Universität Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin I

Ärztlicher Direktor:

Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Untersuchung der protektiven Rolle des Hitzeschockproteins 72 bei akuter Pankreatitis

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Carolin Gonzior, geb. Schwarz

aus Erlabrunn

2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. P. Strnad

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Walcher

Tag der Promotion: 14.12.2017

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgendem Fachartikel veröffentlicht:

Lunova M, Zizer E, Kucukoglu O, Schwarz C, Dillmann WH, Wagner M, Strnad P: Hsp72 Overexpression Accelerates the Recovery from Caerulein-Induced Pancreatitis. PLoS One. 7 (2012)

DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039972
Veröffentlicht unter Creative Commons Attribution License, CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode

Für meine Familie, die mich immer bedingungslos unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis…….. I

Abkürzungsverzeichnis…….. II

1. Einleitung…….. 1

1.1 Pankreas…….. 1

1.2 Pankreatitis…….. 2

1.3 Klinik und Behandlung…….. 5

1.4 Hitzeschockproteine…….. 6

1.5 Mausmodell…….. 10

1.6 Zielsetzung…….. 11

2. Material und Methoden…….. 12

2.1 Chemikalien und Reagenzien…….. 12

2.2 Kits…….. 13

2.3 Andere…….. 14

2.4 Reaktionsansätze und Pufferlösungen…….. 15

2.5 Geräte…….. 19

2.6 Versuchstiere…….. 21

2.7 Stressmodelle…….. 23

2.8 Molekularbiologische und biochemische Methoden…….. 24

2.9 Färbungen…….. 35

2.10 statistische Auswertung …….. 37

3. Ergebnisse…….. 38

3.1 Charakterisierung der Versuchstiere …….. 38

3.2 Einfluss von Hsp72 auf den Verlauf einer AP…… 45

3.3 Einfluss von Hsp72 Überexpression

auf wiederholte Caerulein-Expression…….. 58

3.4 Einfluss von Hsp72 Überexpression

auf L-Arginin induzierte Pankreatitis…….. 60

4. Diskussion…….. 64

5. Zusammenfassung …….. 69

6. Literaturverzeichnis……70

Anhang……75

Danksagung……77

Lebenslauf……78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest	aqua destillata (destilliertes Wasser)
AP	akute Pankreatitis
APF	Aminophenyl fluorescein (Fluoreszensfarbstoff)
APS	Amoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	basepair
ca.	zirka
CCKA	Cholezystokinin A
cDNA	zyklische Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CP	chronische Pankreatitis
CT	Computertomographie
Cy3	Cyanin 3
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethyldicarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence (verbesserte Chemieluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetra-Essigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
et al.	und andere
EtOh	Ethanol
F-Primer	forward Primer
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (fluoreszierendes Molekül)
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GRP	Glucose-reguliertes Protein
h	Stunden
HCL	Chlorwasserstoff
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffer)
HDAC	Histon-Deacetylase
hrsg.	herausgegeben
Hsc	heat schock cognate
HSF	Hitzeschockfaktor
Hsp	Hiteschockprotein

H_2O_2	Wasserstoffperoxid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
M	molare Masse
MAK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHC	Haupt-Histo-Kompatibilitästskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MPO	Myeloperoxidase
m-RNA	massenger-Ribonukleinsäure
MRP	Meerrettich-Peroxidase
NaCl	Natriumchlorid
NaClO	Natriumhypochlorid
NF_KB	Nuklear Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenraktion)
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PVDF	Poly-vinyliden-fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
R-Primer	reverse Primer
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime- Polymerase chain reaction (Echtzeit-Polymerasekettenraktion)
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
sek	Sekunde
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
sog.	sogenannte
SSC	Saline Sodium Citrat (Puffer)
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA (Puffer)
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetra-methyl-ethylen-diamin (Polymerisationskatalysator)

TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-aminomethan (Puffer)
u.a.	unter anderem
U/L	Units pro Liter (Einheiten pro Liter)
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

1. Einleitung

1.1 Pankreas

Das Pankreas ist eine gemischte, rein seröse Drüse, die sowohl als endokrines als auch exokrines Sekretionsorgan wirkt. Es liegt retroperitoneal vor der Hauptschlagader und besteht makroskopisch aus Kopf (Caput), welcher sich in einer Biegung des Zwölffingerdarmes (Duodenum) befindet, Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda), welcher an die Milz stößt. Das exokrine Gewebe entspricht dem Hauptteil des Organs und sezerniert ca. 1,5 l Pankreassekret pro Tag. Dieses ist sowohl reich an Enzymen als auch alkalisch und wirkt, nach Abgabe in das Duodenum, als Verdauungssaft. Das Sekret enthält Bicarbonat und Verdauungsenzyme die sowohl proteolytisch (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Caboxypeptidase A/B, Aminopeptidase), amylolytisch (d.h. Verdauung der Kohlenhydrate durch α-Amylase), nukleolytisch (d.h. Verdauung der Nukleinsäuren wie Ribonuklease und Desoxyribonuklease) als auch lipolytisch (Lipase, Phospholipase A, Cholesterinesterase) wirken. Die Enzyme werden in den Azinuszellen (Drüsenendstück) gebildet und über kleine Gänge in den Pankreas-Ausführungsgang geleitet. Innerhalb des exokrinen Drüsengewebes (vor allem im Bereich der Cauda) befinden sich die endokrinen Anteile in Form kleiner Gruppen (Langerhans-Inseln). Deren Aufgabe ist die Produktion von Hormonen wie Glukagon (A-Zellen) und Insulin (B-Zellen) zur Regulierung des Zuckerhaushaltes, sowie Somatostatin (Inhibitor der A-und B-Zellen) und des pankreatischen Polypeptides, welches das Sättigungsgefühl vermittelt. Im Gegensatz zu den Enzymen des exokrinen Anteiles werden die Hormone direkt ins Blut abgegeben.

1.2. Pankreatitis

Die Pankreatitis ist eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse, welche zumeist aufgrund einer vorzeitigen Aktivierung der Pankreasenzyme mit anschließendem Selbstverdau des Organs entsteht. Dieser „Selbstverdau“ wird in einem physiologischen Organismus durch drei Mechanismen verhindert:
1) Die lokale Trennung von Enzymen und Zellproteinen.
2) Das Vorhandensein von Hemmstoffen, die eine vorzeitige Aktivierung der Enzyme innerhalb der Gänge und des Gewebes der Drüse verhindern.
3) Die Freisetzung der Enzyme in einer inaktiven Form.
Sind diese Schutzmechanismen nicht gewährleistet, kann es zu einer chronisch verlaufenden, oder einer plötzlich beginnenden akuten Pankreatitis kommen, die in 15-20% aller Fälle tödlich endet (Gupta und Wu 2010).

1.2.1 Akute Pankreatitis

Jedes Jahr werden pro 100 000 Einwohner ca. 15-20 Fälle von akuter Pankreatitis (AP) verzeichnet, wobei sie bei Männern und Frauen im gleichen Maße auftritt.
Die AP kann in zwei weitere Gruppen unterteilt werden: Die akute infektiöse Pankreatitis ist eine, durch Bakterien oder Viren ausgelöste primäre Infektion der Bauchspeicheldrüse mit eher mildem klinischem Verlauf (Klöppel et al. 2004, 807-820), die aufgrund Ihrer Seltenheit hier aber nur am Rande erwähnt werden soll.
Die akute nichtinfektiöse Pankreatitis manifestiert sich in einer nekrotisch verlaufenden Erkrankung und folgt einer primären Autodigestion und sekundären Entzündungsreaktion, wobei nur ca. 10% der Betroffenen eine schwere Verlaufsform aufweisen (Klöppel et al. 2004, 807-820). Dabei reicht die Ausprägung von einer interstitiellen Entzündung mit ödematösen Veränderungen bei erhaltener Organstruktur bis zur nekrotisierenden Form mit Zelltod und Verlust der Parenchymstruktur (Göke und Beglinger 2007). Ursächlich dafür sind zumeist Gallensteine, welche die Papille obstruieren und somit zu einem Druckanstieg führen. Weitere Ursachen können Alkoholabusus, Schock, Trauma, operative Eingriffe (z.B. ERCP), Medikamente (z.B.

Kortikoide, Diuretika und orale Kontrazeptiva.) sowie Tumore sein (Göke und Beglinger 2007). Durch die Organzerstörung gelangen Pankreasenzyme ins Blut und können dort nachgewiesen werden.

Der Verlauf der akuten nichtinfektiösen Pankreatitis konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt werden. Sicher ist jedoch, dass die Autodigestion (d.h. Selbstverdauung) eine zentrale Rolle spielt. Dies setzt eine Freisetzung aktiver Pankreasenzyme aus den azinären Zellen in das interstitielle Gewebe voraus. Ein möglicher Ablauf ist dabei die o.g. Obstruktion der Papille durch einen Gallenstein und darauffolgender Druckanstieg und/oder Gallenreflux im Pankreasgang (Klöppel et al. 2004, 807-820). Dabei könnte es zu einer Aktivierung von Trypsinogen kommen, was unter physiologischen Bedingungen nicht stattfindet.

Die Freisetzung von aktiven Pankreasenzymen in das umgebende Fettgewebe resultiert in Nekrosen desselben (u.a. durch Lipasen), gefolgt von der Freisetzung von Fettsäuren und Aktivierung weiterer Proenzyme. Dadurch kommt es zur Ausdehnung der Nekrose auf Venen, Azini und Pankreasgänge und letztendlich zu einer hämorrhagischen (d.h. blutigen) Nekrose. Kommt es nun zur Resorption der Nekrose entsteht eine Fibrose; eine Infektion resultiert in einem Abszess und eine Abkapselung führt zu einer Pseudozyste. Morphologisch weißt die milde Form der akuten nichtinfektiösen Pankreatitis punktförmige, weißgelbe Fettgewebsnekrosen auf der Pankreasoberfläche auf sowie Ödeme, welche die Drüse vergrößern. Die schwere Form der Entzündung erkennt man makroskopisch deutlich an den peripankreatischen Fettgewebsnekrosen mit Blutungen. Ein Übergreifen auf das Mesenterium des Colon transversum, das Omentum majus und das retroperitoneale Fettgewebe ist dabei möglich (Klöppel et al. 2004, 807-820).

1.2.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine Erkrankung die in den westlichen Ländern mit einer Inzidenz von 10 Erkrankungen auf 100 000 Menschen auftritt, wobei hauptsächlich Männer mit erhöhtem Alkoholabusus betroffen sind (Klöppel et al. 2004, 807-820). Diese Entzündung bedingt eine irreversible Schädigung der Bauchspeicheldrüse und einen Verlauf, der sich in akuten wiederholten Attacken oder in einer stetigen Progression der Symptome äußert (Göke und Beglinger 2007). Als Folge der wiederkehrenden Entzündungsprozesse kommt es zum bindegewebigen Ersatz des Drüsenparenchyms sowie der Veränderung/ Verlagerung von Pankreasgängen.
Neben dem langjährigen Alkoholmissbrauch können auch genetische Mutationen im Trypsinogen-Gen oder metabolische Faktoren, wie Hyperkalzämie ursächlich sein. (Klöppel et al. 2004, 807-820)
Eine Hypothese zur Entstehung dieser Erkrankung ist die Entwicklung der chronischen Pankreatitis aus einer schweren akuten Pankreatitis. Dabei kommt es zur Entwicklung einer Fibrose, induziert durch Makrophagen, welche die Nekrose resorbieren und dabei Zytokine (z.B. TGF-ß) abgeben. Dadurch entsteht eine sog. „Nekrose-Fibrose-Sequenz“ (Klöppel et al. 2004, 807-820), welche im weiteren Verlauf zu einer Narbenbildung in den betroffenen Gängen führt und somit das Abfließen von Pankreassekret behindert. Dieser Sekretstau führt zu Obstruktionen der betroffenen Gänge und damit zum Abbau des umgebenden Azinusgewebes.
Morphologisch lassen sich im frühen Stadium herdförmige Fibrosen nachweisen, oft begleitet von einer Pseudozyste. In späteren Stadien kommt es zur ausgedehnten Fibrose mit vermehrten Vernarbungen, bis hin zur Schrumpfung der Drüse.

1.3 Klinik und Behandlung

Patienten mit Verdacht auf akute Pankreatitis weisen zumeist charakteristische Symptome auf. Dazu gehören akut auftretende Bauchschmerzen, die gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen und für gewöhnlich nicht in Schüben kommen. Im weiteren Verlauf klagen diese Patienten über ein Ansteigen des Schmerzes bis hin zum Maximum innerhalb der nächsten 6h sowie ggf. dem Auftreten von Fieber. Eine bläuliche Verfärbung im Bereich der Lendenregion kann auf eine Blutansammlung und damit auf eine hämorrhagische Pankreatitis hinweisen.
Da diese Symptome allerdings Differentialdiagnosen, wie z.B. Cholecystitis (d.h. Gallenblasenentzündung), Ulzera (d.h. Geschwüre), Angina abdominalis (d.h. Durchblutungsstörung der Darmwand) und Ileus (d.h. Darmverschluss) zulassen, ist eine weiterführende Diagnostik in Form von Labor (u.a. Bestimmung der Amylase- und Lipase-Werte), EKG, Ultraschall, ggf. CT und ggf. ERCP unumgänglich.
Des Weiteren empfiehlt sich die Untersuchung des Blutbildes, die Bestimmung von Elektrolyten, Kreatinin und Harnstoff sowie die Blutgasanalyse um den Schweregrad der Pankreatitis einzuschätzen.
Bei einer Pankreatitis kommt es typischerweise zur signifikanten Ödembildung mit Flüssigkeits-Extravasation. Um dieser entgegenzuwirken, ist eine durchgehende Flüssigkeitstherapie notwendig. Um eine Pankreasreizung zu verhindern, werden die Patienten initial nüchtern belassen, jedoch hat sich ein frühzeitiger Kostaufbau bewährt. Dazu empfiehlt sich eine Jejunalsonde oder falls dies nicht möglich ist, totale parenterale Ernährung. Bei massiven Bauchschmerzen ist eine starke Schmerztherapie unumgänglich. Des Weiteren führt eine akute Pankreatitis zu einer Obstipation, sodass meistens abführende Maßnahmen notwendig werden. Durch diese Maßnahmen kommt es bei der Mehrzahl der Patienten zur raschen Besserung, während sich in ca. 15-30% der Fälle eine schwere, nekrotisierende Form ausbildet (Nam und Murthy 2003). Neben der Nekrose wird hierbei die sekundäre Infektion gefürchtet. Die nekrotisierende Pankreatitis stellt eine therapeutische Herausforderung dar, bei der die Vor- und Nachteile der konservativen (d.h. antibiotische sowie Schmerztherapie) und operativen Therapie (Abtragung der Nekrosen sowie antiseptische Behandlung der Infektion) gegeneinander abgewogen werden sollten.

1.4 Hitzeschockproteine

1.4.1 Einteilung

Hitzeschockproteine (Hsp) sind ubiquitär vorkommende, evolutionär konservierte Proteine, die ihren Namen der Beobachtung verdanken, dass deren Expression unter Hitzeschockbedingungen hochreguliert wird (Lindquist 1986), (Lindquist und Craig 1988), (Nover 1991). Die Einteilung der Hsp erfolgt nach Molekulargewicht (kDa) in Untergruppen, die in folgender Tabelle zusammengefast sind:

Tabelle 1: Einteilung der wichtigsten Hitzeschockproteine (Toivola et al. 2010)

Klasse und Vertreter (alternativer Name)	Funktion	Verbindung zu menschlichen Krankheiten
Kleine Hsp`s – HspB Familie		
- HspB1 (HSP27)	- induzierbar; schützt vor oxidativem Stress und Protein-Aggregation	- Mutation führt zu Neuropathien (Charcot-Marie-Tooth-Syndrom
- HspB5 (αB-Crystallin)	- induzierbar, schützt vor Hitze und oxidativem Stress , Apoptose und Protein-Aggregation	- Mutation führt zu Cardio-Myopathien
- HspB8 (HSP22)	- Zell- und umstandsabhängig induzierbar; verhindert die Aggregation von falsch gefalteten Proteinen	- Muatation fürt zu Neuropathien (Charcot-Marie-Tooth-Syndrom)
DNAJ – Hsp40 Familie		
- DNAJB1 (HSP40)	- induzierbar; beteiligt an der Protein-	- Schutz gegen die Bildung

	Degradierung	neuronaler Einschlüsse
Hsp70 – HspA Familie - Hspa1a (HSP70/72)	- induzierbar; schützt vor Hitze, UV-Strahlung, oxidativen/ osmotischen Stress, Ischämie, Pankreatitis	- steigt nach Anwendung; die Induzierbarkeit wird mit steigendem Alter besser
- Hspa5 (GRP78)	- überlebenswichtig; Proteinfaltung im ER, wird im ER hochreguliert	- verbunden mit hämolytisch-urämischen Syndrom und den Marinesco-Sjörgen Syndrom
- Hspa8 (HSC70)	- überlebenswichtig; konstitutiv gebildet; beteiligt an Translation, Faltung und Translokation der Proteine; schützt vor Protein-Aggregation und Apoptose	
Hsp 90 – HspC Familie - Hspc1 (HSP90A)	- induzierbar; überlebenswichtig	
- Hspc3 (HSP90B)	- konstitutiv; überlebenswichtig	
Hsp110 – HspH Familie - HspH1 (Hsp105)	- unterdrückt Protein-Aggregation	

1.4.2 Aufgaben der Hitzeschockproteine

Erstmals erwähnt wurden die Hsp in Verbindung mit den Speicheldrüsen der Fruchtfliege Drosophila (Ritossa 1962). Der Grundgedanke, dass diese Proteine immer dann an Bedeutung gewinnen, wenn der Organismus Erhöhung der Temperatur erfährt war grundlegend für die Namensgebung. Heute ist bekannt, dass es sich nicht ausschließlich um die Temperatur handelt, sondern, dass Hsp bei einer Reihe von Stresssituationen z.B. UV-Strahlung, oxidativem, mechanischem sowie toxischem Stress und Entzündungen von besonderer Bedeutung sind. Die Hauptaufgabe der Hitzeschockproteine ist die Einnahme und Erhaltung der korrekten Tertiärstruktur von Proteinen. Da in Stresssituationen die Fehlerrate bei der Faltung von Proteinen zunimmt, wird der erhöhte Bedarf mit einer erhöhten Hsp-Expression gedeckt. Durch die Protein-schützende Wirkung gelten Hsp als multifunktionelle, stressprotektive Faktoren. Außerdem kann man nach einem erhöhten Hsp-Pegel von einer gewissen Toleranz gegenüber folgendem Stress sprechen (z.B. Thermotoleranz). Ihre Wirkung wurde u.a. in zahlreichen Situationen belegt, die mit Protein-Aggregatbildung einhergehen. In diesen Fällen wirken Hsp sowohl der Aggregatbildung als auch der Krankheitsentwicklung entgegen. Durch die Prozessierung und Präsentation von Antigenen sind Hsp an der Immunantwort beteiligt und beeinflussen die Immunogenität von Tumoren durch die Bindung antigener Peptide und anschließendem Auslösen einer T-Zell-vermittelten Immunantwort (Srivastava et al. 1998), (Binder et al. 2001). Des Weiteren sind Hitzeschockproteine durch ihr Mitwirken in der Translation und Translokation von Proteinen in die Vorgänge des Körperhaushaltes involviert, schützen vor Zell-Apoptose und sind wichtig für die Qualitätskontrolle von T- und B-Zellrezeptoren sowie MHC-I-Komplexen (Piatelli et al. 2002), (Wright et al. 2004), (Schnaider et al. 2000).

1.4.3 Regulation der Hitzeschockproteine

Verantwortlich für die Regulation der Hsp-Transkription sind die sog. „heat-shock“ Transkriptionsfaktoren (HSF). Zuerst müssen die HSF phosphoryliert werden, anschließend folgt eine Trimerbildung aus drei Monomeren und eine Translokation aus dem Zellplasma in den Zellkern (Morimoto 1992; Sarge 1993; Westwood 1993). Durch die Bindung von Hsp an HSF wird die Transkription blockiert. Wenn in einer Stresssituation vermehrt denaturierte Proteine entstehen binden die Hsp vermehrt an diese und die HSF werden frei um die Produktion weiterer Hsp zu veranlassen. Somit besteht eine sog. negative Feedback-Regulation.
Neben diesen stress-induzierbaren, gibt es sog. konstitutive im Cytosol und Nukleus exprimierte Hitzeschockproteine, wie z.B. Hspa8 (Hsc70) und Hspc3 (Hsp90B). (Toivola et al. 2010)

1.4.4. Hsp72

Das Hitzeschockprotein 72 ist eines der am besten erforschten cytoplasmatischen Chaperone, welches durch Stress induziert werden kann. Im Gegensatz dazu, sind andere Chaperone in bestimmten Zellkompartimenten zu finden (z.B. Grp78 im endoplasmatischen Retikulum) oder liegen konstitutiv vor (z.B. Hsc71) (Kampinga et al. 2009). Im Hinblick darauf, wurde nachgewiesen, dass der Überexpression von Hsp72 eine protektive Funktion in Stress-Situationen, im Fall der Pankreatitis speziell für Azini, obliegt. (Westerheide und Morimoto 2005), (Clemons et al. 2002). Im Zuge einer akuten Pankreatitis, kommt es zur vermehrten Expression von Hsp72 im Bereich der azinären Zell-Vakuolen (Song et al. 2008). In diesem Falle schützt das intrazelluläre Hsp72 die Drüse vor der Entzündung, indem eine frühzeitige Aktivierung von Trypsinogen verhindert wird. Andererseits kann extrazelluläres Hsp72 zu einer Involvierung der Leber und zur Entstehung von SIRS führen (Song et al. 2008), bei dem, ungeachtet von dem eigentlichen Entstehungsort einer Entzündung, weitere Entzündungsherde im Organismus auftreten.

1.5 Mausmodell

Zum besseren Verständnis der akuten Pankreatitis, wurden verschiedene Modelle entwickelt, von denen die durch Caerulein induzierte Pankreatitis in der Maus das am weitesten verbreitete ist (Pandol et al. 2007).
Für dieses Model wurde eine Mauslinie mit einem Cytomegalovirus Enhancer (Verstärker) und einem ß-Actin-Promoter, welcher zur Expression von Hsp72 der Ratte in heterozygoten Tieren führt, gezüchtet. Diese Mäuse exprimieren im ungestressten Zustand deutlich mehr Hsp72 als nicht-transgene Tiere nach einem Stresszustand (Marber et al. 1995).
Die intraperitoneale Injektion von Caerulein in die Maus führt zu einer maximalen Sekretion von Verdauungsenzymen, verfrühter Aktivierung dieser Enzyme und somit zur Autodigestion des Pankreas (Chan und Leung 2007).
Der CCK_A- (Cholecystokinin A-) Rezeptor spielt bei der Entstehung einer Pankreasentzündung eine signifikante Rolle. Die Affinität von Cholecystokinin zu diesem Rezeptor, entspricht dabei weitgehend der von Caerulein (Clemons et al. 2002). Somit ist Caerulein sehr gut für das Modell der Pankreasentzündung geeignet. Die intraperitoneale Stimulation mit Caerulein resultiert in einer akuten Pankreatitis und manifestiert sich u.a. durch interstitielle Ödeme, vergrößerte Pankreaszellen, Mengenzunahme der Vakuolen und verstärkter Myeloperoxidase-Aktivität. Unmittelbar nach der Injektion kommt es zum intrazellulären Anstieg von Calcium. Dem folgt nach ca. 5-45 min die Aktivierung der MAK vermittelt durch die PKC. Dies resultiert in einem Anstieg des Hsp72 (Clemons et al. 2002).

1.6 Zielsetzung

Obwohl die akute Pankreatitis klinisch von großer Bedeutung ist, ist die Pathogenese bisher weitgehend unbekannt. Deshalb soll in den Experimenten die Rolle des Hsp72 während der akuten Pankreatitis genau betrachtet werden.
Die Schutzfunktion erhöhter Hsp72-Level vor akuter Pankreatitis wurde in transgenen Mäusen bislang nicht getestet und soll in dieser Arbeit untersucht werden.
Hsp72 wurde in einigen Studien eindeutig eine protektive Rolle zugeschrieben, während dies von anderen Studien nicht bewiesen werden konnte. Aufgrund dessen soll die Überexpression von isoliertem Hsp72 getestet werden. Dabei spielt möglicherweise auch das NF_KB Signal im Zuge der Ausprägung der akuten Pankreatitis eine Rolle.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agarose	Biozyme, Deutschland
Albumin Bovine Factor V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Amoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Avidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Bromphenolblau Natrium Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Caerulein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
DEPC-Wasser	Invitrogen, Deutschland
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Deoxi Nucleosid Triphosphat Mischug	5 Prime GmbH, Deutschland
Digoxigenin	Abcam, Deutschland
DIG RNA Labeling Mix 10x conc.	Roche, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Entwickler	Tetnal AG & Co. KG, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
FISH skin Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Fixierer	Tetnal AG & Co. KG, Deutschland
Formalin	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Deutschland
Formamid deionisiert	Applichem, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Hydrogenperoxid –Lösung (30%)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Deutschland
In Situ Hybridisations Puffer	Enzo, Deutschland
In Situ Hybridisationslösung	Maxim Biotech, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Kalium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
L-Arginin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natrium-Dodecyl-Sulphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Nonidet p40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
PageRuler prestained Protein Ladder	ThermoFischer Scientific GmbH, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung	Biochrom, Deutschland
Phenyl-methan-sulfonyl-fluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Proteinase K	Dako, Deutschland
RNAlater	Ambion, Deutschland
Spermidine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
SSC Puffer 20x konzentriert	Roche, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	USB, Deutschland
Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Xylin	VWR Prolabo, Deutschland

2.2 Kits

Antigen Erkennungs Lösung	Vector Laboratories, INC., CA
Biotin Blocking System	Dako, Deutschland
BIO RAD DC protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
DIG RNA Markierungs Kit (SP6/T7)	Roche, Deutschland
DIG Nucleinsäuren Nachweis Kit	Roche, Deutschland
DIG Wasch und Block Puffer Set	Roche, Deutschland
DNeasy Blood and Tissue Kit	QIAGEN GmbH, Deutschland
ECL Western Blot Erkennungs-Reagenz	GE-Healthcare, Amersham Biosc., Deutschland

Gen Point (Tyramid Signalverstärkungs-System für biotinylierten Sonden)	Dako, Deutschland
Gen Ruler 300bp	Fermentas, Deutschland
GoTaq Green Master Mix	Promega, Deutschland
Haematoxylin Flüssigkeit	Dako, Deutschland
MPO Kit	Calbiochem, Deutschland
QiaQuick-PCR clean up Kit	QIAGEN GmbH, Valencia, CA
RNase A/T1 Cocktail	Abmion, Deutschland
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Valencia, CA
SuperScript II Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	Life Technologies Applied Biosystems, Deutschland
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, INC., CA
Vector Nova Red	Vector Laboratories, INC., CA
0,5% Eosin G-Lösung	Merk, Deutschland

2.3 Andere

Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	Roche, Germany
DAB Plus (3,3-Diaminobenzidin)	Dako, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Deutschland
MicroAmp schnell optische Mikrotiter Reaktions Platte	Applied Biosystems, Deutschland
MicroAmp optische selbstklebende Polyfolie	Applied Biosystems, Deutschland
Potter-Elvehjem-Mikro-Gewebehomogenisatoren 2ml	Wheaton Science Products, USA

PVDF Membran	Millipore, USA
Random Primer	Invitrogen, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL	GE-Healthcare, Amersham Biosc., Deutschland
SuperFrost Plus Objektträger	Thermoscientific, Deutschland

2.4 Reaktionsansätze und Pufferlösungen

APS 10% (Ammoniumpersulfat)	Ammoniumpersulfat	0,1 g
	A. dest	1000 µl
Blockerlösung (Western Blot)	Milchpulver	5 mg
	TBST	100 ml
Coomassie Brilliant blue Lösung 0,1%	Coomassie Brilliant blue	1 g
	Methanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	A. dest	500 ml
Entfärberlösung	Methanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	A.dest	500 ml

Homogenisations-Puffer	SDS (Natrium-dodecyl-sulphat)	3%
	Tris pH 7,8	50mM
	Kaliumchlorid	150 mM
	Nonidet P 40	1%
	Potassium deoxycholate	0,5%
	PMSF	1 mM
	Spermidine	25µg/ml
Laemmli-Puffer	1 M Tris-HCL, pH 6,8	1,5 ml
(Gel-Ladepuffer)	SDS	0,6 g
	1 M DTT	3ml
	100% Glycerol	3 ml
	Bromphenolblau	0,03 g
Laufpuffer 1x	10x Laufpuffer	100 ml
	A. dest	900 ml
Laufpuffer 10x	SDS	50 g
	Tris Basis	150 g
	Glyzin	720 g
	A. dest	4 L

Im Wasserbad auf 70-80°C erhitzen um die Chemikalien zu lösen. Anschießend mit A. dest auf 5l auffüllen.

Puffer A	HEPES-KOH pH 7,9	10mM
	$MgCl_2$	1,5mM
	KCl	10mM
	DTT	0,5mM
	PMSF	0,2mM
Puffer B	HEPES-KOH pH 7,9	20mM
	Glycerol	25%
	NaCl	420mM
	$MgCl_2$	1,5mM
	EDTA	0,2mM
	DTT	0,5mM
	PMSF	0,2mM
Sammelgelpuffer	Tris	60,5 g
	A. dest	600 ml
	pH mit HCl auf 6,8 einstellen	
	A. dest bis 1l auffüllen	
Sammelgel	A. dest	1,5 ml
	Trenngel-Puffer	0,65 ml
	30% Acrylamid	375 µl
	10% SDS	25 µl
	10% APS	12,5 µl
	TEMED	2,5 µl

SDS 10% (Sodium dodecyl sulphat)	SDS	10 mg
	A. dest	100 ml
SDS Trenngel 10%	A. dest	2,05 ml
	Trenngel-Puffer	1,3 ml
	30% Acrylamid	1,65 ml
	10% SDS	50 µl
	10% APS	25 µl
	TEMED	7,5 µl
TAE Puffer pH 8	Tris Basis	40 mM
	Essigsäure	20 mM
	EDTA	1 mM
TBS 1 x	TBS 10 x	100 ml
	A. dest	900 ml
TBS 10 x, pH 7,6	Tris	24,2 g
	NaCl	80 g
	A. dest bis 1l auffüllen	
TBST	TBS 10x	100 ml
	Tween20	1ml
	A. dest	900 ml

Transfer-Puffer 1x	Transfer-Puffer 10x	100 ml
	Methanol	200 ml
	A. dest	700 ml

Transfer-Puffer 10x	Tris Basis	15,8 g
	Glyzin	36,05g
	Methanol	1 L
	A.dest bis 5l auffüllen	

Trenngelpuffer	Tris	181,71 g
	A. dest	500 ml
	pH mit HCl auf 8,8 einstellen	
	A. dest bis 1l auffüllen	

2.5 Geräte

Analysewaage	Sartorius AG, Deutschland
Aufrechtes Lichtmikroskop Typ DM5500 mit Software LAS 3.8	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
Block Thermostat	Biostep GmbH, Deutschland
Centrifuge 5417C	Eppendorf AG, Deutschland
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Deutschland
Deep freezer	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
DNAEngine Piltier	Bio Rad Lab, USA
Fluoreszenzmikroskop IX 71 mit Software Simple PCI6	Olympus Europa GmbH, Hamburg

Gel Elektrophorese Ausstattung und Zubehör	Bio-Rad Lab, USA
Homogenisator	VWR, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Deutschland
MS3 Minishaker (Vortex)	IKA- Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Magnetrührer	IKA- Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf AG, Deutschland
Nano Drop 1000	Thermo Scientific, Deutschland
PCR Gerät	Bio Rad Laboratories GmbH, Deutschland
pH-Meter DRI-Block	Biostep GmbH, Deutschland
Photometer Ultrospec 1100 pro	GE-Healthcare, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Pipet Boy	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
Waage PM 4000	Mettler-Toledo GmbH, Deutschland
Wasserbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Deutschland
7500 Fast Real-Time PCR System, mit Sequenz-Erkennungs-Software, Version 1.4	AppliedBiosystems, Deutschland

2.6 Versuchstiere

2.6.1 Verwendete Mausstämme

Zur Untersuchung der Funktion von Hsp72 wurden Mäuse (im Alter von 4 bis 5 Monaten) verwendet, welche das Gen Hspa1a der Ratte überexprimieren (Hsp72 Mäuse) sowie deren genetisch unveränderte Wurfgeschwister (C57B6 Mäuse) (Marber et al. 1995). Die genetische Veränderung der Mäuse wurde mit Hilfe eines chimärischen, also aus dem Erbgut mehrerer Spezies bestehenden Transgens vollzogen. Dieses beinhaltet ein Hspa1a Gen von der Ratte (rhsp70i), welches in den Vektor pCAGGS eingesetzt wurde. Die Aminosäuresequenz des rhsp70i ist zu 95% identisch mit dem menschlichen Hsp72 und zu 97% identisch mit dem Hsp72 der Maus. Das pCAGGS Konstrukt beinhaltet das rhsp70i-Gen unter der Kontrolle des Chicken ß-actin Promoters. Das chimärische Transgen wurde durch Verdauung von Sal I und Sac I aus dem Plasmid herausgeschnitten, purifiziert und zur Generierung der transgenen Mäuse verwendet. (Marber et al. 1995)

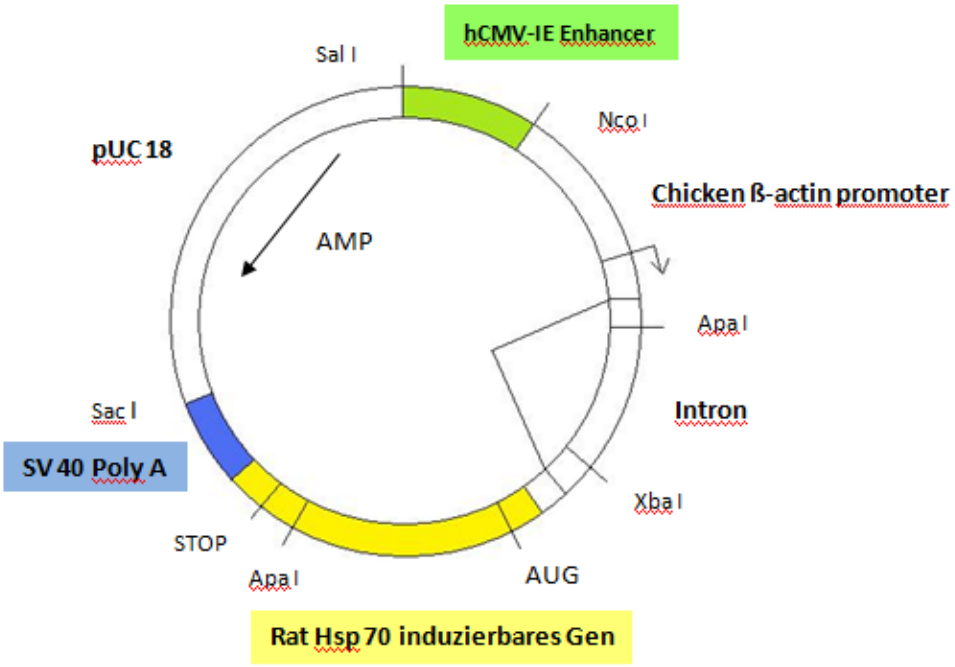


Abbildung 1: pCAGGS-Konstrukt, *nach Marber 1995,* pUC18=künstlich hergestelltes, bakterielles Plasmid; Sal I, Sac I, Nco I, Apa I, xba I = Restriktionsenzyme, AUG=Start-Codon, SV40PolyA=RNA-Element welches die Polyadenylierung fördert, hCMV-IE-Enhancer= verstärkt Zell-spezifische-Gen-Expression, AMP=Adenosinmonophosphat; [Neu veröffentlicht mit Genehmigung der „American Society for Clinical Investigation“, nach: Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. M S Marber, R Mestril, S H Chi, M R Sayen, D M Yellon, and W H Dillmann, 95(4), 1446–1456, 1995; Genehmigung vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.]

2.6.2 Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden in Plastikkäfigen (26,5 cm x 20 cm x 14 cm) bei einer Raumtemperatur von 22°C gehalten. Als Nahrung wurde Wasser und das Mäusezuchtfutter ssniff V1124-300 gegeben. Im Zuchtraum lag ein 12h Tag-Nacht-Rhythmus mit Licht von 7.00 - 19.00 Uhr vor. Alle Handlungsweisen an Mäusen wurden nach den deutschen Leitlinien für tierexperimentelle Forschung und Tierschutz unternommen. Aktenzeichen: 35/9185.81-3

2.6.3 Genotypisierung der Versuchstiere

Um den Genotyp der Mäuse zu bestimmen, wurde zuerst deren DNA mit einem DNA-Isolations-Kit (DNA Blood-and Tissue Kit, QUIAGEN GmbH, Deutschland) gewonnen. Dafür wurde den Jungtieren (4-6 Wochen alt) nach Trennung von der Mutter ein ca. 3mm langes Stück der Schwanzspitze entfernt. Die Mäuse wurden mittels Ohrmarkierungen durchnummeriert und geschlechtsspezifisch in Käfigen untergebracht. Die Isolation der DNA erfolgte nach Protokoll des Herstellers und beruht auf einem über Nacht Verdau des Gewebes mittels Proteinase K im Wasserbad bei 56°C. Die somit freigelegte DNA wurde am folgenden Tag durch Zugabe von AL-Puffer und Ethanol sowie anschließender Zentrifugierung selektiv an die Silica-Gel-Membran der Säule gebunden. Verunreinigungen wie z.B. Proteine und Lipide wurden in mehreren Schritten ausgewaschen. Am Ende wurde die DNA aus der Membran mittels TAE Puffer eluiert. Bis zum Gebrauch wurde die fertige DNA bei 4°C aufbewahrt.

2.7 Stressmodelle

Anhand von zwei Pankreatitis-Modellen wurde die Funktion des Hsp72 bei der Entstehung einer Bauchspeicheldrüsen-Entzündung untersucht. In beiden Fällen wurden alters- und geschlechtsangepasste Mäuse verwendet.

2.7.1 Caerulein-induzierte Entzündung des Pankreas

Die intraperitoneale Injektion von Caerulein in die Maus verursacht eine milde und vollständig reversible Pankreatitis (Chan und Leung 2007). Für dieses Modell wurden Tiere im Alter von 4-5 Monaten gewogen und es folgten sechs intraperitoneale Injektionen mit 100µg/kg Caerulein im Abstand von jeweils einer Stunde. Als Kontroll-Model wurden nicht-injizierte Mäuse verwendet. Die Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten durch Vergasen mit Kohlenstoffdioxid getötet und anschließend gewogen (Die 6h Gruppe wurde eine Stunde nach der letzten Injektion vergast). Das Blut der Mäuse wurde mittels einer 1ml Spritze und einer Kanüle aus dem Herz gesammelt um die Lipase-Menge im Serum zu ermitteln. Das Pankreas wurde der Maus zügig entnommen und in drei Teile geschnitten, welche wie folgt verwendet wurden:

1) Fixierung in 10% Formalin für die histologische/immunhistochemische Analyse
2) Schock-Gefrieren in Flüssig-Stickstoff für die Protein-Analyse
3) Stabilisierung in RNAlater für die mRNA-Analyse.

2.7.2 L-Arginin-induzierte Entzündung des Pankreas

Ein weiteres Modell stellt die Induktion der Pankreasentzündung mittels L-Arginin dar (Hu et al. 2011). Dabei wurden den Versuchstieren zwei L-Arginin-Injektionen (aufgelöst in NaCl, jeweils 5g/kg Körpergewicht des Tieres) im Abstand von einer Stunde verabreicht. Die Tiere wurden 3 Tage nach der Injektion vergast und analysiert. Die intraperitoneale L-Arginin-Injektion bewirkt bei der Maus in 60-70% der Fälle Nekrosen des

Pankreasgewebes, Fettgewebsnekrosen, Ödeme sowie deutliche inflammatorische Reaktionen. Diese Veränderungen sind jedoch reversibel.

2.8 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.8.1 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die PCR ist eine in-vitro Technik, um spezifische DNA-Abschnitte enzymatisch zu amplifizieren. (Saiki et al. 1988) Der DNA-Doppelstrang wird durch Erhöhung der Temperatur denaturiert. Nach zügigem Abkühlen binden die zwei zugehörigen spezifischen Oligonukleotide (Primer) an den komplementären Originalstrang (Annealing). Mittels einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase erfolgt, ausgehend von den Primern, eine Komplementierung der Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang (Extensionsschritt). Aufgrund der erneuten Erhöhung der Temperatur werden die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge getrennt und somit der nächste Replikationszyklus eingeleitet. Die Amplifikation der DNA erfolgt damit exponentiell.
Für die PCR wurde ein automatisierter Thermocycler verwendet (Reaktionsbedingungen siehe Tab.2). Zur Genotypisierung der Hsp72 Mäuse wurden folgende Primer verwendet:
5‘-ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC-3‘ (F-Primer)
und
5‘-GTAGGAAAGTCCCATAAGGTCATGT-3‘ (R-Primer)
Der Reaktionsansatz der PCR wurde zuerst als Mastermix zusammen pipettiert (Tab.3) Um die optimalen Bedingungen zu sichern, wurde ein kommerziell erhältlicher Mastermix verwendet, der bereits die meisten für die Reaktion erforderlichen Komponenten (Mg, Puffer, Enzym, dNTP`s) beinhaltet. Davon wurde pro Reaktionsgefäß 45µl pipettiert und 2,5µl der aus den Mausschwänzen isolierten DNA zugegeben. Um Kontaminationen mit Fremd-DNA und deren Amplifizierung erkennen zu können, wurde als Negativkontrolle jeweils der gleiche Master-Mix ohne Zugabe von DNA mitgeführt. Die Verwertbarkeit der Genotypisierung wurde ebenfalls durch das Mitführen einer Positivkontrolle, welche die DNA eines positiven Tieres und den PCR Master-Mix enthielt, überprüft.

Tabelle 2: Ablauf und Reaktionsbedingungen der PCR (Polymerasekettenreaktion); °C= Grad Celsius, min= Minuten, sek=Sekunden

Temperatur	Phase	Dauer	Anzahl der Zyklen
94°C	Initiale Denaturierung, Enzymaktivierung	4 min	1
94°C	Denaturierung	30 sek	45
58°C	Annealing	30 sek	
72°C	Extension	40 sek	
94°C	Denaturierung	30 sek	21
65°C	Annealing	30 sek	
72°C	Extension	10 sek	
4°C	Finale Extension	10 min	1

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die PCR (per Reaktionsgefäß); µl=Mikroliter, H_2O=Wasser, DNA= Desoxyribonukleinsäure

Reagenz	Volumen µl
GoTaqGreen	25
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
H_2O	16,5
DNA	2,5

2.8.2 Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die, aus der PCR erhaltenen, DNA-Abschnitte nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend sichtbar gemacht. Dazu wurde 1%iges Agarose-Gel hergestellt welches mit 5µl Ethidiumbromid versetzt wurde, um die aufgetrennte DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Als Laufpuffer diente 1xTAE und zur Markierung der Laufgeschwindigkeit und Detektion der DNA-Größe wurde ein 300bp DNA-Marker (GeneRuler) verwendet.

2.8.3 In-Situ Hybridisierung

Mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung ist es möglich spezifische Nukleinsäuren in Geweben, Zellen oder Chromosomen zu detektieren. Um dies zu ermöglichen nutzt man künstlich hergestellte Sonden mit einer komplementären Basenabfolge. Der komplementäre Strang heftet sich dabei der zu detektierenden Sequenz an. Zum Nachweis ist eine vorangegangene Markierung der Sonden notwendig. Diese Markierung kann sowohl indirekt als auch direkt erfolgen und wird mittels PCR durchgeführt. Die indirekte Markierung erfolgt mit Haptenen wie Digoxigenin, 2,4-Dinitrophenol oder Biotin. Bei der direkten Markierung (sog. FISH) wird mit fluoreszierenden Molekülen wie Cy3 oder FITC gearbeitet. Zuerst wurden die Gewebestücke geschnitten und auf die Objektträger platziert. Die spezifischen ratHsp72 Sense und Antisense DNA Proben wurden mittels PCR von der cDNA amplifiziert. Folgende Primer wurden verwendet:
59-CTAATACGACTCACTATAGGGGCTTCTCCCGTTTGACACTC-39 (forward Sense Primer für Antisense Probe),
59-CCGGACTGGTTGTTATTTGC-39 (reverse Sense Primer für Antisense Probe),
59-CTAATACGACTCACTATAGGGCCGGACTGGTTGTTATTTGC-39 (forward Antisense Primer für Sense Probe)
59-GCTTCTCCCGTTTGACACTC-39 (reverse Antisense Primer für Sense Probe)
Die Kontrolle der Qualität und Größe der Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gel. Die entsprechenden Banden wurden mit Hilfe des QiaQuick-PCR clean up Kit nach Herstellerangeben aufgereinigt und nach anschließend photometrisch ermittelter DNA-

Konzentration auf 50ng/µl verdünnt. Die anschließende in vitro Transkription wurde mit dem Roche DIG RNA – Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Ribo-Sonde wurde bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.
Am ersten Tag der In-situ-Hybridisierung wurden die Schnitte sequentiell für jeweils 5 Minuten in Xylol, 100% EtOh, 70% EtOh, 50% EtOh inkubiert. Dies diente der, für die Hybridisierung notwendigen, Rehydrierung.
Zur Blockierung der endogenen Peroxidase folgte nach zwei Waschschritten für je 3 min in DEPC-Wasser eine Inkubation in 1% H_2O_2 für 10 min. Es folgten zwei Waschschritte für je 3 min in DEPC-Wasser und die Pufferung in TBS für 5 min bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte mit Proteinase K für 6 min bei 37°C (feuchte Kammer) verdaut, um die RNA zugänglich zu machen. Das Enzym wurde 2 x für 3 min mit TBST-Lösung ausgewaschen. Die eigentliche Hybridisierung begann mit der Verdünnung (1:50) der vorbereiteten Sonde in Hybridisierungs-Lösung (Maxim Biotech Inc.) und anschließender Denaturierung bei 65°C für 2 min. Die weitere Verarbeitung erfolgte auf Eis. 150-300µl der Sonde wurden auf den Schnitt gegeben und, mit Parafilm abgedeckt, in einer feuchten Kammer bei 55°C über Nacht inkubiert.
Am zweiten Tag wurden die Schnitte für 5 min in 2x SSC bei 45°C im Wasserbad inkubiert; anschließend wurden die ungebundenen Proben für 3 min mit SSC ausgewaschen. Der Verdau der restlichen ungebundenen RNA Sonden wurde mittels Inkubation von 250 µl RNAse A/T1 cocktail (1:35 in 2x SSC) für 30 min bei 37°C (feuchte Kammer) erzielt. Die folgenden Schritte dienten der weiteren Reinigung:

- 30 Min 2x SSC und 50% Formamid bei 5-8°C unter der Hybridisierungs-Temperatur
- 20 Min 2x SSC und 50% Formamid bei 5-8°C unter der Hybridisierungs-Temperatur
- 20 Min 0,08x SSC bei 5-8°C unter der Hybridisierungs-Temperatur
- Zweimaliges Waschen für je 3 Min mit 1x TBST

Das endogene Biotin wurde mittels dem Biotin Blocking System (Dako) nach Herstellerangaben geblockt (alle folgenden Schritte fanden im Dunkeln statt). Dafür wurde mit einem Fett-Stift das Präparat auf dem Objektträger umrandet und 2 Tropfen Avidin zugegeben und für 10 Min, RT inkubiert). Es folgte ein Waschschritt für 3 Min mit

1x TBST. Anschließend wurde der Schnitt mit 2 Tropfen Biotin für 10 Min inkubiert und danach 3x mit 1xTBST für je 3 Min gewaschen. Zum Blocken von unspezifischen Protein-Bindungen wurde 200 µl Blocking Puffer zugegeben (Gemisch aus 200 µl 1x Blocking Puffer + 10 µl Maus-Serum) und für 30 Min in der feuchten Kammer inkubiert. Die folgende Inkubation mit HRP-anti-DIG – Antikörper in der feuchten Kammer für 30 Min diente einer weiteren Signalamplifikation. Die ungebundenen Antikörper wurden mit Waschschritten entfernt. Um das Signal zu verstärken wurde das GenPoint Kit von Dako benutzt. Dazu wurde ein Tropfen Biotinyl-Tyramid Fertiglösung auf dem Schnitt aufgebracht und für 15 Min RT im Dunkeln inkubiert. Es folgten drei Waschschritte zu je 3 Min mit 1x TBST auf dem Shaker. Anschließend wurde ein Tropfen Streptavidin aufgetragen, für 15 Min RT inkubiert und erneut 3x für je 5 Min in 1x TBST (Shaker) gewaschen. Die DAB-Färbung wurde mit 150 µl pro Objektträger, kontrolliert unter dem Mikroskop, durchgeführt. Durch das Tauchen der Objektträger in Wasser wurde die Reaktion gestoppt. Um die Zellkerne zu visualisieren wurden die Objektträger in Haematoxylin (Dako) für 20 Sek inkubiert und danach zweimal mit Wasser gespült. Abschließend wurden die Schnitte dehydriert um sie haltbar zu machen. Dazu wurden sie für je 30 Sek in 50% EtOH, 70% EtOH, 100% EtOh und schlussendlich für 1 Min in Xylol inkubiert.

2.8.4 Ödem-Messung

Ein Ödem ist eine pathologische Flüssigkeitsansammlung im Interstitium und entsteht aufgrund einer entzündungsbedingten, erhöhten Kapillarpermeabilität
Um das Ausmaß eines Ödems im Pankreas zu ermitteln wurde das Pankreas von Fett befreit, gewogen (Feuchtgewicht) und anschließend wurde das Wasser für 24h bei 160°C verdampft. Danach wurde das Trockengewicht des Gewebes und somit der Wassergehalt ermittelt. (1-Feuchtgewicht/Trockengewicht)

2.8.5 Myeloperoxidase-Aktivität

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym der neutrophilen Granulozyten das dazu verwendet wird, das Ausmaß der Entzündung zu quantifizieren. Die Aktivität der MPO im Pankreas wurde mittels dem MPO Kit nach Herstellerangaben ermittelt. Das zugegebene Enzym katalysiert die Produktion von NaClO, H_2O_2 und NaCl. Nachfolgen reagiert NaClO mit dem freien Radikal-Sensor Aminophenylfluorescein (APF). Die dabei entstehende Fluoreszenz kann im Bereich von 485/525nm gemessen werden.

2.8.6 Extraktion der nuklearen Bestandteile

Um das Ausmaß der NF_KB- Aktivierung zu bestimmen, wurde die Translokation in den Zellkernen quantifiziert. Dafür wurden die Zellkerne mittels Gradienten-Zentrifugation isoliert. Zuerst wurde das Pankreasgewebe ausgiebig in Puffer A bei 4°C homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat bei 4°C und 2000rpm für 10 min zentrifugiert. Der anfallende Überstand entspricht den Bestandteilen des Cytosols und wurde in ein zweites Gefäß pipettiert. Das Pellet wurde mit Puffer B für 30 min auf Eis inkubiert und während dieser Zeit 3x gevortext. Die Suspension wurde bei 4°C und 20000rpm für 2 min abzentrifugiert (Pellet). Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes repräsentiert den nuklearen Bestandteil der Zellen und wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.8.7 Isolierung und Quantifizierung von RNA

Um die Genexpression zu analysieren wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe eines RNA-Isolations-Kits (RNeasy Mini Kit) nach Angabe des Herstellers aus dem pankreatischen Gewebe isoliert. Zur Gewährleistung der Integrität der RNA, wurden die entnommenen Gewebestücke direkt in RNAlater gegeben und bis zur Isolation der RNA darin aufbewahrt. Nach der Entnahme der Gewebestücke aus der Stabilisierungs-Flüssigkeit wurde die Probe mit Lyse-Puffer versetzt und anschließend homogenisiert. Die folgenden Schritte ähneln dem Prinzip der DNA-Isolation und inkludieren die Zugabe von Ethanol zum Homogenisat um die Bindung der RNA an die Membran der Säule zu ermöglichen,

sowie diverse Wasch- und Zentrifugationsschritte, zur Entfernung von Verunreinigungen. Es folgt die abschließende Eluation der aufgereinigten RNA mit RNase-freiem Wasser sowie die UV-photometrische Messung, welche der Qualitätskontrolle dient. Dabei wird der Quotient der Absorption bei 260/280nm bestimmt, welcher dazu benutz wird, die Verunreinigung von Nukleinsäuren durch Proteine zu bestimmen und im Falle einer reinen RNA zwischen 1,7-2,0 liegen sollte.

Tabelle 4: Qualitätskontrolle der isolierten RNA. Die Nukleinsäurekonzentration wurde photometrisch gemessen. Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280nm wurde verwendet, um Kontamination mit Proteinen zu erfassen. Wasser wurde als Negativkontrolle verwendet; µg=Mikrogramm, µl=Mikroliter

Probe	Nukleinsäure-Konzentration	260/280
Wasser	0,0003 µg/µl	0,96
1	2,4288 µg/µl	2,10
2	2,4436 µg/µl	2,07
3	3,0186 µg/µl	2,08
4	2,3718 µg/µl	2,07
5	1,9132 µg/µl	2,07
6	1,4396 µg/µl	2,08
7	2,5888 µg/µl	2,08
8	2,9625 µg/µl	2,08

2.8.8 cDNA-Synthese

Mittels dem SuperScript II Reverse Transkriptase Kit wurde die isolierte, instabile RNA nach Herstellerprotokoll in stabile cDNA umgeschrieben. Dafür wurden zuerst 1 µl Random Primer (Life Technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), 1 µl dNTPs und 2 µl RNA pro Tube pipettiert und mit A. dest auf 13 µl aufgefüllt. Es folgte ein erster Lauf für 5 Minuten im Thermocycler und anschließendem, kurzen Kühlen auf Eis. Abschließend wurden in jedes Reaktionsgefäß 4 µl 5x-First-Strand-Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl Super

Script (enthält die Reverse Transkriptase) pipettiert und der Ansatz für 50 min bei 42°C laufen gelassen. Nach erfolgter cDNA-Transkription wurde die RNA enzymatisch verdaut.

2.8.9 Quantitative Real-Time-PCR

Die Bestimmung der Transkriptionsmengen einzelner Gene wurde mit Hilfe eines Erkennungssystems (Applied Biosystems 7500 fast Real Time PCR System, Darmstadt, Deutschland) und spezifischen Primern (Forward/Reverse) durchgeführt. Folgende Primer wurden verwendet

Hsp72:	5`- AACGTGCTCATCTTCGACCT - 3`(Forward)
	5`- TGGCTGATGTCCTTCTTGTG - 3`(Reverse)
TNF-α:	5`- TCTCTTCAAGGGACAAGGCTG -3` (Forward)
	5`- ATAGCAAATCGGCTGACGGT - 3`(Reverse)
PCNA:	5`- GGGCGTGAACCTCACCAGTA - 3` (Forward)
	5`- TCATTGCCGGCGCATT - 3`(Reverse)
L7:	5'- GAAAGGCAAGGAGGAAGCTCATCT - 3' (Forward)
	5`- AATCTCAGTGCGGTACATCTGCCT - 3' (Reverse)

Der Reaktionsansatz wurde in Mikrotierplatten mit 96 Vertiefungen angesetzt und enthielt je Vertiefung 8µl RT-PCR-Mastermix, 1 µl der zu untersuchenden cDNA und 1µl Primergemisch. Der RT-PCR-Mastermix bestand, für je eine cDNA Probe, aus 5µl SYBR-Mix (SYBR Green PCR Master-Mix) und 3 µl sterilem A. dest.
SYBR Green ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich der DNA anlagert. Dadurch kann die DNA-Menge in Echtzeit bestimmt werden. Im Replikationszyklus wurde bei 95°C für 15 sek die Denaturierung eingeleitet, anschließend erfolgten unter 60°C für 60 sek das Annealing und die Elongation. Es wurden jeweils 45 Zyklen durchgeführt. Vor dem Replikationszyklus erfolgten unter 95°C jeweils für 10 sek die initiale Denaturierung sowie für 10 min die Aktivierung der im SYBR-Mix enthaltenen Hot-Start-Taq-DNA-Polymerase. Die bestimmte „C_T-Value" gibt an, wann genau die DNA eine festgelegte Konzentration erreicht hat. „C_T-Value" steigt dabei indirekt proportional zu den initial vorhandenen Transkriptionsmengen. L7 diente als „House-Keeping-Gen" der Referenz. Die Primer wurden über Invitrogen, Deutschland bezogen. Für die Auswertung wurde die Sequence

detection Software, Version *1.4* (7500 Fast System, Life Technologies, AppliedBiosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.8.10 Proteinextraktion

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurden Proteine aus dem entnommenen pankreatischen Gewebe isoliert. Dazu wurde mit einer Einmalklinge ein 0,025-0,05g großes Stück des bei -80°C aufbewahrten Pankreasgewebes abgetrennt und mit einer entsprechenden Menge eines Homogenisations-Puffers versetzt, welcher 3% Sodium Dodecyl Sulphat (SDS) enthält. Diese Substanz hat eine denaturierende Wirkung, zerstört dadurch Enzyme und schützt somit die Proteine vor Degradation. Die Homogenisierung wurde anschließend in Potter-Elvehjem-Mikro-Gewebehomogenisatoren (2ml) durchgeführt und basiert auf der starken Verkleinerung des Gewebes und der Zellen mit Hilfe von Scherkräften, welche durch die Auf-und Ab-bewegungen eines Kolbens in einem eng darum passenden Glasgefäß hervorgerufen werden.
Das homogenisierte Gewebe wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min auf 98°C erhitzt um eine noch bessere Denaturierung der Proteine zu erzielen. Anschließend wurde mit Hilfe einer 1 ml Spritze und einer Kanüle der Größe 21G das Homogenisat 20x auf-und-abgezogen um die DNA zu fragmentieren.
Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (14 000rpm und 4°C für 2 min) um alle ungelösten Bestandteile abzusetzen. Da der Überstand die meisten Proteine enthält, wurde dieser in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Protein-Konzentration wurde mittels Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) nach Herstellerangaben ermittelt. Zur Durchführung eines Western Blot`s wurden die Proben mit reduzierendem Laemmli-Puffer im Verhältnis 1:4 (100µl Protein-Probe und 300µl Puffer) versetzt und somit die Konzentration der Proteine verringert. Diese Proben wurden kurz gevortext und erneut für 5 min auf 98°C erhitzt. Bis zum Gebrauch wurden sie bei -20°C aufbewahrt. Vor dem eigentlichen Western Blot wurden alle Proben auf einem Gel aufgetragen und mittels Coomassie-Blau-Färbung die enthaltenen Proteinkonzentrationen visualisiert und überprüft.

2.8.11 Western Blot

Der Western Blot setzt sich aus drei Teilen zusammen. Im ersten Schritt erfolgt die Auftrennung von Proteinen entsprechend Ihrer Größe mittels SDS-Page (Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Dafür wurden 10%ige SDS-Gele nach unten angegebenen Schema gegossen (Tab. 5). APS (10%) und TEMED wurden unmittelbar vor dem Eingießen zugegeben, da diese beiden Substanzen die Polymerisation auslösen. Durch das Auftragen einer dünnen Schicht Isopropanol wird eine glatte Oberfläche des Gels erzielt. Anschließend wird das Isopropanol abgegossen und das Gel vorsichtig mit Wasser abgespült. Danach wird das Sammelgel gegossen und sofort mit einem Kunststoff-Kamm versehen, welcher die Kammern für die Proben formt. Das Gel ist 30 min später ausgehärtet und einsatzbereit. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und nach anschließendem vortexen in die Gelkammer eingebracht. In der ersten Gelkammer wurden 5µl eines aus Proteinen bestehenden Größenstandards (Page Ruler Prestained Protein Ladder) aufgetragen, welcher der späteren Beurteilung der Banden dient. In die nächsten Kammern wurden jeweils 10µl der Proben aufgetragen. Die Innere und die äußere Kammer wurden mit 1x Lauf-Puffer gefüllt. Die Gelelektrophorese fand bei Raumtemperatur statt und erfolgte 30 min bei 70V (Wanderung im Sammelgel) sowie anschließend 1 h bei 100V (Wanderung im Trenngel). Dabei wurden die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt.
Der zweite Teil ist der eigentliche Blot. Dabei wurden die zuvor im Gel aufgetrennten Proteine mittels elektrischem Feld auf eine Membran transferiert (Transfer Membrane Immobilon-P 0,45 µm, Millipore, Massachusetts, USA). Dazu wurde das Gel vorsichtig von der Platte gehoben und blasenfrei auf die zuvor in Methanol aktivierte Membran aufgebracht. Der Blotvorgang läuft bei 4°C, umgeben von 1xTransfer-Puffer (Nassblotverfahren) für 1 h 30 min bei 110V ab.
Im abschließenden dritten Teil folgt die Detektion der spezifischen Antigene mittels Antikörper. Dazu wird die Membran zunächst 3x für 10 min mit TBST gewaschen und anschließend für eine 1h mittels einer Blockerlösung behandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C im Erstantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörper 3x für 10 min mit TBST ausgewaschen und anschließend wurde die Membran für 1h bei

Raumtemperatur im entsprechenden Zweitantikörper (Verdünnung 1:10 000) inkubiert (Die verwendeten Antikörper sind in Tab.6 zusammengefasst). Der Zweitantikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert und bewirkt dadurch die enzymatische Visualisierung des Immunkomplexes. Nach einem weiteren Waschschritt mit TBST wurde die Membran für 5 min mit ECL-Luminolreagenz bedeckt. Dies ist ein MRP-Substrat dessen enzymatische Modifikation zur Lichtentwicklung führt und somit die Banden auf einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL), sichtbar macht. Danach wurde der Film entwickelt und fixiert. Dabei wurden verschiedene Expositionszeiten zur besseren Quantifizierung verwendet.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines typischen SDS-Gels (Ansatz für 1 Gel); H_2O=Wasser, SDS=Sodiumdodecylsulphat, APS=Amoniumpersulphat, TEMED= Tetra-methyl-ethylen-diamin, ml=Milliliter, µl=Mikroliter

Reagenz	Trenngel	Sammelgel
H_2O	2,05 ml	1,5 ml
Gelpuffer	Trenngel-Puffer 1,3 ml	Sammelgel-Puffer 0,65 ml
30% Acrylamid	1,65 ml	375 µl
10% SDS	50 µl	25 µl
10% APS	25 µl	12,5 µl
TEMED	7,5 µl	2,5 µl

Tabelle 6: Übersicht über die zur Western Blot-Analyse verwendeten Antikörper; Hsp=Hitzeschockprotein

Erstantikörper	Verdünnung	Spezies	Firma
Anti Hsp72 SPA 812	1:1000	Kaninchen	Stressgen, Ann Arbor, USA
Anti Hsp60 SPA 805	1:1000	Kaninchen	Stressgen, Ann Arbor, USA
Hsc71 SPA 819	1:1000	Kaninchen	Stressgen, Ann Arbor, USA
Hsp27 sc-1049	1:500	Ziege	Santa Cruz Biotech, Deutschland
P65 Sc-372		Kaninchen	Santa Cruz Biotech, Deutschland
P65 RB1638		Kaninchen	Neomarkers, Deutschland
ß-tubulin T8328		Maus	Sigma, Deutschland

2.9 Färbungen

2.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Für die Färbung mit H.E. wurden histologische Gewebeschnitte hergestellt. Dafür wurde das Pankreasgewebe direkt nach der Entnahme über Nacht in 10% gepuffertem Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde es in Paraffin eingebettet und in einem Mikrotom in 3µm dicke Paraffinschnitte zerteilt. Zur morphologischen Beurteilung des Pankreas-Gewebes wurde eine Standard-H.E.-Färbung nach unten aufgeführtem Schema durchgeführt (Tab.7)

Die fertigen Objektträger wurden mittels Lichtmikroskop und digitaler Kamera (Typ DM 5500, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) und entsprechender Software(Leica Application Suite 3.8) ausgewertet.

Tabelle 7: Ablauf der H.E.-Färbung; min= Minuten

Arbeitsschritt	Dauer	Wirkung
Xylin	10 min	Entfernung des Paraffins
Xylin	10 min	Entfernung des Paraffins
Ethanol (100%-100%-90%-90%-80%-70%)	Jeweils 2 min	Hydrisierung
Destilliertes Wasser	1 min	Entfernen des Ethanols Hydrisierung
Hämatoxylin	5 min	Visualisierung der Nuklei
Leitungswasser	5 min	Entfernen des Hämatoxylin-Überschusses
0,5% Eosin-G-Lösung	5 min	Färbung des Cytosplasmas
Destilliertes Wasser	5 min	Entfernen des Eosin-Überschusses
Ethanol (70%-80%-90%-90%-100%)	Jeweils 15 sek	Dehydrisierung
Ethanol (100%)	1 min	Dehydrisierung

2.9.2 Immunhistochemie

Für diese Immun-basierte Nachweismethode wurde ein Maus ABC Färbesystem (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, INC, Burlingame CA) verwendet. Dafür wurden die deparaffinisierten Proben in Antigen Retrieval Solution gekocht und in 3% H_2O_2 für 10 min vorinkubiert um die endogene Peroxidase Aktvität zu beseitigen. Nach Blockierung mit FISH Skin blocking solution für 20 min wurden die Schnitte mit anti Hsp72 (Ab SPA 810) für 1h inkubiert und anschließend mit TBST gewaschen. Danach wurden sie für 30min mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Die Schnitte wurden dann für 30 min in AB Enzym-Reagenz gegeben und danach mit TBST gewaschen. Der Peroxidase Substrat Vector Nova Red wurde verwendet, um die Antikörper-Komplexe zu visualisieren.

Tabelle 8: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper; Hsp=Hitzeschockprotein

Erstantikörper (Verdünnung: 1:500)	Spezies	Gewinnung	Zweitantikörper (Verdünnung: 1:10000)
Hsp72 SPA 810	Kaninchen	Stressgen, Ann Arbor, USA	Anti-Kaninchen, hergestellt in einer Ziege

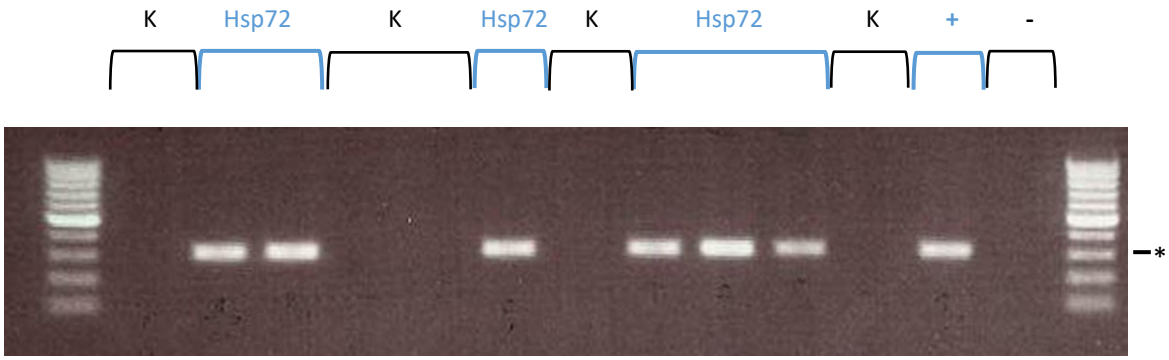
2.10 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte als Bestimmung der Mittelwerte und Standartabweichungen (SEM) in Microsoft Office Excel 2010. Der Newman-Keuls und Fisher Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede wurde genutzt um die unterschiedlichen Gruppen miteinander zu vergleichen, wobei $p<0,05$ als signifikant angesehen wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Versuchstiere

Um die Bedeutung von Hitzeschockproteinen in der Bauchspeicheldrüse zu untersuchen, wurde in diesem Projekt der seit langem etablierte Maus-Stamm Hsp72 genutzt (Marber et al. 1995). Im Gegensatz zu Knock-out/Knock-in Tieren, bei denen die DNA an sich durch das Entfernen bzw. Zugeben von Genen verändert wird, weist der oben genannte Mausstamm eine Überexpression von Ratten-Hsp72 zusätzlich zum Vorhandensein von endogenem Maus-Hsp72 auf. Der Nachweis von Tieren, die Hsp72 zusätzlich exprimieren wurde mittels PCR erbracht. (Abb 2.) Charakteristisch für ein genetisch verändertes Tier ist das Vorhandensein eines ~300bp großen Fragments. Während transgene Tiere eine positive Bande aufweisen, kann man bei den nicht-transgenen Tieren kein Signal erkennen.



* 300bp

Abb. 2: Genotypisierung von Mäusen, die Hsp72 überexprimieren. Die durchgeführte PCR-Reaktion amplifiziert ein etwa 300bp großes Fragment des humanen Hsp72-Gens (Hsp72).Die richtige Größe wurde mit Hilfe eines Markers überprüft. Zu erkennen sind 5 nicht-transgene Kontrolltiere (K) welche das Hsp72 nicht überexprimieren und 6 Tiere (Hsp72), welche das Gen beherbergen. (+) und (-) entspricht bereits im Vorfeld genotypisierten Tieren, die der Verifizierung des Versuches dienen. PCR (Polymerasekettenreaktion), Hsp72 (Hitzeschockprotein 72)

3.1.1 Expression von Hsp72 in verschiedenen Geweben

Neben der Überexpression von Hsp72 im Pankreas wurden weitere Organe auf das Vorhandensein des transgenen Chaperons getestet. Mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-PCR wurden die Transkriptionsmengen von Ratten-Hsp72 in verschiedenen Abschnitten des Darmes (Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon - Abb 3.) sowie der Leber (Abb. 4) dargestellt.

In den untersuchten Darmabschnitten der transgenen Tieren (Hsp72) findet man eine moderate Expression von Ratten-Hsp72, während die nicht transgenen Tiere (Kontrolle), wie zu erwarten, keine Expression aufweisen (Abb.3). Dadurch wird auch die Spezifizität der verwendeten Primer bestätigt.

Im Gegensatz dazu konnte in der Leber (Abb.4) keine signifikante Expression von Ratten-Hsp72 nachgewiesen werden.

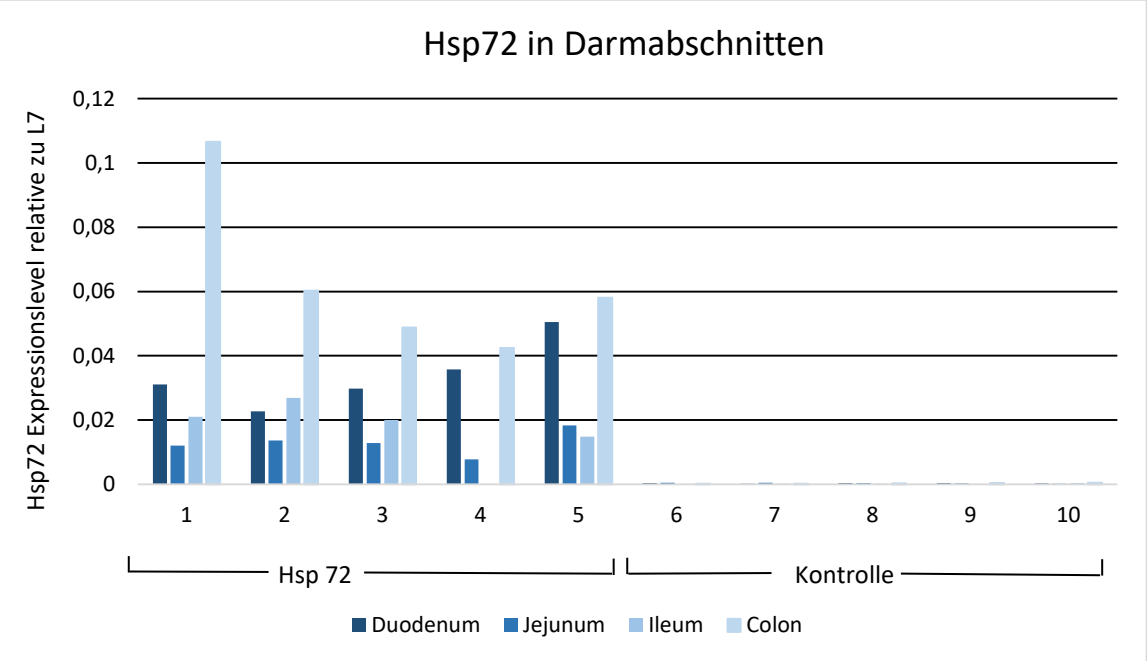


Abb. 3: Quantifizierung der Expression von Ratten-Hsp72 in Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon der transgenen Tiere und Kontrolltiere. Die Expression wurde mittels RT-PCR (Real-Time-Polymerasekettenreaktion) ermittelt. Die Kontrolltiere weisen keine nennenswerte Expression von Ratten-Hsp72 auf. 1-5 transgene Tiere, 6-10 nicht-transgene Tiere; Hsp= Hitzeschockprotein

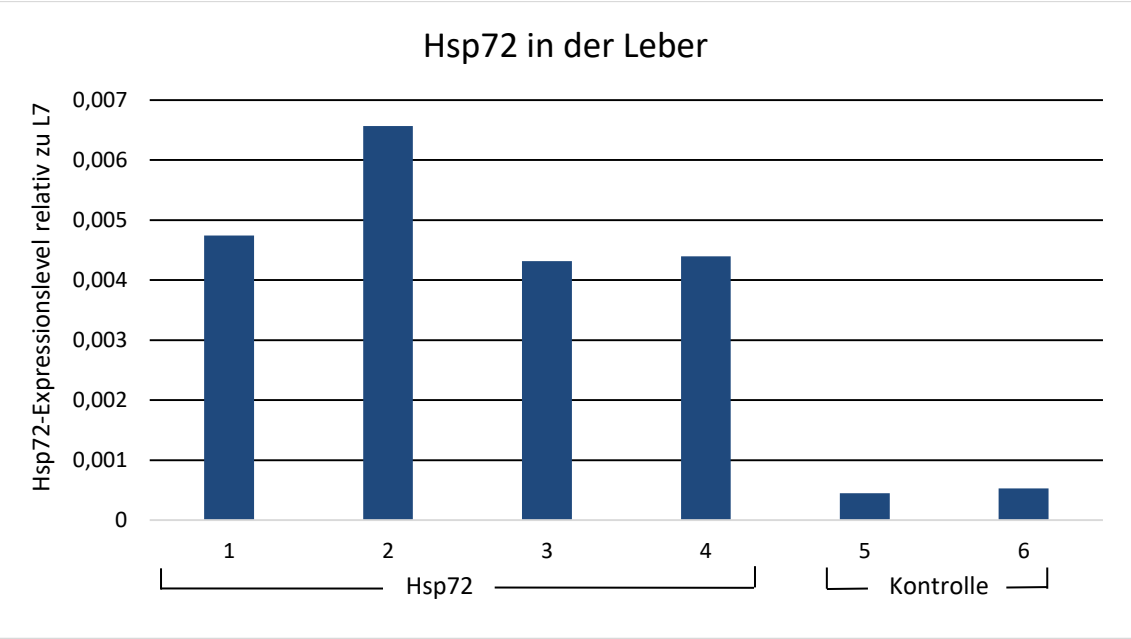


Abb. 4: Quantifizierung der Expression von Ratten-Hsp72 in der Leber der transgenen Tiere und Kontrolltiere. Die Real-time-PCR zeigt, dass weder transgene (1-4) Tiere noch nicht-transgene (5 und 6) Tiere eine nennenswerte Expression von Ratten- Hsp72 beinhalten; Hsp= Hitzeschockprotein, PCR= Polymerasekettenreaktion

3.1.2 Expression von Hsp72 im Pankreas

3.1.2.1 In-situ-Hybridisierung

Die Expression von Hsp72 im Pankreas wurde mittels In-situ-Hybridisierung untersucht. Verwendet wurden ratHsp72 Sense und Antisense Proben. Die nicht-transgenen Tiere (Kontrolle) und die Sense-Proben zeigen kein Signal. Im Gegensatz dazu weisen die transgenen Tiere (Hsp72) eine deutliche Expression von Hsp72 auf (Abb. 5). Besonders zu betonen ist, dass die Expression ausschließlich im exokrinen Bereich des Pankreas zu finden ist. Im endokrinen Teil der Drüse kann keine nennenswerte Expression festgestellt werden.

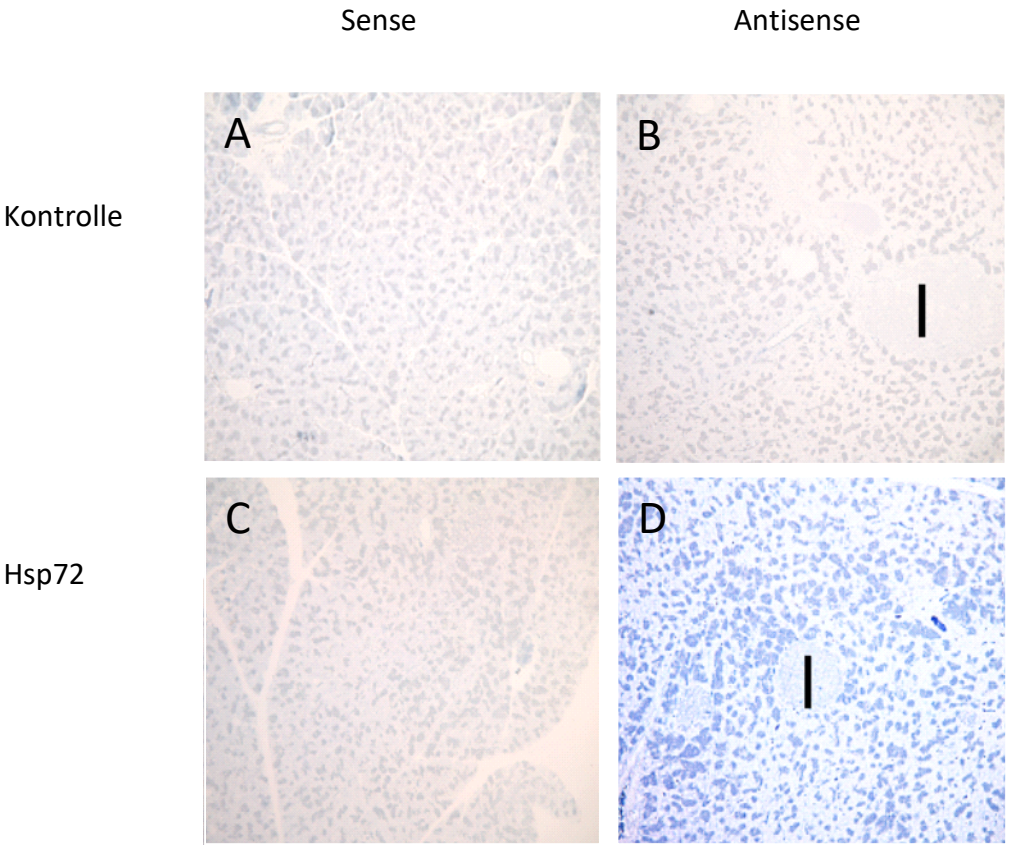


Abb. 5: (Lunova et al. 2012) In-situ-Hybridisierung dokumentiert die Expression von Ratten-Hsp72 mRNA im exokrinen Pankreas. A und B markieren Gewebeproben nicht-transgener Tiere (Kontrolle), C und D stellen Gewebeproben transgener Tiere dar (Hsp72). Die Proben A und C wurden mit rat Hsp72 Sense hybridisiert, B und D mit Antisense. Gut zu erkennen ist das exokrine, rein seröse Gewebe und die mit I bezeichnete Langerhans-Insel, also das endokrine Pankreas, das jedoch kein nennenswertes Hsp72-Signal aufweist. (100-fache Vergrößerung); Hsp=Hitzeschockprotein; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.1.2.2 Immunhistochemie

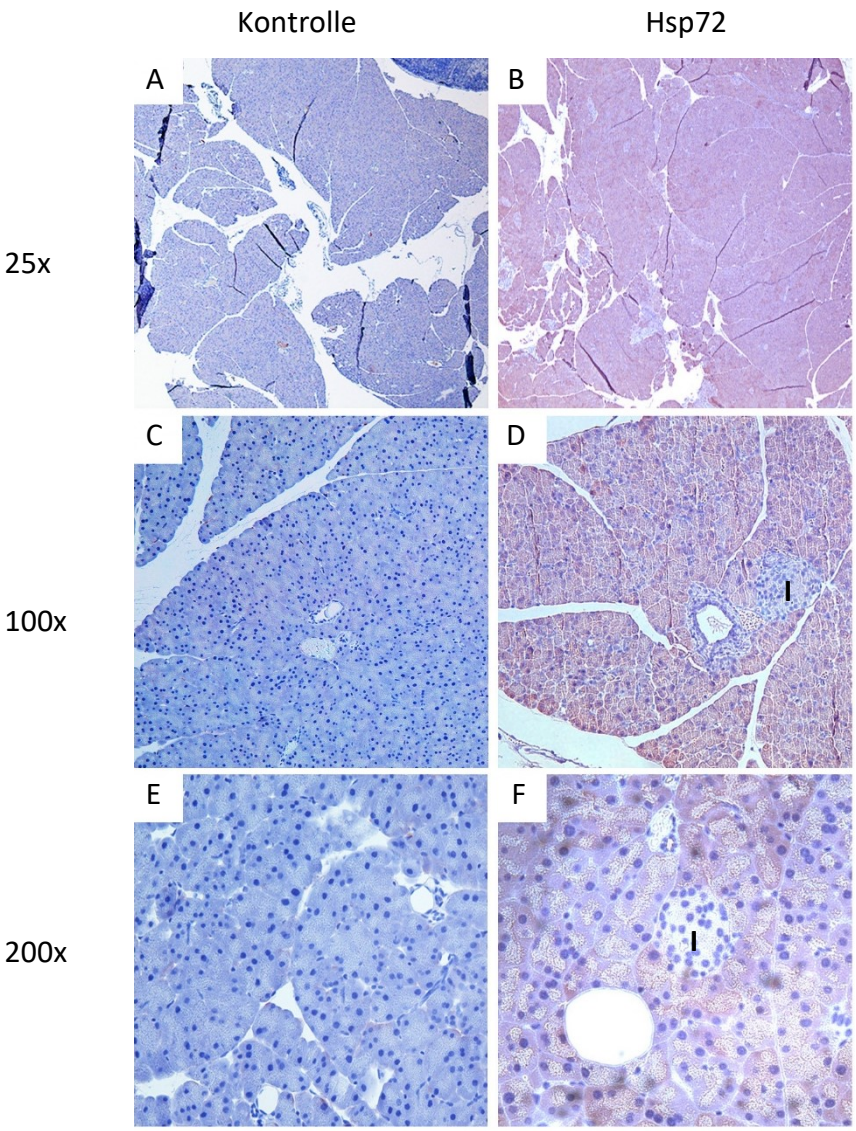


Abb. 6: (modifiziert nach Lunova et al. 2012) Darstellung der Expression von Hsp72 im Pankreas mittels immunhistochemischer Färbung, mit Hilfe eines Antikörpers gegen Hsp72. A,C und E markieren Gewebeproben nicht-transgener Tiere (Kontrolle), B,D und F stellen Gewebeproben transgener Tiere (Hsp72) dar. Die gewählte Vergrößerung beträgt jeweils 25- (A, B), 100- (C, D) und 200-fach (E, F). Man erkennt eine deutliche Überexpression von Hsp72 in den Azinuszellen transgener Tiere. In den Inselzellen (I in Bild D und F) und den Gangzellen ist, wie auch bei den Kontrolltieren, keine Überexpression nachweisbar. Hsp= Hitzeschockprotein; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

Die Expressionsmuster von Hsp72 in transgenen (Hsp72) und nicht-transgenen Tieren (Kontrolle) wurden des Weiteren mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen (Abb. 6) Mit Hilfe des Antikörpers gegen Hsp72 wird eine deutlich vermehrte Expression von Hsp72 bei den genetisch veränderten Tieren im Bereich der Azinuszellen sichtbar. In den Inselzellen und Gangzellen (endokriner Anteil) kann hingegen keine Überexpression festgestellt werden.

3.1.2.3 Quantifizierung der Hsp72-Überexpression

Der Gehalt an Hsp72 im pankreatischen Gewebe von genetisch veränderten (Hsp72) und nicht veränderten Tieren (Kontrolle) wurde mit Hilfe einer Verdünnungsserie im Western Blot ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Kontroll-Gruppe bei 100%-iger Gewebekonzentration ein ähnlich starkes Signal aufweist, wie die Hsp72-Gruppe bei 1%-iger Gewebekonzentration. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Konzentration an Hsp72 in den genetisch veränderten Tieren ca. 100-fach höher ist.

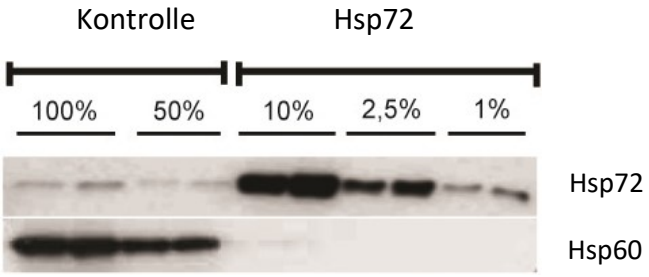


Abb. 7: (Lunova et al. 2012) Semiquantitative Ermittlung der relativen Hsp72-Überexpression mittels einer Verdünnungs-Serie von pankreatischem Gewebe-Homogenisat. Im WesternBlot wurden jeweils zwei Proben nicht transgener Tiere (Kontrolle) und transgener Tiere (Hsp72) in den gekennzeichneten Verdünnungen aufgetragen. Untersucht wurde die Menge von Hsp72, Hsp60 diente als Ladekontrolle; Hsp=Hitzeschockprotein; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.1.2.4 Hsp72-Überexpression und ihre Auswirkung auf andere Chaperone

Nachdem die vermehrte pankreatische Expressionsrate von Hsp72 in den transgenen Tieren nachgewiesen wurde, wurde mit Hilfe des Western Blots ermittelt, ob die Überexpression von Hsp72 einen Einfluss auf andere Chaperone nimmt. Im Vergleich zu Hsp72 sind die Signale der anderen getesteten Chaperone sowohl für die transgene Hsp72-Gruppe, wie auch für die nicht-transgene Kontrollgruppe weitgehend identisch. Die zusätzliche Expression von Hsp72 nimmt also keinen Einfluss auf andere Chaperone.

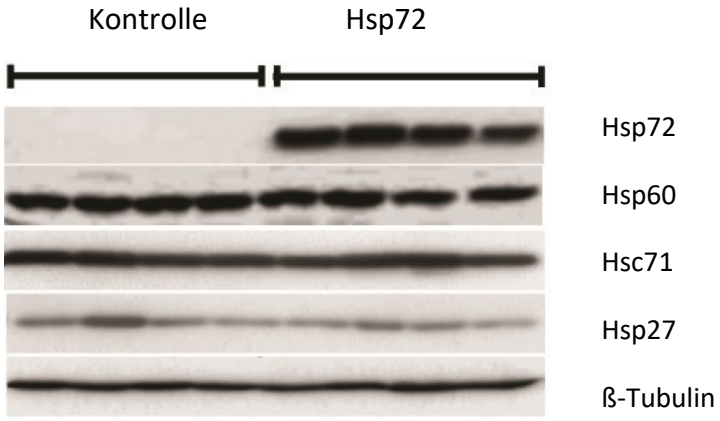


Abb. 8: (Lunova et al. 2012) Analyse der Expression der ausgewählten Chaperone in Pankreata von nicht transgenen (Kontrolle) und transgenen Tieren (Hsp72). Aufgetragen wurden jeweils vier Proben pro Gruppe. ß-Tubulin diente als Ladekontrolle. Nur Hsp72 zeigte eine veränderte Expression in den genetisch veränderten Tieren, die anderen Chaperone blieben weitgehend unverändert; Hsp= Hitzeschockprotein, Hsc= Heatschock-cognates; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.2 Einfluss von Hsp72 Überexpression auf den Verlauf einer akuten Pankreatitis

Diese Arbeit soll die Frage klären, ob ein vermehrtes Vorhandensein von Hsp72 Einfluss auf die Entwicklung einer akuten Pankreatitis nimmt. Sowohl in den genetisch veränderten (Hsp72), wie auch in den genetisch unveränderten Tieren (Kontrolle) wurde durch Caerulein-Injektion eine akute Pankreatitis induziert. Der Verlauf der Erkrankung ist gekennzeichnet von Wassereinlagerungen (Ödemen), Leukozyteninfiltration und Nekrosen des Pankreas. Bei genetisch unveränderten Tieren erreicht die akute Pankreatitis nach ca. 12-36h ihren Höhepunkt. Die Zeitpunkte der Betrachtungen/Messungen sind deshalb vor Injektion (0h) sowie 6-36h danach gewählt. Die Ergebnisse der histologischen und biochemischen Untersuchungen beider Versuchsgruppen werden im Folgenden dargelegt.

3.2.1. Quantifizierung der Pankreasschädigung mittels Serum-Lipase-Wert

Während einer akuten Pankreatitis steigt, bedingt durch die Zellschädigung, der Wert an Lipase im Serum bereits innerhalb kurzer Zeit an. Bei der Untersuchung von genetisch veränderten (Hsp72) und unveränderten Tieren (Kontrolle) hinsichtlich der Menge an Lipase im Verlauf einer durch Caerulein induzierten, akuten Pankreatitis vor Injektion und 6-36h danach wurde deutlich, dass die Lipase-Level beider Gruppen in den ersten 12h annähernd gleich sind. Nach 36h zeigt die transgene Gruppe jedoch signifikant niedrigere Werte als die Kontrollgruppe. Dies spricht für eine raschere Regeneration der transgenen Gruppe (Hsp72).

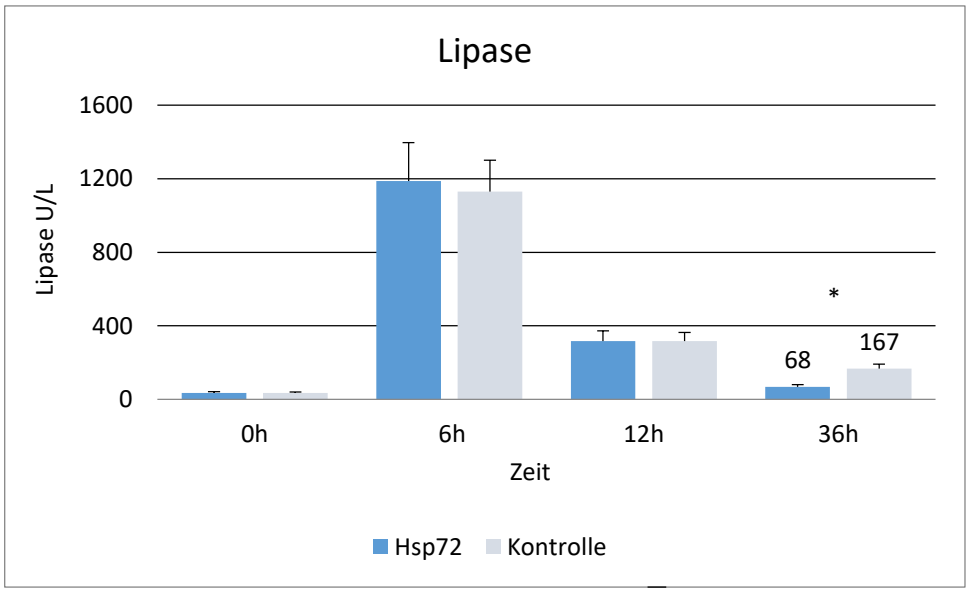
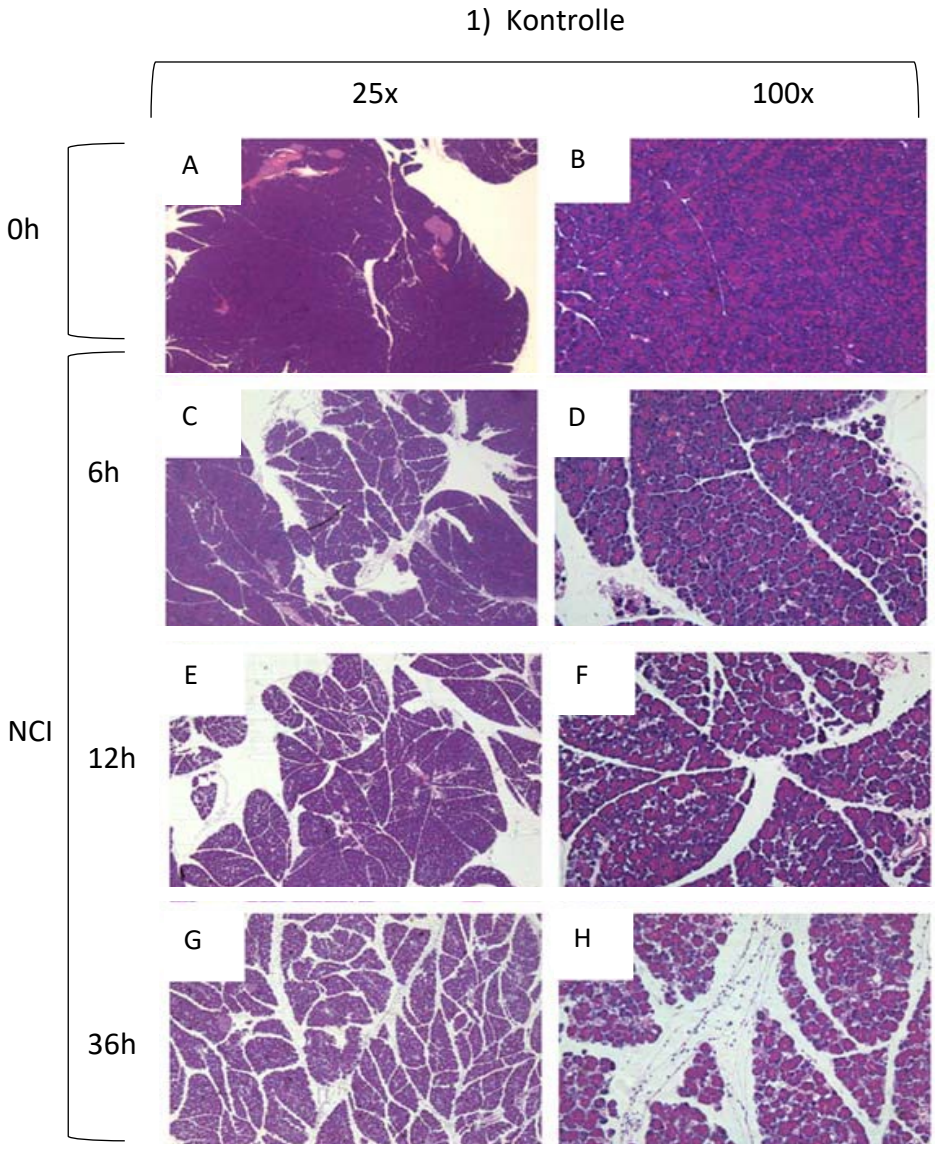


Abb 9.: (modifiziert nach Lunova et al. 2012)Serum-Lipase-Wert im Verlauf von 36h nach Caerulein-Injektion. Die Serum-Werte transgener (Hsp72, dunkelblau) und nicht-transgener Tiere (Kontrolle, hellblau) vor (0h) sowie 6h, 12h und 36h nach erster Caerulein-Injektion wurden miteinander verglichen. Von jeder Gruppe (Hsp72/Kontrolle) wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils vier Tiere gemessen und die Mittelwerte wurden errechnet. 36h nach erster Caerulein-Gabe wiesen die Hsp72-Tiere einen signifikant niedrigeren Serum-Lipase-Wert auf, als die Kontrollgruppe. *P<0,05; U/L= Units pro Liter, Hsp=Hitzeschockprotein; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.2.2 Quantifizierung der Gewebsschädigung mittels einer histologischen Untersuchung

Verglichen wurden histologische Schnitte der Pankreaten von genetisch unveränderten (Kontrolle) und veränderten (Hsp72) Tieren vor der Indizierung einer akuten Pankreatitis, sowie 6-36h danach. Vor der Injektion mit der auslösenden Substanz (Caerulein) wurden histologisch weitestgehend unauffällige Pankreaten in beiden Versuchsgruppen beobachtet. Nach 6h und 12h weisen beide Gruppen Schädigungen des Pankreas in Form von Wassereinlagerungen, entzündlichen Infiltraten und Nekrosen auf. Das Ausmaß der Schädigung war bis zu diesem Zeitpunkt in beiden Versuchsgruppen vergleichbar.
36h nach Injektion kann man bei den transgenen Tieren (2) Hsp72) im Gegensatz zu den nicht transgenen Tieren (1) Kontrolle) eine nahezu vollständige Regeneration von den histologischen Auswirkungen der akuten Pankreatitis beobachten.



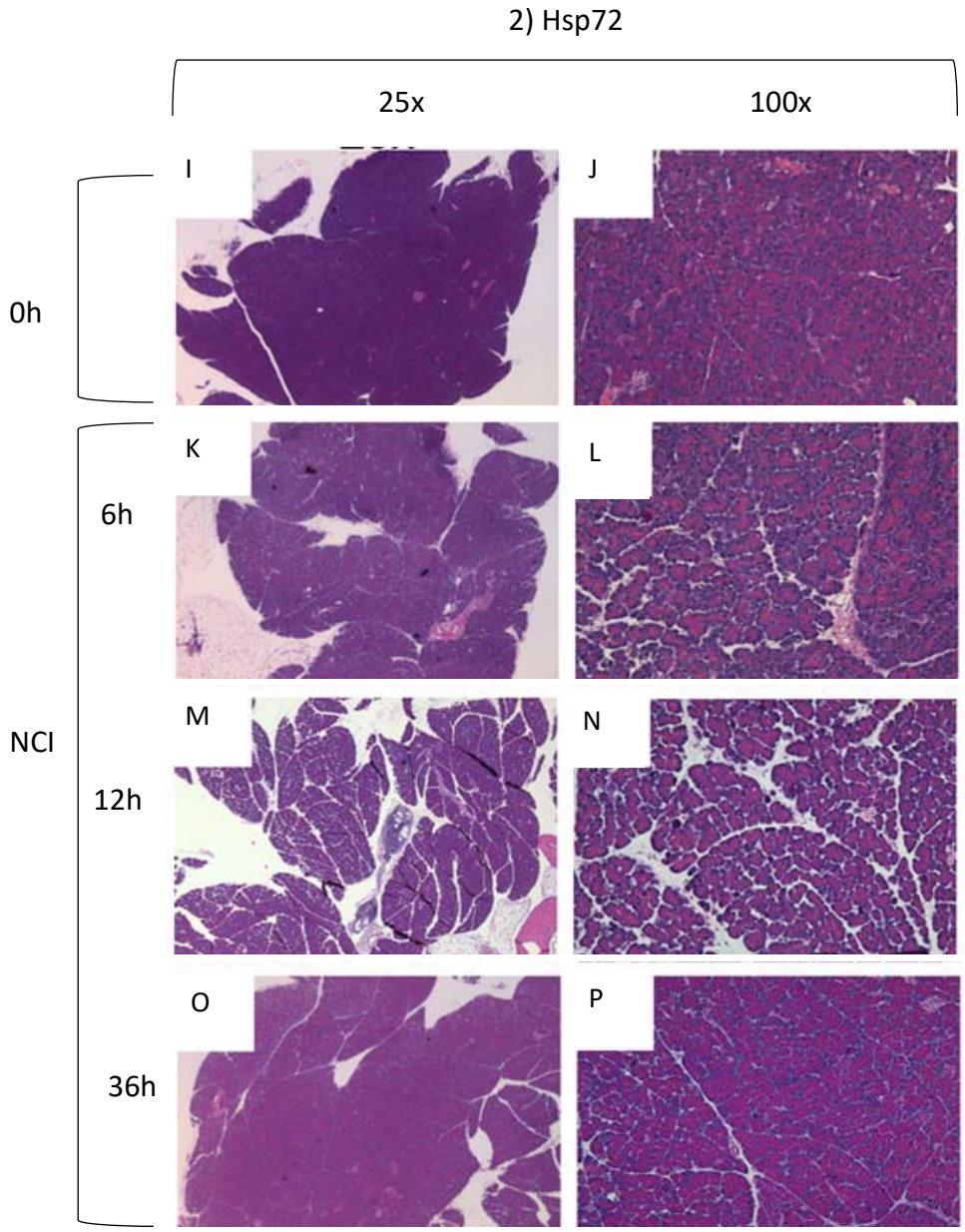
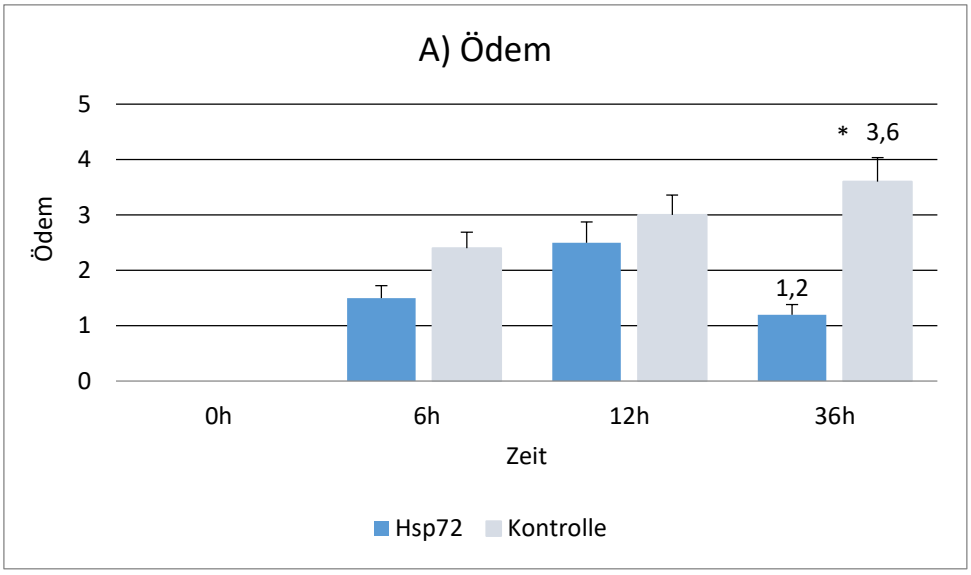
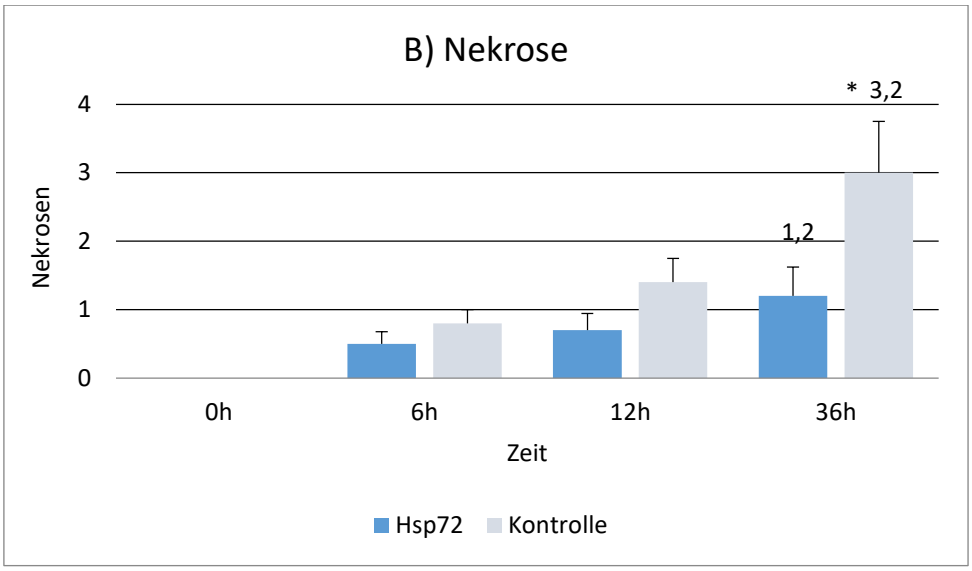


Abb. 10: (modifiziert nach Lunova et al. 2012) Hsp72-überexprimierende Tiere weisen eine schnellere Regeneration nach einer Caerulein-induzierten Pankreatitis auf. Hämatoxylin-Eosin-Färbung visualisiert die Pankreaten von 1) nicht-transgenen Tieren (Kontrolle; A,B,C,D,E,F,G,H) und 2) transgenen Tieren (Hsp72; I,J,K,L,M,N,O,P) jeweils vor Caerulein-Injektion 0h (A,B,I,J) sowie 6h (C,D,K,L) , 12h (E,F,M,N) und 36h (G,H,O,P) nach erster Injektion. Vergrößerung 25- und 100-fach. 36h nach erster Caerulein-Gabe zeigt die Hsp72-Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine fast vollständige Regeneration der Pankreaten, während zu den anderen Zeitpunkten vergleichbare Gewebsschädigung in beiden Gruppen mit Ödemen, entzündlichen Infiltrationen und Nekrosen beobachtet wurde; NCI= nach Caerulein-Injektion, Hsp= Hitzeschockprotein, h= Stunden; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.2.2.1 Morphometrische Auswertung der histologischen Bilder

Wie bereits beschrieben, sind Wassereinlagerungen (Ödeme - A), abgestorbenes Gewebe (Nekrosen - B) und entzündliches Infiltrat (Leukozyteninfiltration - C) die typischen Zeichen einer akuten Pankreatitis. Zur Beurteilung dieser Marker im Verlauf der Erkrankung, wurden die histologischen Gewebeschnitte von Pankreaten morphometrisch betrachtet. Vor dem Auslösen der akuten Pankreatitis durch die Caerulein-Injektion (0h) sowie 6h danach sind zwischen beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der 3 Marker erkennbar. Nach 12h sind die Mengen an Ödemen und Nekrosen für transgene (Hsp72) und nicht-transgene (Kontrolle) Tiere ebenfalls ohne bedeutenden Unterschied, die Werte für Leukozyteninfiltration bei Hsp72 im Vergleich zur Kontrolle jedoch deutlich geringer. 36h nach erster Caerulein Injektion weisen die genetisch veränderten Tiere (Hsp72) bei allen drei Parametern deutlich geringere Werte auf, als die Kontrollgruppe.
Abschließend gesagt entwickeln sowohl die genetisch unveränderten (Kontrolle) wie auch die transgenen (Hsp72) Tiere eine deutliche akute Pankreatitis. Das zusätzliche Ratten-Hsp72 der transgenen Tiere schützt somit nicht vor dem Ausbruch der Erkrankung, bewirkt aber eine schnellere Regeneration des Gewebes.





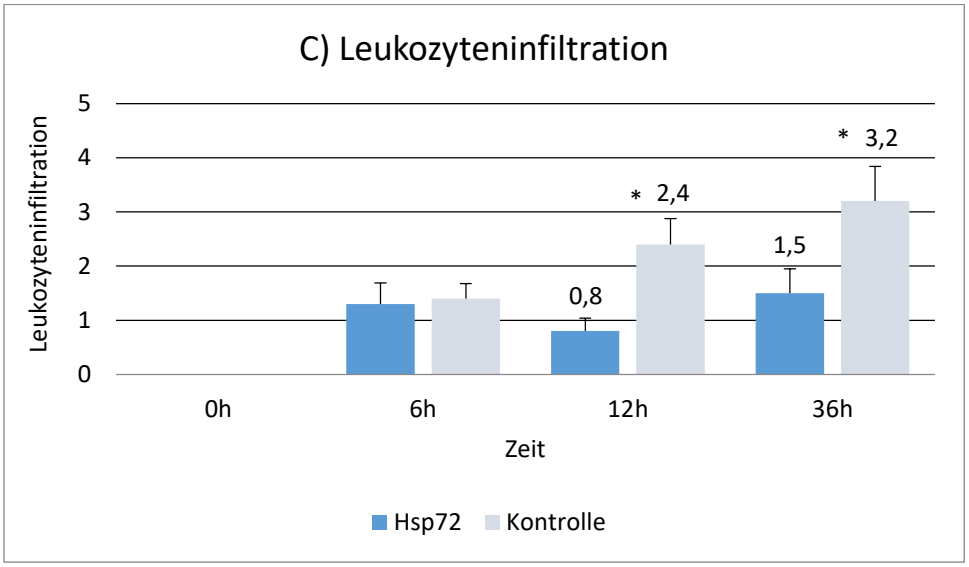


Abb. 11: (modifiziert nach Lunova et al. 2012) Histologisches Scoring; Morphometrische Beurteilung histologischer Pankreas-Schnitte von transgenen Tieren (Hsp72) und nicht transgenen Tieren (Kontrolle) hinsichtlich der Menge an ödematösen Gewebsveränderungen (A), Nekrosen (B) und Leukozyteninfiltration (C). Die Gewebeproben wurden vor (0h) sowie 6h, 12h und 36h nach erster Caerulein-Injektion analysiert. Aus jeder Gruppe wurden zu jedem Zeitpunkt 4 Tiere untersucht. 36h nach Caerulein-Injektion zeigen die Hsp72-Tiere (dunkelblau) in allen drei Parametern niedrigere Werte als die Kontrollgruppe (hellblau). Bei nicht behandelten Tieren wurden weder nennenswerte Leukozyteninfiltration, Nekrosen, noch ödematöse Veränderungen beobachtet. *P<0,05.; Hsp= Hitzeschockprotein, h= Stunde; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.2.3 Quantifizierung des Wassergehaltes des Pankreas

Neben der histologischen, morphometrischen Betrachtung des Pankreasgewebes, wurde der Wassergehalt (Ödem) auch über das Gewicht der Pankreaten ermittelt (1-Feuchtgewicht/Trockengewicht). Die transgenen Tiere (Hsp72) und die nicht-transgenen Tiere (Kontrolle) weisen vor Injektion (0h), sowie 6h und 12h danach einen ähnlichen Wassergehalt der Pankreaten auf. Dabei steigt der Wassergehalt im Laufe der ersten 12h nach erster Caerulein-Injektion deutlich an - genau so, wie es bei einer akuten Entzündung zu erwarten ist. 36h nach Injektion erkennt man einen deutlich geringeren Wassergehalt bei den transgenen Tieren (Hsp72). Der signifikante Unterschied zu nicht-transgenen Tieren lässt auf eine beschleunigte Genesung von der Erkrankung schließen.

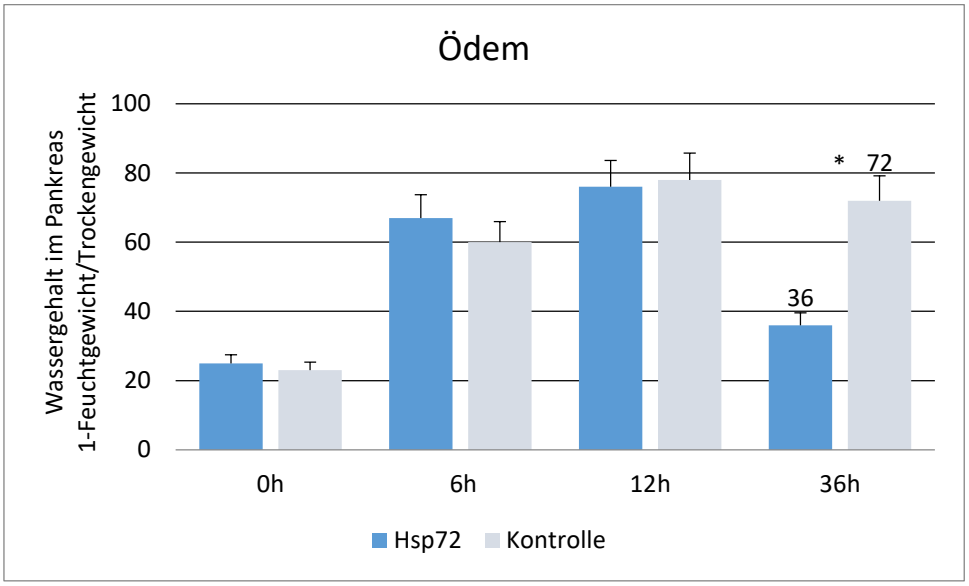


Abb. 12: (modifiziert nach Lunova et al. 2012) Hsp72-überexprimierende Tiere weisen bei Caerulein-induzierter Pankreatitis eine schnellere Rückbildung der ödematösen Veränderungen auf. Der Wassergehalt der Pankreaten (gemessen als 1-Trockengewicht/Feuchtgewicht) wurde für die transgenen Tiere (Hsp72) und die nicht-transgenen Tiere (Kontrolle) vor erster Caerulein-Injektion (0h) und 6h, 12h sowie 36h nach erster Gabe ermittelt. Für jede Gruppe wurden zu jedem Zeitpunkt 4 Tiere betrachtet. Nach 36h zeigen die genetisch veränderten Tiere (dunkelblau) einen deutlich geringeren Wert als die genetisch unveränderten (hellblau). *P < 0,05; Hsp= Hitzeschockprotein, h= Stunde; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.2.4 Quantifizierung der Entzündung mittels Myeloperoxidase-Enzymaktivität

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Protein, das in neutrophilen Granulozyten vorkommt und regulatorisch in den Entzündungsprozess eingreift. (Green et al. 2004) Der Gehalt der MPO ist somit ausschlaggebend für das Ausmaß einer Entzündung. Vor Injektion mit Caerulein (0h) sind die Mengen an relativer MPO für transgene (Hsp72) und nicht-transgene Tiere (Kontrolle) gleich. 12h und 36h nach Injektion mit Caerulein weisen die transgenen Tiere einen deutlich geringeren MPO-Pegel auf als die Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist kongruent zu 3.2.2.1 (C) und weist auf die schnellere Regeneration der genetisch veränderten Tiere (Hsp72) von akuter Pankreatitis hin.

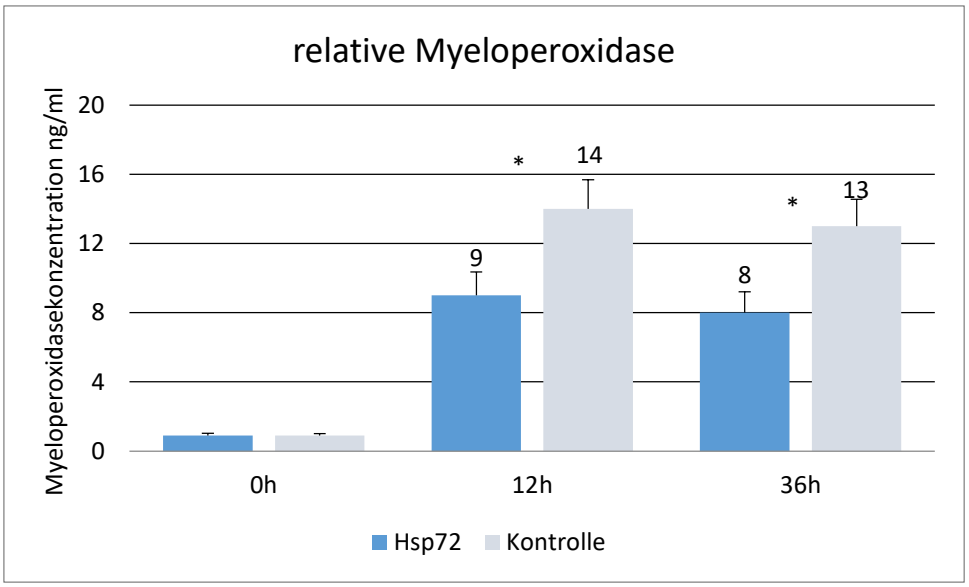


Abb. 13: (modifiziert nach Lunova et al. 2012) Hsp72-überexprimierende Tiere entwickeln nach Caerulein-injektion eine weniger stark ausgeprägte Pankreas-Entzündung. Das Ausmaß der neutrophilen Infiltration (gemessen über die Aktivität der Myeloperoxidase) wurde für die transgenen Tiere (Hsp72) und die nicht-transgenen Tiere (Kontrolle) vor erster Caerulein-Injektion (0h), sowie 12h und 36h danach bestimmt. Für jede Gruppe, wurden zu jedem Zeitpunkt 4 Tiere betrachtet. Während vor der Injektion die Werte sehr niedrig und nahezu gleich sind, zeigen sich sowohl 12h, als auch 36h nach Injektion verringerte Werte bei den genetisch veränderten Tieren (dunkelblau) im Vergleich zu den genetisch unveränderten (hellblau). *P<0,05; Hsp= Hitzeschockprotein, h= Stunde; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.2.5 Bestimmung der TNF-α-Expression

Der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) ist ein wichtiger Botenstoff des Immunsystems und wird vorwiegend von Makrophagen gebildet und ausgeschüttet (Hehlgans et al. 2005). Eine lokale Erhöhung von TNF-α führt zu den typischen Entzündungskennzeichen wie Schwellung, Rötung, Hitze (Fieber) und Schmerz. Es wird deutlich, das vor Auslösen der akuten Pankreatitis sowie 12h und 18h danach, die Werte für TNF-α - mRNA-Expression bei beiden Versuchsgruppen (Hsp72 und Kontrolle) annähernd gleich sind. 36h nach erster Caerulein-Injektion erkennt man einen signifikant geringeren Wert an TNF-α bei den genetisch veränderten Tieren. Dies lässt auf eine schnellere Genesung von der Erkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe schließen.

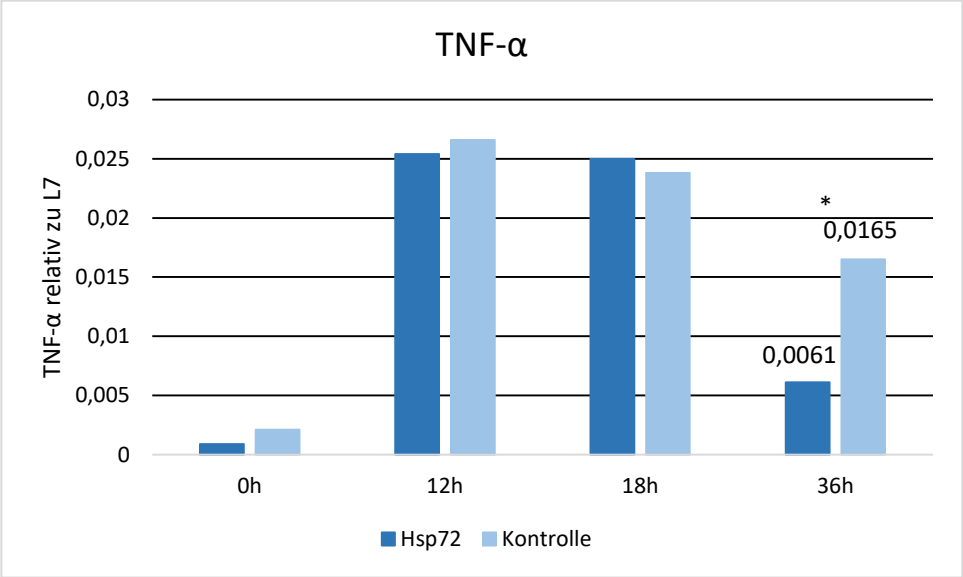


Abb. 14: Beurteilung der entzündlichen Reaktion während der Caerulein-induzierten Pankreatitis mittels des charakteristischen Entzündungsmarkers Tumornekrosefaktor- a (TNF- α). Der zuvor genannte Parameter wurde für transgene Tiere (Hsp72) und nicht-transgene Tiere (Kontrolle) jeweils vor erster Caerulein-Injektion (0h) sowie 12h, 18h und 36h danach mittels RT-PCR gemessen. Hsp72-Tiere (dunkelblau) zeigten 36h nach erster Caerulein-Injektion signifikant niedrigere TNF-α -mRNA- Werte als nicht transgene Tiere. *P<0,05; Hsp= Hitzeschockprotein, h= Stunde, TNF= Tumornekrosefaktor, RT-PCR= Realtime-Polymerasekettenreaktion

3.2.6 Analyse der Pankreasregenertion mittels PCNA-Expression

Das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ist ein Ringprotein, welches die DNA bei der Replikation umgibt und eine komplette und schnelle Vervielfältigung des Erbgutes ermöglicht (Travali et al. 1989) und wird somit als ein Marker von sich teilenden Zellen verwendet. Ermittelt wurde die Transkriptionsmenge von PCNA vor Auslösen der akuten Pankreatitis mittels Caerulein-Injektion, sowie 12h, 18h und 36h nach erster Injektion. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den genetisch veränderten Tieren (Hsp72) und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

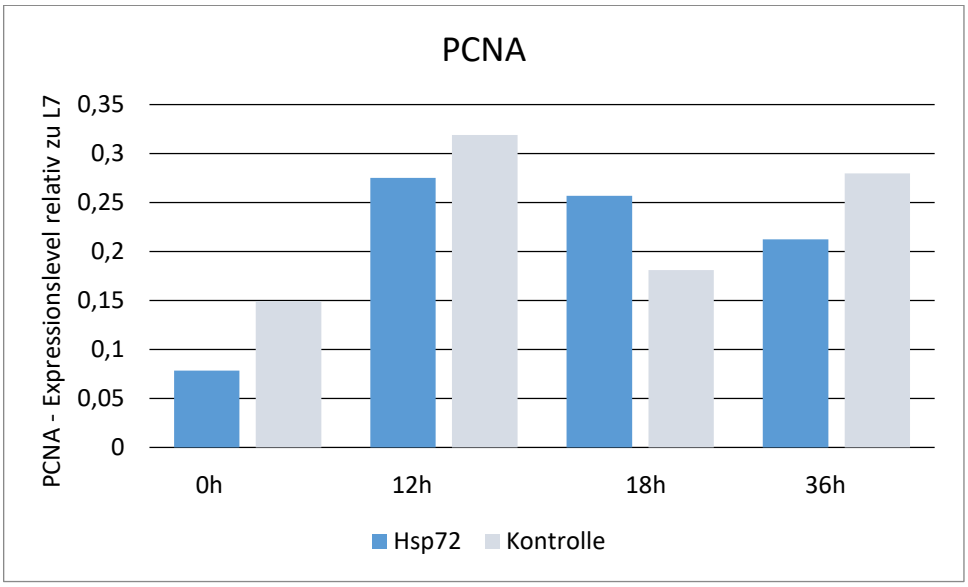
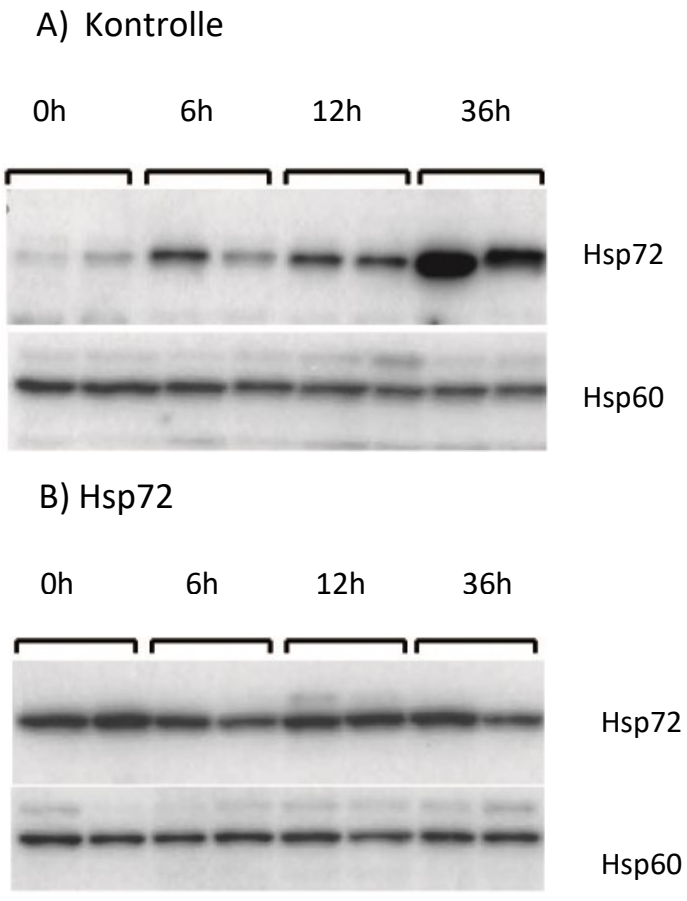


Abb. 15: Quantifizierung der Pankreasregeneration mittels Real-Time-PCR für den Proliferationsmarker PCNA. Ermittelt wurden die Transkriptionsmengen für transgene Tiere (Hsp72) und nicht-trangene Tiere (Kontrolle) jeweils vor erster Injektion (0h) sowie 12h, 18h und 36h danach. Nach Injektion ist ein Anstieg der Transkriptionsmenge zu erkennen, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Hsp= Hitzeschockprotein, h= Stunde, PCNA= Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCR=Polymerasekettenraktion

3.2.7 Bestimmung der Hsp72-Level während der Pankreatitis

Das Hitzeschockprotein 72 unterstützt den Organismus indem es eine schnelle Regeneration der betroffenen Gewebe ermöglicht. Während die Kontrollgruppe nur das körpereigene Hsp72 aufweist, bilden die genetisch veränderten Tiere (Hsp72) zusätzliches Ratten-Hsp72. Im Folgenden wurden die quantitativen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen während der Pankreasentzündung untersucht.
Die Abbildungen A) und B) zeigen die quantitativen Veränderungen der Menge an Hsp72 im Verlauf der durch Caerulein induzierten Pankreatitis. Die nicht transgenen Tiere weisen einen deutlichen Anstieg der Hsp72-Menge im Verlauf der Erkrankung auf, während die Hsp72-überexprimierenden Mäuse ein gleichbleibendes Signal zeigen. Die genetisch unveränderten Tiere erreichen trotz eines Anstieges der Hsp72-Menge im Verlauf der Erkrankung jedoch nie die Hsp72-Konzentration der genetisch veränderten Tiere (Abb. 16 C).



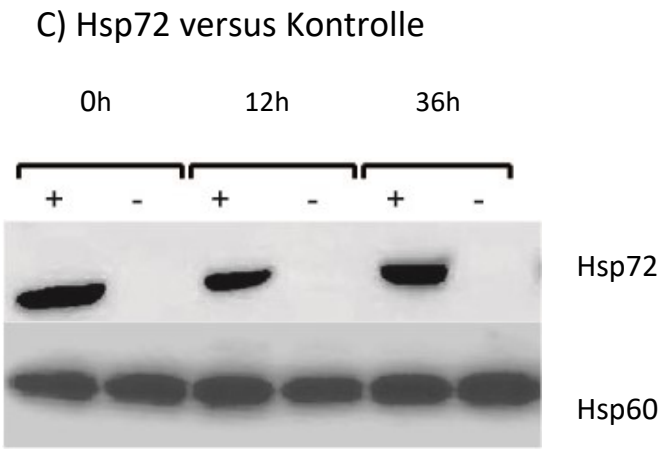


Abb. 16: (Lunova et al. 2012) Bestimmung der Konzentration von Hsp72 im Verlauf einer akuten Pankreatitis mittels Western Blot. A),B) und C) zeigen die Menge an Hsp72 vor ersten Injektion, sowie (6h*), 12h und 36h danach (jeweils 2 Individuen pro Zeitpunkt). A) zeigt genetisch unveränderte Tiere (Kontrolle). Es ist ein deutlicher Konzentrations-Anstieg zu erkennen, der während der Regenerationsphase (d.h. 36h nach erster Caerulein-Applikation) am stärksten ausgeprägt ist. B) zeigt genetisch veränderte Tiere (Hsp72). Die Konzentration an Hsp72 ist vor und nach Caerulein-Injektion nahezu gleichbleibend. C) vergleicht genetisch veränderte (+) mit unveränderten (-) Tieren. Die Hsp72- Konzentration von nicht-transgenen-Tieren erreicht zu keinem Zeitpunkt des Versuches die Hsp72 Konzentration von Tieren, die Hsp72 überexprimieren. Hsp60 diente in allen drei Versuchen als Ladekontrolle; Hsp= Hitzeschockprotein, h= Stunde; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne] *nur A und B

3.2.8 Quantifizierung des Ausmaßes der NFκB- Aktivierung

Der Transkriptionsfaktor NFκB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression einer akuten Pankreatitis (Baumann et al. 2007). Im Folgenden wurde die Aktivität des NFκB-Signals im Verlauf einer akuten, induzierten Pankreatitis untersucht, da bereits im Vorfeld gezeigt wurde, dass Hsp72 die NFκB- Aktivierung modulieren kann (Rakonczay et al. 2003; Feng et al. 2010).
Als Ausmaß der NFκB- Aktivierung wurde die Menge an p65 in der nukleären Fraktion bestimmt. HDAC2 diente als Ladekontrolle. Die genetisch unveränderten Tiere (-) zeigen vor Injektion (0h) ein ähnlich starkes Signal wie die genetisch veränderten Tiere. Nach 6h ist NFκB für alle Versuchstiere erhöht, wobei die transgenen Tiere (+) ein schwächeres Signal zeigen. 12h nach Injektion haben die transgenen Tiere (+) hinsichtlich NFκB wieder den Ausgangszustand erreicht, während die genetisch unveränderten Tiere (-) das stärkste Signal im Verlauf des Versuches aufweisen.

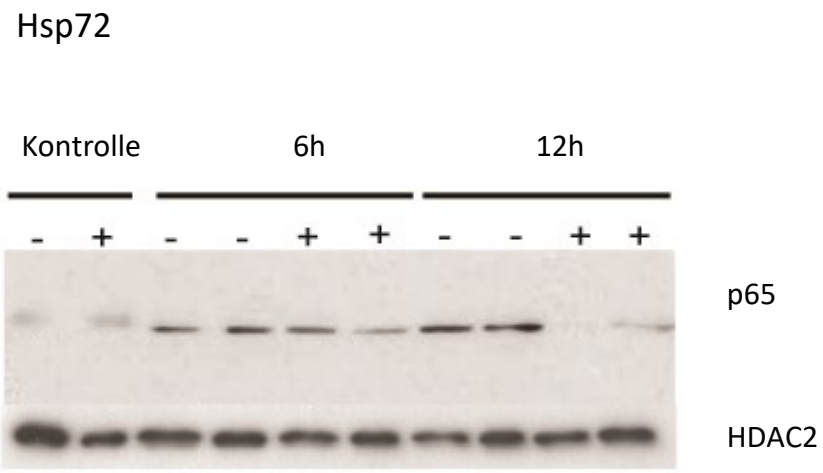
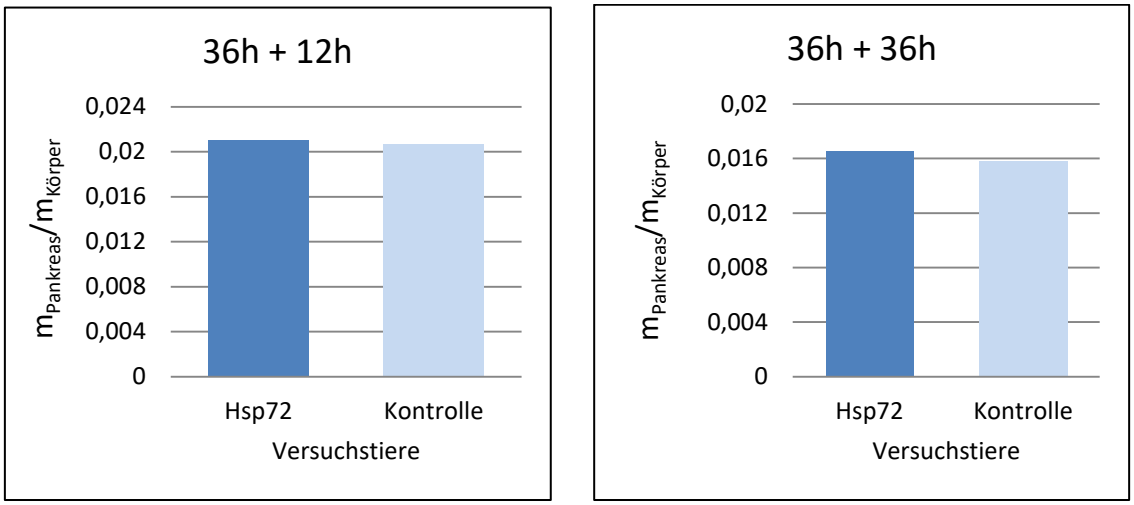


Abb. 17: Analyse der NFκB-Aktivierung während einer akuten, Caerulein-induzierten Pankreatitis über p65; (+) beschreibt jeweils ein genetisch verändertes Individuum, (-) ein genetisch unverändertes. Aufgetragen wurden Proben von Tieren die nicht injiziert wurden (Kontrolle) sowie Proben 6h und 12h nach erster Caerulein-Injektion. Um das Ausmaß der NFκB-Aktivierung zu bestimmen, wurden die Mengen von p65 in nukleären Extrakten mittels Immunoblotting quantifiziert. (-)-Tiere zeigen während einer akuten Pankreatitis ein erhöhtes Signal und damit eine stärkere NFκB-Aktivierung im Vergleich zu den (+)-Tieren. HDAC2 diente als Ladekontrolle; Hsp=Hitzeschockprotein, h=Stunden

3.3 Einfluss von Hsp72-Überexpression auf wiederholte Caerulein-Exposition

Um die Empfindlichkeit gegenüber wiederkehrender Pankreas-Reizung zu analysieren, wurden nicht-transgene (Kontrolle) und Hsp72-überexprimierende Tiere (Hsp72) 36 Stunden nach der ersten Caerulein-Applikation mit einem erneuten Caerulein-Zyklus belastet. Die Analyse dieser Tiere erfolgte 12 Stunden und 36 Stunden nach Beginn der zweiten Applikation. Zu beiden Zeitpunkten konnten zwischen beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede sowohl im Pankreasgewicht bezogen auf Körpergewicht (Abb. 18 A), als auch im Lipase-Serum-Spiegel (Abb. 18 B) festgestellt werden.

A) Pankreasgewicht/Körpergewicht



B) Lipasespiegel im Serum

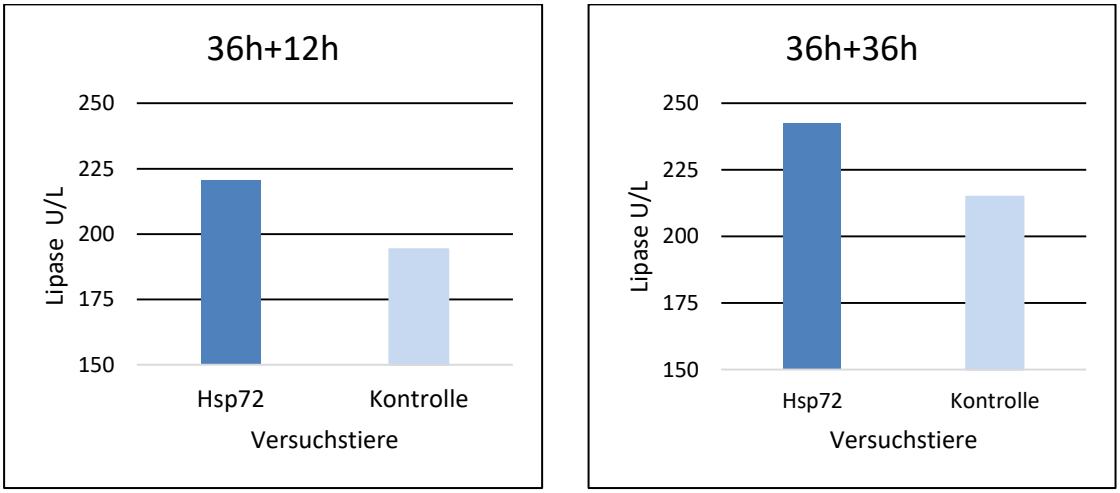


Abb. 18: Analyse der Empfindlichkeit der Hsp72-überexprimierenden Tiere gegenüber wiederholter Caerulein-Exposition. 36h nach Caerulein Applikation erfolgte ein erneuter Caerulein-Zyklus mit anschließender Analyse der Tiere 12h und 36h nach Beginn der zweiten Expositionsrunde. Betrachtet wurden dabei die Gesichtspunkte Pankreasgewicht/Körpergewicht (A) und Lipasespiegel im Serum (B). Die Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede für die genetisch veränderten (dunkelblau) und nicht veränderten Tiere (hellblau). Es wurden jeweils die Werte von 6 Tieren pro Gruppe gemessen und gemittelt. Hsp= Hitzeschockprotein, h= Stunden

3.4 Einfluss von Hsp72 Überexpression auf L-Arginin-induzierte Pankreatitis

Um zu testen, ob sich die ermittelten Daten aus dem Caerulein-Experiment auch auf andere Modelle akuter Pankreatitis übertragen lassen, wurde Versuchstieren der gleichen Abstammung eine Pankreatitis mittels zwei intraperitonealen Injektionen mit L-Arginin-Hydrochlorid im Abstand von einer Stunde induziert. Drei Tage nach Injektion von L-Arginin wurde in beiden Versuchsgruppen eine histologisch ähnlich starke Krankheitsausprägung sichtbar.

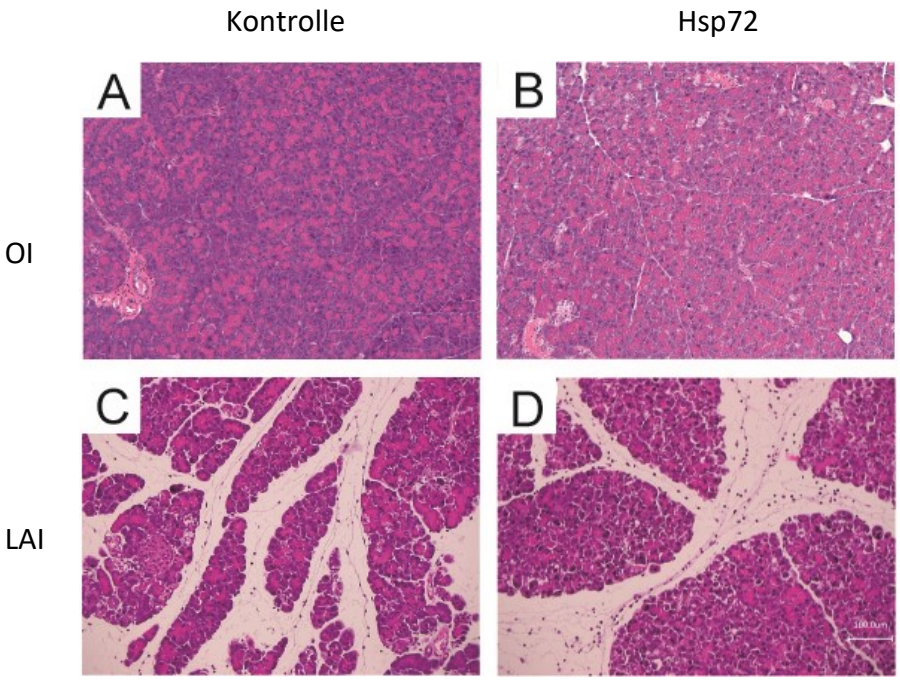
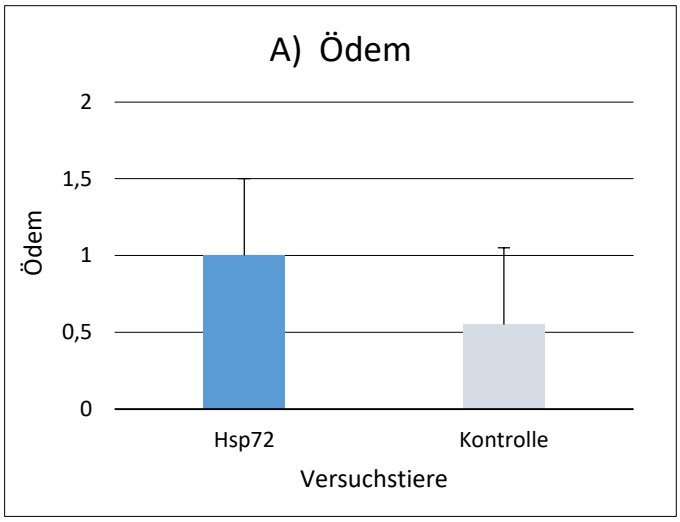
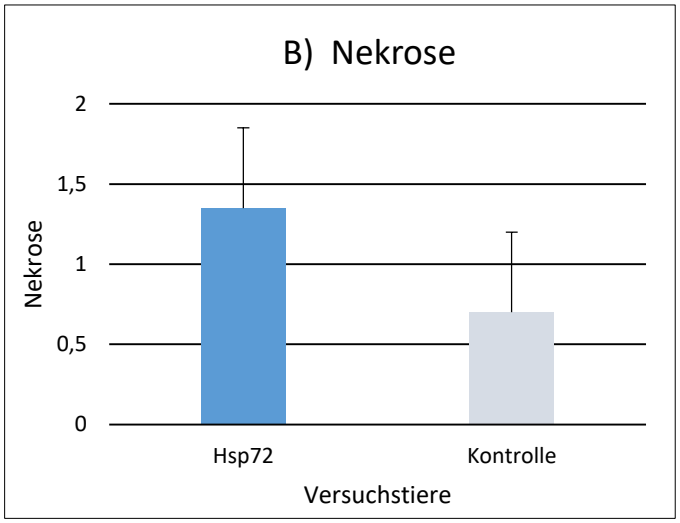


Abb. 19: . (modifiziert nach Lunova et al. 2012) Hsp72-überexprimierende Tiere sind nicht vor Entwicklung einer L-Arginin-induzierten Pankreatitis geschützt. Histologische Schnitte (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) der Pankreata von transgenen (Hsp72:B,D) und nicht-transgenen Tieren (Kontrolle: A,C) ohne Injektion (A,B) und 3 Tage nach erster L-Arginin-Injektion (C,D). 100-fache Vergrößerung. Nach L-Arginin-Injektion wurde in beiden Gruppen eine ähnlich stark ausgeprägte Pankreatitis beobachtet. LAI = L-Arginin-Injektion, OI = ohne Injektion, Hsp= Hitzeschockprotein; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.4.1 Histologische Beurteilung

Wie auch im 1.Modell erfolgte die morphometrische Betrachtung der Gewebeproben hinsichtlich der typischen Erkrankungszeichen Ödeme (A), Nekrosen (B) und Leukozyteninfiltration (C). Die Ausprägung dieser Merkmale war bei den genetisch veränderten Tieren und in der Kontrollgruppe vergleichbar. Dies bestätigt den nahezu identischen Krankheitsverlauf, unabhängig vom zusätzlichen Ratten-Hsp72 der transgenen Tiere.





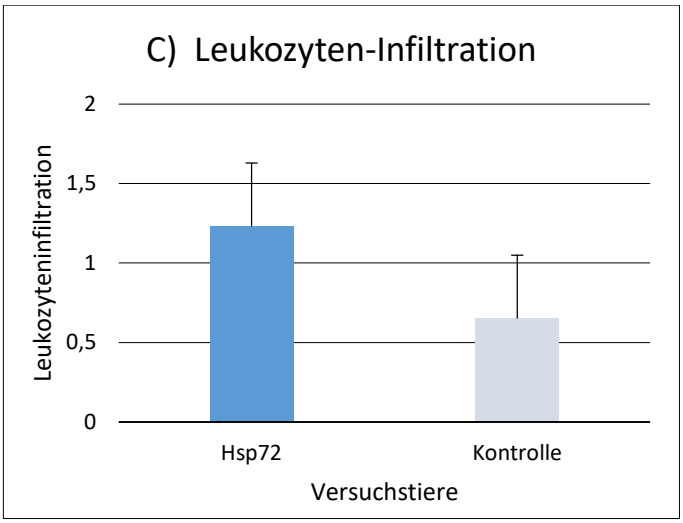


Abb. 20: (modifiziert nach Lunova et al. 2012) Histologisches Scoring; Morphometrische Quantifizierung der durch L-Arginin-Injektion induzierten Pankreasveränderungen. Die histologischen Schnitte von transgenen Tieren (Hsp72) und nicht transgenen Tieren (Kontrolle) wurden hinsichtlich der Menge an ödematösen Veränderungen (A), Nekrosen (B) und Leukozyteninfiltration (C) analysiert. Pro Gruppe wurden jeweils 5 Tiere untersucht und zusammengefasst. Die genetisch veränderten Tiere (dunkelblau) zeigen vergleichbare Werte wie die nicht-transgenen Mäuse (hellblau). Hsp=Hitzeschockprotein; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

3.4.2 Quantifizierung des Pankreasödems und der Serum-Lipase-Werte

Zur Verifizierung der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurden die Wassereinlagerungen (Ödem-A) als 1-Feuchtgewicht/Trockengewicht) ermittelt und die Serum-Lipase (B) gemessen. Die Wassermenge ist in den Pankreaten der genetisch veränderten Tiere (Hsp72) und der unveränderten Mäuse (Kontrolle) nahezu identisch, während die transgenen Tiere (dunkelblau) tendenziell höhere Serum-Lipase-Level als die Kontrollgruppe (hellblau) aufweisen. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Das bestätigt, dass eine Überexpression von Hsp72 nicht vor L-Arginin induzierter, akuter Pankreatitis schützt.

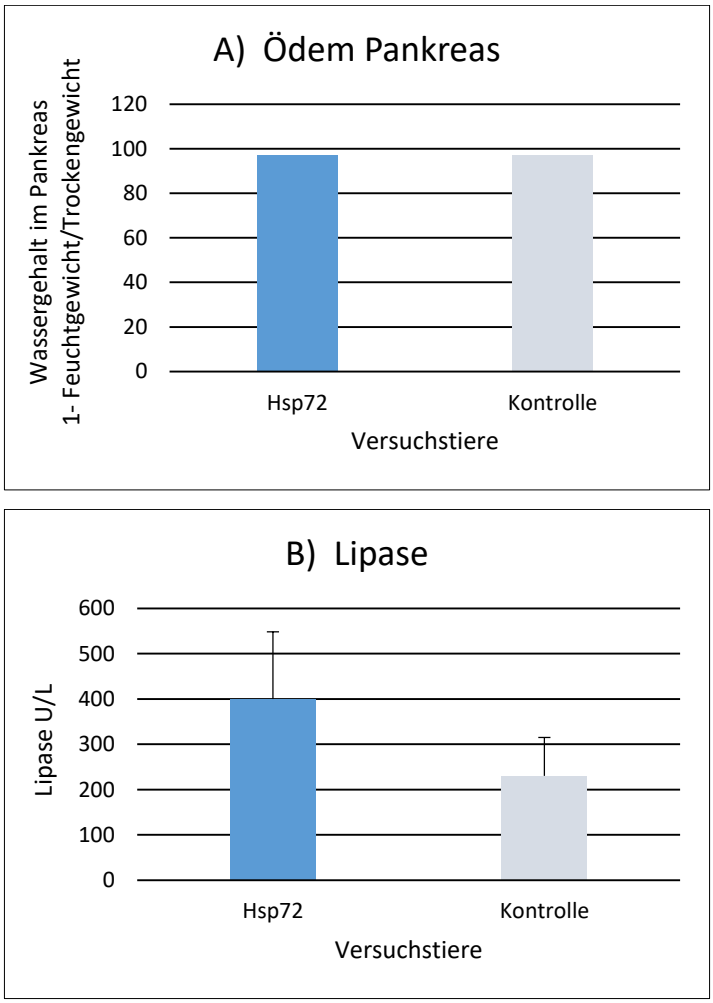


Abb.21: (modifiziert nach Lunova et al. 2012) Pankreasschädigung nach L-Arginin-Injektion, ermittelt über den Wert an Lipase im Serum (B) und dem Wasser-Gehalt der Pankreas (A) bei transgenen Tieren (Hsp72) und nicht transgenen Tieren (Kontrolle) Es wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe analysiert. Hsp72 (dunkelblau) zeigt im Vergleich zur Kontrolle (hellblau) einen nahezu gleichen Gehalt an Wasser und einen nicht-signifikant erhöhten Serum-Lipaselevel. Hsp= Hitzeschockprotein, U/L= Units pro Liter; [mit freundlicher Genehmigung von PlosOne]

4. Diskussion

Die Pankreatitis ist eine Erkrankung die sowohl chronisch als auch akut verlaufen kann und bei einem schweren Verlauf eine Letalität von 15-20% aufweist (Gupta und Wu 2010). Aufgrund dessen rückt die Forschung zur Entwicklung vorbeugender oder kurativer Substanzen zunehmend in den Fokus der Medizin.

Bereits im Vorfeld wurde Hsp72 eine protektive Rolle in Stress-Situationen zugeschrieben, im Fall der Pankreatitis speziell für Azini. (Westerheide et al. 2005; Clemons et al., 2002) Song et al., 2008 beobachteten die vermehrte Expression von Hsp72 im Bereich der azinären Zell-Vakuolen und den damit verbundenen Schutz vor der Erkrankung durch das Unterbinden der frühzeitigen Trypsinogen-Aktivierung. Diese Studie baut auf diesen Beobachtungen auf und stellte die Frage, ob eine isolierte Überexpression des Hitzeschockproteins 72 (Hsp72) vor der Entwicklung einer akuten Pankreatitis schützt.

Das von uns genutzte und von Lampel und Kern 1977 entwickelte Modell einer durch intraperitonealen Caerulein-Injektionen ausgelösten akuten Pankreatitis ist laut Pandol et al. (2007) das am weitesten verbreitete und am besten erforschte Tiermodell. Der Wirkmechanismus beruht auf einer supramaximalen Aktivierung der Enzymsekretion, die sekundär zur Pankreas-Schädigung führt und spiegelt somit einige, aber nicht alle Aspekte der humanen Erkrankung.

Wir verwendeten den von Marber et al. (1995) hergestellten Mausstamm der zusätzlich zum eigenen Maus-Hsp72, das transgene Ratten-Hsp72 exprimiert. Diese Tiere exprimieren in ungestresstem Zustand deutlich mehr Hsp72 als nicht-transgene Tiere, was wir bestätigen konnten. Die Konzentration von Hsp72 im Pankreas war bei den genetisch veränderten Tieren 100-fach höher als bei der Kontrollgruppe; die Kontrollgruppe hat selbst unter Stressbedingungen nie den Gehalt an Hsp72 erreicht wie die transgenen Tiere.

Das Screening verschiedener Gewebe auf das vermehrte Vorhandensein von Hsp72 ergab unterschiedliche Ergebnisse. In den Darmabschnitten und der Leber konnten zum Beispiel

keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen- und Kontroll-Tieren gemessen werden.
Im Bereich des Pankreas konnte histologisch eine deutliche Überexpression im exokrinen Teil nachgewiesen werden, hingegen kein nennenswertes Vorkommen im endokrinen Teil. Dies war zuerst etwas überraschend, da der verwendete Promoter eine ubiquitäre Expression garantieren sollte. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung kann der verwendete Cytomegalovirus-Enhancer (CMV) sein. Mehrere Studien haben im Vorfeld beschrieben, das Gene, welche unter Kontrolle des CMV stehen nur in einigen Organen eine effiziente Expression aufweisen, wobei die Azinuszellen des Pankreas besonders starke Produktionsraten aufwiesen. (Natori et al. 1998; Baskar et al. 1996; Koedood et al. 1995) Weitere Faktoren können ebenfalls die Expression von Transgenen beeinflussen. So besteht zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen der gewebespezifischen Expression und der umgebenden Lokalität des eingebrachten Gens im Genom. Laut Bellen (1999) haben die regulatorischen Elemente des Integrationsortes einen unvorhersehbaren Einfluss auf das Expressionsverhalten. Da die Integration der pronukleär injizierten transgenen Konstrukte zufällig erfolgt, kann dieser Faktor ja ohnehin nur schwer beeinflusst werden.

Nach der Caerulein-Injektion konnte man in beiden Versuchsgruppen die typischen Zeichen einer akuten Pankreatitis erkennen. Sowohl die transgenen Tiere wie auch die Kontrollgruppe zeigten jedoch im gleichen Maße die Auswirkungen einer Pankreatitis. Diese Beobachtungen waren etwas unerwartet und kontrovers zu vorausgegangenen Studien, in denen Hsp72 eine protektive Rolle hinsichtlich akuter Pankreatitis zugeschrieben wurde. (Rakonczay et al. 2003; Marber et al. 1995). Für diese Unterschiede gibt es zahlreiche potentielle Erklärungen (Details siehe unten).

Zur Beurteilung der entzündlichen Reaktion bestimmten wir die TNF-α Expression in beiden Versuchsgruppen. Simultan zu den bereits oben genannten Ergebnissen zeigten sich erst 36h nach Injektion signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die von Rakonczay und Marber beschriebene Schutzfunktion von Hsp72 vor akuter Pankreatitis konnte somit in unserem Experiment nicht nachgewiesen werden, wohl aber eine beschleunigte Genesung der genetisch veränderten Tiere von der Erkrankung.

Feng et al. (2010) und Rakonczay et al. (2003) beschrieben die modulierende Funktion von Hsp72 auf den Transkriptionsfaktor NF_KB und damit auf die Entwicklung und Progression einer akuten Pankreatitis. 6h nach Injektion zeigten beide Versuchsgruppen erhöhte Werte für NF_KB, die transgene Gruppe jedoch geringere als die Kontrollgruppe. Bereits nach 12h sind die Werte für die transgene Gruppe wieder ähnlich dem Ausgangszustand, die Kontrollgruppe weist hingegen das stärkste Signal im Verlauf des Experimentes auf.
Tiere, die Hsp72 überexprimieren zeigen ein deutlich verringertes NF_KB-Signal. Dieses verringerte Signal hat auch Einfluss auf nachgeschaltete Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel TNF-α und kann damit verantwortlich sein für die verkürzte Erholungszeit. In dieser Hinsicht ist zu betonen, dass die Bedeutung des NF-kB-Signalweges für die Entwicklung einer Pankreatitis durch zahlreiche Studien bestens belegt ist (Huang et al. 2013; Treiber et al. 2011)

Obwohl wir einen Unterschied hinsichtlich der Genesungszeit zwischen den Hsp72 überexprimierenden Tieren und der Kontrollgruppe ausmachen konnten, stellt sich die Frage, warum Hsp72, anders als erwartet, nicht vor der Entstehung einer akuten Pankreatitis schützt.
Eine mögliche Erklärung für diese Divergenz kann sein, dass in anderen Studien (Rakonczay et al. 2003; Kondo et al. 2012) sogenannte Präkonditionierung genutzt wurde um das Hsp72 Level zu erhöhen. Als Antwort auf diesen Reiz werden körpereigne Hitzeschockproteine (so auch Hsp72) gebildet. Diese Vorgehensweise unterscheidet sich deutlich von der von uns verwendeten Methode. Wir nutzten ein rein genetisches Modell, bei dem bereits im Ruhezustand ein Vielfaches an Hsp72 in vereinzelten Zellen nachweisbar ist. Im Wesentlichen unterscheiden sich diese Modelle darin, dass genetisch veränderte Tiere isoliert erhöhtes, körperfremdes (in unserem Fall Ratten-Hsp72) Hsp72 aufweisen, was nicht ubiquitär sondern nur in lokalen Zellen nachweisbar ist – durch Präkonditionierung hingegen werden neben dem körpereigenen Hsp72 eine Vielzahl von Co-Faktoren gebildet, welche die korrekte Funktion des Chaperons ermöglichen. So zeigten Hartl et al. 2011 den Zusammenhang zwischen der Wirkung von Hsp72 und der notwendigen Beteiligung von Co-Faktoren wie Hsp40 oder den Nukleotid-Austausch-Faktoren auf.
Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das in unserem Fall verwendete Modell und somit die isolierte Hsp72 Überexpression keine ausreichend protektive Wirkung bietet. Man kann

somit spekulieren, dass eine gleichzeitige Hochregulation von weiteren Co-Faktoren für die Schutzwirkung von Hsp72 von wesentlicher Bedeutung ist. Dieser Hypothese entsprechen auch die Daten aus transgenen Mäusen, bei denen HSF1, als zentraler Regulator der Hitzeschockanwort aktiviert ist. Diese Tiere weisen in der Regel einen deutlich stärkeren Phänotyp auf als Tiere mit einer Überexpression eines einzelnen Hitzeschockproteins (Morimoto 2008; Xiao et al. 1999).

Im Hinblick auf die zuvor beschriebene Präkonditionierung und die daraus resultierenden Veränderungen, welche quasi ein Training für den Organismus bedeuten, wurde die Idee eines weiteren Caerulein-Zyklus aufgegriffen. Die Überlegung dahinter war, die erste Injektionsabfolge als Präkonditionierung zu nutzen um eine Erhöhung der notwendigen Hsp72-Co-Faktoren zu erreichen. Die darauffolgende Injektionsreihe stellt dann den eigentlich untersuchten Krankheitsfall dar.
Die Resultate zeigten hinsichtlich dem Pankreasgewicht zu Körpergewicht und dem Serum-Lipase-Spiegel keine signifikanten Unterschiede zur ersten Versuchsreihe.
Warum in diesem Fall die Präkonditionierung keinen Nutzen zeigt ist noch unklar. Eine mögliche Ursache ist die Intensität der gewählten Methode. Caerulein löst die akute Pankreatitis aus und bedeutet damit massiven Stress. Hyperthermie stellt einen milderen Reizzustand dar und ermöglicht wahrscheinlich eine effizientere Expression von Hitzeschockproteinen. Eine andere Erklärung könnte die Tatsache sein, dass die nicht-transgenen Tiere eine doch etwas stärkere (oder zumindest länger anhaltende) Pankreatitis entwickeln und dadurch auch eine stärkere Präkonditionierung erfahren.
Eine andere mögliche Erklärung für die fehlende/gering ausgeprägte Schutzfunktion von Hsp72 in unseren Tieren könnte die Tatsache sein, dass die Überexpression lediglich in azinären Zellen beobachtet wird, die anderen Zellpopulationen aber auch eine wichtige Rolle spielen könnten. So sezernieren die Gangzellen unter anderem Bicarbonat-haltige Flüssigkeit zur Neutralisierung des sauren Magensaftes sowie Carboanhydrase-2 (Lönnerholm et al. 1985; Parkkila et al 1994) welche für die Induktion der Immunreaktion verantwortlich gemacht wird. Im Zuge einer akuten Pankreatitis durchlaufen zudem Azinuszellen eine sog. azinär-duktale Metaplasie bei der sie die Eigenschaften duktaler Zellen annehmen. Ob eine Überexpression von Hsp72 in den Gangzellen einen mehr-Nutzen hinsichtlich einer Schutzfunktion bringt, bleibt derzeit offen.

Eine weitere Ursache der fehlenden protektiven Funktion von Hsp72 in unserem Versuch könnte der ausgeprägte Zusammenhang zwischen endokrinem und exokrinem Pankreas darstellen.
Die beiden Teile der Bauchspeicheldrüse stehen sowohl anatomisch, wie auch funktionell in direkter Beziehung (Tsunoda et al. 1993) So kann eine Erkrankung des exokrinen Teils der Drüse ursächlich sein für Störungen im endokrinen Teil. Adler und Kern schrieben bereits 1975 dem Insulin eine stimulatorische Rolle bei der korrekten Funktion des exokrinen Pankreas zu. Die reine Überexpression von Hsp72 im exokrinen Teil der Drüse kann möglicherweise ein Ungleichgewicht in diesem komplexen System verursacht haben. Auch durch andere, oben zum Teil aufgelistete Mechanismen, kann eine endokrine Hsp72-Überexpression für die beobachteten Effekte bei den Präkonditionierungsstudien mitverantwortlich sein (Rakonczay et al.2003; Konto et al. 2012).
Zusammenfassend gesagt passen die von uns beobachteten Ergebnisse zu der gut etablierten stress-protektiven Wirkung von Hsp72, zeigen allerdings zugleich, dass eine (zumindest isolierte und auf einzelne Zelltypen beschränkte) Hsp72-Überexpression nur eine schwache Wirkung aufweist.

5. Zusammenfassung

Hitzeschockproteine sind multifunktionelle, stressprotektive Faktoren welche zahlreiche Funktionen im Körper übernehmen. Besonders unter Extrembedingungen, wie z.B. entzündlichen Erkrankungen oder toxischem Stress schützen sie die Zellen vor Apoptose und können damit der Krankheitsentwicklung entgegenwirken.
Das Hitzeschockprotein 72 (Hsp72) ist eines der am besten erforschten Chaperone, welches durch Stress induziert werden kann und bereits im Vorfeld seine protektive Funktion in Stresssituationen unter Beweis gestellt hat.
Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, ob die Überexpression von Hsp72 einen positiven Effekt auf die Entwicklung einer akuten Pankreatitis hat. Wir nutzten dazu einen Mausstamm, der zusätzlich zum körpereigenen Hitzeschockprotein Ratten-Hitzeschockprotein-72 exprimiert und induzierten die Pankreatitis mittels Caerulein-Injektion. Die Charakterisierung der Tiere mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und WesternBlot ergab eine signifikant erhöhte Hsp72 Expression der transgenen Tiere, die immunhistochemische Betrachtung zeigte jedoch eine isolierte Überexpression im exokrinen Teil der Drüse.
Nach Caerulein-Injektion entwickelten die transgenen Tiere und die Kontrollgruppe eine vergleichbar starke, akute Pankreatitis (AP). Im Unterschied zur Kontrollgruppe zeigten die Hsp72-überexprimierenden Tiere jedoch eine raschere Genesung von der Erkrankung. So waren die typischen histologischen Zeichen einer Entzündung, wie Ödeme, Nekrosen und Leukozyteninfiltration bei den transgenen Tieren 36 Stunden (h) nach induzierter AP deutlich reduziert. Des Weiteren konnten wir verringerte Werte von Myeloperoxidase (MPO) und Tumornekrosefaktor α (TNF-α) im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 12h bzw. 36h feststellen. Die Aktivierung von NF_KB (Nuklear-Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen) bei den transgenen Tieren war gegenüber der Kontrollgruppe weniger stark ausgeprägt.
Die protektive Wirkung von Hsp72 konnte hinsichtlich der Ausprägung einer akuten Pankreatitis nachgewiesen werden. Jedoch beruht dies vornehmlich auf beschleunigter Regeneration von der Erkrankung. Isoliertes Hsp72 vermag die Entwicklung einer akuten Pankreatitis nicht zu verhindern.

6. Literaturverzeichnis

1. Adler G, Kern HF: Regulation of exocrine pancreatic secretory process by insulin in vivo. Horm Metab Res. 7: 290-296 (1975)
2. Baskar JF, Smith PP, Nilaver G, Jupp RA, Hoffmann S, Peffer NJ, Tenney DJ, Colberg-Poley AM, Ghazal P, Nelson JA: The enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter determines cell type-specific expression in transgenic mice. J Virol. 70: 3207-3214 (1996)
3. Baumann B, Wagner M, Aleksic T, von Wichert G, Weber CK: Constitutive IKK2 activation in acinar cells is sufficient to induce pancreatitis in vivo. J Clin Invest. 117: 1502–1513 (2007)
4. Bellen HJ: Ten years of enhancer detection: lessons from the fly. Plant Cell. 11: 2271-2281 (1999)
5. Binder RJ, Blachere NE, Srivastava PK: Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. J Biol Chem. 276: 17163-1771 (2001)
6. Bruzzone R: The molecular basis of enzyme secretion. Gastroenterology. 99: 1157-1176 (1990)
7. Burkhard Göke, Christoph Beglinger (Hrsg.)
   Gastroenterologie systematisch
   UNI-MED Verlag AG, Bremen 2007, 304-336
8. Chan YC, Leung PS: Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. Pancreas 34: 1-14 (2007)
9. Clemons AP, Holstein DM, Galli A, Saunders C: Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059. Pancreas 25: 251-259 (2002)
10. Cobb MH, Goldsmith EJ: How MAP kinases are regulated. J Biol Chem. 270: 14843-14846 (1995)
11. Feng JY, Li YY: Alteration and role of heat shock proteins in acute pancreatitis. J Dig Dis. 11: 277–283 (2010)

12. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, Heinecke JW: Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. J Neurochem. 90: 724-733 (2004)
13. Gupta K, Wu B.: In the clinic: Acute pancreatitis, Ann Intern Med 153 (2010)
14. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M: Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature. 475: 324-332 (2011)
15. Hehlgans T, Pfeffer K: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology. 115: 1-20 (2005)
16. Hu G, Shen J, Cheng L, Guo C, Xu X, Wang F, Huang L, Yang L, He M, Xiang D, Zhu S, Wu M, Yu Y, Han W, Wang X: Reg4 protects against acinar cell necrosis in experimental pancreatitis. Gut 60: 820–828 (2011)
17. Huang H, Liu Y, Daniluk J, Gaiser S, Chu J, Wang H, Li ZS, Logsdon CD, Ji B: Activation of nuclear factor-κB in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice. Gastroenterology 144: 202-210 (2013)
18. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE: Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. Cell Stress Chaperones. 14: 105-111 (2009)
19. Klöppel, G., Lüttges J., Heitz, P. U. Tumoren des exokrinen Pankreas. in Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. (Hrsg) Pathologie Urban und Fischer Verlag, München Jena 2004, 807-820
20. Koedood M, Fichtel A, Meier P, Mitchell PJ: Human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early enhancer/promoter specificity during embryogenesis defines target tissues of congenital HCMV infection. J Virol. 69: 2194-2207 (1995)
21. Kondo T, Sasaki K, Matsuyama R, Morino-Koga S, Adachi H, Suico MA, Kawashima J, Motoshima H, Furukawa N, Kai H, Araki E: Hyperthermia with mild electrical stimulation protects pancreatic β-cells from cell stresses and apoptosis. Diabetes. 61: 838-847 (2012)
22. Lampel M, Kern HF: Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 373: 97-117 (1977)

23. Lindquist S: The heat-shock response. Annu Rev Biochem 55: 1151-1191 (1986)
24. Lindquist S, Craig EA: The heat-shock proteins. Annu Rev Genet. 22: 631-677 (1988)
25. Lönnerholm G, Selking O, Wistrand PJ: Amount and distribution of carbonic anhydrases CA I and CA II in the gastrointestinal tract. Gastroenterology. 88: 1151-1161 (1985)
26. Lunova M, Zizer E, Kucukoglu O, Schwarz C, Dillmann WH, Wagner M, Strnad P: Hsp72 Overexpression Accelerates the Recovery from Caerulein-Induced Pancreatitis. PLoS One. 7 (2012)
27. Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH: Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. J Clin Invest. 95: 1446-1456 (1995)
28. Morimoto RI, Transcription factors: positive and negative regulators of cell growth and disease. Curr Opin Cell Biol. 4: 480-487 (1992)
29. Morimoto RI: Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. Genes Dev. 22: 1427-1438 (2008)
30. Nam JH, Murthy S: Acute pancreatitis – the current status in management. Expert Opin Pharmacother. 4: 235-241 (2004)
31. Natori S, King A, Hellwig A, Weiss U, Iguchi H, Tsuchiya B, Kameya T, Takayanagi R, Nawata H, Huttner WB: Chromogranin B (secretogranin I), a neuroendocrine-regulated secretory protein, is sorted to exocrine secretory granules in transgenic mice. EMBO J. 17: 3277-3289 (1998)
32. Nover L: HSFs and HSPs--a stressful program on transcription factors and chaperones. Stress Proteins and the Heat Shock Response. New Biol. 3: 855-859 (1991)
33. Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA: Acute pancreatitis: bench to the bedside. Gastroenterology 132: 1127-1151 (2007)
34. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Rajaniemi H.: Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. Gut. 35: 646-650 (1994)

35. Piatelli MJ, Doughty C, Chiles TC: Requirement for a hsp90 chaperone-dependent MEK1/2-ERK pathway for B cell antigen receptor-induced cyclin D2 expression in mature B lymphocytes. J Biol Chem. 277: 12144-12150 (2002)
36. Rakonczay Z, Taka´cs T, Boros I, Lonovics J:Heat shock proteins and the pancreas. J Cell Physiol. 195: 383–391 (2003)
37. Ritossa P: Problems of prophylactic vaccinations of infants. Riv Ist Sieroter Ital. 37: 79-108 (1962)
38. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487–491 (1988)
39. Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI: Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. Mol Cell Biol. 13: 1392-1407 (1993)
40. Schnaider T, Somogyi J, Csermely P, Szamel M: The Hsp90-specific inhibitor geldanamycin selectively disrupts kinase-mediated signaling events of T-lymphocyte activation.
Cell Stress Chaperones. 5: 52-61 (2002)
41. Song JM, Liu HX, Li Y, Zeng YJ, Zhou ZG, Liu HY, Xu B, Wang L, Zhou B, Wang R: Extracellular heat-shock protein 70 aggravates cerulein-induced pancreatitis through toll-like receptor-4 in mice. Chin Med J (Engl). 121: 1420-1425 (2008)
42. Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL: Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. Immunity. 8: 657-665 (1998)
43. Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB: Intermediate filaments take the heat as stress proteins. Trends Cell Biol. 20: 79-91 (2010)
44. Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B: Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. J Biol Chem. 264: 7466-7472 (1989)

45. Treiber M, Neuhöfer P, Anetsberger E, Einwächter H, Lesina M, Rickmann M, Liang S, Kehl T, Nakhai H, Schmid RM, Algül H: Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis. Gastroenterology 141: 1473-1485 (2011)
46. Tsunoda Y, Owyang C: Differential involvement of phospholipase A2 /arachidonic acid and phospholipase C/phosinositol pathways during cholecystokinin receptor activated Ca2+-oscillations in pancreatic acini. Biochem Biophys Res Com. 194: 1194-1202 (1993)
47. Westerheide SD, Morimoto RI: Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. J Biol Chem. 280: 33097-33100 (2005)
48. Westwood JT, Wu C: Activation of Drosophila heat shock factor: conformational change associated with a monomer-to-trimer transition. Mol Cell Biol. 13: 3481-3486 (1993)
49. Wright CA, Kozik P, Zacharias M, Springer S: Tapasin and other chaperones: models of the MHC class I loading complex. Biol Chem. 385: 763-778 (2004)
50. Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, Benjamin IJ: HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. EMBO J. 18: 5943-5952 (1999)

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsnummer	Abbildungsinhalt	Seite
1	pCAGGS-Konstrukt	21
2	Genotypisierung der Versuchstiere	38
3	Hsp72 in den Darmabschnitten	39
4	Hsp72 in der Leber	40
5	In Situ Hybridisierung	41
6	Immunhistochemische Färbung	42
7	Quantifizierung der Hsp72 Überexpression	43
8	Auswirkung von Hsp72 auf andere Chaperone	44
9	Serum-Lipase	46
10	Histologische Betrachtung	47-48
11	Morphometrische Auswertung	49-50
12	Wassergehalt des Pankreas	51
13	Relative MPO	52
14	TNF-α	53
15	PCNA	54
16	Hsp72 Level während Pankreatitis	55-56
17	NF_KB – Aktivierung	57
18	Wiederholte Caerulein-Exposition	59
19	Histologische Betrachtung (L-Arginin)	60
20	Morphometrische Auswertung (L-Arginin)	61-62
21	Wasser- und Lipasegehalt des Pankreas (L-Arginin)	63

Tabellenverzeichnis

Tabellennummer	Tabelleninhalt	Seite
1	Einteilung der Hitzeschockproteine	7
2	Ablauf und Reaktionsbedingungen PCR	25
3	Reaktionsansatz für PCR	25
4	Qualität der isolierten RNA	30
5	Zusammensetzung SDS-Gel	34
6	Western Blot – Antikörper-Übersicht	35
7	H.E. – Färbung	36
8	Immunfluoreszenz – Antikörper-Übersicht	37

Danksagung

Ich danke Herrn *Dr. Pavel Strnad* für die Möglichkeit diese Dissertationen in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Die Betreuung seinerseits war durchweg zuverlässig und kompetent. Er war stets engagiert und motivierte mich in vielen Situationen diese Arbeit voran zu bringen.

Von ganzem Herzen danken möchte ich *Dr. Mariia Lunova* für ihre liebenswerte Betreuung während des praktischen Teils im Labor und darüber hinaus.
Mariia, thank you so much for your patiently and loveable support. It was a pleasure to meet you and to win a new friend.

Ein großes Dankeschön geht auch an *Elke Preiß* und *Claudia Längle*, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, das Chaos überblickten und für eine wunderbare Stimmung im Labor sorgten.
Auch allen anderen, teilweise ehemaligen, Mitgliedern der AG Strnad möchte ich auf diesem Wege meinen Dank aussprechen – Danke *Peggy*, für die unheimlich lustigen und inspirierenden Gespräche während der Arbeitszeit und deine Unterstützung bei der finalen Gestaltung. Thank you *Valentin, Yu* and *Nurdan* for helping me with my thesis and for improving my english.

Mein besonderer Dank geht an meine *Familie*. Danke an meine *Eltern*, die mich mein ganzes Leben lang liebevoll gefördert, alle meine Entscheidungen unterstützt und mich stets seelisch-moralisch getragen haben.
Meinem *Mann* möchte ich danken, weil er immer an mich glaubt, für seine bedingungslose Unterstützung und seine Aufmunterungen.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Zuname	Carolin Gonzior
Geburtsname	Schwarz
Geburtsdatum	1988
Geburtsort	Erlabrunn

SCHULISCHER WERDEGANG

1995 – 1999	Grundschule Beierfeld
1999 – 2007	Bertolt-Brecht-Gymnasium, Schwarzenberg

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

2008	Beginn des Zahnmedizinstudiums an der Universität Ulm
2011	Physikum
2013	Abschluss Staatsexamen

BERUFLICHER WERDEGANG

2014-2016	Assistenzzahnärztin bei ZAP Kaiser, Zwönitz
seit 2016	Zahnärztin bei ZAP Kaiser, Zwönitz