

Aus dem Institut für experimentelle Hepatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. D. Häussinger

Frühe Wirkungen der caerulein-induzierten
Pankreatitis auf die Tight-Junctions der
Azinuszellen bei der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

M A R I O E C K E R T

2 0 0 6

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. B E R N D N Ü R N B E R G (Dekan)

Referent: PD Dr. med. R E I N H A R D L Ü T H E N

Korreferent: PD Dr. med. M A T H I A S C O H N E N

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	4
I.1 Das Pankreas	4
I.2 Die Pankreatitis	4
I.3 Tight-Junctions	6
I.4 Proteine der Tight-Junctions.....	7
I.5 Die Signaltransduktion im exokrinen Pankreas.....	10
I.6 Die Inhibition von Calcium, Proteinkinase C und MAP-Kinasen im Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis	11
I.7 Fragestellung	14
II Materialien und Methodik	16
II.1 Versuchstiere und Futter	16
II.2 Chemikalien und Materialien	16
II.3 Isolierung und Stimulation pankreatischer Azinuszellen	16
II.4 Induktion einer akuten Pankreatitis.....	17
II.5 Immunhistochemie und Immunzytochemie	18
II.5.1 Immunzytochemie (In-vitro-Modell).....	18
II.5.2 Immunhistochemie (In-vivo-Modell).....	19
II.6 Inhibition intrazellulärer Signalwege	19
II.7 Konfokale Lasermikroskopie	20
II.8 Western Blot.....	20
II.9 Biochemische Messungen	21
II.9.1 Messung der Amylase	21
II.9.2 Messung der Lipase.....	22
II.10 Statistische Auswertung	23
III Ergebnisse	24
III.1 Immunzytochemische Untersuchungen von Tight-Junction-Proteinen isolierter pankreatischer Azini der Maus nach In-vitro-Stimulation mit Caerulein	24
III.2 Immunhistochemische Untersuchungen von Tight-Junction-Proteinen pankreatischer Azini der Maus nach In-vivo-Stimulation mit Caerulein.....	26
III.2.1 Tight-Junction-Proteine/F-Aktin nach Stimulation mit 0,25 µg Caerulein/kg KG/h	26
III.2.2 Tight-Junction-Proteine/F-Aktin nach Stimulation mit 50 µg Caerulein/kg KG/h	27

III.3 Western Blot-Analyse von Tight-Junction-Proteinen isolierter pankreatischer Azini der Maus nach In-vivo-Stimulation mit Caerulein	28
III.4 Pankreasenzyme der Maus nach In-vivo-Stimulation mit Caerulein.....	29
III.4.1 Serumentzymaktivität der Amylase	29
III.4.2 Serumentzymaktivität der Lipase	30
III.5 Inhibition intrazellulärer Signalwege und ihr Effekt auf die Struktur der Tight-Junction-Proteine des exokrinen Pankreas der Maus bei In-vitro-Stimulation mit Caerulein	31
IV Diskussion.....	32
IV.1 Methodische Diskussion.....	32
IV.1.1 Die tierexperimentelle akute Pankreatitis	32
IV.1.2 Synopse zu bekannten initialen Ereignissen im Modell der caerulein-induzierten akuten Pankreatitis.....	35
IV.2 Thematische Diskussion	37
IV.2.1 Die Bedeutung der Tight-Junctions im exokrinen Pankreas	37
IV.2.2 Die Bedeutung der einzelnen Tight-Junction-Proteine im Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis	40
IV.2.3 Die Signaltransduktion im Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis....	47
V Zusammenfassung.....	53
Anhang.....	54
Abkürzungen.....	55
Literaturverzeichnis	57
Verzeichnis der Chemikalien.....	74
Abbildungsverzeichnis.....	75
Farbtafeln	76

I Einleitung

I.1 Das Pankreas

Das Pankreas ist eine gemischt exokrin-endokrine Drüse. Seine Enzyme bewirken die Spaltung und Verdauung von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen im Dünndarm und seine Hormone regulieren den Kohlenhydrathaushalt. Der exokrine Anteil des Pankreas ist eine rein seröse Drüse; seine funktionellen Endstücke bilden die Azini (Abb. 1), in denen ein Verdauungsssekret gebildet wird, von dem täglich zwei Liter in das verzweigte Gangsystem der Drüse und von dort in das Duodenum sezerniert werden [Klinke/Silbernagel 2001]. Dieses Sekret besteht hauptsächlich aus inaktiven Proenzymen wie Trypsinogen, Proelastase, Prokarboxypeptidase und Prophospholipase, die erst im Zwölffingerdarm in ihre aktive Form hydrolysiert werden. Jedoch sind auch bereits aktive Enzyme wie Amylase, Lipase und Ribonuklease enthalten. Insgesamt produziert das Pankreas eine etwa zehnfach höhere Enzymmenge als für eine ausreichende Verdauungsfunktion erforderlich ist [Schmidt/Thews/Lang 2000].

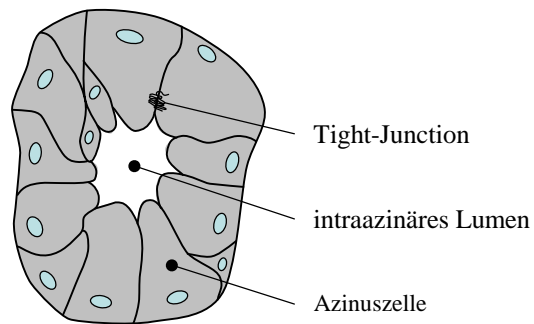


Abb.1: Pankreatischer Azinus
(Entwurf und Darstellung: M.E.)

I.2 Die Pankreatitis

Pathologische entzündliche Veränderungen der Bauchspeicheldrüse in Form von Hämorrhagie und disseminierter Fettnekrose sind bereits seit 1889 bekannt [Fitz 1889]. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Selbstverdauung des exokrinen Pankreas der pathophysiologische Grundmechanismus der Pankreatitis ist. Patienten, die an einer Episode einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis gestorben sind, sollen „ihrem eigenen digestivem Reichum unterlegen sein“ [Chiari 1891].

Am Anfang der akuten Pankreatitis sind primär die Azinuszellen betroffen. In diesen entwickelt sich eine Dysbalance von Segregation, Transport, Exozytose und Aktivierung der digestiven Enzyme [Lüthen et al. 1995, Adler et al. 1982, Saluja et al. 1985]. Hierbei resultiert eine frühzeitige intraazinäre Aktivierung der pankreatischen Verdauungsenzyme und diese Aktivierung beinhaltet die Gefahr der Selbstverdauung von Gewebsanteilen bis hin zur Nekrosebildung und zur vollständigen Zerstörung des Organs [Otsuki et al. 2002, Nagai et al. 1989, Niederau/Lüthen 1997].

Neben der vorzeitigen intraaziniären Aktivierung von Trypsin und anderen Enzymen werden bei der Entzündung des exokrinen Pankreas weitere Mechanismen frühzeitig in Gang gesetzt, beispielsweise werden Zytokine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren mobilisiert und es entstehen freie Radikale [Leach et al. 1991, Schulz et al. 1999, Denham et al. 1997, Steinle et al. 1999, Grady et al. 1997, Konturek et al. 1992]. Ihnen allen kommt nicht nur für das lokale Krankheitsbild sondern auch für die Entstehung sekundärer systemischer Komplikationen eine pathogenetische Relevanz im Entzündungsverlauf zu [Klar/Werner 2000, Frossard et al. 2003].

Die bedeutendsten Risikofaktoren, die zur Entstehung der Entzündung führen, sind Gallensteine und Alkoholabusus [Dietze/Delforge 2002, Niederau/Lüthen 1997]. Weniger häufige Ursachen sind Stoffwechsellentgleisungen wie Hypercalcämie oder Hypertriglyceridämie, sowie pharmakologische Wirkstoffe wie Azathioprin, Mercaptopurin und Didanosin, traumatische, genetische oder auch idiopathische Faktoren [Mitchell et al. 2003, Steinberg/Tenner 1994]. Die Inzidenz der akuten Pankreatitis liegt jährlich etwa bei bis zu 46 Fällen pro 100.000 Einwohnern, dies mit einer Letalität von unter 1% bei akut ödematöser und 10 bis 24% bei hämorrhagisch-nekrotisierender Pankreatitis [Mayerle/Lerch 2001]. Eine spezifische Therapie der Erkrankung ist nicht bekannt. Meist erfolgt sie konservativ und bei sehr akuten Verläufen durch intensive Überwachung des Patienten, um Komplikationen zu vermeiden und rechtzeitig zu erkennen [Dugernier et al. 2003, Nam/Murthy 2003, Otsuki et al. 2002].

Experimentell lässt sich mittels Caerulein, einem Analogon des neurohumoralen Botenstoffs Cholezystokinin, beim Säugetier das Bild der humanen ödematösen Pankreatitis hervorrufen und dadurch ihre frühe Pathologie im Tiermodell untersuchen [Lampel/Kern 1977, Niederau et al. 1990]. Mit Hilfe dieses Modells zeigt sich, dass 30 Minuten nach CCK-Stimulation das Volumen des durch die Pankreasgänge strömenden Pankreassekrets abnimmt [Adler et al. 1982] und dass nach Ablauf von 60 Minuten das Organparenchym ödematös aufquillt [Grady et al. 1996]. Diese pathologischen Mechanismen können darin begründet liegen, dass sich die Permeabilität zwischen den Azinusgängen und dem interstitiellen Drüsengewebe erhöht, indem sich die durch Tight-Junctions (TJ) gebildete parazelluläre Barriere öffnet und hierdurch vorzeitig aktiviertes Verdauungsssekret aus den Ganglumina ins parazelluläre Azinusgewebe eindringen kann [Akao et al. 2000, Lüthen et al. 1993, Fallon et al. 1995] (Abb. 1 und 2).

I.3 Tight-Junctions

Tight-Junctions (TJ), Zonulae occludentes, sind zellverbindende Strukturen und damit neben den Zonulae adherentes und den Maculae adherentes Teil des epithelialen junctionalen Komplexes [Farquhar/Palade 1963, Staehelin 1974]. Sie befinden sich in epithelialen und endothelialen Zellen am apikalen Ende der lateralen Membran. Dabei formen sie extrazellulär enge Zell-Zell-Kontakte zwischen den Plasmamembranen benachbarter Zellen und bilden zusätzlich intrazellulär die Grenze zwischen den apikalen und basolateralen Membrananteilen [Powell 1981].

Mit Hilfe elektronenmikroskopisch betrachteter Ultradünnschnitte wurden TJ erstmals 1963 als interzelluläre Kontakte erkannt. Bei dieser Untersuchung wurden sie als aneinander gereihte, punktförmige, interzelluläre Verschmelzungen sichtbar, die den äußeren Spalt der Plasmamembranen umgeben [Farquhar/Palade 1963]. In Gefrierbruchschnitten erscheinen TJ als Serien ununterbrochener, miteinander verbundener Stränge, die im äußeren zytoplasmatischen (intramembranösen) und im inneren extrazytoplasmatischen (intermembranösen) Zwischenraum lokalisiert sind [Staehelin 1974]. Die Zonulae occludentes formen hierdurch nicht nur Zell-Zellkontakte, sondern bilden aus diesen miteinander kommunizierenden Strängen ein Netzwerk, das den interzellulären Raum verschließt [Mitic et al. 1998] (Abb. 2).

Die wichtigste Funktion dieses Verschlusses ist die Abdichtung des parazellulären Raumes zwischen den einzelnen Zellen (Grenzfunktion). Hierbei bilden TJ eine semipermeable Diffusionsbarriere und regulieren selektiv die Passage von Wasser, gelösten Teilchen und Immunzellen [Madara 1998, Fanning et al. 1999]. Innerhalb der Zellen limitieren TJ zudem als intramembranöse Barriere die Diffusion von Lipiden und Proteinen zwischen den apikalen und den basolateralen Anteilen der äußeren Plasmamembran (Zaunfunktion) [Dragsten et al. 1981, van Meer/Simons 1986].

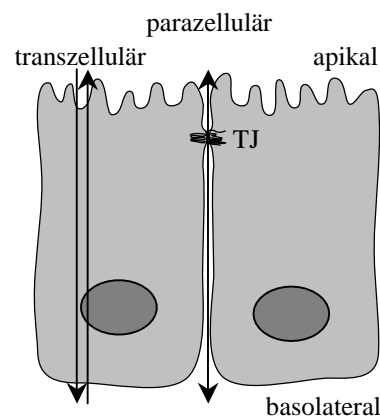


Abb.2: Tight-Junctions zwischen benachbarten Azinuszellen (nach Anderson 2001)

TJ haben zudem an der Entstehung von Zelloberflächenpolarität wesentlichen Anteil; dies nicht nur aufgrund der von ihnen aufrechterhaltenen selektiven Permeabilitätsbarriere [Cereijido et al. 1998, van Der Wouden et al. 2003], sondern auch dadurch, dass eine positive, exponentielle Korrelation zwischen der Anzahl der oben beschriebenen TJ-Stränge und dem elektrischen Widerstand an der apikalen Zellmembran besteht [Claude

1978, González-Mariscal et al. 2003]. Zunehmend werden weitere Funktionen der TJ bekannt, die über die ledigliche Verschlussfunktion hinausgehend signalvermittelnde Prozesse beispielsweise hinsichtlich Zellwachstum und Zelldifferenzierung beinhalten [Gonzalez-Mariscal/Nava 2005].

Die Aufgaben der TJ sind zum einen vom elektrischen Widerstand an der Zellmembran und von dem dort vorliegenden osmotischen und hydrostatischen Druck abhängig [Powell 1981] und werden außerdem durch signalvermittelnde Botenstoffe wie beispielsweise Calcium (Ca^{2+}) oder MAP-Kinasen (mitogen activated protein kinases) reguliert [Cerejido et al. 1998, van Der Wouden et al. 2003]. Nach Stimulation mit CCK steigt der intrazelluläre Calciumspiegel bereits innerhalb weniger Sekunden an [Niederau et al. 1999]; die MAPK 1 und -2 erreichen innerhalb von fünf Minuten nach Stimulation ihr Aktivitätsmaximum [Duan et al. 1994]. Diese Botenstoffe können somit sehr rasch eine Wirkung auf die TJ und ihre Proteine entfalten.

Zum anderen variiert das Ausmaß der durch die TJ kontrollierten Permeabilität je nach Art der Epithelbeschaffenheit und kann sich auch durch physiologische und durch pathologische Stimuli wie beispielsweise die Anwesenheit von Zytokinen, Leukozyten, einer erhöhten Glucosekonzentration an der Zellmembran oder auch durch Ethanol verändern [Bentzel et al. 1991, Nusrat et al. 2000a, Rotoli et al. 2004].

Ebenso wie in anderen Organen haben die TJ des exokrinen Pankreas die Funktion luminale Inhalte – hier Verdauungsssekret in den Azinuszgängen – von interstitiellen Kompartimenten zu trennen. Bei dieser Aufgabe unterliegen die TJ und ihre Proteine einer morphologischen Dynamik, die nicht zuletzt auch von dem einwirkenden Stimulus abhängt und auf die im weiteren Text noch eingegangen wird [Lerch et al. 1997, Akao et al. 2000].

I.4 Proteine der Tight-Junctions

Die Zonulae occludentes sind ein Komplex verschiedener miteinander assoziierter und interagierender Proteine [González-Mariscal et al. 2003]. Ihr Aufbau differenziert sich in transmembranäre Anteile, von denen Occludin, die Familie der Claudine sowie JAM (junctional adhaesion molecule) bekannt sind und dem Komplex zugeordnete, zytoplasmatische Proteine. Zu den letztgenannten gehört neben anderen die Gruppe der ZO-Proteine (Zonulae Occludentes) [Fanning et al. 1999].

In dieser Arbeit gilt das Interesse vor allem den beiden Proteinen Claudin-1 und Occludin. Durch ihre transmembranären und extrazellulären Anteile sind sie für die Aufgaben der Zonulae occludentes besonders bedeutsam [Mitic et al. 2000, Anderson/van Itallie 1999]. Gleichzeitig werden zudem die Proteine ZO-1 und F-Aktin betrachtet, damit wei-

tere Bestandteile der TJ Berücksichtigung finden. Sie alle seien an dieser Stelle kurz vorgestellt:

Occludin ist das transmembranöse Protein der Zonulae occludentes, das zuerst beschrieben worden ist [Furuse et al. 1993]. Kurze Zeit nach seiner Entdeckung in der Leber des Huhns wurde dieses Protein, welches je nach Spezies aus ca. 520 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa hat, als Bestandteil in verschiedenen epithelialen und endothelialen Zellen von Säugetieren, auch beim Menschen, nachgewiesen [Ando-Akatsuka et al. 1996, Hirase et al. 1997, Kevil et al. 1998]. Occludin setzt sich aus zwei extrazellulären Schleifen, vier transmembranären und drei zytoplasmatischen Domänen zusammen. Die zytoplasmatischen Anteile enden mit einem langen COOH-terminalen und einem kurzen NH₂-terminalen Bereich; dazwischen befindet sich ein kurzer intrazellulärer Bogen [Furuse et al. 1993] (Abb. 3). Die erste extrazelluläre Schleife von Occludin besitzt einen hohen Gehalt von Tyrosin und Glycin und ist vermutlich an der Interaktion sich gegenüberliegender Zellen wesentlich beteiligt [Ando-Akatsuka et al. 1996].

Claudine bestehen ebenso wie Occludin aus vier transmembranären Domänen, zwei extrazellulären Schleifen und je einem COOH- bzw. NH₂-terminalen zytoplasmatischen Ende. Mit einer Molekülmasse von 22-24 kD und der Zusammensetzung aus ca. 211-230 Aminosäuren sind sie allerdings wesentlich kleiner als Occludin [Furuse et al. 1998] (Abb. 3). Claudin-1 und -2 sind die zuerst beschriebenen Proteine einer ganzen sogenannten Claudin-Familie, von der zur Zeit etwa 20 verschiedene Proteine bekannt sind. Die verschiedenen Claudine unterscheiden sich voneinander durch ihre Aminosäuresequenzen (vor allem in den transmembranären Domänen) und durch variierende funktionelle Charakteristika. Sie sind in den verschiedenen Organen in unterschiedlicher Verteilung und Häufigkeit vorhanden [Morita et al. 1999, Mitic et al. 2000]. Wahrscheinlich werden durch diese Variationen die organspezifischen Aufgaben der TJ in den jeweiligen Epithelien ermöglicht [Heiskala et al. 2001].

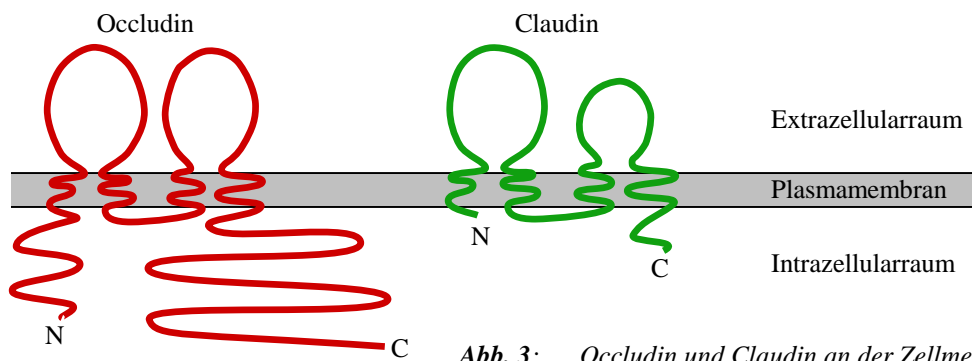


Abb. 3: Occludin und Claudin an der Zellmembran (nach Tsukita et al. 1999)

Eine Reihe zytoplasmatischer Proteine bildet einen intrazellulären Unterbau für die transmembranären Anteile der TJ. Aus ihnen entsteht ein Gerüst, das transmembranäre und zytoplasmatische Regulationen verbindet und das für zielgerichteten Transport und Zellpolarität verantwortlich ist [Madara 1998, Valentijn et al. 1999, Fanning/ Anderson 1999] (Abb. 4).

Das zuerst entdeckte TJ assoziierte Protein war ZO-1 mit einer Molekülmasse von 220 kD [Stevenson et al. 1986]. Neben ZO-2 (mit 160-kD) [Jesaitis/Goodenough 1994] und ZO-3 (mit 130 kD) [Haskins et al. 1998] gehört es zu der Gruppe der sogenannten MAGUK-Proteine (membrane-associated guanylate kinase). Es hat direkten Kontakt zu verschiedenen Proteinen der TJ, so auch zu Occludin und Claudin-1 und zum Zytoskelett [Fanning et al. 2002, Furuse et al. 1994, Itoh et al. 1999]. Als Phosphoprotein ist ZO-1 über diese Verbindungen an der Regulation von TJ-Funktionen, vermutlich auch an der Regulation der parazellulären Barriere, beteiligt [González-Mariscal et al. 2003]. ZO-1 kolokalisiert in der immunhistochemischen Mikroskopie mit den TJ [Willott et al. 1992].

F-Aktin, ein zytoskelettales Protein, ist überwiegend apikal und zu einem geringeren Teil basolateral unterhalb der Plasmamembran lokalisiert [Torgerson/McNiven 1998]. Wie ein kontraktile Ring umgibt es die apikolateralen peripheren Membranstrukturen Adhaerens Junctions und TJ [Hirokawa/Tilney 1982, Madara 1987] und steht dabei mit verschiedenen TJ-Proteinen in direkter Verbindung [Wittchen et al. 1999, Fanning et al. 2002]. Kontraktile Elemente des Zytoskeletts sollen durch ihre Bewegungskräfte Einfluss auf ZO-1 und dadurch auf die parazelluläre Barriere ausüben können [Nusrat et al. 1995, Madara 1998].

Mittels immunhistochemischer Anfärbung findet sich in pankreatischen Azinuszellen 30 Minuten nach Stimulation mit Caerulein ein Strukturverlust von ZO-1 und F-Aktin. In Folge erhöht sich zwischen Azinusganglumina und Interstitium die Permeabilität [Fallon et al. 1995]. Damit ein Verlust der parazellulären Grenzfunktion einsetzt, muss jedoch zuvor eine Modifikation der transmembranären TJ-Proteine Occludin und Claudin erfolgt sein, denn es sind die extrazellulären Schleifen dieser beiden Proteine, welche den parazellulären Raum abdichten [González-Mariscal et al. 2003].

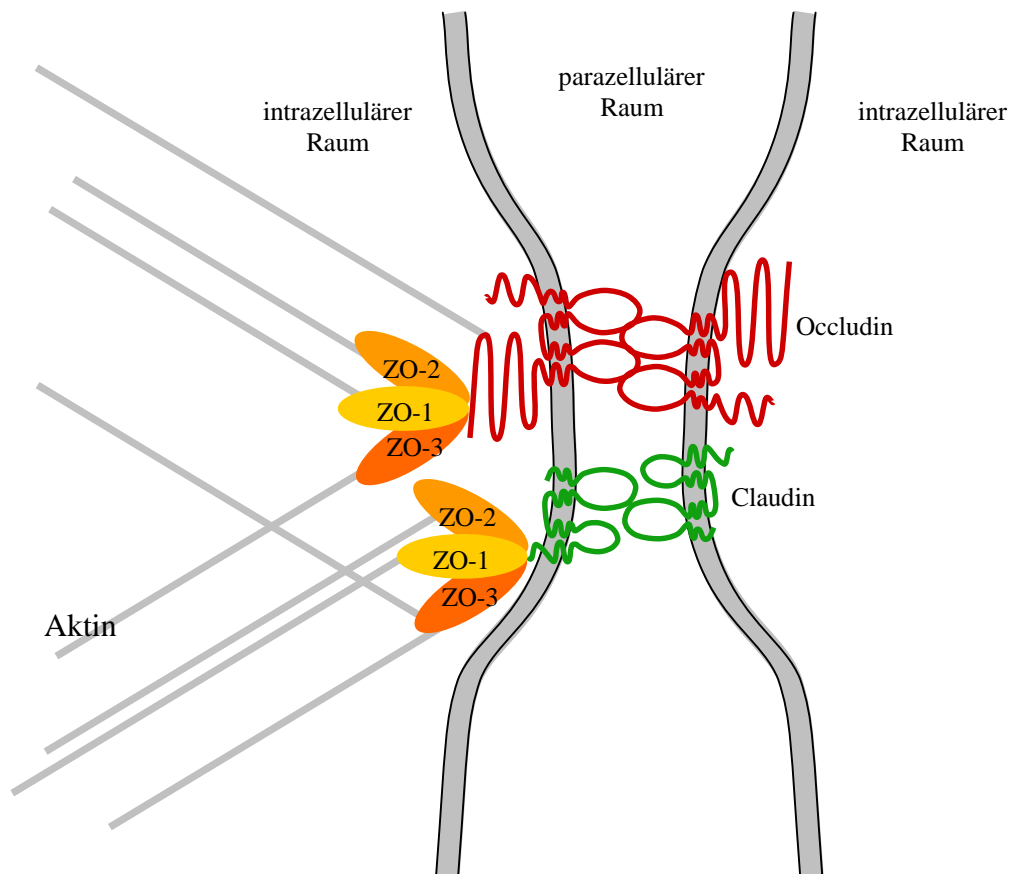


Abb.4: Schematischer Aufbau des Tight-junction-Komplexes
(nach Fanning et al. 1999)

I.5 Die Signaltransduktion im exokrinen Pankreas

Eine intrazelluläre Signalkaskade ist für die Entstehung der caerulein-induzierten Pan-
kreatitis verantwortlich und bestimmt die nachfolgende Entzündungsreaktion des Organs.
Neben anderen sind hierbei die Informationsträger Calcium (Ca^{2+}), die Proteinkinase C
(PKC) und die Gruppe der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK) beteiligt [Willi-
ams 2001]. Alle drei sind zudem an der Regulation der parazellulären Permeabilität und
somit der Funktion der TJ involviert (Abb. 5).

Ca^{2+} ist als second messenger für die exokrine Funktion der Bauchspeicheldrüse von gro-
ßer Bedeutung [Bruzzone 1990, Koh et al. 2000]. Cholezystokinin (CCK) bewirkt über
einen Inositoltriphosphat-(IP_3)-Rezeptor gesteuerten Kanal die Freisetzung von Ca^{2+} -Io-
nen insbesondere aus dem endoplasmatischen Retikulum und den Einstrom extrazellu-
lären Calciums durch die Plasmamembran [Williams/Blevins 1993, Klonowski et al.
1997]. Niedrige Konzentrationen bewirken über einen weiteren CCK-Rezeptor (mit hoher
Affinität) Ca^{2+} -Oszillationen. Diese unterliegen dabei über die vorherrschende intra-
zelluläre Ca^{2+} -Konzentration einem Feedback-Mechanismus [Williams 2001, Lankisch et
al. 1999, Mogami et al. 1998]. Eine erhöhte Konzentration des freien zytosolischen Ca^{2+}

ist ein Startsignal für die frühzeitige Aktivierung von Trypsin und kann die Aktivierung anderer pankreatischer Verdauungsenzyme einleiten [Lüthen et al. 1994, Niederau et al. 1999].

Ca²⁺ reguliert ebenso die Funktion der parazellulären Barriere [Denker/Nigam 1998, Kasab et al. 2002]; es beeinflusst die Bildung von Zell-Zellkontakten, die Lokalisation und den Einbau der TJ in die Zellmembran und den Erhalt des transepithelialen Widerstands [Stuart et al. 1996, Gonzalez-Mariscal et al. 1990]. Die akute Hypercalcämie ist ein Risikofaktor für die Entstehung der akuten und chronischen Pankreatitis [Niederau et al. 1999]; zwischen pankreatischen Gangzellen begünstigt sie einen Anstieg der Permeabilität für Moleküle bis hin zur Größe der Verdauungsenzyme [Cates et al. 1988].

Es existieren verschiedene PKC-Isoenzyme. Die meisten von ihnen sind Ca²⁺- und phosphoproteinabhängige Enzyme. Die PKC-Enzyme leiten selbst mittels Phosphorylierung anderer Proteine intrazelluläre Signale weiter [Bruzzone 1990, Nishizuka 1986]. Sie modulieren hierdurch verschiedene Zellfunktionen wie Exozytose und Zellproliferation [Koh et al. 2000, Raffaniello et al. 1998]. Bereits geringe Dosen von Caerulein können im exokrinen Pankreas die PKC aktivieren und lösen dadurch eine Translokation des Enzyms vom Zytosol in die membranösen Zellanteile aus [Bruzzone et al. 1988]. Durch die Phosphorylierung von Occludin und ZO-1 sind Proteinkinasen auch an der Regulation der parazellulären Permeabilität beteiligt [Andreeva et al. 2001, Clarke et al. 2000].

Die Gruppe der MAP-Kinasen ist wie die anderen oben beschriebenen Botenstoffe Teil der zellulären Signalkaskaden, die Zellprozesse kontrollieren. Die MAPKs partizipieren an Zellwachstum und Zelldifferenzierung [Williams 1997, Malarkey et al. 1995].

Es wird angenommen, dass MAPKs regulatorische Funktionen bei der CCK-Pankreatitis übernehmen [Williams 2001, Wagner et al. 1999]. Die Aktivierung der Untergruppe MEK1 (mitogen activated protein kinase) löst in MDCK-Zellen (madine darby canine kidney) Aufreißen und Dislokation der Occludin-Strukturen, jedoch nicht von ZO-1, aus [Chen et al. 2000].

I.6 Die Inhibition von Calcium, Proteinkinase C und MAP-Kinasen im Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis

Der Calciumchelator 1,2-Bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N,N-Tetraessigsäure (BAPTA) bindet intrazellulär frei vorhandenens Calcium. Zur Permeation durch die Zellmembran ist zuvor eine Vorinkubation erforderlich [Tsien et al. 1980]. Werden pankreatische Azinuszellen mit einer Konzentration von 10⁻⁹ mol/l Caerulein stimuliert, bewirkt dies, infolge des hierdurch induzierten Calciumanstiegs, die Aktivierung von Trypsin und die Bildung von Vakuolen am apikalen Zellpol. Eine 30 minütige Vorinkubation der Azinus-

zellen in BAPTA-haltigem Medium (in einer Konzentration von 5 μM) führt dazu, dass der intrazelluläre Calciumanstieg erheblich reduziert wird. Auch bleibt die anschließende Plateauphase des Calciumspiegels aus (dem schnellen Calciumanstieg folgt ein allmählicher Konzentrationsabfall, nach welchem sich der intrazelluläre Calciumspiegel zunächst auf einem über dem Ausgangswert liegendem Plateau einpendelt). Durch die Hemmung des intrazellulären Calciumanstiegs kommt es nach der Vorinkubation mit BAPTA nicht zur Aktivierung von Trypsin und ebenso bleibt die signifikante Zunahme der Vakuolenbildung am apikalen Zellpol aus [Raraty et al. 2000].

BAPTA verhindert auch den Calciumanstieg, wenn dieser durch freie Radikale induziert wird, welche in pankreatischen Azinuszellen durch die Oxidation von Hypoxanthin entstehen [Vorinkubation 30 min, Konzentration 5 μM]. Die durch Radikale hervorgerufenen Zellschäden – Aufnahme von Trypanblau aufgrund Schädigung der Zellmembranen, Freisetzung von Lactatdehydrogenase und Abfall der Konzentration von Adenosintri-phosphat (ATP) – werden durch den Calciumchelator deutlich reduziert [Klonowski et al. 1997].

Das calciumabhängige PKC-Isoenzym PKC- α wird durch GÖ6976 inhibiert. Die Aktivität Calcium unabhängiger PKC wird von diesem Inhibitor nicht betroffen [Wenzel-Seifert et al. 1994]. In pankreatischen Azinuszellen kann mittels GÖ6976 und somit der Hemmung der PKC- α (bei einer Konzentration von 100 nM) die Zellproliferation inhibiert werden [Raffaniello et al. 1998]. Untersuchungen, inwiefern die PKC- α an der frühen Pathophysiologie der caerulein-induzierten Pankreatitis involviert ist und wie sich hierbei die Hemmung dieses Isoenzym durch GÖ6976 auswirkt, liegen zur Zeit nicht vor.

PD98059 ist zellpermeabel und inhibiert MEK1 und -2. Dadurch wird selektiv die Phosphorylierung von ERK1 und -2 und der ihnen nachfolgenden Substrate blockiert [Reiners et al. 1998]. Bei In-vivo-Versuchen, in denen Mäusen hohe Dosen Caerulein (5 $\mu\text{g/kg KG/h}$) und 30 min zuvor PD98059 intraperitoneal injiziert wird, bleibt die aktivierte Menge von ERK1 und -2 erheblich reduziert. Es resultiert hierdurch eine Reduktion des interstitiellen Ödems, hiermit einhergehend auch des Pankreasfeuchtgewichtes und eine signifikante Abnahme der Serumamylaseaktivität im Vergleich zu den Kontrollen ohne Hemmstoffapplikation [Clemons et al.].

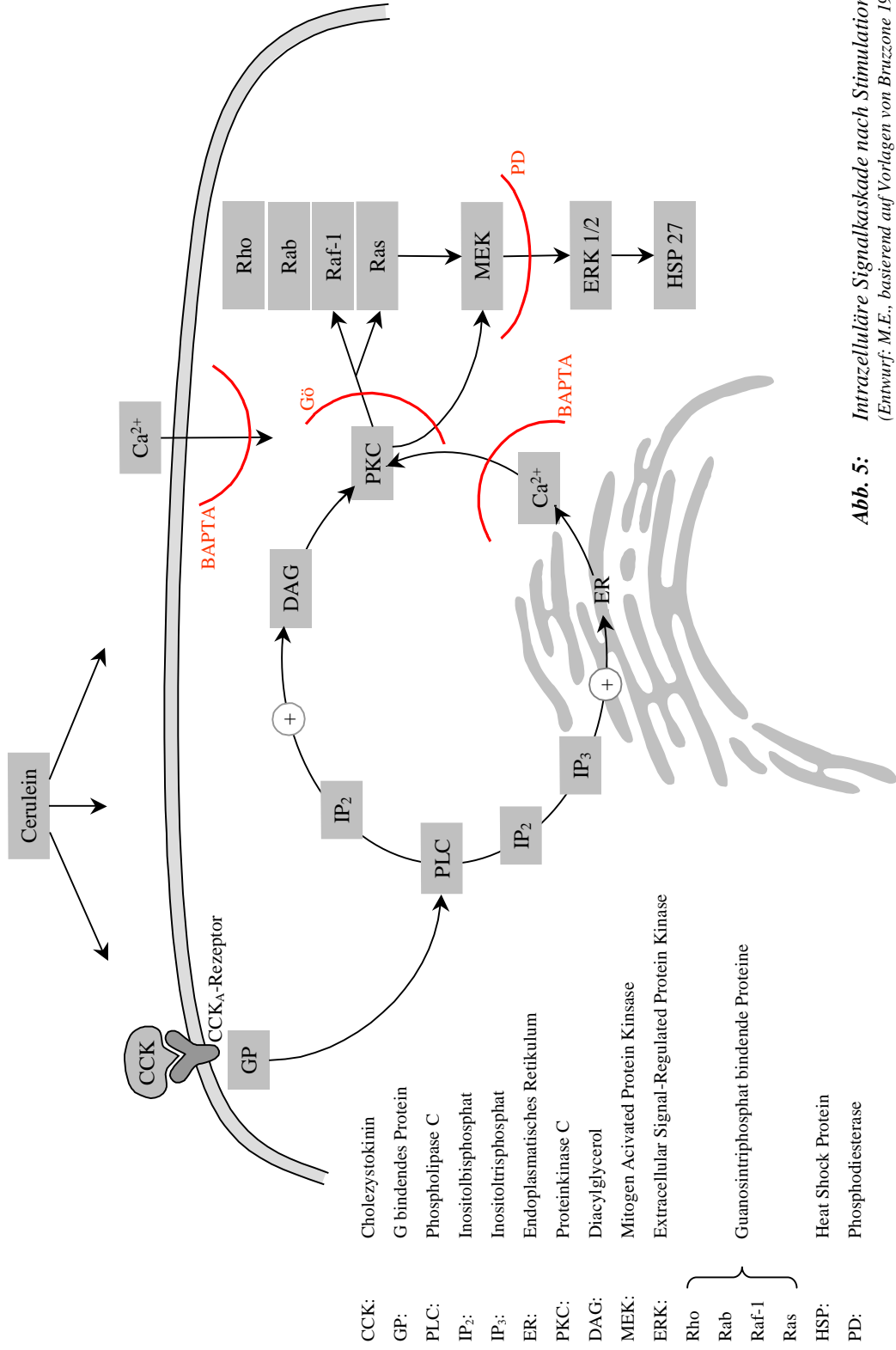


Abb. 5: Intrazelluläre Signalkaskade nach Stimulation mit Caerulein
 (Entwurf: M.E., basierend auf Vorlagen von Bruzzone 1990, Malarky et al. 1995, Cobb/Goldsmith 1995, Williams 2001)

I.7 Fragestellung

Das Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis wurde entwickelt, um die Pathogenese der akuten Entzündung der Bauchspeicheldrüse zu entschlüsseln. Obschon viele pathophysiologische Faktoren der Pankreatitis beschrieben worden sind [Otsuki et al. 2002], bleiben dennoch zahlreiche Mechanismen und Zusammenhänge im Unklaren. Ein bedeutender Anteil der Pathophysiologie, die sich nach entsprechender Reizung des Organs in den Azini abspielt und dort zur Entstehung des vollen Krankheitsbildes beiträgt, beginnt im Caerulein-Modell innerhalb eines Zeitraums von wenigen Sekunden bis zu 60 Minuten.

Für verschiedene Krankheiten ist nachgewiesen worden, dass im frühen Verlauf morphologische und funktionelle Veränderungen der parazellulären Barriere schädigenden Substanzen den Eintritt in den interstitiellen Raum ermöglichen und hierdurch entscheidenden Beitrag zu ihrer Pathogenese leisten. Hierfür ist eine Öffnung des parazellulären Verschlusses und somit eine Modifikation der diesen Verschluss bildenden transmembranären Proteine Occludin und Claudin erforderlich [Sawada et al. 2003]. Im exokrinen Pankreas können infolge einer Schädigung der parazellulären Grenzfunktion in den Azinuszellen befindliche Inhalte in das interstitielle Drüsengewebe eindringen [Metz et al. 1978, Akao et al. 2000]. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass Veränderungen der TJ-Verschlussproteine auch die für die Pankreatitis typischen und rasch auftretenden Organschäden begünstigen, indem frühzeitig aggressive (und bei der akuten Pankreatitis vorzeitig aktivierte) Verdauungsenzyme aus dem Gangsystem in das Drüsenparenchym gelangen. Es ist jedoch noch nie untersucht worden, ob bei der akuten Pankreatitis Veränderungen von Claudin und/oder Occludin stattfinden und wenn, zu welchem Zeitpunkt diese einsetzen.

Sowohl Ca^{2+} , die PKC als auch die Gruppe der MAPK werden einerseits nach Caeruleinstimulation über den CCK-Rezeptor aktiviert und sind somit an der Signaltransduktion bei Pankreatitis beteiligt. Andererseits wirken sie ebenso auf die Funktion und den Aufbau der Zonulae occludentes regulatorisch ein. Ob für die genannten Signaltransduktoren ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Funktionen im Verlauf der akuten Pankreatitis existiert, ist noch nicht untersucht worden.

Im einzelnen wurden daher folgende Fragen bearbeitet:

1. Wirkt sich in pankreatischen Azinuszellen die Stimulation mit Caerulein auf die Integrität der transmembranären TJ-Proteine Occludin und Claudin-1 aus?
2. Gibt es nach Caeruleinstimulation eine zeitliche Sequenz in der Disintegration der verschiedenen TJ- und TJ-assoziierten Proteine?

3. Sind die Signaltransduktoren Ca^{2+} , PKC und die Gruppe der MAPK an der Öffnung der parazellulären Barriere bei Pankreatitis beteiligt?

II Materialien und Methodik

II.1 Versuchstiere und Futter

Alle Versuchstiere waren Mäuse des Stammes C57BL/6 der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Sie wurden unter kontrolliertem Tages- und Nachtrhythmus (jeweils 12 Stunden) gehalten und hatten freien Zugang zu dem Standard-trockenfutter Altrumin 300 Standarddiät (Altromin GmbH, Lage, D) und Leitungswasser ad libitum. Ihr Gewicht lag zum Zeitpunkt der Untersuchungen zwischen 20 und 30 g. Die Tierversuche wurden nach den Richtlinien der hiesigen Tierversuchskontrollkommission durchgeführt.

II.2 Chemikalien und Materialien

Alle Chemikalien besaßen Analysenqualität. Soweit nicht anders vermerkt, wurden sie von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Die Chemikalien und Materialien anderer Bezugsquellen finden sich aufgelistet im Anhang wieder (S. 69). Die Feinchemikalien, Hemmstoffe und Färbeantikörper wurden, den angegebenen Konzentrationen entsprechend, vor jedem Experiment frisch angesetzt.

II.3 Isolierung und Stimulation pankreatischer Azinuszellen

Die Azinuszellen aus Mäusepankreatata wurden in Anlehnung an die von Niederau et al. beschriebenen Methoden gewonnen [Niederau et al. 1990]. Dazu wurde ein Krebs Henseleit-Puffer (KHB) verwendet, welcher sich aus 10,0 mmol/l Glucose, 2,0 mmol/l Glutamin, 32,5 mmol/l NaHCO₃, 109,74 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 0,8 mmol/l Na₂HPO₄, 2,12 mmol/l MgCl₂, 0,01% (w/v) Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) und supplementierten essentiellen Aminosäuren zusammensetzte. Die Lösung wurde 15 Minuten mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast; pH 7,4.

Die Mäuse wurden dekapitiert, das Pankreas entnommen und anhaftendes Fett, Lymphgewebe und Gefäße entfernt. Mit einer 27 G Kanüle wurden ca. 5 ml zuvor mit 2 mg Kollagenase und mit Ca²⁺-supplementierter KHB in das Pankreasgewebe injiziert, bis sich glasige Blasen bildeten. Das so isolierte Gewebe wurde zehn Minuten inkubiert. Soweit nicht anders vermerkt, erfolgten alle Inkubationen im Brutschrank in einer Atmosphäre von 37°C und 5% CO₂. Danach wurde die vorhandene überstehende Enzymlösung abgossen und 5 ml frische Enzymlösung nachgefüllt.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 25 Minuten wurden die Pankreaszellen durch das Aufziehen in Nalgene-Pipetten, deren Öffnungsdurchmesser sich stetig verkleinerten (2,4 mm, 1,6 mm, 0,9 mm), mechanisch voneinander getrennt. Die danach noch in der Suspension vorhandenen Gewebereste wurden mit Hilfe eines Nylonnetzes mit 150 µm

Maschenweite abgelfert. Um m3glichst viele Azini zu gewinnen, wurde das Netz mit einer L3sung aus 10 ml CaCl₂-haltiger KHB und 100 mg BSA nachgesp3lt. Vorsichtig wurde die nun vorhandene Zellsuspension in Nalgene-R3hrchen mit Zentrifugationsl3sung (50 ml CaCl₂-haltiger KHB und 2 g BSA) vermengt und danach je vier Minuten zweimal bei 250 U/Min zentrifugiert (Heraeus Minifuge 2, Heraeus Christ GmbH, Osterode, D). Nach der ersten Zenrifugation wurde der entstandene 3berstand abgesch3ttet und neue Zentrifugationsl3sung hinzu gegeben. Die sedimentierten Azinuszellen wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (Biochrom AG, Berlin, D), das 10% BSA und 0,01% Gentamicin enthielt, gel3st und gleichm3Big auf mit Matrigel (B.D. Transduktionslaboratorien, Heidelberg) beschichtete Objekttr3ger (Lab-Tek Chamber-Slide-System, Nalgene Nunc International, Naperville, USA) verteilt. Anschließend wurden sie 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, bevor sie zu Versuchen oder Untersuchungen verwendet wurden.

Durch diese Art der Zellisolation werden bis zu ca. 90-95% funktionierende Azinuszellen gewonnen. Dies ist beispielsweise ersichtlich an fehlender Permaetion von Trypanblau durch die Zellmembranen [Amsterdam/Jamieson 1974, Bruzzone et al. 1985].

II.4 Induktion einer akuten Pankreatitis

Die akute Pankreatitis wurde mit intraperitonealer Gabe des Cholezystokininanalogons Caerulein induziert. Hoch dosierte Stimulationsreihen erfolgten mit einer Konzentration von 50 µg/kg KG/h; Kontrollreihen wurden sowohl mit geringer Stimulation von 0,25 µg/kg KG/h als auch mit steriler Kochsalzl3sung durchgef3hrt.

In Versuchsreihen, die Zeitr3ume von 3ber 60 Minuten beinhalteten, erhielten die Tiere genau nach Ablauf dieses Zeitraums eine Folgeinjektion. Jede Versuchs- oder Kontrollgruppe bestand aus mindestens drei oder mehr M3usen.

Nach Ablauf festgesetzter Wirkzeitr3ume, die ab dem Zeitpunkt der erfolgten Injektion gemessen wurden, wurden die M3use dekapitiert, das Pankreas wurde durch Pr3paration entnommen, in zwei St3cke geteilt und sofort in fl3ssigem Stickstoff schockgefroren. Die Pr3parate wurden anschlieBend bis zu den folgenden Untersuchungen bei -80°C gelagert.

Das Blut der dekapitierten M3use wurde mittels eines heparinisierten Trichters in Eppendorf-Gef3Ben aufgefangen und danach bei 4°C zehn Minuten lang bei 10.000 g zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge EBA 12R). Hiernach konnte das 3berstehende Serum abpipettiert und bis zu den Messungen der Serumenzyme am Folgetag bei -20°C eingefroren werden.

II.5 Immunhistochemie und Immunzytochemie

Bei den erfolgten Färbeschritten wurde phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) als Grundlösung zur Verdünnung der Antikörper und zum Waschen der Präparate benutzt. PBS setzte sich folgendermaßen zusammen: Auf 1 l Aqua dest. kamen 8,0 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,7 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ und 0,2 g KCl.

II.5.1 Immunzytochemie (*In-vitro-Modell*)

Die in den Zellkammern anhaftenden Zellen wurden durch Austausch des Kulturmediums gegen PBS von nicht adhärenen Zelldebris gereinigt. Zur Fixierung wurden die Azinuszellen anschließend in 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung inkubiert (Einwirkzeit: 10 min bei RT). Es erfolgte ein erneuter Waschgang und danach die Blockierung unspezifischer Färbereaktionen mittels einstündiger Inkubation der Azini in einer Lösung aus Ziegen Serum in PBS in einem Mischungsverhältnis von 1:1.

Hiernach wurden die Zellkammern erneut gewaschen, um schließlich in den folgenden (mit PBS hergestellten) Verdünnungen die Erstantikörper aufzutragen:

- Maus anti Occludin, monoklonaler Antikörper (mAB), 1:100
Kaninchen anti Claudin-1, polyklonaler Antikörper (pAB), 1:100
- Maus anti Occludin, mAB, 1:100
Ratte anti ZO-1, pAB, 1:250

Die Erstantikörper hatten einen Einwirkzeitraum von zwölf Stunden bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Objektträger mindestens dreimal für zehn Minuten in PBS geschwenkt, um nicht gebundene Erstantikörper zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den Zweitantikörpern:

- Occludin: Ziege anti Maus CY 3, 1:300
Claudin-1: Ziege anti Kaninchen FITC (Fluorescein-isothiocyanat) Alexa: 1:150
- Occludin: Ziege anti Maus CY 3, 1:300
ZO-1: Ziege anti Ratte Alexa 488, 1:150

Nach der Inkubationszeit (60 min bei RT) wurden die Präparate wieder drei mal je zehn Minuten mit PBS ausgewaschen und schließlich mit Mounting Medium (Dako, Hamburg, D) überschichtet.

Zur Anfärbung von F-Aktin wurde das an den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gebundene Pflanzenalkaloid Phalloidin verwendet:

- Phalloidin TRITC (Tetramethylrodaminisothiocyanat), 1:500

Die Einwirkzeit des Alkaloids betrug 30 Minuten (abgedunkelt bei RT), danach Reinigung mittels PBS und Überschichtung mit Mounting Medium.

Mikroskopisch wurden je sechs Zellkammern in mindestens drei Gesichtsfeldern ausgewertet.

II.5.2 Immunhistochemie (In-vivo-Modell)

Aus den gefrorenen Pankreaspräparaten wurden mit einem Leica Kryotom CM 3050 (Leica, Bensheim, BRD) bei -25 °C 5 µm dicke Schnitte angefertigt, und diese auf Objektträgern aufgetragen. Die Schnitte wurden mit Methanol fixiert (10 min bei -20°C), in PBS gewaschen und danach 60 Minuten lang mit einer einprozentigen BSA-Lösung blockiert. Nach erneutem Wechseln der Waschlösung wurden sie mit den Erstantikörpern beschichtet:

- Maus anti Occludin, mAB, 1:100
Kaninchen anti Claudin-1, pAB, 1:100
- Maus anti Occludin, mAB, 1:100
Ratte anti ZO-1, pAB, 1:100

Bei allen übrigen Anfärbungen entsprachen die nun folgenden Arbeitsschritte (Inkubation, Waschung und Überschichtung) den bei den Pankreasazini durchgeführten. Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

- Occludin: Ziege anti Maus CY 3, 1:300
Claudin-1: Ziege anti Kaninchen FITC Alexa, 1:500
- Occludin: Ziege anti Maus CY 3, 1:300
ZO-1: Ziege anti Ratte FITC Alexa, 1:500

Die Anfärbung F-Aktins mit Phalloidin erfolgte in der Verdünnung

- Phalloidin TRITC, 1:500

und die Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (10 min bei RT); die Einwirkzeit betrug 30 Minuten (abgedunkelt bei RT), danach erfolgten Reinigung und Überschichtung wie oben beschrieben.

Zur Auswertung wurden jeweils sechs repräsentative Schnitte in je drei Gesichtsfeldern untersucht.

II.6 Inhibition intrazellulärer Signalwege

Es wurde untersucht, ob sich in dem Modell die strukturellen Veränderungen der TJ-Proteine Occludin und ZO-1 durch Hemmung der durch Ca²⁺, PKC-α und MEK1 und MEK2 vermittelten intrazellulären Signalwirkung verhindern ließen. Hierzu wurden Inhibitoren der einzelnen Signaltransduktionswege verwendet (Abb. 5).

Die einzelnen Inhibitoren wurden in DMEM gelöst. Die Azini wurden zuerst 30 Minuten lang in Medium bzw. Medium + Inhibitoren vorinkubiert. Anschließend wurden sie in Medium, Medium + Inhibitor, Medium + Caerulein bzw. Medium + Caerulein + Inhibitor weitere 30 Minuten lang inkubiert. Die Stimulation der Azinuszellen erfolgte in den Konzentrationen 10^{-9} mol Caerulein/l und 10^{-6} mol Caerulein/l. Die Isolierung der Azinuszellen sowie Fixierung, Färbung und Lasermikroskopie erfolgten ebenso wie in den oben beschriebenen Versuchsreihen.

Es wurden folgende, in PBS gelöste, Inhibitoren angewendet:

- BAPTA (Konzentration: 5 μ M und 50 μ M)
- GÖ6976 (Konzentration: 10 μ M)
- PD98059 (Konzentration: 10 mM)

II.7 Konfokale Lasermikroskopie

Die immunhistochemisch angefärbten Azinuspräparate und Kryoschnitte wurden mittels eines Leica DM IRB Mikroskops (Bensheim, BRD), welches mit einem Leica-TCS-NT konfokalen Laserscanner-System mit Argon-Krypton-Laser ausgestattet war, betrachtet und analysiert. Die auftretende Fluoreszenz wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 488$ nm (FITC und Alexa 488) und $\lambda = 568$ nm (Cy 3) detektiert. Die Kolokalisation von grün (488 nm) und rot (568 nm) wurde mittels Computer in ein gelbes Signal errechnet.

II.8 Western Blot

Der spezifische Proteinnachweis von Claudin-1 und Occludin im Western Blot diente dazu, die frühen Modifikationszeitpunkte der transmembranären TJ-Proteine zu bestätigen. Indem hierfür dieselben Antikörper wie in den immunhisto- und -zytochemischen Anfärbungen benutzt wurden, konnte ebenso die Spezifität der verwendeten Antikörper überprüft werden.

Das gefrorene Pankreasgewebe wurde homogenisiert und mit einem Lyse-Puffer aufgelöst; dieser enthielt 20 mmol/l Tris-HCl (pH 7,4), 140 mmol/l NaCl, 10 mmol/l NaF, 10 mmol/l Natriumpyrophosphat, 1% Triton X-100, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l Natriumvanadat, 20 mmol/l Gammaglycerolphosphat und ein Proteaseinhibitor-gemisch (Boehringer, Mannheim, D).

15-200 μ g der so gewonnenen Proteinlysate wurden mit einem SDS-haltigem (Sodiumdodecylsulfat) Auftragspuffer gemischt und gelelektrophoretisch auf 10%- (Occludin-) oder 15%-(Claudin-1-)Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt [Laemmli 1970]. Bekannte Molekulargewichtsstandards liefen dabei neben den Proben mit. Anschließend wurden die Proteine mit einer halbtrockenen Transferapparatur (Multiphor II, Pharmacia&Upjohn, Upp-

sala, Schweden) auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mittels einer zweistündigen Inkubation mit 5% BSA bei 4°C abgesättigt. Danach erfolgte über Nacht die Inkubation mit den spezifischen Erstantikörpern, verdünnt in „Tris-buffered saline“ bei 4°C:

- Maus anti Occludin, mAB, 1:10000
- Kaninchen anti Claudin-1, pAB, 1:10000

Die Membran wurde mittels PBS gereinigt und es erfolgte die Inkubation mit den Sekundäntikörpern (abgedunkelt für 60 min bei RT) in folgender Konzentration:

- Anti-mouse-HRPO, 1:10000
- Anti-rabbit-HRPO, 1:10000

Die Membranen wurden hiernach in einem Chemilumineszenz-Reagenz für eine Minute inkubiert. Hyperfilm ECL-Filme (Amersham, Freiburg, D) wurden für Zeiträume von 30 Sekunden bis 60 Minuten durch die Chemilumineszenz der Membranen belichtet. Die entwickelten Filme wurden densitometrisch ausgewertet.

II.9 Biochemische Messungen

II.9.1 Messung der Amylase

Die Sekretion von α -Amylase nach Stimulation mit Caerulein ist eine physiologische Reaktion von Pankreasazinuszellen. Die Amylaseaktivität im Serum der Versuchstiere wurde durch den Phadebas Amylase Test (Pharmacia&Upjohn, Uppsala, Schweden) bestimmt, welcher sich eines durch Quervernetzung wasserunlöslichen Stärkepolymers bedient. Ist in den Serumproben Amylaseenzymaktivität vorhanden, wird die Stärke gespalten und es entstehen, in einer Geschwindigkeit, die dieser Aktivität direkt proportional ist, wasserlösliche blaue Fragmente.

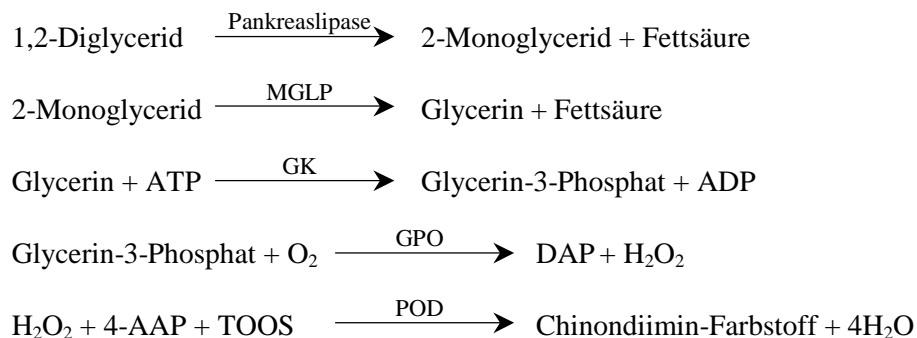
Zunächst wurden je 10 μ l der Proben zusammen mit 4 ml Aqua dest. in Einmal-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Ein nur Aqua dest. enthaltendes Röhrchen diente als Kontrolle. Die Proben wurden im Wasserbad (5 min bei 37°C) erwärmt und hiernach in jede eine Amylase-Tablette mit einer Pinzette beigefügt. Die Lösungen wurden gut durchmischt und anschließend 15 min. lang im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Hydrolysereaktionen wurden nach Ablauf dieses Zeitraums mit 1ml 0,5 N NaOH abgebrochen und die Lösungen zentrifugiert (5 min bei 4000 U). Danach wurde die Extinktion des Überstandes bei 620 nm spektrophotometrisch bestimmt. Die Extinktion entspricht hierbei der Aktivität der α -Amylase in der Probe und wurde anhand einer Standardkurve in Aktivitätswerte (U/l) umgerechnet.

II.9.2 Messung der Lipase

Die Lipase ist ein für das Pankreas spezifisches Enzym, das ebenso wie die Amylase nach Stimulation von Azinuszellen sezerniert wird [Niederau et al. 1990]. Die Höhe der Lipase-Ausscheidung wurde nach der kolorimetrischen Methode von Imamura mit dem Lipase-PS-Test (Sigma, Deisenhofen, D) gemessen [Imamura et al. 1989].

Die Messung basiert darauf, dass die Pankreaslipase die α -1 und α -3-Ester langkettiger Fettsäuren von ihren Triglyceriden abspaltet. Dieser Vorgang benötigt allerdings die Anwesenheit von Co-Lipase, die den Bindungsvorgang zwischen Substrat und Enzym fördert. Zuerst wird 1,2-Diglycerid in 2-Monoglycerid und Fettsäuren gespalten; dieses Spaltungsprodukt wird daraufhin durch gekoppelte Enzymreaktionen gemessen. Bei diesen Reaktionen wirken Monoglyceridlipase, Glycerinkinase, Glycerinphosphatoxidase und Peroxidase als Katalysatoren mit. In der Endreaktion entsteht ein Farbstoff, der Licht einer Wellenlänge von 550 nm absorbiert. Der Absorptionsanstieg, der spektralphotometrisch gemessen wird, ist der Aktivität der Pankreaslipase im Serum direkt proportional:

Zur Durchführung: Zunächst musste die Lipase-Aktivität eines Standards erstellt werden (mittels Lipase von Sigma, 23000 U/mg in PBS).



Abkürzungen:

MGLP: Monoglyceridlipase; ATP: Adenosintriphosphat, GK: Glycerinkinase, ADP: Adenosindiphosphat; GPO: Glycerin-3 Phosphatoxidase; DAP: Dihydroxyacetonphosphat; 4-AAP: 4-Aminoantipyrin; TOOS: Natrium-N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-m-Toluidin, POD: Peroxidase (zitiert nach Imamura et al. 1989)

In jede Küvette wurden 900 μ l Lipase-PS™ Substrate Reagent plus je 15 μ l Serum, Aqua dest. für den Leerwert oder Standardlösung für den Standard pipettiert. Diese Lösungen wurden vorsichtig vermischt, danach im Wasserbad inkubiert (5 min bei 37°C) und 300 μ l Lipase-PS™ Activator Reagent beigefügt. Mittels des auf 37°C vorgeheizten Photometers erfolgte anschließend die Messung der Lichtabsorption jeder einzelnen Probe. Dies geschah bei einer Wellenlänge von 550 nm und über einen Zeitraum von fünf Minuten alle 30 Sekunden.

Die Höhe der Lipase-Aktivität im Mäuseserum konnte nach Erhalt der Extinktionswerte nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Lipase-Aktivität (U/l)} = \frac{(\Delta A \text{ Probe} - \Delta A \text{ Leerwert})}{(\Delta A \text{ Standard} - \Delta A \text{ Leerwert})} \cdot (\text{Lipase-Aktivität des Standards})$$

$$\Delta A \text{ Leerwert} = A \text{ Endleerwert} - A \text{ Initialleerwert}$$

$$\Delta A \text{ Standard} = A \text{ Endstandard} - A \text{ Initialstandard}$$

$$\Delta A \text{ Probe} = A \text{ Endprobe} - A \text{ Initialprobe}$$

II.10 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in mindestens drei unabhängigen Azinus-Präparationen oder drei unabhängigen Präparationsreihen gewonnen. Die Ergebnisse sind als Durchschnittswerte mit Standardabweichung angegeben. Zur Bewertung statistischer Unterschiede wurde der Student T-Test angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

III Ergebnisse

III.1 Immunzytochemische Untersuchungen von Tight-Junction-Proteinen isolierter pankreatischer Azini der Maus nach In-vitro-Stimulation mit Caerulein

Azinuszellen wurden nach der oben beschriebenen Isolierung mit steigenden Konzentrationen des Cholezystokinin-Analogons Caerulein stimuliert (10^{-12} mol/l, 10^{-9} mol/l und 10^{-6} mol/l für 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min), um eine maximale sekretorische Stimulation oder eine der Pankreatitis ähnliche Schädigung zu induzieren. Die maximale Stimulation isolierter pankreatischer Azinuszellen beginnt ab einer Caeruleinkonzentration von 10^{-10} mol/l [Bruzzone et al. 1985]. Morphologische Veränderungen wurden mittels Immunhistochemie und konfokaler Lasermikroskopie nachgewiesen.

Ohne Stimulation und ebenso in den Kontrollreihen zeichneten sich die untersuchten TJ-Proteine als filigran gezeichnete, meist durchgängig verlaufende, doppelt konturierte Linien am apikalen Pol der aneinander gelagerten Gang- und Azinuszellen ab. Eine Ausnahme hiervon bildete Claudin-1, das sich auch an den äußeren Zellmembranen abbildete.

Occludin und ZO-1

In der Färbung wurde, bedingt durch die eingesetzten Sekundärantikörper Occludin als rotes und ZO-1 als grünes Signal sichtbar; bei Kolo-kalisation entstand durch die Überlagerung der beiden Farben ein gelbes Signal (Tafel I).

Sowohl Occludin als auch ZO-1 lagen in den Kontrollen am apikalen Pol der isolierten Gang- und Azinuszellen und zeigten sich dabei immer strikt kolo-kalisiert. Diese Befunde galten für alle Kontrollen und zu jedem Zeitpunkt, also auch noch nach 60 Minuten dauernder Inkubation im Kontrollmedium. Somit hatten die Kulturbedingungen keinen Einfluss auf Lokalisation und Verteilung der untersuchten TJ-Proteine.

Ebenso zeigten sich bei einer Caerulein-Konzentration von 10^{-12} mol/l zu allen Zeitpunkten die doppelt konturierten, feinen Linien in ihrer Struktur durchgehend erhalten. Die Anfärbungen entsprachen hier morphologisch den Kontrollabbildungen. Dies bewies, dass die in diesem Modell verwendeten geringen Mengen des CCK-Analogons keine Auswirkungen auf Struktur und Anordnung von Occludin oder ZO-1 hatten.

Anders verhielt es sich bei höheren Konzentrationen von CCK. So fanden sich bei 10^{-6} mol Caerulein/l Medium bereits nach zehnmütiger und bei 10^{-9} mol Caerulein/l Medium, leicht verzögert, nach fünfzehnminütiger Exposition erste Anzeichen morphologischer Veränderungen. Diese äußerten sich in Kondensationen, durch welche die filigranen Linien unschärfer begrenzt erschienen und in einem streckenweisen Verlust der Doppelkonturierungen. Mit fortschreitender Inkubationszeit setzten sich diese Prozesse fort.

Bereits nach einem Inkubationszeitraum von 30 Minuten war bei beiden Konzentrationen die vorherige Struktur der Proteinanordnung kaum noch vorhanden. Die gangförmige Doppelkonturierung war fast völlig aufgehoben, die angefärbten Areale erscheinen unscharf begrenzt und verklumpt. Nach 60 Minuten Inkubation (in 10^{-6} mol/l bzw. 10^{-9} mol/l) traten zu diesen Befunden keine wesentlichen Unterschiede mehr auf.

Occludin und Claudin-1

Bei diesen Anfärbungen wurde wiederum Occludin rot angefärbt, grün stand diesmal für Claudin-1. Überlagerungen wurden durch gelb angezeigt (Tafel II). Die hier untersuchten Proteine erwiesen sich als nur teilweise kolokalisiert. Wohingegen sich Occludin wie vorher an der apikalen Zellmembran anfärbte, war Claudin-1 nicht nur an der apikalen sondern auch an der basolateralen Membran der Gang- und Azinuszellen vorhanden.

Die Durchführung der Präparation und die Inkubationsbedingungen hatten im zeitlichen Verlauf keinen Effekt auf die dargestellten angefärbten Strukturen. Auch eine Konzentration von 10^{-12} mol Caerulein/l Medium bewirkte innerhalb einer Inkubationszeit von 60 Minuten keine deutliche Modifikation.

Bei den hohen Konzentrationen (10^{-6} mol/l bzw. 10^{-9} mol/l) begann nach 10 bis 15 Minuten eine Kondensation der Strukturen, die im weiteren Zeitverlauf deutlich zunahm. Ersichtlich wurde der Prozess der strukturellen Veränderungen an der zunehmenden Unschärfe des angefärbten Proteinmusters mit Verlust der Doppelkonturierung und der Durchgängigkeit der Linien. Hierbei entstanden klobig plumpe, signalintensive Areale. Nach 30 Minuten Inkubation war die Kondensation so weit fortgeschritten, dass das eigentliche Färbemuster nicht mehr zu erkennen war. Die Anfärbungen waren unregelmäßig und undeutlich; übrig blieben vor allem verdichtete, konturlose Signale. Die Schäden traten nach 30 Minuten Inkubation in beiden Konzentrationsreihen ebenso deutlich hervor wie nach 60 Minuten Inkubation.

F-Aktin als Protein des Zytoskeletts

F-Aktin zeichnete sich in den verwendeten Azinuszellen sehr ähnlich wie die Proteine der Zonulae occludentes in filigranen doppelsträngigen Linien im Inneren der Azinuszellen, aber auch wie Claudin-1 an den äußeren Zellmembranen ab. Es war somit sowohl apikal als auch basolateral lokalisiert. F-Aktin wurde mit TRITC-markiertem Phalloidin (rotes Signal) angefärbt (Tafel III).

Im Kontrollmedium und ebenso im Medium mit geringem Caeruleinanteil (10^{-12} mol/l) blieb F-Aktin bei allen untersuchten Zeitpunkten gleichmäßig doppelt konturiert und exakt begrenzt abgebildet.

Ab einer Inkubationszeit von 10 bis 15 Minuten bei 10^{-6} mol Caerulein/l Medium bzw. 10^{-9} mol Caerulein/l Medium begann die morphologische Schädigung des Zytoskeletts,

welche sich, ebenso wie oben bei den TJ-Proteinen beschrieben, zunächst in Form beginnender Unschärfe des Färbeprofils mit Verlust der Doppelstruktur abzeichnete. Diese Veränderungen setzten sich mit Ablauf längerer Inkubationszeiten kontinuierlich fort und erreichten nach 30 Minuten ihr Maximum. Sowohl nach 30 als auch nach 60 Minuten war F-Aktin im Vergleich zu den Kontrollen in Form von Verdichtung, unscharfer Zeichnung und körnig fleckförmiger Kondensation massiv modifiziert.

III.2 Immunhistochemische Untersuchungen von Tight-Junction-Proteinen pankreatischer Azini der Maus nach In-vivo-Stimulation mit Caerulein

Die caerulein-induzierte Pankreatitis ist ein etabliertes Modell, durch das sich bei Mäusen schnell eine sekretorische Stimulation oder auch eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse hervorrufen lässt [Lampel/Kern 1977].

An Pankreata von Mäusen, die einer entsprechenden Stimulation mit Caerulein ausgesetzt worden waren, ließ sich zum einen die Zeitabhängigkeit morphologischer Veränderungen nach dem Zeitpunkt einer Caeruleingabe und zum anderen die unterschiedlichen Reaktionen auf eine gering und eine hoch dosierte Stimulation untersuchen.

III.2.1 Tight-Junction-Proteine/F-Aktin nach Stimulation mit 0,25 µg Caerulein/kg KG/h

Diese Zeitreihen enthielten Präparate der Zeitpunkte 5, 10, 15, 20, 30, 60 und 120 Minuten *post injectionem* (*p.i.*) mit einer niedrigen (maximalen) Dosierung von 0,25 µg Caerulein/kg KG/h [Kern et al. 1985]. Kontrollen wurden zu den Zeitpunkten 60 oder 120 Minuten nach intraperitonealer Gabe von Ringer-Laktat-Lösung oder zum Zeitpunkt null, also *sine injectionem*, durchgeführt.

In den angefertigten Schnitten der Pankreata zeichneten sich in allen Kontrollen die einzelnen Proteine der Zonulae occludentes ebenso wie in den isolierten Azini als exakt konturierte, doppelböige Gänge ab. Claudin-1 war in den Präparaten der In-vivo-Versuche ebenso wie die anderen TJ-Proteine nur an der apikalen Zellmembran lokalisiert. Anzumerken bleibt, dass die immunhistochemische Anfärbung insbesondere von Claudin-1 als auch von F-Aktin nicht ganz die Qualität wie die in der Immunzytochemie erreichte.

Occludin und ZO-1

Occludin (rotes Signal) und ZO-1 (grünes Signal) waren strikt kolokalisiert (gelbes Signal) und lagen an der apikalen Zellmembran (Tafel IV). Nach gering dosierter Stimulation mit Caerulein waren innerhalb eines Zeitraums von 120 Minuten *p.i.* zu allen untersuchten Zeitpunkten keine Strukturauflösungen oder Veränderungen der Proteinfärbung zu finden. Somit hatte sich die maximale Konzentration von 0,25 µg Caerulein/kg KG/h nicht auf die strukturelle Anordnung der beobachteten Proteine ausgewirkt.

Occludin und Claudin-1

Beide Proteine, Occludin als rotes und Claudin-1 als grünes Signal angefärbt, lagen in den Pankreasschnitten kolokalisiert (gelbes Signal) vor (Tafel V). Auch bei diesen Proteinen bewirkte die niedrige Caeruleinkonzentration von 0,25 µg Caerulein/kg KG/h zu keinem Zeitpunkt Veränderungen im Färbeprofil. Ersichtlich wurde dies im besonderen durch den Erhalt der filigranen Doppelstrukturen auch noch 120 Minuten nach erfolgter Caeruleinstimulation.

F-Aktin als Protein des Zytoskeletts

Die Anfärbung des zytoskelettalen F-Aktins (rotes Signal) wies bei der niedrigen Dosierung von 0,25µg Caerulein/kg KG/h zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung oder Schädigung auf. Die feinen Doppelstrukturen des Färbeprofils erwiesen sich noch nach 120 Minuten *p.i.* als gleichmäßig konturiert (Tafel VII).

III.2.2 Tight-Junction-Proteine/F-Aktin nach Stimulation mit 50 µg Caerulein/kg KG/h

Die supramaximale Stimulation wurde mit der Dosierung 50 µg Caerulein/kg KG/h [Kern et al. 1985] durchgeführt. Die Pankreata wurden nach 5,10,15,30 und 120 Minuten *p.i.* entnommen. Kontrollen wurden zu den Zeitpunkten 30 oder 120 Minuten nach intraperitonealer Gabe von Ringer-Laktat-Lösung oder ohne vorangehende Injektion gewonnen.

Occludin und ZO-1

Im Vergleich zu den Kontrollen verursachte die hoch dosierte Gabe von 50 µg Caerulein/kg KG/h innerhalb von 5 Minuten ein erstes leichtes Aufreißen der durchgehenden, linearen Doppelstrukturen beim transmembranären Occludin (rote Farbe) (Tafel VIII).

Dahingegen blieb das Muster des zytoplasmatischen ZO-1 (grüne Farbe) erhalten. Die Disintegration von Occludin nahm innerhalb des Beobachtungszeitraums von 60 Minuten deutlich zu. Bereits nach 30 Minuten *p.i.* war bereits ein fast vollständiger Verlust des Färbeprofils ersichtlich. 60 Minuten nach Stimulationsbeginn war das gesamte Färbemuster von Occludin nicht mehr nachweisbar.

Veränderungen im Färbemuster von ZO-1 erfolgten im Vergleich zu Occludin verzögert nach erst 30 Minuten *p.i.*. Erst ab diesem Zeitpunkt entwickelte sich ein unregelmäßiges, kondensiertes Bild der ZO-1-Anfärbung. Im darauf folgendem Zeitverlauf löste sich das Profil von ZO-1 ebenso wie das Occludins zunehmend auf und verklumpte. Allerdings war es nach 60 minütiger Inkubation im Gegensatz zu Occludin noch schemenhaft zu erkennen.

Occludin und Claudin-1

Die durch 50 µg Caerulein/kg KG/h bedingten strukturellen Veränderungen hatten bei beiden transmembranären Proteinen, Occludin (rotes Signal) und Claudin-1 (grünes Signal, Kolokalisation gelbes Signal), denselben zeitlichen Verlauf (Tafel IX). Bereits fünf Minuten nach dieser starken Stimulation wiesen Occludin und auch Claudin-1 ein unscharfes, kondensiertes Färbeabbild vor. 10 Minuten nach der Stimulation verblassten die angefärbten Strukturen zunehmend und lösten sich innerhalb von 30 Minuten auf oder verklumpten, bis dass sie nach Ablauf von 60 Minuten ganz verschwunden waren.

F-Aktin als Protein des Zytoskeletts

Die reaktiven morphologischen Veränderungen des zytoskelettalen F-Aktins (rot) manifestierten sich ab 30 Minuten *p.i.* (50µg Caerulein/kg KG/h) und somit ca. 20 Minuten später als die der transmembranären TJ-Proteine (Tafel VI). Die Disintegration von F-Aktin wurde ebenso wie bei den anderen beschriebenen Proteinen dadurch ersichtlich, dass sich das Färbemuster in seiner Kontur unschärfer und verblasst darstellte. Im weiteren Zeitverlauf von 60 Minuten veränderten sich die filigranen Doppellinien zu verklumpten, verdichteten Arealen.

III.3 Western Blot-Analyse von Tight-Junction-Proteinen isolierter pankreatischer Azini der Maus nach In-vivo-Stimulation mit Caerulein

Ebenso wie in den immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Versuchstiere wieder zu den Zeitpunkten 0, 10, 30 und 60 Minuten mit niedrigen (0,25 µg Caerulein/kg KG/h) und hohen (50 µg Caerulein/kg KG/h) Caeruleinkonzentrationen stimuliert. Das Molekulargewicht von Occludin lag im Vergleich mit den verwendeten Molekulargewichtsstandards zwischen 58-60 kDa und das von Claudin-1 zwischen 23-25 kDa. Diese Molekülmassen entsprachen den Angaben in der hierzu vorliegenden Literatur [Furuse et al. 1993, Furuse et al. 1998].

Proteine nach Stimulation mit 0,25 µg bzw. mit 50 µg Caerulein/kg KG/h

Bei der hohen, supramaximalen Stimulation nahm die Occludinmenge nach 10 Minuten deutlich ab und erreichte ihren Tiefpunkt nach einem Zeitraum von 30 Minuten. Nach Ablauf von 60 Minuten fand sich wieder eine Mengenzunahme des untersuchten Proteins. Hingegen zeigten sich bei der Stimulation mit 0,25 µg Caerulein/kg KG/h zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede in der Proteinmenge (Abb. 6).

Ähnliche Ergebnisse wurden für Claudin-1 erzielt: Im Vergleich zu der niedrig dosierten Stimulation nahm die Claudin-1-Menge nach 10 minütiger Einwirkzeit von 50 µg Caerulein/kg KG/h ab und erreichte nach 30 Minuten ihren niedrigsten Stand. Ebenfalls hier stieg die vom Antikörper detektierte Proteinmenge nach 60 Minuten wieder an.

Allerdings ergaben sich in den niedrig dosierten Stimulationsreihen für Claudin-1 minimale Mengenabnahmen nach 30 und 60 Minuten *p.i.* (Abb. 6).

Nieder- oder höhermolekulare Banden als Zeichen einer Disintegration der untersuchten Proteine konnten nicht nachgewiesen werden.

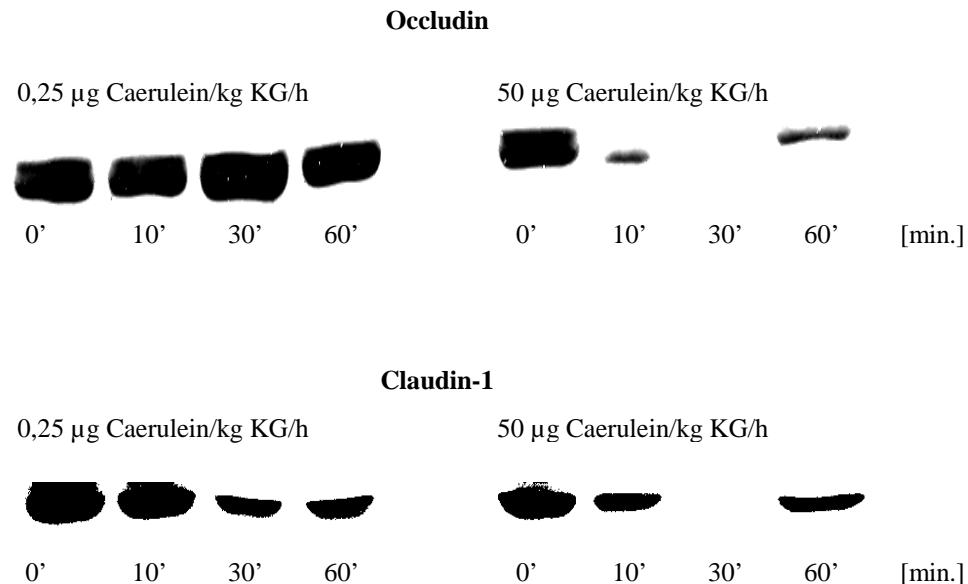


Abb. 6: Western-Blot-Analyse von Occludin und Claudin-1 nach niedrig bzw. hoch dosierter In-vivo-Stimulation mit Caerulein

III.4 Pankreasenzyme der Maus nach In-vivo-Stimulation mit Caerulein

Durch Messung der im Serum vorhandenen Enzymaktivitäten von Amylase und Lipase konnten im In-Vivo-Modell Rückschlüsse darüber gewonnen werden, wie stark die Bauchspeicheldrüsen der einzelnen Versuchstiere auf die Caeruleingaben reagiert hatten. Amylase wird überwiegend und Lipase ausschließlich vom Pankreas produziert.

III.4.1 Serumentzymaktivität der Amylase

Amylaseaktivität nach Stimulation mit 0,25 µg Caerulein/kg KG/h

Die Stimulation mit 0,25 µg Caerulein/kg KG/h ergab keinen signifikanten Anstieg der Amylase-Aktivität im Serum (Abb. 7).

Amylaseaktivität nach Stimulation mit 50 µg Caerulein/kg KG/h

Der hochdosierten Gabe von Caerulein (50 µg/kg KG/h) folgte bis zum zuletzt gemessenen Zeitpunkt von 120 Minuten *p.i.* ein kontinuierlicher Anstieg der Amylaseaktivität im Serum. Dieser war während der ersten 15 Minuten sehr gering, erreichte jedoch ab 20 Minuten *p.i.* im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Werte (Abb. 7).

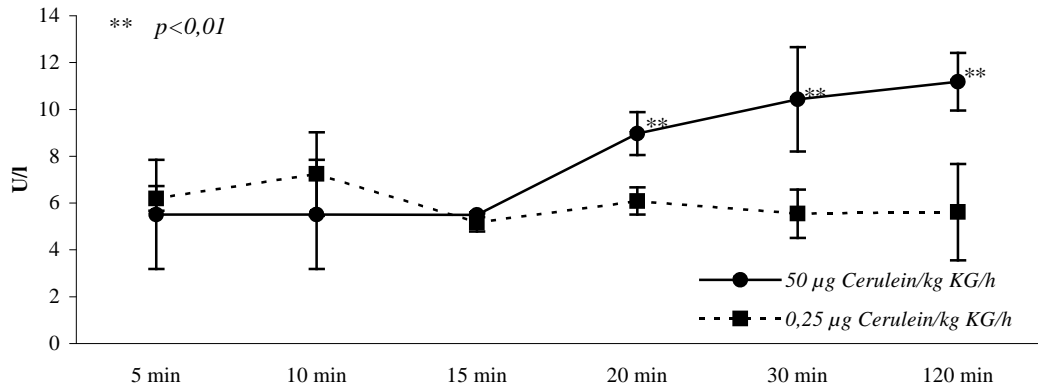


Abb.7: Amylaseaktivität nach 0,25 µg und 50 µg Caerulein/kg KG/h

III.4.2 Serumenzymaktivität der Lipase

Lipaseaktivität nach Stimulation mit 0,25 µg Caerulein/kg KG/h

In Folge einer geringen Stimulation (0,25 µg/kg KG/h) mit dem schädigenden Cholezystokinin-Analogen entstanden im Verlauf des beobachteten Zeitraums von 120 Minuten keine signifikant erhöhten Werte der Lipaseaktivität im Serum der Versuchstiere. Alle Mittelwerte lagen nahe des Kontrollwertes oder sogar darunter (Abb. 8).

Lipaseaktivität nach Stimulation mit 50 µg Caerulein/kg KG/h

Eine Stimulation mit einer hohen Caerulein-Dosis (50 µg/kg KG/h) bewirkte im untersuchten Zeitraum von 120 min eine massive Erhöhung der Lipaseaktivität im Serum. Nach Ablauf von 15 Minuten wurden, in bezug auf die Kontrollen, signifikant erhöhte Werte für die Lipase-Aktivität gemessen, wobei die enzymatische Aktivität in den Folgezeitpunkten noch weiterhin anstieg (Abb.8).

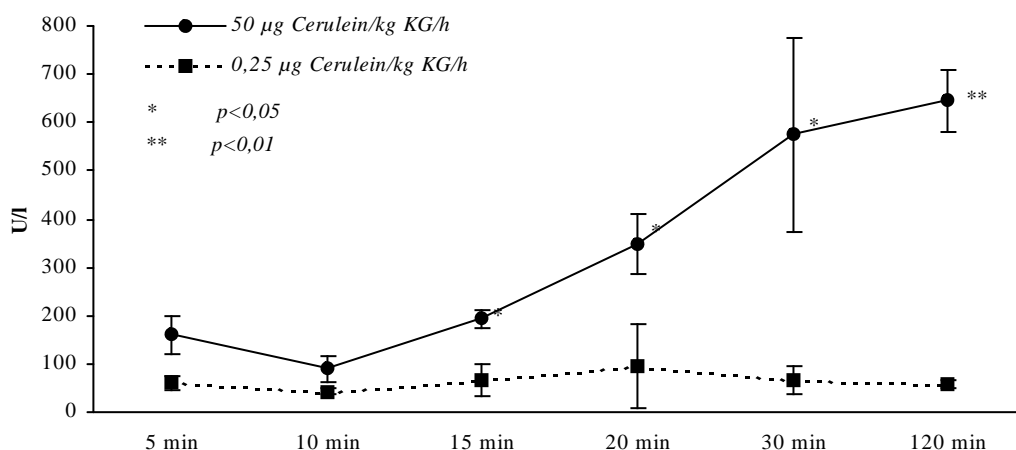


Abb.8: Lipaseaktivität nach 0,25 µg und 50 µg Caerulein/kg KG/h

III.5 Inhibition intrazellulärer Signalwege und ihr Effekt auf die Struktur der Tight-Junction-Proteine des exokrinen Pankreas der Maus bei In-vitro-Stimulation mit Caerulein

Es stellt sich die Frage, welche Signalwege in diesem Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis die morphologischen Veränderungen an den TJ modulieren. In den folgenden Versuchen wurde das oben beschriebene Modell dazu verwendet, die Wirkung verschiedener Inhibitoren bekannter Botenstoffe und damit deren Beteiligung an der Signalvermittlung bei der Caerulein-Pankreatitis zu testen. Die Zellen im reinen Caeruleinmedium (10^{-9} mol/l bzw. 10^{-6} mol/l) zeigten auch in diesen Versuchsreihen nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten stets die wie oben beschriebenen, strukturellen Veränderungen von Occludin und ZO-1.

Intrazelluläres, freies Ca^{2+}

Die 30-minütige Vorinkubation mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA wirkte sich nicht auf das Immunfluoreszenzmuster der untersuchten Proteine aus (Tafel X). Bei einigen Azini, die der Konzentration 10^{-9} mol Caerulein/l und dabei einer BAPTA-Konzentration von 5 μ M ausgesetzt wurden, schien die Schädigung von Occludin und ZO-1 milder auszufallen als ohne Inhibition. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich, dass in diesen Zellen die Anfärbung weniger kondensiert, die dünnen Linien der Azinusgänge genauer konturiert und die Doppelstrukturierung sichtbar geblieben war. Diese Resultate ließen sich jedoch nicht aussagekräftig reproduzieren. Die aus diesen Gründen erfolgte höhere Konzentration des Ca^{2+} -Chelators auf 50 μ M zeigte zudem keine besseren strukturerhaltenden Resultate als die geringere Dosierung. Bei der höher konzentrierten Dosis des Cholezystokinin-Analogs fand sich in keiner der Versuchsreihen eine strukturerhaltende Wirkung durch den Calcium-Chelator.

PKC- α

Nach Vorinkubation mit GÖ6976 zeichneten sich keine Modifikation des Immunfluoreszenzprofils von Occludin oder ZO-1 ab (Tafel XI). Das Anfärbungsbild von Occludin und ZO-1 blieb kontinuierlich und doppelsträngig. Weder bei 10^{-9} noch bei 10^{-6} mol Caerulein/l Medium konnte die Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoenzyme die Disintegration der Proteine aufhalten.

MEK1/2

Die reine Vorinkubation mit PD98059 blieb ohne Auswirkung auf die dargestellten TJ-Proteine (Tafel XII). Nach Caeruleinstimulation erwies sich die Inhibition von MEK1/2 und somit der MAP-Kinasen ERK1/2 als wirkungslos, denn Zeitpunkt und Ausmaß der Proteinveränderungen blieben unverändert.

IV Diskussion

IV.1 Methodische Diskussion

IV.1.1 Die tierexperimentelle akute Pankreatitis

Den klinischen Symptomen der akuten Pankreatitis gehen frühe pathophysiologische Ereignisse voraus [Niederau/Lüthen 1997, Steer 1999]. Die in dieser Arbeit untersuchten Phänomene – die Disintegration der TJ und der Anstieg pankreatischer Enzyme im Serum innerhalb der ersten 30 Minuten bei Erkrankungsbeginn – reihen sich hierbei ein. Ist die Entzündung erst klinisch manifest, ist es für ein kausales Einwirken auf die akute Pankreatitis offenbar zu spät. Manipulationen am Patienten sind daher, vor allem im Frühstadium der Erkrankung, umstritten und eher zu vermeiden, da sie das Risiko von Komplikationen erhöhen können [Dugernier et al. 2003, Mitchell et al. 2003]. Gewebeproben eines erkrankten Menschen zur Untersuchung früher Zeitpunkte der Entzündung können aus diesen und auch aus ethischen Gründen nicht gewonnen werden. Verschiedene Modelle der experimentell induzierten Pankreatitis sind entwickelt worden, um im Tiermodell, sowohl in vitro als auch in vivo, Einblicke in den Ablauf der Frühphase der Pathophysiologie des erkrankten Organs zu erhalten.

Ein häufig – und ebenso hier – verwendetes Modell der tierexperimentellen Pankreatitis ist die durch caerulein-induzierte akute Pankreatitis. Caerulein ist ein Analogon von Cholezystokinin, einem Botenstoff, der von den enterochromaffinen Drüsenzellen des Duodenum produziert und dort nach Nahrungsaufnahme freigesetzt wird. In pankreatischen Azinuszellen entfaltet es seine Wirkung mittels zwei verschiedener CCK-Rezeptoren: Einer mit hoher Affinität (CCK-A-Rezeptor) steuert die pankreatische Sekretion und das Wachstum der Drüse, einer mit geringer Affinität (CCK-B-Rezeptor), welcher durch hohe Dosen von CCK stimuliert wird, ist für das Entstehen einer Pankreatitis und der dabei auftretenden Sekretionsblockade verantwortlich [Niederau et al. 1994, Saluja et al. 1989].

Entwickelt wurde das Caerulein-Modell 1977 von Lampel und Kern. Nach intravenöser Infusion hoher Dosen von Caerulein lassen sich hierbei im exokrinen Pankreas neben der Entstehung entzündlicher Infiltrate auch Veränderungen zytoplasmatischer Strukturen, beispielsweise die Fusion von Vakuolen mit sekretorischen Granula, beobachten. Zudem entwickelt sich innerhalb einer Stunde ein progressives interstitielles Ödem. Dieses Ödem erreicht im Verlauf von zwölf Stunden seine stärkste Ausprägung und ist nach 24 Stunden weitgehend reabsorbiert. Gleichzeitig steigt während der Infusionsdauer die Serumamylase kontinuierlich an [Lampel/Kern 1977]. Die durch Caerulein induzierten histolo-

gischen und biochemischen Auffälligkeiten gleichen dem Bild der humanen ödematös-interstitiellen Pankreatitis [Niederau et al. 1992].

Weitere häufig angewendete experimentelle Modelle, die zur Induktion der akuten Pankreatitis Anwendung finden, sind die Cholin-defiziente-Ethionin-supplementierte-(CDE)-Diät [Lombardi et al. 1975], die retrograde Infusion mit Taurocholat [Niederau et al. 1992] und die biliäre Obstruktion am Opossum [Senninger et al. 1984]. Diese, exemplarisch genannten, verursachen alle einen fulminanter verlaufenden und mit höheren Mortalitätsraten einhergehenden Entzündungsverlauf als das Caerulein-Modell [Niederau et al. 1990, Senninger et al. 1984]. Beim Menschen entspricht das durch diese Methoden verursachte Krankheitsbild der nekrotisch-hämorrhagischen Pankreatitis [Lombardi et al. 1975]. Dementsprechend verursachen sie zwar einige Pathomechanismen, beispielsweise verminderte digestive Enzymsekretion, Segregation digestiver Enzyme und lysosomaler Hydrolasen oder Hyperamylasaemie, die ebenso im Caerulein-Modell zu finden sind [Steer 1992], jedoch treten zudem auch schwere hämorrhagisch-nekrotische Zellschäden auf [Lombardi et al. 1975] – im retrograden Infusionsmodell mit Taurocholat bereits nach 30 bis 60 Minuten [Niederau et al. 1990].

Bei diesen Methoden ist die Pathophysiologie der Erkrankung von Versuchsaufbauten abhängig, die, nicht zuletzt auch in bezug auf die Untersuchung der TJ, aufwendig zu kontrollieren und zu reproduzieren sind. Bei der retrograden Perfusion des exokrinen Pankreas können primäre oder sekundäre Schädigungen der TJ sowohl aufgrund der mit der Methode verbundenen invasiv-operativen Maßnahmen als auch aufgrund der sich im Versuchsverlauf entwickelnden Hypertension in den Azinusgängen nicht ausgeschlossen werden [Niederau et al. 1990, Steer/Meldolesi et al. 1987]. Auch könnten hierbei kontaktbedingte toxische Wirkungen der Infusionslösung die transmembranären Proteine schädigen [Trocha et al. 1999, Dodane et al. 1999]. Ähnliches gilt für das ebenso invasive Modell der Obstruktion von Ductus pancreaticus und Ductus cysticus, bei welchem zudem schwierig zu kontrollierende Gewebsdestruktionen schon frühzeitig einsetzen können [Steer 1992].

Bei der Caerulein-Methode sind des weiteren Störvariablen, die bei den anderen genannten Modellen durch sekundäre, nekrotisch bedingte biochemische Prozesse auftreten können, eher vermeidbar [Lüthen et al. 1995a], da sich hierbei das reversible Bild einer milden, interstitiell-ödematösen Entzündung entwickelt [Lampel/Kern 1977]. So können die frühen Veränderungen der TJ untersucht werden, wenn noch keine allzu großen Zellschädigungen stattgefunden haben, die sich sekundär auch auf die TJ-Proteine und ihr Immunfluoreszenzprofil auswirken könnten. Obschon innerhalb der ersten Stunde ein Abfall von intrazellulärem ATP gemessen werden kann, nimmt die durch Caerulein bedingte Entzün-

derung einen moderaten Verlauf, in dem schwere Zellschäden nicht vor vier bis zwölf Stunden nach Stimulation zu erwarten sind [Lüthen et al. 1995a].

Bei dem Modell der CDE-Diät ist ein Nachteil, dass das Gewicht der Versuchstiere und auch ihr Alter und Geschlecht für das Ausmaß der provozierten Zellschädigung maßgebend sind. Zudem muss zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen eine identische Einnahme der Diät genau gewährleistet sein, da ebenso hierdurch unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung entstehen können [Niederau et al. 1992a]. Diese Unterschiede würden bei der hier diskutierten Fragestellung letztlich den zeitlichen Vergleich der erhaltenen Ergebnisse nahezu unmöglich machen.

Mit Hilfe von Kontrollreihen zeigt sich in dieser Arbeit, dass die Versuchsbedingungen der Caerulein-Methode keinerlei Einfluss auf die hier vorgestellten Ergebnisse haben, denn auch noch 60 Minuten nach der Präparation bleibt im Kontrollmedium das Muster der angefärbten TJ-Proteine im In-vitro- und im In-vivo-Modell unverändert. Die morphologischen Veränderungen der transmembranären TJ-Proteine sind Phänomene, die im Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis bereits innerhalb von fünf Minuten nach Stimulation einsetzen. Die Voraussetzung dafür, dieses frühzeitig bei Erkrankungsbeginn einsetzende Geschehen zu erfassen, ist ein Modell, in dem zeitliche Abläufe gut messbar sind und außerdem die Pathogenese möglichst wenigen beeinflussenden Faktoren unterliegt. Das Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis erweist sich daher bei der hier untersuchten Fragestellung als geeignet: Die Dauer der Stimulationen ist durch vorab festgelegte Zeitpunkte von Wirkstoffinjektion und Organentnahme einer genauen Kontrolle unterworfen. Hierdurch kann der zeitliche Verlauf der Ereignisse zuverlässig beschrieben und verglichen werden. Zum anderen lässt sich die Verabreichung einer identischen Menge des Wirkstoffs für alle Versuchstiere gewährleisten.

Ein weiterer Vorteil des Cholezystokinin-Analogons liegt in der Möglichkeit, sowohl hohe, wirkungsrelevante Dosierungen (supramaximale Stimulation) als auch geringe, zwar sekretorisch maximal stimulierende, jedoch nicht pathogen wirkende Mengen verabreichen zu können (maximale Stimulation) [Kern et al. 1985, Willemer et al. 1992]. Serumenzymanstieg und histologische Schäden entsprechen hierbei der verabreichten Caerulein-Dosis und spiegeln den Ausprägungsgrad der Entzündung wider [Lüthen et al. 1995]. Durch die maximalen Stimulationsreihen, die keine Anzeichen einer Pankreatitis auslösen, kann in dieser Arbeit bewiesen werden, dass im Caerulein-Modell ausnahmslos die Applikation hoher Konzentrationen des Cholezystokinin-Analogons für die untersuchte Pathogenese von Enzymanstieg und veränderter TJ-Morphologie verantwortlich ist. Bei der hohen CCK-Dosierung zeigt sich eine zeitliche Sequenz: Gemessen ab dem Zeitpunkt der Stimulation löst sich zuerst die Struktur der transmembranären und anschließend die der zytoplasmatischen Proteine auf.

IV.1.2 Synopsis zu bekannten initialen Ereignissen im Modell der caerulein-induzierten akuten Pankreatitis

Eine ganze Kaskade verschiedener intra- und extrazellulärer Ereignisse nimmt nach der Stimulation mit Caerulein ihren Lauf. Die frühzeitige Öffnung der parazellulären Verschlussleisten reiht sich dabei in eine Anzahl anderer bisher bekannter, initialer Phänomene der akuten Pankreatitis ein. Die Bedeutung einzelner pathophysiologischer Ereignisse und ihr zeitlicher Ablauf werden zum Teil unterschiedlich beschrieben. Insgesamt ist es jedoch wahrscheinlich, dass die ersten Schritte, die zum Entstehen des Krankheitsbildes führen, in den Azinuszellen einsetzen [Lüthen et al. 1998, Leach et al. 1991].

Frühe Ereignisse der Caeruleinpankreatitis, die innerhalb eines Einwirkzeitraums von 60 Minuten nach Stimulation bisher nachgewiesen werden konnten:

2 Sekunden

- Anstieg von Ca^{2+} (in vitro, 10^{-9} mol/l) [Tsunoda et al. 1990]

5 Sekunden

- Anstieg von DAG (in vitro, 10^{-8} mol/l) [Matozaki/Williams 1989]

30 Sekunden

- Bildung von InsP3 (in vitro, 10^{-9} mol/l) [Bruzzone et al.1988]

1 Minute

- Aktivierung der MEK (in vitro, 10^{-9} mol/l) [Duan et al. 1995]
- Anstieg von p38MAPK (in vitro, 10^{-9} mol/l) [Schäfer et al. 1998]

5 Minuten

- Aktivierung der JNK (in vivo, 10 $\mu\text{g/kg KG/h}$) [Dabrowski et al. 1996]
- Aktivitätsmaximum der ERK1/2 (in vitro, 10^{-9} mol/l) [Duan et al. 1994]
- Beginnende Degradation von Occludin und Claudin-1 (in vivo, 50 $\mu\text{g/kg KG/h}$)

10 Minuten

- Intraazinäre Trypsinogenaktivierung (in vitro, 10^{-8} mol/l und in vivo 5 $\mu\text{g/kg KG/h}$) [Saluja et al. 1997, Grady et al. 1996]
- Beginnende Fusion von Zymogengranula (in vivo, 5 $\mu\text{g/kg KG/h}$) [Adler et al. 1982]
- Abnahme der Proteinsynthese um ca. 25% (in vivo, 50 $\mu\text{g/kg KG/h}$) [Sans et al. 2003]
- Beginnende Degradation von Occludin, Claudin-1 und ZO-1 (in vitro, 10^{-6} mol/l)

15 Minuten

- Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappa B/Rel im Zellkern (in vivo, 40 µg/kg KG/h) [Steinle et al. 1999]
- Erhöhte Aktivität von Cathepsin B (in vivo, 5 µg/kg KG/h) [Grady et al. 1996]
- Lipase im Serum signifikant angestiegen (in vivo, 50 µg/kg KG/h)

20 Minuten

- Amylase im Serum signifikant angestiegen (in vivo, 50 µg/kg KG/h)

30 Minuten

- Aktivierung der ERK1/2 (in vivo, 5 µg/kg KG/h) [Clemons et al. 2002]
- Aktivitätsmaximum der JNK (in vivo, 10 µg/kg KG/h) [Dabrowski et al. 1996]
- Trypsinaktivität ist intraazinär stark erhöht (in vitro, 10⁻⁸ mol/l) [Hofbauer et al. 1998]
- LDH-Release (in vitro, 10⁻⁷ mol/l) [Grady et al. 1998]
- Drastische Abnahme des Volumendurchflusses in den sekretorischen Pankreasgängen (in vivo, 5 µg/kg KG/h) [Adler et al. 1982]
- Lichtmikroskopische Degradation der Strukturen von ZO-1 und F-Aktin (in vivo, 5 µg/kg KG/h und in vivo, 50 µg/kg KG/h), β-Tubulin (in vivo, 10 µg/kg KG/h), E-cadherin und β-Catenin (in vivo, 10 µg/kg KG/h) [Fallon et al. 1995, Jungermann et al. 1995, Lerch et al. 1997]
- Serumamylase um 119% und Serumlipase um 137% angestiegen (in vivo, 50 µg/kg KG/h)
- Fast vollständiger Schwund von Occludin und Claudin-1 in der Immunhistochemie (in vivo, 50 µg/kg KG/h)

60 Minuten

- Lichtmikroskopisch sichtbare Vakuolenbildung [Lüthen et al. 1995a]
- Elektronenmikroskopisch sichtbare Degeneration zellulärer Organellen; intraazinär ist der Gehalt von ATP um 38% und Glutathion um 47% abgefallen [Lüthen et al. 1995a]
- Elastase und Trypsin im Pankreasgewebe sind signifikant angestiegen (in vivo, 50 µg/kg KG/h) [Lüthen et al. 1995a]
- Pankreatisches Ödem (in vivo, 5 µg/kg KG/h) [Grady et al. 1996]
- Immunhistochemisches Färbemuster von Occludin und Claudin-1 ist komplett degradiert (in vivo, 50 µg/kg KG/h)

Anmerkung: Alle hier aufgeführten Daten sind bei tierexperimentellen Versuchen mit Maus oder Ratte entstanden. Die in dieser Arbeit vorgestellten eigenen Ergebnisse sind zur Hervorhebung unterstrichen abgedruckt.

IV.2 Thematische Diskussion

IV.2.1 Die Bedeutung der Tight-Junctions im exokrinen Pankreas

In dieser Arbeit richtet sich das Interesse auf die Bedeutung der TJ und im Besonderen auf ihre Barriere bildenden transmembranären Proteine im exokrinen Pankreas. Die wesentliche Aufgabe der aus Occludin und der Familie der Claudine gebildeten TJ-Stränge ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, der Verschluss des intramembranösen Raumes und die Aufrechterhaltung einer Diffusionsbarriere innerhalb des parazellulären Weges [Fanning et al. 1999].

Eine klinisch relevante Funktionalität der TJ ist bereits für andere Organe erkannt worden [Fries et al. 1999, Mazzon et al. 2002]. Ein Beispiel hierfür sind die TJ epithelialer Zelllinien, die dem Kot von Hausstaubmilben oder der darin enthaltenen Protease „Der p 1“ ausgesetzt werden: Die mit der Protease in Berührung gekommenen TJ spalten sich reversibel auf; in Folge erhöht sich die parazelluläre Permeabilität und schädigende Allergene passieren die transmembranäre Epithelbarriere. Dieser Prozess kann ein entscheidender initialer Schritt bei der Entstehung allergischen Asthmas sein und es ist wahrscheinlich, dass „Der p 1“ hierbei über spezifische Spaltungsstellen wirkt, die sich in den extrazellulären Schleifen von Occludin und Claudin-1 befinden [Wan et al. 1999].

Der Zusammenhang von erhöhter parazellulärer Permeabilität zwischen pankreatischen Azinuszellen und der akuten Pankreatitis ist in verschiedenen Untersuchungen belegt worden:

Bei der Ligatur des bilio-pankreatischen Gangs im Opossum entwickelt sich eine zeitliche Abfolge von Ereignissen: Zuerst, innerhalb der ersten drei Stunden, reißt das apikale Plasmalemma in den Azinuszellen auf, danach, innerhalb von sechs Stunden, kommt es zu einem pankreatischen Ödem und zu einer Hyperamylasämie und innerhalb von zwölf Stunden entstehen schließlich Hämorrhagie, entzündliche Zellinfiltrationen und Azinuszellnekrosen [Lerch et al. 1992]. Die Perfusion einer Mischung aus Gallensalzen und pankreatischen Enzymen in die Bauchspeicheldrüse lässt in den Pankreasgängen die Permeabilität für Moleküle bis hin zu der Größe von pankreatischen Verdauungsenzymen ansteigen [Lüthen et al. 1993]. Bei intravenöser Gabe von Ethanol ist eine akute, ödematöse Pankreatitis sogar nur dann provozierbar, wenn gleichzeitig eine erhöhte Gangpermeabilität vorhanden ist. Es wird daher angenommen, dass die Verdauungsenzyme durch den Übertritt von den Pankreasgängen in das umliegende Parenchym die akute Entzündung des Organs hervorrufen [Harvey et al. 1988]. De facto lässt Ethanol die parazelluläre Permeabilität zwischen pankreatischen Gangzellen ansteigen [Rotoli et al. 2004]. Für diesen Übertritt muss eine Veränderung der intrazellulären Verschlussleisten stattfinden.

Ebenso wie in anderen Organen übernehmen die TJ auch im exokrinen Pankreas die Abgrenzung luminaler Inhalte – hier Verdauungssekret in den Pankreasgängen – von interstitiellen Kompartimenten und man weiß mittlerweile, dass sie dabei einer morphologischen Dynamik unterliegen [Akao et al. 2000]. Entsprechend der hier vorgestellten Ergebnisse zeigen Fallon et al., dass das immunhistochemische Färbemuster der TJ assoziierten Proteine ZO-1 und F-Aktin 30 Minuten nach supramaximaler Caeruleinstimulation kondensiert und verklumpt. Zugleich weisen sie zwischen den stimulierten Azinuszellen einen Anstieg der zellulären Permeabilität für Meerrettichperoxidase nach [Fallon et al. 1995]. Diese hat ein Molekulargewicht (MW) von 44.000 D [Kuijpers et al. 1985]; so dass infolge der Caeruleinstimulation ebenso pankreatische Verdauungsenzyme in das Interstitium gelangen können (MW einiger pankreatischer Enzyme: Trypsin 25.000 D, Chymotrypsin 24.000 D, Phospholipase A₂ 14.000 D, Amylase 50.000 D [Lüthen et al. 1993]. Allerdings bleibt offen, zu welchem genauen Zeitpunkt dieser Permeabilitätsanstieg einsetzt, und es besteht die Frage, ob sich die Permeabilität bereits vor oder erst nach den Modifikationen von ZO-1 und F-Aktin erhöht hat [Fallon et al. 1995]. Andere Autoren bestätigen im Caerulein-Modell die Kondensation zytoskelettalen F-Aktins ab 30 Minuten nach Stimulation [Jungermann et al. 1995] und heben in diesem Zusammenhang hervor, dass den TJ und ihren Proteinen die interstitielle Verschlussfunktion unterliegt [Lerch et al. 1997]. Es sind Occludin und die Claudine, die in Epithel- und Endothelzellen die Schlüsselfunktion für die Abgrenzung von apikaler und basolateraler Membrandomäne und für die Entstehung der parazellulären Diffusionsbarriere haben [González-Mariscal et al. 2003, Mitic et al. 2000, Tsukita/Furuse 1999, Wachtel et al. 1999]. Über Bedeutung und Reaktion dieser transmembranären Proteine bei der akuten Pankreatitis lagen bislang keine Daten vor.

Elektronenmikroskopisch wurde bereits 1978 nachgewiesen, dass nach der Ligation des Ductus pancreaticus die parazelluläre Permeabilität zwischen den Azinuszellen zunimmt und eine Verbindung zwischen Kompartimenten des Pankreassaftes und dem interstitiellen Raum entsteht. Parallel zu dem durch die Ligation bedingten Anstieg des intraluminalen Drucks, verändert sich das Gefüge der luminalen Membranoberfläche und der Zonulae occludentes: Die Anzahl der intramembranösen TJ-Stränge verringert sich und im System dieser Stränge entwickeln sich Diskontinuitäten [Metz et al. 1978]. Ebenso nimmt nach cholinergischer Stimulation mit Carbachol die Anzahl der TJ-Stränge in pankreatischen Azini ab. Dieser Prozess geht einher mit dem Eintritt von Meerrettichperoxidase in den interstitiellen Raum [Kuijpers et al. 1985]. Heute weiß man, dass sich diese Stränge aus den intramembranären Schleifen von mindestens drei TJ-Proteinen zusammensetzen: Occludin, Claudin und JAM [Anderson 2001].

In den hier besprochenen In-vivo-Versuchen kondensiert das immunhistochemische Färbemuster der integralen Membranproteine Occludin und Claudin-1 schon nach 5-10 Minuten. Ihre Disintegration schreitet erhöhten Serumaktivitätswerten pankreatischer Verdauungsenzyme voraus. Die Aktivität von Lipase und Amylase im Serum der Versuchstiere steigt innerhalb eines Zeitraumes von 15 bzw. 20 Minuten signifikant an. Die morphologischen Veränderungen von F-Aktin und ZO-1 folgen diesen Ereignissen erst später, nämlich ab 30 Minuten nach Stimulation. Die Ergebnisse sprechen deshalb für eine zeitliche Sequenz der zytoskelettalen und junctionalen Veränderungen, die mit dem Aufreißen von Occludin und Claudin-1 ihren Beginn nimmt und erst danach, etwa 15-20 Minuten später, bei den TJ-assoziierten Proteinen fortgesetzt wird.

Zwar findet sich in den In-vitro-Versuchen nicht diese differierende zeitliche Sequenz, doch bestätigen sich insgesamt auch hier die sehr frühen strukturellen Modifikationen der TJ-Proteine. Es muß diesbezüglich bedacht werden, dass bei der Immunzytochemie bereits durch den Prozess der Zellisolation eine Dedifferenzierung der Azinuszellen und auch der junctionalen Zellverbindungen auftreten kann [Metz et al. 1977, DeLisle/Logsdon 1990]. Beispielsweise ist die basale Amylasefreisetzung in In-vitro-Versuchen größer als im In-vivo-Modell, da durch den Prozess der Zellpräparation selbst vermehrt Pankreasenzyme aus hierbei geschädigten Azinuszellen freigesetzt werden [Niederau et al. 1990]. Dies könnte sich auf die untersuchten TJ-Proteine in Form einer sich rasch generalisierenden Schädigung auswirken, welche die rein intrazellulären Proteine ZO-1 und F-Aktin ebenso beinhaltet wie die transmembranären Strukturen. Die Überlegenheit des In-vivo-Modells besteht somit vor allem darin, dass sich das Bild der humanen ödematösen Pankreatitis widerspiegelt und dies ohne dass hierbei durch eine Zellisolation sekundär bedingte Azinuzellschäden auftreten [Niederau et al. 1992].

Aus der frühzeitig beginnenden Disintegration der transmembranären Proteine und der daraus entstehenden erhöhten parazellulären Permeabilität [Wan et al. 2001, Schmitt et al. 2001, Stevenson 1999] ergibt sich die Möglichkeit, dass schädigende Substanzen aus dem Pankreasgangsystem in das Interstitium und in den vaskulären Raum der Drüse gelangen können. Hierbei handelt es sich dann vor allem um die aggressiven Verdauungsenzyme des Pankreas, denn in Azinuszellen ist in vitro bereits innerhalb von zehn Minuten nach Caeruleinstimulation Trypsinogen aktiviert. Trypsinogen wiederum aktiviert die in den Zymogengranula vorliegenden Vorstufen der Verdauungsenzyme [Saluja et al. 1997].

Im Serum der Versuchstiere ist die Enzymaktivität von Amylase und Lipase bereits nach 10 bzw. 15 Minuten *p.s.* signifikant angestiegen. Doch die strukturelle Auflösung von Claudin-1 und Occludin setzt bereits zehn Minuten zuvor ein. Diese Daten sprechen dafür, dass der Verlust des parazellulären Zaunes den Übertritt pankreatischer Enzyme in den Blutkreislauf bedingt, indem die aktivierten Verdauungsenzyme vom Pankreasgang-

system in das interstitielle Drüsenparenchym übertreten können. Hierin könnte zudem die Erklärung für die Ödembildung des Organs und die Abnahme des pankreatischen Volumendurchflusses in den Pankreasgängen bei der akuten Pankreatitis liegen [Metz et al. 1978, Fallon et al. 1995, Akao et al. 2000]. Schließlich ist es die destruktive Wirkung der organeigenen Enzyme, die zur Entzündung und Zerstörung pankreatischen Gewebes im Verlauf der Pankreatitis führt [Lüthen et al. 1993, Sata et al. 1996]. Die hier nachgewiesenen sehr frühzeitigen Veränderungen der transmembranären Proteine können hierbei ein entscheidender Faktor sein, da hierdurch die organeigenen Enzyme ihre proteolytische Wirkung im Drüsenparenchym entfalten können.

So richtet sich in dieser Arbeit das besondere Interesse den beiden transmembranären Proteinen Occludin und Claudin-1.

IV.2.2 Die Bedeutung der einzelnen Tight-Junction-Proteine im Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis

In den hier vorgestellten Versuchen findet sich nach hoch dosierter Caeruleinstimulation immunmikroskopisch eine Modifikation der strukturellen Anordnung der TJ-Proteine und von F-Aktin in Form einer zeit- und dosisabhängigen zunehmend ungeordnet erscheinenden, unkontinuierlichen und plumpen Zusammenballung der Färbesignale. Der Western Blot zeigt innerhalb von zehn Minuten eine simultane Mengenabnahme von Occludin und Claudin-1. Es ergibt sich hieraus die Frage, welcher Prozess den Veränderungen des angefärbten Proteinmusters zugrunde liegt.

Möglich ist, dass eine Modifikation des Verteilungsmusters der Proteine stattfindet und zwar von apikal nach basolateral bzw. in den zytoplasmatischen Raum. Elektronenmikroskopisch ist in pankreatischen Azinuszellen beobachtet worden, dass sich beispielsweise F-Aktin infolge einer hohen Caeruleinstimulation (in vivo) im perijunktionalen Zytoplasma, aber auch basolateral akkumuliert und hierbei in der Immunchemie verklumpt und aggregiert darstellt [Fallon et al. 1995, Lerch et al. 1997, Torgerson/Mc Niven 1998]. In menschlichen durch Morbus Crohn inflammatorisch geschädigten Darmepithelzellen sind Occludin und ZO-1 statt am apikalen Zellpol ebenfalls nach basolateral und auch in die extrazelluläre Lamina propria disloziert [Oshitani et al. 2005]. Gegen diese These spricht hier jedoch die erhebliche Mengenabnahme der transmembranären Proteine in den Western-Blots. Es ist unwahrscheinlich, dass in den verwendeten Zelllysaten nach intrazellulär oder basolateral umverteiltes Claudin und Occludin nicht mehr detektiert wird.

Alternativ muß bedacht werden, dass die Caeruleinstimulation eine Abnahme der zellulären Proteinsynthese bedingt, welche zu einem Abbau der untersuchten Proteine führen kann. Tatsächlich wird im Caeruleinmodell bereits ab einem Zeitraum von zehn

Minuten *p.s.* eine generelle Hemmung der zellulären Proteinsynthese um ca. 25% beschrieben (in vivo, 50 µg/kg KG/h) [Sans et al. 2003]. Allerdings ist dieser These entgegenzustellen, dass im Western-Blot die Molekülmasse der TJ-Proteine nach Ablauf von 60 Minuten wieder zunimmt, wohingegen die Proteinsynthese zu diesem Zeitpunkt weiterhin gehemmt bleibt [Sans et al. 2003]. Um zu differenzieren, welchem Mechanismus die hier gefundenen Veränderungen der TJ-Proteine unterliegen, wären daher weitere Untersuchungen erforderlich, beispielsweise eine elektronenmikroskopische Darstellung von Claudin und Occludin im zeitlichen Verlauf nach Caeruleinstimulation.

Am wahrscheinlichsten bleibt bei Betrachtung der hier vorliegenden Daten, dass es infolge der caerulein-induzierten Pankreatitis zu einem raschen Abbau der untersuchten TJ-Proteine kommt. Hierfür sprechen die Mengenabnahme der Proteine im Western Blot als auch die zunehmende Abnahme der Färbesignale in der Immunchemie.

Die transmembranären Proteine Occludin und Claudin

Die Proteine Occludin und Claudin-1 wurden den zytoplasmatischen Anteilen der TJ bisher als eine Art transmembranäre Einheit gegenübergestellt. Doch obschon die Disintegration der transmembranären Proteine simultan einsetzt, ist eine differenzierte Betrachtung beider Proteine erforderlich, um die Struktur und Funktion der TJ zu verstehen. Eine zeitgleiche Reaktion beinhaltet nicht, dass beide im gleichen Maße für die Regulation der parazellulären Diffusionsbarriere verantwortlich sind. Es stellen sich hierbei vor allem die Fragen, ob einem von beiden die Rolle als das entscheidende Sealing-Protein im exokrinen Pankreas zukommt und welches von beiden die Information zur Öffnung der Barriere aufnimmt und weiterleitet.

Grundsätzlich ist für beide Proteine nachgewiesen worden, dass sie innerhalb des TJ-Komplexes funktionale Aufgaben übernehmen. Occludin hat sich in verschiedenen Experimenten, bei denen zum Teil strukturelle Mutationen dieses Proteins in TJ eingeführt wurden, als wichtige Komponente der parazellulären Barriere herausgestellt:

So steigt die parazelluläre Durchlässigkeit an, wenn im Occludin das C-terminale Ende entfernt wird [Balda et al. 1996, Chen et al. 1997]. Der transepitheliale Widerstand (TER) verringert sich und zugleich erhöht sich der parazelluläre Durchfluss niedermolekularer Marker (MW hier: 4.000 D), wenn das N-terminale Ende und extrazelluläre Schleifen fehlen [Bamforth et al. 1999]. Ebenso durch den Einbau eines synthetischen Peptids, das der zweiten extrazellulären Schleife von Occludin entspricht, nimmt der TER ab und parallel hierzu steigt die parazelluläre Permeabilität für Moleküle (Dextran) bis zu einer Größe von 40.000 D an [Wong/Gumbiner 1997], welche vergleichbar mit der Molekülmasse pankreatischer Verdauungsenzyme ist [Lüthen et al. 1993]. Ebenso ist die Gruppe der Claudine für die parazelluläre Diffusionsbarriere wichtig: Eine Über-

expression von Claudin-1 bewirkt eine Anhebung des TER, allerdings mit unterschiedlich beschriebenen Auswirkungen auf die parazelluläre Passage von Mannitol [McCarthy et al. 2000, Inai et al. 1999].

Am Rande bemerkt sei, dass sich für die Claudine, im Gegensatz zu Occludin, konkrete klinische Relevanzen herausgestellt haben. Klinisch-experimentelle Studien verdeutlichen, dass die gesamte Claudin-Familie für die Aufgaben der Zonulae occludentes von fundamentaler Bedeutung ist [Tsukita/Furuse 2002]:

So sind Mutationen von Claudin-14 ursächlich für die autosomal rezessiv vererbare Taubheit; vermutlich deshalb, weil hierdurch die Permeabilität der Verschlussleisten im Corti-Organ erhöht ist und dadurch das Ionengleichgewicht in der Cochlea zerstört wird [Wilcox et al. 2001]. Das Fehlen von TJ-Strängen zwischen Myelin- und Sertoli-Zellen geht einher mit verzögerter axonaler Übertragung und verursacht durch Deletion von Claudin-11 männliche Sterilität [Gow et al. 1999]. Bei Mutationen von Claudin-16, Paracellin, entsteht die hereditäre Hypomagnesiämie, hierbei ist die Reabsorption von Magnesium im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife erniedrigt [Simon et al. 1999] und Claudin-1 defiziente Mäuse leiden an einer mangelhaften parazellulären Barriere in der Epidermis [Furuse et al. 2002].

Bezogen auf die Struktur der TJ ist die Familie der Claudine die wichtigere transmembranäre Verschlusskomponente in den TJ. Die, je nach Gewebe variierende, Anzahl verschiedener Claudine und das entsprechende Zusammenspiel unter diesen [Furuse et al. 1999] sollen für organ- bzw. epithelspezifische Unterschiede in der parazellulären Leitfähigkeit, der selektiven Permeabilität [Heiskala et al. 2001, Colegio et al. 2002] und der Festigkeit der TJ [Furuse et al. 2001] verantwortlich sein. Im Gewebe des exokrinen Pankreas sind bisher Claudin-2 in den TJ von Gangepithel, Claudin-5 in den TJ von Azinuszellen und die Claudine-1, -3, und -4 in denen beider Gewebe nachgewiesen worden [Rahner et al. 2001]. Claudin-1 wurde in den hiesigen Versuchen stellvertretend für die Familie der Claudine ausgewählt.

Obwohl Occludin Einfluss auf den TER und die parazelluläre Barriere nimmt, bestehen Zweifel, ob es für die Verschlussfunktion der Zonulae occludentes tatsächlich unentbehrlich ist, denn Occludin defiziente Stammzellen können sich zu polarisierten Zellen ausbilden und dabei TJ mit parazellulärer Grenzfunktion produzieren [Saitou et al. 1998]. Zusätzlich stellte sich bei Occludin-knock-out-Mäusen (mit Occludin negativem Phänotyp) heraus, dass die TJ dieser Tiere intakt bleiben. Es lassen sich bei ihnen weder auffällige Unterschiede in der Anzahl der TJ-Stränge noch Beeinträchtigungen epithelialer Grenzfunktionen im Intestinum nachweisen. Dennoch deutet sich bei diesen Versuchstieren ebenso an, dass Occludin nicht gänzlich irrelevant ist: Bei einigen Mäusen fallen nämlich

Abnormalitäten wie Wachstumsstörungen, testikuläre Atrophie oder chronische Inflammation und Hyperplasie des gastrischen Epithels auf [Saitou et al. 2000]. Insgesamt ist Occludin im Gegensatz zu den Claudinen wahrscheinlich weniger für die Struktur als vor allem für die Funktionalität der TJ bedeutsam. Als Phosphoprotein übernimmt Occludin regulatorische Aufgaben innerhalb des TJ-Komplexes [Hirase et al. 2001, Kale et al. 2003].

Ein ineinandergreifendes Zusammenspiel von Struktur und Funktion der beiden transmembranären Proteine ist somit anzunehmen. Folgende Versuche weisen in diesem Zusammenhang in die entsprechende Richtung:

Nach Expression von Chimären in MDCK-Zellen, die mindestens eine transmembranäre Domäne von Occludin enthalten, ist eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation von Claudin-4 festzustellen [Balda et al. 2000]. In Fibroblasten, die keine TJ besitzen, induzieren Claudin-1 und -2 ebenso wie Occludin Zelladhäsion. Die Claudine bilden dabei transmembranöse Stränge, die zahlreicher und länger sind als jene, die durch Occludin induziert werden. Bei gleichzeitiger Transfektion von Occludin und Claudin-1 kopolymerisieren allerdings die Stränge beider Proteine, indem Occludin in die auf Claudin-1 basierenden Stränge eingebaut wird [Furuse et al. 1998a].

In dem in dieser Arbeit angewendeten Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis fällt bei den immunhistochemischen Anfärbungen und ebenso im Western Blot auf, dass sowohl für Occludin als auch für Claudin-1 eine gleich- und frühzeitige Modifikation innerhalb des TJ-Komplexes stattfindet. Es lässt sich, vor allem in Hinblick auf den zeitgleichen Beginn ihrer Veränderungen, nicht feststellen, ob einem der beiden Proteine eine führende Rolle für die Verschlussfunktion der TJ im exokrinen Pankreas zukommt. Dennoch unterstützt ihre zeitgleiche Disintegration, welche der übrigen untersuchten Proteine vorausgeht, die These, dass beide transmembranäre Proteine wesentliche Komponenten für die durch TJ gebildete parazelluläre Barriere in pankreatischen Azini sind. Ihre zeitgleiche Reaktion liegt vermutlich in der oben beschriebenen strukturellen und funktionalen Kopplung begründet.

Bei isolierten Azinuszellen, hier vor allem in den Kontrollfärbungen, kann Claudin-1 im Gegensatz zu Occludin nicht nur an der apikalen sondern auch an der basolateralen Membran nachgewiesen werden [Rahner et al. 2001]. Hierin könnten sich Wege des intrazellulären zielgerichteten Proteintransportes zur Zellmembran widerspiegeln. Andererseits kann das unterschiedliche Verteilungsmuster von Claudin-1 in isolierten Azinuszellen und pankreatischem Gewebe durch den Prozess der Zellisolation hervorgerufen worden sein [Metz 1977], zumal eine durch den Isolationsprozess hervorgerufene Dedifferenzierung von Azinuszellen bekannt ist [De Lisle/Logsdon 1990]. So kann die

basolaterale Lokalisation des eigentlich transmembranären Claudin-1 in einer durch die Methode bedingten Umverteilung des Strukturproteins zur Plasmamembran begründet sein. Nicht zuletzt muss bedacht werden, dass bei der Zellisolation zelluläre Signalwege wie beispielsweise die p38 MAP-Kinase aktiviert werden können [Blinman et al. 2000] und sich manche von diesen auf den Zusammenbau der TJ auswirken [Marzesco et al. 2002, Chen et al. 2000].

Die TJ-assoziierten Proteine ZO-1 und F-Aktin

Bei den In-vitro-Stimulationen traten die Modifikationen der Färbeprofile von Occludin, Claudin-1 und ZO-1 zeitgleich auf. Diese frühe Disintegration von ZO-1 in den isolierten Azinuszellen kann durch seine Eigenschaften als Signalprotein hervorgerufen worden sein [Kim 1995]. Aufgrund des Verfahrens, mit dessen Hilfe die Azinuszellen gewonnen werden, entstehen Veränderungen an junctionalen Proteinen [Metz et al. 1977]; diese könnten sich auf den funktionellen Status von Signalproteinen wie ZO-1 auswirken und eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der in vitro und der in vivo durchgeführten Untersuchungen sein. Mit Hilfe der hier angewandten Untersuchungsmethoden konnten allerdings in vivo keine morphologischen Veränderungen von ZO-1 nachgewiesen werden, die denen der transmembranären Proteine vorausgeschritten wären, sondern hier resultierte die oben beschriebene zeitliche Sequenz in der Reaktion der transmembranären und der zytoplasmatischen Proteine.

ZO-1 ist ein Protein der MAGUK-Gruppe. Proteine dieser Gruppe sind definiert durch charakteristische Domänen (PDZ-Domänen, src homologe Domäne und GUK-Domäne) [Stevenson et al. 1986], die als Proteinbindungsstellen dienen und die an Interaktionen (signaling) zwischen verschiedenen zellulären Proteinen beteiligt sind [Kim 1995, Fanning/Anderson 1999]. ZO-1 hat eine Verbindung zu ZO-2 und ZO-3 [Wittchen et al. 1999], zum Zytoskelett [Fanning et al. 2002], zu den Adhaerens Junctions [Itoh et al. 1997] und auch zu den TJ [Furuse et al. 1994]. Innerhalb dieser Verbindungen ist es für die hier besprochene Arbeit wichtig, dass die GUK-Domäne von ZO-1 mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne von Occludin [Furuse et al. 1994], und seine erste PDZ-Domäne mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne der verschiedenen Claudine interagiert [Itoh et al. 1999]. Außerdem beinhaltet die C-terminale Hälfte von ZO-1 eine Aktin-Bindungsstelle, so dass ZO-1 die transmembranären Proteine der TJ mit dem Zytoskelett verbindet [Fanning et al. 1998].

Funktionell ist ZO-1 zum einen für die Lokalisation und den Einbau von Occludin in die TJ bedeutsam [Mitic et al. 1999]. Es wird ihm außerdem eine Schlüsselrolle als Verbindungsglied zwischen den transmembranären TJ-Proteinen und dem Zytoskelett zugesprochen [Anderson/van Itallie 1995]. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob über

die hierdurch entstehenden Interaktionen zwischen Zytoskelett und transmembranären Proteinen die Öffnung der parazellulären Barriere reguliert wird [Anderson/van Itallie 1995, Mitic et al. 1998]. Jedoch existiert ebenso eine direkte Interaktion zwischen Occludin und F-Aktin [Kojima et al. 1999, Wittchen et al. 1999] und bei einer Phosphorylierung von Occludin nimmt die Menge der daran gebundenen ZO-Proteine signifikant ab, wohingegen die Bindungen mit F-Aktin nahezu unverändert bleiben. Es ist daher ebenso möglich, dass ein Aufreißen der TJ durch eine solche Tyrosin-Phosphorylierung von Occludin getriggert wird [Kale et al. 2003].

Es bleibt zu bemerken, dass ZO-1 häufig als Markerprotein für die TJ benutzt und seine Degradation mit einer Veränderung des gesamten TJ-Komplexes gleichgesetzt wird. Dennoch bleiben die Claudine und Occludin die für die Bildung der transmembranösen Barriere entscheidenden Proteine [Fanning et al. 1999a, Lacaz-Vieira et al. 1999, Wachtel et al. 1999]. Ebenso wie im exokrinen entzündlich erkrankten Pankreas nimmt beispielsweise bei entzündlichen Darmerkrankungen die Permeabilität zwischen den Epithelzellen von Duodenum oder Ileum signifikant zu. In der immunhistochemischen In-vivo-Untersuchung von Gefrierbruchschnitten zeigt sich in diesen Darmabschnitten, dass in den entzündlich veränderten Zellen die TJ-Proteine ZO-1 und Cingulin keiner Modifikation unterliegen, wohingegen das Färbeprofil Occludins irregulär und zerrissen erscheint. Es wird auch hier das transmembranäre Occludin für die mit der Entzündung einhergehende erhöhte parazelluläre Permeabilität verantwortlich gemacht [Fries et al. 1999].

Das zytoskelettale Protein F-Aktin hat in exokrinen Zellen auf Sekretion, Exozytose und dabei stattfindender Membranfusion regulierenden Einfluss. [Muallem et al. 1995, Burnham/Williams 1982]. In pankreatischen Azini wird nach supramaximaler Stimulation mit Cholezystokinin das Zerreißen von apikalem Aktin und ebenso von ZO-1 beobachtet [Jungermann et al. 1995, Fallon et al. 1995]. So kann bei Pankreatitis eine Umordnung von apikalem F-Aktin bedeutsam sein, indem hierdurch bei Entzündungsbeginn die azinäre Sekretion und die Einstrukturierung von Zymogengranula inhibiert wird [Valentijn et al. 1999, Jungermann et al. 1995]. Dennoch bleibt die exakte Funktionalität von Aktin in gewisser Weise noch unklar, da sich apikales Aktin in Folge einer Überstimulation mit Cholezystokinin nicht am oberen Zellpol sondern vor allem basolateral ansammelt und reorganisiert [Torgerson/McNiven 1998].

In einigen Studien zeigt sich nach dem Aufreißen von Aktin eine erhöhte Permeabilität der Zonulae occludentes, dies an unpolarierten Säugetierzellen bzw. an humanen intestinalen Epithelzellen [Nusrat et al. 1995, Youakim et al. 1999]. Aus diesem Zusammenhang ergibt sich die Vermutung, dass die Kontraktion zytoskelettaler Elemente die Degradation an sie gekoppelter transmembranärer Proteine veranlasst [Kojima et al. 1999, Madara 1998].

Da in der hier vorgestellten Arbeit die Modifikation der transmembranären Proteine und auch die Anstiege der Serumenzyme Amylase und Lipase der strukturellen Umbildung von F-Aktin im In-vivo-Modell vorausschreiten, sollte eine vom Zytoskelett unabhängige Degradation der transmembranären TJ-Proteine ebenso in Betracht gezogen werden.

Hierfür sprechen einige Daten; so besteht beispielsweise im intestinalen Epithel von Patienten mit Morbus Crohn eine Dislokation von Occludin ohne nachweisbare Veränderungen F-Aktins – einhergehend mit erhöhter parazellulärer Permeabilität und alterierter Immunantwort [Oshitani et al. 2005]. Bei In-vitro-Versuchen mit Hepatozyten bedingt eine strukturelle Modifikation Aktins zwar den Verlust von Occludin aus der zellulären Grenzregion, jedoch bleiben die für die Verschlussfunktion wesentlichen TJ-Stränge dabei unverändert [Kojima et al. 1999]. In Endothelzellen zeigt sich, dass Occludin die Lokalisation von Aktin beeinflussen kann [Atsumi et al. 1999, Kuwabara et al. 2001]. Im Hinblick darauf ist von weiterem Interesse, dass einige Autoren nachweisen konnten, dass Modifikationen des transmembranösen Occludins die parazelluläre Permeabilität unabhängig vom Zytoskelett regulieren können [Hirase et al. 2001]. Tatsächlich kann Occludin jene Bindungsproteine koordinieren, von denen man annahm, dass diese die Struktur der TJ modulieren würden [Nusrat et al. 2000].

Unter Berücksichtigung dieser Daten sprechen die hier vorliegenden Ergebnisse dafür, dass im Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis die Degradation der transmembranären Anteile der TJ und die von ihnen aufrechterhaltene parazelluläre Permeabilität weder von einem Aufreißen des kontraktilen Zytoskeletts noch von einer durch ZO-1 vermittelten Steuerung abhängig sein müssen.

Letztlich können durch die in dieser Arbeit gemessene zeitliche Sequenz der Protein-Disintegration nach Caerulein-Stimulation nicht automatisch Rückschlüsse auf die hierbei stattfindenden Proteininteraktionen der vorgestellten Proteine gezogen werden. Dennoch wird zum ersten mal nachgewiesen, dass die immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Veränderungen der TJ-Proteine bei der akuten Pankreatitis bei den transmembranären Proteinen beginnen.

Eine Erklärung der hier beschriebenen Prozesse könnte in einer Modifikation Occludins durch eine Phosphorylierung liegen. Occludin hat als Phosphoprotein eine Schlüsselfunktion innerhalb des TJ-Komplexes [Andreeva et al. 2001, Farshori/Kachar 1999, Wong 1997, Sakakibara et al. 1997] und es kann seine Funktion innerhalb der parazellulären Barriere nicht nur vom Zytoskelett unabhängig regulieren [Hirase et al. 2001, Clarke et al. 2000] sondern auch mit Auswirkung auf das Zytoskelett [Yu et al. 2005].

IV.2.3 Die Signaltransduktion im Modell der caerulein-induzierten Pankreatitis

Die Öffnung der parazellulären Barriere kann, wie in Kapitel IV.2.1. diskutiert, ein für die Pathophysiologie der akuten Pankreatitis entscheidendes Ereignis sein. Wie in der Einleitung bereits dargestellt, ist für die Reaktion auf eine Stimulation mit CCK die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade erforderlich (Abb. 5). Mit Hilfe von Stimulationsreihen wurde das Modell der Immunhistochemie angewendet, um durch die hierdurch ermöglichte Darstellung reaktiver Veränderungen der TJ-Proteine indirekt Erkenntnisse über die Signaltransduktion im exokrinen Pankreas zu gewinnen.

Calcium

Nach supramaximaler Caerulein-Stimulation kann intrazellulär ein sofortiger Anstieg der freien zytosolischen Kalziumkonzentration gemessen werden (innerhalb von 1-2 sec. von ca. 100 nM im unstimulierten Zustand auf 500-1000 nM), der rasch auf ein Niveau von 150-200 nM abfällt. Diese Konzentration bleibt für den weiteren Zeitraum der CCK-Stimulation relativ konstant. Bei maximaler Stimulation entstehen Calciumoszillationen, deren Frequenz und Amplitude sich mit der Verabreichung steigender Caeruleindosen erhöhen [Tsunoda et al. 1990]; doch nicht alleine die Höhe sondern vor allem auch Dauer und Ursprung des Ca^{2+} -Anstiegs entscheiden über die nachfolgende Reaktion der Zelle [Niederau et al. 1999].

Der erhöhten freien zytosolischen Kalziumkonzentration nach oxidativem Stress bzw. supramaximaler CCK-Stimulation folgt die Schädigung der Azinuszellen [Klonowski-Stumpe et al. 1997, Ward et al. 1996]. Ca^{2+} ist ein Startsignal für die frühzeitige Aktivierung von Trypsin und kann somit die Aktivierung anderer pankreatischer Enzyme mit konsekutiver Autodigestion einleiten [Lüthen et al. 1994].

Experimentell zeigte sich durch den Einsatz des Ca^{2+} -Chelators BAPTA eine erhebliche Reduktion der Azinuszellschäden, die durch freie Radikale induziert werden können [Klonowski-Stumpe et al. 1997]. Mit Hilfe des Chelators können sowohl der durch CCK provozierte intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg als auch die frühzeitige Trypsin-Aktivierung vermieden werden [Raraty et al. 2000]. Aus diesen Daten ergibt sich die Frage, ob mittels BAPTA auch die frühe Degradation der TJ-Proteine – durch das Ausbleiben der Caerulein bedingten Oszillationen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels – verhindert werden kann.

Im hier vorgestellten Modell lässt sich jedoch durch BAPTA die rasche Disintegration der TJ-Proteine kaum beeinflussen. Obwohl sich in einigen Versuchsreihen Anzeichen dafür ergeben haben, dass sich die Chelatierung intrazellulären, freien Calciums und die damit unterbundenen intrazellulären Schwankungen der Ca^{2+} -Konzentration positiv auf den Erhalt der TJ-Morphologie auswirken könnte, bleibt die Aussagekraft der Ergebnisse

in Wiederholungsversuchen unbefriedigend. Eine Konzentrationserhöhung des zur Vorinkubation verwendeten BAPTA bewirkt hier keine Änderung dieser Resultate.

Bei Betrachtung der Daten, die sich mit der Wirkung von Ca^{2+} auf die TJ auseinandersetzen, wird jedoch ersichtlich, dass verschiedenste Schwankungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Modifikation der parazellulären Barriere bewirken können.

So kann ein Anstieg intrazellulären Calciums über eine Phosphorylierung der Myosin light chain kinase (MLCK) die Retraktion perijunktionalen Myosins und Aktins auslösen [Kitamura et al. 1991] und soll dabei, eventuell über eine Degradation der TJ-Proteine, einen Anstieg der parazellulären Permeabilität verursachen [Nusrat et al. 2000]. Bei intestinalen Epithelzellen lässt sich eine Separation von Occludin und ZO-1 bei gleichzeitiger Aktivierung der MLCK nachweisen [Ma et al. 2000]. Andererseits zeigte sich aber auch, dass durch ein Absenken des intrazellulären Calciums mittels Calcium-Chelatierung durch BAPTA der Wiederaufbau einer aufgrund ATP-Entzug geschädigten parazellulären Barriere signifikant inhibiert wird. Ebenso wird hierdurch die Rückverlagerung von nach intrazellulär degradiertem Occludin zurück in das Niveau der TJ verhindert [Ye et al. 1999].

In Hepatozyten kann bei Ca^{2+} -Entzug aus dem Inkubationsmedium bereits nach fünf Minuten immunhistochemisch eine Degradation Occludins aus den TJ der Gallenkanalikululi nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt erscheint im Fluoreszenzprofil von ZO-1 noch keine wesentliche Veränderung [Schmitt et al. 2001]. Es scheint also eine exakte Regulation der freien zytosolischen Calciumkonzentration für die Aufrechterhaltung der TJ-Barriere erforderlich zu sein. Doch bewirkte in den hier vorgestellten Versuchen die Vorinkubation mit BAPTA keine Veränderungen der Immunfluoreszenzprofile.

Ogleich in dieser Arbeit durch die Chelatierung des freien zytosolischen Ca^{2+} (in vitro) kein Benefit für den Erhalt der Proteinstrukturen von Occludin und ZO-1 erzielt wurde, ist dennoch nicht auszuschließen, dass Ca^{2+} als second messenger die Funktion der TJ-Proteine bei der CCK induzierten akuten Pankreatitis moduliert. Schließlich ist die Modalität zwischen Ca^{2+} und den TJ nicht hinreichend geklärt und bleibt, wie oben beschrieben, widersprüchlich. Manche Autoren schlagen sogar vor, dass jegliche Modifikation der intrazellulären Ca^{2+} -Aktivität Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität nimmt [Trischitta et al. 2001].

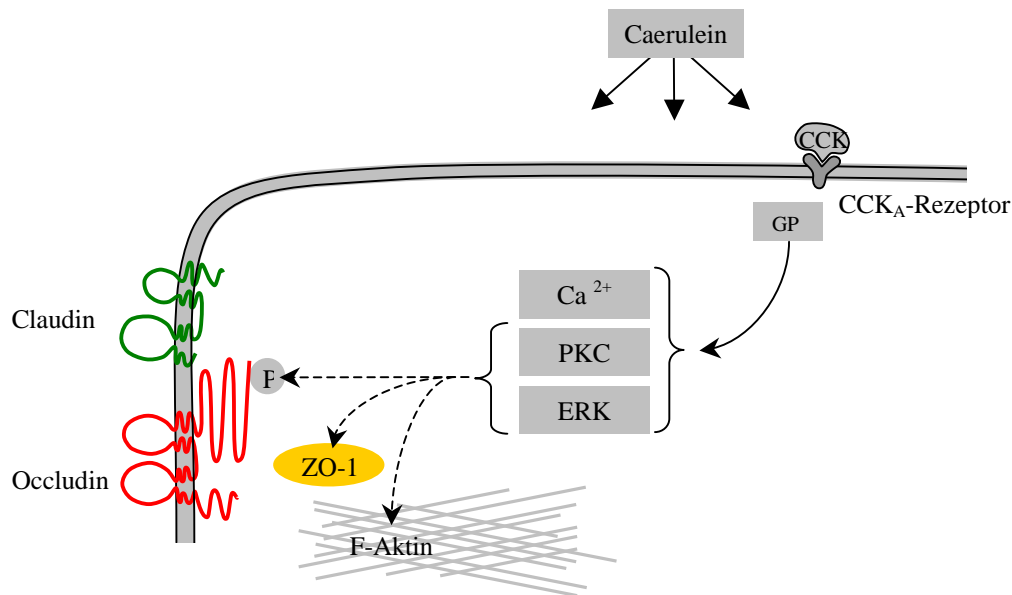


Abb.9: *Potenzielle Wirkung von Caerulein auf Tight-junction-Proteine über die intrazelluläre Signaltransduktion*
 (Entwurf und Darstellung: M.E., basierend auf Daten von Tsunoda et al. 1990, Kitamura et al. 1991, Trischitta et al. 2001, Kim et al. 2001, Rao et al. 2002, Williams 2001, Chen et al. 2000)

Proteinkinase C

Es existieren verschiedene PKC-Isoenzyme, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Aktivierungsmodi in mehrere Klassen eingeteilt werden [Nishizuka 1988]. Im exokrinen Pankreas gibt es sowohl Ca²⁺- als auch Phospholipid abhängige Formen der PKC [Raffaniello et al. 1996]. Die hier untersuchte Proteinkinase- α beispielsweise gehört zu der ersten Isoenzymklasse, welche durch Ca²⁺-Signale aktiviert wird [Rosson et al.1997]. Im Epithel des exokrinen Pankreas sind die PKC-Isoenzyme PKC- α , - δ , - γ , - ϵ , - ζ und - λ nachweisbar [Kim et al. 2001]. Die Stimulation mit CCK bewirkt den Übergang der Isoenzyme - α , - ϵ und - δ vom Zytosol in die Membranstrukturen [Li et al. 2004].

Obschon vermutet wird, dass die PKC die sekretorische Funktion der Bauchspeicheldrüse mitreguliert, ist ihre genaue modulatorische Bedeutung für sowohl das gesunde als auch das entzündlich erkrankte Organ noch weitgehend ungeklärt [Williams 2001].

Infolge oxidativen Stresses findet im Pankreas die Aktivierung der PKC statt, wodurch eine Tyrosin-Phosphorylierung von Occludin und ZO-1 vermittelt wird. Hierbei kommt es zur Dissoziation der miteinander assoziierten Proteine Occludin, ZO-1 und F-Aktin und zu einem Abfall des TER [Rao et al. 2002]. Dementsprechend kann eine durch extrazellulären Ca²⁺-Entzug vermittelte Öffnung der parazellulären Barriere unterbunden werden, indem die Aktivierung der PKC inhibiert wird [Lacaz-Vieira/Jaeger 2001].

Andererseits beteiligt sich die PKC regulatorisch ebenso beim Aufbau und Zusammenschluss der TJ und ihrer Proteine [Matter/Balda 1999]. So können PKC-Agonisten eine Zunahme der TJ-Stränge, eine Abnahme des parazellulären Durchflusses von Mannitol und einen leichten Anstieg im TER verursachen, wohingegen PKC-Antagonisten die Rekonstruktion der TJ nach oxidativem Stress behindern [Stuart/Nigam 1995, Denker/Nigam 1998, Meyer et al. 2001].

In dieser Arbeit wurde mittels GÖ6976 die PKC- α inhibiert, da speziell von der PKC- α der Einfluss auf die parazelluläre Barriere bekannt ist: Eine Überexpression von Wild-Typ-PKC- α in Epithelzellen bewirkt eine signifikante Sensibilisierung der Zellen gegenüber PKC-Aktivatoren, was bei entsprechendem Reiz zum Verlust des TER und wesentlich höherer Permeabilität als zwischen PKC- α -negativen Vergleichszellen führt [Rosson et al. 1997]. Ebenso ist für dieses Isoenzym bei Translokation der aktivierten Form vom Zytosol in die Membranfraktion eine sich davon zeitabhängig erhöhende Durchlässigkeit der TJ nachgewiesen worden. Vor allem dort wo die parazelluläre Durchlässigkeit am stärksten ausgeprägt ist, ist die phosphorylierte PKC- α am besten nachweisbar [Mullin et al. 1996]. Nach Aktivierung der epithelialen PKC- α mittels Chitosanglutamat ist eine Dislokation von ZO-1 und eine Abnahme des TER zu beobachten [Smith et al. 2005].

Hier konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation der Azini mit dem für die PKC- α spezifischen Inhibitor GÖ6976 keine Schädigung der angefärbten Strukturen der TJ bewirkt, jedoch ebenso wenig die durch Caerulein bedingte Degradation von Occludin und ZO-1 aufhalten kann.

Die bisher bekannten PKC-Isoenzyme übernehmen vermutlich alle verschiedenen zell- bzw. organspezifische Aufgaben, so dass die oben beschriebenen In-vitro-Modelle, die mit unterschiedlichen epithelialen Zellreihen durchgeführt worden sind, nur einen Anhalt dafür geben können, welche Proteinkinase bei den Veränderungen der TJ-Proteine in der CCK-Pankreatitis beteiligt sein könnte [Bruzzone 1990]. Da durch Inhibition der PKC- α die Degradation der TJ-Proteine nicht hinreichend verhindert werden konnte, ist eine Beteiligung dieses Isoenzym unwahrscheinlich. Eine Beteiligung der anderen PKC-Isoenzyme wurde nicht untersucht. Hier wären beispielsweise die PKC- δ und die PKC- ϵ von Interesse, da diesen in der aktuellen Literatur eine Schlüsselrolle für die Signaltransduktion im exokrinen Pankreas zugesprochen wird [Satoh et al. 2004]. Zugleich bleibt zu bemerken, dass die Inhibition der PKC- α (mittels GÖ6976) den durch CCK ausgelösten Anstieg der Amylase-Sekretion nicht beeinflusst, wohingegen die Hemmung der PKC- δ die CCK-bedingte Amylasesekretion abbremst [Li et al. 2004].

MAP-Kinasen

Cholezystokinin bewirkt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* innerhalb von fünf Minuten die Aktivierung verschiedener MAPKs in pankreatischen Azini. Die Aktivitätsmaxima der unterschiedlichen MAPK werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht (siehe Kapitel IV.1.2.) [Duan et al. 1994, Dabrowski et al. 2000]. In die Gruppe der MAPK, die durch CCK aktiviert werden, gehören: MAPK1 und MAPK2, auch ERK1 und -2 genannt (extracellular signaling-regulated kinases), JNK (c-Jun amino-terminal kinase) und p38 MAPK; diese sind alle Phosphoproteine (Serin/Threonin-Kinasen) [Williams, 2001]. Ihre Aktivierung kann nach Reizung entsprechender membranärer Rezeptoren unter anderem durch PKC, Ca²⁺ und MAP Kinase Kinase (MEK1/2) erfolgen [Cobb/Goldsmith 1995]. Die genauen Funktionen der MAPKs sind sehr vielfältig und bisher lediglich in groben Zügen bekannt [Williams 2001].

Nach *In-vitro*-Caeruleininkubation kann die p38 MAPK über die Aktivierung von hsp 27 (heat shock protein) Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts bewirken [Schäfer et al. 1998]. Die Inhibition der MEK1/2 (und folglich der ERK1/2) mittels PD98059 vermindert *in vivo* pathologische Veränderungen der Caeruleinpankreatitis wie die histologische Schädigung des Organs, die Ödembildung infolge Wasserzunahme und den Anstieg der Serumamylase [Clemons et al. 2002].

Bei Inhibition der MEK1/2 mit PD98059 findet in MDCK-Zellen eine Phosphorylierung von Occludin und ZO-1 statt. Occludin, Claudin-1 und ZO-1 werden in Folge vom Zytosol in die Zellmembran rekrutiert. Es formen sich TJ-Stränge aus und zwischen den Zellen steigt der TER. Dahingegen bewirkt die Aktivierung der MEK1, dass das Färbemuster von Occludin aufreißt und das Protein degradiert [Chen et al. 2000].

Bei den hier verwendeten pankreatischen Azini konnten die strukturellen Veränderungen von Occludin und ZO-1 mit Hilfe einer Vorinkubation der Zellen in PD98059 (in derselben Dosierung von 50 µM) nicht aufgehalten werden.

Obschon Clemens et al. wie oben beschrieben, eine deutliche Minderung der Entzündungserscheinungen bei Applikation des MEK1/2-Inhibitors PD98059 festgestellt haben, ergibt sich ein Widerspruch, wenn man den genauen Aktivierungszeitpunkt von ERK1/2 und den Serumamylase-Anstieg betrachtet. Im Gegensatz zu anderen Autoren [Dabrowski et al. 1996] weisen sie die enzymatische Aktivierung von MEK1/2 erst 30 Minuten *p.s.* nach, obgleich sie zum selben Zeitpunkt feststellen müssen, dass der Anstieg der Serumamylase bereits vor Ablauf dieses Zeitraumes eingesetzt hat. Die Autoren konstatieren deshalb, dass sich die Inhibition von MEK1/2 erst im späteren Verlauf des Krankheitsgeschehens positiv bemerkbar macht und die initialen Ereignisse der Caerulein-Pankreatitis unabhängig vom ERK1/2-Weg einsetzen [Clemons et al. 2002]. Die hier

getestete Wirkungslosigkeit von PD98059, bei dem Versuch, die strukturellen Veränderungen der transmembranären Proteine Occludin und Claudin-1 zu verhindern, bestätigt diese Vermutung. Ihre Degradation beginnt bereits innerhalb von 5-10 Minuten *in vivo* und 10-15 Minuten *in vitro* nach Stimulation und gehört damit zu den initialen Ereignissen der caerulein-induzierten Pankreatitis.

V Zusammenfassung

Informationen über das Verhalten der transmembranären Verschlussproteine Occludin und Claudin-1 bei Pankreatitis gab es bisher nicht. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine supramaximale Stimulation mit Caerulein, Auslöser der interstitiell ödematösen Pankreatitis, die Struktur dieser beiden Proteine beeinflusst und ob hierbei die Signaltransduktoren Ca^{2+} , PKC- α und/oder ERK1/-2 beteiligt sind. Die Serumenzymaktivität von Amylase und Lipase, sowie rein zytoplasmatisch lokalisierte Proteine des TJ-Komplexes, exemplarisch ZO-1 und F-Aktin, wurden in die Untersuchungen miteingeschlossen.

Isolierte pankreatische Azinuszellen der Maus wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Cholezystokininanalogons inkubiert oder es wurde Mäusen der Wirkstoff intraperitoneal injiziert (maximale Stimulation mit 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG/h, supramaximale – pankreatitis-induzierende – mit 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG/h), um aus den stimulierten Pankreaspräparaten Kryoschnitte herzustellen. Anschließend wurden immunhistochemische Anfärbungen zur konfokalen Lasermikroskopie angefertigt. Die Modifikationszeitpunkte der transmembranären Proteine und die Spezifität der benutzten Antikörper wurden mittels Western Blot bestätigt. Die oben genannten Signalwege wurden mit den spezifischen Inhibitoren BAPTA, GÖ6976 bzw. PD98059 blockiert.

Unter Kontrollbedingungen zeigten alle TJ-Proteine ein lineares, gleichmäßiges Färbemuster an der apikalen Membran von Azinus- und intralobulären Gangzellen. In vitro fand sich ein zeitgleicher Verlust der Färbemuster aller untersuchten Proteine ab 10 Minuten nach hoch dosierter Stimulation. *In vivo* resultierte bereits ab fünf Minuten *p.s.* eine Disintegration der Verschlussproteine Occludin und Claudin-1. Diese ging dem Anstieg der Serumenzymaktivität voraus. Ebenso folgten *in vivo* morphologische Veränderungen von F-Aktin und ZO-1 der Reaktion der transmembranären Proteine erst 20 Minuten später nach. Keiner der untersuchten Inhibitoren modifizierte das Anfärbemuster der untersuchten Proteine Occludin und ZO-1 in den Kontrollen; es konnte jedoch ebenso durch keinen die durch Caerulein bedingte Disintegration verhindert werden.

Die Ergebnisse sprechen für eine zeitliche Sequenz in der Disintegration zytoskelettal-zytoplasmatischer und transmembranärer Bestandteile des TJ-Komplexes bei Pankreatitis, welche mit der Modifikation von Occludin und Claudin beginnt. Die Reihenfolge der untersuchten Ereignisse unterstreicht die Bedeutung der transmembranären Proteine für Aufbau und Funktion der parazellulären Barriere und ist ein Hinweis auf eine mögliche Modifikation dieser unabhängig vom Zytoskelett. Die Alteration der Verschlussleisten kann den Übertritt vorzeitig aktivierter Verdauungsenzyme in das Drüseninterstitium begünstigen. Ca^{2+} , PKC- α oder den ERK1/-2 scheint in diesem Modell keine wesentliche Bedeutung für die Öffnung der parazellulären Barriere zuzukommen.

Anhang

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
BAPTA	1,2-Bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
CCK	Cholezystokinin
CDE	choline deficient ethionine supplementated
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
ERK	extracellular signaling-regulated kinase
FITC	Fluorescein-isocyanat
hsp	heat shock protein
GÖ6976	[12-(2-Cyanoethyl)]-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole
InsP ₃	Inositoltriphosphat
JAM	junctional adhaesion molecule
KG	Körpergewicht
KHB	Krebs Henseleit Puffer
LDH	Laktathydrogenase
mAB	monoclonal antibody
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MDCK	madine darby canine kidney
min	Minuten
MLCK	myosin light chaine kinase
pAB	polyclonal antibody
PBS	phosphate buffered saline
PD	Phosphodiesterase

PD 98059	2'-Amino-3'methoxyflavone
p.i.	post injectionem
p.s.	post stimulationem
PKC	Proteinkinase C
RT	Raumtemperatur
SBTI	soybean trypsin inhibitor
sek	Sekunden
TBST	triff-buffered salt solution with tween
TER	transepithelial resistance
TRITC	Tetramethylrodaminisothiocyanat
TJ	Tight-Junctions
U/l	units/liter
U/min	units/minute
ZO	Zonula Occludens Protein

Literaturverzeichnis

- 1 Adler, G.; Rohr, G.; Kern, H.F. (1982): *Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat*. Dig Dis Sci. 27, 993-1002.
- 2 Akao, S.; Oya, M.; Akiyama, H. et al. (2000): *The tight junction of pancreatic exocrine cells is a morphometrically dynamic structure altered by intraductal hypertension*. J Gastroenterol. 35, 758-767.
- 3 Anderson, J.M. (2001): *Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport*. News Physiol Sci. 16, 126-130.
- 4 Anderson, J.M.; Van Itallie, C.M. (1995): *Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability*. Am J Physiol. 269, G467-G475.
- 5 Anderson, J.M.; Van Itallie, C.M. (1999): *Tight junctions: Closing on the seal*. Curr Biol. 9, R922-R924.
- 6 Ando-Akatsuka, Y.; Saitou, M.; Hirase, T. et al. (1996): *Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues*. J Cell Biol. 133, 43-47.
- 7 Andreeva, A.Y.; Krause, E.; Muller, E.C. et al. (2001): *Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin*. J Biol Chem. 276, 38480-38486.
- 8 Atsumi, S.S.; Kokai, Y.; Tobioka, H. et al. (1999): *Occludin modulates organization of perijunctional circumferential actin in rat endothelial cells*. Med Electron Microsc. 32, 11-19.
- 9 Balda, M.S.; Flores-Maldonado, C.; Cereijido, M. et al. (2000): *Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability*. J Cell Biochem. 78, 85-96.
- 10 Balda, M.S.; Whitney, J.A.; Flores, C. et al. (1996): *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein*. J Cell Biol. 134, 1031-1049.
- 11 Bamforth, S.D.; Kniesel, U.; Wolburg, H. et al. (1999): *Dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function*. J Cell Sci. 112 (Pt 12), 1879-1888.
- 12 Bentzel, C.J.; Palant, C.E.; Fromm, M. (1991): *Physiological and pathological factors affecting the tight junction*. In Tight Junctions (ed.M.Cereijido), 151-173. CRC Press, Inc.; Boca Raton, FL.

- 13 Blinman T. A.; Gukovsky, I.; Mouria, M. et al. (2000): *Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase*. Am J Physiol Cell Physiol. 279, C1993-C2003.
- 14 Bruzzone, R. (1990): *The molecular basis of enzyme secretion*. Gastroenterology 99, 1157-1176.
- 15 Bruzzone, R.; Halban, P.A.; Gjinovic, A. et al. (1985): *A new, rapid, method for preparation of dispersed pancreatic acini*. Biochem J. 226, 621-624.
- 16 Bruzzone, R.; Regazzi, R.; Wollheim, C.B. (1988): *Caerulein causes translocation of protein kinase C in rat acini without increasing cytosolic free Ca²⁺*. Am J Physiol. 255, G33-G39.
- 17 Burnham, D.B.; Williams, J.A. (1982): *Effects of high concentrations of secretagogues on the morphology and secretory activity of the pancreas: a role for microfilaments*. Cell Tissue Res. 222, 201-212.
- 18 Cates, M.C.; Singh, S.M.; Peick, A.L. et al. (1988): *Acute hypercalcemia, pancreatic duct permeability, and pancreatitis in cats*. Surgery 104, 137-141.
- 19 Cereijido, M.; Valdés, J.; Shoshani, L. et al. (1998): *Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity*. Annu Rev Physiol. 60, 161-177.
- 20 Chen, Y.; Merzdorf, C.; Paul, D.L. et al. (1997): *COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early Xenopus embryos*. J Cell Biol. 138, 891-899.
- 21 Chen, Y.; Lu, Q.; Schneeberger, E.E.; Goodenough, D.A. (2000): *Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells*. Mol Biol Cell 11, 849-862.
- 22 Chiari H. (1891): *Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas*. Z Heilk. 17, 69-96.
- 23 Clarke, H.; Soler, A.P.; Mullin, J.M. (2000): *Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets*. J Cell Sci. 113 (Pt 18), 3187-3196.
- 24 Claude P. (1978): *Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens*. J Membr Biol. 39, 219-224.
- 25 Clemons, A.P.; Holstein, D.M.; Galli, A. et al. (2002): *Caerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059*. Pancreas 25, 251-259.

- 26 Cobb, M.H.; Goldsmith, E.J. (1995): *How MAP kinases are regulated*. J Biol Chem. 270, 14843-14846.
- 27 Colegio, O.R.; Van Itallie, C.M.; McCrea, H.J. et al. (2002): *Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol. 283, C142-C147.
- 28 Dabrowski, A.; Boguslowicz, C.; Dabrowska, M. et al. (2000): *Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells*. Pancreas 21, 376-384.
- 29 Dabrowski, A.; Grady, T.; Logsdon, C.D. et al. (1996): *Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo*. J Biol Chem. 271, 5686-5690.
- 30 De Lisle, R. C.; Logsdon, C. D. (1990): *Pancreatic acinar cells in culture: expression of acinar and ductal antigens in a growth-related manner*. Eur J Cell Biol. 51, 64-75.
- 31 Denham, W.; Yang, J.; Fink, G. et al. (1997): *Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis*. Gastroenterology 113, 1741-1746.
- 32 Denker, B.M.; Nigam, S.K. (1998): *Molecular structure and assembly of the tight junction*. Am J Physiol. 274, F1-F9.
- 33 Dietze, M.A.; Delforge, M. (2002): *Evaluation criteria for acute pancreatitis. Recent data from the literature*. Rev Med Liège 57, 701-709.
- 34 Dodane, V.; Khan, M.A.; Merwin, J.R. (1999): *Effect of chitosan on epithelial permeability and structure*. Int J Pharm. 182, 21-32.
- 35 Dragsten, P.R.; Blumenthal, R.; Handler, J.S. (1981): *Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane?* Nature 294, 718-722.
- 36 Duan, R.D.; Williams, J.A. (1994): *Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini*. Am J Physiol. 267, G401-G408.
- 37 Duan, R.D.; Zheng, C.F.; Guan, K.L. et al. (1995): *Activation of MAP kinase kinase (MEK) and Ras by cholecystokinin in rat pancreatic acini*. Am J Physiol. 268, G1060-G1065.
- 38 Dugernier, T.; Reynaert, M.; Laterre, P.F. (2003): *Early multi-system organ failure associated with acute pancreatitis: a plea for a conservative therapeutic strategy*. Acta Gastroenterol Belg. 66, 177-183.

- 39 Fallon, M.B.; Gorelick, F.S.; Anderson, J.M. et al. (1995): *Effect of caerulein hyperstimulation on the paracellular barrier of rat exocrine pancreas*. *Gastroenterology* 108, 1863-1872.
- 40 Fanning, A.S.; Anderson, J.M. (1999): *Protein modules as organizers of membrane structure*. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 432-439.
- 41 Fanning, A.S.; Jameson, B.J.; Jesaitis, L.A. et al. (1998): *The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton*. *J Biol Chem.* 273, 29745-29753.
- 42 Fanning, A.S.; Ma, T.Y.; Anderson, J.M. (2002): *Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1*. *FASEB J.* 16, 1835-1837.
- 43 Fanning, A.S.; Mitic, L.L.; Anderson, J.M. (1999): *Transmembrane proteins in the tight junction barrier*. *J Am Soc Nephrol.* 10, 1337-1345.
- 44 Farquhar, M.G.; Palade, G.E. (1963): *Junctional complexes in various epithelia*. *J Cell Biol.* 17, 375-412.
- 45 Farshori, P.; Kachar, B. (1999): *Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells*. *J Membr Biol.* 170, 147-156.
- 46 Fitz RH. (1889): *Acute pancreatitis: a consideration of pancreatic hemorrhage, hemorrhagic, suppurative, and gangrenous pancreatitis, and of disseminated fat-necrosis*. *Boston Med Surg.* 120, 181-7, 205-7, 229-35.
- 47 Fries, W.; Mazzon,E, Squarzoni, S. et al. (1999): *Experimental colitis increases small intestine permeability in the rat*. *Lab Invest* .79, No.1, 49-57.
- 48 Frossard, J.L. (2003): *Pathophysiology of acute pancreatitis: a multistep disease*. *Acta Gastroenterol Belg.* 66, 166-173.
- 49 Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M. et al. (1993): *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions*. *J Cell Biol.* 123, 1777-1788.
- 50 Furuse, M.; Itoh, M.; Nagafuchi, A. et al. (1994): *Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at the tight junctions*. *J Cell Biol.* 127 (6 Pt 1), 1617-1626.
- 51 Furuse, M.; Fujimoto, K.; Sato, N. et al. (1996): *Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures*. *J Cell Sci.* 109 (Pt 2), 429-435.

- 52 Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T. et al. (1998): *Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin*. J Cell Biol. 141, 1539-1550.
- 53 Furuse, M.; Sasaki, H.; Fujimoto, K. et al. (1998): *A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts*. J Cell Biol. 143, 391-401.
- 54 Furuse, M.; Sasaki, H.; Tsukita, S. (1999): *Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands*. J Cell Biol. 147, 891-903.
- 55 Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H. et al. (2001): *Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells*. J Cell Biol. 153, 263-272.
- 56 Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H. et al. (2002): *Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice*. J Cell Biol. 156, 1099-1111.
- 57 González-Mariscal, L.; Contreras, R.G.; Bolivar, J.J. et al. (1990): *Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells*. Am J Physiol. 259, C978-C986.
- 58 González-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Nava, P. et al. (2003): *Tight junction proteins*. Prog Biophys Mol Biol. 81, 1-44.
- 59 González-Mariscal, L.; Nava, P. (2005): *Tight junctions, from tight intercellular seals to sophisticated protein complexes involved in drug delivery, pathogens interaction and cell proliferation*. Adv Drug Deliv Rev. 57, 811-814.
- 60 Gow, A.; Southwood, C.M.; Li, J. S. et al. (1999): *CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice*. Cell 99, 649-659.
- 61 Grady, T.; Liang, P.; Ernst, S.A. et al. (1997): *Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis*. Gastroenterology 113, 1966-1975.
- 62 Grady, T.; Mahmoud, M.; Otani, T. et al. (1998): *Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury*. Am J Physiol. 275, G1010-G1017.
- 63 Grady, T.; Saluja, A.; Kaiser, A. et al. (1996): *Edema and intrapancreatic trypsinogen activation precede glutathione depletion during caerulein pancreatitis*. Am J Physiol. 271. (1 Pt 1), G20-6 .
- 64 Harvey M.H.; Cates M.C.; Reber H.A. (1988): *Possible mechanisms of acute pancreatitis induced by ethanol*. Am J Surg. 155(1), 49-56.

- 65 Haskins, J.; Gu, L.; Wittchen, E.S. et al. (1998): *ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin.* J Cell Biol. 141, 199-208.
- 66 Heiskala, M.; Peterson, P.A.; Yang, Y. (2001): *The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport.* Traffic 2, 93-98.
- 67 Hirase, T.; Kawashima, S.; Wong, E.Y. et al. (2001): *Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms.* J Biol Chem. 276, 10423-10431.
- 68 Hirase, T.; Staddon, J.M.; Saitou, M. et al. (1997): *Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells.* J Cell Sci. 110 (Pt 14), 1603-1613.
- 69 Hirokawa, N.; Tilney, L.G. (1982): *Interactions between actin filaments and between actin filaments and membranes in quick-frozen and deeply etched hair cells of the chick ear.* J Cell Biol. 95, 249-261.
- 70 Hofbauer, B.; Saluja, A.K.; Lerch, M.M. et al. (1998): *Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats.* Am J Physiol. 275, G352-G362.
- 71 Imamura, S.; Hirayama, T.; Arai, T. et al. (1989): *An enzymatic method using 1, 2-Diglyceride for pancreatic lipase test in serum.* Clin Chem. 35, 1126-1130.
- 72 Itoh, M.; Furuse, M.; Morita, K. et al. (1999): *Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, Zo-3, with the COOH termini of claudins.* J Cell Biol. 6, 1351-1363.
- 73 Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Moroi, S. et al. (1997): *Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments.* J Cell Biol. 138, 181-192.
- 74 Jesaitis, L.A.; Goodenough, D.A. (1994): *Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein.* J Cell Biol. 124, 949-961.
- 75 Jungermann, J.; Lerch, M.M.; Weidenbach, H. et al. (1995): *Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation.* Am J Physiol. 268, G328-G338.
- 76 Kale, G.; Naren, A.P.; Sheth, P. et al. (2003): *Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3.* Biochem Biophys Res Commun. 302, 324-329.

- 77 Kassab, F. Jr.; Marques, R. P.; Lacaz-Vieira, F. (2002): *Modeling tight junction dynamics and oscillations*. J Gen Physiol. 120, 237-247.
- 78 Kern, H.F.; Adler, G.; Scheele, G.A. (1985): *Structural and biochemical characterization of maximal and supramaximal hormonal stimulation of rat exocrine pancreas*. Scand J Gastroenterol Suppl. 112, 20-29.
- 79 Kevil, C.G.; Okayama, N.; Trocha, S.D. et al. (1998): *Expression of zonula occludens and adherens junctional proteins in human venous and arterial endothelial cells: role of occludin in endothelial solute barriers*. Microcirculation. 5, 197-210.
- 80 Kim, M.J.; Lee, Y.S.; Lee, K.H. (2001): *Site-specific localization of protein kinase C isoforms in rat pancreas*. Pancreatology 1, 36-42.
- 81 Kim, S.K. (1995): *Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signaling*. Curr Opin Cell Biol. 7, 641-649.
- 82 Kitamura, T.; Brauneis, U.; Gatmaitan, Z. et al. (1991): *Extracellular ATP, intracellular calcium and canalicular contraction in rat hepatocyte doublets*. Hepatology 14, 640-647.
- 83 Klar, E.; Werner, J. (2000): *New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis*. Chirurg 71, 253-264.
- 84 Klinke, R.; Silbernagel, S. (2001): *Lehrbuch der Physiologie*. 4. Auflage. Stuttgart, New York (Thieme).
- 85 Klonowski-Stumpe, H.; Schreiber, R.; Grolik, M. et al. (1997): *Effect of oxidative stress on cellular functions and cytosolic free calcium of rat pancreatic acinar cells*. Am J Physiol. 272, G1489-G1498.
- 86 Koh, D.S.; Moody, M.W.; Nguyen, T.D. et al. (2000): *Regulation of exocytosis by protein kinases and Ca(2+) in pancreatic duct epithelial cells*. J Gen Physiol. 116, 507-520.
- 87 Kojima, T.; Sawada, N.; Yamamoto, M. et al. (1999): *Disruption of circumferential actin filament causes disappearance of occludin from the cell borders of rat hepatocytes in primary culture without distinct changes of tight junction strands*. Cell Struct Funct. 24, 11-17.
- 88 Konturek, S.J.; Dembinski, A.; Konturek, P.J. et al. (1992): *Role of platelet activating factor in pathogenesis of acute pancreatitis in rats*. Gut 33, 1268-1274.
- 89 Kuijpers, G.A.; Van Nooy, I.G.; Vossen, M.E. et al. (1985): *Tight junctional permeability of the resting and carbachol stimulated exocrine rabbit pancreas*. Histochemistry 83, 257-264.

- 90 Kuwabara, H.; Kokai, Y.; Kojima, T. et al. (2001): *Occludin regulates actin cytoskeleton in endothelial cells*. Cell Struct Funct. 26, 109-116.
- 91 Lacaz-Vieira, F. (1997): *Calcium site specificity. Early Ca²⁺-related tight junction events*. J Gen Physiol. 110, 727-740.
- 92 Lacaz-Vieira, F.; Jaeger, M.M. (2001): *Protein kinase inhibitors and the dynamics of tight junction opening and closing in A6 cell monolayers*. J Membr Biol. 184, 185-196.
- 93 Lacaz-Vieira, F.; Jaeger, M.M.; Farshori, P. et al. (1999): *Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing*. J Membr Biol. 168, 289-297.
- 94 Laemmli, U.K. (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄*. Nature 227, 680-685.
- 95 Lampel, M.; Kern, H.F. (1977): *Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue*. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 373, 97-117.
- 96 Lankisch, T.O.; Nozu, F.; Owyang, C. et al. (1999): *High affinity cholecystokinin type A receptor/cytosolic phospholipase A₂ pathways mediate Ca²⁺ oscillations via a positive feedback regulation by calmodulin kinase in pancreatic acini*. Eur J Cell Biol. 78, 632-641.
- 97 Leach, S.D.; Modlin, I.M.; Scheele, G.A. et al. (1991): *Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin*. J Clin Invest. 87, 362-366.
- 98 Lerch, M.M.; Lutz, M.P.; Weidenbach, H. et al. (1997): *Dissociation and reassembly of adherens junctions during experimental acute pancreatitis*. Gastroenterology 113, 1355-1366.
- 99 Lerch, M.M.; Saluja, A.K.; Dawra, R. et al. (1992): *Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells*. Gastroenterology 103, 205-213.
- 100 Li, C.; Chen, C.; Williams, J.A. (2004): *Regulation of CCK induced amylase release by PKC-delta in rat pancreatic acinar cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 287, G 764-G771.
- 101 Lombardi, B.; Estes, L.W.; Longnecker, D.S. (1975): *Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet*. Am J Pathol. 79, 465-480.

- 102 Lüthen, R.E.; Niederau, C.; Ferrell, L.D. et al. (1995): *Energy metabolism in mouse pancreas in response to different dosages of a CCK analogue*. *Pancreas* 11(2), 141-146.
- 103 Lüthen, R.E.; Niederau, C.; Grendell, J.H. (1993): *Effects of bile and pancreatic digestive enzymes on permeability of the pancreatic duct system in rabbits*. *Pancreas* 8, 671-681.
- 104 Lüthen, R.E.; Niederau, C.; Grendell, J.H. (1995a): *Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats*. *Am J Physiol.* 268 , G592-G604.
- 105 Lüthen, R.E.; Owen, R.L.; Sarbia, M. et al. (1994): *Premature zymogen activation inside pancreatic acinar cells during experimental acute pancreatitis: morphologic evidence by labelling of trypsin activation peptide*. *Pancreas* 6, 795.
- 106 Lüthen, R.E.; Owen, R.L.; Sarbia, M. et al. (1998): *Premature trypsinogen activation during caerulein pancreatitis in rats occurs inside pancreatic acinar cells*. *Pancreas* 17, 38-43.
- 107 Ma, T.Y.; Tarn, D.; Hoa, N. et al. (2000): *Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement*. *Microsc Res Tech.* 51, 156-168.
- 108 Madara, J.L. (1987): *Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton*. *Am J Physiol.* 253, C171-C175.
- 109 Madara, J.L. (1998): *Regulation of the movements of solutes across tight junctions*. *Annu Rev Physiol.* 60, 143-159.
- 110 Malarkey, K.; Belham, C.M.; Paul, A. et al.: *The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors*. *Biochem J.* 309 (Pt 2), 361-375 (1995).
- 111 Marzesko, A.M.; Dunia, I.; Pandjaitan, R. et al. (2002): *The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells*. *Mol Biol Cell* 13, 1819-1831.
- 112 Matozaki, T.; Williams, J.A. (1989): *Multiple sources of 1, 2-diacylglycerol in isolated rat pancreatic acini stimulated by cholecystokinin. Involvement of phosphatidylinositol bisphosphate and phosphatidylcholine hydrolysis*. *J Biol Chem.* 264, 14729-14734.
- 113 Matter, K.; Balda, M.S. (1999): *Occludin and the functions of tight junctions*. *Int Rev Cytol.* 186 , 117-146.

- 114 Mayerle, J.; Lerch, M.M. (2001): *Course of illness in acute pancreatitis*. Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr. 118, 296-300.
- 115 Mazzon, E.; Sturniolo, G.C.; Puzzolo, D. et al. (2002): *Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum*. Gut 51, 507-513.
- 116 Metz, J.; Forsman, W.G.; Ito, S. (1977): *Exocrine pancreas under experimental conditions. III. Membrane and cell junctions in isolated acinar cells*. Cell Tissue Res. 177, 459-474.
- 117 Metz, J.; Merlo, M.; Billich, H. et al. (1978): *Exocrine pancreas under experimental conditions. IV. Alterations of intercellular junctions between acinar cells following pancreatic duct ligation*. Cell Tissue Res. 186, 227-240.
- 118 Meyer, T.N.; Schwesinger, C.; Ye, J. et al. (2001): *Reassembly of the tight junction after oxidative stress depends on tyrosine kinase activity*. J Biol Chem. 276, 22048-22055.
- 119 Mitchell, R.M.; Byrne, M.F.; Baillie, J. (2003): *Pancreatitis*. Lancet 361, 1447-1455.
- 120 Mitic, L.L.; Anderson, J.M. (1998): *Molecular architecture of tight junctions*. Annu Rev Physiol. 60, 121-142.
- 121 Mitic, L.L.; Schneeberger, E.E.; Fanning, A.S. et al. (1999): *Connexin-occludin chimeras containing the ZO-binding domain of occludin localize at MDCK tight junctions and NRK cell contacts*. J Cell Biol. 146, No.3, 683-693.
- 122 Mitic, L.L.; Van Itallie, C.M.; Anderson, J.M. (2000): *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 279, G250-G254.
- 123 Mogami, H.; Tepikin, A.V.; Petersen, O.H. (1998): *Termination of cytosolic Ca^{2+} signals: Ca^{2+} reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca^{2+} concentration in the store lumen*. EMBO J. 17, 435-442.
- 124 Morita, K.; Furuse, M.; Fujimoto, K. et al. (1999): *Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands*. Proc Natl Acad Sci USA. 96, 511-516.
- 125 Muallem, S.; Kwiatkowska, K.; Xu, X. et al. (1995): *Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells*. J Cell Biol. 128, 589-598.
- 126 Mullin, J.M.; Soler, A.P.; Laughlin, K.V. et al. (1996): *Chronic exposure of LLC-PK1 epithelia to the phorbol ester TPA produces polyp-like foci with leaky tight junc-*

- tions and altered protein kinase C-alpha expression and localization. *Exp Cell Res.* 227, 12-22.
- 127 Nagai, H.; Henrich, H.; Wunsch, P.H. et al. (1989): *Role of pancreatic enzymes and their substrates in autodigestion of the pancreas. In vitro studies with isolated rat pancreatic acini.* *Gastroenterology* 96, 838-847.
- 128 Nam, J.H.; Murthy, S. (2003): *Acute pancreatitis-the current status in management.* *Expert Opin Pharmacother.* 4, 235-241.
- 129 Niederau, C.; Lüthen, R.E. (1997): *Current aspects in the pathogenesis of acute pancreatitis.* *Schweiz Rundsch Med Prax.* 86, 385-391.
- 130 Niederau, C.; Lüthen, R.E.; Heintges, T. (1994): *Effects of CCK on pancreatic function and morphology.* *Ann NY Acad Sci.* 713, 180-198.
- 131 Niederau, C.; Lüthen, R.E.; Klonowski-Stumpe, H. et al. (1999): *The role of calcium in pancreatitis.* *Hepatogastroenterology* 46, 2723-2730.
- 132 Niederau, C.; Lüthen, R.E.; Niederau, M.C. et al. (1992a): *Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. Methodology and standards.* *Eur Surg Res.* 24 Suppl 1, 40-54.
- 133 Niederau, C.; Niederau, M.; Borchard, F. et al. (1992): *Effects of antioxidants and free radical scavengers in three different models of acute pancreatitis.* *Pancreas* 7, 486-496.
- 134 Niederau, C.; Niederau, M.; Lüthen, R.E. et al. (1990): *Pancreatic exocrine secretion in acute experimental pancreatitis.* *Gastroenterology* 99, 1120-1127.
- 135 Nishizuka, Y. (1988): *The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.* *Nature* 334, 661-665.
- 136 Nusrat, A.; Chen, J.A.; Foley, C.S. et al. (2000): *The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction.* *J Biol Chem.* 275, 29816-29822.
- 137 Nusrat, A.; Giry, M.; Turner, J.M. et al. (1995): *Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia.* *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 10629-10633.
- 138 Nusrat, A.; Turner, J.R.; Madara, J.L. (2000a): *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279, G851-G857.

- 139 Otsuki, M.; Matsuno, S.; Shimosegawa, T. et al. (2002): *International symposium: mechanism of pancreatitis--between bedside and laboratory*. *Pancreas* 24, 391-407.
- 140 Oshitani, N.; Watanabe, K.; Nakamura, S. (2005): *Dislocation of tight junction proteins without F-actin disruption in inactive Crohn's disease*. *Int J Mol Med*. 15, 407-410.
- 141 Powell, D. W. (1981): *Barrier function of epithelia*. *Am J Physiol*. 60, G275-G288.
- 142 Raffaniello, R.D.; Nam, J.; Cho, I. et al. (1998): *Protein kinase C isoform expression and function in transformed and non-transformed pancreatic acinar cell lines*. *Biochem Biophys Res Commun*. 246, 166-171.
- 143 Rahner, C.; Mitic, L.L.; Anderson, J.M. (2001): *Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut*. *Gastroenterology* 120, 411-422.
- 144 Rao, R.K.; Basuroy, S.; Rao, V.U. et al. (2000): *Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress*. *Biochem J*. 368, 471-481 (2002).
- 145 Raraty, M.; Ward, J.; Erdemli, G. et al. (2000): *Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13126-13131.
- 146 Reiners, Jr.L.J.Y.; Cliff, R.E.; Dudley, D.T. et al. (1998): *PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase*. *Mol Pharmacol*. 53, 438-445.
- 147 Rosson, D.; O'Brien, T.G.; Kampherstein, J.A. et al. (1997): *Protein kinase C-alpha activity modulates transepithelial permeability and cell junctions in the LLC-PK1 epithelial cell line*. *J Biol Chem*. 272, 14950-14953.
- 148 Rotoli, B.M.; Orlandini, G.; Guizzardi, S. (2004): *Ethanol increases the paracellular permeability of monolayers of CAPAN-1 pancreatic duct cells*. *J Mol Histol*. 35, 355-366.
- 149 Saitou, M.; Fujimoto, K.; Doi, Y. et al. (1998): *Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions*. *J Cell Biol*. 141, 397-408.
- 150 Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H. et al. (2000): *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands*. *Mol Biol Cell* 11, 4131-4142.

- 151 Saluja, A.K.; Bhagat, L.; Lee, H.S. et al. (1999): *Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini*. Am J Physiol. 276, G835-G842.
- 152 Saluja, A.K.; Donovan, E.A.; Yamanaka, K. et al. (1997): *Caerulein induced trypsinogen activation in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B*. Gastroenterology 113, 304-310.
- 153 Saluja, A.K.; Saito, I.; Saluja, M. et al. (1985): *In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein*. Am J Physiol. 249, G702-G710.
- 154 Saluja, A.K.; Saluja, M.; Printz, H. et al. (1989): *Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion*. Proc Natl Acad Sci USA 86, 8968-8971.
- 155 Sans, M.D.; Di Magno, M.J.; D'Alecy, L.G. (2003): *Caerulein-induced acute pancreatitis inhibits protein synthesis through effects on eIF2B and eIF4F*. Am J Gastrointest Liver Physiol. 285, G517-528.
- 156 Sata, N.; Kimura, W.; Muto, T. et al. (1996): *Exocrine function of caerulein-induced acute pancreatitis in anesthetized rats*. J Gastroenterol. 31, 94-99.
- 157 Satoh, A.; Gukovskaya, A.S.; Nieto, J.M. (2004): *PKC-delta and -epsilon regulate NF-kappaB activation induced by cholecystinin and TNF-alpha in pancreatic acinar cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 287, G582-592.
- 158 Sawada, N.; Murata, M.; Kikuchi, K. et al. (2003): *Tight junctions and human diseases*. Med Electron Microsc. 36, 147-156.
- 159 Schäfer, C.; Ross, S.E. Bragado, M.J. et al. (1998): *A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini*. J Biol Chem. 273, 24173-24180.
- 160 Schmidt, R.F.; Thews, G., Lang, S. (2000): *Physiologie des Menschen*. 28. Auflage. Berlin, Heidelberg (Springer).
- 161 Schmitt, M.; Kubitz, R.; Lizun, S. et al. (2001): *Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity*. Hepatology 33, 509-518.
- 162 Schulz, H.U.; Niederau, C.; Klonowski-Stumpe, H. et al. (1999): *Oxidative stress in acute pancreatitis*. Hepatogastroenterology 46, 2736-2750.

- 163 Senninger, N.; Moody, F.G.; Van Buren, D.H. et al. (1984): *Effect of biliary obstruction on pancreatic exocrine secretion in conscious opossums*. Surg Forum 35, 226-228.
- 164 Simon, D.B.; Lu, Y.; Choate, K.A. et al. (1999): *Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption*. Science 285, 103-106.
- 165 Smith, J.M.; Dornish, M.; Wood, E.J. (2005): *Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption*. Biomaterials 26, 3269-3276.
- 166 Staehelin, L.A. (1974): *Structure and function of intercellular junctions*. Int Rev Cytol. 39, 191-283.
- 167 Steer, M.L. (1992): *How and where does acute pancreatitis begin?* Arch Surg. 127, 1350-1353.
- 168 Steer, M.L. (1999): *Early events in acute pancreatitis*. Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol. 13, 213-225.
- 169 Steer, M.L.; Meldolesi, J. (1987): *The cell biology of experimental pancreatitis*. N Engl J Med. 316, 144-150.
- 170 Steinberg, W.; Tenner, S. (1994): *Acute Pancreatitis*. N Engl J Med. 330, 1198-1210.
- 171 Steinle, A.U.; Weidenbach, H.; Wagner, M. et al. (1999): *NF-kappaB/Rel activation in caerulein pancreatitis*. Gastroenterology 116, 420-430.
- 172 Stevenson, B.R. (1999): *Understanding tight junction clinical physiology at the molecular level*. J Clin Invest. 104, 3-4.
- 173 Stevenson, B.R.; Siliciano, J.D.; Mooseker, M.S. et al. (1986): *Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia*. J Cell Biol. 103, 755-766.
- 174 Stuart, R.O.; Nigam, S.K. (1995): *Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci USA 92, 6072-6076.
- 175 Stuart, R.O.; Sun, A.; Bush, K.T. et al. (1996): *Dependence of epithelial intercellular junction biogenesis on thapsigargin-sensitive intracellular calcium stores*. J Biol Chem. 271, 13636-13641.
- 176 Torgerson, R.R.; McNiven, M.A. (1998): *The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing*. J Cell Sci. 111 (Pt 19), 2911-2922.
- 177 Trischitta, F.; Denaro, M.G.; Faggio, C. et al. (2001): *Ca⁺⁺ regulation of paracellular permeability in the middle intestine of the eel, Anguilla anguilla*. J Comp Physiol. [B] 171, 85-90.

- 178 Trocha, S.D.; Kevil, C.G.; Mancini, M.C. et al. (1999): *Organ preservation solutions increase endothelial permeability and promote loss of junctional proteins*. *An Surg.* 230, 105-113.
- 179 Tsien, R.Y. (1980): *New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis and properties of prototype structures*. *Biochemistry* 19, 2396-2404.
- 180 Tsukita, S.; Furuse, M. (1999): *Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?* *Cell Biol.* 9, 268-273.
- 181 Tsukita, S.; Furuse, M. (2002): *Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets*. *Curr Opin Cell Biol.* 14, 531-536.
- 182 Tsunoda, Y.; Stuenkel, E.L.; Williams, J.A. (1990): *Oscillatory mode of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells*. *Am J Physiol.* 258, C147-C155.
- 183 Kikkawa, U.; Nishizuka, Y. (1986): *The role of protein kinase C in transmembrane signalling*. *Ann Rev Cell Biol.* 2, 149-178.
- 184 Valentijn, K.M.; Gumkowski, F.D.; Jamieson, J.D. (1999): *The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and membrane retrieval in pancreatic acinar cells*. *J Cell Sci.* 112 (Pt 1), 81-96.
- 185 Van der Wouden, J.M.; Maier, O.; van IJzendoorn, S.C. et al. (2003): *Membrane dynamics and the regulation of epithelial cell polarity*. *Int Rev Cytol.* 226, 127-164.
- 186 Van Meer, G.; Simons, K. (1986): *The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells*. *EMBO J.* 5, 1455-1464.
- 187 Wachtel, M.; Frei, K.; Ehler, E. et al. (1999): *Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition*. *J Cell Sci.* 112, 4347-4356.
- 188 Wagner, A.C.; Metzler, W.; Hofken, T. et al. (1999): *P38 map kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following caerulein hyperstimulation*. *Digestion* 60, 41-47.
- 189 Wan, H.; Winton, H.L.; Soeller, C. et al. (1999): *Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions*. *J Clin Invest.* 104, 123-133.
- 190 Wan, H.; Winton, H.L.; Soeller, C. et al. (2001): *The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 31(2), 279-294.

- 191 Ward, J.B.; Sutton, R.; Jenkins, S.A. et al. (1996): *Progressive disruption of acinar cell calcium signaling is an early feature of caerulein-induced pancreatitis in mice.* Gastroenterology 111, 481-491.
- 192 Wenzel-Seifert, K.; Schachtele, C.; Seifert, R.(1994): *N-protein kinase C isoenzymes may be involved in the regulation of various neutrophil functions.* Biochem Biophys Res Commun. 200(3), 1536-1543
- 193 Wilcox, E.R.; Burton, Q.L.; Naz, S. et al. (2001): *Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29.* Cell 104, 165-172.
- 194 Willemer, S.; Elsasser, H.P.; Adler, G. (1992): *Hormone-induced pancreatitis.* Eur Surg Res. 24 Suppl 1, 29-39.
- 195 Williams, J.A. (1997): *Pancreatic acinar cell intracellular signaling mechanisms.* Curr Opin Gastroent. 13, 369-374.
- 196 Williams, J.A. (2001): *Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells.* Annu Rev Physiol.63, 77-97.
- 197 Williams, J.A.; Blevins, G.T. (1993): *Cholecystokinin and regulation of pancreatic acinar cell function.* Physiol Rev. 73, 701-723.
- 198 Willott, E.; Balda, M.S.; Heintzelman, M. et al. (1992): *Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1.* Am J Physiol. 262, C1119-C1124.
- 199 Wittchen, E.S.; Haskins, J.; Stevenson, B.R. (1999): *Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3.* J Biol Chem. 274, 35179-35185.
- 200 Wong, V. (1997): *Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction.* Am J Physiol. 273, C1859-C1867.
- 201 Wong, V.; Gumbiner, B.M. (1997): *A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier.* J Cell Biol. 136, 399-409.
- 202 Ye, J.; Tsukamoto, T.; Sun, A. et al. (1999): *A role for intracellular calcium in tight junction reassembly after ATP depletion-repletion.* Am J Physiol.277, F524-F532.
- 203 Youakim, A.; Ahdieh, M. (1999): *Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin.* Am J Physiol. 276, G1279-G1288.

204 Yu, A.S.; McCarthy, K.M.; Francis, S.A. (2005): *Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288, C1191-C1192.

Verzeichnis der Chemikalien

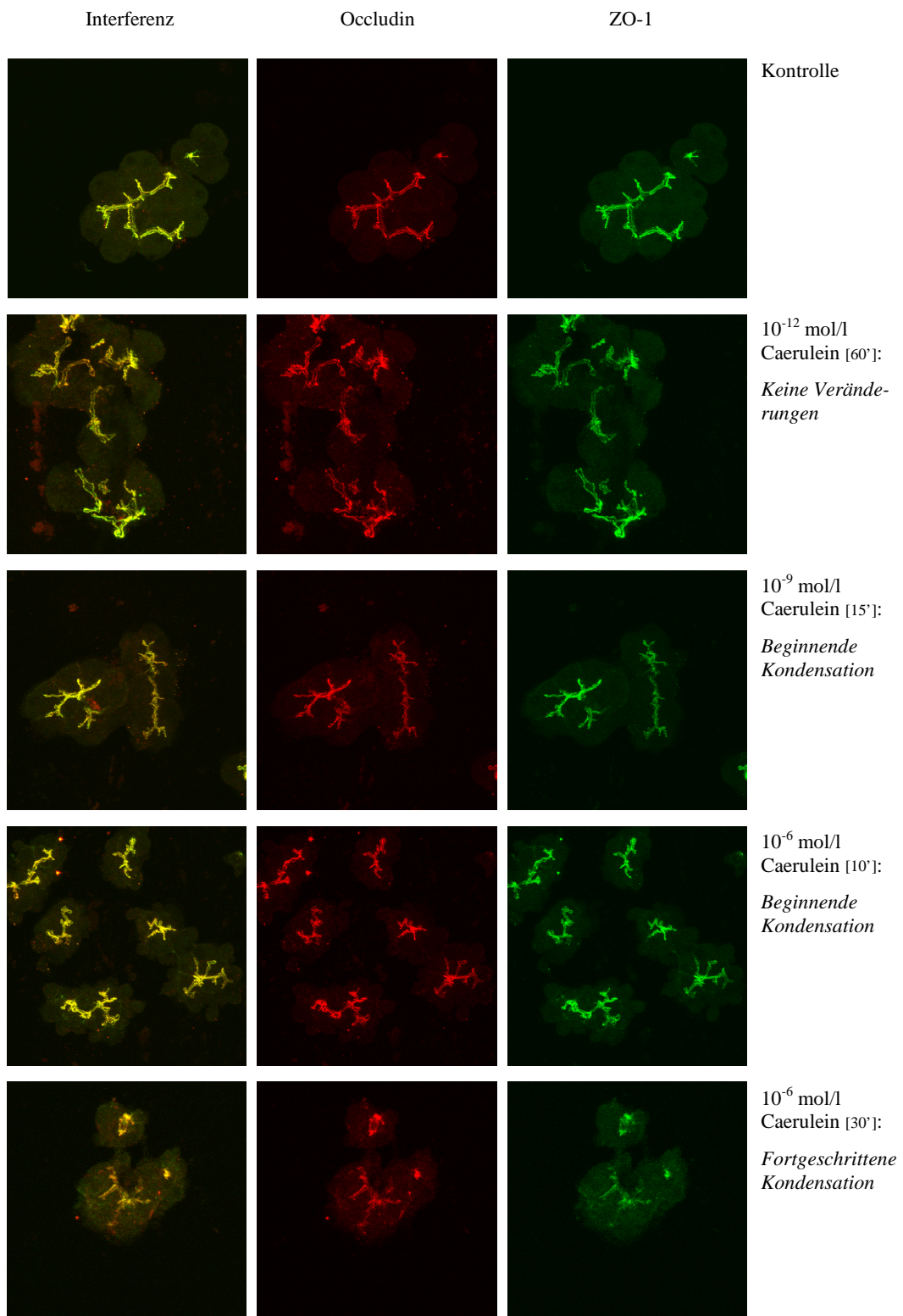
<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Firmensitz</i>
<i>Erstantikörper</i>		
monoklonal Maus anti Occludin	Zymed	San Francisco, USA
polyklonal Hase anti Claudin	Zymed	San Francisco, USA
polyklonal Ratte anti ZO-1	Jackson	Westgrove, USA
monoklonal Maus anti Tubulin	Progen	Heidelberg, D
Phalloidin TRITC	Progen	Heidelberg, D
<i>Zweitantikörper</i>		
Ziege anti Maus Cy 3	Jackson	Westgrove, USA
Ziege anti Ratte Fitc Alexa	Molecular Probes	Leiden, NL
Ziege anti Hase Alexa FITC	Molecular Probes	Leiden, NL
<i>BAPTA</i>	Calbiochem	
<i>Caerulein</i>	Farmitalia	Freiburg, D
<i>Dulbecco`s Medium</i>	Biochrom AG	Berlin, D
<i>Gammaglycerolphosphat</i>	Boehringer	Mannheim, D
<i>GÖ6976</i>	Calbiochem	
<i>2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES)</i>	Merck	Darmstadt, D
<i>Hyperfilm ECL-Filme</i>	Amersham	Freiburg, D
<i>Instamed (Dulbecco`s PBS)</i>	Biochrom AG	Berlin, D
<i>Kollagenase</i>	Worthington Biochemical Corp.	Freehold, USA
<i>Lipase-PS-Test</i>	Sigma	Deisenhofen, D
<i>Matrigel</i>	B.D.Transduktionslaboratorien	Heidelberg, D
<i>Mounting Medium</i>	DAKO	Hamburg, D
<i>Phadebas Amylase Test</i>	Pharmacia&Upjohn	Uppsala, S
<i>PD98059</i>	Calbiochem	
<i>Proteaseinhibitor</i>	Boehringer	Mannheim, D
<i>Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI)</i>	Sigma	Deisenhofen, D
<i>Transferapparatur</i>	Pharmacia&Upjohn	Uppsala, S
<i>Ziegenserum</i>	Sigma	Deisenhofen, D

Abbildungsverzeichnis

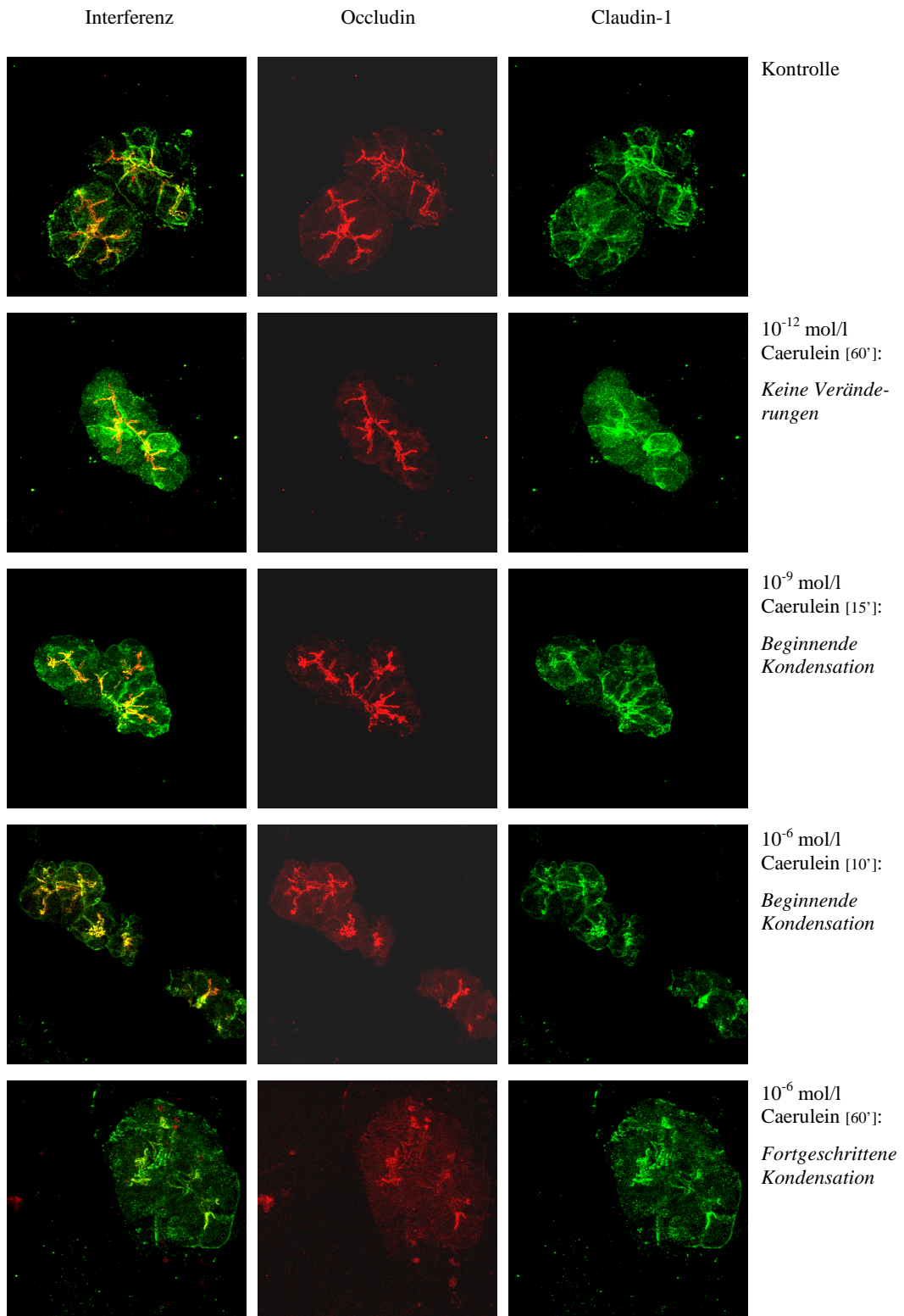
Abb. 1:	Pankreatischer Azinus	4
Abb. 2:	Tight-Junctions zwischen benachbarten Azinuszellen	6
Abb. 3:	Occludin und Claudin an der Zellmembran	8
Abb. 4:	Schematischer Aufbau des Tight-junction-Komplexes	10
Abb. 5:	Intrazelluläre Signalkaskade nach Stimulation mit Caerulein	13
Abb. 6:	Western-Blot-Analyse von Occludin und Claudin-1 nach niedrig bzw. hoch dosierter In-vivo-Stimulation mit Caerulein	29
Abb. 7:	Amylaseaktivität nach 0,25 µg und 50 µg Caerulein/kg KG/h	30
Abb. 8:	Lipaseaktivität nach 0,25 µg und 50 µg Caerulein/kg KG/h	30
Abb. 9:	Potenzielle Wirkung von Caerulein auf Tight-junction-Proteine über die intrazelluläre Signaltransduktion	49

Farbtafeln

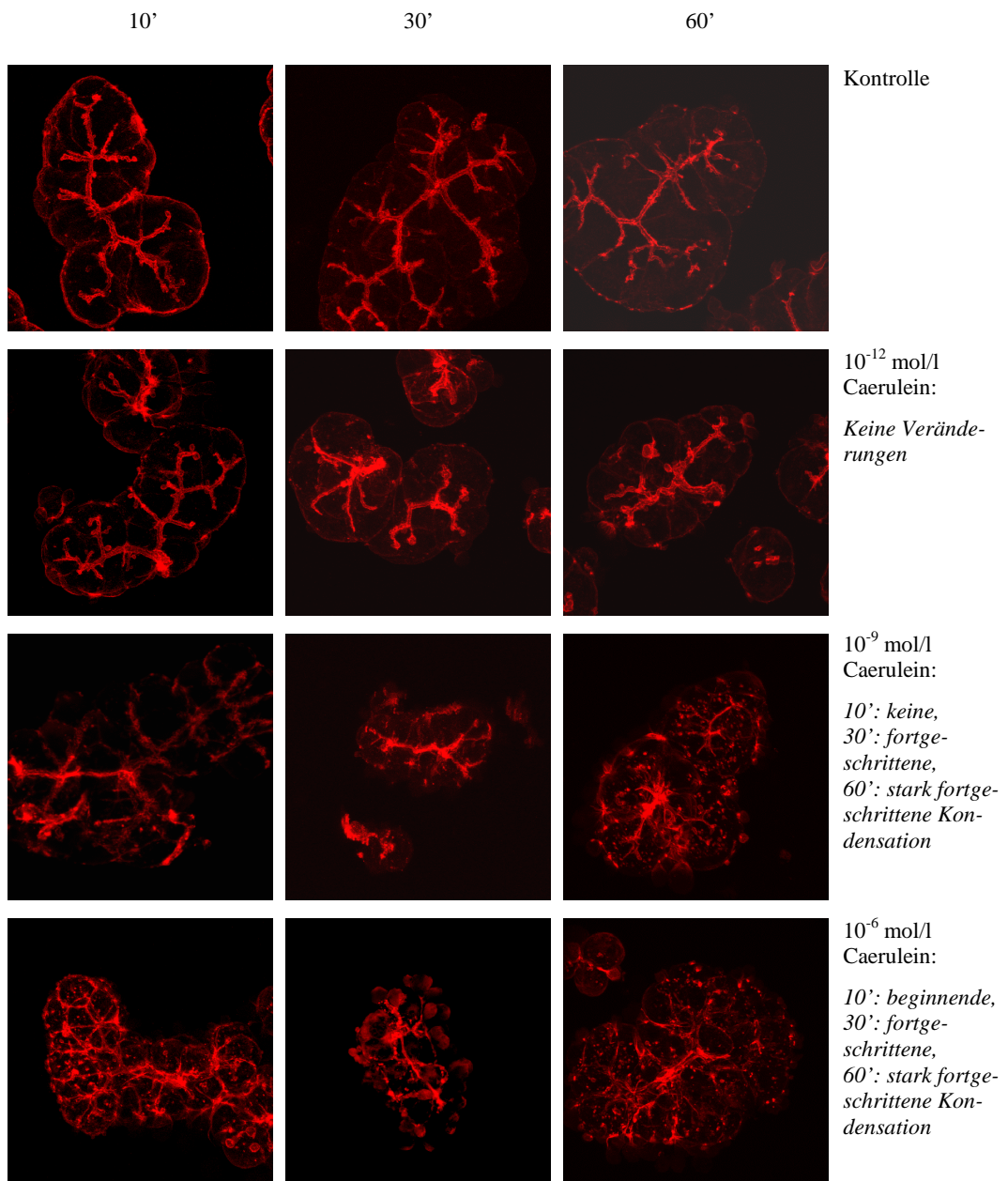
Tafel I:	Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und ZO-1 bei isolierten pankreatischen Azini	77
Tafel II:	Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und Claudin-1 bei isolierten pankreatischen Azini	78
Tafel III:	Caerulein-induzierte Kondensation von F-Aktin bei isolierten pankreatischen Azini	79
Tafel IV:	Färbemuster von Occludin und ZO-1 bei geringer (nicht Pankreatitis induzierender) Stimulation mit Caerulein (Pankreas-Kryoschnitte)	80
Tafel V:	Färbemuster von Occludin und Claudin-1 bei geringer (nicht Pankreatitis induzierender) Stimulation mit Caerulein (Pankreas-Kryoschnitte)	80
Tafel VI:	Kondensation des F-Aktin-Färbemusters bei der caerulein-induzierten Pankreatitis (Pankreas-Kryoschnitte)	81
Tafel VII:	Färbemuster von F-Aktin bei geringer (nicht Pankreatitis induzierender) Stimulation mit Caerulein (Pankreas-Kryoschnitte)	81
Tafel VIII:	Kondensation des Occludin- und ZO-1-Färbemusters bei der caerulein-induzierten Pankreatitis (Pankreas-Kryoschnitte)	82
Tafel IX:	Kondensation des Occludin- und Claudin-1-Färbemusters bei der caerulein-induzierten Pankreatitis (Pankreas-Kryoschnitte)	83
Tafel X:	Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und ZO-1 bei isolierten pankreatischen Azini trotz Vorinkubation in 50 μ M bzw. 5 μ M BAPTA-Lösung	84
Tafel XI:	Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und ZO-1 bei isolierten pankreatischen Azini trotz Vorinkubation in 10 μ M GÖ6976-Lösung.....	85
Tafel XII:	Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und ZO-1 bei isolierten pankreatischen Azini trotz Vorinkubation in 10 mM PD-Lösung.....	86



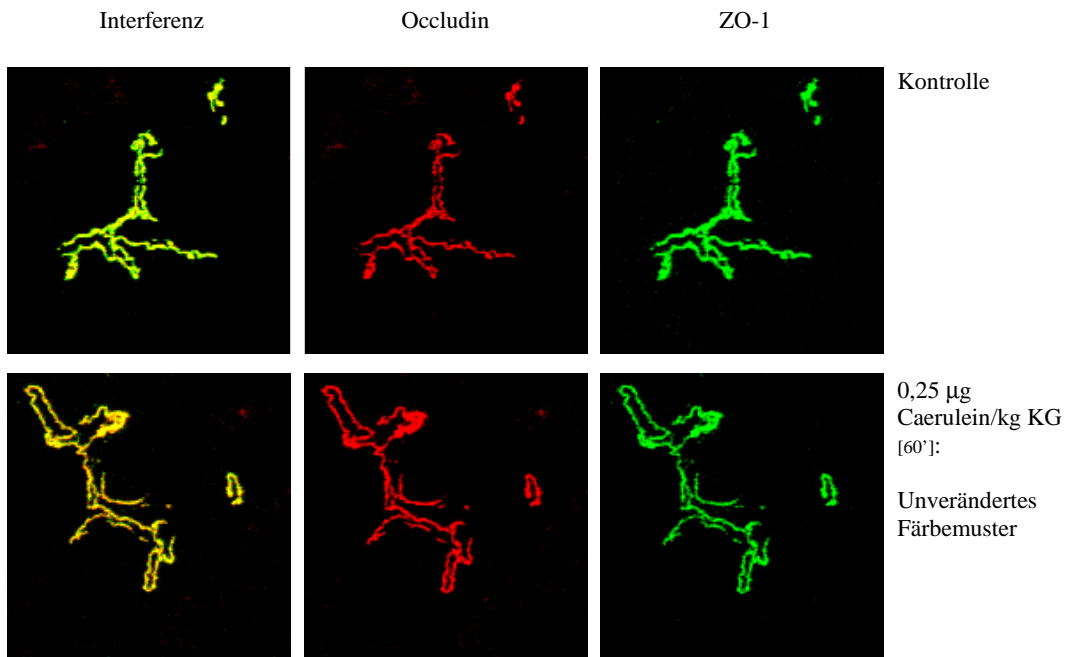
Tafel I: *Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und ZO-1 bei isolierten pankreatischen Azini*



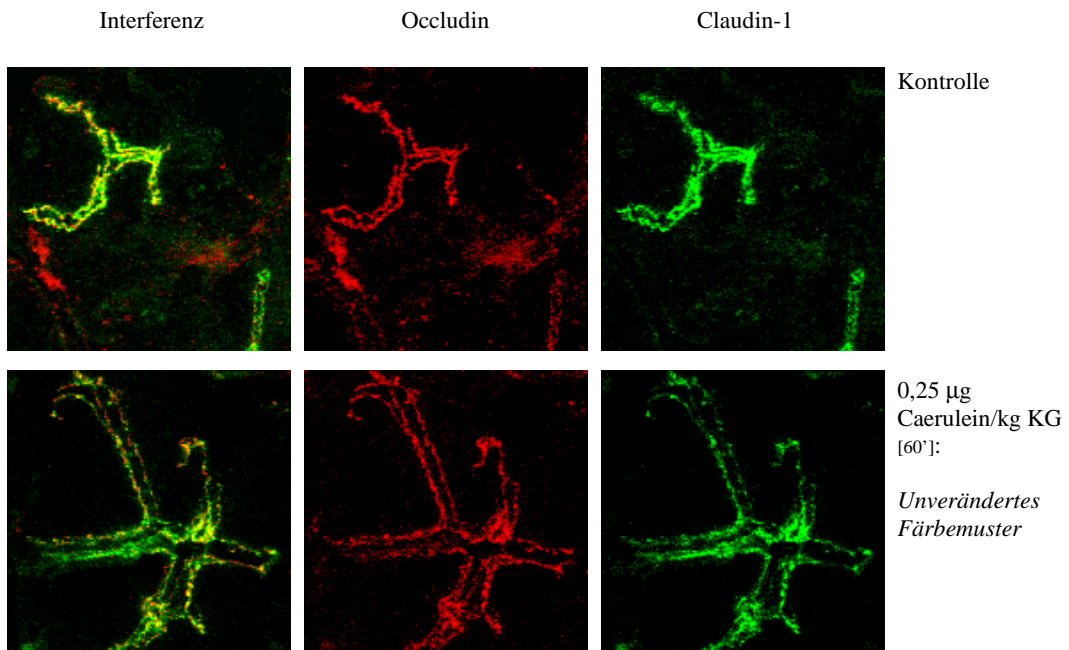
Tafel II: *Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und Claudin-1 bei isolierten pankreatischen Azini*



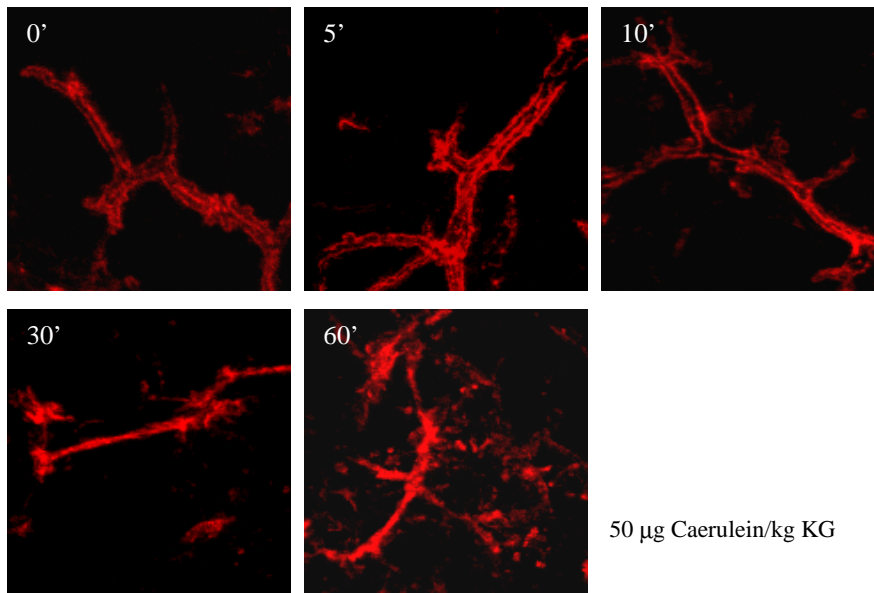
Tafel III: *Caerulein-induzierte Kondensation von F-Aktin bei isolierten pankreatischen Azini*



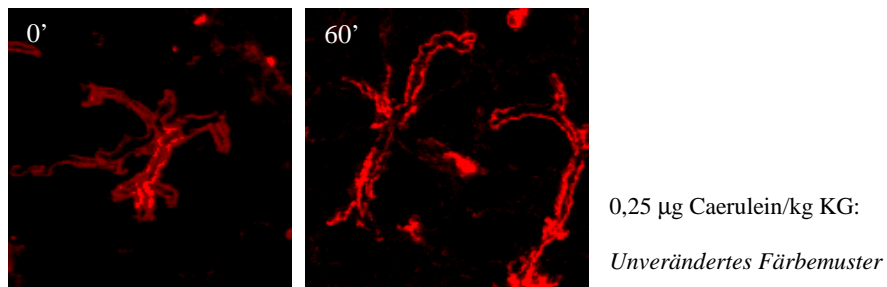
Tafel IV: *Färbemuster von Occludin und ZO-1 bei geringer (nicht Pankreatitis induzierender) Stimulation mit Caerulein (Pankreas-Kryoschnitte)*



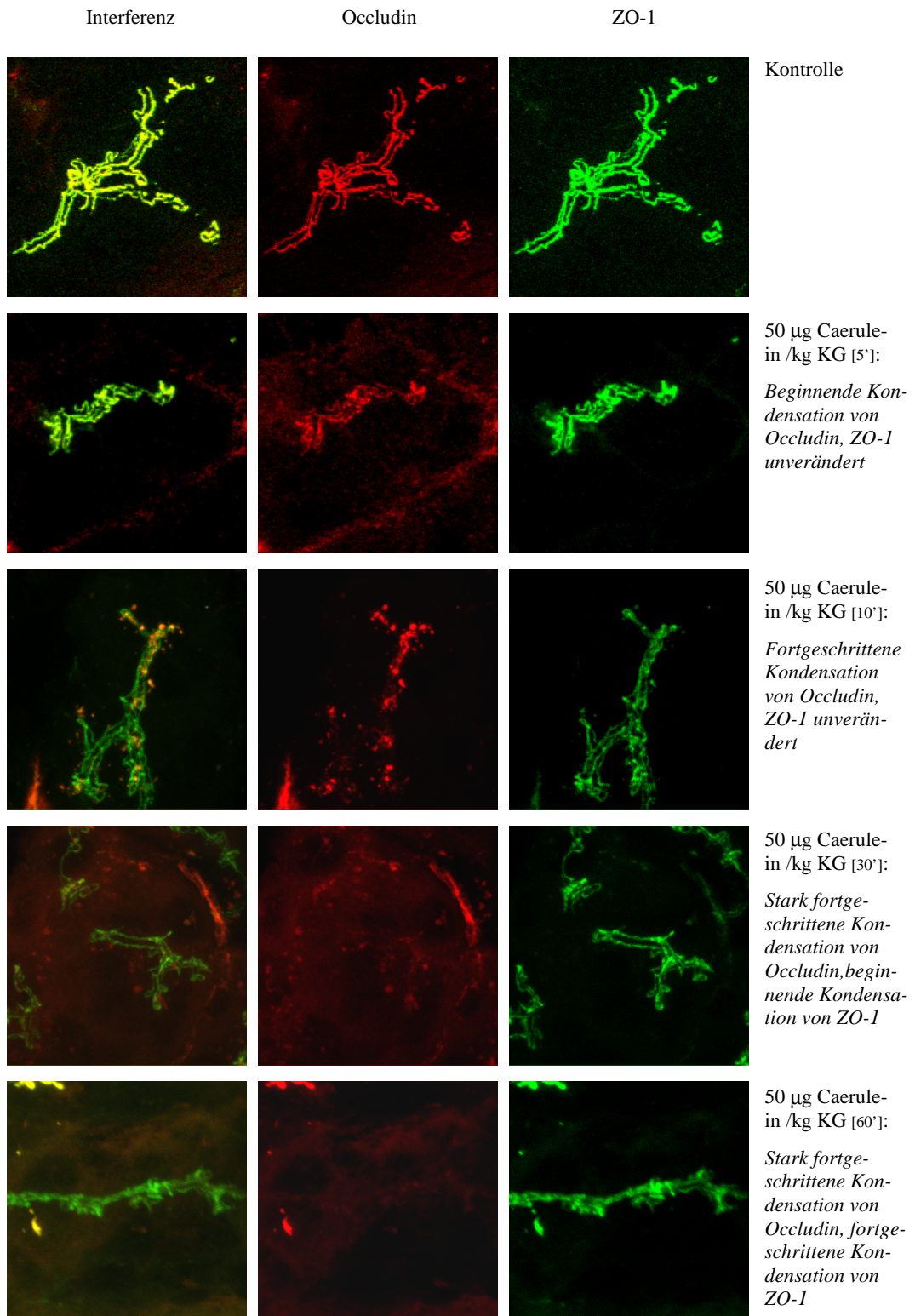
Tafel V: *Färbemuster von Occludin und Claudin-1 bei geringer (nicht Pankreatitis induzierender) Stimulation mit Caerulein (Pankreas-Kryoschnitte)*



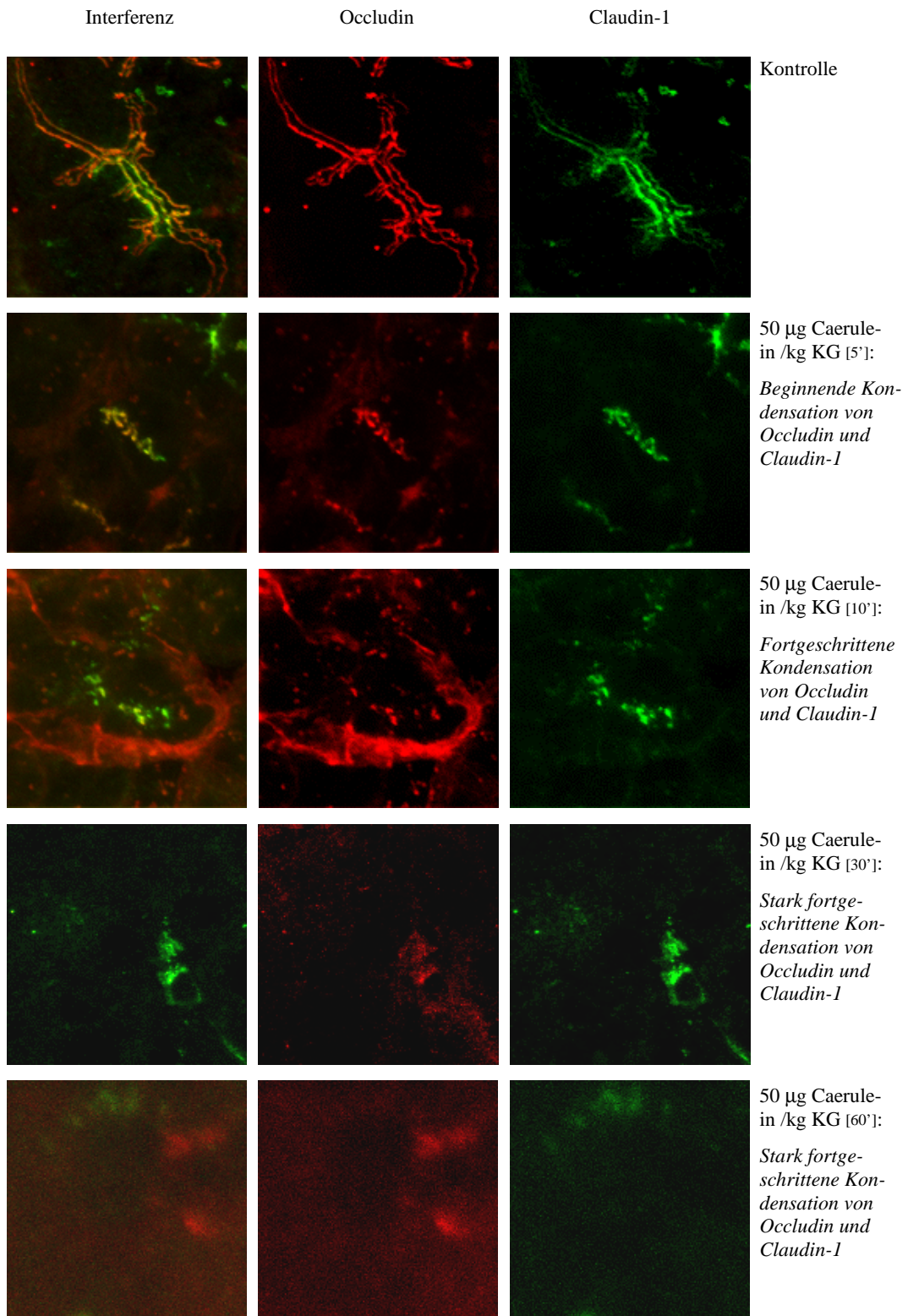
Tafel VI: *Kondensation des F-Aktin-Färbemusters bei der caerulein-induzierten Pankreatitis (Pankreas-Kryoschnitte)*



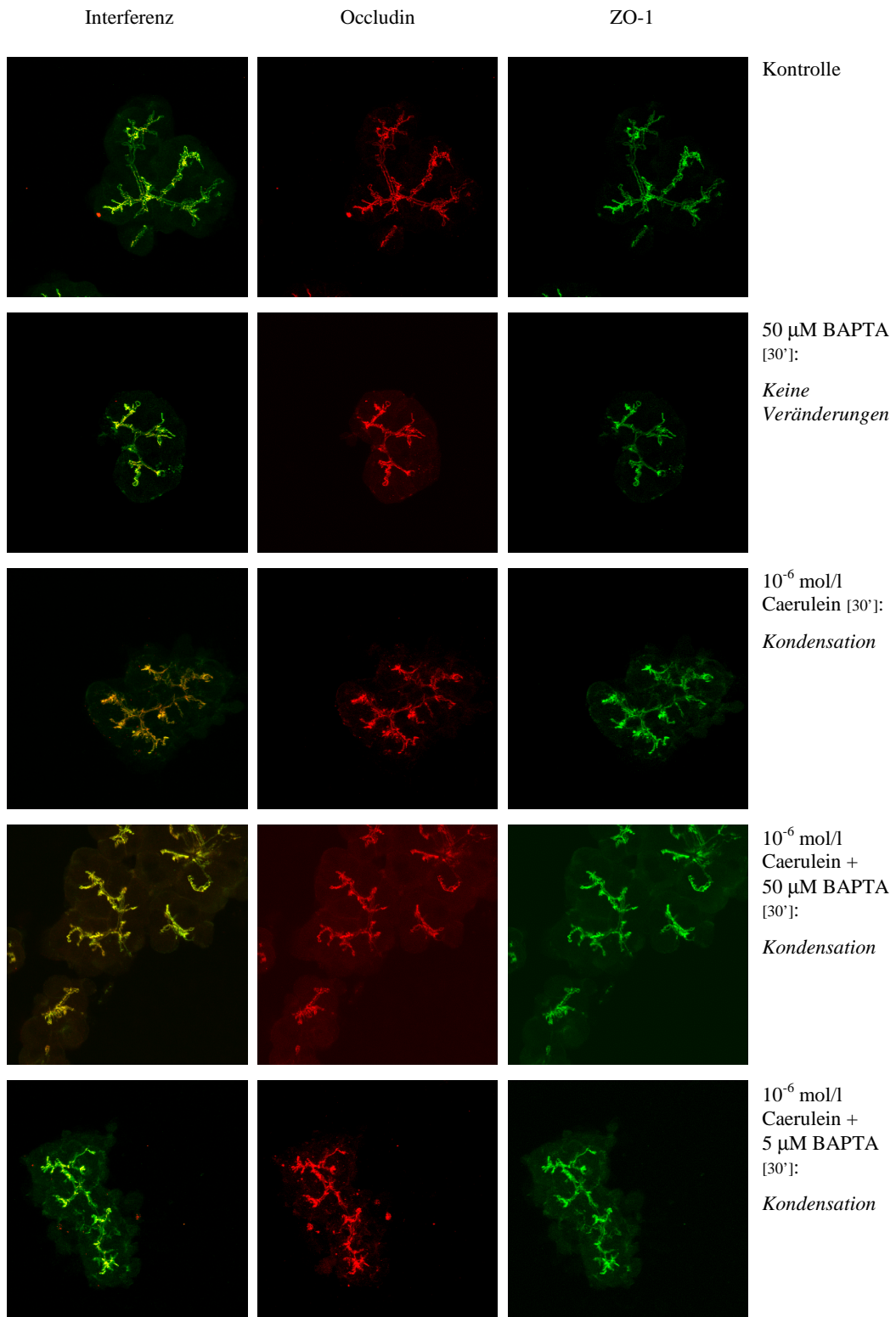
Tafel VII: *Färbemuster von F-Aktion bei geringer (nicht Pankreatitis induzierender) Stimulation mit Caerulein (Pankreas-Kryoschnitte)*



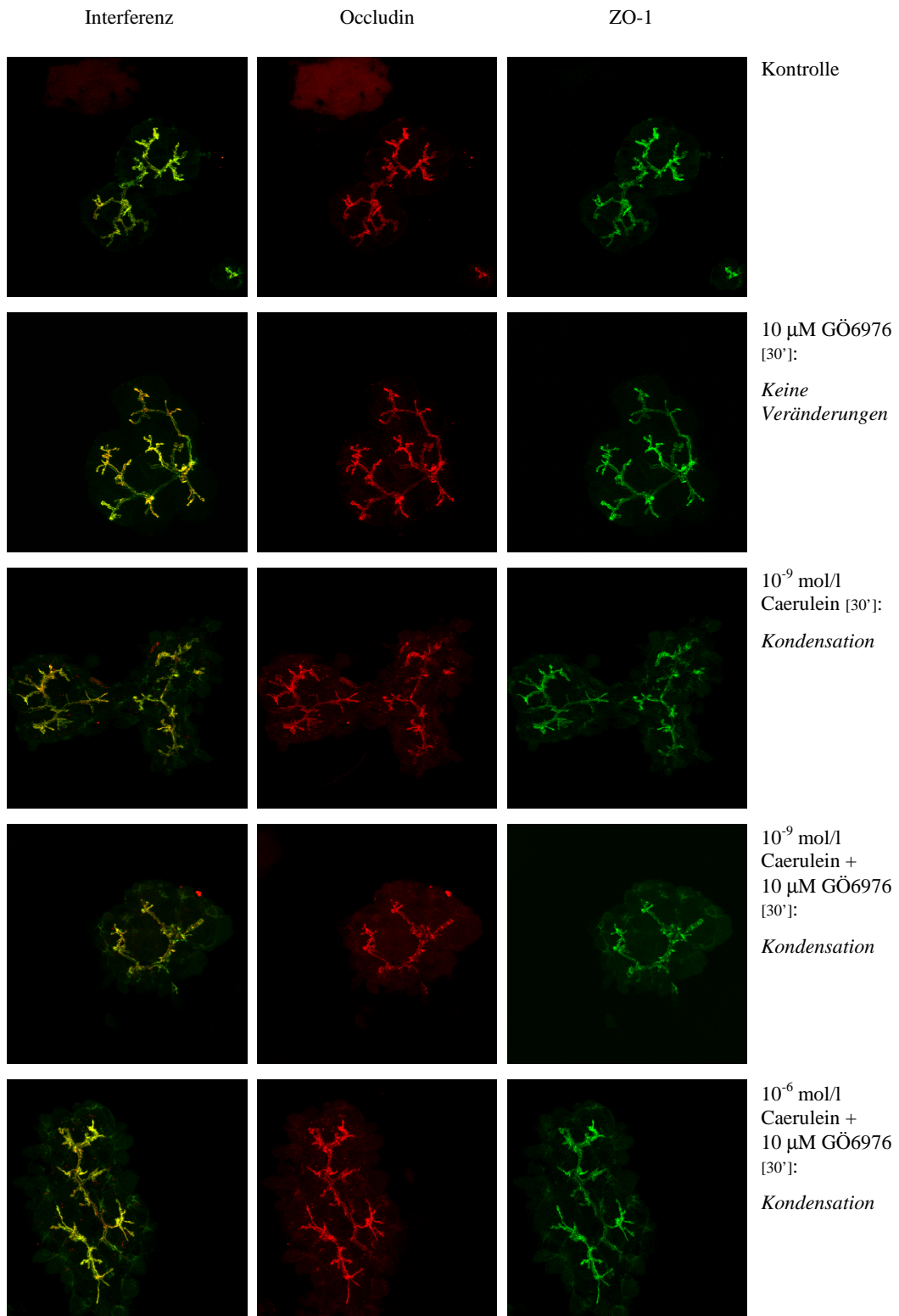
Tafel VIII: Kondensation des Occludin- und ZO-1-Färbemusters bei der caerulein-induzierten Pankreatitis (Pankreas-Kryoschnitte)



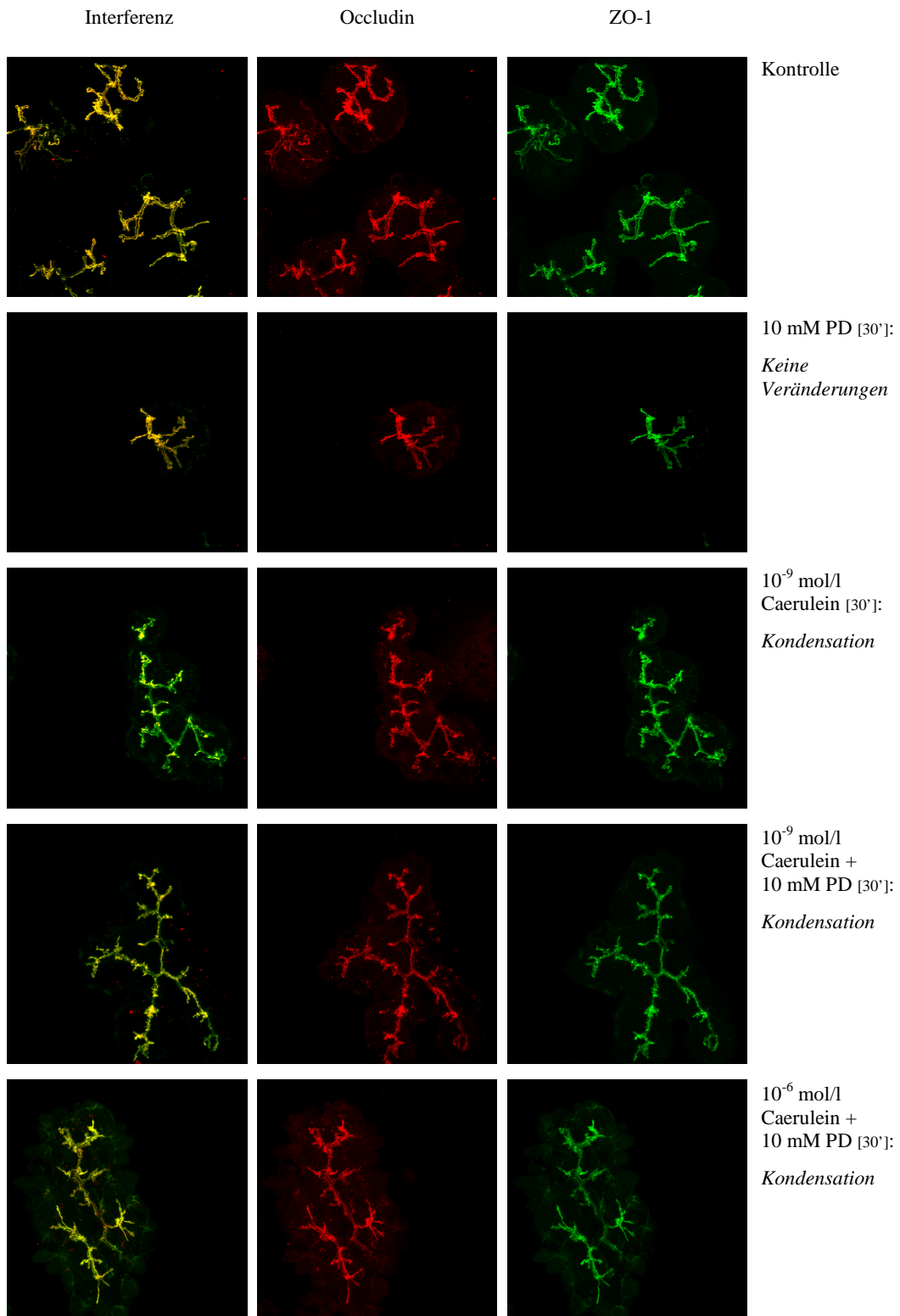
Tafel IX: *Kondensation des Occludin- und Claudin-1-Färbemusters bei der caerulein-induzierten Pankreatitis (Pankreas-Kryoschnitte)*



Tafel X: *Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und ZO-1 bei isolierten pankreatischen Azini trotz Vorinkubation in 50 μM bzw. 5 μM BAPTA-Lösung*



Tafel XI: *Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und ZO-1 bei isolierten pankreatischen Azini trotz Vorinkubation in 10 μM GÖ6976-Lösung*



Tafel XII: *Caerulein-induzierte Kondensation von Occludin und ZO-1 bei isolierten pankreatischen Azini trotz Vorinkubation in 10 mM PD-Lösung*

Publikationen

Schmitt, M.; Klonowski-Stumpe, H.; Eckert, M.; Lüthen, R.; Häussinger, D. (2004):
Disruption of paracellular sealing is an early event in acute caerulein-pancreatitis.
Pancreas 28, 181-190.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Mario Eckert geboren am 17. Juni 1972 in Düren-Birkesdorf
Schulbildung	<i>1982-1991: Stiftisches Gymnasium Düren</i>
Zivildienst	<i>1991-1992: Heilpädagogischer Kindergarten der Lebenshilfe Düren</i>
Berufsausbildung	<i>1994-1997: Ausbildung zum Krankenpfleger an der Rheinischen Landeslinik Düren</i>
Studium	<i>1997-2004: Studium der Humanmedizin an der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf 1999: Ärztliche Vorprüfung 2000: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2000: Beginn der Dissertation am Institut für experimentelle Hepatology der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2002: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2004: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</i>
Berufstätigkeiten	<i>August - September 2004: Arzt im Praktikum in der Fach- abteilung für Neurologie des Klinikum Krefeld seit Oktober 2004: Assistenzarzt in der Fachabteilung für Neurologie des Klinikum Krefeld</i>

Abstract

Informationen über das Verhalten der transmembranären Verschlussproteine Occludin und Claudin-1 bei Pankreatitis gab es bisher nicht. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine supramaximale Stimulation mit Caerulein, Auslöser der interstitiell ödematösen Pankreatitis, die Struktur dieser beiden Proteine beeinflusst und ob hierbei die Signaltransduktoren Calcium (Ca^{2+}), Proteinkinase C (PKC) und/oder Mitogenaktivierte-Proteinkinasen (MAPK) beteiligt sind. Die Serumenzymaktivität von Amylase und Lipase, sowie zwei rein zytoplasmatisch lokalisierte Proteine des Tight-Junctions (TJ)-Komplexes, exemplarisch Zonula occludens Protein-1 (ZO-1) und F-Aktin, wurden in die Untersuchungen miteingeschlossen.

Isolierte pankreatische Azinuszellen der Maus wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Cholezystokininanalogs inkubiert oder es wurde Mäusen der Wirkstoff intraperitoneal injiziert (maximale Stimulation mit 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg KG/h}$, supramaximale – pankreatitis-induzierende – mit 50 $\mu\text{g}/\text{kg KG/h}$), um aus den stimulierten Pankreaspräparaten Kryoschnitte herzustellen. Anschließend wurden immunhistochemische Anfärbungen zur konfokalen Lasermikroskopie angefertigt. Die Modifikationszeitpunkte der transmembranären Proteine und die Spezifität der benutzten Antikörper wurden mittels Western Blot bestätigt. Die oben genannten Signalwege wurden mit den für sie spezifischen Inhibitoren 1,2-Bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (BAPTA), [12-(2-Cyanoethyl)]-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5Hindolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole (GÖ6976) bzw. 2'-Amino-3'methoxyflavone (PD98059) blockiert.

Unter Kontrollbedingungen zeigten alle TJ-Proteine ein lineares, gleichmäßiges Färbemuster an der apikalen Membran von Azinus- und intralobulären Gangzellen. *In vitro* bestand ein zeitgleicher Verlust der Färbemuster aller untersuchten Proteine ab 10 Minuten nach hoch dosierter Stimulation. *In vivo* resultierte bereits ab fünf Minuten ein Aufreißen der Verschlussproteine Occludin und Claudin-1 *post stimulationem*. Ihre Disintegration ging dem Anstieg der Serumenzymaktivität voraus. Ebenso folgten *in vivo* morphologische Veränderungen von F-Aktin und ZO-1 denen der transmembranären Proteine erst 20 Minuten später nach. Keiner der untersuchten Inhibitoren modifizierte das Anfärbemuster der untersuchten Proteine Occludin und ZO-1 in den Kontrollen; es konnte jedoch ebenso durch keinen die durch Caerulein bedingte Disintegration verhindert werden.

Die Ergebnisse sprechen für eine zeitliche Sequenz in der Disintegration zytoskelettal-zytoplasmatischer und transmembranärer Bestandteile des TJ-Komplexes bei Pankreatitis. Sie beginnt mit der Modifikation von Occludin und Claudin. Die Reihenfolge der untersuchten Ereignisse unterstreicht somit die Bedeutung der transmembranären Proteine für Aufbau und Funktion der parazellulären Barriere und ist ein Hinweis auf eine mögliche Modifikation dieser unabhängig vom Zytoskelett. Die Alteration der Verschlussleisten könnte den Übertritt vorzeitig aktivierter Verdauungsenzyme in das Drüseninterstitium begünstigen. Den Signaltransduktoren Ca^{2+} , PKC und MAPK scheint in diesem Modell keine wesentliche Bedeutung für die Öffnung der parazellulären Barriere zuzukommen.

gez. Referent PD Dr. med. Reinhold Lüthen