegeben haben, ein rapides Absinken der Radikalentstehung auf die Hälfte des Wertes ohne Natriumazid zeigen. Dieses ist dadurch zu erklären, daß ein Großteil der Radikalentstehung im Mitochondrium stattfindet. Mit 1mM Natriumazid wird die enzymatische Geschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) der Cytochrom-C-Oxidase vermindert und so die Radikalbildung durch das Mitochondrium inhibiert.



**Abb.5: Gegenüberstellung der konzentrationsabhängigen Radikal-entstehung nach CCK-Stimulation mit und ohne 1mM Natriumazid.** Positivkontrolle  $\text{H}_2\text{O}_2$   $300\ \mu\text{M}$  (100%). **A:** Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM) ohne Natriumazid; **B:** Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM) mit Natriumazid; **C:** DMEM + CCK  $10^{-12}$  M ohne Natriumazid; **D:** DMEM + CCK  $10^{-9}$ M ohne Natriumazid; **E:** DMEM + CCK  $10^{-6}$ M ohne Natriumazid; **F:** DMEM + CCK  $10^{-12}$ M mit Natriumazid; **G:** DMEM + CCK  $10^{-9}$ M mit Natriumazid; **H:** DMEM + CCK  $10^{-12}$ M mit Natriumazid.

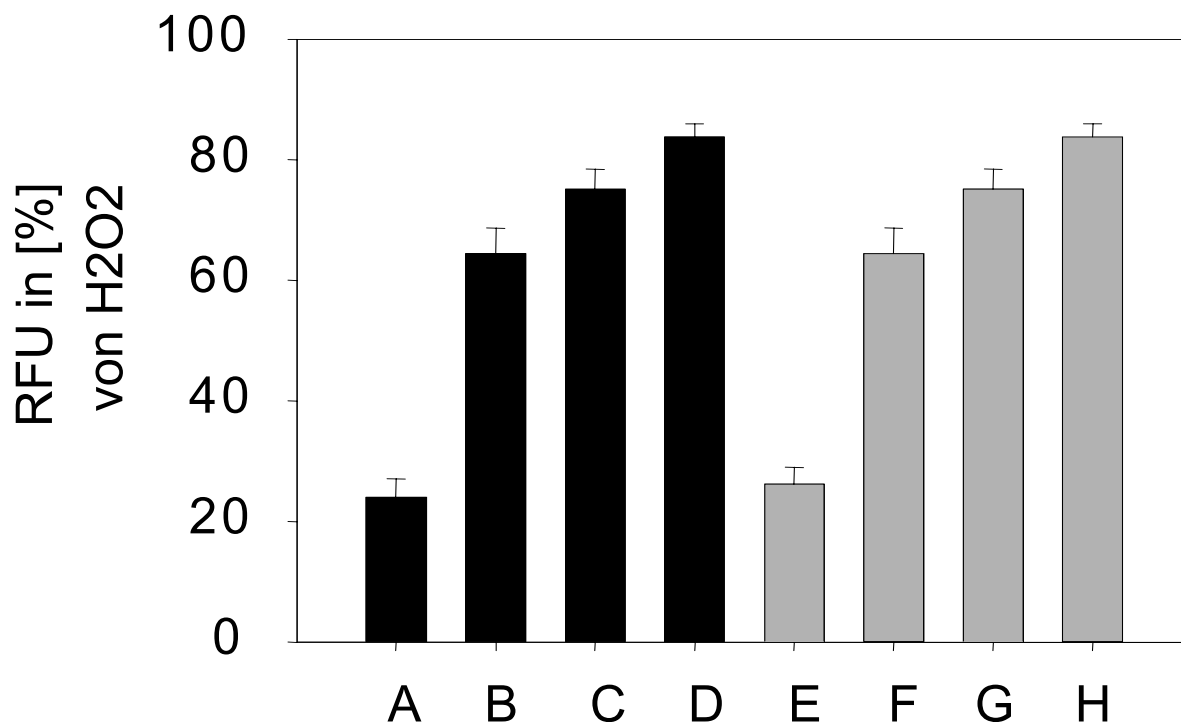


**Abb.6: Gegenüberstellung der konzentrationsabhängige Radikalentstehung nach Bombesin-Stimulation mit und ohne 1mM Natriumazid.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM (100%). **A:** Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM) ohne Natriumazid; **B:** Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM) mit Natriumazid; **C:** DMEM + Bombesin 10<sup>-12</sup> M ohne Natriumazid; **D:** DMEM + Bombesin 10<sup>-9</sup>M ohne Natriumazid; **E:** DMEM + Bombesin 10<sup>-6</sup>M ohne Natriumazid; **F:** DMEM + Bombesin 10<sup>-12</sup>M mit Natriumazid; **G:** DMEM + Bombesin 10<sup>-9</sup>M mit Natriumazid; **H:** DMEM + Bombesin 10<sup>-12</sup>M mit Natriumazid.

### 4.3 Radikalentstehung in mit Dexamethason differenzierten AR42J-Zellen nach Stimulation mit CCK bzw. Bombesin

Es wurde bereits gezeigt, daß differenzierte AR42J-Zellen größere Mengen an Amylase und anderen exokrinen Enzymen produzieren (Sachs et al. 1992). Wir wollten herausfinden, ob durch die Differenzierung der Zellen auch eine größere Menge an Radikalen entsteht. Zu diesem Zweck differenzierte man die Zellen mit 100nM des Glucocorticoids Dexamethason. Dazu gab 100nM Dexamethason ins Zellsuspensat bevor man die Zellen auf 96-Loch-Platten aussäte. Dann ließ man die Zellen 3 Tage im Brutschrank wachsen. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit 50µM DCF-DA. Nach dem Spülen der Zellen mit PBS stimulierte man diese 10 Minuten mit CCK 10<sup>-6</sup> M, CCK 10<sup>-9</sup> M, CCK 10<sup>-12</sup> M. Als Positivkontrolle diente 300µM Wasserstoffperoxyd, als Negativkontrolle DMEM ohne Zusatz. Nach der Stimulation bei 37°C wurde die Platte im Fluorometer gemessen. Bei

Betrachtung der Daten stellt sich heraus, daß nach Differenzierung der Zellen mit 100nM Dexamethason keine signifikante Veränderung gegenüber den undifferenzierten Zellen in der Radikalentstehung vorhanden ist.

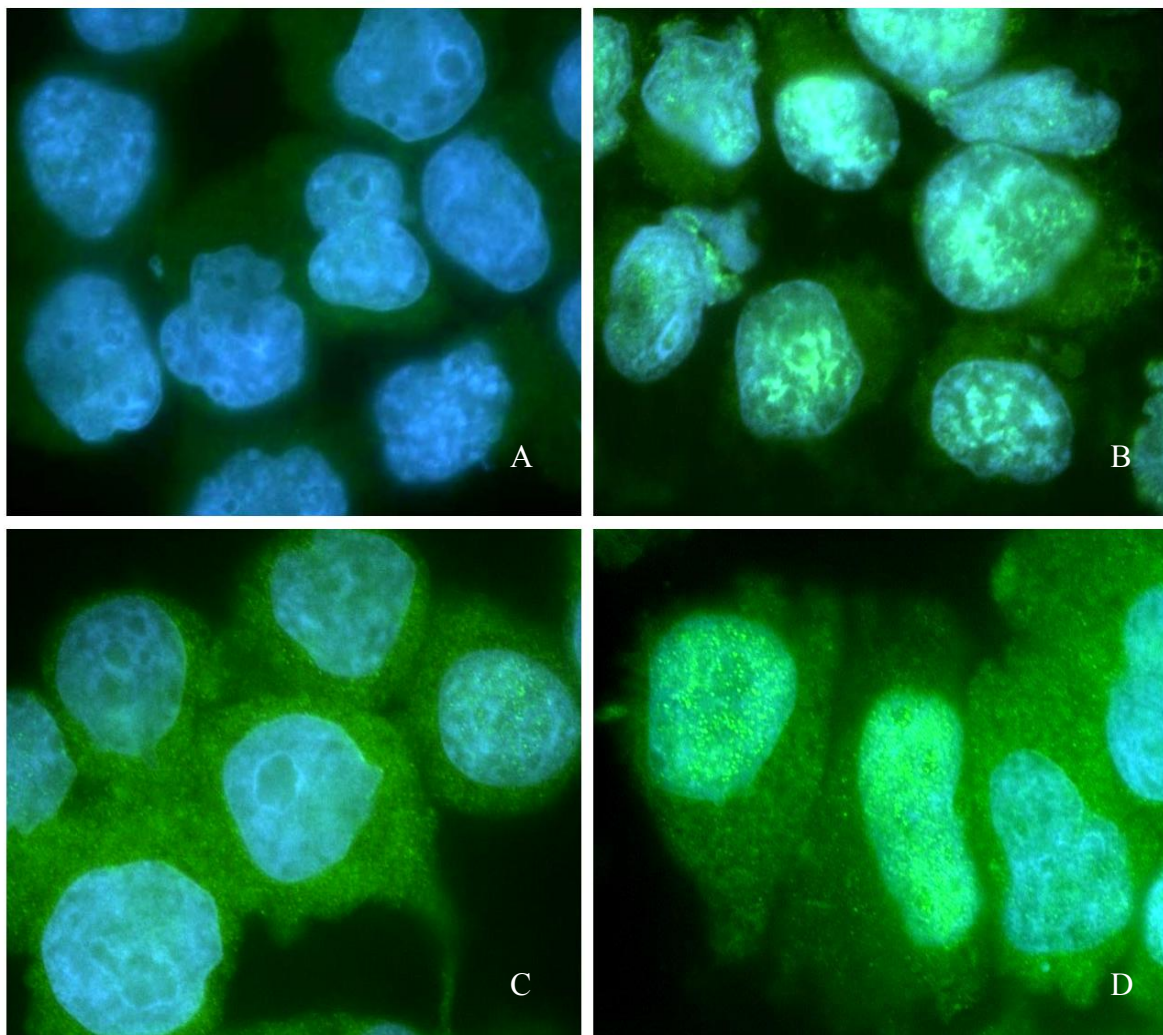


**Abb. 7: Gegenüberstellung der konzentrationsabhängigen Radikalentstehung in differenzierten und undifferenzierten AR42J-Zellen nach CCK-Stimulation.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM (100%), Negativkontrolle nur DMEM. **A:** Negativkontrolle (undifferenzierte Zellen), **B:** CCK 10<sup>-12</sup>M (undifferenzierte Zellen), **C:** CCK 10<sup>-9</sup>M (undifferenzierte Zellen), **D:** CCK 10<sup>-6</sup>M (undifferenzierte Zellen), **E:** Negativkontrolle (differenzierte Zellen), **F:** CCK 10<sup>-12</sup>M (differenzierte Zellen), **G:** CCK 10<sup>-9</sup>M (differenzierte Zellen), **H:** CCK 10<sup>-6</sup>M (differenzierte Zellen).

#### 4.4 Oxidative DNA-Schädigung nach CCK-Stimulation

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Sauerstoffradikale in der Zelle zur DNA-Schädigung führen, indem sie entweder die Desoxyribose oder die verschiedenen Basen modifizieren. Oxidative Modifikationen führen oft zu Strangbrüchen, oxidativer Abbau der verschiedenen Basen zu deren Zerstörung oder Modifikation, so dass Fehlpaarungen die Folge sind. Besonders häufige Basenmodifikationen sind Thymindimerisierungen oder die Entstehung von 8-Hydroxyguanosinresten in der DNA. Diese führen zur Basenpaarung mit Adenin und sind damit mutagen (Löffler 1997). Immunhistochemisch lassen sich 8-Hydroxyguanosinreste mit Hilfe des primären Antikörpers Goat-Anti-8-Hydroxyguanosin in einer Verdünnung von 1:2000 nachweisen. Dieser detektiert DNA-Oxidation in der Zelle

durch Bindung an die 8-Hydroxyguanosinreste. Der verwendete sekundäre Antikörper ist FITC-Donkey-Anti-Goat in einer Verdünnung von 1:200. Als Blocking-Solution wählten wir Aurion Block Donkey unverdünnt. Damit ließ sich darstellen, daß es bereits nach 5 Minuten Stimulation mit supramaximaler CCK-Konzentration (CCK  $10^{-6}$  M) zur DNA-Oxidation im Kern und im Zytoplasma kommt. Nach Stimulation mit  $300\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kommt es zur DNA-Oxidation vor allem im Kern. Auch nach physiologischer CCK-Konzentration (CCK  $10^{-12}$  M) kommt es zur DNA-Oxidation im Kern und Zytoplasma, allerdings ist diese geringer als die DNA-Oxidation nach supramaximaler CCK-Stimulation.



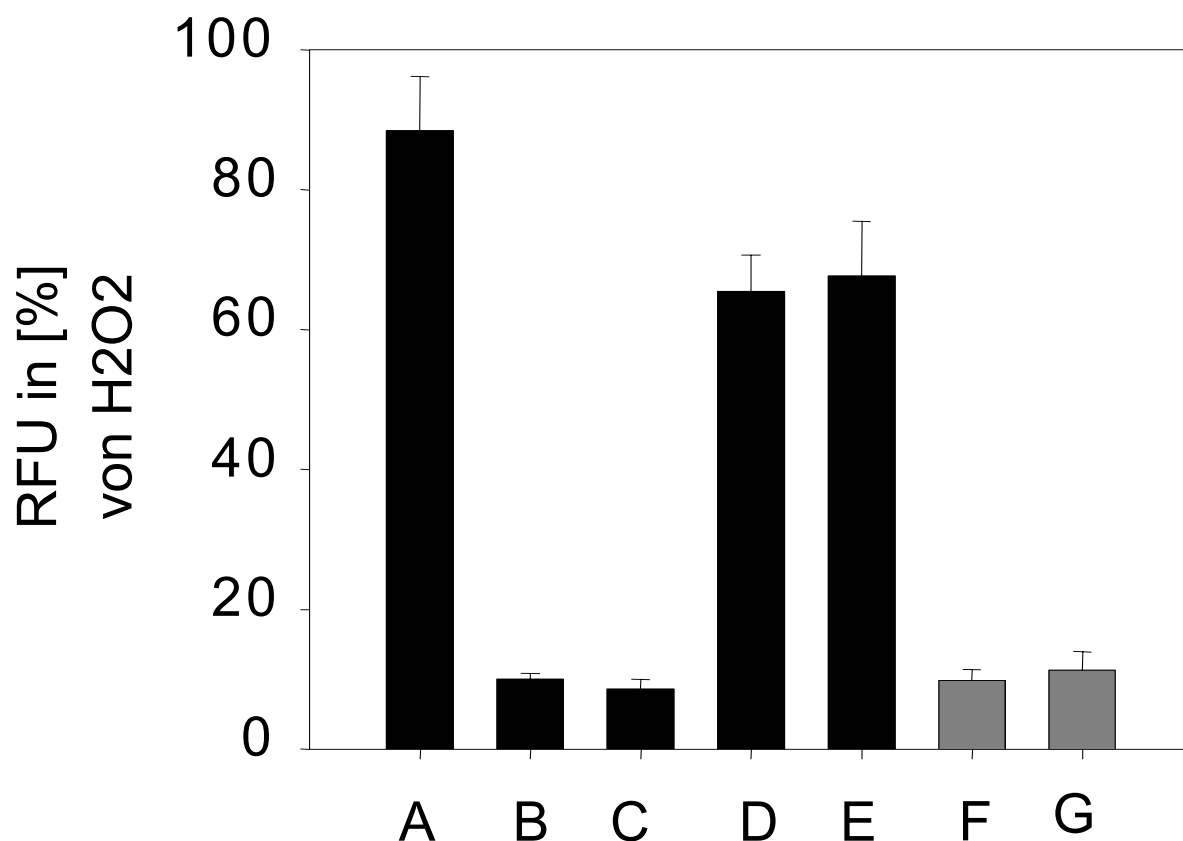
**Abb.8: DNA-Oxidation in AR42J-Zellen.** A: ohne Stimulation, B: nach Stimulation mit  $300\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , C: nach physiologischer CCK-Stimulation (CCK $10^{-12}$  M), D: nach supramaximaler CCK-Stimulation (CCK $10^{-6}$  M).



#### 4.5 Der Radikalfänger N-Acetylcystein senkt die CCK-induzierte Radikalentstehung um 100%

Der Radikalfänger N-Acetylcystein ist ein Donor des Tripeptides Glutathion. Dieses besteht aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin und dient in seiner reduzierten Form der Entgiftung von Peroxiden und der Aufrechterhaltung des reduzierten Zustandes katalytisch wichtiger Cysteinreste. Die Inkubation von AR42J-Zellen mit 20 mM N-Acetylcystein soll die nach CCK-Stimulation produzierten freien Radikale möglichst quantitativ abfangen.

Nach Zugabe von N-Acetylcystein in 20 mM Konzentration erreichen wir erwartungsgemäß einen Rückgang der durch CCK-Stimulation hervorgerufenen Radikalenstehung um ca. 100%. Die entstandenen Radikale werden durch das N-Acetylcystein abgefangen.



**Abb.9: Rückgang der CCK- induzierten Radikalentstehung nach Gabe von N-Acetylcystein.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 µM), Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). **A:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Ca<sup>2+</sup>, **B:** Medium-Ca<sup>2+</sup>, **C:** Medium+Ca<sup>2+</sup>, **D:** CCK-Ca<sup>2+</sup>, **E:** CCK+Ca<sup>2+</sup>, **F:** N-ACC+CCK-Ca<sup>2+</sup>, **G:** N-ACC+CCK+Ca<sup>2+</sup>

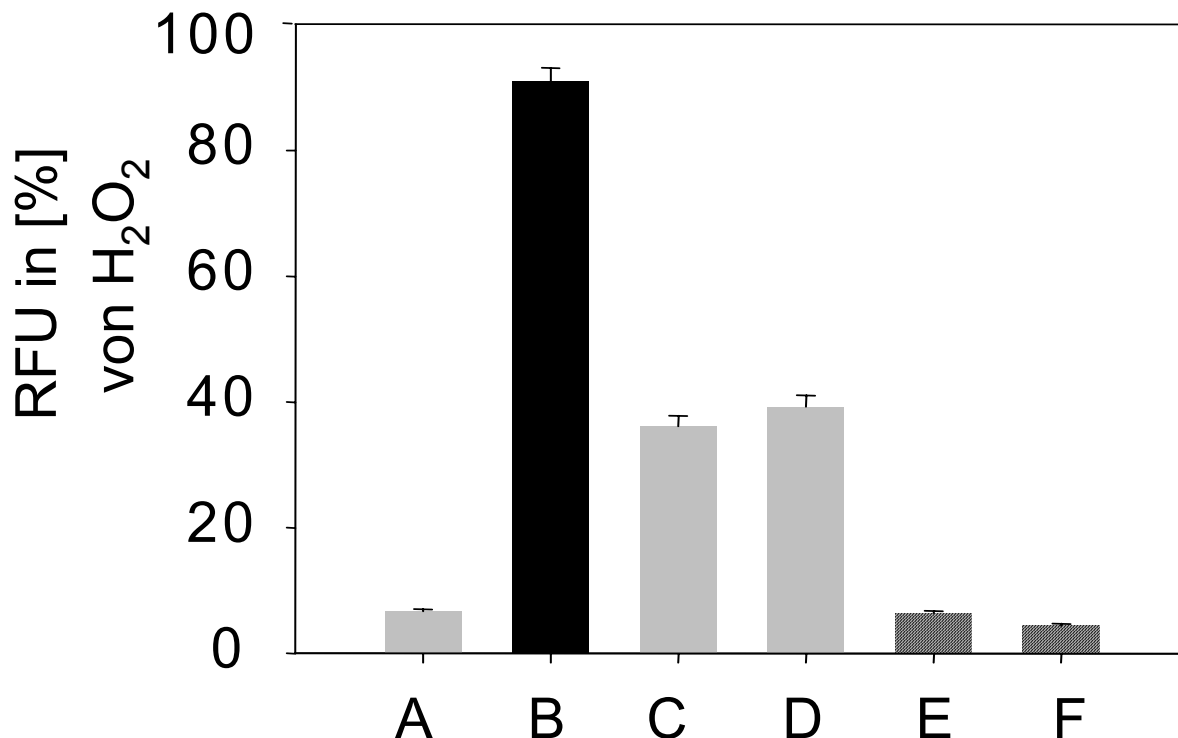
## **4.6 Signalwege der CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen**

Vorausgegangene Untersuchungen weisen darauf hin, daß Pankreas-Azinuszellen bereits in frühen Stadien der Organveränderung infolge toxischer und metabolischer Störungen betroffen sind (Gronroos et al. 1991; Takacs et al. 1994). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen intrazelluläre Veränderungen an der Plasmamembran, die zu Störungen der Membran-abhängigen Signaltransduktion (Saluja, Dawra et al. 1992) oder der intrazellulären Sortierung führen (Lerch, Saluja et al. 1995). Die Signalwege, die zur Bildung von Sauerstoffradikalen in AR42J-Zellen führen, wurden mittels Kinase-Inhibitoren untersucht, die verschiedene Signalwege in der Zelle blockieren. Die Radikalentstehung sinkt also nach Inhibition der Kinasen, die zur Radikalentstehung beitragen. Für die nachfolgenden Versuche wurden auf 96-Loch-Platten ausgesäte, 25 Stunden gehungerte AR42J-Zellen 30 Minuten mit DCF-DA inkubiert. Alle hier verwendeten Inhibitoren wurden in den entsprechenden Konzentrationen 45 min. inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff DCF-DA wurde 30 min. inkubiert. Dann wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten mit CCK bzw Bombesin  $10^{-6}$  M mit und ohne den Inhibitor in den entsprechenden Konzentrationen stimuliert. Als Positivkontrolle diente  $300\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxyd, als Negativkontrolle DMEM ohne Zusatz. Nach der Stimulation wurde die Platte im Fluorometer bei  $37^{\circ}\text{C}$  gemessen. Da die Lösungsmittel der jeweiligen Stock-Lösung der Inhibitoren, wie PBS und DMSO, Auswirkungen auf die Radikalentstehung hatten, wurden diese zu allen verwendeten Reagenzien gleichermaßen zugefügt: 0,1% DMSO bzw. 1% PBS.

### **4.6.1 JMV-180, ein partieller Agonist an CCK-Rezeptoren**

JMV-180 ist ein CCK-Analogon und stimuliert wie CCK die Amylase Sekretion durch den CCK-A-Rezeptor in Rattenpankreas-Azinuszellen (Stark et al. 1989; Matozaki et al. 1990; Tsunoda et al. 1996). Vorrausgesetzt, dass beide, CCK und JMV-180 an die gleiche Seite des CCK-A-Rezeptors binden (Stark et al. 1989), kann vermutet werden, dass JMV-180 als ein Agonist für den hochaffinen Zustand und als ein Antagonist für den niedrigaffinen Zustand des Rezeptors agiert (Tsunoda et al. 1996). In dem dargestellten Diagramm erkennt man, dass JMV in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  und  $3\mu\text{M}$  die CCK-induzierte Radikalenstehung ohne Vorinkubation um 100% senkt. Nach alleiniger Stimulation mit JMV-180 kommt es zur 60%

igen Radikalenstehung. JMV-180 agiert daher als typischer partieller Agonist an den CCK-Rezeptoren der AR42J-Zelle.

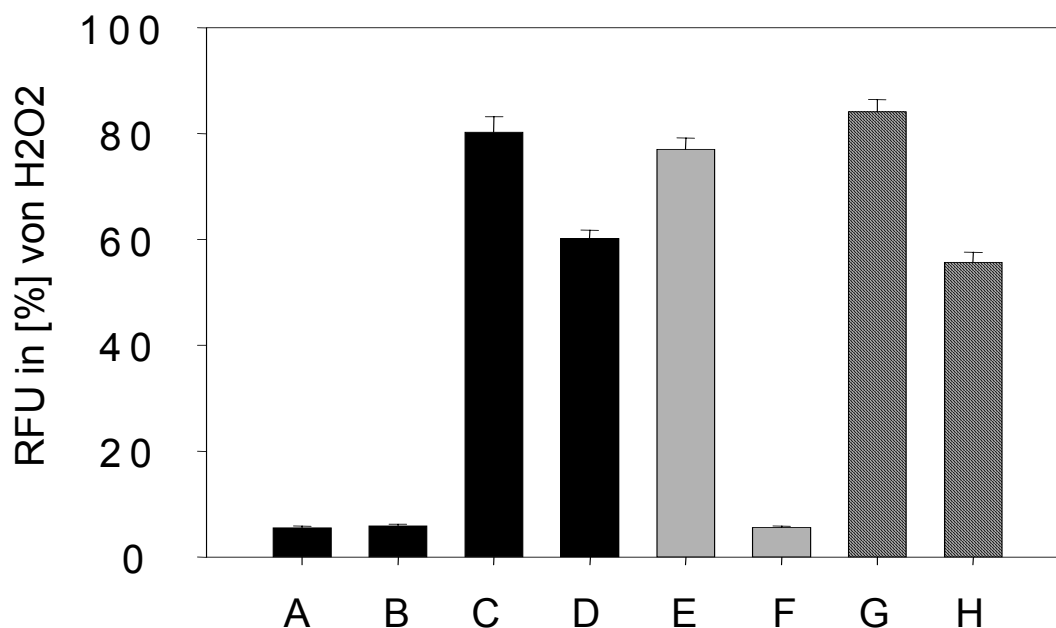


**Abb.10:** Das CCK-Analogon JMV-180 führt zu einer 100%igen Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung und zu einer 60%igen Radikalbildung nach alleiniger Stimulation mit JMV-180. A: Medium, B: CCK  $10^{-6}$ M, C: JMV-180  $1\mu$ M, D: JMV-180  $3\mu$ M, E: JMV-180  $1\mu$ M+CCK  $10^{-6}$ M, F: JMV-180  $3\mu$ M+CCK  $10^{-6}$ M

#### 4.6.2 CCK vermittelte, EGF induzierte Radikalentstehung in AR42J-Zellen

Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor. Wenn EGF an den Rezeptor bindet, kommt es zur Autophosphorylierung von intrazellulären Tyrosylresten. Dieser Vorgang wird durch eine ligandenaktivierte Tyrosinkinase katalysiert. Die Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) bindet an die phosphorylierten Tyrosylreste und wird so aktiviert. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol in IP<sub>3</sub> und Diacylglycerol (Berridge and Irvine 1989). IP<sub>3</sub> bewirkt eine rasche Freisetzung von Kalzium aus im ER lokalisierten Speichern (Streb, Irvine et al. 1983). Diacylglycerol aktiviert Proteinkinase-C. Rezeptortyrosin-Kinasen lassen sich durch Tyrphostine spezifisch inaktivieren. Tyrphostine sind eine neue Klasse spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitoren, die von der Struktur des Adenosin abgeleitet sind. ATP bindet in

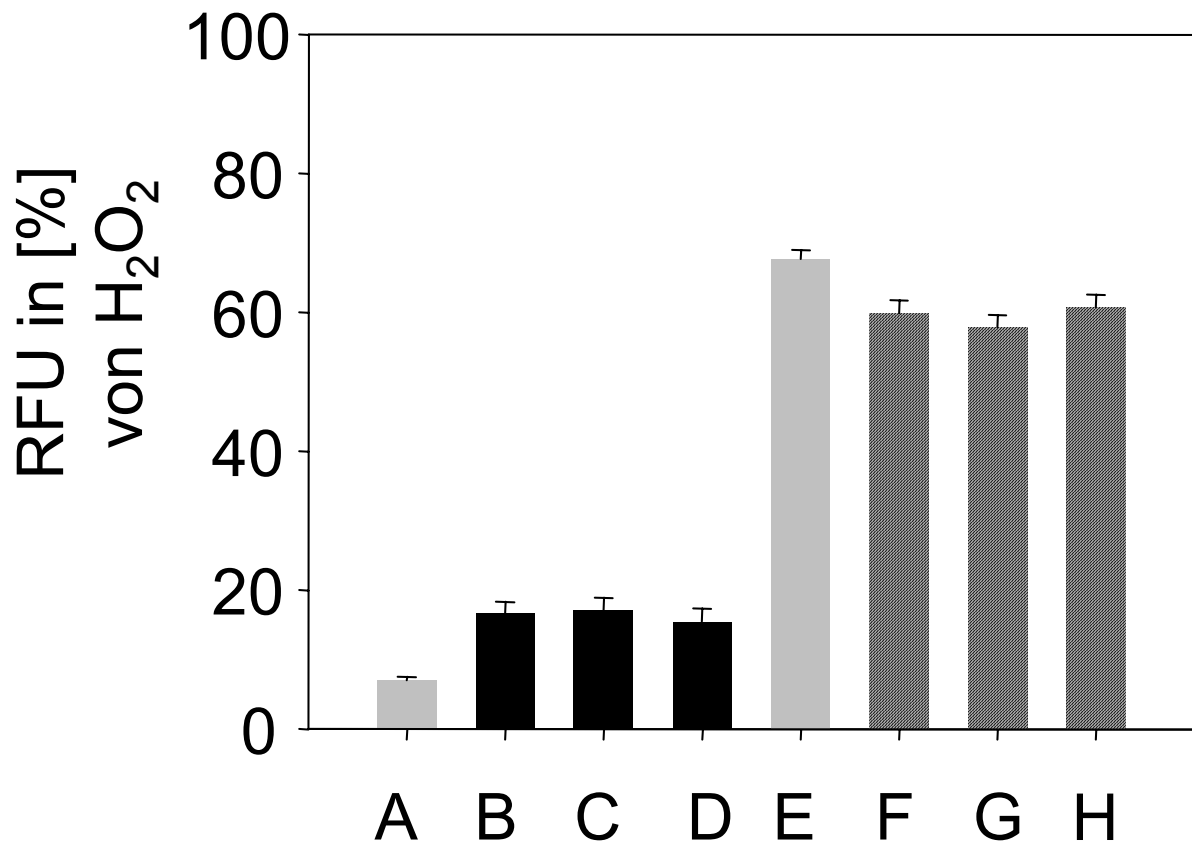
einer katalytischen Tasche innerhalb der Kinasedomäne der Tyrosinkinase, Tyrphostine sind spezifisch den Bindungstaschen der einzelnen Rezeptoren angepaßt. Für EGFR existiert das hochspezifische Tyrphostin AG 1478. Wir haben festgestellt, daß der spezifische EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor (RTK-Inhibitor) AG1478 zu einer konzentrationsabhängigen Senkung der Radikalenstehung nach supramaximaler-CCK-Konzentration führt. Dieses spricht für eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch CCK. Daher haben wir untersucht, ob es auch nach EGF-Stimulation in einer Konzentration von 2ng/ml zur Radikalfreisetzung kommt. Dabei stellten wir fest, daß die Radikalentstehung nach EGF-Stimulation genauso hoch ist wie nach CCK-Stimulation. Nach Gabe des RTK-Inhibitors AG1478 kommt es nach EGF-Stimulation zu einer Senkung der Radikalentstehung um 100%. Wenn wir mit CCK und EGF gleichzeitig stimulieren, potenziert sich ihre Wirkung auf die Radikalentstehung nicht. Nach Hemmung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase nach gleichzeitiger CCK- und EGF-Stimulation kommt es zu einer Senkung der Radikalbildung um 20%. Dieses entspricht der Senkung der Radikalbildung nach EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibition nach CCK-Stimulation ohne gleichzeitige EGF-Stimulation. Wir halten fest: Nach EGF-Stimulation kommt es zur Radikalbildung, welche durch den RTK-Inhibitor AG1478 praktisch ausgeschaltet wird. EGF und CCK potenzieren sich nicht in ihrer Wirkung auf die Radikalentstehung, nach Hemmung durch AG1478 kommt es zum Rückgang der Radikalentstehung wie bei AG1478 mit CCK.



**Abb.11: Radikalentstehung nach Stimulation mit EGF 2ng/ml.** A: Negativkontrolle, B: Negativkontrolle + AG1478 (10µM), C: CCK 10<sup>-6</sup>M, D: CCK 10<sup>-6</sup>M + AG1478 (10µM) E: EGF 2ng/ml, F: EGF 2ng/ml + AG1478 (10µM), G: EGF 2ng/ml + CCK 10<sup>-6</sup>M, H: EGF 2ng/ml + CCK 10<sup>-6</sup>M + AG148 (10µM).

### **4.6.3 Die Funktion von G-Proteinen bei der CCK-induzierten Radikalenstehung in AR42J-Zellen**

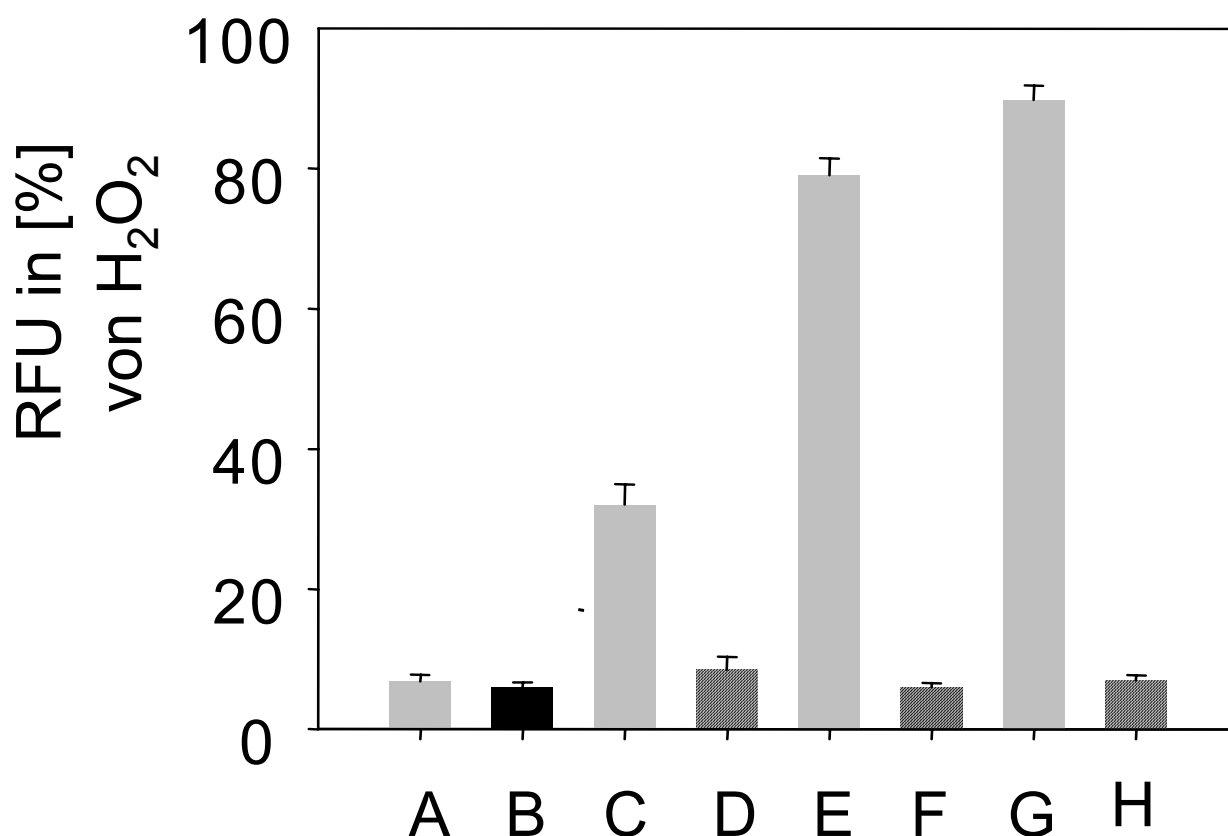
G-Proteine sind häufig an der hormonellen Signaltransduktion beteiligt. Sie dienen als molekulare Schalter und kommen in zwei unterschiedlichen Zuständen vor, die sich nur durch das jeweils gebundene Guaninnucleotid unterscheiden. In aktiver Form sind sie mit GTP beladen und imstande, eine Reihe unterschiedlicher Proteine zu aktivieren. Es gibt 50 unterschiedliche Isoformen von G-Proteinen, die sich in 3 Untergruppen einteilen lassen, von denen die heterotrimeren, großen G-Proteine für die hormonelle Signaltransduktion von besonderer Bedeutung sind. (Kaziro 1991; Lincoln 1993; Löffler 1997). Der CCK-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter 7-Transmembrandomänen-Rezeptor. Dieser aktiviert die heterotrimeren G-Proteine. Die CCK-B-Rezeptor-vermittelte PLC  $\beta$ -Aktivierung wird dabei nicht durch Pertussis-Toxin inhibiert, was eine Aktivierung über ein  $G_q$ -gekoppeltes G-Protein nahelegt (Matzotaki et al. 1988). Pertussis Toxin ist ein Inhibitor des  $G_i$ -Proteins, Es katalysiert die ADP-Ribolysierung von  $G_i$  und löst  $G_i$  von den Rezeptoren. Es wurden 200 ng/ml Pertussis Toxin eingesetzt. Dann wurde eine Zeitreihe erstellt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden kann man eine erhebliche Zunahme der Radikalbildung feststellen (hier nicht gezeigt). Daher wurden Inkubationszeiten bis 1 ½ Stunden angewandt, wobei sich zeigt, dass Pertussis Toxin nicht zu einer Senkung der CCK-induzierten Radikalbildung führt.



**Abb.12: Keine Wirkung von Pertussis Toxin 200ng/ml nach einer Inkubationszeit von 30 min., 1h, 1 ½ h.**  
A: Negativkontrolle B: Negativkontrolle + PTx (200ng/ml, 30 min. Vorinkubation), C: Negativkontrolle + PTx (200ng/ml, 1h Vorinkubation), D: Negativkontrolle + PTx (200ng/ml, 1 ½ h Vorinkubation), E: CCK 10<sup>-6</sup> M, F: CCK 10<sup>-6</sup> M + PTx ( 200ng/ml, 30 min. Vorinkubation), G: CCK 10<sup>-6</sup> M + PTx (200ng/ml, 1 h Vorinkubation), H: CCK 10<sup>-6</sup> M + PTx (200ng/ml, 1 ½ h Vorinkubation)

#### 4.6.4 Die Funktion der Phospholipase C in der CCK-induzierten Radikalenstehung in AR42J-Zellen

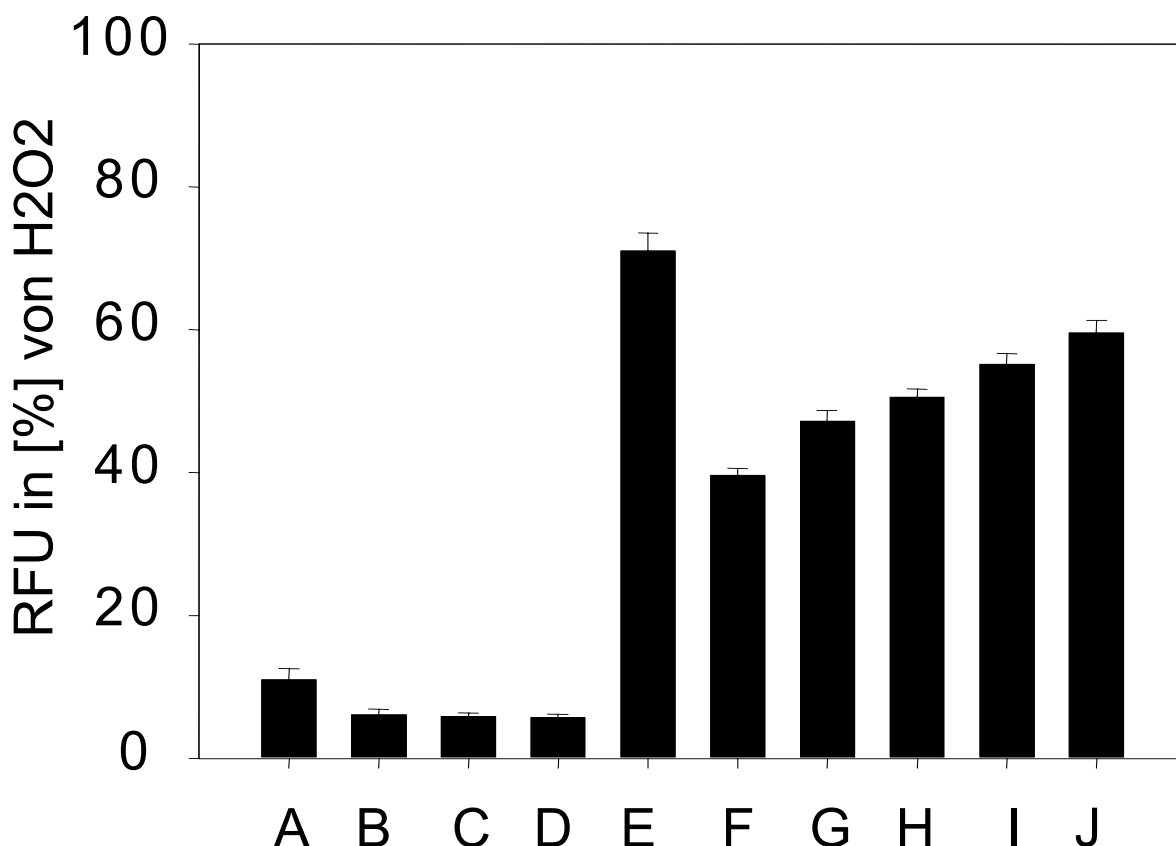
Für die Bildung von InsP3 (Inositol-(1,4,5)-triphosphat) aus PIP2 wird eine spezifische Phospholipase, die Phospholipase C  $\beta$ , benötigt. Ein weiteres Reaktionsprodukt außer InsP3 ist Diacylglycerin (DAG), welches in der Membran zurückbleibt. InsP3 erhöht die cytoplasmatische Kalziumkonzentration durch Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Löffler 1997). Dieses führt im Pankreas zu einer Stimulierung sekretorischer Prozesse. Ein spezifischer Inhibitor der PLC  $\beta$  ist U73122 in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$ . Nach Gabe dieses Inhibitors kommt es zur 100%igen Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen. Die PLC  $\beta$  ist also in den zur CCK-induzierten Radikalentstehung führenden Signaltransduktionsweg eingebunden.



**Abb.13: 100%ige Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung nach Gabe des PLC  $\beta$  -Inhibitors U73122 ( $5\mu\text{M}$ ).** A: Negativkontrolle, B: Negativkontrolle + U73122 ( $5\mu\text{M}$ ), C: CCK  $10^{-12}$  M, D: CCK  $10^{-12}$  M + U73122 ( $5\mu\text{M}$ ), E: CCK  $10^{-9}$  M, F: CCK  $10^{-9}$  M + U73122 ( $5\mu\text{M}$ ) G: CCK  $10^{-6}$  M, H: CCK  $10^{-6}$  M + U73122 ( $5\mu\text{M}$ )

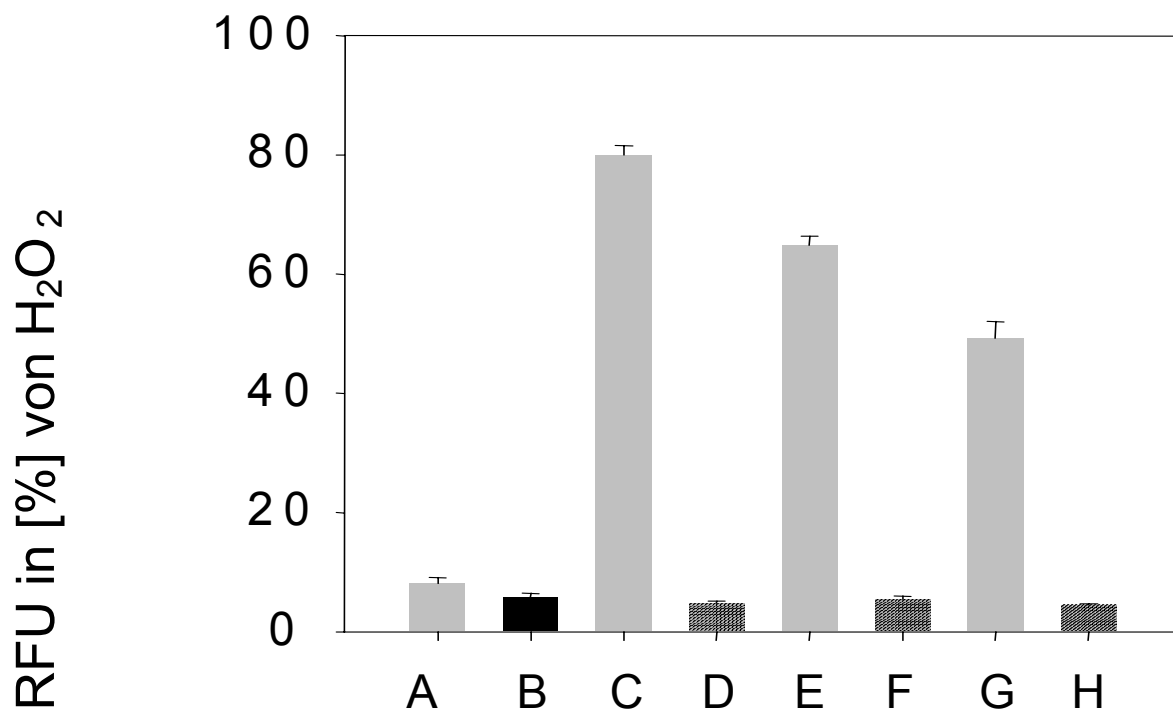
#### 4.6.5 Die Funktion von Tyrosinkinasen bei der CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen

Src-Proteinkinasen gehören zur Familie der Tyrosinkinasen. Die Funktion von Src-Kinasen in der Radikalentstehung wurde mittels der Src-Kinase-Inhibitoren PP-2, Genistein und Herbimycin untersucht. PP-2 wird zur Hemmung von SRC-Kinasen in einer Konzentration von 5-20 $\mu$ M verwendet. Man sieht eine signifikante, konzentrationsabhängige Senkung der Radikalentstehung nach Gabe von PP-2 zusammen mit CCK  $10^{-6}$  M gegenüber einer Stimulation mit CCK  $10^{-6}$  M alleine. Auch nach Gabe von Genistein (10 $\mu$ M) erkennt man eine signifikante Senkung der Radikalentstehung zusammen mit CCK  $10^{-6}$  M gegenüber einer Stimulation mit CCK  $10^{-6}$  M alleine, dieses Mal auf die ein Viertel des Vergleichwertes. Nach Gabe von Herbimycin in einer Konzentration von 2  $\mu$ M sieht man einen Rückgang der CCK-induzierten Radikalentsteung um 100%. Dieses spricht dafür, daß bestimmten SRC-Kinasen eine Rolle in der Radikalentstehung zukommt.

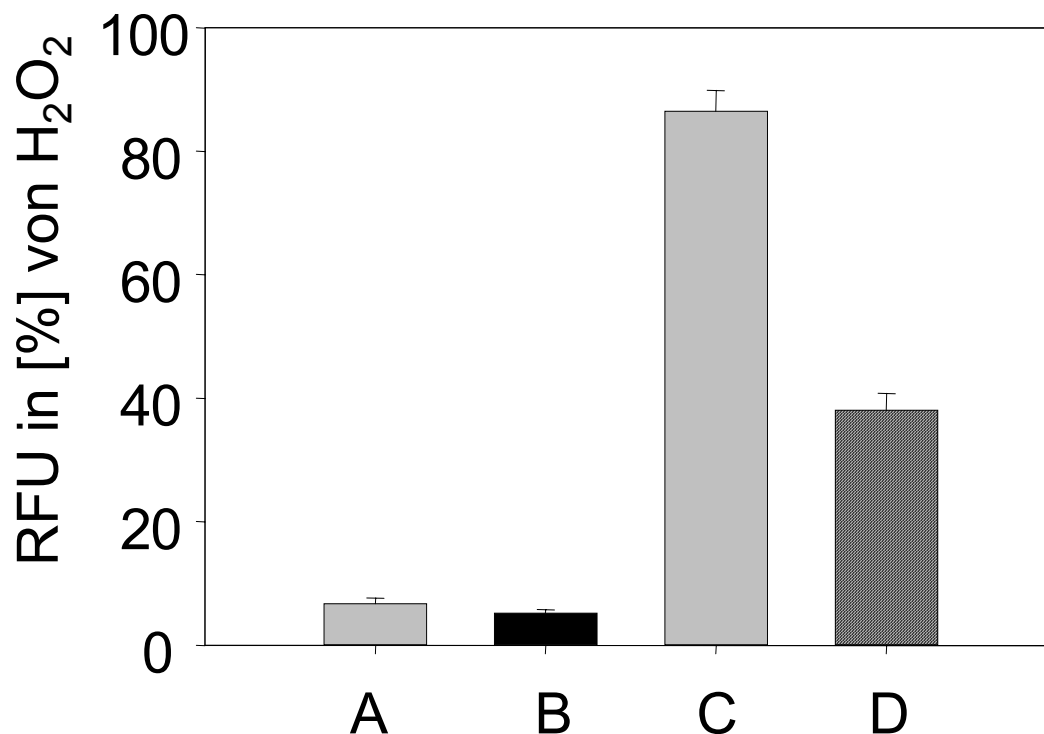


**Abb.14: Konzentrationsabhängige Senkung der Radikalentstehung nach supramaximaler CCK-Stimulation durch den Src-Kinase-Inhibitor PP-2.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300  $\mu$ M, Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). **A:** Negativkontrolle, **B:** Negativkontrolle + PP-2 (100 $\mu$ M), **C:** Negativkontrolle + PP-2 (20 $\mu$ M), **D:** Negativkontrolle + PP-2 (1 $\mu$ M), **E:** CCK  $10^{-6}$ M, **F:** CCK  $10^{-6}$ M + PP-2 (100 $\mu$ M), **G:** CCK  $10^{-6}$ M + PP-2 (20 $\mu$ M), **H:** CCK  $10^{-6}$ M + PP-2 (5 $\mu$ M), **I:** CCK  $10^{-6}$ M + PP-2 (1 $\mu$ M), **J:** CCK  $10^{-6}$ M + PP-2 (100nM)





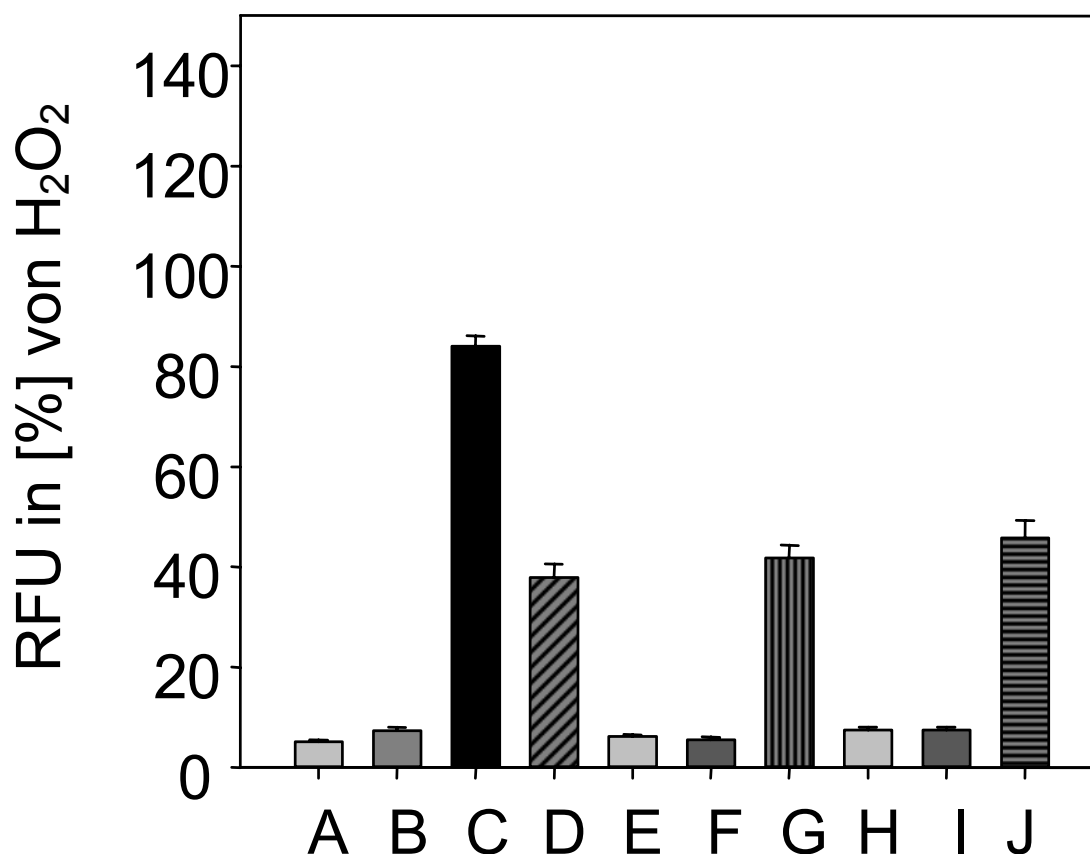
**Abb.15: 100%ige Senkung der Radikalentstehung nach supramaximaler CCK-Stimulation durch den Kinase-Inhibitor Herbimycin.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM, Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). **A:** Negativkontrolle, **B:** Negativkontrolle + Herbimycin (1µM), **C:** CCK 10<sup>-6</sup> M, **D:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Herbimycin (1µM), **E:** CCK 10<sup>-9</sup> M, **F:** CCK 10<sup>-9</sup> M + Herbimycin (1µM), **G:** CCK 10<sup>-12</sup> M, **H:** CCK 10<sup>-12</sup> M + Herbimycin (1µM)



**Abb.16: 50% ige Senkung der Radikalentstehung nach supramaximaler CCK-Stimulation durch den Src-Kinase-Inhibitor Genistein.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM, Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). **A:** Negativkontrolle, **B:** Negativkontrolle + Genistein (100 µM), **C:** CCK 10<sup>-6</sup> M, **D:** CCK 10<sup>-6</sup> M+ Genistein (100 µM)

#### 4.6.6 Eine Kombination der Src-Kinasen-Inhibitoren PP-2 und Genistein mit Natriumazid führt nicht zu einer Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung um 100%

Da Genistein, wie bereits dargestellt, zu einer Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung um 75% führt und PP-2 die CCK-induzierte Radikalentstehung konzentrationsabhängig um 20-40% senkt, zeigen die nächsten Ergebnisse die Senkung der CCK-induzierten Radikalbildung nach Kombination von jeweils PP-2 (10 $\mu$ M) oder Genistein (10 $\mu$ M) mit Natriumazid (1mM), welches alleine die CCK-induzierte Radikalentstehung um 50% senkt. Wir können feststellen, daß die Radikalentstehung durch diese Kombination nicht weiter sinkt, als mit Natriumazid alleine.

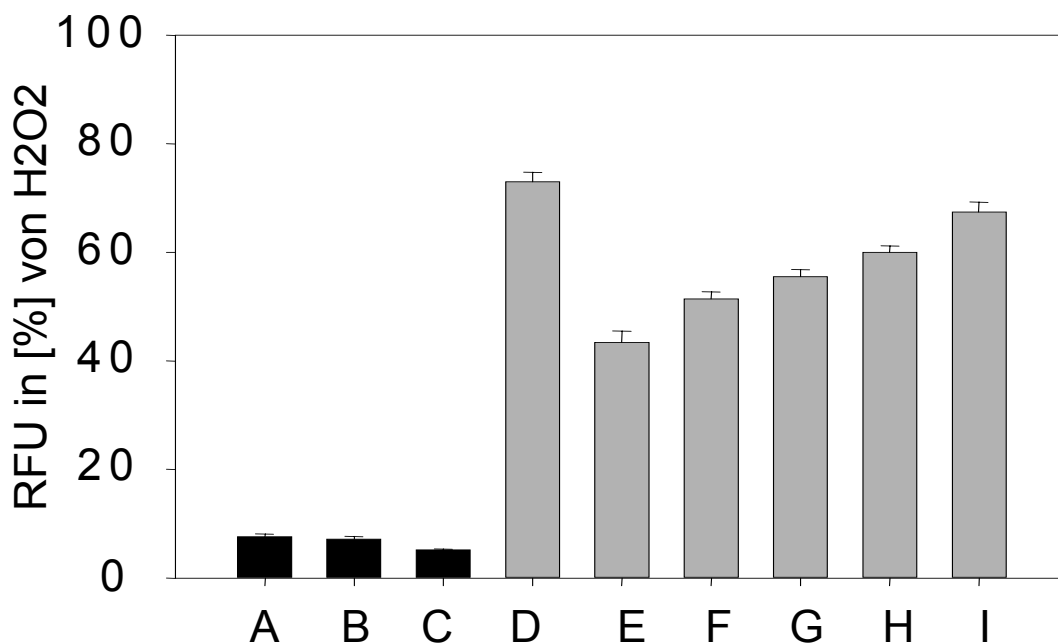


**Abb.17: Kombination von Kinase-Inhibitoren (Genistein und PP-2) mit Natriumazid.**

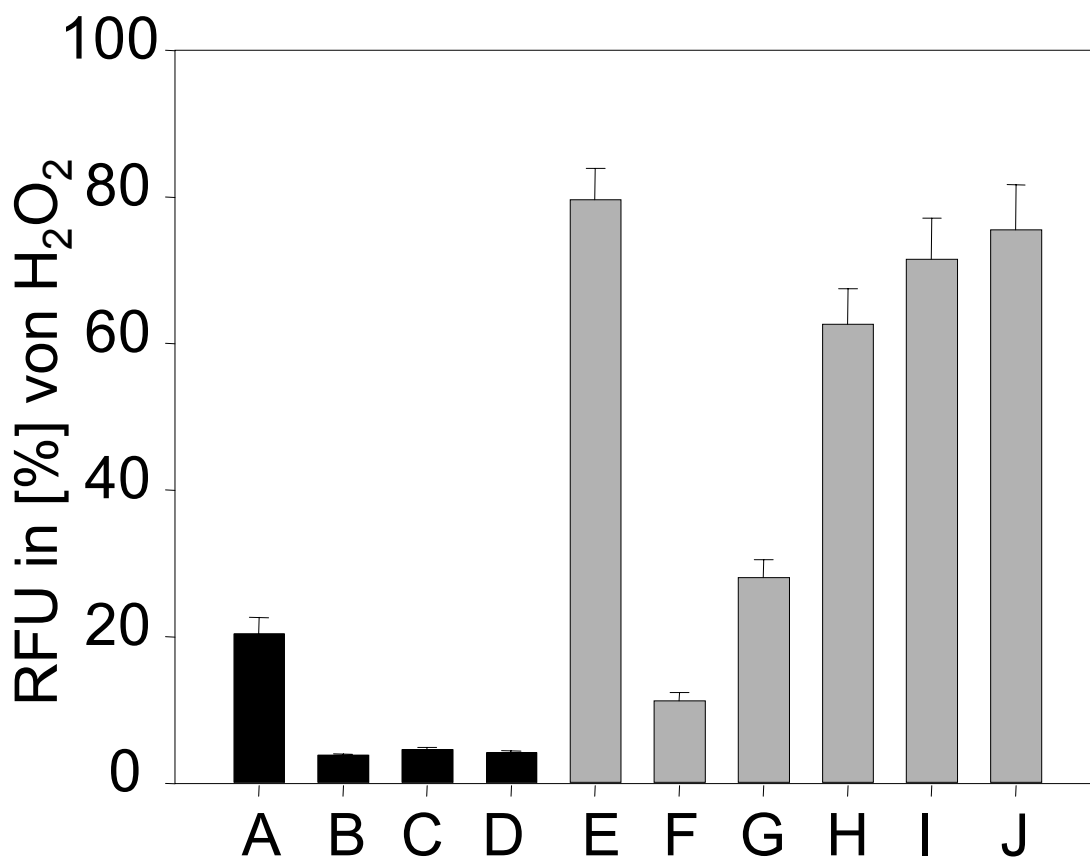
**A:** Negativkontrolle, **B:** Negativkontrolle + Natriumazid 1mM, **C:** CCK 10<sup>-6</sup>M, **D:** CCK 10<sup>-6</sup>M + Natriumazid 1mM, **E:** PP-2 (10 $\mu$ M), **F:** PP-2 (10 $\mu$ M) + Natriumazid (1mM), **G:** CCK 10<sup>-6</sup>M + Natriumazid (1mM) + PP-2 (10 $\mu$ M), **H:** Genistein (10 $\mu$ M), **I:** Genistein (10 $\mu$ M) + Natriumazid (1mM), **J:** CCK 10<sup>-6</sup>M + Natriumazid (1mM) + Genistein (10 $\mu$ M)

#### 4.6.7 Die Funktion von PI-3-Kinasen bei der Radikalentstehung in AR42J-Zellen

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) sind Lipid-Kinasen, die Phosphatidylinositole (PtdIns) an der D-3 Position des Inositol-Ringes phosphorylieren. Sie werden aktiviert, indem sie an SH2-Domänen (Src-homologe Domäne) von Proteinen binden. Spezifische Inhibitoren sind LY 294002 und Wortmannin. LY294002 hat eine ähnliche Struktur wie ATP und ist daher ein stabiler, spezifischer und kompetitiver Inhibitor der PI-3-Kinase. Wortmannin ist weniger spezifisch und instabil in wässrigen Lösungen. Es reagiert kovalent mit einem Lysinrest in der ATP-Bindungstasche der PI-3-Kinase. LY294002 wurde in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  und Wortmannin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Nach Gabe von LY 294002 sieht man ein Absinken der Radikalentstehung um ca. 20%, während nach Gabe von Wortmannin in den für PI-3-Kinasen spezifischen Konzentrationen kein signifikantes Absinken der Radikalenstehung zu sehen ist. Dieses spricht dafür, dass PI-3-Kinasen an der Radikalentstehung nur geringfügig beteiligt sind.



**Abb.18: Konzentrationsabhängige Senkung der Radikalentstehung nach supramaximaler CCK-Stimulation durch den PI-3-Kinase-Inhibitor LY294002.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300  $\mu\text{M}$ , Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). **A:** Negativkontrolle, **B:** Negativkontrolle + LY294002 (20 nM), **C:** Negativkontrolle + LY 294002 (10  $\mu\text{M}$ ), **D:** CCK 10<sup>-6</sup> M, **E:** CCK 10<sup>-6</sup> M + LY294002 (50  $\mu\text{M}$ ), **F:** CCK 10<sup>-6</sup> M + LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ), **G:** CCK 10<sup>-6</sup> M + LY294002 (1  $\mu\text{M}$ ), **H:** CCK 10<sup>-6</sup> M + LY294002 (100 nM), **I:** CCK 10<sup>-6</sup> M + LY294002 (20 nM)

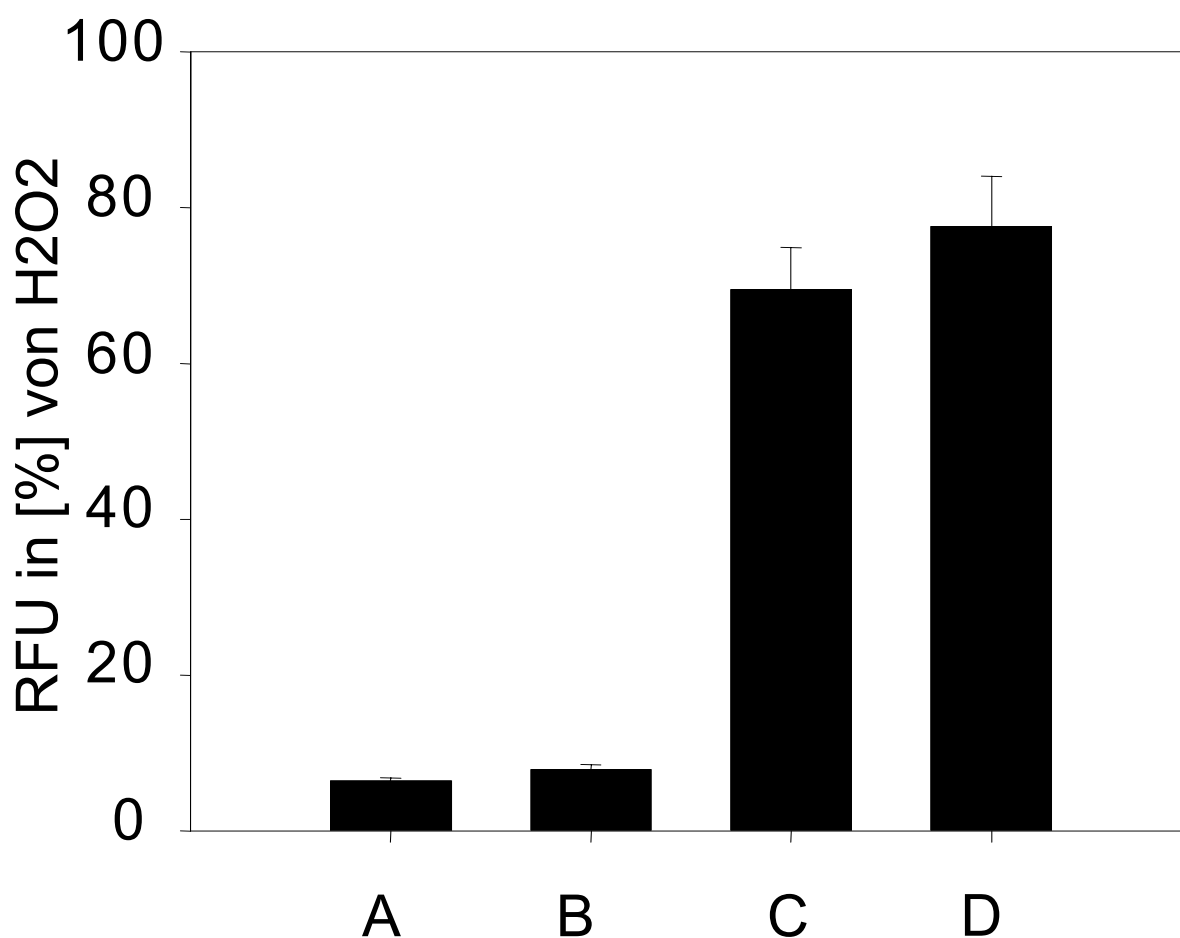


**Abb.19: Konzentrationsabhängige Senkung der Radikalentstehung nach supramaximaler CCK-Stimulation durch den PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM, Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). **A:** Negativkontrolle, **B:** Negativkontrolle + Wortmannin (100 µM), **C:** Negativkontrolle + Wortmannin (1 µM), **D:** Wortmannin (20 nM) **E:** CCK 10<sup>-6</sup> M, **F:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Wortmannin (100 µM), **G:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Wortmannin (10 µM), **H:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Wortmannin (100 nM), **I:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Wortmannin (20 nM)

#### 4.6.8 Die Funktion von MAPK-Kinasen bei der Radikalentstehung in AR42J-Zellen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sind für die Induktion der für die mitogene Antwort verantwortlichen Gene von besonderer Bedeutung. Sie werden durch eine Phosphorylierungskaskade aktiviert, wobei das primäre Ereignis die Aktivierung der Raf-Kinase durch ein als Ras bezeichnetes G-Protein ist. Ras ist seinerseits über die Adapterproteine SOS und Grb 2 mit den Rezeptortyrosinkinasen verknüpft. MAPK wandern in den Kern und aktivieren dort durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren. MAPK wird manchmal ERK (extrazellulär regulierte Kinase) genannt (Löffler 1997); Avruch et al. 1994). Ein spezifischer MAPK-(Erk-2)-Inhibitor ist PD 98,059. PD 98,059 hemmt in einer Konzentration von 10 µM spezifisch die MAP-Kinase-Kinase. Dabei erkennt man, daß sich nach Inhibition der MAP-Kinase nichts gegenüber der Kontrolle mit CCK 10<sup>-6</sup> M ohne

Inhibitor an der Radikalentstehung verändert. Dieses zeigt, dass MAP-Kinasen keine Auswirkungen auf die Radikalentstehung in AR42J-Zellen nach supramaximaler CCK-Stimulation haben, also die Wege die zur Radikalbildung führen bereits vor der Aktivierung von MAP-Kinasen abgehen.



**Abb.20: Keine Veränderung der Radikalentstehung nach supramaximaler CCK-Stimulation durch MAPK-Kinase-Inhibitor PD 98,059.** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM, Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). **A:** Negativkontrolle, **B:** Negativkontrolle + PD 98,059 (100µM), **C:** CCK 10<sup>-6</sup>M, **D:** CCK 10<sup>-6</sup>M + PD 98,059 (100µM)

#### 4.6.9 Die Funktion von Proteinkinase A in der CCK-induzierten Radikalenstehung in AR42J-Zellen

Die Proteinkinase A (PKA) wird durch cAMP aktiviert und phosphoryliert daraufhin spezifische Serylreste einer Reihe von Proteinen. Beispiele sind Phosphorylase, Glykogensynthase, hormonsensitive Lipase, Myosinkinase und Cholesterinester-Hydrolase (Löffler 1997). Eine Stimulation der PKA kann die PLC $\beta$  aktivieren, so dass diese ein Kalzium-Signal generiert. (Piiper et al. 2000). Diese Antwort könnte durch sequentielle Aktivierung von G<sub>s</sub> und G<sub>i</sub>, mit Hilfe der PKA, vermittelt werden (Luo et al. 1999). Ein spezifischer Inhibitor der PKA ist der PKA-Inhibitor 14-22 Amid. Dieser hemmt die Proteinkinase A spezifisch in einer Konzentration von 10  $\mu$ M. Nach Gabe dieses Inhibitors stellt man fest, dass die CCK-induzierte Radikalentstehung um 100% sinkt. Das bedeutet, dass die PKA ein Baustein der zur Radikalbildung führenden Signaltransduktion ist.

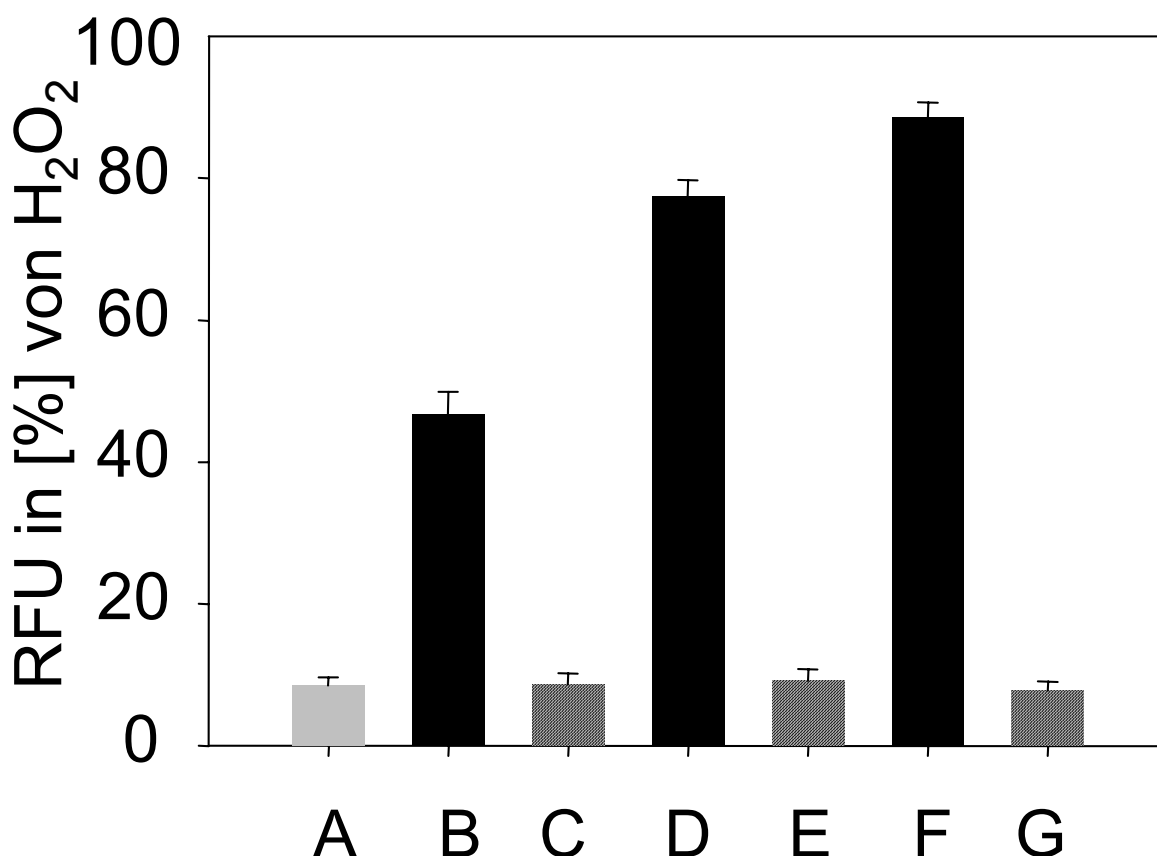
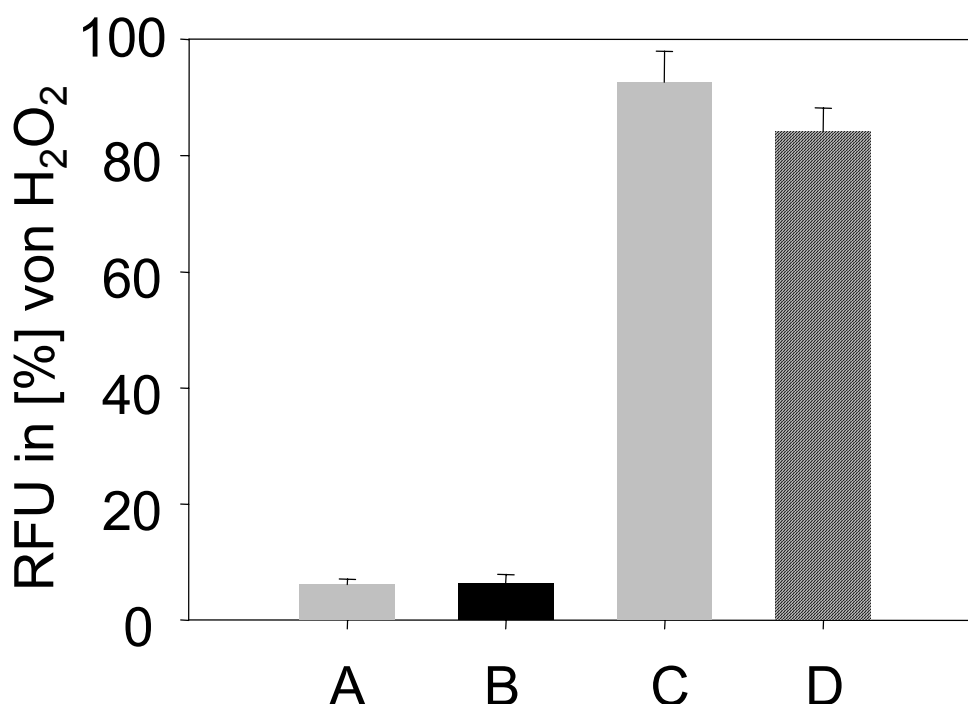


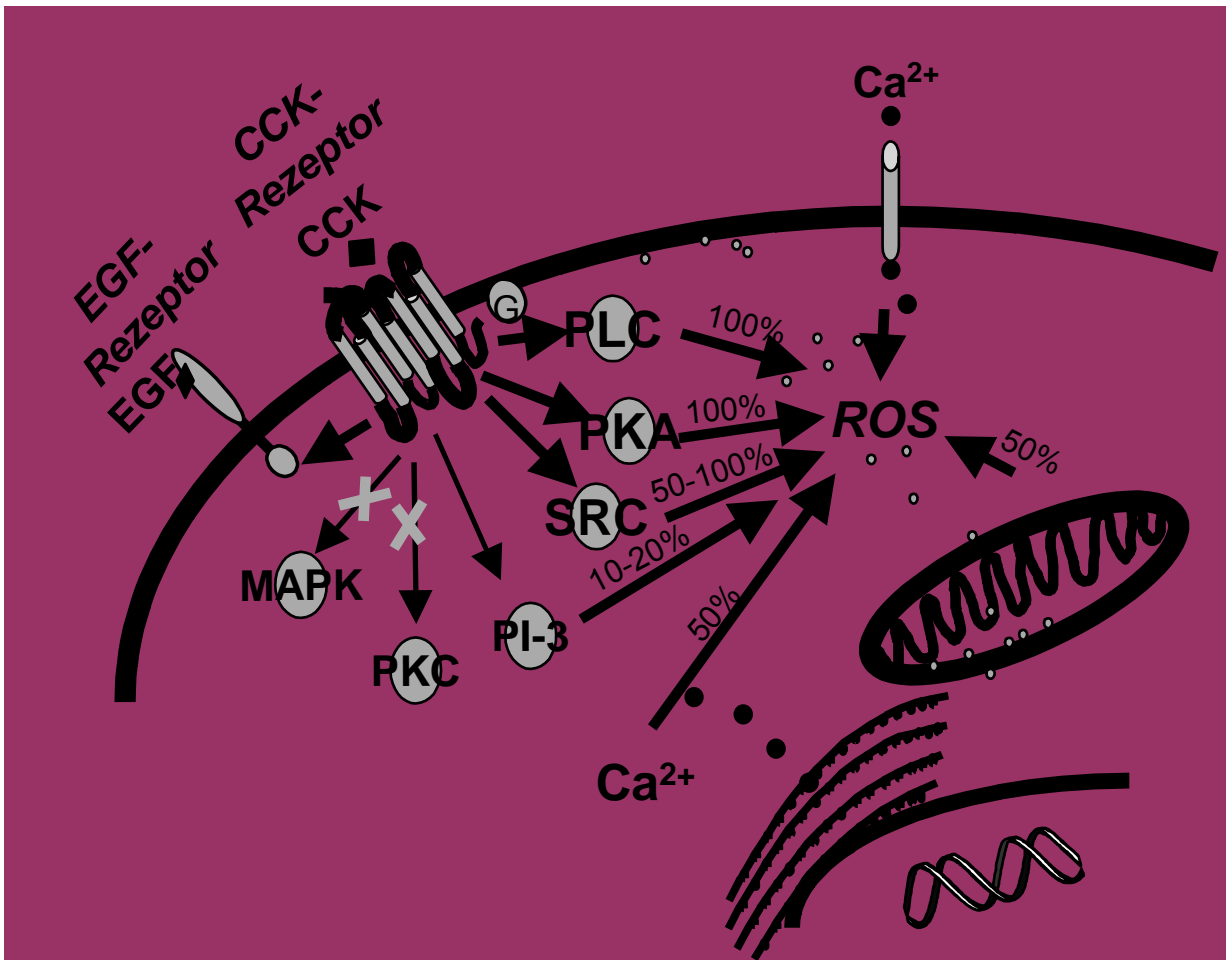
Abb.21: 100%ige Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung nach Gabe von 10 $\mu$ M PKA-Inhibitor 14-22 Amid. A: Negativkontrolle, B: CCK 10<sup>-12</sup> M, C: CCK 10<sup>-12</sup> M + PKA-Inhibitor, D: CCK 10<sup>-9</sup> M, E: CCK 10<sup>-9</sup> M + PKA-Inhibitor, F: CCK 10<sup>-6</sup> M, G: CCK 10<sup>-6</sup> M + PKA-Inhibitor

#### 4.6.10 Die Funktion der Proteinkinase C in der CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen

Die Proteinkinase C (PKC)-Familie besteht aus mindestens 12 Mitgliedern, die alle durch Proteolyse und Membranlipide aktiviert werden und denen eine Kalziumabhängigkeit gemeinsam ist. Die Aktivierung von PKC erfolgt in Anwesenheit von Kalzium durch Bindung an Diacylglycerin, welches an der Innenseite der Plasmamembran gebunden ist. Die Substrate der PKC werden an Seryl- bzw. Threonylresten phosphoryliert und ändern damit ihre biologische Aktivität. Substrate sind das alaninreiche PKC-Substrat mit unbekannter Funktion, der EGF-Rezeptor der dadurch seine Affinität für EGF vermindert (Transmodulation) und das I-kappaB-Protein, das eine Rolle bei der Transkription spielt (Azzi et al. 1992 ; Asaoka et al. 1992). Ein spezifischer Inhibitor ist der PKC-Inhibitor (20-28). Dieser ist in einer Konzentration von 40µM spezifisch für die Proteinkinase C. Man kann erkennen, dass es nach Inhibition der PKC nicht zu einer Senkung der Radikalbildung kommt. Die Proteinkinase C ist daher nicht in die radikalbildende Signaltransduktion nach CCK-Stimulation in AR42J-Zellen involviert.



**Abb.22: Keine Senkung der Radikalenstehung nach Gabe des PKC-Inhibitors (20-28) (40µM).** A: Negativkontrolle, B: Negativkontrolle + PKC-Inhibitor (40 µM), C: CCK 10<sup>-6</sup>M , D: CCK 10<sup>-6</sup>M + PKC-Inhibitor (40 µM)



**Abb. 23: Signalwege in der Pankreasazinuszelle, die zur CCK-induzierten Sauerstoffradikalbildung (ROS) führen, sowie Interaktionen von Sauerstoffradikalen mit Stickoxidradikalen (NO).**

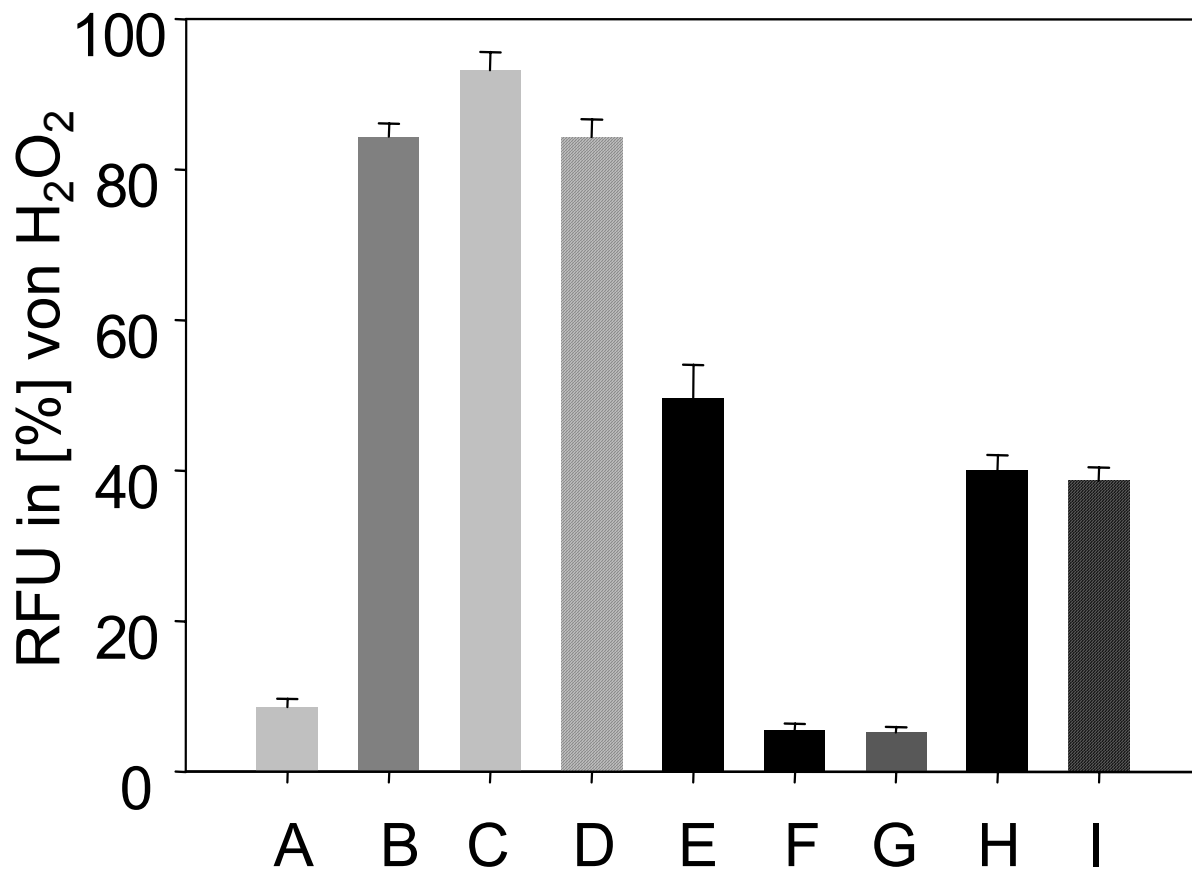
**Unter Inhibition der Phospholipase C (PLC) sowie der Proteinkinase A (PKA) kommt es zur Senkung der Entstehung freier Sauerstoffradikale um 100%. Weiterhin scheinen SRC-Kinasen , PI3-Kinasen und Calcium-Ionen eine erhebliche Rolle bei der Entstehung von Sauerstoffradikalen zu spielen.**



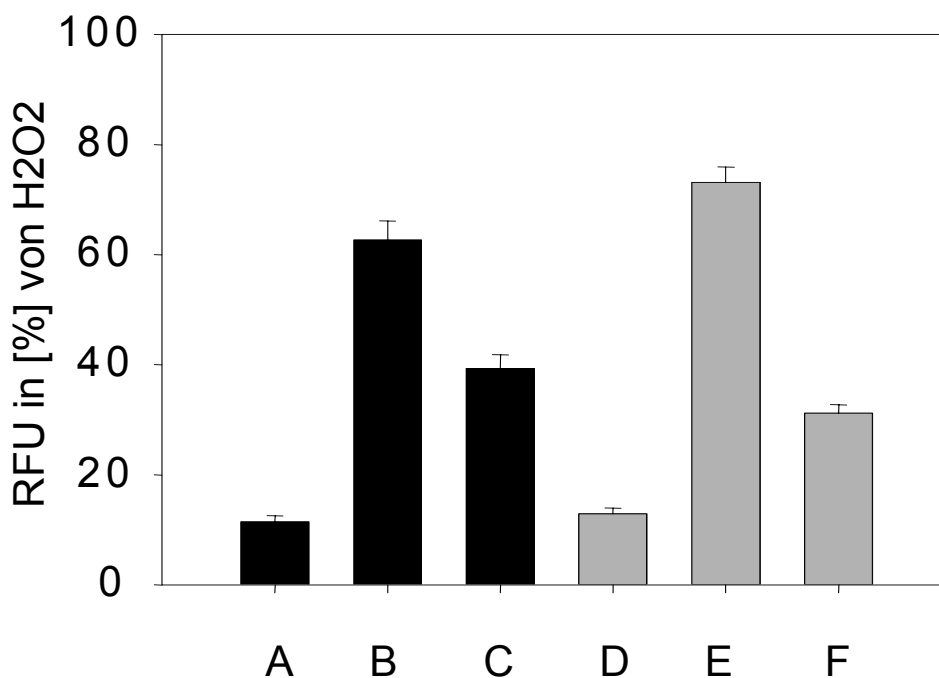
#### 4.7 Kalzium führt zur Freisetzung reaktiver Sauerstoff Spezies

Es gibt viele Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen Kalzium und freien Sauerstoffradikalen (Mirabelli et al. 1989; Nicotera et al. 1988). Bisher bleibt unklar, ob Kalzium zur Radikalfreisetzung führt, oder ob es die Radikale sind, die den initiiierenden Schritt machen und zum Kalziueinstrom in die Zelle führen. Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen  $\text{Ca}^{2+}$  und Sauerstoffradikalen haben wir als erstes die Bildung von Radikalen nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom genauer betrachtet. Die Radikalentstehung wurde quantitativ mittels einer DCF-Messung im Fluorometer SPECTRAMax Gemini festgehalten. Dazu wurden auf 96-Loch-Platten ausgesäte konfluente und 15 Stunden gehungerte AR42J-Zellen zunächst 30 min. mit dem zell-permeablen DCF-DA inkubiert. Auf 8 der Wells wurde noch 20 mM N-Acetylcystein gegeben. Nach diesen 30 min. wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gespült. Alle Reagenzien wurden doppelt hergestellt: einmal in  $\text{Ca}^{2+}$ -reichen und einmal in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium. Dann wurden die Zellen mit jeweils 100µl CCK, CCK  $10^{-6}\text{M}$  mit dem Radikalfänger Glutathion 20mM und  $\text{H}_2\text{O}_2$  300 µM beladen. Als Positivkontrolle dienten der mobile Ionen-Carrier Ca-Ionophore in 10µM Konzentration und der Inhibitor der endo- und sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Thapsigargin, ebenfalls in 10µM Konzentration. Beide führen zu einem Einstrom von Kalzium in das Cytoplasma der Zelle. Die Negativkontrolle war nur DMEM. Nach ca. 10 Minuten Stimulation bei 37°C im Inkubator wurde das entstandene fluoreszierende Dichlorofluorescein im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Nach Auswertung der Daten ist erkennbar, daß es nach Stimulation mit Ca-Ionophore zu einer verstärkten Radikalentstehung kommt, die sich durch zusätzliche supramaximale Stimulation mit CCK nicht mehr steigern lässt. Dasselbe gilt in schwächerer Ausprägung für Thapsigargin, welches die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen im endo- und sarkoplasmatischen Retikulum hemmt. Da diese dazu dienen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol niedrig zu halten kommt es auch hier zu einer Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes im Cytosol. Dieses führt wieder zur verstärkten Radikalentstehung gegenüber dem Basalwert ohne Stimulation, welche sich durch zusätzliche CCK-Stimulation nicht steigern läßt. Umgekehrt wird die intrazelluläre Radikalentstehung nach Zugabe von 10 µM Bapta, AM, welches als intrazellulärer Kalziumchelator fungiert, reduziert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, daß es nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle zur Radikalentstehung kommt. Die

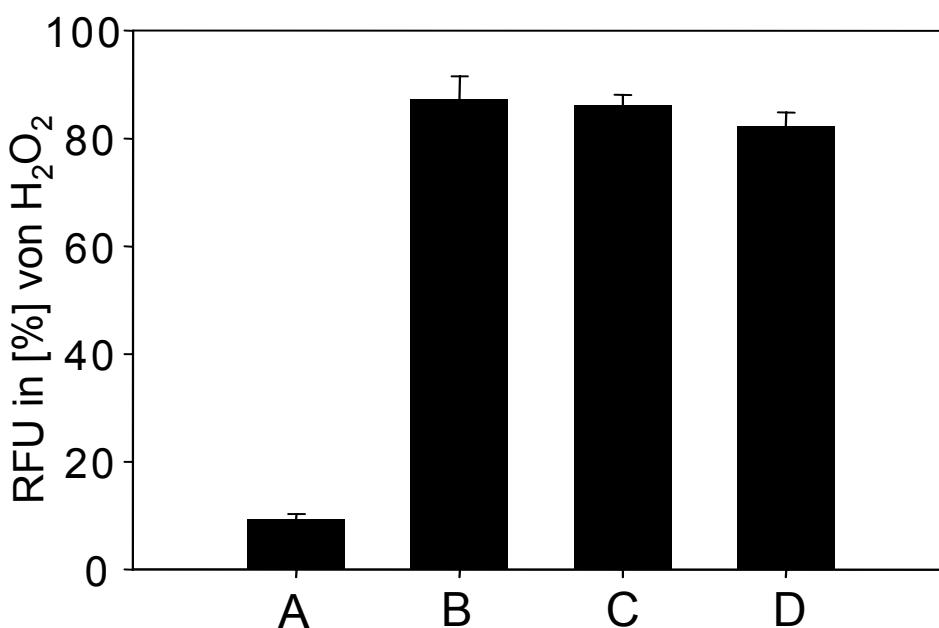
gebildeten Radikale lassen sich, wie bereits gezeigt, durch den Radikalfänger N-Acetylcystein (N-ACC) abfangen.



**Abb.24: Radikalentstehung nach Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Zytosol durch Hemmung der sarkoplasmatischen Kalziumpumpe durch Thapsigargin (10µM).** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM, Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). Alles jeweils in Ca<sup>2+</sup>-reichem und Ca<sup>2+</sup>-freien Medium mit 100 µM Bapta, AM. **A:** Negativkontrolle, **B:** Thapsigargin (10µM) **C:** CCK 10<sup>-6</sup> M, **D:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Thapsigargin (10µM) **E:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Bapta, AM – Ca<sup>2+</sup>, **F:** Negativkontrolle+ Bapta, AM – Ca<sup>2+</sup>, **G:** Thapsigargin (10µM) + Bapta, AM – Ca<sup>2+</sup>, **H:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Bapta,AM – Ca<sup>2+</sup>, **I:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Thapsigargin (10µM) + Bapta, AM – Ca<sup>2+</sup>



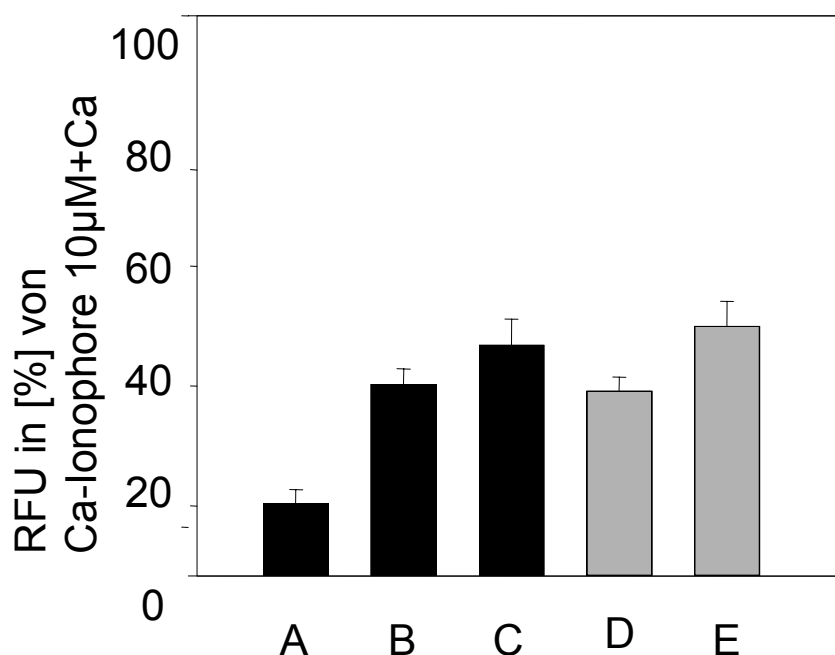
**Abb.25:** Reduktion der Radikalentstehung nach Zugabe des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelators Bapta, AM (100µM). A: Negativkontrolle ohne Ca<sup>2+</sup>, B: CCK 10<sup>-6</sup> M ohne Kalzium, C: CCK 10<sup>-6</sup> M + Bapta, AM (100µM) ohne Kalzium, D: Negativkontrolle mit Ca<sup>2+</sup>, E: CCK 10<sup>-6</sup> M mit Ca<sup>2+</sup>, F: CCK 10<sup>-6</sup> M + Bapta, AM (100µM) mit Ca<sup>2+</sup>



**Abb.26: Radikalentstehung nach Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Zytosol durch Ca-Ionophore (10µM).** Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM, Negativkontrolle ohne Stimulation (nur DMEM). Alles in Ca<sup>2+</sup>-reichem. A: Negativkontrolle, B: Ca-Ionophore(10µM) C: CCK 10<sup>-6</sup> M, D: CCK 10<sup>-6</sup> M + Ca-Ionophore (10µM)

#### 4.8 Sauerstoffradikale führen nicht zum $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle

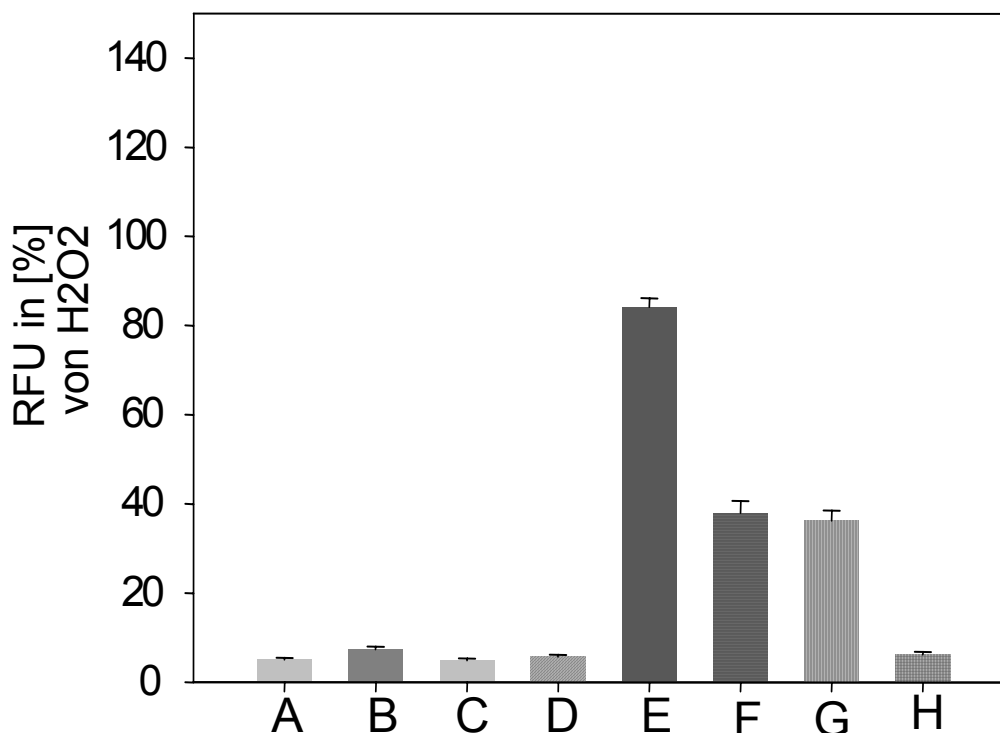
Als Nächstes wurde untersucht, ob Sauerstoffradikale zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom-führen.ieses geschah mit Hilfe des zell-permeablen Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2,AM in  $10\mu\text{M}$  Konzentration. FURA-2,AM wird durch intrazelluläre Esterasen zu FURA-2 gespalten, welches die Zelle nicht mehr verlassen kann. FURA-2 bindet Kalzium und fluoresziert. Die quantitative Erfassung der Kalziummenge erfolgte am Fluorometer SPECTRAMax GEMINI. Dazu wurden auf 96-Loch-Platten ausgesäte konfluente und 15 Stunden gehungerte AR42J-Zellen zunächst 30 min. mit dem zell-permeablen FURA-2,AM inkubiert. Auf 8 der Wells wurden zusätzlich 20 mM N-Acetylcystein (N-ACC) gegeben. Nach diesen 30 min. wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gespült. Alle Reagenzien wurden doppelt hergestellt: einmal in  $\text{Ca}^{2+}$ -reichen und einmal in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium. Dann wurden die Zellen mit jeweils  $100\mu\text{l}$  CCK, CCK  $10^{-6}\text{M}$  mit dem Radikalfänger N-ACC (20mM) beladen. Als Positivkontrolle dienten der mobile Ionen-Carrier Ca-Ionophore in  $10\mu\text{M}$  Konzentration und der Inhibitor der endo-und sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Thapsigargin, ebenfalls in  $10\mu\text{M}$  Konzentration. Beide führen zu einem Einstrom von Kalzium in das Cytoplasma der Zelle. Die Negativkontrolle war nur DMEM. Nach ca. 10 Minuten Stimulation bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator wurde das entstandene fluoreszierende Dichlorofluorescein im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Dabei wird demonstriert, daß es nach Stimulation der Zellen durch eine supramaximale CCK-Konzentration zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ohne Stimulation kommt. Nach Abfangen der Radikale durch 20mM N-Acetylcystein unter gleichzeitiger supramaximaler CCK-Stimulation kommt es nicht zu einer Senkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge. Daraus schließen wir, daß unter anderem ein Kalzium-Einstrom zur Radikalbildung führt, daß aber Sauerstoffradikale nicht zum Einstrom von Kalzium in die Zelle führen, da nach Wegfangen der Radikale die Kalziummenge unverändert bleibt.



**Abb.27: Kalziueinstrom nach supramaximaler CCK-Stimulation mit und ohne Vorinkubation von 20 mM N-Acetylcystein (N-ACC).** Fura-2,AM-Messung. Negativkontrolle: DMEM, Positivkontrolle: Ca-Ionophore (100µM). **A:** Negativkontrolle, **B:** CCK 10<sup>-6</sup>M, **C:** CCK 10<sup>-6</sup>M + Ca<sup>2+</sup>, **D:** CCK 10<sup>-6</sup>M +N-ACC (20mM), **E:** CCK 10<sup>-6</sup>M + N-ACC

#### **4.9 Der Ca<sup>2+</sup>-Chelator Bapta, AM führt unter Ausschaltung der mitochondrialen Radikalproduktion zu einer Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung um 100%**

Unter Wegfangen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen sinkt die CCK-induzierte Radikalentstehung, wie bereits gezeigt, um 50%. Sie sinkt ebenfalls um 50%, wenn das Mitochondrium- mit Hilfe des Hemmstoffes Natriumazid- keine Radikale mehr bildet. Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine Kombination des Wegfangens des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> mit dem Kalziumchelator Bapta, AM (100µM) in kalziumfreien Medium unter Umgehung der mitochondrialen Atmungskette durch Natriumazid (1mM) zu einem Absinken der CCK-induzierten Radikalentstehung um 100% führt.



**Abb.28: Der Kalziumchelator Bapta,AM führt in Kombination mit dem mitochondrialen Hemmstoff Natriumazid zu einer Senkung der CCK-induzierten Radikalproduktion um 100%.**

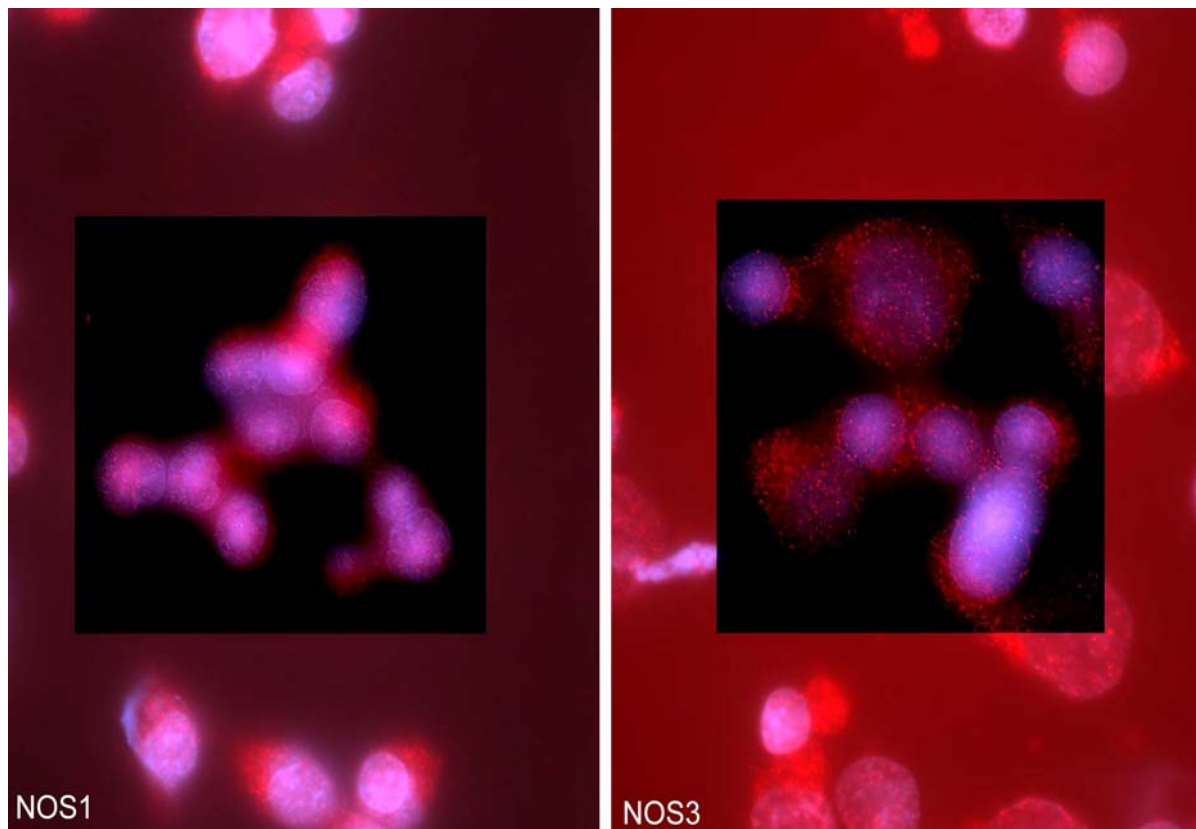
Negativkontrolle: DMEM, Positivkontrolle: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 µM). **A:** Negativkontrolle, **B:** Negativkontrolle + Natriumazid (1mM), **C:** Negativkontrolle + Bapta,AM (100µM), **D:** Negativkontrolle + Bapta,AM + Natriumazid, **E:** CCK 10<sup>-6</sup> M, **F:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Natriumazid (1mM), **G:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Bapta,AM (100 µM), **H:** CCK 10<sup>-6</sup> M + Bapta,AM+Natriumazid (1mM).

#### **4.10 Interaktionen zwischen Stickoxid-Radikalen und Sauerstoffradikalen**

Nitrit-Oxid (NO) entsteht durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginine (Hootmann SR 1987). NO wird im Pankreas von NOS 1 und NOS 3 in geringen Mengen produziert und spielt eine Rolle bei der Sekretion und der Blut-Zirkulation im Pankreas. In der akuten Pankreatitis kommt es zur Induktion von NOS 2 und zur drastischen Steigerung der NO-Freisetzung. Seine physiologischen Aktionen sind vor allem durch cyclisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) vermittelt (Moncada et al. 1993). Im Pankreas steigen intrazelluläre cGMP-Konzentrationen als Antwort auf verschiedene Substanzen, wie Cholezystokinin (Hootmann SR 1987), daher spielt NO eine aktive Rolle in der pankreatischen Sekretion. (Konturek et al. 1994; Konturek et al. 1993).

#### 4.10.1 Immunhistochemische Darstellung von NOS I und NOS III in der AR42J-Zelle

Zunächst sollte das Vorhandensein und die Lokalisation von NOS in AR42J-Zellen nachgewiesen werden. Nitrit-Oxid (NO) entsteht durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginine (Hootmann SR 1987). NO wird im Pankreas von NOS 1 und NOS 3 in geringen Mengen produziert und spielt eine Rolle bei der Sekretion und der Blut-Zirkulation im Pankreas. In der akuten Pankreatitis kommt es zur Induktion von NOS 2 und zur drastischen Steigerung der NO-Freisetzung. Mit Hilfe der Immunhistochemie konnten wir NOS I und NOS III in der AR42J-Zelle im Zytoplasma nachweisen. Als primärer Antikörper diente uns dafür Anti-NOS I und Anti-NOS III. Als sekundären Antikörper gebrauchten wir Anti-mouse-cy3 1:200, als Blocking Solution Aurion Block BSA in 1:10 Verdünnung.

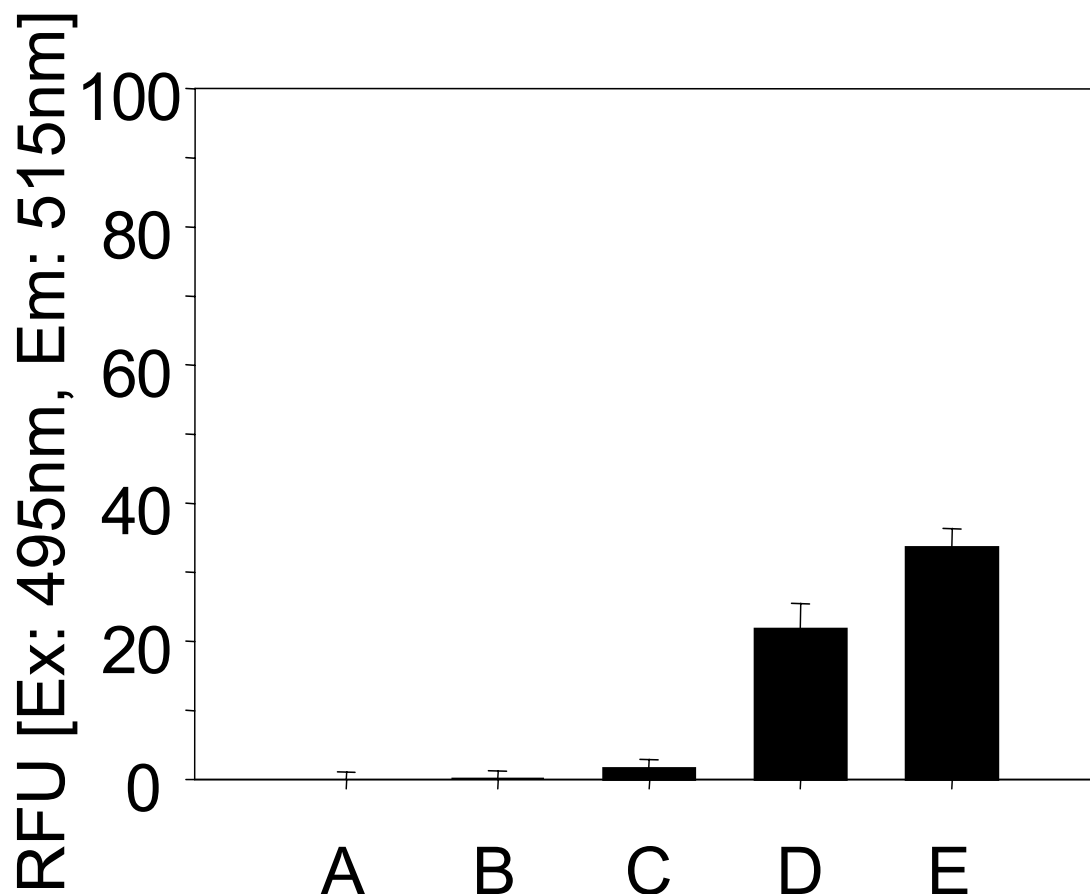


**Abb.29: Verteilung von NOS I und NOS III im Zytoplasma der unstimulierten AR42J-Zellen.** Primärer Antikörper: Anti-NOS I und Anti-NOS III. Sekundärer Antikörper: Anti-mouse-cy3 1:200.

#### **4.10.2 Nach Stimulation der AR42J-Zellen mit CCK und Wasserstoffperoxid entstehen keine Stickoxidradikale**

Im folgenden Versuch sollte nachgewiesen werden, daß die bisherigen Messungen auch tatsächlich Sauerstoffradikale nach CCK-Stimulation erfasst haben, da der bisher für die Sauerstoffradikalmessungen benutzte Fluoreszenzfarbstoff DCFDA nicht spezifisch für Sauerstoffradikale ist. Deswegen haben wir den für NO-Radikale spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM, DA genutzt. Dieser wird in der Zelle durch Esterasen zu DAF-FM gespalten, welches die Zelle nicht mehr verlassen kann. Es reagiert mit NO in Anwesenheit von Sauerstoffradikalen zu einem Triazolo-Fluorescein-Analogon (DAF-FM T). Hierzu wurden auf 96-Loch-Platten ausgesäte konfluente und 15 Stunden gehungerte AR42J-Zellen zunächst 30 min. mit dem zell-permeablen DAF-FM, DA inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit jeweils 100µl CCK  $10^{-6}$  M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM und SNAP 10µM zusammen mit CCK  $10^{-6}$  M beladen. Als Positivkontrolle diente SNAP in 10µM Konzentration. Die Versuche zeigen, daß das, was wir bisher mit DCFDA gemessen haben auch tatsächlich Sauerstoffradikale sind und nicht NO-Radikale. Man sieht, daß es nach Stimulation mit supramaximaler CCK-Konzentration genauso wie nach Stimulation mit 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht zur NO-Radikalfreisetzung kommt. Lediglich nach Stimulation mit dem NO-Donor SNAP kommt es zur NO-Radikalfreisetzung. Bei kombinierter Stimulation von SNAP mit supramaximaler CCK-Konzentration kommt es sogar zu einem leichten Rückgang der NO-Radikalbildung, was dafür sprechen würde, daß NO- und Sauerstoffradikale sich gegenseitig abfangen, NO-Radikale also einen protektiven Effekt haben. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob NOS-Inhibitoren die Sauerstoffradikalbildung steigern bzw. NO-Donatoren die Sauerstoffradikalbildung senken, denn damit könnte man beweisen, daß NO-Radikale Sauerstoffradikale abfangen und so protektiv wirken.



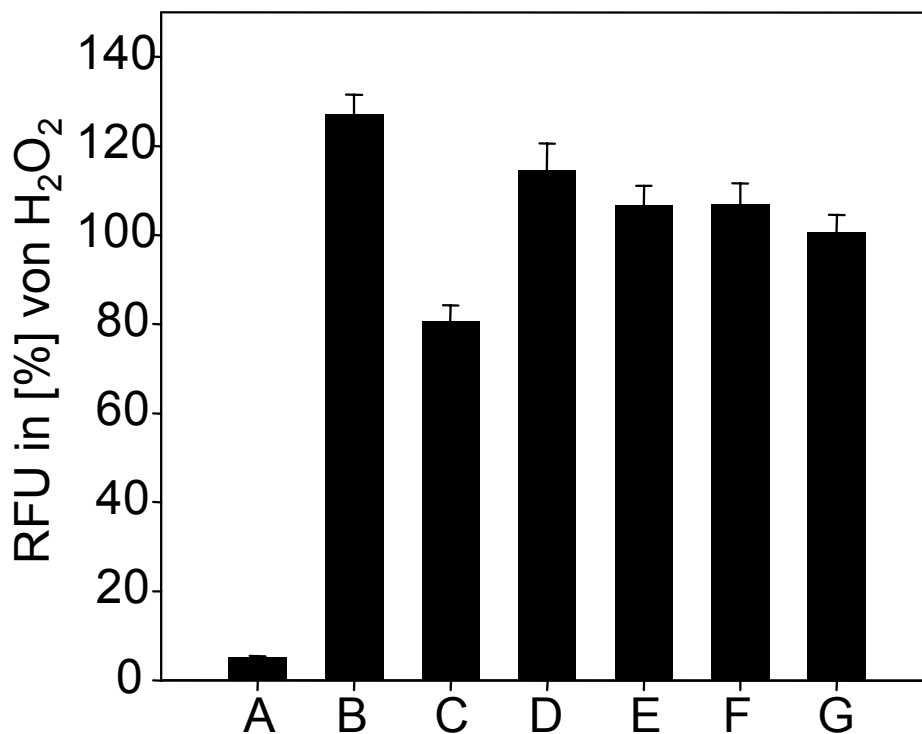


**Abb.30: NO-Radikalentstehung in AR42J-Zellen nach Stimulation mit AF, FM-DA-Messung.** Negativkontrolle ist DMEM, Positivkontrolle ist der NO-00 $\mu$ M). **A:** Negativkontrolle, **B:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300  $\mu$ M, **C:** CCK 10<sup>-6</sup> M, **D:** CCK 10<sup>-6</sup> M  $\Delta$ , **E:** SNAP (100 $\mu$ M)

#### 4.10.3 NOS-Inhibitoren führen zu einem leichten Anstieg von Sauerstoffradikalen

In der Cerulein-induzierten Pankreatitis verstärkt eine Inhibition der NO-Synthase, z.B. durch L-NNA, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NIL) oder durch N-nitro-L-arginine (L-NAME), die durch Cerulein hervorgerufenen entzündlichen Veränderungen des Pankreas (Konturek et al. 1994). Wir wollten nun mittels einer DCFDA-Messung untersuchen, ob NOS-Inhibitoren wie L-NAME oder L-NIL dazu in der Lage sind, nach CCK-Stimulation die Radikalbildung noch zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden auf 96-Loch-Platten ausgesäte konfluente und 15 Stunden gehungerte AR42J-Zellen zunächst 30 min. mit dem zell-permeablen DCFDA inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit jeweils 100 $\mu$ l CCK bzw. Bombesin 10<sup>-6</sup> M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300  $\mu$ M als Positivkontrolle, L-NIL bzw. L-NAME jeweils zusammen mit CCK bzw. Bombesin 10<sup>-6</sup> M und L-NAME bzw. L-NIL zusammen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300  $\mu$ M beladen. L-NIL und L-

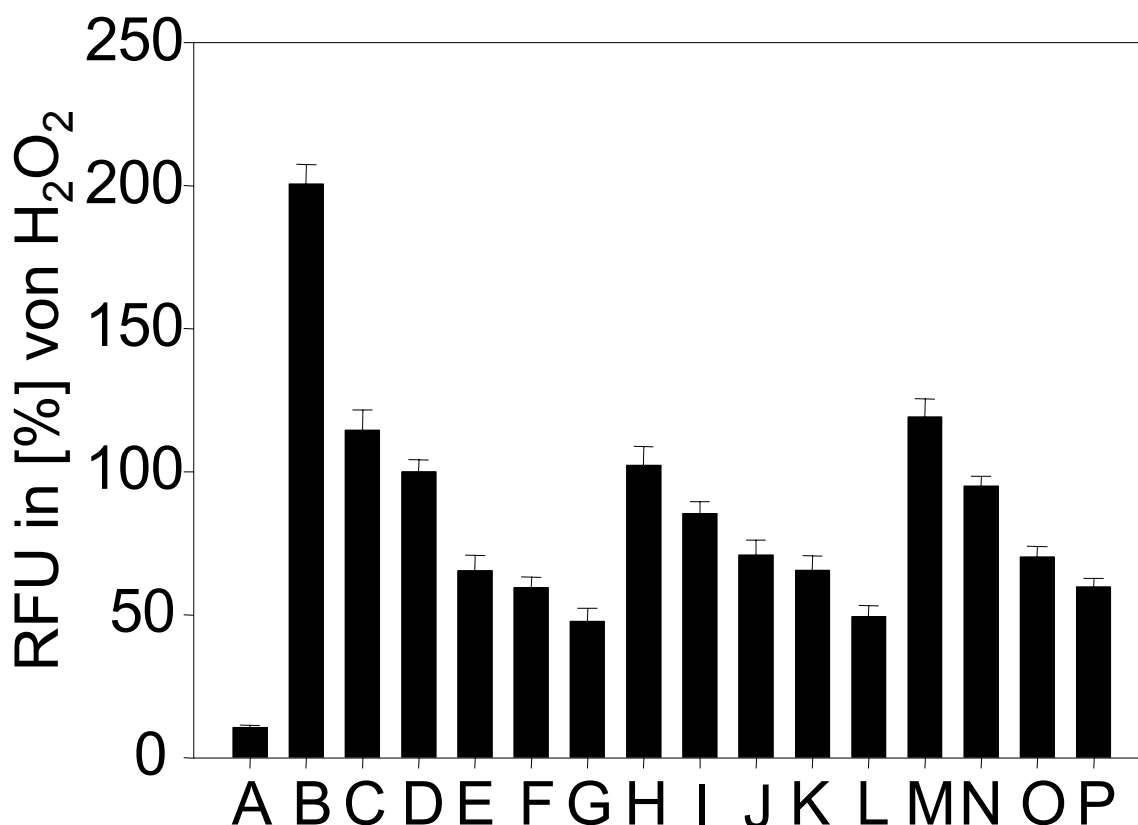
NAME wurden in steigenden Konzentrationen eingesetzt, die empfohlene Konzentration zur NOS-Inhibition sind für L-NIL 3,3 $\mu$ M und für L-NAME 500nM. Dabei kann man festhalten, daß ein signifikanter Anstieg der Radikalmenge nach CCK bzw. Bombesin-Stimulation besonders nach Gabe des potenteren und wirkungsvolleren Inhibitors L-NIL zu sehen ist.



**Abb.31: CCK-induzierte Radikalentstehung in AR42J-Zellen nach Stimulation zusammen mit dem NOS-Inhibitor L-NIL.** Negativkontrolle ist DMEM, Positivkontrolle ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 $\mu$ M). **A:** Negativkontrolle, **B:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300  $\mu$ M) + L-NIL (10 $\mu$ M), **C:** CCK 10<sup>-6</sup> M, **D:** CCK 10<sup>-6</sup> M + L-NIL (10 $\mu$ M), **E:** CCK 10<sup>-6</sup> M + L-NIL (5 $\mu$ M), **F:** CCK 10<sup>-6</sup> M + L-NIL (3,3 $\mu$ M), **G:** CCK 10<sup>-6</sup> M + L-NIL (1 $\mu$ M).

#### 4.10.4 Der NOS-Donor SNAP führt in einer Messung mit DCF nicht zu einer Reduzierung der Sauerstoffradikale

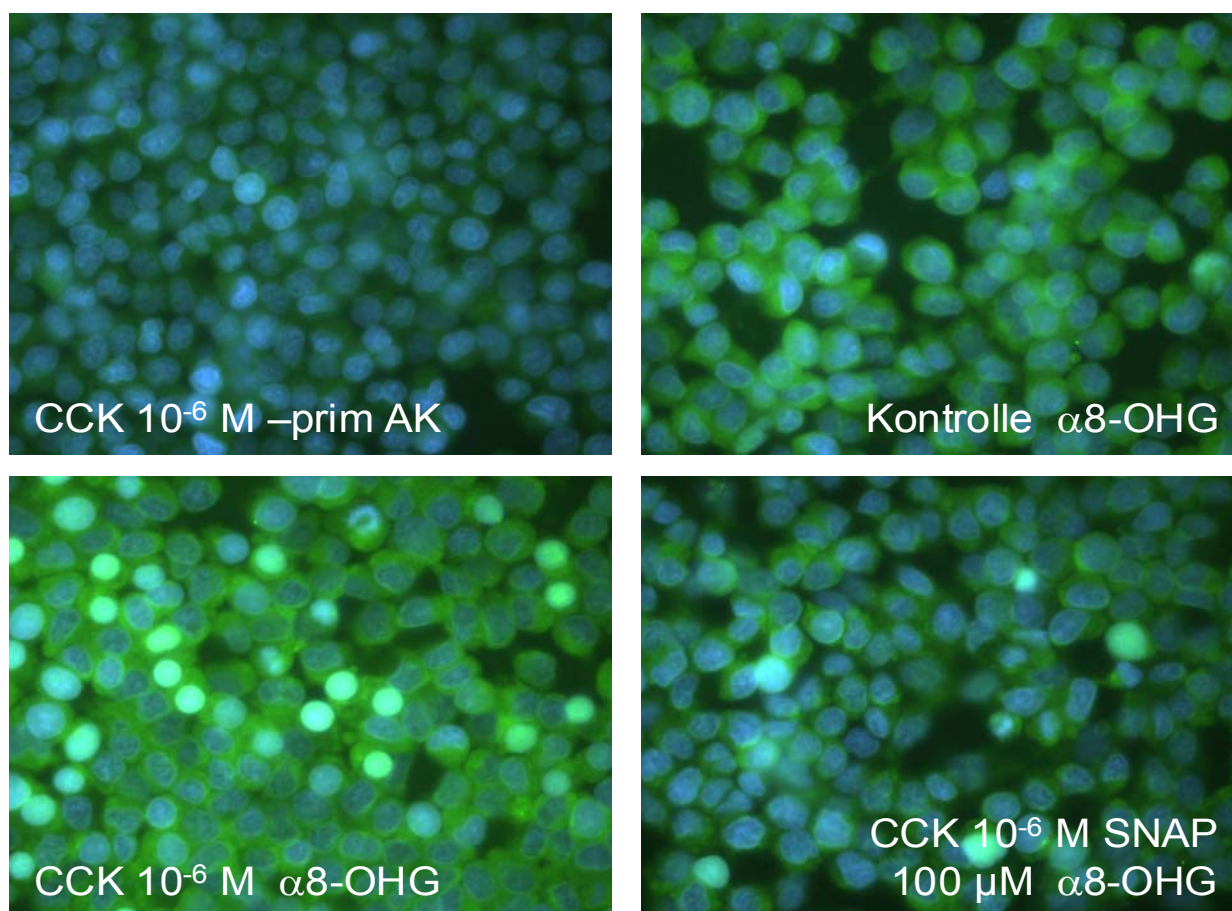
In unterschiedlichen Tiermodellen der Pankreatitis wird NO sowohl eine protektive als auch eine schädigende Wirkung zugeschrieben. Wir haben nun überlegt, ob es nach Gabe des NO-Donors SNAP zu einer Senkung der Sauerstoffradikale kommt. Dieses würde sich dadurch erklären, daß NO-Radikale Sauerstoffradikale abfangen. Dafür wurden auf 96-Loch-Platten ausgesäte konfluente und 15 Stunden gehungerte AR42J-Zellen zunächst 30 min. mit dem zell-permeablen DCFDA inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit jeweils 100µl CCK bzw. Bombesin  $10^{-6}$  M,  $H_2O_2$  300 µM als Positivkontrolle, SNAP zusammen mit CCK bzw. Bombesin  $10^{-6}$  M und SNAP ohne Zusatz beladen. SNAP wurden in steigenden Konzentrationen eingesetzt. Wir können feststellen, daß es nach Stimulation mit dem NO-Donor SNAP (100µM) zu einer Erhöhung der Radikalentstehung kommt.



**Abb.32: CCK-induzierte Radikalentstehung in AR42J-Zellen nach Stimulation zusammen mit dem NOS-Donor SNAP+ Natriumazid (1mM).** Negativkontrolle ist DMEM, Positivkontrolle ist  $H_2O_2$  (300µM). **A:** Negativkontrolle, **B:**  $H_2O_2$  300 µM) + SNAP (100 µM), **C:** SNAP (100µM), **D:** SNAP (10µM), **E:** SNAP (1µM), **F:** SNAP (130nM), **G:** CCK  $10^{-6}$  M, **H:** CCK  $10^{-6}$  M + SNAP (100µM), **I:** CCK  $10^{-6}$  M + SNAP (10µM), **J:** CCK  $10^{-6}$  M + SNAP (1µM), **K:** CCK  $10^{-6}$  M + SNAP (130nM), **L:** Bombesin  $10^{-6}$  M, **M:** Bombesin  $10^{-6}$  M + SNAP (100µM), **N:** Bombesin  $10^{-6}$  M + SNAP (10µM), **O:** Bombesin  $10^{-6}$  M + SNAP (1µM), **P:** CCK  $10^{-6}$  M + SNAP (130 nM)

#### 4.10.5 Immunhistochemische Darstellung des Rückganges der DNA-Oxidation durch den NO-Donor SNAP

Da die Auswertung der vorausgegangenen DCF-Messungen zur Überprüfung vorhandener Interaktionen zwischen NO-Radikalen und Sauerstoffradikalen nicht eindeutig war, zogen wir die Immunhistochemie zu Rate. Immunhistochemisch lässt sich darstellen, dass es nach supramaximaler CCK-Stimulation unter gleichzeitiger Gabe des NO-Donors SNAP zum Rückgang der DNA-Oxidation im Vergleich zur DNA-Oxidation nach alleiniger Stimulation mit CCK  $10^{-6}$  M kommt. Als primärer Antikörper diente Goat Anti-8-Hydroxy-guanosin 1:2000, als sekundärer Antikörper FITC Donkey-Anti-Goat 1:200. Als Blocking Solution benutzte man unverdünntes Aurion Block Donkey. Aus diesem Versuch ist ersichtlich, daß ein protektiver Effekt von SNAP bei gleichzeitiger Stimulation mit CCK in supra-maximaler Konzentration vorhanden ist- der Anteil der oxidierten DNA nimmt im Vergleich zur DNA-Oxidation nach alleiniger supramaximaler CCK-Stimulation ab.



**Abb.33:** Immunhistochemische Darstellung von AR42J-Zellen. Primärer Antikörper  $\alpha 8$ -OHG. Stimulation mit CCK  $10^{-6}$  M mit und ohne den NO-Donor SNAP.

## 5. Diskussion

Radikale haben eine wichtige Aufgabe als Mediatoren in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, z.B. Apoptose, Alterungsprozesse, kardiovaskuläre Erkrankungen, Gehirndysfunktionen, Entzündungen und Krebs (Halliwell et al. 1989). Eine pathogenetische Bedeutung solcher radikalbedingter oder radikalvermittelter Zellschädigungen wird für eine Reihe von Krankheiten diskutiert, so auch für die akute Pankreatitis (Schoenberg et al. 1992, Weber et al. 1995). Trotz der Beobachtung, daß Antioxidantien und Radikalfänger den Verlauf einer akuten Pankreatitis mildern (Nonaka et al. 1991; Sweiry et al. 1996), ist die Herkunft der reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) und ihre pathophysiologische Funktion weitgehend unbekannt. Trotz zahlreicher Publikationen zur Rolle freier Radikale in der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis ( Sanfey et al. 1985; Koiwai et al. 1989; Schoenberg et al. 1994; Niederau et al. 1992), aus denen hervorgeht, dass eine erhöhte Radikalaktivität sowohl im Tiermodell wie auch bei der klinischen Erkrankung nachgewiesen werden kann, bleiben die genauen Mechanismen der Radikalbildung unklar. Es wurde aber bereits gezeigt, daß Sauerstoffradikale als Mediatoren in der Signaltransduktion involviert sind (Natarajan et al. 1995). Neben einigen extra-mitochondrialen Enzymsystemen, darunter die NAD(P)H-Oxidase (Jones et al., 1996; López-Barneo et al., 2001), die Xanthin-Oxidase und das Cytochrom P-450 (Jones et al. 1996), stellt insbesondere die mitochondriale Atmungskette (Chandel et al. 1998; López-Barneo et al. 2001) einen Entstehungsort für ROS dar. Es ist allerdings noch ungeklärt, welches dieser Systeme in Pankreasazinuszellen für den Cholezystokinin (CCK)-induzierten ROS-Anstieg verantwortlich ist. Weitgehend aufgeklärt dagegen ist die Aktivierung der Signaltransduktion durch Bindung von CCK an seinen Rezeptor. Die Azinuszellen der Ratte als typischem Versuchstier zur Untersuchung der Pankreassekretion besitzen neben anderen auch Rezeptoren für CCK. Eine Stimulation mit CCK führt klassischerweise zu einer Inositol-Triphosphat (IP<sub>3</sub>)- und kalziumabhängigen Stimulation. CCK bindet dabei zunächst an einen Rezeptor der basolateralen Membran. Vermittelt durch ein G-Protein kommt es zu einer Aktivierung der membrangebundenen Phospholipase-C. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol in IP<sub>3</sub> und Diacylglycerol (Berridge and Irvine 1989). IP<sub>3</sub> bewirkt eine rasche Freisetzung von Kalzium aus im ER lokalisierten Speichern (Streb, Irvine et al. 1983). Diacylglycerol aktiviert Proteinkinase-C. Dieses Enzym und das freigesetzte Kalzium vermitteln die Fusion und Verschmelzung von Zymogengranula mit der luminalen Zellmembran und somit die Sekretion von Verdauungsenzymen (Gardner, Costenbader et al. 1979; Ederveen, Van Emst-De Vries et al.

1990; Matozaki, Zhu et al. 1991). Die CCK-B-Rezeptor-vermittelte PLC  $\beta$ -Aktivierung wird dabei nicht durch Pertussis-Toxin inhibiert, was eine Aktivierung über ein  $G_q$ -gekoppeltes G-Protein nahelegt (Matzotaki et al. 1988). Somit aktiviert der CCK-B-Rezeptor zwei unterschiedliche Signalwege durch Kopplung an zwei verschiedene G-Proteine (Pommier et al. (1999). In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der intrazellulären, CCK-induzierten Radikalentstehung in der AR42J-Zelle untersucht. Um die Mechanismen der Radikalentstehung aufdecken zu können, musste zunächst gezeigt werden, ob es auch in AR42J-Zellen nach CCK-Stimulation zur Radikalentstehung kommt. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen dieses: nach CCK-Stimulation kommt es zur konzentrationsabhängigen, intrazellulären Radikalentstehung in AR42J-Zellen. Die Radikalenstehung liegt auch nach Stimulation mit einer physiologischen CCK Konzentration bei 50% der Positivkontrolle ( $H_2O_2$  300 $\mu$ M). Nach Stimulation mit einer supramaximalen CCK-Konzentration kommt es zu einer Erhöhung der Radikalentstehung um 60-80%. Nach Stimulation der Zellen mit sehr niedrigen Konzentrationen von CCK ( $10^{-18}$  M,  $10^{-20}$  M) kommt es zu keiner vermehrten Radikalentstehung gegenüber der basalen Radikalbildung ohne Stimulation. Damit ist die Grundvoraussetzung für die weiteren Versuche vorhanden: AR42J-Zellen bilden nach CCK-Stimulation konzentrationsabhängig Radikale. Das Gleiche gilt für eine Stimulation mit Bombesin: Nach Stimulation mit supramaximaler Bombesin-Konzentration (Bombesin  $10^{-6}$  M) liegt die Radikalentstehung bei 60-80% der Positivkontrolle. Auch hier ist eine Konzentrationsabhängigkeit der Radikalbildung festzustellen. Nach Stimulation mit Bombesin  $10^{-18}$  M ist gegenüber dem Basalwert der Radikalbildung ohne Stimulation kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen. Diese Ergebnisse decken sich mit der in der Literatur angegebenen CCK-induzierten Radikalenstehung in Pankreasazinuszellen der Ratte (Sanfey et al. 1985; Koiwai et al. 1989; Schoenberg et al. 1992, 1994 ). Aus ihnen geht hervor, daß Pankreasazinuszellen nach supramaximaler CCK-Stimulation vermehrt Radikale bilden. Neu ist, daß auch nach physiologischer CCK-Stimulation vermehrt Radikale entstehen. Um zu zeigen, daß mit dem für Sauerstoffradikale unspezifischen Fluoreszenzfarbstoff DCF auch tatsächlich Sauerstoffradikale nach CCK-Stimulation entstanden sind, wurde mit einem für NO-Radikale spezifischen Fluoreszenzfarbstoff die Bildung von NO-Radikalen nach supramaximaler CCK-Stimulation gemessen- diese ist verschwindend gering. So konnte gezeigt werden, daß die in den DCF-Messungen gemessenen Radikale nach CCK-Stimulation größtenteils Sauerstoffradikale darstellen.

Nach Differenzierung der Zellen mit Dexamethason zeigt sich keine vermehrte CCK-induzierte Radikalentstehung gegenüber undifferenzierten Zellen. In der Literatur wurde dagegen für die Amylase-Sekretion festgestellt, daß differenzierte AR42J-Zellen einen Anstieg des Granula-Gehaltes und ihres Ansprechens auf CCK aufweisen (Sachs et al. 1992). Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Radikalentstehung von dem Differenzierungsgrad der Azinuszellen unberührt bleiben.

Als Nächstes wurde der Anteil der in den Mitochondrien gebildeten Radikale an der Gesamtmenge der CCK-induzierten Radikalentstehung untersucht. Es ist bekannt, daß in den Mitochondrien der Zelle Radikale entstehen (Masayoshi et al. 1998; Raha et al. 2001). Um die Entstehung von mitochondrialen Radikalen von denen, die an der Zellmembran gebildet wurden, unterscheiden zu können, wurde Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) eingesetzt. Bei  $\text{NaN}_3$  handelt es sich um einen nicht-kompetitiven Atmungsketteninhibitor der Cytochrom-c-Oxidase. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die AR42J-Zellen, auf die wir Natriumazid gegeben haben, ein rapides Absinken der Radikalentstehung auf die Hälfte des Wertes ohne Natriumazid zeigen. Dieses ist dadurch zu erklären, daß ein Großteil der Radikalentstehung im Mitochondrium stattfindet. Mit Hilfe der eingesetzten  $\text{NaN}_3$ -Konzentration kommt es zur partiellen Enzyminhibition. Das Mitochondrium bildet keine Radikale mehr. Das heißt auch, daß 50% der nach CCK-Stimulation entstandenen Radikale in AR42J-Zellen nicht-mitochondrial gebildet werden. Nicht-mitochondriale Wege der Radikalbildung in der Zelle sind z.B. die NAD(P)H-Oxidase (Jones et al., 1996; López-Barneo et al., 2001), die Xanthin-Oxidase und das Cytochrom P-450 (Jones et al. 1996). Welches dieser Systeme in Pankreasazinuszellen für den Cholezystokinin (CCK)-induzierten ROS-Anstieg mit second-messenger-Funktion verantwortlich ist, ist z.Zt. noch ungeklärt.

Im Folgenden wurden die zur Radikalentstehung führenden Signaltransduktions-Wege nach supramaximaler CCK-Stimulation untersucht. Dabei wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die verschiedene Wege der Signalkaskade hemmen. Zunächst wurde der CCK-Rezeptor, als Anfangspunkt der Signalkette, mit JMV-180 partiell inhibiert. JMV-180 ist ein CCK-Analogon und stimuliert wie CCK die Amylase Sekretion durch den CCK-A-Rezeptor in Rattenpankreas-Azinuszellen (Stark et al. 1989, Matozaki et al. 1990; Tsunoda et al. 1996). Vorrausgesetzt, dass beide, CCK und JMV-180 an die gleiche Seite des CCK-A-Rezeptors binden (Stark et al. 1989), kann vermutet werden, dass JMV-180 als ein Agonist für den hochaffinen Zustand und als ein Antagonist für den niedrigaffinen Zustand des Rezeptors agiert (Tsunoda et al. 1996 ). Die Ergebnisse zeigen, dass JMV-180 die CCK-induzierte Radikalenstehung ohne Vorinkubation um 100% senkt. Nach alleiniger Stimulation mit JMV-

180 kommt es zur 60% igen Radikalenstehung. Die vorliegenden Ergebnisse decken sich daher mit denen, die in der Literatur beschrieben sind (Tsunoda et al. 1996 ). JMV-180 agiert als typischer partieller Agonist an den CCK-A-Rezeptoren der AR42J-Zelle: Er ist ein Agonist für den hochaffinen Zustand und ein Antagonist für den niedrigaffinen Zustand des Rezeptors. Die CCK-induzierte Radikalenstehung in AR42J-Zellen scheint also ihren Anfang an dem CCK-A-Rezeptor zu nehmen. Nun sollte untersucht werden, ob eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch CCK mit der Radikalenstehung in Verbindung steht. Da CCK eine wichtige Rolle als Mitogen für Azinuszellen spielt und entscheidend an der Organregeneration nach einer Pankreatitis beteiligt ist, was vermutlich in Zusammenhang mit der Aktivierung von Tyrosinkinasen steht (Jurkowska et al. 1992), sind Untersuchungen zum 'cross-talk' zwischen dem CCK-Rezeptor und der Tyrosinkinase-vermittelten Signaltransduktion von großer pathophysiologischer Relevanz. Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist ein Tyrosinkinasen-Rezeptor. Wenn EGF an den Rezeptor bindet, kommt es zur Autophosphorylierung von intrazellulären Tyrosylresten. Dieser Vorgang wird durch eine ligandenaktivierte Tyrosinkinase katalysiert. In den vorliegenden Ergebnissen zeigt sich, daß der spezifische EGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen-Inhibitor (RTK-Inhibitor) AG1478 zu einer konzentrationsabhängigen Senkung der Radikalenstehung nach supramaximaler-CCK-Konzentration führt. Nach EGF-Stimulation kommt es zur Radikalbildung, welche durch den RTK-Inhibitor AG1478, wie erwartet, praktisch ausgeschaltet wird. EGF und CCK potenzieren sich nicht in ihrer Wirkung auf die Radikalenstehung. Nach Hemmung der EGF- und CCK-Stimulation durch AG1478 kommt es zum Rückgang der Radikalenstehung wie bei AG1478 mit CCK. Dieses spricht für eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch CCK und für einen 'cross-talk' zwischen dem CCK-Rezeptor und der Tyrosinkinase-vermittelten Signaltransduktion.

Die nächste, an den Rezeptor angeschlossene Station der Signalkaskade sind die G-Proteine. G-Proteine dienen als molekulare Schalter und kommen in zwei unterschiedlichen Zuständen vor, die sich nur durch das jeweils gebundene Guaninnucleotid unterscheiden. In aktiver Form sind sie mit GTP beladen und imstande, eine Reihe unterschiedlicher Proteine zu aktivieren. Es gibt 50 unterschiedliche Isoformen von G-Proteinen, von denen die heterotrimeren, großen G-Proteine für die hormonelle Signaltransduktion von besonderer Bedeutung sind (Kaziro 1991; Lincoln 1993). Der CCK-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter 7-Transmembran-domänen-Rezeptor. Dieser aktiviert die heterotrimeren G-Proteine. Pertussis Toxin ist ein Inhibitor des  $G_i$ -Proteins. Es katalysiert die ADP-Ribolysierung von  $G_i$  und löst  $G_i$  von den Rezeptoren. Diese Aussagen der Literatur sind ein Erklärungsansatz für die vorliegenden



Ergebnisse: Pertussis Toxin führt nicht zu einer Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen. Die Signalkaskade läuft daher nicht über  $G_i$ -Proteine. Im Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Hemmung der Radikalproduktion durch JMV-180, welches ein partieller Agonist an CCK-A-Rezeptoren ist (Stark et al. 1989; Matzotaki et al. 1990, Tsunoda et al. 1996), lässt sich schlussfolgern, daß die CCK-induzierte Radikalentstehung ihren Anfang am CCK-A-Rezeptor nimmt. Dieses stimmt mit einigen Autoren überein, die belegen, daß CCK-A-Rezeptoren an  $G_{q/11}$  Proteine gekoppelt sind (Williams 1997; Piiper et al. 1997). Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Autoren, die besagen, dass die CCK-B-Rezeptor-vermittelte PLC  $\beta$ -Aktivierung nicht durch Pertussis-Toxin inhibiert wird, was eine Aktivierung über ein  $G_q$ -gekoppeltes G-Protein nahelegt (Matzotaki et al. 1988). Allerdings schließt diese Aussage nicht aus, daß CCK-A-Rezeptoren nicht auch an  $G_q$ - Proteine gekoppelt sind. Die an den CCK-Rezeptor angeschlossenen G-Proteine aktivieren die Phospholipase C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ). Dieses Enzym spaltet PIP<sub>2</sub> in InsP<sub>3</sub> (Inositol-(1,4,5)-triphosphat) und Diacylglycerin (DAG), welches in der Membran zurückbleibt. InsP<sub>3</sub> erhöht die cytoplasmatische Kalziumkonzentration durch Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Streb, Irvine et al. 1983). Dieses führt im Pankreas zu einer Stimulierung sekretorischer Prozesse. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß es nach Inhibition der PLC  $\beta$  zur 100%igen Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen kommt. Die PLC  $\beta$  ist also in den zur CCK-induzierten Radikalentstehung führenden Signaltransduktionsweg eingebunden. Der weitere Verlauf der Signaltransduktion führt nun über eine Vielzahl von Proteinkinasen, die in der vorliegenden Arbeit getestet wurden. Sie werden zwar während des gesamten Zellzyklus exprimiert, sind jedoch nur an spezifischen Übergängen enzymatisch aktiv. Src-Kinasen gehören zur Familie der Tyrosinkinasen. Sie dienen als Verbindung zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und ERK (extrazellulär-regulierte Kinase)-Aktivierung. Allerdings ist ihre Rolle in diesem Signalweg hochgradig rezeptor- und zellspezifisch. In den dargestellten Ergebnissen sieht man eine signifikante Senkung der CCK-induzierten Radikalentstehung nach Gabe bestimmter Src-Kinase-Inhibitoren: Herbimycin führt zur 100%igen Senkung der Radikalentstehung, während Genistein zum Absinken der Radikalbildung auf die Hälfte und PP-2 auf 40% der CCK-induzierten Radikalbildung führt. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf die Selektivität und Potenz der Inhibitoren zurückzuführen. Zur Funktion von Src-Kinasen in der CCK-induzierten Radikalentstehung sind bisher noch keine Ergebnisse in der Literatur bekannt.

Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) sind Lipid-Kinasen, die Phosphatidyl-inositole (PtdIns) an der D-3 Position des Inositol-Ringes phosphorylieren. Sie werden aktiviert, indem sie an SH2-Domänen (Src-homologe Domäne) von Proteinen binden. Aktivierte PI-3-Kinasen machen aus dem Membranlipid PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-triphosphat). PIP<sub>3</sub> aktiviert daraufhin die Proteinkinase B (PKB). Nach Hemmung der PI-3-Kinasen mit LY 294002 sieht man ein Absinken der Radikalentstehung um ca. 20%, während nach Gabe von Wortmannin in den für PI-3-Kinasen spezifischen Konzentrationen kein signifikantes Absinken der Radikalenstehung zu sehen ist. Dieses spricht dafür, dass PI-3-Kinasen an der Radikalentstehung nur geringfügig beteiligt sind. Auch diese Ergebnisse lassen sich nicht mit der z. Zt. existierenden Literatur vergleichen, da noch keine Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen PI-3-Kinasen und der CCK-induzierten Radikalentstehung bekannt sind. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind für die Induktion der für die mitogene Antwort verantwortlichen Gene von besonderer Bedeutung. Sie werden durch eine Phosphorylierungskaskade aktiviert, wobei das primäre Ereignis die Aktivierung der Raf-Kinase durch ein als Ras bezeichnetes G-Protein ist. Ras ist seinerseits über die Adapterproteine SOS und Grb 2 mit den Rezeptortyrosinkinasen verknüpft. MAPK wandern in den Kern und aktivieren dort durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren. MAPK wird manchmal ERK (extrazellulär regulierte Kinase) genannt (Löffler 1997; Avruch et al. 1994). Ein spezifischer MAPK-(Erk-2)-Inhibitor ist PD 98,059. Im vorliegenden Diagramm ist dargestellt, daß MAP-Kinasen keine Auswirkungen auf die Radikalentstehung in AR42J-Zellen nach supramaximaler CCK-Stimulation haben. Die Wege die zur Radikalbildung führen, gehen daher bereits vor der Aktivierung von MAP-Kinasen ab.

Die Proteinkinase A (PKA) wird durch cAMP aktiviert und phosphoryliert daraufhin spezifische Serylreste einer Reihe von Proteinen. Beispiele sind Phosphorylase, Glykogensynthase, hormonsensitive Lipase, Myosinkinase und Cholesterinester-Hydrolase (Löffler 1997). Eine Stimulation der PKA kann die PLC  $\beta$  aktivieren, so dass diese ein Kalzium-Signal generiert (Piiper et al. 2000). Diese Antwort könnte durch sequentielle Aktivierung von G<sub>s</sub> und G<sub>i</sub>, mit Hilfe der PKA, vermittelt werden (Luo et al. 1999). Eine Hemmung der PKA führt zum 100%igen Rückgang der CCK-induzierten Radikalentstehung. Dieses Ergebnis zeigt, daß die PKA ein Schritt auf dem Weg zur CCK-induzierten Radikalentstehung ist. Man kann dieses Ergebnis mit Piiper et al. in Einklang bringen, der gezeigt hat, daß die PKA die PLC  $\beta$  aktivieren kann (Piiper et al. 2000). Die Reihenfolge der zur CCK-induzierten Radikalentstehung führenden Signaltransduktion würde dann vom

CCK-A-Rezeptor ausgehend über das  $G_{q/11}$ -Protein zur PKA, die dann die PLC  $\beta$  aktiviert, führen. Die Proteinkinase C (PKC)-Familie besteht aus mindestens 12 Mitgliedern, die alle durch Proteolyse und Membranlipide aktiviert werden und denen eine Kalziumabhängigkeit gemeinsam ist. Die Aktivierung der PKC erfolgt in Anwesenheit von Kalzium durch Bindung an Diacylglycerin, welches an der Innenseite der Plasmamembran gebunden ist. Die Substrate der PKC werden an Seryl- bzw. Threonylresten phosphoryliert und ändern damit ihre biologische Aktivität. Substrate sind das alaninreiche PKC-Substrat mit unbekannter Funktion, der EGF-Rezeptor der dadurch seine Affinität für EGF vermindert (Transmodulation) und das I-kappaB-Protein, das eine Rolle bei der Transkription spielt (Azzi et al. 1992, Asaoka et al. 1992). Die Inhibition der PKC beeinflusst die CCK-induzierte Radikalentstehung nicht, während die CCK-induzierte Amylasesekretion laut Literatur PKC-abhängig ist (Piiper et al. 2000). Es gibt viele Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen Kalzium und freien Sauerstoffradikalen (Mirabelli et al. 1989; Nicotera et al. 1988). Bisher bleibt unklar, ob Kalzium zur Radikalfreisetzung führt, oder ob es die Radikale sind, die den initiiierenden Schritt machen und zum Kalziumeinstrom in die Zelle führen. Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen  $Ca^{2+}$  und Sauerstoffradikalen haben wir als erstes die Bildung von Radikalen nach  $Ca^{2+}$ -Einstrom genauer betrachtet. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß es nach Stimulation mit Ca-Ionophore zu einer verstärkten Radikalentstehung kommt, die sich durch zusätzliche supramaximale Stimulation mit CCK nicht mehr steigern läßt. Dasselbe gilt in schwächerer Ausprägung für Thapsigargin, welches die  $Ca^{2+}$ -Pumpen im endo- und sarkoplasmatischen Retikulum hemmt. Da diese dazu dienen die  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Cytosol niedrig zu halten kommt es auch hier zu einer Erhöhung des  $Ca^{2+}$ -Gehaltes im Cytosol. Dieses führt wieder zur verstärkten Radikalentstehung gegenüber dem Basalwert ohne Stimulation, welche sich durch zusätzliche CCK-Stimulation nicht steigern läßt. Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß es nach  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle zur Radikalentstehung kommt. Die gebildeten Radikale lassen sich durch den Radikalfänger N-Acetylcystein (N-ACC) abfangen. Als Nächstes wurde untersucht, ob Sauerstoffradikale zum  $Ca^{2+}$ -Einstrom führen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß es nach Stimulation der Zellen mit mit einer supramaximalen CCK-Konzentration zur Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Vergleich zur  $Ca^{2+}$ -Konzentration ohne Stimulation kommt. Nach Abfangen der Radikale durch N-ACC unter gleichzeitiger supramaximaler CCK-Stimulation kommt es nicht zu einer Senkung der  $Ca^{2+}$ -Menge. Daraus schließen wir, daß unter anderem ein Kalzium-Einstrom zur Radikalbildung führt, daß aber Sauerstoffradikale nicht zum Einstrom von Kalzium in die Zelle führen, da nach Wegfangen

der Radikale die Kalziummenge unverändert bleibt. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu vorhandenen Ergebnissen verschiedener Autoren, die gezeigt haben, daß Radikale zum Kalziumeinstrom führen (Niederau et al. 1999, Klonokowski-Stumpe et al. 1997, Weber et al. 1998). Im folgenden werden Interaktionen zwischen Stickoxidradikalen (NO-Radikalen) und Sauerstoffradikalen anhand der vorliegenden Ergebnisse diskutiert. Nitrit-Oxid (NO) entsteht durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginine (Hootmann SR 1987). NO wird im Pankreas von NOS 1 und NOS 3 in geringen Mengen produziert und spielt eine Rolle bei der Sekretion und der Blut-Zirkulation im Pankreas. In der akuten Pankreatitis kommt es zur Induktion von NOS 2 und zur drastischen Steigerung der NO-Freisetzung. Seine physiologischen Aktionen sind vor allem durch cyclisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) vermittelt (Moncada et al. 1993). Im Pankreas steigen intrazelluläre cGMP-Konzentrationen als Antwort auf verschiedene Substanzen, wie Cholezystokinin (Hootmann SR 1987), daher spielt NO eine aktive Rolle in der pankreatischen Sekretion. (Konturek et al. 1994; Konturek et al. 1993). In unterschiedlichen Tiermodellen der Pankreatitis wird NO sowohl eine protektive als auch eine schädigende Wirkung zugeschrieben. Der Mechanismus der NO-Wirkung ist unbekannt. Unsere immunhistochemischen Ergebnisse zeigen zunächst ein Vorhandensein von NOS I und NOS III in der AR42J-Zelle. Weiterhin kann man festhalten, daß ein signifikanter Anstieg der Radikalmenge nach CCK bzw. Bombesin-Stimulation besonders nach Gabe des potenteren und wirkungsvolleren Inhibitors L-NIL zu sehen ist. Dieses Ergebnis stimmt mit bereits vorhandenen Aussagen überein die besagen, dass in der Cerulein-induzierten Pankreatitis eine Inhibition der NO-Synthase, z.B. durch L-NNA, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NIL) oder durch N-nitro-L-arginine (L-NAME), die durch Cerulein hervorgerufenen entzündlichen Veränderungen des Pankreas verstärken (Konturek et al. 1994). Nach Gabe des NO-Donors SNAP dagegen kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der Radikalmenge. Dieses kann darauf zurückgeführt werden, daß der in den Messungen verwandte Fluoreszenzfarbstoff DCF nicht für Sauerstoffradikale spezifisch ist und auch NO-Radikale erfasst. SNAP wurde wahrscheinlich in zu hohen Dosen auf die Zellen gegeben, so daß zwar alle Sauerstoffradikale abgefangen wurden, jedoch noch zu viele NO-Radikale übrig waren. Im immunhistochemischen Bild konnte ein protektiver Effekt von NO-Donoren nachgewiesen werden: Nach Zugabe von SNAP kam es zur Abnahme der CCK-induzierten DNA-Oxidation. Dieses Ergebnis stimmt mit Ergebnissen der Literatur überein, die zeigen, daß NO einen positiven Effekt auf bestimmte Aspekte in der akuten Pankreatitis hat (Werner et al. 1997; Abe et al. 1995; Toyama et al. 1995). Außerdem mindern NO-Donoren das pankreatische Ödem, intrapankreatische Trypsinogen-Aktivierung und Amylase-Sekretion (Werner et al.

1997). Die ungestörte Synthese von endogenem NO scheint weiterhin eine essentielle Rolle in der Begrenzung der zerstörerischen Mechanismen in der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis und zwar in der frühen und in der Erholungsphase der Pankreatitis zu spielen (Andrejewska et al. 1999). Im Gegensatz dazu kommt es in der akuten hämorrhagischen Pankreatitis zur Potenzierung des oxidativen Stresses im Pankreas durch NO (Dabrowski et al. 1994). Andere Autoren kommen zu dem Schluß, daß direkte Effekte von NO auf Pankreas-Azinuszellen und ihre Sekretion nur eine geringe Rolle in der Pathogenese der akuten Pankreatitis spielen. Der positive Effekt von NO in der akuten Pankreatitis soll durch eine Reduktion in der Leukozyten-Adhäsion und Gewebsinfiltration, sowie durch Modulation der pankreatischen Mikrozirkulation und Gewebsoxygenierung begründet sein (Werner et al. 1998).

Unsere Ergebnisse deuten eine Reihenfolge der Signaltransduktion, die zur CCK-induzierten Radikalentstehung in AR42J-Zellen führt, an. Nachdem CCK an seinen Rezeptor, den CCK-A-Rezeptor, gebunden hat, kommt es zur Gi-Protein-unabhängigen PKA-Aktivierung. PKA führt zu einer Aktivierung der PLC  $\beta$ . Diese spaltet PIP<sub>2</sub> in InsP<sub>3</sub> (Inositol-(1,4,5)-triphosphat) und Diacylglycerin (DAG), welches in der Membran zurückbleibt. InsP<sub>3</sub> erhöht die cytoplasmatische Kalziumkonzentration durch Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Streb, Irvine et al. 1983). Dieses führt zur Freisetzung von Radikalen. Weiterhin ist die Atmungskette des Mitochondriums in die Radikalbildung involviert- es liefert die Hälfte der entstandenen Radikale. An welcher Stelle die Src-Kinase miteinbezogen wird, bleibt unklar. Nach Hemmung der mitochondrialen Radikalproduktion zusammen mit der Radikalproduktion durch Kalzium wird die CCK-induzierte Radikalentstehung vollends unterbunden. In Abwesenheit von NO-Radikalen kommt es zu einer leichten Steigerung der Radikalmenge, was für einen protektiven Effekt von NO spricht. Umgekehrt konnte jedoch lediglich im immunhistochemischen Bild ein protektiver Effekt von NO-Donoren gezeigt werden. Immunhistochemisch konnte auch nachgewiesen werden, daß es nach CCK-Stimulation zur DNA-Oxidation kommt.

In weitergehenden Arbeiten muß untersucht werden, welche Proteine durch Radikale modifiziert werden. Auch die Rolle von NO bleibt weitgehend unklar.

Bombesin stimuliert, im Gegensatz zu CCK, nicht die Trypsinaktivierung. Daher entsteht die Frage, ob die Entstehung freier Sauerstoff-Spezies zur Trypsinogenaktivierung und damit letztlich zur Autodigestion des Pankreas führt.

Außerdem muss gezeigt werden, ob das Modell der AR42J-Zelle auf isolierte Pankreasazinuszellen übertragbar ist.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abe T, Shimosegawa T, Satoh A et al. (1995) "Nitric oxide modulates pancreatic edema formation in rat caerulein-induced pancreatitis." *J Gastroenterol* **30**: 636-642
2. Adler G, Beglinger C et al. (1991) "Cholecystokinin antagonists in gastroenterology." Berlin-Heidelberg, Springer.
3. Adler G, Hupp T, et al. (1979) "Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat." *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **382**(1): 31-47
4. Adler G, Rohr G, et al. (1982) "Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat." *Dig Dis Sci* **27**(11): 993-1002
5. Anderson KL, Mc Niven MA (1995) "Vesicle dynamics during regulated secretion in a novel pancreatic acinar cell in vitro model." *Eur J Cell Biol* **66**(1): 25-38
6. Aikawa R, Komuru I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y (1997) "Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through src and ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats." *J Clin Invest* **7**: 1813-1821
7. Andrzejewska A, Jurkowska G (1999) "Nitric oxide protects the ultrastructure of pancreatic acinar cells in the course of caerulein-induced acute pancreatitis." *Int J Exp Path*, **80**: 317-324
8. Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y (1992) "Proteinkinase C, calcium and phospholipid degradation." *TIBS* **17**: 414-417
9. Avruch J, Zhang X, Kyriakis JM (1994) "Raf meet Ras: completing the framework of a signal transduction pathway." *TIBS* **19**: 279-283

10. Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C (1992) "The protein kinase C family." *Eur J Biochem* **208**: 347-357
11. Bernard C (1856) *Lecons de physiologie experimentale*. Paris, Bailliere: 278
12. Berridge MJ, Irvine RF (1989) "Inositol phosphates and cell signalling." *Nature* **341**(6239): 197-205
13. Braganza JM, Scott P, Biltin D, Schofield D, Chaloner C, Schiel N, Hunt LP, Bottiglieri T. (1995) "Evidence for early oxidative stress in acute pancreatitis? Clues for correction." *Intern J Pancreat* **17**: 69-81
14. Bruzzone R, Halban PA et al. (1985) "A new, rapid, method for preparation of dispersed pancreatic acini." *Biochem J* **226**(2): 621-4
15. Buchler M, Malfertheiner P et al. (1993) "Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group." *Gastroenterology* **104**(4): 1165-70
16. Buchwalow IB, Schulze W et al. (2001) "Inducible nitric oxide synthase in the myocard." *Mol Cell Biochem* **217**(1-2): 73-82
17. Buffa R, Solcia E et al. (1976) "Immunohistochemical identification of the cholecystokinin cell in the intestinal mucosa." *Gastroenterology* **70**(4): 528-32
18. Carafoli E (1987) "Intracellular calcium Homeostasis." *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 395-433
19. Castle JD (1990) "Sorting and secretory pathways in exocrine cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**(2): 119-26
20. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC & Schumacker PT(1998) "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription." *Proc Natl Acad Sci USA*; **95**: 11715-11720

21. Chiari H (1896) "Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas." Z. Heilkunde **17**: 69-96
22. Christophe J (1994) "Pancreatic tumoral cell line AR42J: an ampicrine model" Am J Physiol **266**: G963-971
23. Closa D, Hotter G, Rosello-Catafau J, Bulbena O, Fernandez-Cruz L, Gelpi E (1994) "Prostanoids and oxygen free radicals in early stages of experimental acute pancreatitis." Digestive Diseases and Sciences **39**: 1537-1543
24. Dabrowski A, Chwiecko M (1990) "Oxygen radicals mediate depletion of pancreatic sulfhydryl compounds in rats with cerulein-induced acute pancreatitis." Digestion **47**:15-19
25. Dabrowski A, Gabryelewicz A (1994) "Nitric oxide contributes to multiorgan oxidative stress in acute experimental pancreatitis." Scand J Gastroent **29**: 943-948
26. Dabrowski A, Gabryelewicz A (1992) "Oxidative stress. An early phenomenon characteristic of acute experimental pancreatitis." Intern J Pancreat **12**: 193-199
27. Daub H, Wallasch C, Lanckenau A, Herrlich A, Ullrich A (1997) „Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor.“ Embo J. **16**: 7032-7044
28. Della Rocca GJ, Van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) "Ras-dependent Mitogen-activated Protein Kinase Activation by G Protein-coupled Receptors." J Biol Chem **272**: 19125-19132
29. Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J (1996) " A role for PYK2 and Src in linking G-protein-coupled receptor with MAP kinase activation." Nature **383**:547-550



30. Ederveen AG, Van Emst-De Vries SE et al. (1990) "Dissimilar effects of the protein kinase C inhibitors, staurosporine and H-7, on cholecystokinin-induced enzyme secretion from rabbit pancreatic acini." *Eur J Biochem* **193**(1): 291-5
31. Eysselein VE, Reeve JR et al. (1982) "Partial structure of a large canine cholecystokinin (CCK58): amino acid sequence." *Peptides* **3**(4): 687-91
32. Feher JJ, Lee KN, Wu QY (1998) "Ryanodine-sensitive, thapsigargin-insensitive calcium uptake in rat ventricle homogenates." *Mol Cell Biochem.* **189**(1-2):9-17
33. Freedman SD, Scheele GA (1994) "Acid-base interactions during exocrine pancreatic secretion. Primary role for ductal bicarbonate in acinar lumen function." *Ann N Y Acad Sci* **713**: 199-206
34. Frick TW, Fernandez del CC, Bimmler D, Warshaw AL (1997) "Elevated calcium and activation of trypsinogen in rat pancreatic acini" *Gut* **41**: 339-343
35. Funakoshi A, Miyasaka K et al. (1988) "Bioactivity of synthetic human pancreastatin on exocrine pancreas." *Biochem Biophys Res Commun* **156**(3): 1237-42
36. Furakawa M, Kimura T, Yamaguchi H, Kinjoh M, Natawa H (1994) "Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic pancreatitis induced by stress and cerulein in rats." *Pancreas* **9**: 67-72
37. Gardner JD, Costenbader CL et al. (1979) "Effect of extracellular calcium on amylase release from dispersed pancreatic acini." *Am J Physiol* **236**(6): E754-62
38. Gaspar M, Stinner A, Younes M, belzner I, Bultmann B, Beger HG (1990) "Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat." *Gut* **31**: 1138-1143
39. Gronroos JM, Aho HJ, Hietaranta AJ, Nevalainen TJ (1991) "Early acinar cell changes in caerulein-induced interstitial acute pancreatitis in the rat pancreas." *Exp Pathol* **41**(1): 21-30

- 
40. Green GM, Lyman RL (1972) "Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats." *Proc Soc Exp Biol Med* **140**(1): 6-12
41. Halangk W, Lerch MM et al. (2000) "Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis." *J Clin Invest* **106**(6): 773-81
42. Hamada JI, Nakata D, Nakae D, Kobayashi Y, Okada F, Shibata T, Hosokawa M, Moriuchi T (2001) "Increased oxidative DNA damage in mammary tumor cells by continuous epidermal growth factor stimulation." *J National Cancer Institute* **93**: 214-219
43. Halliwell B, Gutteridge JM (1989) "Free radicals, aging and disease" *Free Rad Biol Med* 416-508
44. Halliwell B (1991) "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease." *Am J Med* **91** suppl 3C: 14S-22S
45. Hootmann SR, Williams JA (1987) "Stimulus-secretion coupling in the pancreas acinus." *Raven* 1129-1146
46. Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Hoffmann BB (1996) "Alphal adrenergic receptors activate phosphatidylinositol 3-kinase in human vascular smooth muscle cells. Role in mitogenesis." *J Biol Chem* **271**: 8977-8982
47. Isenmann R, Buchler M et al. (1993) "Pancreatic necrosis: an early finding in severe acute pancreatitis." *Pancreas* **8**(3): 358-61
48. Jansen JB, Lamers CB (1983) "Radioimmunoassay of cholecystokinin in human tissue and plasma." *Clin Chim Acta* **131**(3): 305-16
49. Jessop NW, Hay RJ (1980) "Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors" *In vitro* **16**: 212-216

50. Jurkowska G, Grondin G, Masse S, Morisset J (1992) "Soybean trypsin inhibitor and cerulein accelerate recovery of cerulein-induced pancreatitis in rats." *Gastroenterology* **102**: 550-62
51. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT (1996) "Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells." *Am J Physiol*; **271**: H1626-1634
52. Kay J, Kassell B (1971) "The autoactivation of trypsinogen." *J Biol Chem* **246**(21): 6661-5
53. Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T (1991) "Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins." *Annu Rev Biochem* **60**: 349-400
54. Keaney J, Gou Y, Cunningham D, Shwaery G, Xu A, Vita J (1996) "Vascular incorporation of a-tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation." *J Clin Invest* **98**: 386-394
55. Kikuchi Y, Shimosegawa T, Moriizumi S, Kimura K, Satoh A, Koizumi M, Kato I, Epstein JC, Toyota T (1997) "Transgenic copper/zinc-superoxide dismutase ameliorates cerulein-induced pancreatitis in mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **233**: 177-181
56. Klonokowski-Stumpe H, Schreiber R, Grolik M, Schulz HU, Haussinger D, Niederau C (1997) "Effect of oxidative stress on cellular functions and cytosolic free calcium of rat pancreatic acinar cells." *Am J Physiol* **272**: G1489-98
57. Konturek SJ, Bilski J, Konturek PK et al. (1993) "Role of endogenous nitric oxide in the control of canine pancreatic secretion and blood flow." *Gastroenterology* **104**: 896-902
58. Konturek SJ, Szlachcic A, Dembinski A et al. (1994) "Nitric oxide in pancreatic secretion and hormone-induced pancreatitis in rats." *Int J Pancreatol* **15**: 19-28

59. Koiwai T, Oguchi H, Kawa S, Yanigisawa Y, Kobayashi T, Homma T (1989) "The role of oxygen free radicals in experimental acute pancreatitis in the rat." *Int J Pancreatol* **5**:135-143
60. Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysee N, Seva C (1996) "Gastrin stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with Grb2 and the phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* **271**: 26356-26361
61. Kranenburg O, Verlaan L, Hordijk PL, Moolenaar WH (1997) "Gi-mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway involves a 100 kDa tyrosin phosphorylated Grb2 SH3 binding protein, but not Src nor Shc." *EMBO J* **16**: 3097-3105
62. Kukor Z, Mayerle J et al. (2002) "Presence of Cathepsin B in the Human Pancreatic Secretory Pathway and Its Role in Trypsinogen Activation during Hereditary Pancreatitis." *J Biol Chem* **277**(24): 21389-21396
63. Lehr HA, Frei B, Arfors KE (1994) "Vitamin C prevents cigarette-smoke induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 7688-7692
64. Lerch MM, Adler G (1994) "Experimental animal models of acute pancreatitis." *Int J Pancreatol* **15**(3): 159-70
65. Lerch MM, Adler G (1993) "Mechanismen der Sekretion des exokrinen Pankreas." *Ökosystem Darm V. Heidelberg, Zeitz M et al.*
66. Lerch, MM, Halangk W et al. (2000) "The role of cysteine proteases in intracellular pancreatic serine protease activation." *Adv Exp Med Biol* **477**: 403-11
67. Lerch MM, Lutz MP et al. (1997) "Dissociation and reassembly of adherens junctions during experimental acute pancreatitis." *Gastroenterology* **113**(4): 1355-66

68. Lerch MM, Saluja AK et al. (1993) "Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum." *Gastroenterology* **104**(3): 853-61
69. Lerch MM, Saluja AK et al. (1995) "Luminal endocytosis and intracellular targeting by acinar cells during early biliary pancreatitis in the opossum." *J Clin Invest* **95**(5): 2222-31
70. Lerch MM, Weidenbach H et al. (1994) "Pancreatic outflow obstruction as the critical event for human gall stone induced pancreatitis." *Gut* **35**(10): 1501-3
71. Lincoln TM, Cornwell TL (1993) „Intracellular cyclic GMP receptor proteins.“ *FASEB J.* **7**: 328-338
72. Löffler G, Petrides PE "Biochemie und Pathobiochemie" (1997), 5.Auflage, Springer-Verlag, S. 512-515
73. Löffler G, Petrides PE "Biochemie und Pathobiochemie" (1997), 5.Auflage, Springer-Verlag, S. 771-780
74. Logsdon CD (1986) "Glucocorticoids increase cholecystinin receptors and amylase secretion in pancreatic acinar AR42J cells." *J Biol Chem* **261**: 2096-2101
75. Lombardi B, Estes LW et al. (1975) "Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet." *Am J Pathol* **79**(3): 465-80
76. López-Barneo J, Pardal R & Ortega-Sáenz P (2001) "Cellular mechanism of oxygen sensing." *Annu Rev Physiol* **63**: 259-287
77. Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY (2001) "Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions." *Cell Biochem Biophys* **35**(2): 141-170
78. Luo X, Zeng W, Xu X, Popov S, Davignon I, Wilkie TM, Mumby SM, Muallem S (1999) "Alternate coupling of receptors to Gs and Gi in pancreatic and submandibular gland cells." *J Biol Chem* **274**: 17684-17690

79. Luttrell LM, Hawes BE, Van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, Lefkowitz RJ (1996) "Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases." *J Biol Chem* **271**: 19443-19450
80. Lutz MP, Piiper A, Gaisano HY, Stryjek-Kaminska D, Zeuzem S, Adler G. (1997) "Protein tyrosine phosphorylation in pancreatic acini: differential effects of VIP and CCK." *Am J Physiol* **273**: G1226-1232
81. Mansfield CS, Jones BR (2001) "Review of feline pancreatitis part one: the normal feline pancreas, the pathophysiology, classification, prevalence and aetiologies of pancreatitis." *J Feline Med Surg* **3**(3): 117-24
82. Mansfield CS, Jones BR (2001) "Review of feline pancreatitis part two: clinical signs, diagnosis and treatment." *J Feline Med Surg* **3**(3): 125-32
83. Matozaki T, Göke B, Tsunoda Y, Rodriguez M, Martinez J, Williams JA (1990) "Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of action on Ca<sup>2+</sup> mobilization and phospholipid hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. Studies using a new cholecystokinin analog, JMV-180." *J Biol Chem* **265**: 6247-6254
84. Matozaki T, Sakamoto C, Nagao M, Nishizaki H, Baba S. (1988) "G protein in stimulation of PI hydrolysis by CCK in isolated rat pancreatic acinar cells." *Am J Physiol* **255**: E652-659
85. Matozaki T, Zhu WY et al. (1991) "Intracellular mediators of bombesin action on rat pancreatic acinar cells." *Am J Physiol* **260**(6 Pt 1): G858-64
86. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera A, Wyllie AH, Orrenius S (1988) "Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress." *Toxicol Lett* **42**: 123-130
87. Meister A (1994) "Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in mammals." *J Biol Chem* **269**: 9397-9400

88. Mirabelli F, Salis A, Vairetti M, Bellomo G, Thor H, Orrenius S (1989) "Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca<sup>2+</sup> dependent mechanisms." *Arch Biochem Biophys* **270**: 478-488
89. Mithofer K, Fernandez-Del Castillo C, Frick TW, Lewadrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL (1995) "Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat." *Gastroenterology* **109**: 239-246
90. Moncada S, Higgs A (1993) "The L-arginine-nitric oxide pathway." *New Engl J Med* **329**: 2012
91. Mouret J (1895) "Contribution a l'etude des cellules glandulaires (pancreas)." *J Anat Physiol* **31**: 221-236
92. Mutt V (1980) "Cholecystokinin: isolation, structure and function." *Gastrointestinal Hormones* G GBJ New York, Raven Press: 169-221
93. Mutt V, Jorpes JE (1968) "Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin." *Eur J Biochem* **6**(1): 156-62
94. Nagai H, Henrich H et al. (1989) "Role of pancreatic enzymes and their substrates in autodigestion of the pancreas. In vitro studies with isolated rat pancreatic acini." *Gastroenterology* **96**(3): 838-47
95. Natarajan V (1995) "Oxidants and signal transduction in vascular endothelium." *J Lab Clin Med* **125**: 26-37
96. Neuschwander-Tetri BA, Ferrell LD, Sukhabote RJ, Grendell JH (1992) "Glutathionemonoethyl ester ameliorates caerulein-induced pancreatitis in the mouse." *J Clin Inv* **89**: 109-116
97. Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S (1992) "Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**: 449-70

98. Nicotera P, McConkey D, Svensson SA, Bellomo G, Orrenius S (1988) "Correlation between cytosolic Ca<sup>2+</sup>-concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress." *Toxicology* **52**: 55-63
99. Niederau C, Luthen R, Klonowski-Stumpe H, Schreiber R, Soika I, Sata N, Bing H, Haussinger D (1999) "The role of calcium in pancreatitis." *Hepatogastroenterology*; **46**(29): 2723-30
100. Niederau C, Niederau M, Borchard F, Ude K, Lüthen R, Strohmeyer, Ferrell LD, Grendell JH (1992) "Effects of antioxidants and free radical scavengers in three different models of acute pancreatitis." *Pancreas* **7**: 486-496
101. Niederau, C. and J. H. Grendell (1988) "Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment." *J Clin Invest* **81**(1): 229-36
102. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T (1990) "Changes in lipid peroxidation and oxygen radical scavengers in cerulein induced acute pancreatitis." *Digestion* **47**: 130-137
103. Nonaka A, Manabe T, Tobe T (1991) "Effect of new synthetic ascorbic acid derivative as a free radical scavenger on the development of acute pancreatitis in mice." *Gut* **32**: 528-532
104. Nordback IH, Cameron JL (1993) "The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in acute Pancreatitis in the canine isolated pancreas preparation." *Surgery* **113**: 90-97
105. Owyang C, Louie DS et al. (1986) "Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion. Suppression of cholecystokinin release by trypsin." *J Clin Invest* **77**(6): 2042-7
106. Park MK, Lomax RB, Tepikin AV, Petersen OH (2001) "Local uncaging of caged Ca<sup>2+</sup> reveals distribution of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels in pancreatic acinar cells." *PNAS* **98** (19): 10948-10953



107. Park MK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK (2003) "Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis" *World J Gastroenterol* **9(10)**:2266-9
108. Palade G (1975) "Intracellular aspects of the process of protein synthesis." *Science* **189**(4200): 347-58
109. Pearse BM, Robinson MS (1990) "Clathrin, adaptors, and sorting." *Annu Rev Cell Biol* **6**: 151-71
110. Piiper A, Stryjek-Kaminska D, Klengel R, Zeuzem S (1997) "CCK, carbachol and bombesin activate distinct PLC- $\beta$  isoenzymes via Gq/11 in rat pancreatic acinar membranes." *Am J Physiol* **272**: G135-G140
111. Pines J (1993) "Cyclin and cyclin dependant kinases take your partners." *TIBS* **18**: 195-197
112. Pommier B, Da Nascimento S, Dumont S, Bellier B, Million E, Garbay C, Roques BP Noble F (1999) "The cholecystokinin B receptor is coupled to two effector pathways through pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins." *J Neurochem* **73**: 281-288
113. Rinderknecht H (1986) "Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation." *Dig Dis Sci* **31**(3): 314-21
114. Rosewicz S, Riecken EO, Wiedenmann B (1992) "The ampicrine pancreatic cell line AR42J: a model system for combined studies on exocrine and endocrine secretion." *J Clin Inv* **205**-209
115. Saluja A, Saluja M et al. (1986) "Failure of extracellular digestive enzymes to alter in vitro secretion by rat pancreas." *Am J Physiol* **250**(3 Pt 1): C413-7
116. Saluja A, Saluja M, et al. (1989) "Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization." *J Clin Invest* **84**(4): 1260-6

117. Saluja AK, Dawra AK et al. (1992) "CCK-JMV-180, an analog of cholecystokinin, releases intracellular calcium from an inositol trisphosphate-independent pool in rat pancreatic acini." *J Biol Chem* **267**(16): 11202-7
118. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL (1985) "The pathogenesis of acute pancreatitis: the source and role of oxygen derived free radicals in three different experimental models." *Ann of Surg* **201**: 633-639
119. Sachs E, Jamieson JD (1992) "Perturbation of regulated secretion in the pancreatic acinar cell line, AR42J" *Am J Physiol* **262**: G257-266
120. Saward L, Zahradka P (1997) "Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* **81**: 249-257
121. Schoenberg MH, Büchler M, Beger HG (1994) "Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis." *Hepato-Gastroenterology* **41**: 313-319
122. Schoenberg MH, Büchler M, Beger HG (1992) "The role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis." *Free Radicals Biology and Medicine* **12**: 515-522
123. Schoenberg MH, Büchler M, Gaspar M, Stinner A, Younes M et al. (1990) "Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat." *Gut* **31**:1138-1145
124. Schoenberg MH, Büchler M, Younes M, Kirchmayr R, Brückner UB, Beger HG (1994) "Effect of antioxidant treatment in rats with acute hemorrhagic-pancreatitis." *Digestive Diseases and Sciences* **39**: 1034-1040
125. Schulz HU, Niederau C (1994) "Oxidative stress-induced changes in pancreatic acinar cells: insights from in vitro studies." *Hepato-Gastroenterology* **41**:309-312
126. Seufferlein T, Withers DJ, Broad S, Herget T, Walsh JH, Rozengurt E (1995) "The human CCKB/gastrin receptor transfected into rat1 fibroblasts mediates

---

activation of MAP kinase, p74raf-1 kinase and mitogenesis." *Cell Growth Differ* **6**:383-393

127. Sharp RE, Chapman SK (1999) "Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins." *Biochim Biophys Acta* **1432**(2): 143-58

128. Sheehan JP, Russell H, Swerdlow, Miller SW, Davis RE, Parks JK, Parker WD, Tuttle JB (1997) "Calcium Homeostasis and reactive oxygen species production in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic alzheimers disease." *J Neurosc* **17**(12): 4612-4622

129. Sies H (1998) "Biochemie des oxidativen Stress." *Angew Chemie* **98**: 1061-1075

130. Sies H (1991) "Oxidative stress: from basic research to clinical application." *Am J Med* **91** suppl.3C:31S-38S

131. Sies H (1997) "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* **82**: 291-295

132. Sies H (1993) "Strategies of antioxidant defense." *Eur J Biochem* **215**: 213-219

133. Silvente Poirot S, Hadjiivanova C et al. (1993) "Study of the states and populations of the rat pancreatic cholecystokinin receptor using the full peptide antagonist JMV 179." *Eur J Biochem* **212**(2): 529-38

134. Singer MV, Gyr K et al. (1985) "Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984." *Gastroenterology* **89**(3): 683-5

135. Slack JM (1995) "Developmental biology of the pancreas." *Development* **121**(6): 1569-80

136. Stark HA, Sharp CM, Sutliff VE, Martinez J, Jensen RT, Gardner JD (1989) "CCK-JMV-180: a peptide that distinguishes high affinity cholecystokinin receptors from low-affinity cholecystokinin receptors." *Biochim Biophys Acta* **1010**:145-150
137. Steiner JM, Williams DA (1999) "Feline exocrine pancreatic disorders." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **29**(2): 551-75
138. Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT (1994) "A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G-protein beta gamma subunits." *Cell* **77**: 83-93
139. Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B (1995) "Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase." *Science* **269** : 690-693
140. Streb H, Irvine RF et al. (1983) "Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate." *Nature* **306**(5938): 67-9
141. Suzuki H, Suematsu M, Miura S, Asako H, Kurose I, Ishii H, Houzawa S, Tsuchiya M (1993) "Xanthine oxidase-mediated intracellular oxidative stress in response to cerulein in rat pancreatic acinar cells." *Pancreas* **8**: 465-470
142. Sweiry JH, Mann GE (1992) "Oxidative stress inhibits pancreatic fluid secretion." *Intern J Pancreat* **12**:139A
143. Sweiry JH, Mann GE (1996) "Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis." *Scand J Gastroenterology* **31**:10-15
144. Sweiry JH, Shibuya I, Asada N, Niwa K, Doolabh K, Kanno T, Mann GE (1996) "Inhibition of exocrine pancreatic secretion and Ca<sup>2+</sup> oscillations in oxidative stress: beneficial effects of antioxidants." *Digestion* **57**: 268P

145. Takacs T, Czako L, Jarmay K, Hegyi P, Pozsar J, Marosi E, Pap A, Lonovics J (1994) "Time-course changes in pancreatic laboratory and morphologic parameters in two different acute pancreatitis models in rats." *Acta Med Hung* **50**(1-2): 117-130
147. Thomason PA, James SR, Casey PJ, Downes CP, (1994) "A G-protein beta gamma-subunit responsive phosphoinositide 3-kinase activity in human platelet cytosol." *J Biol Chem* **269**: 16525-16528
148. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA (1996) "Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with non-insulin –dependent diabetes mellitus." *J Clin Inv* **97**: 22-28
149. Tooze J, Kern HF et al. (1989) "Condensation-sorting events in the rough endoplasmic reticulum of exocrine pancreatic cells." *J Cell Biol* **109**(1): 35-50
150. Toyama MT, Kusske AM, Reber PU et al. (1995) "Administration of a nitric oxide donor decreases the severity of acute pancreatitis." *Pancreas* **11**: A451
151. Trapnell JE (1981) "Pathophysiology of acute pancreatitis." *World J Surg* **5**(3): 319-27
152. Tsunoda Y, Owyang C (1993) "Differential involvement of phospholipase A2 /arachidonic acid and phospholipase C/phosphoinositol pathways during cholecystokinin receptor activated Ca<sup>2+</sup>-oscillations in pancreatic acini." *Biochem Biophys Res Com* **194**: 1194-1202
153. Tsunoda Y, Yoshida H, Owyang C (1996) "Structural requirements of CCK analogues to differentiate second messengers and pancreatic secretion." *Am J Physiol* **271**: G8-G19
154. Walsh J. (1994) "Gastrointestinal hormones. Physiology of the gastrointestinal tract." L Johnson New York, Raven Press: 1-128
155. Wan Y, Kurosaki T, Huang XY (1996) "Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors." *Nature* **380**: 541-544

156. Wank SA, Harkins R et al. (1992) "Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 3125-9

157. Ward JB, Petersen OH, Jenkins SA, Sutton R (1995) "Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis?" Lancet **346**: 1016-1019

158. Weber H, Merkord J, Jonas L, Wagner A, Schröder H, Käding U, Werner A, Dummler W (1995) "Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas." Pancreas **11**: 382-388

159. Weber H, Roesner JP, Nebe B, Rychly J, Werner A, Schröder H, Jonas L, Leitzmann P, Schneider KP, Dummler W (1998) "Increased cytosolic Ca<sup>2+</sup> amplifies oxygen radical-induced alterations of the ultrastructure and the energy metabolism of isolated rat pancreatic acinar cells." Digestion **59**:175-185

160. Werner J, Rivera J, Fernandez-del Castillo C et al. (1997) "Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous vs. necrotizing pancreatitis." Surgery, **121**:23-30

161. Werner J, Rivera J, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, Kollias N, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL (1998) "On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis" Gut, **43**: 401-407

162. Williams JA (1997) "Pancreatic acinar cell intracellular signalling mechanisms." Curr Opin Gastroenterol **13**: 369-374

163. Wisner J, Grenn D, Ferrell L, Renner I (1988) "Evidence for a role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of caerulein induced acute pancreatitis in rats." Gut **29**: 1516-1523

164. Yamaguchi H, Kimura T, Nawata H (1990) "Does stress play a role in the development of severe pancreatitis in rats?" Gastroenterology **98**: 1682

165. Yule DI, Wu D, Essington TE, Shayman JA, Williams JA (1993) "Sphingosine metabolism induces Ca<sup>2+</sup>-oscillations in rat pancreatic acinar cells." *J Biol Chem* **268**(17): 12353-12358

166. Zou Y, Komuru I, Yamazaki T, Kudoh S, Aikawa R, Zhu W, Shiojima L, Hiroi Y, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y (1998) " Cell type-specific angiotensin II-evoked signal-transduction pathways: critical roles of Gbetagamma subunit, Src family and Ras in cardiac fibroblasts." *Circ Res* **82**: 337-345

## 8. Abkürzungen

AG1478	4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline
Anti-8-OHG	Anti-8-Hydroxyguanosine
A23187	Streptomyces chartreusensis (Calcium Ionophore)
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
CCK-8	[Tyr(SO <sub>3</sub> H) <sup>27</sup> ]-Cholecystokinin Amide, Fragment 26-33
CCCP	Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone
DAF-FM DA	3-Amino-4-Aminomethyl-2',7'-Difluorescein
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride Hydrate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGF	epidermal growth factor, Epidermaler Wachstumsfaktor
FURA-2/AM	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-2'-amino5'-methylphenoxy-ethane-N,N,N',N',-tetraacetic Acid, Pentaacetaoxymethyl Ester
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein Diacetate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd
HEPES	
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid



---

InsP <sub>3</sub>	Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat
JMV-180	
L-NAME	NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester, Hydrochloride
L-NIL, Dihydrochloride	[L-N6-(1-Iminoethyl)lysine], DiHCL
LY 294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H- 1-benzopyran-4-one
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid- Phosphat
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat
PT	Phosphotyrosin
PTx	Pertussis Toxin
PD 98,059	2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)- -4H-1-benzopyran-4-one
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP-2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t- butyl) pyrazolol[3,4-d]pyrimidine
ROS	Radical Oxygen Species
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamine
U73122	1-(6-((17- betamethoxyestra1,3,5(10)trien-17- yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5- dione

## 9. Lebenslauf

**Persönliche Daten:**

Name : Iris Keiner  
Geburtsdatum : 25.03.1977  
Geburtsort : Berlin-Schöneberg  
Eltern : Maria-Margareta Keiner, geb. Althelmig  
Dr. med Johann-Georg Keiner  
Geschwister : Anne Keiner, geb. 06.03.1979  
Philip Keiner, geb. 29.12.1981  
Nationalität : deutsch  
Schulbildung : Mai 1996: Abitur  
1987-1996: Gymnasium Dionysianum, Rheine  
1983-1987: Grundschulen in Rinteln und Rheine

**Hochschulbildung:**

10/1997- 05/2004: Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster  
05/2004: Drittes Staatsexamen  
03/2003: Zweites Staatsexamen  
07/2000: Erstes Staatsexamen  
07/1999: Physikum

**Praktisches Jahr:**

12/2003-03/2004: Innere Medizin am Universitätsklinikum der WWU Münster  
08/2003-11/2003: Pädiatrie am Universitätsklinikum der WWU Münster  
04/2003-08/2003: Chirurgie am Royal Hospital in Hobart, Tasmanien, Australien

**Famulaturen:**

200-2002: 4 Wochen Allgemeinchirurgie am Mathias –Hospital Rheine  
4 Wochen in der Praxis Dr. Keiner/Dr. Nebel für Innere Medizin und Kardiologie in Rheine  
8 Wochen in der Inneren Klinik B am Universitätsklinikum Münster

**Studienbegleitende Tätigkeit:**

1999-2000: Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie (WWU Münster): Übersetzung großer Teile der Homepage des Institutes ins Englische sowie Tutorin im Präparierkurs

**Dissertation:**

Beginn im Oktober 2000: „Mechanismen der Radikalentstehung in AR42J-Zellen“  
am Institut der Inneren Klinik B der Uniklinik Münster  
Doktorvater: Prof. Dr. med. M. M. Lerch  
Mündliche Prüfung am 1.09.2005 in Greifswald

**Berufserfahrung:**

05/2004-09/2004: Assistenzärztin zur Weiterbildung in der Praxis Dr. Keiner, Rheine  
seit Januar 2005: Internship am Launceston General Hospital in Tasmanien, Australien

## 10. Danksagung

In besonderem Maße danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Lerch für die Bereitstellung des Themas und seine Unterstützung.

Herrn Dr. J. Schnekenburger danke ich für die Betreuung der Experimente und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. rer. Nat. M. Ruthenbürger und Frau Dr. med. J. Mayerle danke ich für ihre ständige Unterstützung und Tips für die Auswertung der Versuche.

Außerdem danke ich meinen Eltern, die mir alles ermöglicht haben.