

Matrix Metalloproteinasen
und deren Inhibitoren im
Verlauf der experimentellen
chronischen Pankreatitis.



Ilse Janner

Aus der Klinik für Innere Medizin, Abteilung für Gastroenterologie

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Stefan Liebe

Matrix Metalloproteinasen und deren Inhibitoren im Verlauf der experimentellen chronischen Pankreatitis.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

Vorgelegt von
Ib Jammer, geboren am 5. März 1975 in Flensburg
Aus Bergen, Norwegen

Bergen 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0068-5

Dekan: Prof. Dr. Emil Christian Reisinger, Medizinische Fakultät, Universität Rostock.

1.Gutachter: Prof. Dr. Jörg Emmrich, Medizinische Fakultät, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abt. für Gastroenterologie, Universität Rostock.

2.Gutachter: Prof. Dr. Ernst Klar, Medizinische Fakultät, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universität Rostock.

3.Gutachter: Prof. Dr. Peter Malfertheiner, Medizinische Fakultät, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

1 Einführung und Fragestellung	4
1.1 Einleitung	4
1.2 Materialgewinnung	5
1.3 Pankreaserkrankungen	5
1.3.1 <i>Die akute Pankreatitis</i>	5
1.3.2 <i>Die chronische Pankreatitis</i>	6
1.4 Tiermodelle zur Pankreatitis	8
1.5 Modelle der akuten Pankreatitis	8
1.5.1 <i>Cerulein Pankreatitis</i>	8
1.5.2 <i>Cholinarme ethionin-haltige Diät</i>	8
1.5.3 <i>Das Trypsinmodell</i>	8
1.5.4 <i>Operative Obstruktion des Duodenums</i>	9
1.6 Modelle der chronischen Pankreatitis	9
1.6.1 <i>Operative Obstruktion des Duodenums</i>	9
1.6.2 <i>Das Zein-Ölsäure-Linolsäure Modell</i>	9
1.6.3 <i>Überexpression vom Transforming Growth Factor-α im Pankreas an der transgenen Maus</i>	9
1.6.4 <i>Überexpression vom Transforming Growth Factor-β im Pankreas an der transgenen Maus</i>	9
1.6.5 <i>Transgene Maus mit dominant-negativer Mutante des TGF-β Typ II Rezeptors.</i>	10
1.6.6 <i>Pankreasfibrose induziert durch Trinitrobenzen Sulfonsäure (TNBS)</i>	10
1.6.7 <i>Chronische experimentelle Pankreatitis induziert durch Dibutylzinn-Dichlorid.</i>	10
1.7 Pankreatische Stellatezellen	12
1.8 Matrix Metalloproteinasen und Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen	12
1.9 Fibrose, pankreatische Stellatezellen und Matrix Metalloproteinasen	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	17
2.1.2 <i>DNA Oligonukleotide</i>	18
2.1.3 <i>Puffer und Lösungen</i>	19
2.1.4 <i>Bakterienkulturmedien</i>	20
2.1.5 <i>Kits</i>	20
2.1.6 <i>Versuchstiere</i>	21
2.1.7 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	21
2.1.8 <i>Geräte</i>	21
2.2 Induktion der chronischen DBTC-Pankreatitis	21

2.3 RNA-Extraktion aus dem Pankreas	21
2.4 Nachweis der mRNA-Expression	22
2.5 Kontrollfragment	22
2.5.1 <i>Plasmid DNA</i>	23
2.5.2 <i>Amplifikation von Bakterien</i>	24
2.5.3 <i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i>	25
2.6 RNA Elektrophorese	26
2.7 Reverse Transkriptase	26
2.8 Kompetitive Polymerase – Kettenreaktion	27
2.9 Elektrophorese der PCR-Produkte und Fluoreszenzauswertung	29
2.10 Präparation der pankreatischen Stellatezellen	29
2.11 PCR von pankreatischen Stellatezellen	30
2.12 Zymografie	31
2.12.1 <i>Probengewinnung</i>	31
2.12.2 <i>Trenn- und Sammelgel</i>	31
2.12.3 <i>Durchführung der Elektrophorese und Auswertung</i>	32
2.13 Hematoxylin & Eosin - Färbung	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Histologie der DBTC–Pankreatitis	33
3.2 Einstellung der cDNA mittels β-actin	35
3.3 Expression von Matrix Metalloproteinasen im Gewebe	36
3.3.1 <i>Expression von MMP-9</i>	36
3.3.2 <i>Expression von MMP-2 und MMP-3</i>	37
3.4 Expression von Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinasen im Gewebe	38
3.4.1 <i>Expression von TIMP-1</i>	38
3.4.2 <i>Expression von TIMP-2</i>	39
3.5 MMP in pankreatischen Stellatezellen	39
3.6 Statistik	41
4 Diskussion	42
4.1 Der Verlauf der DBTC-Pankreatitis	42
4.2 MMP-9	43
4.2.1 <i>MMP-9 aus Leukozyten</i>	43
4.2.2 <i>Beziehung zwischen der Basalmembran und MMP-9</i>	44
4.3 Synthese von MMP-9 in PSC	44
4.4 RNA-Expression von MMP-9 bei der chronischen DBTC-Pankreatitis	45
4.5 RNA-Expression von MMP-2, MMP-3, TIMP-1 und TIMP-2 bei der chronischen DBTC-Pankreatitis	46
4.6 Schlussfolgerungen	47

5 Thesen	48
6 Abkürzungsverzeichnis	51
7 Literatur	52
8 Danksagung	66
9 Selbstständigkeitserklärung	67

1 Einführung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Die Pankreatitis ist sowohl in ihrer akuten als auch in der chronischen Form eine in Mitteleuropa relativ häufige Erkrankung des Gastrointestinaltraktes (Prävalenz: 25-30 auf 100.000 Einwohner). Trotz aller Fortschritte in der Diagnostik und der Therapie ist sie noch nicht in ausreichendem Maß beherrschbar. Die akute Pankreatitis verläuft unter dem Bild des akuten Abdomens, heilt in den meisten Fällen jedoch folgenlos aus.¹ Die chronische Pankreatitis hingegen führt zu irreversibler Schädigung des Organs durch Fibrose. Nicht selten kommt es nach jahrelangem Verlauf mit rezidivierenden Attacken zur exokrinen und später auch zur endokrinen Insuffizienz.² Die akute Pankreatitis ist in der Regel biliärer oder alkoholischer Genese, während der chronischen Pankreatitis meist ein jahrelanger Alkoholabusus sowie auch ein Nikotinabusus zugrunde liegt. Nicht geklärt ist bislang die Frage, warum die akute Pankreatitis nach einem kurzen Zeitraum zur Rückbildung und Ausheilung gelangt, während die chronische Pankreatitis meist über Jahre persistiert, in Intervallen exazerbiert und schließlich zur Fibrose führt.

In den vergangenen Jahren rückte eine Enzymgruppe in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, mit deren Hilfe der Körper die Bildung und Aufrechterhaltung des Bindegewebes reguliert. Dabei handelt es sich um die Matrix- Metalloproteinasen (MMPs). Sie bilden eine Enzymgruppe, die für den Abbau der Extrazellulären Matrix verantwortlich ist und sind in der Lage, Bestandteile der Extrazellulärmatrix (ECM) zu spalten. Ihnen gegenüber stehen die Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMPs), welche mit den MMPs eine nicht-kovalente Bindung im Verhältnis 1:1 eingehen und sie dadurch hemmen. MMPs und TIMPs stehen dabei in einem Gleichgewicht, welches sehr genau den Auf- und Abbau der ECM steuert. Im gesunden Gewebe ist das Gleichgewicht von MMPs und TIMPs entscheidend für physiologische Prozesse.³ Wenn diese Regulation nicht mehr funktioniert, kommt es zu einer Minderproduktion von MMPs und einer vermehrten Ablagerung von ECM.

MMPs sind sowohl bei physiologischen, als auch bei pathologischen Prozessen des Körpers von entscheidender Bedeutung. In der Embryonalentwicklung sind sie ein wichtiger Faktor für die Ausbildung von Organen und der Implantation des Embryos.^{4,5} Sie spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Narbenbildung^{6,7} und der Metastasierung von malignen Tumoren.⁸

Ein entscheidender Vorgang im Krankheitsverlauf der chronischen Pankreatitis ist die Fibrosierung des Pankreasparenchyms. Dabei handelt es sich um einen noch nicht vollständig pathogenetisch verstandenen Prozess, der nach wie vor nicht therapeutisch beeinflussbar ist. Pankreatische Stellatezellen (PSC) spielen als wesentliche Produzenten der ECM vermutlich eine Schlüsselrolle bei der Fibrogenese.⁹ Es ist davon auszugehen, dass die Wechselwirkungen von MMPs und TIMPs hinsichtlich der Fibrosierung auch von großer Bedeutung sind. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Expression von MMPs und TIMPs im Verlauf der chronischen Pankreatitis zu analysieren. Langfristig sollten sich aus diesen Untersuchungen Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien ergeben.

1.2 Materialgewinnung

Untersuchungen zu den pathogenetischen Mechanismen der chronischen Pankreatitis werden limitiert durch die Verfügbarkeit von humanem Pankreasgewebe. Pankreasgewebe steht generell nur nach chirurgischen Eingriffen zur Verfügung. Diese werden jedoch meist nur im Endstadium der Erkrankung durchgeführt. Bei einer mit Hilfe der Bildgebung gesicherten chronischen Pankreatitis wird auf Biopsien verzichtet, da diese keine therapeutischen oder diagnostischen Konsequenzen haben. Ein invasiver und risikobehafteter Eingriff ist allein aus Forschungszwecken ethisch nicht vertretbar. Aus diesem Grund sind am humanen Gewebe keine Verlaufsuntersuchungen möglich.

Zur molekularbiologischen Forschung und für einen möglichen therapeutischen Ansatz ist es notwendig, Material der chronischen Pankreatitis zu gewinnen, wenn sich die Erkrankung noch in der Initialphase befindet. Am Tiermodell kann die Entzündung von Beginn an in ihrem Verlauf erforscht werden.

Für Untersuchungen des Verlaufes der chronischen Pankreatitis ist das Dibutylzinn-Dichlorid (DBTC) Modell an der Ratte (Siehe Kapitel 1.6.7) sehr gut geeignet. Die Induktion der chronischen Pankreatitis ist einfach durchzuführen. Die Pankreatitis entwickelt sich vom ersten Tag an, der Verlauf kann untersucht werden und verschiedene Pankreasgewebe können untereinander verglichen werden. Der Versuchsansatz ist nicht invasiv. Die Tiere müssen nicht z. B. für Injektionen in den Pankreasgang operiert werden. Dies hat den Vorteil, dass das Pankreas manuell nicht manipuliert wird. Dadurch werden zusätzliche Störfaktoren ausgeschlossen.

Die geplanten Untersuchungen zur Expression von MMPs und TIMPs im Verlauf der chronischen Pankreatitis wurden daher am DBTC-Modell der Ratte durchgeführt.

1.3 Pankreaserkrankungen

1.3.1 Die akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist klinisch gezeichnet durch Oberbauchschmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Blutdruckabfall bis hin zum Schock. Das Abdomen ist aufgrund des obligaten Subileus massiv gebläht und gespannt, so dass es palpatorisch als so genannter Gummibauch imponiert. Die Computertomographie ist neben den klinischen Symptomen diagnostisch wegweisend. Es lassen sich eine ödematöse Auflockerung und Schwellung des Pankreas und eventuelle Nekrosen des Organs darstellen. Des Weiteren stützt sich die Diagnostik auf die sonografische Darstellung des Pankreas, sowie auf den serologisch nachweisbaren Anstieg der Pankreasenzyme Amylase und Lipase. Histologisch zeigt sich bei der akuten Pankreatitis eine von neutrophilen Granulozyten dominierte entzündliche Infiltration des Organs.

In Verlauf und Prognose ist die akute Pankreatitis ein äußerst variables Krankheitsbild. Die Organschädigung beginnt durch die Schädigung von Azinuszellen durch vorzeitige Aktivierung von Pankreasenzymen. Nach der Atlanta-Klassifikation von 1992 unterscheidet man eine milde exsudative und eine schwere hämorrhagisch nekrotisierende Verlaufsform. In etwa 80% der Krankheitsfälle kommt es zur exsudativen akuten Pankreatitis. Diese ist klinisch gezeichnet durch einen in aller Regel komplikationslosen Verlauf ohne nennenswerte Einschränkung der

Organfunktion mit Rückbildung der akuten Symptomatik bei adäquater Therapie innerhalb von 2-3 Tagen. Das pathologisch-anatomische Korrelat ist die interstitiell-ödematöse Entzündung mit Exsudationen innerhalb der Bauchspeicheldrüse, sowie in ihrer Umgebung mit höchstens mikroskopisch kleinen Nekrosen.

Im Gegensatz dazu kommt es bei ca. 20% der Fälle zur schweren Verlaufsform mit Ausbildung von Hämorrhagien und große Teile des Pankreas erfassenden Nekrosen. Mögliche Folgen sind lokale Komplikationen, wie die Entstehung von Pseudozysten oder Infektion der Nekrosen. Außerdem drohen Komplikationen wie Schock, ARDS und Nierenversagen. Seltener kommt es zur disseminierten intravasalen Gerinnung mit anschließender Verbrauchskoagulopathie und einem Multiorganversagen. Hierzu kommt es durch Aktivierung verschiedener Mediatorsysteme und Invasion der betroffenen Organe durch neutrophile Granulozyten.

Die schwere Form der Pankreatitis weist eine Letalität von 10-20% auf. Die frühe Erkennung schwer verlaufender Fälle, deren Komplikationen und die frühzeitige Einleitung intensivtherapeutischer Maßnahmen sind entscheidend für die Prognose.

Die frühzeitige Einschätzung des Krankheitsbildes gestaltet sich in der Praxis schwierig. Zwischen den Werten der Pankreasenzyme im Serum und dem Schweregrad der Erkrankung besteht keine Korrelation. Auch die Ausprägung der klinischen Symptomatik gibt nicht immer verlässliche Hinweise. Aus diesem Grund werden verschiedene Scores eingesetzt, z. B. die Ranson Kriterien, der APACHE-2 Score und andere, deren Wert, Praktikabilität und Aussagekraft allerdings unterschiedlich beurteilt werden.^{10,11}

Die Therapie der akuten Pankreatitis ist prinzipiell symptomatisch: Hospitalisation, Kontrolle und Korrektur des Wasser- und Elektrolythaushaltes, Schmerztherapie, Flüssigkeits- und Nahrungskarenz, sowie Absaugen von Sekret über eine Magensonde zur Entlastung der exokrinen Drüse. Schwere Verläufe erfordern eine intensivmedizinische Betreuung. Diese umfasst Monitoring der Herz-Kreislaufparameter und die engmaschige Durchführung von Laborkontrollen, die neben Elektrolyten, Blutbild und Pankreasenzymen auch Gerinnung und Nierenretentionswerte umfassen. Wichtig ist ebenfalls eine ausreichende Volumengabe unter genauer Bilanzierung der renalen Ausscheidung. Ob der Einsatz von Antibiotika bei der Pankreatitis bereits als Prophylaxe oder erst beim Auftreten von Fieber oder dem Nachweis von Nekrosen gerechtfertigt ist, wird kontrovers diskutiert.

Bei Vorliegen eines konservativ nicht beherrschbaren Verlaufes, insbesondere mit infizierten Nekrosen, besteht eine Indikation zur chirurgischen Intervention. Häufig angewandte Verfahren sind die Nekrosektomie und die offene oder geschlossene Lavage. Ist die akute Pankreatitis bei Cholezystolithiasis biliärer Genese, so ist neben der Revision des Ductus choledochus im Rahmen einer ERCP eine Cholezystektomie indiziert.^{1,12}

1.3.2 Die chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine chronisch fibrosierende Entzündung der Bauchspeicheldrüse mit progredientem diffusen, fokalen oder segmentalen narbigen Ersatz des exokrinen Parenchyms. Dabei kann es sowohl zur Bildung von Pseudozysten, als auch zu Verkalkungen im Gangsystem kommen.

Alkoholabusus ist die häufigste Ursache für die chronische Pankreatitis. Der Anteil der durch Alkohol induzierten chronischen Pankreatitiden wird in der Literatur mit 60-90% angegeben. Am häufigsten erkranken Männer. Das durchschnittliche Manifestationsalter beträgt 40 Jahre.^{13,14}

Bei der unkomplizierten chronischen Pankreatitis lässt sich der klinische Verlauf prinzipiell in zwei Phasen untergliedern.

Die erste Phase ist von kontinuierlichem oder rezidivierendem Oberbauchschmerz gekennzeichnet. Nach einigen Jahren kommt es in der zweiten Phase zu zunehmendem Parenchym- und Funktionsverlust der Drüse, einhergehend mit einem Rückgang der Schmerzsymptomatik. Typische Spätkomplikationen sind extrapankreatische Kompressionserscheinungen, meist durch Pseudozysten, wie beispielsweise eine Cholestase oder Duodenalstenose.

Im Falle einer komplizierten chronischen Pankreatitis, kann sich eine ebenfalls von Schmerzen geprägte dritte Phase im Krankheitsverlauf anschließen.^{15,16,17}

Morphologisch ist die chronische Pankreatitis von einer unregelmäßig verteilten Fibrosierung infolge der Destruktion des exokrinen Pankreas geprägt. Das endokrine Pankreas ist nicht betroffen und wird erst bei weit fortgeschrittener Fibrose in Mitleidenschaft gezogen. Histologisch findet sich neben einer Infiltration des Gewebes, vorwiegend mit Lymphozyten und kleineren Nekrosen, auch ein zunehmender Verlust von Azinuszellen, die im Verlauf der Erkrankung durch kollagenes Bindegewebe ersetzt werden. Dies führt letztendlich zur Pankreasfibrose, Verkalkung und infolge des Verlusts von Drüsengewebe zu exokriner und später auch endokriner Organinsuffizienz. Klinisch zeigt sich in weit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung eine Maldigestion mit Diarrhöen und Fettstühlen, sowie ein Diabetes mellitus.¹⁸

Die unkomplizierte chronische Pankreatitis wird in der Regel konservativ behandelt. Das Auftreten von Komplikationen erfordert hingegen häufig eine chirurgische Intervention, wie zum Beispiel die Drainage von Pseudozysten, Teilresektionen der Bauchspeicheldrüse oder eine Duodeno-pankreatektomie.

Während die Möglichkeit des Übergangs der akuten Form in die chronische Form umstritten ist, kann es umgekehrt im Verlauf der chronischen Pankreatitis immer wieder zu akuten Exazerbationen kommen, die klinisch der akuten Form ähneln. Die sichere Unterscheidung der akuten von der chronischen Pankreatitis ist daher häufig erst unter Beobachtung des Verlaufes über einen längeren Zeitraum möglich.¹⁵ Die Ergebnisse der Computertomographie sollen eine gute Korrelation zur Gewebeuntersuchung aufwiesen.¹⁹

Die wichtigsten Methoden zur Diagnosestellung der chronischen Pankreatitis sind der Ultraschall, die Endoskopisch-Retrograde-Cholangio-Pankreatographie (ERCP) und die Computertomographie (CT). Die einzige kausale Therapie der äthyltoxischen chronischen Pankreatitis besteht in dem Absetzen der Noxe, d.h. einer absoluten Alkoholkarenz. Als symptomatische Therapie stehen die Behandlung der Schmerzen mit Analgetika, der exokrinen Insuffizienz mit Pankreasenzymen, der Malabsorption mit Diät und Vitaminsubstitution, sowie der eventuellen endokrinen Insuffizienz mit Insulin im Vordergrund. Rezidivierende Pseudozysten, die nach Punktion immer wiederkehren, kann man über den Magen oder das Duodenum operativ oder endoskopisch

drainieren. Jeder zweite Patient mit chronischer Pankreatitis benötigt im Laufe seines Lebens eine Operation oder eine interventionelle Endoskopie. In Abhängigkeit vom Ausmaß der Pankreatitis wird unter verschiedenen Operationsverfahren gewählt. Am häufigsten durchgeführt werden die Whipple-Operation und die Pylorus erhaltende Pankreaskopfresektionen.^{1,12}

1.4 Tiermodelle zur Pankreatitis

Um Untersuchungen der pathophysiologischen Zusammenhänge zu ermöglichen, wurden in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Tiermodelle sowohl zur akuten, als auch zur chronischen Pankreatitis entwickelt. Diese experimentellen Modelle haben einen besonders hohen Stellenwert, da bei zumeist konservativer Therapie der Pankreatitiden menschliches Gewebe nur selten verfügbar ist. Resektionen in späten Stadien und bei schweren Verläufen weisen in aller Regel erhebliche Veränderungen des Pankreas auf.

In der Literatur wird eine Vielzahl von Modellen zur Induktion der Pankreatitis beschrieben, deren ausführliche Darstellung den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würde. Aus diesem Grund soll nur auf eine Auswahl der Pankreatitismodelle eingegangen werden.

1.5 Modelle der akuten Pankreatitis

1.5.1 Cerulein Pankreatitis

Mit Hilfe des Cholezytokininanalogons Cerulein lässt sich bei Ratten eine akute Pankreatitis erzeugen. Hierbei entwickelt sich eine Entzündung aufgrund supramaximaler Stimulation der Produktion sekretorischer Proteine. Dies führt an der Ratte zur Proliferation von azinären Zellen, erhöhter mitotischer Aktivität von Fibroblasten und der Expression von Kollagen I/III und Fibronectin.^{20,21,22} Zwei Wochen nach Induktion der Pankreatitis bildet sich der Kollagengehalt des Pankreas wieder auf Normalwerte zurück, welches auf eine vollständige Regeneration schließen lässt.²³ Eine wiederholende Induktion der Cerulein Pankreatitis führt nicht zur Induktion einer Fibrose.²⁴

Dieses Modell der akuten Pankreatitis bei der Maus wurde 1975 von Lampel und Kern entwickelt und ist seither von zahlreichen Autoren zum Teil erheblich modifiziert worden.²⁵ Während die Erstbeschreiber das Cerulein über einen in der Vena jugularis liegenden Katheter infundierten, ist auch die intraperitoneale Applikation möglich.²⁶

1.5.2 Cholinarme ethionin-haltige Diät

Dieses Modell basiert auf der Fütterung einer Diät, die neben einem Mangel an Cholin außerdem auf Azinuszellen zytotoxisch wirkendes Ethionin enthält. Das Cholin-Defizit bewirkt gemeinsam mit der Toxizität des Ethionins binnen 5 Tagen die Entstehung einer von intra- und extrapancreatischen Nekrosen, Hämorrhagien und massiver entzündlicher Infiltration geprägten Pankreatitis.²⁷

1.5.3 Das Trypsinmodell

Durch Infusion von Trypsin in den biliopankreatischen Gang der Ratte lässt sich eine akute

hämorrhagische Pankreatitis erzeugen. Binnen 12 Stunden entwickelt sich bei den Versuchstieren initial eine ödematöse Entzündung, gefolgt von Ischämie, Hämorrhagien und Nekrosen.²⁸

1.5.4 Operative Obstruktion des Duodenum

Durch operative Obstruktion des Duodenum lässt sich eine akute Pankreatitis hervorrufen. Binnen 24 Stunden nach dem Eingriff ist ein Pankreasödem nachweisbar. Die Ursache der Zellschädigung ist hier ein duodenaler Reflux. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Ausbildung massiver Parenchymnekrosen, sowie intraabdominaler Nekrosen und Aszites.²⁹

1.6 Modelle der chronischen Pankreatitis

1.6.1 Operative Obstruktion des Duodenum

Neben einer akuten Pankreatitis ist es auch möglich, mittels Duodenalobstruktion eine chronische Pankreatitis hervorzurufen. Ermöglicht man ein Überleben der Tiere, kommt es nach Revision der Obstruktion nach 3 Wochen zu progredientem Parenchymverlust, Fibrose des Organs und einer chronischen Infiltration mit Entzündungszellen.²⁹

1.6.2 Das Zein-Ölsäure-Linolsäure Modell

Die retrograde Injektion einer viskösen Zein-Ölsäure-Linolsäure-Lösung in den biliopankreatischen Gang führt zur Entstehung einer chronischen Pankreatitis. Entsprechend der Annahme einer Okklusion der kleinen Pankreasgänge durch Proteine bei der humanen alkoholinduzierten chronischen Pankreatitis, wird hierbei ein Verschluss derselben durch die beschriebene visköse Lösung herbeigeführt. Binnen 6 Wochen entwickelt sich histomorphologisch ein Krankheitsbild, das der chronischen Pankreatitis des Menschen sehr ähnlich ist, mit entzündlicher Infiltration, degenerativen Veränderungen, Fibrose des Parenchyms, Fetteinlagerungen und der Bildung tubulärer Komplexe.³⁰

1.6.3 Überexpression vom Transforming Growth Factor- α im Pankreas an der transgenen Maus

Eine Überexpression von Transforming Growth Factor- α (TGF- α) im Pankreas der transgenen Maus zeigt eine progressive Fibrose und einen strukturellen Übergang von azinären Zellen zu tubulären Komplexen.^{31,32} Diese azinären Zellen scheinen sich zu dukталen Zellen zu differenzieren, wobei sie tubuläre Komplexe bilden und duktale Marker exprimieren.³³ In diesem Modell kommt es zwar zur Fibrose, es entsteht jedoch keine Entzündung. Vielmehr kommt es nach einem Jahr zur Ausbildung eines dukталen Pankreastumors.³⁴

1.6.4 Überexpression vom Transforming Growth Factor- β im Pankreas an der transgenen Maus

Eine Überexpression von Transforming Growth Factor- β (TGF- β) im Pankreas der transgenen Maus führt zu einer zellulären Infiltration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Gleichzeitig entwickelt sich eine Fibroblastenproliferation mit abnormaler Ablagerung von extrazellulärer Matrix innerhalb des Pankreas.^{35,36} Es kommt allerdings im Laufe der Fibrose zu einem

frühzeitigen Umbau der Inselzellen, der bei der humanen Pankreatitis erst sehr spät oder bei sehr schweren Verlaufsformen auftritt. Die Anzahl pankreatischer Stellatezellen (PSC) nimmt parallel mit einer vermehrten Ablagerung von Kollagen zu.³⁷

1.6.5 Transgene Maus mit dominant-negativer Mutante des TGF- β Typ II Rezeptors.

Um den TGF- β Signalweg in epithelialen Zellen funktionell zu inaktivieren, wurde eine transgene Maus generiert, welche eine dominant-negative Mutante des TGF- β Typ II Rezeptors aufweist. Diese TGF- β Typ II Mutante blockiert die Signaltransduktion für alle drei TGF- β Isoformen in hepatozytären und pankreatischen Azinus-Zellenkulturen. Die Azinuszellen aus dem Pankreas der transgenen Maus zeigen eine gesteigerte Proliferation und eine stark veränderte azinäre Differenzierung. Zusätzliche Veränderungen des Pankreas sind Fibrose, Neoangiogenese und eine leichte Makrophageninfiltration.³⁸

1.6.6 Pankreasfibrose induziert durch Trinitrobenzen Sulfonsäure (TNBS)

Bei dieser Methode wird Trinitrobenzen Sulfonsäure (TNBS) in den Ductus pancreaticus einer Ratte infundiert. Die Infusion von TNBS führt zu einer nekrotischen Entzündung des Pankreas, der innerhalb von 4 Wochen eine Fibrose des Pankreas folgt. Mikroskopisch zeigen sich eine periduktuläre und interstitielle Fibrose und eine akute und chronische Infiltration von Entzündungszellen mit Drüsenatrophie. Dieses Bild der experimentellen chronischen Pankreatitis ähnelt der chronischen Pankreatitis des Menschen.³⁹

1.6.7 Chronische experimentelle Pankreatitis induziert durch Dibutylzinn-Dichlorid.

In den frühen siebziger Jahren kam es zu einer Anhäufung von akuten Pankreatitiden unter Arbeitern in einer Rostocker Werft. Nach näheren Untersuchungen stellte man fest, dass diese Arbeiter mit einer speziellen Farbe umgingen, die zum Anstreichen von Schiffsrümpfen bestimmt war. Die Aufgabe dieser Farbe war es, das Anwachsen von Seetang, Muscheln und anderen Meerestieren zu verhindern. Dazu wurde unter anderem die zinnorganische Verbindung Dibutylzinn-Dichlorid (DBTC) beigemischt, welches in der Farbe als Toxin wirkte.

Um die Toxizität und die T_{50} Konzentration festzustellen, wurden daraufhin tierexperimentelle Untersuchungen mit DBTC an Ratten vorgenommen. Diese entwickelten nach i.v. Verabreichung von DBTC eine akute Pankreatitis. Nach weiteren Studien fand man eine Beziehung zwischen Dosis und Verlauf der Pankreatitis.⁴⁰ Der Verlauf war durch die Dosis beeinflussbar und führte entweder zu einer akuten oder einer chronischen Pankreatitis.

Die experimentelle akute Pankreatitis wird durch i.v. Applikation von 4mg/kg DBTC bei der Ratte induziert.⁴⁰ Dies führt zu einer akuten ödematösen Pankreatitis, die nach 7 Tagen in eine vollständige restitutio ad integrum mündet.

Die experimentelle chronische Pankreatitis wird durch intravenöse Applikation von 8mg/kg DBTC bei der Ratte induziert.⁴¹ Es ist damit die nichtinvasive Induktion der chronischen Pankreatitis bei einer gesunden Ratte möglich. Es kommt innerhalb von 24 Stunden zu einer akuten ödematösen Pankreatitis. Nach sieben Tagen entwickelt sich eine massive Infiltration von mononuklearen Zellen, gefolgt von einer Fibrose des Pankreas. Parallel zur Zellinfiltration findet eine

Hochregulation der mRNA von TGF- β 1 und Kollagen TypI statt.⁴² Pathogenetisch ist die DBTC-Pankreatitis ein zweiteiliger Prozess mit einer biliären und einer hämatogenen Komponente. Im Mittelpunkt steht dabei die Entstehung eines Azinuszellschadens, dem eine Entzündung des gesamten Pankreas folgt.

Der Schlüssel für die Induktion der Pankreatitis ist der zytotoxische Effekt des DBTC auf das Epithel des Gallenganges. Dieser zytotoxische Effekt entsteht durch die schnelle und hochkonzentrierte biliäre Exkretion von Organozinn über die Galle. Er führt am biliopränkreatischen Gangsystem zur epithelialen Nekrose mit Gangobstruktion, daraufhin zur Cholestase und zur interstitiellen Pankreatitis. Der hämatogene Effekt des DBTCs führt zu direkter Schädigung des Pankreasparenchyms (mitochondrialer Schaden, Autophagie, Zellnekrosen), gefolgt von einer Entzündung des Pankreas und einem generellen interstitiellen Ödem.

Eine gesteigerte Konzentration von Hyaluronsäure im Serum wurde als Marker der Fibrose bei der humanen chronischen Pankreatitis nachgewiesen.⁴³ Bei der DBTC Pankreatitis finden sich erhöhte Konzentrationen von Hyaluronsäure und Hydroxyprolin im Urin als weitere Marker der Pankreasfibrose. Es wurde beschrieben, dass TGF- β eine Schlüsselrolle in der Entstehung von fibrosierenden Erkrankungen spielt; zum Beispiel bei Leberzirrhose oder Lungenfibrose.^{44,45} Im Verlauf der Pankreatitis entwickelt sich eine vermehrte mRNA Expression von Kollagen TypI und TGF- β 1. Zugleich kommt es zu einer Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen, sowie einer umfassenden Umwandlung des Pankreas mit periduktaler und interstitieller Fibrose.⁴⁶ Diese Fibrose setzt sich fort, bis nach acht bis 15 Wochen das Pankreas vollständig fibrosiert ist. Nur Inseln mit Langerhansschen Zellen verbleiben im Pankreas. Diese unterliegen 36 Wochen nach Induktion der DBTC ebenfalls einem Umbau.

Im Vergleich mit anderen Modellen zur chronischen Pankreatitis oder Pankreasfibrose ist das DBTC-Modell charakterisiert durch eine massive Infiltration von mononuklearen Zellen in ausgedehnten Fibrosearealen. Im Gegensatz zu anderen Modellen findet bei der DBTC-Pankreatitis aber keine Pankreasatrophie oder Lipomatose statt. Es entsteht eine Fibrose des exokrinen Pankreas, später auch des endokrinen Pankreas.

Ergänzend kommt hinzu, dass das Modell der DBTC-Pankreatitis keinen operativen Eingriff erfordert und deshalb einfach zu handhaben ist. Es verursacht keine hohen Kosten, da keine spezielle Züchtung von Knock-out Ratten notwendig ist. Das DBTC-Modell zur chronischen Pankreatitis bietet deshalb eine sehr gute Möglichkeit, den Verlauf der Fibrose im Rahmen der chronischen Pankreatitis am Ratten-Tiermodell zu erforschen.

In vorhergehenden Studien wurde an diesem Rattenmodell festgestellt, dass in den ersten 14 Tagen der chronischen experimentellen Pankreatitis eine erhöhte Expression von Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) nachweisbar war. Diese ECM fand sich allerdings nicht in histologischen Schnitten dieses Zeitraumes. Erst nach 14 Tagen ließ sich histologisch eine Vermehrung des Bindegewebes in der chronischen Pankreatitis feststellen.⁴² Eine Erklärung, weshalb am Beginn der chronischen Pankreatitis eine vermehrte ECM Produktion stattfindet, diese aber nicht abgelagert werden, können vermutlich Bindegewebe abbauende Enzyme liefern. Die Gruppe der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) spalten physiologisch die Strukturen des Bindegewebes zur biologischen Erneuerung. Ein Schutz des Körpers vor Fibrose könnte daher eine Erhöhung der

MMPs im Gewebe darstellen, während Fibrosierung ein Mangel an MMPs bedeuten würde. Zur Bedeutung von MMP und deren Inhibitoren siehe Kapitel 1.8.

1.7 Pankreatische Stellatezellen

Im Pankreas befinden sich Vitamin A speichernde Zellen. Sie sind sternförmig mit langen zytoplasmatischen Ausläufern. Bezeichnet werden diese Zellen wegen ihrer Sternform (stellate [eng.] Stern) und der morphologischen Ähnlichkeit zu hepatischen Stellatezellen (HSC) als pankreatische Stellatezellen (PSC).^{47,48} Im gesunden Pankreas befinden sie sich in einem Ruhezustand. Sie werden identifiziert durch Vitamin A haltige Fetttropfen im Zytoplasma. Bei einer Schädigung des Pankreas werden die PSC aktiviert und entwickeln sich vom ruhenden Phänotyp zu Myofibroblasten ähnlichen Zellen. Diese exprimieren das Zytoskelettprotein α -smooth muscle actin (α -SMA) und produzieren Kollagene und andere extrazelluläre Matrixkomponenten. Die morphologischen und metabolischen Veränderungen, die mit der Aktivierung der PSC verbunden sind, treten auch auf, wenn die Zellen in einer Zellkultur gezüchtet werden. PSC spielen eine Schlüsselrolle in der Fibrogenese der chronischen Pankreatitis.⁹ Aus diesem Grund wurden die PSC in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen. Insbesondere sollte die Expression von MMP in isolierten PSC der Ratte während der Aktivierung in der Zellkultur analysiert werden.

1.8 Matrix Metalloproteinasen und Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen

Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht aus der Basalmembran und dem interstitiellen Stroma. Sie funktioniert als unterstützendes Netzwerk für parenchymale Zellen und als physikalische Barriere, welche den Eintritt von Zellen in das Gewebe reguliert. Die Integrität der ECM wird von den Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ihren Antagonisten, den Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMPs), reguliert. Die MMPs und TIMPs beeinflussen physiologische Entwicklungsprozesse wie zum Beispiel die Embryonalentwicklung^{4,5}, die Implantation der Eizelle⁴⁹, den Endometriumauf- und abbau⁵⁰ sowie die Wundheilung.^{6,7} Sie spielen eine bedeutende Rolle in pathologischen Prozessen bei der rheumatoiden Arthritis,⁵¹ der Osteoarthritis, der Tumorinvasion und der Metastasierung.^{52,8} Es lassen sich vier wesentliche physiologische Einflussmöglichkeiten der MMPs klassifizieren (Abbildung 1).

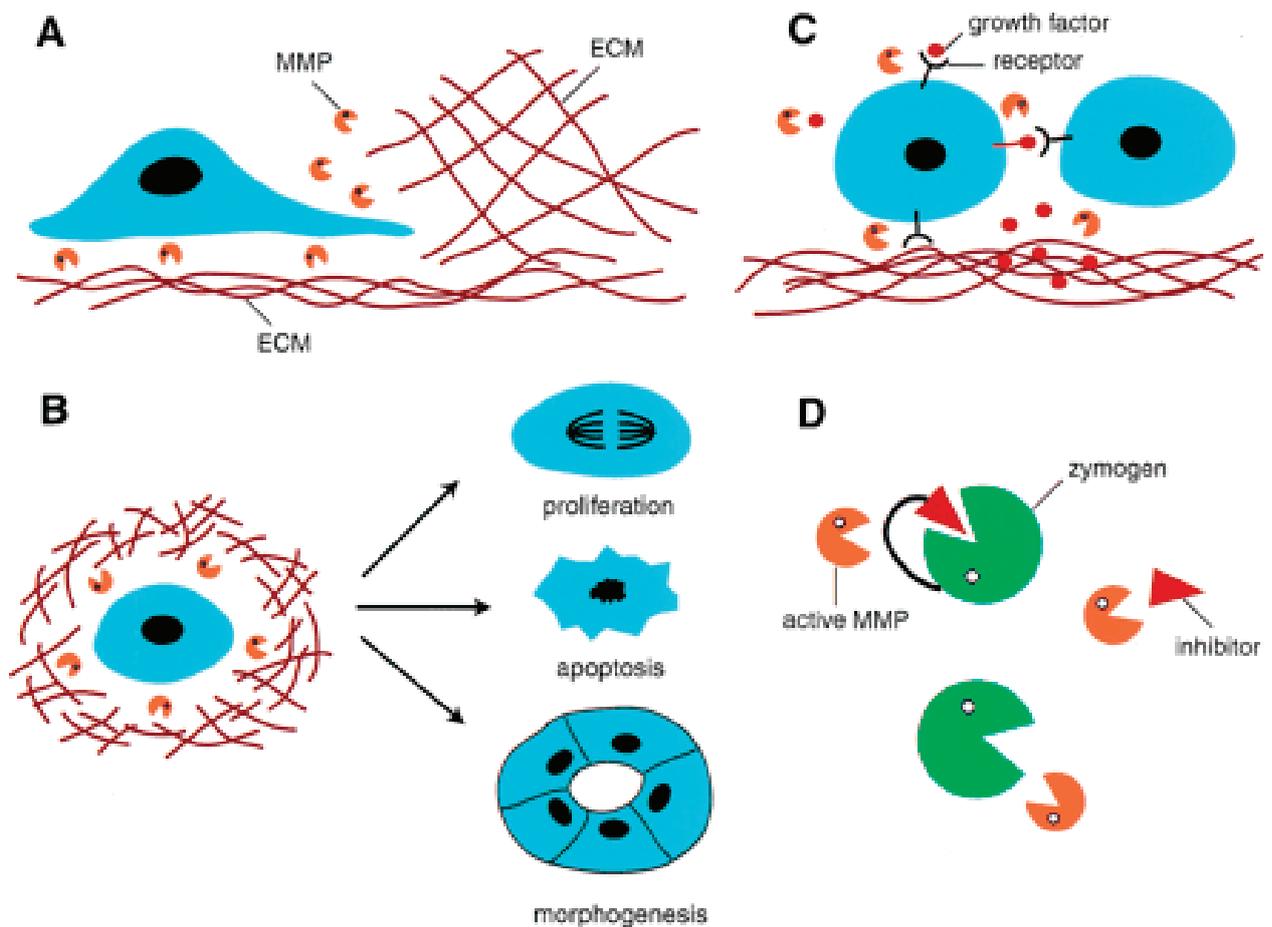


Abbildung 1: Zellfunktionen unter dem Einfluss proteolytisch wirksamer MMPs. (A) Degradation der ECM und Zellmigration. (B) Induktion von Proliferation oder Apoptose. (C) Modulation von Mediatoren und deren Rezeptoren. (D) Aktivierung von weiteren Proteasen durch Spaltung ihrer Proenzyme oder ihres Inhibitors (Vu and Werb, 2000).³

Matrix Metalloproteinasen sind eine Gruppe von über 20 bekannten zinkabhängigen Proteasen. Diese sind in der Lage, die wesentlichen Komponenten der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Kollagen, Laminin, Fibronectin oder Elastin, abzubauen. Bedingt durch ihren Aufbau aus verschiedenen Domänen können MMPs in vier Gruppen eingeteilt werden: Matrylin, MMPs mit Hämopexin ähnlicher Domäne, MMPs mit Transmembrandomäne, MMPs mit Fibronectin ähnlicher Domäne.

Alle MMPs haben eine zur Sekretion erforderliche Region, liegen im latenten Zustand vor und verfügen über eine katalytische Region, welche die aktive Zink-Bindungsstelle beinhaltet.⁵³

Die Klassifikation der MMPs erfolgt jedoch durch eine Einteilung in Familien, welche die Substrate der MMPs zusammenfassen (Tab. 1).⁵²

MMP Familie	Alternativer Name	Nummer	Grundlegende Substrate
Kollagenasen	Intestinale Kollagenase	MMP-1	Kollagen Type I, II, III
	Neutrophile Kollagenase	MMP-8	
	Kollagenase-3	MMP-13	
	Xenopus Kollagenase	MMP-18	
Gelatinasen	Gelatinase A, 72kDa Kollagenase	MMP-2	Kollagen Type IV, V
	Gelatinase B, 92 kDa Kollagenase	MMP-9	
Stromelysine	Stromelysin-1	MMP-3	Proteoglycane, Laminin, Fibronectin, nichtfibrilläres Kollagen
	Stromelysin-2	MMP-10	
	Matrilysin	MMP-7	
	Stromelysin-3	MMP-11	
Elastase	Metalloelastase	MMP-12	Elastin, Nichtfibrilläres Kollagen
Membranständige MMPs (Membran type, MT-MMPs)	MT-MMP-1	MMP-14	ProMMP-2
	MT-MMP-2	MMP-15	
	MT-MMP-3	MMP-16	
	MT-MMP-4	MMP-17	
	MT-MMP-5	MMP-21	
Unklassifiziert		MMP-19	Unbekannt
		MMP-20	
		MMP-23	
		MMP-24	

Tab. 1: Substratbasierte Klassifikation der Matrix Metalloproteinasen.⁵²

Obwohl die Nummerierung der MMPs zurzeit bis 24 reicht, spiegelt sie nicht die Anzahl der Enzyme wieder. So wurden MMP-4, MMP-5 und MMP-6 aus der Nomenklatur herausgenommen. Diese MMPs waren doppelt klassifiziert. Die membranständigen MMPs (MT-MMPs) sind an der Zelloberfläche verankert. Die MT-MMPs konnten noch nicht vollständig charakterisiert werden. Eine ihrer wichtigen Funktionen ist jedoch die Aktivierung von sezernierten proMMP-2 und proMMP-13.^{54,55}

MMPs werden als inaktive Pro-Enzyme produziert und müssen zur Aktivierung proteolytisch gespalten werden. Dabei wird ein Peptid am N-terminalen Ende abgelöst. Die Regulation der MMPs auf Proteinebene erfolgt durch Proteasen, wie zum Beispiel Cathepsine, Trypsin oder dem Urokinase-Plasminogen-System.⁵⁶ Dabei aktiviert der Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) Plasminogen, welches dann Pro-Kollagenasen und Pro-Stromelysine in ihre aktive Form bringt. Aktive MMPs einer Familie können wiederum andere MMPs aktivieren (Abbildung 2).⁵⁷

Die biologische Aktivität der MMPs wird durch spezifische Inhibitoren, die TIMPs, herabgesetzt. Bis jetzt sind vier verschiedene TIMPs bekannt. Bei zwei TIMPs konnte die spezifische Funktion noch nicht definiert werden (Tab. 2). TIMPs binden nicht-kovalent an der katalytischen Domäne der MMPs. Dies geschieht im Verhältnis 1:1, wodurch die proteolytische Aktivität der MMPs gehemmt wird.

Die TIMPs weisen verschiedene Affinitäten zu den MMPs auf. TIMP-1 bindet an MMP-1, MMP-3 und MMP-9 sowie an Pro-MMP-9 und Pro-MMP-2. Die Affinität zu Pro-MMP-9 ist jedoch größer als die zu Pro-MMP-2. TIMP-2 hat eine höhere Affinität zu MMP-2 als zu MMP-9.

Dies gilt auch für die Pro-Enzyme. Das Überlappen der Spezifität wird durch die 50%ige Sequenzhomologie von TIMP-1 und TIMP-2 erklärt.^{58,61}

Die resultierende MMP-Aktivität hängt von dem Verhältnis der MMPs und TIMPs im Gewebe ab. Änderungen in diesem Gleichgewicht führen entweder zu einer signifikant erhöhten Proteolyseaktivität der MMPs⁵⁹ oder zu einer gesteigerten Fibrogenese.⁶⁰

Name	Funktion
TIMP-1	Hemmt Pro-MMP-9 und andere aktive MMPs
TIMP-2	Hemmt Pro-MMP-2 und aktives MMP-2
TIMP-3	Nicht definiert
TIMP-4	Nicht definiert

Tab. 2: Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) und ihre Funktionen

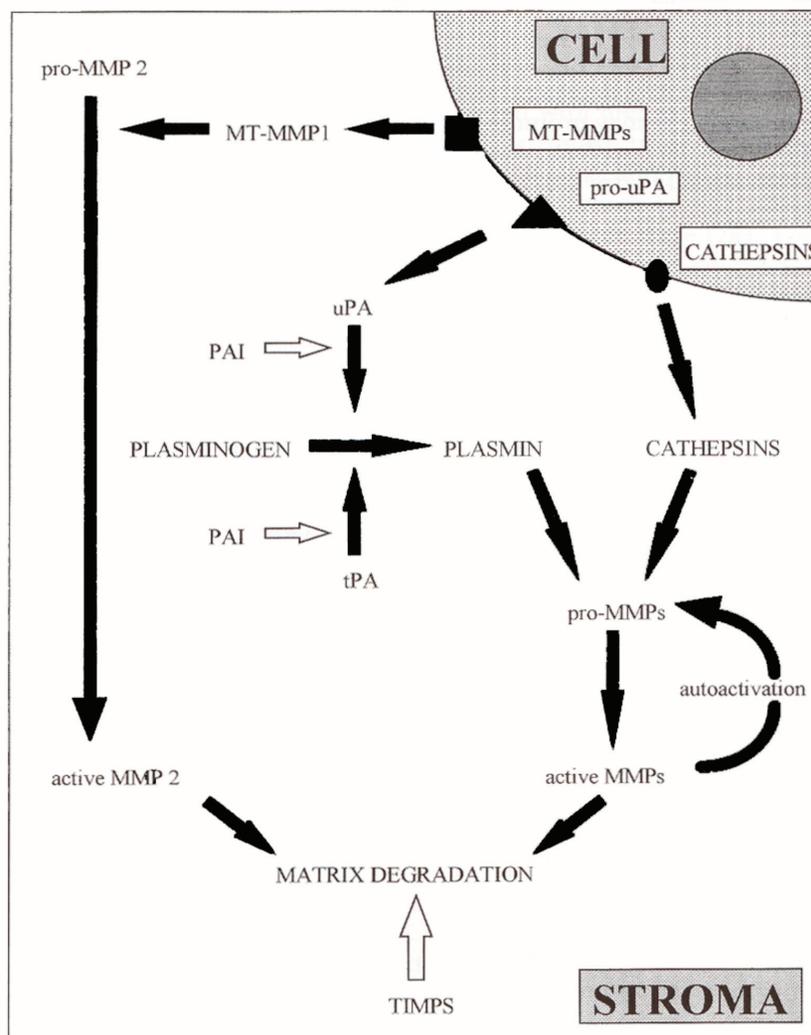


Abbildung 2: Kaskade der Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen durch Cathepsin und Plasmin. Autoaktivierung von Pro MMPs durch active MMPs und MT MMP 1. Hemmung des Matrixabbaues durch TIMPs. (Evans et al. 1999)⁶¹

1.9 Fibrose, pankreatische Stellatezellen und Matrix Metalloproteinasen

Die Fibrose bei der alkoholischen chronischen Pankreatitis entsteht durch eine pathologisch vermehrte Ablagerung von Bindegewebe. Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen ECM Synthese und Abbau.^{62,63} Die Schlüsselenzyme zur Regulation des Bindegewebsstoffwechsels sind die Matrix Metalloproteinasen. Eine Dysregulation zwischen MMPs und TIMPs kann entweder zur Fibrose oder zum vermehrten Abbau von Bindegewebe führen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Expression dieser Enzyme in der Relation zur Fibrose und zum Verlauf der experimentellen chronischen Pankreatitis untersucht werden.

Vorhergehende Studien am Pankreasgewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis und tierexperimentelle Untersuchungen der Pankreasfibrose lassen vermuten, dass aktivierte PSC eine wesentliche Rolle im Pankreas spielen.^{64,65,66} PSC werden definiert als eine fett- und Vitamin A speichernde Zellpopulation. Sie transformieren bei einer Pankreasschädigung *in vivo* oder bei längerer Zellkultivierung *in vitro* von einem ruhenden in einen aktivierten Zustand. Dabei verlieren sie ihre Vitamin A haltigen Fettvakuolen und exprimieren vermehrt α -smooth muscle actin (SMA) gefolgt von der Bildung von Kollagenen.^{67,68}

Neuere Daten zeigen die Vielfältigkeit der Stellatezellen im Hinblick auf die Regulation physiologischer und pathologischer Prozesse. Neben der Synthese von Extrazellulärer Matrix produzieren PSC auch Zytokine und Chemokine. Sie können dadurch einen großen Einfluss auf Entzündungsprozesse ausüben.^{69,70}

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol 0.1mol/l	Sigma, München, Deutschland
Acrylamidstammllösung 40%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aluminiumsulfat	Sigma, München, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chlorhydrat	Sigma, München, Deutschland
Chloroform-isoamylalcohol	Appligene, Illkirch Cedex, Frankreich
Kollagenase (Clostridium histolyticum)	Sigma, München, Deutschland
Comassie blue	Sigma, München, Deutschland
DBTC	Sigma, München, Deutschland
DDT	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
DEPC	Sigma, München, Deutschland
DNA-Marker (100bp DNA Ladder)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
DNase	Sigma, München, Deutschland
dNTP	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma, München, Deutschland
Eisessig	Sigma, München, Deutschland
Eosin (Colour Index No. 45380)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 96%	Sigma, München, Deutschland
Ethanol 96%	Sigma, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll 400	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glucose 1g/l	Sigma, München, Deutschland
Glycin	Sigma, München, Deutschland
Guanidium-Thiocyanat	Fluka, Buchs, Schweiz
HBSS (Hanks gepufferte Salzlösung)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
HBSS ohne Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Hematoxilin (Colour Index No. 75290)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isocove Medium	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Isopropanol	Sigma, München, Deutschland
Kälberserum, fötales (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
MgCl ₂	Promega, Mannheim, Deutschland
MMTV	Quiagen, Hilden, Deutschland

Natriumazetat 2 mol/L, pH4.0	Appligene, Illkirch Cedex, Frankreich
Natriumiodid	Sigma, München, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (0.1mM)	Difco Laboratories, Detroit, USA,
Nycodenz 30%	Nycomed, Oslo, Norwegen
Oligo dT ₁₂₋₁₈	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Orange G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR – Puffer 10x	Promega, Mannheim, Deutschland
Penicillin 100U/ml	Difco Laboratories, Detroit, USA,
Protease IX	Sigma, München, Deutschland
Restriktionsendonukleasen: <i>SphI</i> , <i>NotI</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
RNAsin	Promega, Mannheim, Deutschland
RT x5 Puffer	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Sarcosyl 0.5%	Sigma, München, Deutschland
SDS	Sigma, München, Deutschland
Streptomycin 100µg/ml	Difco Laboratories, Detroit, USA,
Taq – Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Sigma, München, Deutschland
wassergesättigtes Phenol	Appligene, Illkirch Cedex, Frankreich
Zitronensäure	Sigma, München, Deutschland

2.1.2 DNA Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von BioTeZ, Berlin bezogen. Die Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung aufgeführt.

MMP – 2 Amplifikatlänge: 309 bp	CTA TTC TGT CAG CAC TTT GG Länge: 20 bp
MMP – 2 Antisense	CAG ACT TTG GTT CTC AAC TT Länge: 20 bp
MMP – 9 Amplifikatlänge: 309 bp	AAA TGT GGG TGT ACA CAG GC Länge: 20 bp
MMP – 9 Antisense	TTC ACC CGG TTG TGG AAA CT Länge: 20 bp
Actin – Rat Amplifikatlänge: 601 bp	CTA TCG GCA ATG AGC GGT TC Länge: 20 bp
Actin – Rat Antisense	CTT AGG AGT TGG GGG TGG CT Länge: 20 bp
TIMP – 1 Amplifikatlänge: 552 bp	CTT CCA GTA AAG CCT GTA GCT GT Länge: 23 bp
TIMP – 1 Antisense	CAA GGT ATT GCC AGG TGC ACA AA Länge: 23 bp

TIMP – 2 Amplifikatlänge: 453 bp	CAA CAG GCG TTT TGC AAT GCA GA Länge: 23 bp
TIMP – 2 Antisense	CCC ATT GAT GCT CTT CTC TGT GA Länge 23 bp

Vektoren

pQR2 und pQR3 von Graham M.A. Wells, Neures Limited, UK.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Comassie Blue Lösung	1 Teil Eisessig (50ml) 3 Teile Isopropanol(150ml) 6 Teile H ₂ O(300ml) Dazu 0.25g Comassie Blue auf 100ml (1,25g).
DBTC-Lösung	DBTC mit in zwei Teilen Ethanol 96% lösen. Anschließend mit drei Teilen Glycerol vermengen.
DEPC- H ₂ O	1 l dH ₂ O mit 1%DEPC über Nacht inkubieren. Das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktivieren.
Eosin	2,5g Eosin (Colour Index No. 45380) 500ml H ₂ O
HBSS + FCS	50ml HBSS und 15ml FCS 4%, auf Eis stellen.
Mayers Hematoxylin	In 750ml Wasser werden gelöst: 50g Aluminiumsulfat (KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O) 1g Hematoxylin (Colour Index No. 75290) 0,1g Natriumiodit (NaIO ₃) 1,0g Zitronensäure 50g Chlorhydrat Ad H ₂ O bis 1000ml
PBS (Phosphate Buffer Saline)	120mM NaCl 170 mM NaH ₂ PO ₄ 3 mM KCl 26 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
Polyacrylamid-Elektrophoresepuffer	3.03g (0,025M) Tris 14.1g (0,152M) Glycin 1.0g (0,1%) SDS auf 1000ml mit H ₂ O aufgefüllt.
Puffer P1, Qiagen	50mM Tris pH 8.0 10mM EDTA Rnase A (400µg/ml)
Puffer P2, Qiagen	200mM NaOH 1% SDS
Puffer P3, Qiagen	2.55M KAc pH 4.8
Puffer QBT, Qiagen	750mM NaCl 50mM MOPS 15% Ethanol pH 7.0

Puffer QC, Qiagen	1M NaCl 50mM MOPS 15% Ethanol Ph 7.0
Puffer QF, Qiagen	1.25M NaCl 50mM MOPS 15% Ethanol pH 8.2
Stopp-Lösung	25mg Orange G 2,5g Ficoll 400 EDTA 0,5M
Substratpuffer	50mmol/l Tris pH8 + 5mmol/l CaCl ₂
TAE-Puffer 1L	242 g Tris 57 ml Essigsäure 96% 100 ml EDTA 0,5M pH8 Auf 1000ml H ₂ O bidest.
Tris-Puffer	Tris-HCl 1 M in DEPC-H ₂ O, pH 7,4
Tritonlösung 2,5%	10ml Triton + 490ml H ₂ O

2.1.4 Bakterienkulturmedien

Als Bakterienstamm wurde *Escherichia coli* Stamm DH5 α , Firma Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland) verwendet.

Kulturmedien zur Bakterienanzucht wurden von Difco Laboratories, Detroit, USA bezogen.

Ampicillin LB-Agarplatten	Zugabe von 100mg/l Ampicillin auf LB Agarplatten.
LB-Agarplatten	5g Hefeextrakt 10g tryptisches Pepton 10g NaCl aqua dest. 15g Agar H ₂ O bidest zu 1l
Luria Bertani (LB)- Medium	5g Hefeextrakt 10g tryptisches Pepton 10g NaCl aqua dest. Mit 1 N NaOH einstellen auf pH 7,4 H ₂ O bidest. zu 1 l
Transformationspuffer	10%(wt/vol) Polyethylene Glycol 1500 30mM MgCl ₂ in LB-Medium

2.1.5 Kits

Qiagen Miniprep	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen Maxiprep	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Spin	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.6 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Inzuchtratten (LEW-1W, Karlsburg, Deutschland) mit einem Gewicht von 150-170g benutzt. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten sowie mit Nagetierfutter und Wasser ad libitum ernährt.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Impföse	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (1µl, 10µl, 100µl, 500µl, 1ml, 10ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (500µl, 1000µl, 1500µl, 2000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellsieb mit 150µm mesh,	Sigma, München, Deutschland
Sterile Erlenmeyerkolben, Becherglas, Pinzette, Schere, Punktionsnadel, Parafilm, Vaseline, Spacer, Klammern, Gelatine, Elektrophoreseplatten, Mikroliternadel, Harzkleber, Deckgläser.	

2.1.8 Geräte

Dokumentationsystem, UV Photographie, Programm E.A.S.Y.	Herolab, Wisloch, Deutschland
Eppendorfschüttler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gelkammer	Biorad, München, Deutschland
GeneAmp PE-2400 Thermocycler	PerkinElmer, Jügesheim, Deutschland
Photometer DU640	Beckman, Fullerton, USA
Unimag Vortexer	Uniequip, München, Deutschland

2.2 Induktion der chronischen DBTC-Pankreatitis

Die chronische DBTC-Pankreatitis der Ratte wurde in Anlehnung an das Protokoll von Merkord & Henninghausen (1989)⁷¹ sowie Merkord et al. (1991)⁷² induziert.

Die DBTC-Lösung (8 mg/kg Körpergewicht) wurde in einem Volumen von 200 µl Lösung in die Schwanzvene injiziert. In der Kontrollgruppe wurden die Tiere mit dem Lösungsmittel behandelt. An den Tagen 1, 3, 5, 7, 14, 28 und 60 nach Gabe von DBTC wurden jeweils 5 Tiere getötet. Dies erfolgte durch Dekapitierung unter Pentobarbital-Anästhesie.

Das Pankreas wurde freigelegt, entfernt, unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann gelagert. Ein Teil des Pankreasgewebes wurde zur histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet und später geschnitten.

2.3 RNA-Extraktion aus dem Pankreas

Der Umgang mit RNA erfordert eine saubere Arbeitsweise. RNA spaltende Enzyme (RNasen) sind ubiquitär vorhanden und stabiler als andere Enzyme. So werden RNasen durch Erhitzen nicht komplett inaktiviert. Untersuchungen am Pankreas als Produktionsort der Verdauungsenzyme erfordern deshalb besondere Techniken.

Die Gesamt-RNA des Pankreas wurde nach einem von Sparmann et al.⁷³ modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi⁷⁴ vorgenommen.

Gefrorene Pankreasproben wurden mittels Mörser und Stößel in 4 mol/l Guanidium-Thiocyanat auf flüssigem Stickstoff homogenisiert. Danach erfolgte die Zugabe von 0.1 mol/l 2-Mercaptoethanol und 0.5% Sarcosyl.

Die Lösung wurde 10 Sekunden im Ultraturrax homogenisiert und der Reihe nach 0.1 Teile 2 mol/L Natriumazetat, pH 4.0, 1 Teil wassergesättigtes Phenol und 0.2 Teile Chloroform-Isoamylalcohol zugegeben.

Nach gründlichem Mixen wurde die Lösung 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend bei 5000g für 30min zentrifugiert. Die wässrige Phase enthielt die RNA, die durch den Zusatz von Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt werden konnte.

Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 5000g für 30min bei 4°C. Die Lösung wurde dekantiert und das RNA-Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in ribonukleasefreiem Wasser (DEPC-H₂O) gelöst. Nach Quantifizierung der RNA wurde die Lösung bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4 Nachweis der mRNA-Expression

Der Nachweis der mRNA-Expression erfolgte mit Hilfe der kompetitiven DNA Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Dazu muss die RNA in DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe eines viralen Enzyms, der reversen Transkriptase. Die daraus entstehende DNA wird copy DNA (cDNA) genannt.

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Pankreasgewebe isoliert und die mRNA anschließend revers transkribiert (RT-PCR). Die Menge der so erhaltenen cDNA war proportional zu der mRNA in der Zelle. Der cDNA-Nachweis erfolgte nun mit der kompetitiven PCR. Dazu wurde ein interner Standard verwendet (Kontrollfragment, KF). Dieses Kontrollfragment besaß identische Primersequenzen, wobei sich das PCR-Produkt von der cDNA in der Länge unterscheidet. Das Kontrollfragment wurde in definierten Konzentrationen eingesetzt. Deshalb konnte nach elektrophoretischer Trennung der PCR-Produkte im ethidiumbromid-haltigem Agarosegelen aus der Fluoreszenzintensität auf die mRNA-Expression geschlossen werden.

2.5 Kontrollfragment

Das Kontrollfragment diente als interner Standard zur Quantifizierung der PCR-Produkte. Dies geschah mittels einer kompetitiv-quantitativen Messung. Das Kontrollfragment besaß die gleichen Primersequenzen wie die zu amplifizierende DNA. Das Amplifikationsprodukt des Kontrollfragmentes hatte eine Länge von 210 Basenpaaren und war kürzer als das der zu untersuchenden DNA. Es wandert daher in der Elektrophorese weiter. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensität der beiden Banden ließ eine Aussage über die Konzentration der zu untersuchenden DNA zu. In der

vorliegenden Arbeit war das synthetische DNA-Fragment zur Amplifikation in einen bakteriellen Vektor eingebracht worden, der uns freundlicherweise von Graham M.A. Wells, Neures Limited, UK, zur Verfügung gestellt wurde.⁷⁵ Dieser Vektor wurde mit Hilfe von *E. coli* Bakterien vermehrt. Anschließend konnte das Plasmid isoliert und das Kontrollfragment mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten werden.

2.5.1 Plasmid DNA

Plasmide sind zirkuläre DNA-Sequenzen, die in Bakterien extrachromosomal amplifiziert werden. Entsprechende DNA-Sequenzen, z. B. Antibiotika resistente Gene, können hinein kloniert werden (Transformation). Durch Kultivierung des Bakteriums erfolgt die Amplifikation des Plasmids. Ein Nachweis der erfolgreichen Klonierung wird durch den Nachweis der Antibiotikaresistenz erbracht. Zur Testung des korrekten Plasmids wird die DNA-Sequenz mit Hilfe der entsprechenden Restriktasen wieder herausgeschnitten. Ein Nachweis der DNA erfolgt in der Elektrophorese anhand der bekannten Größe der DNA.

Das Kontrollfragment wurde nach der Amplifikation des Plasmids mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *NotI* herausgeschnitten. Die DNA-Menge konnte photometrisch bestimmt werden. Die Plasmid-DNA enthielt außer einem Ampicillin resistenten Gen die intronübergreifenden Sequenzen von MMPs und β -actin. Die Primersequenzen hatten jeweils eine Länge von 20 Basen (Abbildung 3).

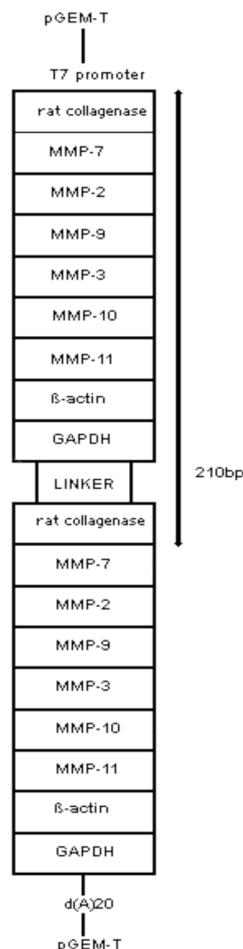


Abbildung 3: Karte des MMP Ratten Kontrollfragmentes. Es enthielt komplementäre Sequenzen für die jeweiligen MMP Primer, wobei immer ein Amplifikat mit der Länge von 210 Basenpaaren entstand.

2.5.2 Amplifikation von Bakterien

1. Herstellung kompetenter Bakterien:

E. coli Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium bei 37°C auf einem Schüttler mit 225 u/min über Nacht inkubiert. 500 µl dieser Kultur wurden in 50ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C mit 225 u/min bis zur frühen exponentielle Wachstumsphase vermehrt. Danach erfolgte die Pelletierung der Bakterien mittels Zentrifugation bei 2200g für 10 min bei 4°C. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem Transformationspuffer aufgenommen, auf Eis gestellt und in Portionen von 100 µl in vorgekühlte sterile 1,5 ml Tubes pipettiert.

2. Transformation:

Für die Transformation wurden 100 pg der Plasmid-DNA in 100 µl Bakterienansatz gegeben. Nach Zugabe der Plasmid-DNA fand die Cloning Reaction statt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Bakterien auf Eis und die Zugabe von LB-Medium auf ein Endvolumen von 1 ml.

3. Amplifikation:

Nun wurden die Bakterien in einem Eppendorfschüttler mit 600 u/min bei 37°C eine Stunde geschüttelt. Dabei wird das Antibiotikaresistenzgen exprimiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen auf Ampicillin beimpfte LB Agarplatten aufgebracht und über Nacht bebrütet. Transformierte Bakterien konnten auf den Ampicillinplatten wachsen. Eine gewachsene Kolonie wurde mit einer Impföse aufgenommen, in 4 ml LB-Medium gelöst und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Pelletierung in der Zentrifuge und die Dekantierung des Überstandes.

4. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Qiagen Miniprep)

Es wurde nun überprüft, ob das Kontrollfragment erfolgreich amplifiziert wurde. Dazu wurden die hergestellten Plasmide gewonnen. Die Methode der Plasmidpräparation beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien.^{76,77} Es wird selektiv chromosomale DNA denaturiert und bei der anschließenden Reutralisierung zu einem unlöslichem komplexen Doppelstrangkonglomerat zusammengelagert, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Die Plasmid-DNA konnte so durch Zentrifugation isoliert werden. Zur Plasmidpräparation wurde ein kommerzielles Kit der Firma Qiagen angewendet:

- *Resuspendieren des Bakterienpellets in 4 ml Puffer P1.*
- *Danach Zugabe von 4 ml Puffer P2 und fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur.*
- *Dann Zugabe von 4 ml Puffer P3, vorsichtiges Mischen und 30 min Zentrifugation bei 15000 g bei 4°C.*
- *Überstand in ein neues Tube geben. Erneutes Zentrifugieren des Überstandes bei 15000 g bei 4°C.*
- *10 ml QBT Puffer durch ein Qiagen-Tip 100 durchleiten und den Überstand aus dem vorigen Schritt einfüllen und durchlaufen lassen. Das Plasmid wird an der Säulenwand adsorbiert.*

- Waschen des Qiagen-Tips mit 10 ml Puffer QC, Waschlösung verwerfen.
- Eluieren des Plasmides aus dem Qiagen-Tip mit 5 ml Puffer QF, Lösung auffangen.
- Präzipitation des Plasmides mit 0,7 fachen des Volumens Isopropanol bei Raumtemperatur.
- Zentrifugation bei 4°C für 30 min
- Vorsichtiges Dekantieren des Tubes und Waschen des Plasmides mit 70% Ethanol. Lufttrocknen lassen für 5 min und Auflösen des Plasmidpellets in TAE-Puffer.
- Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (Quiagen Maxiprep)

Durch eine proportionale Erhöhung der Mengen, wie sie in der Mini-Präparation eingesetzt wurden, ließen sich mehrere mg Plasmid gewinnen. Dazu wurde das Maxi-Präparationskit der Firma Qiagen benutzt.

Der Nachweis der erfolgreichen Präparation des Plasmids erfolgte in einem 1,3% Agarosegel mit Hilfe eines kommerziellen Molekulargewichtsmarkers. Dem Agarosegel wurde 0,04 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Dieses interkaliert an Nukleinsäuren und fluoresziert unter UV-Licht. Die Intensität der Fluoreszenz der Nukleinsäurebande wurde mit dem geeichten Molekulargewichtsmarker verglichen. Dies gab einen Aufschluss über die vorhandene Nukleinsäuremenge.

5. Restriktionsenzymbehandlung des Plasmids

Die Plasmid-DNA wurde einer Restriktionsverdauung unterworfen. Dies diente der Isolierung vom DNA-Fragment (Kontrollfragment), das für die quantitative PCR benötigt wurde. Für einen vollständigen Restriktionsverdau wurden 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

Als Restriktionsendonukleasen wurden *SphI* und *NotI* verwendet. Für die Spaltung von 1 µg DNA wurden jeweils 1-2 U *SphI*, 1-2 U *NotI* und 1/10 des Endvolumens an passendem 10 x Restriktionspuffer benutzt. Für die Verdauung wurde die Reaktionsmischung für eine Stunde bei der für das Enzym optimalen Temperatur (37°C) inkubiert. Nach der Verdauung wurde das Spaltprodukt im Agarosegel vom Plasmid getrennt. Das Fragment enthaltende Gel wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des Kits QIAquick Spin isoliert. Danach wurden die Nukleinsäuren quantifiziert (Siehe Kapitel 2.5.3).

2.5.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Sowohl DNA als auch RNA haben eine maximale Absorption von 260 nm. Es besteht eine lineare Verbindung zwischen der Absorption von Licht und der Konzentration von RNA und DNA. Mit Hilfe eines Spektrophotometers kann man die Konzentration von RNA oder DNA messen. Eine Probe wird ultraviolettem Licht von 260 nm ausgesetzt und ein Fotodetektor misst das Licht, das durch die Probe fällt. Je mehr Licht absorbiert wird, desto höher ist die Konzentration in der Probe.

Um die Reinheit der Probe festzustellen und eine Verunreinigung mit Phenol oder Protein auszuschließen, wird die Ratio zwischen der maximalen Absorption von Ribonukleinsäure (260 nm) und der maximalen Absorption von Protein (280 nm) bestimmt. Eine A₂₆₀/A₂₈₀ Ratio die größer ist als 1,8 bei einer RNA Probe, zeigt an, das die Probe größtenteils frei von Proteinen ist.

Es wurde eine Verdünnung von 1:500 der Nukleinsäurelösung in DEPC behandeltes Aqua dest. vorgenommen und die Absorption im Vergleich zu aqua dest. in einer Quarzküvette bestimmt.

2.6 RNA Elektrophorese

Um die Integrität der isolierten RNA zu prüfen, wurden 1 µg der jeweiligen Probe in 1,3% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Agarosegel wird Ethidiumbromid zugeführt. Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren und fluoresziert unter UV-Licht bei 305 nm. Intakte RNA imponiert nach der Elektrophorese mit zwei eindeutigen Banden die die ribosomale 28s RNA und 18s RNA darstellen.

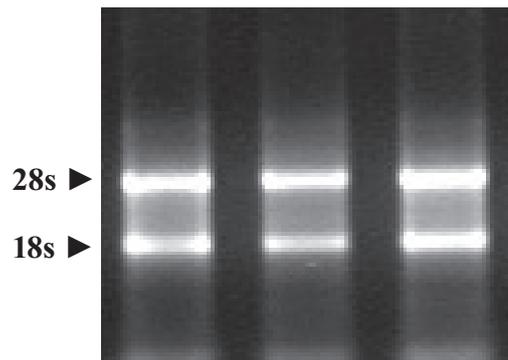


Abbildung 4: Agarose Gel Elektrophorese einer RNA Probe zur Überprüfung der Integrität. Prominent die 28s und die 18s Bande.

2.7 Reverse Transkriptase

Um die mRNA in einen stabileren Zustand zu überführen, wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) die mRNA in copy DNA (cDNA) zurückgeschrieben und in der PCR eingesetzt.

Jede eukariotische mRNA besitzt an ihrem 3'-Ende eine lange Adenosin-Nukleotidkette Im englischen *poly(A)* tail genannt. Sie verschafft einen Weg, mRNA spezifisch von RNA zu trennen, da diese die poly(A) Kette nicht besitzt. Die Trennung geschieht mit Hilfe eines poly(T) Nukleotids (Oligo dT) welches als Startsequenz (Primer) in der RT-Reaktion benutzt wird. Ein virales Enzym, die reverse Transkriptase, amplifiziert im nächsten Schritt die mRNA zu einer doppelsträngigen DNA, die copy DNA oder cDNA.

Ein Standardansatz für die RT Reaktion enthielt folgende Komponenten:

Puffer x5	8µl
DDT	2,5mM
dNTP	2mM
RNAsin	0,4U
Oligo dT	2,5µM
MMTV	2,5U
RNA	5µg
RNAse freies H2O	ad 30µl

Zunächst wurde die RNA und das Wasser in ein Eppendorftube gegeben und die Lösung in einem PCR-Heizblock bei 85°C für 5 min zur Denaturierung inkubiert. Währenddessen wurde der Rest der Reagenzien zusammenpipettiert und nach Ende der Inkubation dem Tube zugegeben. Dieser Mix wurde nun 50 min bei 41°C zur Hybridisierung der oligo(dT) Ketten und der cDNA Amplifikation inkubiert und anschließend 4 min bei 95°C denaturiert. Die synthetisierte cDNA wurde nun in der PCR eingesetzt.

2.8 Kompetitive Polymerase – Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren der Molekulargenetik. Mit Hilfe eines Primers und einer DNA-Polymerase wird ein bestimmter DNA-Abschnitt vervielfältigt. Die PCR besteht aus drei sich wiederholenden Schritten:

- *Denaturierung: der Doppelstrang wird getrennt.*
- *Annealing: die Primer binden sich an die DNA.*
- *Elongation: die DNA-Polymerase synthetisiert aus Nukleotiden (dNTP) einen neuen Komplementärstrang.*

Die kompetitive in vitro-Amplifikation von DNA mit Hilfe von zwei Oligonukleotid-Startern (Primern) erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Mullis et al. (1986),⁷⁸ Mullis & Faloona (1987)⁷⁹ und Siegling et al. (1994).⁸⁰ In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Messung der RNA-Konzentration von Proteasen und deren Inhibitoren innerhalb des Pankreas verwendet. Dabei wurde ein synthetisches DNA-Kontrollfragment als interner Standard verwendet. Das Kontrollfragment beinhaltete spezifische Primer für mehrere Matrix Metalloproteinasen sowie dem housekeeping Protein β -actin. Die Proben cDNA und die Kontrollfragment-DNA wurden zusammen in einem Tube mit denselben Primern co-amplifiziert. Die Proben cDNA und die Kontrollfragment-DNA konnten durch unterschiedliche Amplicons nach der Elektrophorese unterschieden werden. Die Eingangskonzentration des Kontrollfragmentes war bekannt. Die Amplifikation des Kontrollfragmentes lief parallel mit der Amplifikation der Proben cDNA. Dadurch war es hinterher möglich die Konzentration der cDNA zu bestimmen.

Die Matrix Metalloproteinasen und β -actin Primer wurden zur Amplifikation mit dem Kontrollfragment übernommen von Wells et. al. (1996).⁷⁵ Dankenswerterweise wurden uns der Standard von Wells et al. zur Quantifizierung der cDNA überlassen und amplifiziert. TIMP-Primer wurden übernommen von Nishiura & Abe (1999).⁸¹

Eigene MMP-2 und MMP-9 Primer wurden intronübergreifend mit Hilfe eines Primerkonstruktionsprogramms generiert.⁸² Dabei wurde darauf geachtet, eine möglichst gleiche Annealingtemperatur des Forward- und Reverse-Primers zu erreichen.

Ein kommerzieller Standardansatz für die PCR setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

PCR Puffer 10x	2.5 µl
MgCl ₂	2 mM
dNTP Mix	0,22 mM
Primer Sense	25 pM
Primer Antisense	25 pM
cDNA	1 µl
Optionell Kontrollfragment	1 µl
Taq Polymerase	0.5 U
Aqua dest.	ad 25 µl

Die PCR wurde in mehreren Zyklen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Zunächst wurde der PCR-Ansatz bei 95°C inkubiert (denaturiert). Dies führte zur Lösung der Verbindungen zwischen den Nukleotidsträngen. Es lagen nun ausschließlich Einzelstrangnukleotide vor. Eventuell vorhandenes Protein wurde denaturiert. Das Herunterkühlen auf eine Temperatur um 60°C führte zur Hybridisierung der Startersequenzen (Primer) an den entsprechenden Abschnitten der Nukleotidketten (Annealing). Diese Temperatur war optimiert für jedes Primerpaar (Annealingtemperatur). Sie war abhängig von deren Länge und der Menge der verschiedenen Nukleotiden. Anschließend wurde der PCR-Ansatz der optimalen Arbeitstemperatur des Polymerisationsenzym ausgesetzt. Es kam zur Polymerisation einer weiteren DNA-Kette ausgehend vom Primer (Elongation). Danach begann der Zyklus wieder von vorne. Je mehr Zyklen durchlaufen wurden, desto mehr cDNA wurde amplifiziert.

Das Amplifikationsprogramm wurde mit einem steuerbaren PCR-Heizblock mit beheizbarem Deckel nach folgendem Schema durchgeführt:

Zyklus	Denaturierung	Primer – Bindung (Annealing)	Polymerisation (Elongation)	Stopp
0	95°C, 4 min			
1-34	95°C, 30 sek	57°C, 30 sek	72°C, 2 min	
35			72°C, 7 min	4°C, ∞

Nach der PCR wurde die amplifizierte cDNA elektrophoretisch ausgewertet.

Dazu wurde die cDNA aus verschiedenen Proben auf Grundlage ihres β-actin Gehaltes auf die gleichen Ausgangskonzentrationen gebracht. Anschließend wurde die cDNA mit dem Kontrollfragment und dem entsprechendem Primerpaar co-amplifiziert.

Da die Ausgangskonzentration des β-actin Kontrollfragmentes bekannt war, konnten anhand der unterschiedlichen Expression von Kontrollfragment und Ziel-cDNA Rückschlüsse auf die Eingangskonzentration der Ziel-cDNA gezogen werden. Wenn nun die Expression des Kontrollfragmentes gleich der Expression der Ziel-cDNA war, lagen beide in gleichen Ausgangskonzentrationen vor.

2.9 Elektrophorese der PCR-Produkte und Fluoreszenzauswertung

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in 1,2%igen Agarosegelen zu der 0,04 mg/ml Ethidiumbromid zur späteren Visualisierung der DNA hinzu gegeben wurden. Dazu wurden 1,2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und gelöst. Anschließend wurden 4 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) hinzu pipettiert. Das flüssige Produkt wurde in vorgefertigte Kammern mit Kämmen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Käme gezogen und die Kammern mit TAE-Puffer gefüllt.

Die DNA-Lösungen wurden mit je 1 µl einer Stopp-Lösung versetzt. Das dort enthaltene EDTA stoppt die PCR-Reaktion. Ficoll beschwert die Probe und Orange G färbt sie. Je 20 µl der DNA Lösung wurden in die Geltaschen pipetiert. Zugleich wurde 3 µl eines DNA-Längenstandards mit aufgetragen (DNA-Marker).

Zur Fluoreszenzauswertung wurde das Gel auf ein UV-Durchleuchtungstisch gelegt, mit Hilfe einer digitalen Kamera fotografiert und das Bild computergestützt ausgewertet. Das gespeicherte Bild hat eine 8bit Bildauflösung und wird in Graufarben dargestellt. Mit Hilfe des Auswertungsprogramms E.A.S.Y. Win32 von Herolab wurde um jede Bande ein rechteckiges Auswertungsraster gezogen. Die Fläche des Rechteckes blieb dabei für jede Bande gleich. Für jedes Bildpixel innerhalb des Auswertungsrechtecks wurde die Farbtiefe bestimmt. Bei einer 8bit Farbtiefe liegen die Werte für ein Bildpixel als Grauwert zwischen 0 und 255. Das Emissionsvolumen einer Bande ergibt sich aus der Summe aller Grauwertstufen. Sie ist eine dimensionslose Größe.

Je größer das Emissionsvolumen ist, desto mehr PCR-Produkte befinden sich in der Bande. Ein Vergleich der Konzentrationen der PCR-Produkte innerhalb eines Gels ist damit möglich.

Die Verhältnisse der PCR-Produkte zu dem mitamplifizierten Kontrollfragment gaben einen Hinweis auf die relative cDNA-Konzentration im Vergleich zur bekannten Konzentration des Kontrollfragmentes.

Zur Äquilibration der unterschiedlichen cDNA-Proben auf gleiche Ausgangskonzentrationen wurde das ‚house-keeping‘ Gen β -actin verwendet (Abbildung 9). Die so eingestellten Proben wurden in die PCR für die MMP eingesetzt und zusammen mit dem MMP-Kontrollfragment amplifiziert. Anschließend wurde die Konzentration des Kontrollfragmentes verglichen mit der Konzentration des jeweiligen cDNA-Amplifikats. Daraus ließ sich eine relative Konzentrationsänderung der MMP im Versuchsverlauf feststellen.

2.10 Präparation der pankreatischen Stellatezellen

Pankreatische Stellatezellen wurden nach einer leicht modifizierten Methode, beschrieben von Apte et al. (1998), isoliert:⁸³

Einwiegen von 25 mg Kollagenase, 10 mg Protease und 5 mg DNase I (0.5 ml). Danach wurden 50 ml Falconröhrchen mit 40 ml HBSS auf etwa 37°C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die Enzyme in jeweils 1 ml der 40 ml HBSS gelöst.

Bei einem pH-Anstieg, erkennbar an der dunkelrot bis violetten Färbung des Phenolrots im

HBSS, wurde mit ca. 10 µl steriler HCl Lösung der pH-Wert wieder eingestellt. Die Lösung wurde daraufhin wieder gelblich.

- Das Abdomen von pentobarbital-anästhesierten Ratten wurde eröffnet und die Ratten durch Herzpunktion exsanguiniert. In das Pankreas wurden intraductal ca. 6 ml einer HBSS Lösung pH 7.4 injiziert. Diese Lösung enthielt 0.05% Kollagenase, 0.02% Protease IX, 50 µg/ml DNase. Das Pankreas wurde entnommen, mit der Schere zerkleinert und in einen Erlenmeyerkolben gefüllt. Dieser wurde bei 37°C ins Wasserbad gestellt, mit Parafilm verschlossen und 10 min bei 160 rpm geschüttelt.
- Danach wurde das vorzerkleinerte Pankreas in eine Petrischale gegeben, mit der Schere nochmals möglichst klein geschnitten und mit einer 10 ml Pipette etwa zehn Mal auf und nieder pipettiert. Dann wurde das Produkt im Erlenmeyerkolben mit frischer Enzym-lösung auf 20 ml aufgefüllt, mit Parafilm verschlossen und geschüttelt wie oben.
- Zugabe von 250 µl DNase mit etwa 7-10 min Einwirkzeit. Die Zellsuspension wurde im 50ml Falconröhrchen bei 4°C mit 1400 g (2800 rpm) für 7 min zentrifugiert und der Überstand abpipetiert.
- Anschließend wurden die Zellen mit 15 ml HBSS + FCS resuspendiert. Erneute Zentri-fugation im 50 ml Falconröhrchen bei 4°C 1400 g für 7 min und Abpipettieren des Über-standes.
- Das Zellpellet wurde nun mit 12 ml HBSS + FCS resuspendiert. 8 ml 12% Nycodenz wurde dazu pipettiert und vorsichtig vermischt.
- 7 ml HBSS wurden nun in ein Gradienten-Tube gefüllt und die 20 ml Zell-Nycodenz-Suspension mit einer Punktionsnadel vorsichtig unterschichtet. Zwei Fraktionen werden nach Zentrifugation (4°C und 1400 x g (2800 rpm) für 20 min, ohne Bremse) in je 1 x 50 ml Falconröhrchen pipettiert:
 1. Klarer Überstand (etwa 4 ml)
 2. Trüber Ring der Interphase
 3. Untere Phase wird verworfen

Die pankreatischen Stellatezellen sind fetthaltig. Sie haben eine geringere Dichte und finden sich als trüber Ring in der Interphase.

Falconröhrchen mit den Zellen aus der Interphase wurden mit Iscove-Medium aufgefüllt und zentrifugiert (1400 g, 7 min, 20°C), der Überstand abgegossen, Zellpellets erneut in Iscove-Medium suspensiert, in entsprechende Zellkulturgefäße eingebracht und zum Anwachsen auf Kulturplatten in den Brutschrank gestellt.

2.11 PCR von pankreatischen Stellatezellen

Nach der Isolierung der PSC aus dem Rattenpankreas wurden die Zellen in mehreren Parallelansätzen kultiviert. An den Tagen 1, 2, 3, 4, 5 und 7 konnte dann im Verlauf der Zellaktivierung RNA mit Hilfe eines kommerziellen Kits (RNeasy Mini Kit) aus den Zellen isoliert werden. Die

RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit dem Kontrollfragment in der PCR co-amplifiziert (Siehe Kapitel 2.8). Es erfolgte die Analyse der Expression von MMP-2 und MMP-9.

2.12 Zymografie

Mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch Zugabe von Gelatin in das Trenngel bekamen Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) nach deren Auftrennung die Möglichkeit, diese unter bestimmten Bedingungen innerhalb des Geles zu verdauen. Das Trenngel wurde anschließend gefärbt, wobei sich der Farbstoff an das Gelatin band. Es entstanden farblose Banden an den Stellen, wo Gelatinasen das Gelatin verdaut hatten. Die Größe der dadurch entstandenen Banden war der Aktivität des Proteins ungefähr proportional.

Für diesen Versuch wurden kultivierte pankreatische Stellatezellen verwendet. Die Aktivität von sezerniertem MMP konnte quantitativ im Zellkulturüberstand erfasst werden. Untersucht wurde die MMP-Aktivität im Zellkulturüberstand drei und sieben Tage nach Zellkulturansatzung.

2.12.1 Probengewinnung

Der Zellüberstand wurde je nach zwei und sieben Tagen abpipettiert und jeder Überstand in ein eigenes großes Eppendorfröhrchen pipetiert. Die Röhrchen wurden kurz anzentrifugiert um vorhandene Zelltrümmer abzuzentrifugieren. Der Überstand wurde in 4 Fraktionen in kleine Eppendorfröhrchen zu je 75 µl aufgeteilt. Eine Probe je Zellansatz wurde weiterverwendet, die anderen bei -80°C eingefroren.

Den Proben wurde 25 µl Probenpuffer hinzugegeben. Dieser bestand aus 10% SDS (Natriumlaurylsulfat), 4% Sucrose, 0,25 mmol/l Tris-HCl pH 6.8 und 0,1% Bromphenolblau.

2.12.2 Trenn- und Sammelgel

Die Elektrophoresekammer wurde vorbereitet und die Kanten mit Vaseline abgedichtet.

Ein Trenngelansatz enthält:

H ₂ O	14,5 ml
Gelatinelösung	3,3 ml
Acrylamidstammlösung 40%	6,7 ml
Trispuffer pH 8.8	8,25 ml
APS	100 µl
TEMED	17 µl

TEMED und APS wurden als letztes hinzugefügt. APS (Ammoniumpersulfat) ist ein Polymerisationskatalysator. Zusammen mit TEMED (Tetramethylethyldiamin) als Vernetzer wird die Polymerisation des Gels gestartet. Diese wird durch das Vorhandensein der Gelatine noch beschleunigt.

Das Trenngel wurde bis ca. 1,5 cm unterhalb der Taschenoberkante in die Elektrophoresekammer eingefüllt und das Gel vorsichtig mit aqua dest. überschichtet. Das Gel polymerisierte im Laufe von 10 bis 15 Minuten.

Als Sammelgel wurden zusammengegeben:

H ₂ O	5,08 ml
Acrylamidstammlösung 40%	1,0 ml
Trispuffer pH 6,8	2,08 ml
APS	29,2 l
TEMED	8,35 l

Das Wasser über dem Trenngel wurde dekantiert und das Sammelgel auf das bereits polymerisierte Trenngel bis zur Taschenoberkante gegossen.

2.12.3 Durchführung der Elektrophorese und Auswertung

Die Geltaschen wurden beladen und anschließend die Elektrophorese durchgeführt. Das Gel inkubierte anschließend bei Raumtemperatur für 30 min in 2.5% Tritonlösung. Nach 15 Minuten wurde die Tritonlösung einmal gewechselt.

Danach wurde das Gel über Nacht in Substratpuffer bei 37°C im Wasserbecken inkubiert.

Anschließend färbte man das Gel für 30 min in Comassie Blue Lösung. Mit Eisessig-Isopropanol-H₂O Lösung (1:3:6) wurde unter Sicht entfärbt und die Lösung ein- bis zweimal gewechselt. Gelatinfreie Banden erschienen nun weiß durchscheinend durch das blaue Gel.

Das Gel wurde mit einem PC und entsprechender Dokumentationssoftware ausgewertet und dokumentiert (E.A.S.Y. Win32, HEROLAB, Deutschland) und anschließend auf dem Schnell-trockner eingespannt und getrocknet.

2.13 Hematoxylin & Eosin - Färbung

Ein Teil des gewonnenen Pankreasgewebes (siehe Kapitel 2.2) wurde in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotom in 3-4 µm dünne Schnitte geschnitten, auf einen Objektträger aufgebracht und mit Hematoxylin & Eosin (HE) gefärbt.⁸⁴ Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Die Schnitte wurden entparaffinisiert und in Mayers Hematoxylin für 3 min inkubiert.
- Waschen in H₂O für 2-3 min.
- Inkubieren in der Eosin-Lösung für 30 sek.
- Waschen in H₂O für 30 sek.
- Dehydrieren der Schnitte erst in 75% Ethanol, dann in 95% Ethanol für jeweils etwa 1 min.
- Waschen in Xylol für wenige Sekunden. Zum Schluss fixierung des Schnittes mit einem Harzkleber und einem Deckglas.

3 Ergebnisse

3.1 Histologie der DBTC-Pankreatitis

Im Verlauf der DBTC-Pankreatitis kam es zu einer Entzündung mit ausgedehnter Pankreasfibrose. Die morphologischen Veränderungen im Rattenpankreas wurden durch histologische Untersuchungen erfasst. Am 7. Tag nach Induktion der Pankreatitis mit DBTC zeigte sich histologisch eine beginnende periduktuläre Fibrose. Erkennbar waren eine massive Infiltration von mononukleären Zellen und eine beginnende Ablagerung von fibrotischen Material (Abbildung 6). Nach 14 Tagen hatte die Fibrose und die Infiltration mit Lymphozyten und Makrophagen weiter zugenommen (Abbildung 7). 60 Tage nach Induktion der chronischen Pankreatitis war ein großer Teil des exokrinen Pankreasgewebes zerstört und durch fibrotisches Material ersetzt. Es fanden sich noch einzelne exokrine Drüsenreste. Die Inselzellen waren noch nicht vom Umbau betroffen (Abbildung 8).

Die Zerstörung des Pankreasparenchyms, eine massive Infiltration von mononukleären Entzündungszellen und eine ausgeprägte Pankreasfibrose kennzeichnen histologisch eine chronische Pankreatitis.

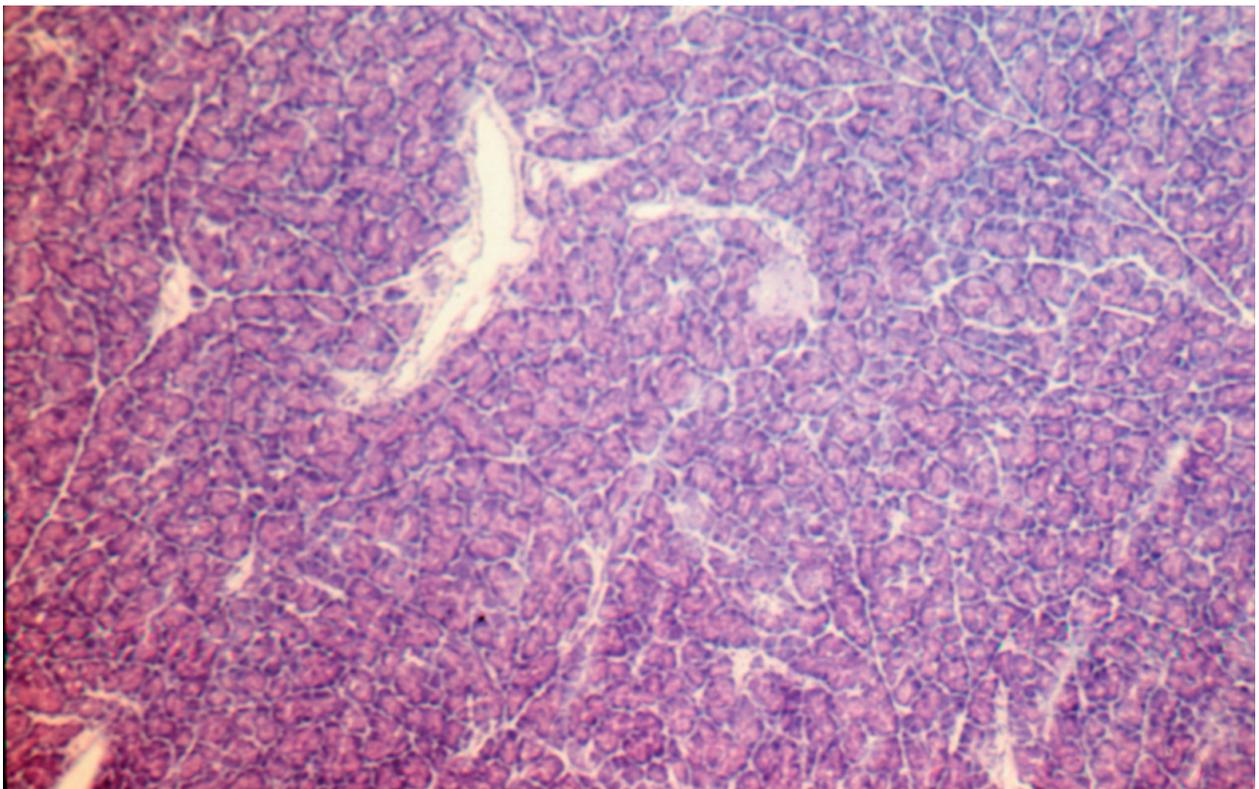


Abbildung 5: *Histologischer Schnitt von einem gesunden Rattenpankreas in HE Färbung.*

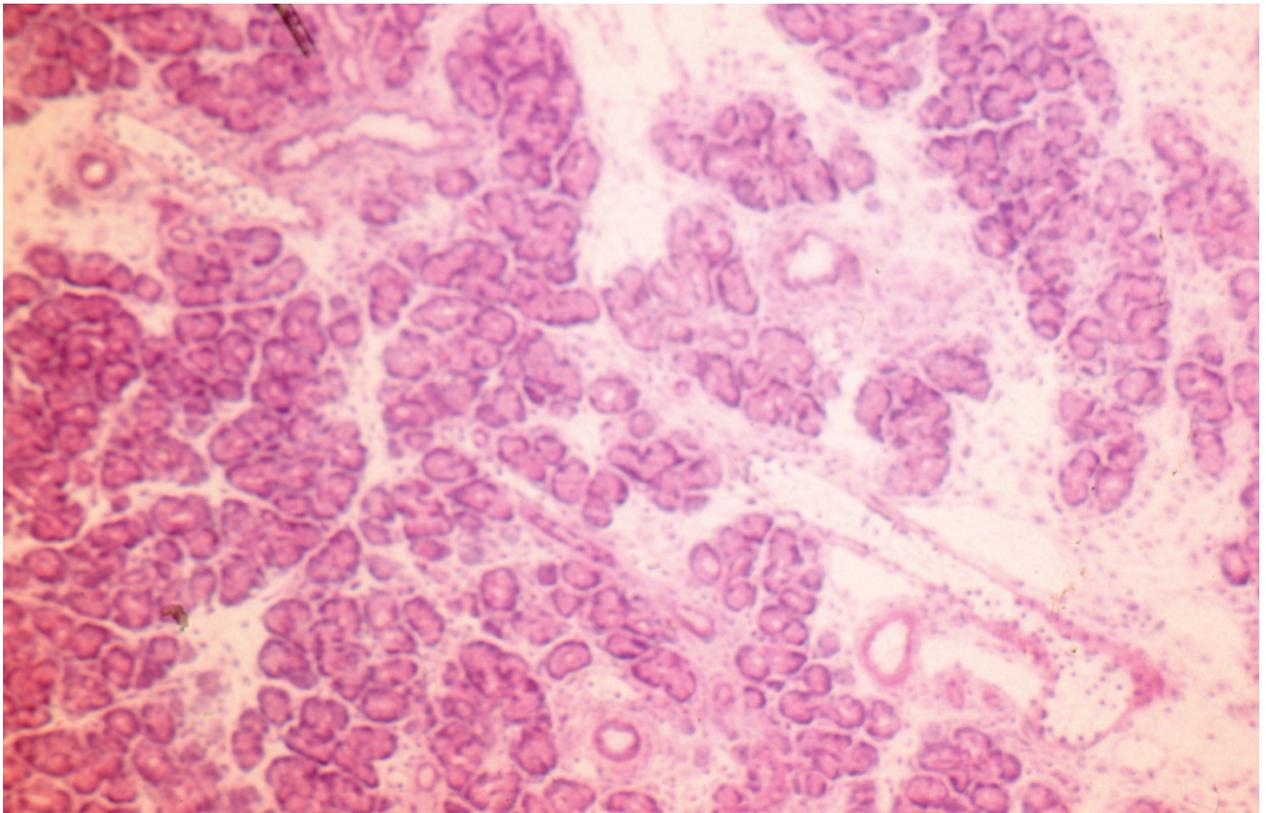


Abbildung 6: Histologischer Schnitt eines Rattenpankreas in HE Färbung 7 Tage nach Induktion der DBTC Pankreatitis. Beginnende periduktuläre Fibrose. Infiltration mit Entzündungszellen.

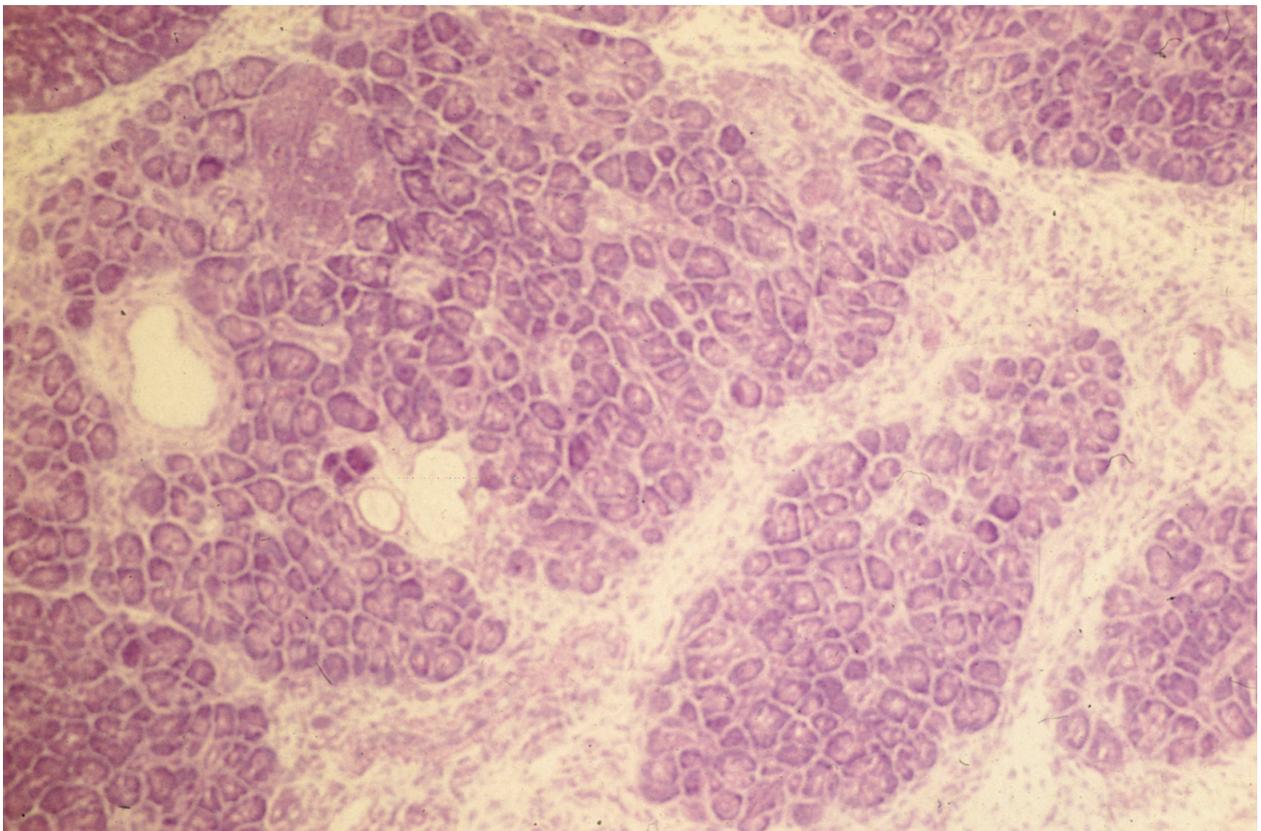


Abbildung 7: Histologischer Schnitt eines Rattenpankreas in HE Färbung 14 Tage nach Induktion der DBTC Pankreatitis. Zunehmende Pankreasfibrose. Lymphozyten und Makrophageninfiltration.

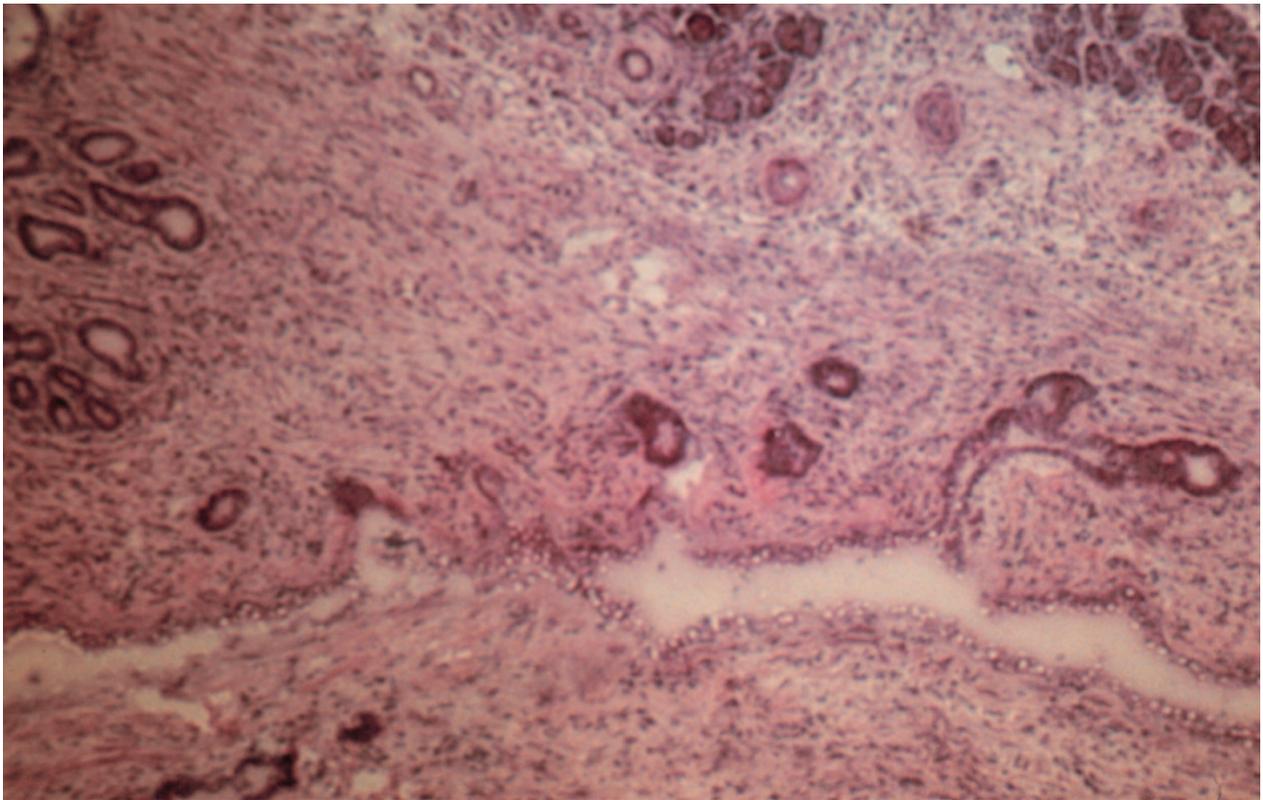


Abbildung 8: Histologischer Schnitt eines Rattenpankreas in HE Färbung 60 Tage nach Induktion der DBTC Pankreatitis. Ausgedehnte Fibrose des gesamten Pankreas, tubuläre Komplexe, einzelne erhaltene Azini.

3.2 Einstellung der cDNA mittels β -actin

Es sollte im Verlauf der experimentellen chronischen DBTC-Pankreatitis die quantitative Expression der Matrix Metalloproteinasen im Pankreas bestimmt werden.

Die cDNA-Konzentration der verschiedenen Proben wurde mit Hilfe der kompetitiven PCR auf das housekeeping Gen β -actin eingestellt (Abbildung 9). Nach Separation der PCR-Produkte und des co-amplifizierten β -actins wurden die Banden verglichen. Gegebenenfalls wurde die cDNA weiter verdünnt oder konzentriert bis nach der PCR beide Banden nahezu gleiche Fluoreszenzintensitäten aufwiesen. Auf diese Weise konnte die Ausgangskonzentration standardisiert werden. Die Proben waren untereinander vergleichbar.

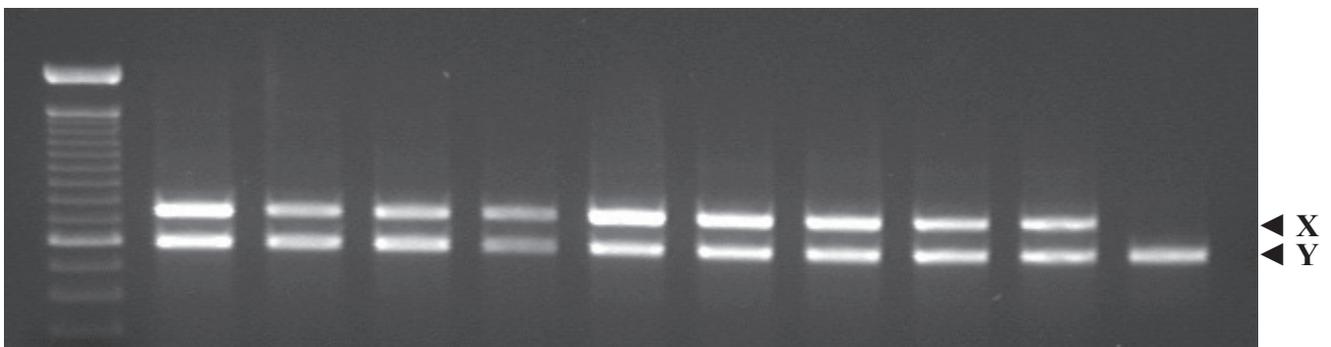


Abbildung 9: Agarose Gel Elektrophorese von PCR Produkten der β actin cDNA im Verlauf der DBTC Pankreatitis. Co amplifikation mit β actin Kontrollfragment. d=Tage nach DBTC Gabe. M = Molekulargewichtsmaker, neg=Negativkontrolle. X=cDNA, Y=Kontrollfragment. Co= Kontrollprobe vom gesunden Pankreas

3.3 Expression von Matrix Metalloproteinasen im Gewebe

3.3.1 Expression von MMP-9

Es wurde die Expression von MMP-9 auf RNA-Ebene im Pankreas im Verlauf der chronischen Pankreatitis bestimmt (Abbildung 10). In Abbildung 11 ist die relative Expression bezogen auf die Kontrolle angegeben. Da eine kleine Stichprobe vorlag (n = 5), wurde zur Darstellung der Median und die Spannweite gewählt. Nach Induktion der chronischen Pankreatitis zeigte sich bereits am ersten Tag ein Anstieg der MMP-9 Expression auf das ca. 120-fache der Kontrolle. Danach sanken die Werte bis zum 5. Tag nahezu wieder auf das Ausgangsniveau. Am Tag 7 war erneut ein Anstieg auf das 250-fache zu beobachten. Nach einer geringen Reduktion der Werte an den Tagen 14 und 28, nahm die Expression am Ende des Beobachtungszeitraumes von 60 Tagen mit einer ungefähr 250-fachen Expression des Kontrollwertes wieder erheblich zu.

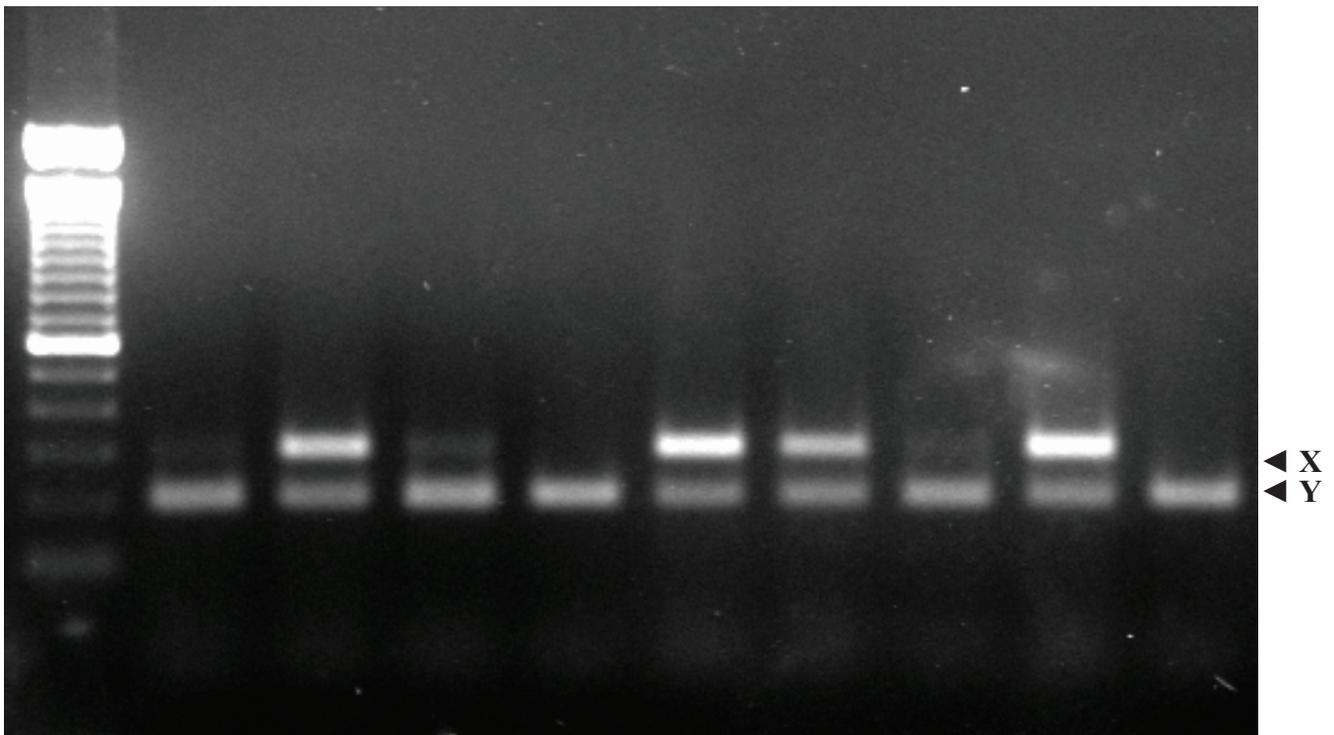


Abbildung 10: Agarose Gel Elektrophorese von PCR Produkten der MMP 9 cDNA im Verlauf der DBTC Pankreatitis. Co =amplifikation mit MMP 9 Kontrollfragment. d=Tage nach DBTC Gabe. M=Molekulargewichtsmarker. neg=Negativkontrolle. X=cDNA, Y=Kontrollfragment. Co=Kontrollprobe vom gesunden Pankreas.

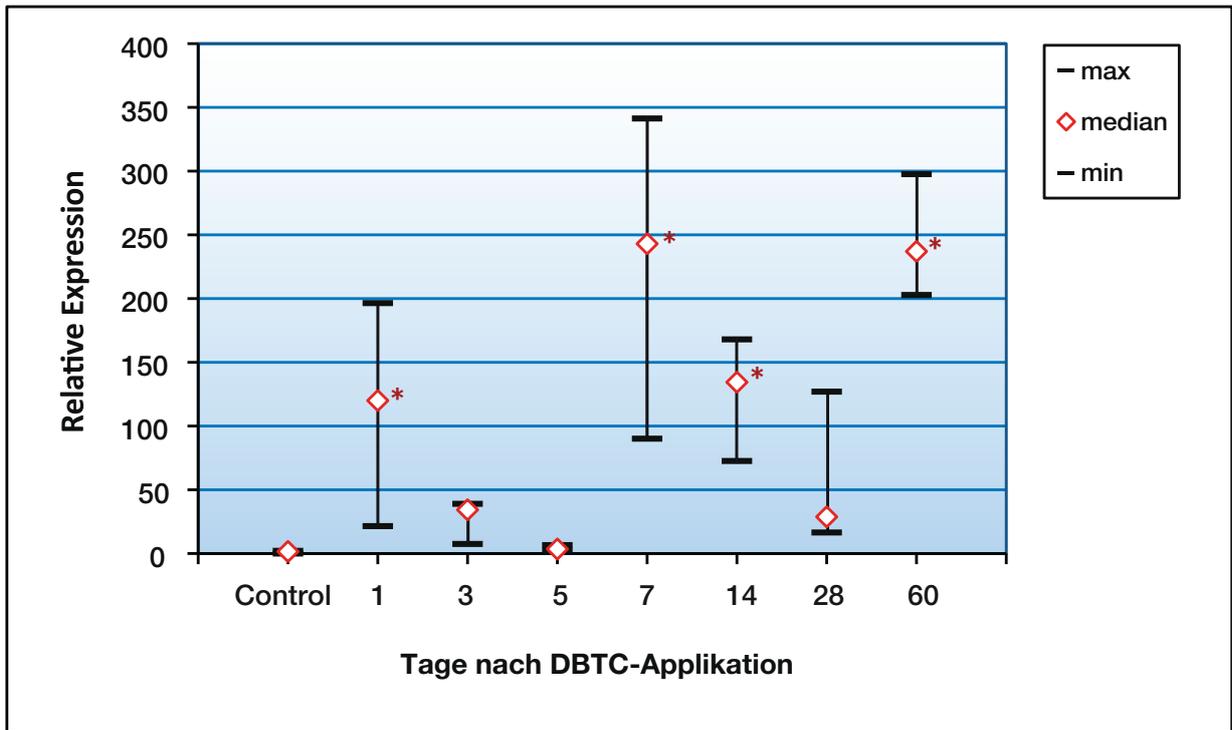


Abbildung 11: Expression von MMP 9 im Verlauf der chronischen Pankreatitis. Control=Kontrollpankreas ohne DBTC Applikation. n=5. Die Expression wurde auf die mit 1 gleichgesetzte Kontrolle bezogen. *=p<0,05

3.3.2 Expression von MMP-2 und MMP-3

Nach Induktion der chronischen Pankreatitis nahm die MMP-2 Expression zu, stieg jedoch nicht mehr als das zweifache des Wertes im Normalgewebe an. Dieser Anstieg ist wahrscheinlich ein Ausdruck der vermehrten Zellinfiltration und nicht einer gesteigerten Expression und hat vermutlich keinerlei Relevanz (Abbildung 13).

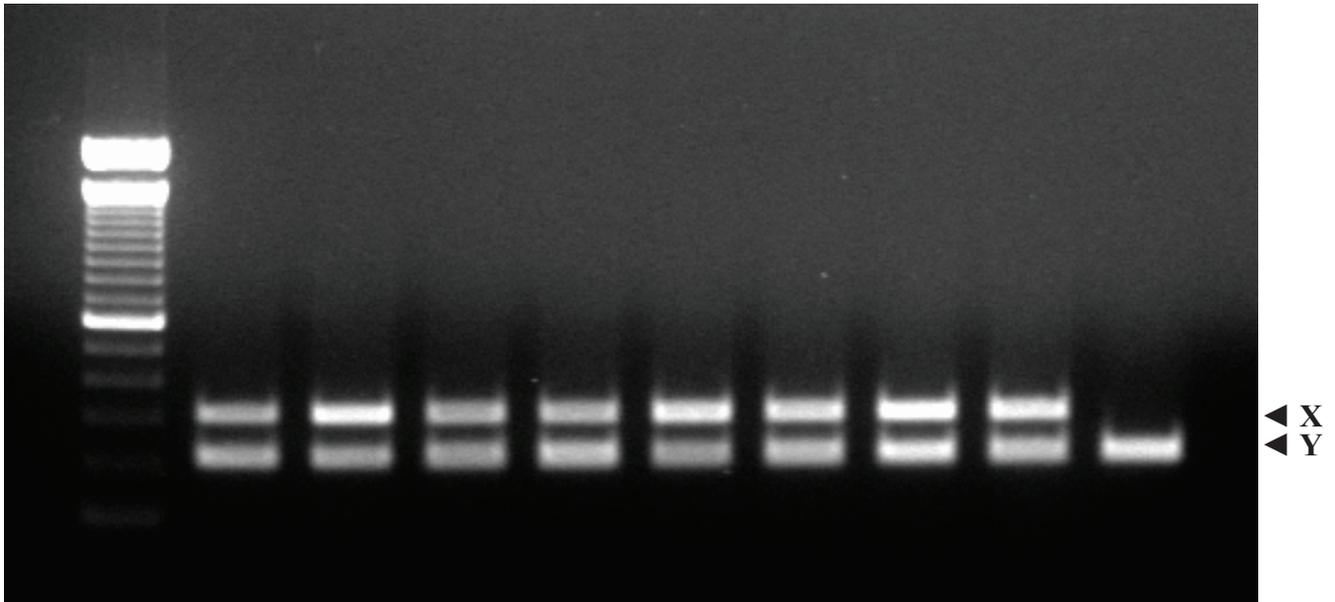


Abbildung 12: Agarose Gel Elektrophorese von PCR Produkten der MMP 2 cDNA im Verlauf der DBTC Pankreatitis. Co amplifikation mit MMP 2 Kontrollfragment. d=Tage nach DBTC Gabe. M=Molekulargewichtsmarker. neg=Negativkontrolle. X=cDNA, Y=Kontrollfragment. Co=Kontrollprobe vom gesunden Pankreas.

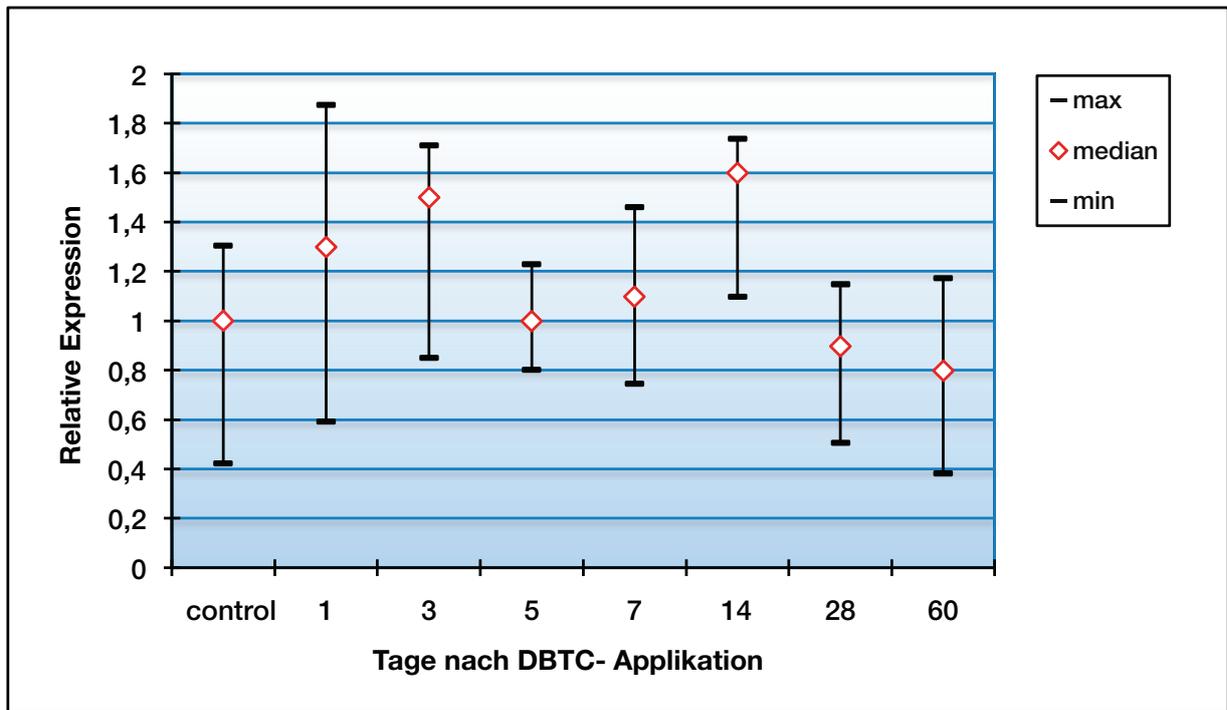


Abbildung 13: Expression von MMP 2 im Verlauf der chronischen Pankreatitis. Ko=Kontrollpankreas ohne DBTC Applikation. n=5. Die Expression wurde auf die mit 1 gleichgesetzte Kontrolle bezogen.

Eine Expression von MMP-3 konnte weder bei der chronischen Pankreatitis, noch bei Kontrollpankreatita nachgewiesen werden.

3.4 Expression von Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases im Gewebe

TIMPs sind die Antagonisten der MMPs. Sie stehen mit den MMPs im Gleichgewicht und können sie durch 1:1 Komplexbildung inhibieren.

3.4.1 Expression von TIMP-1

Die Expression von TIMP-1 nahm einen ähnlichen Verlauf wie die von MMP-9. Nach Induktion der chronischen Pankreatitis stieg die Expression von TIMP-1 auf das sechs- bis achtfache an. Dies geschah schon am ersten Tag nach Induktion der Pankreatitis. Am 5. Tag fiel die Expression wieder nahezu auf Normalwerte ab, während sie am 7. Tag wieder auf das acht- bis zehnfache anstieg um bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes am 60. Tag hoch zu bleiben (Abbildung 14).

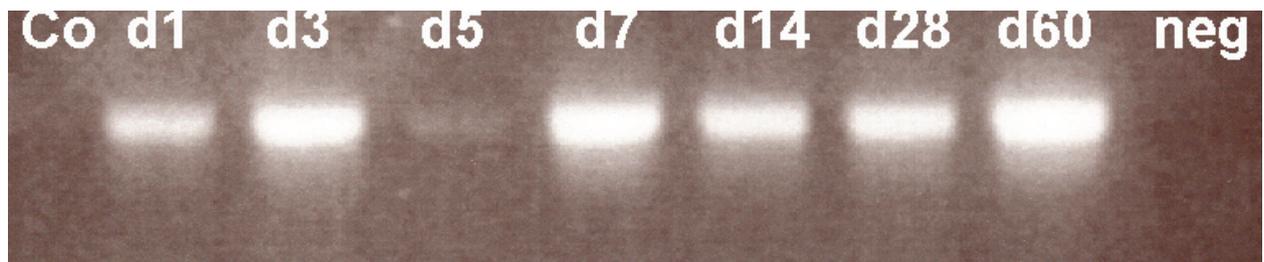


Abbildung 14: Agarose Gel Elektrophorese von PCR Produkten der TIMP 1 cDNA im Verlauf der DBTC Pankreatitis. d=Tage nach DBTC Gabe. M=Molekulargewichtsmarker. neg=Negativkontrolle Co=Kontrollprobe vom gesunden Pankreas.

3.4.2 Expression von TIMP-2

Die Expression von TIMP-2 stieg ähnlich der von MMP-2 im Verlauf nach DBTC-Gabe leicht an. Es zeigen sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede während des Beobachtungszeitraumes. (Abbildung 15)

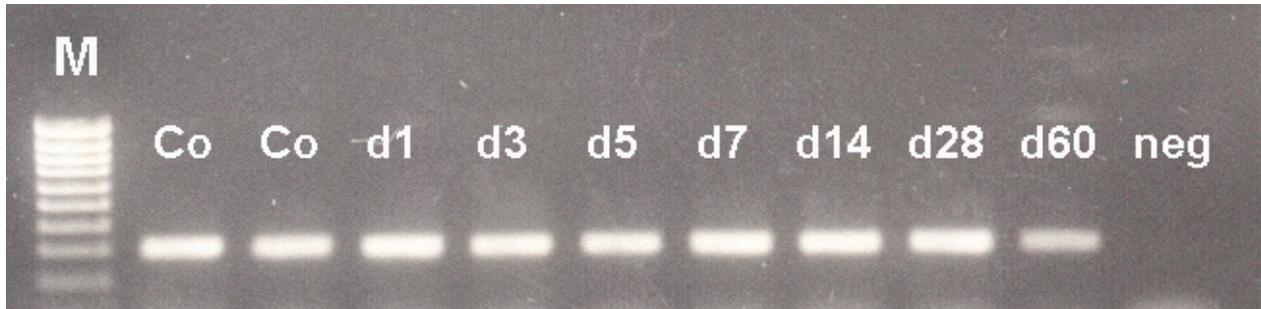


Abbildung 15: Agarose Gel Elektrophorese von PCR Produkten der TIMP 2 cDNA im Verlauf der DBTC Pankreatitis. d=Tage nach DBTC Gabe. M=Molekulargewichtsmarker. neg=Negativkontrolle Co=Kontrollprobe vom gesunden Pankreas.

3.5 MMP in pankreatischen Stellatezellen

Pankreatische Stellatezellen (PSC) spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis. Die Aktivierung von PSC ist unter anderem verbunden mit einer gesteigerten Expression von Kollagen und MMPs.

In der Zellkultur werden die pankreatischen Stellatezellen durch den Kontakt mit der Oberfläche der Zellkulturgefäße aktiviert. Sie beginnen zu proliferieren und ihre Fettspeicherveikel abzustößen. Dabei verlieren sie auch das darin gespeicherte Vitamin A und verändern ihre Morphologie.

Das MMP-9 Protein wird intrazellulär gebildet, in seiner Pro-Form sezerniert und dann extrazellulär aktiviert. Jeweils 3 und 7 Tage nach Ansetzen der Zellkultur wurde die Konzentration von aktiviertem MMP-9 im PSC-Kulturüberstand mit Hilfe der Zymografie gemessen.

Drei Tage nach Beginn der Zellkultur fand sich eine relativ hohe Aktivität an MMP-9 im Zellkulturüberstand der PSC.

Am 7. Tag der Zellkultur und somit nach der Aktivierung der PSC fiel die MMP-9 Aktivität im Kulturüberstand bei allen Proben deutlich ab. Dieses Ergebnis entsprach der Reduktion der MMP-9 Expression während der experimentellen Pankreatitis ab Tag 3 bis 7.

Die Aktivität von MMP-2 war im Zellüberstand der PSC gering. Sie änderte sich nicht nach Aktivierung der PSC (Abbildung 16).

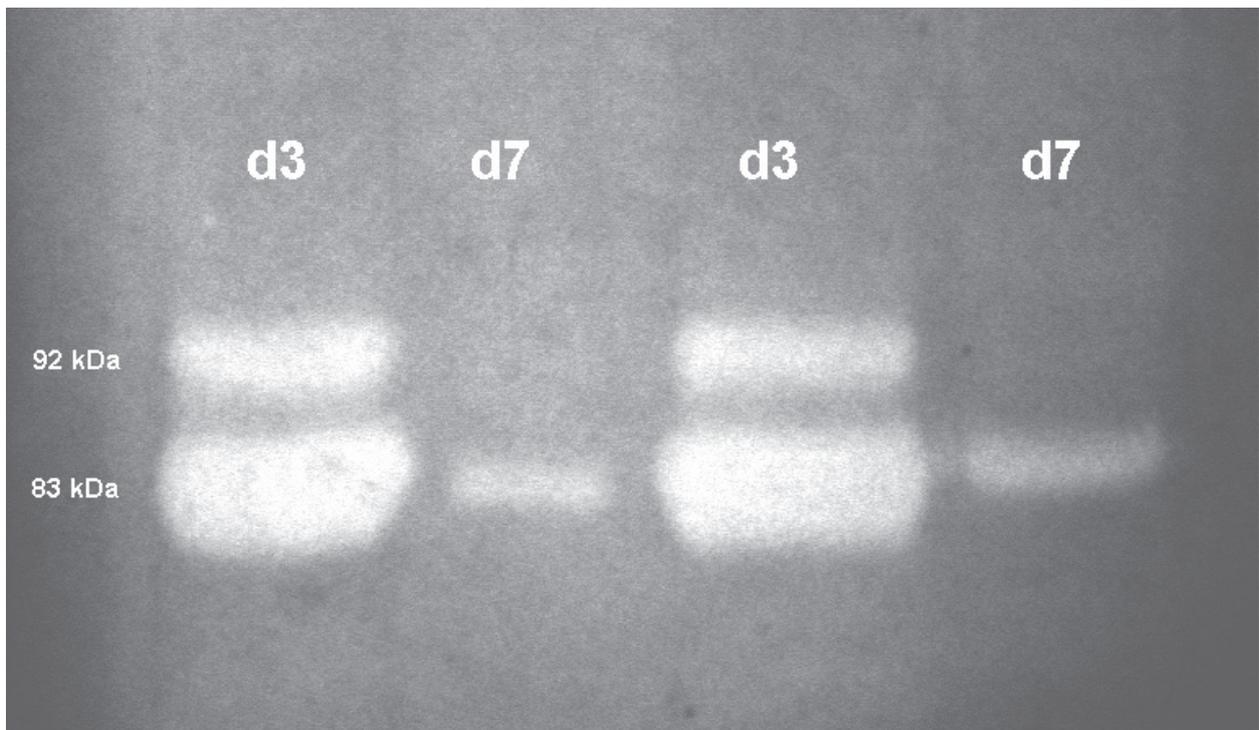


Abbildung 16: Zymografie des Zellüberstandes von pankreatischen Stellatezellen (PSC). *d*=Tage nach Ansetzen in Zellkultur. 92kDa=proMMP 9, 83kDa=aktiviertes MMP 9.

Zusätzlich wurden pankreatische Stellatezellen kultiviert, um im Verlauf der Aktivierung die RNA-Expression von MMP-9 zu erfassen. Die Expression von MMP-9 war bereits am ersten Tag der Zellkultur hoch und verblieb in dieser Ausprägung bis zum Tag 4 (Abbildung 17). An den folgenden Tagen fiel die RNA-Expression von MMP-9 deutlich ab.

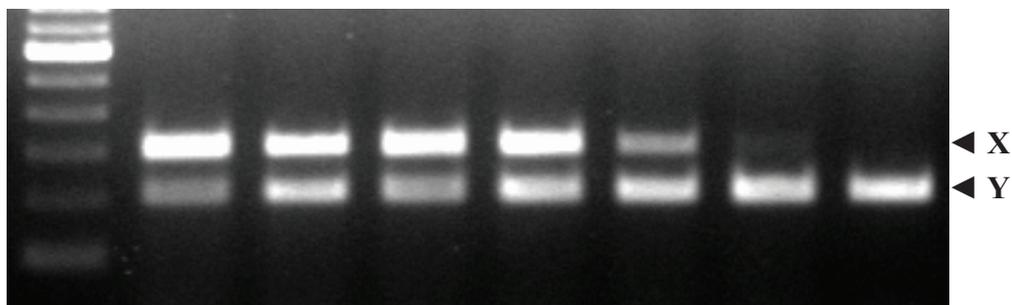


Abbildung 17: Agarose Gel Elektrophorese von PCR Produkten der MMP 9 cDNA in Pankreatischen Stellatezellen. Co amplifikation mit MMP 9 Kontrollfragment. *d*=Tage nach Ansetzen in Zellkultur. *M*=Molekulargewichtsmarker. *neg*=Negativkontrolle. *X*=cDNA, *Y*=Kontrollfragment. *n*=3

Parallel zum Nachweis der RNA-Expression von MMP-9 wurde die Expression von MMP-2 im Verlauf der PSC-Kultur analysiert. Im Untersuchungszeitraum veränderte sich die RNA-Expression von MMP-2 nicht (Abbildung 18). Es kann daher von einer konstitutiven Expression ausgegangen werden.

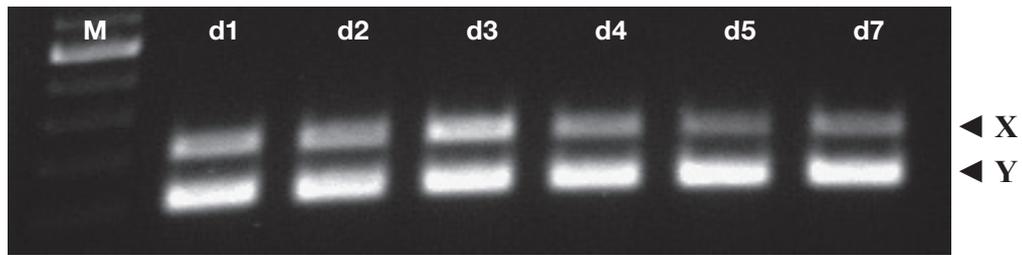


Abbildung 18: Agarose Gel Elektrophorese von PCR Produkten der MMP 2 cDNA in Pankreatischen Stellatezellen. Co amplifikation mit MMP 2 Kontrollfragment. d=Tage nach Ansetzen in Zellkultur. M=Molekulargewichtsmarker. X=cDNA, Y=Kontrollfragment. n=3

3.6 Statistik

Signifikanz bedeutet im statistischen Sinne, dass ein Resultat nicht mehr einem Zufall zugeschrieben werden kann. Wichtig ist nicht nur die statistische Signifikanz, sondern auch die praktische Relevanz.⁸⁵ Relevant war der Anstieg der Expression von MMP-9 am ersten Tag. Verglichen mit der Expression am Kontrollpankreas war dieser Wert statistisch signifikant ($p < 0.05$). Die Reduktion der Expression am Tag 5 führte zu Werten ähnlich der Kontrolle. Die erneute Zunahme der Expression von MMP-9 an den Tagen 7, 14 und 60 war signifikant verglichen mit dem Normalpankreas ($p < 0.05$).

Die Messung der Expression von MMPs wurde an einer kleinen Stichprobe durchgeführt (n = 5). Zur Berechnung der Signifikanz wurde der Wilcoxon-Paarvergleich benutzt.

4 Diskussion

4.1 Der Verlauf der DBTC-Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis beim Menschen ist eine Entzündung des Pankreasgewebes, die zu einer irreversiblen Schädigung und dem Untergang des exokrinen Pankreas führt. Gleichzeitig entwickelt sich eine ausgeprägte Organfibrose.^{86,87}

Die Fibrose ist ein besonderes Kennzeichen der chronischen Pankreatitis. Es kommt dabei zur Bildung und Ablagerung von Kollagenen und anderen Komponenten der ECM.^{88,89} Weiterhin ist die chronische Pankreatitis durch ein Entzündungsinfiltrat charakterisiert, welches hauptsächlich aus Lymphozyten und Makrophagen besteht.^{89,90}

Hauptsächlich wird ein chronischer Alkoholabusus als Ursache für die chronische Pankreatitis verantwortlich gemacht. Der Schädigungsmechanismus ist nicht vollständig geklärt. Die Pathogenese ist jedoch ein multifaktorielles Geschehen. Man geht von einer Nekrose-Fibrose-Sequenz aus. Die chronische Pankreatitis entwickelt sich über akute Schübe, bei denen sich autodigestiv Nekrosen bilden. Diese werden von Makrophagen resorbiert und durch Fibrose ersetzt. Die Fibrosen entstehen zunächst perilobulär und erfassen im fortgeschrittenen Stadium der Pankreatitis auch die Lobuli. Die Fibrosierung beeinträchtigt die Gefäßversorgung des Parenchyms. Der Fibrosierungsprozess verändert das Lumen der Pankreasgänge, so dass der Fluss des Pankreassekretes behindert wird. Es kommt zu einer Stagnation, die eine spontane Präzipitation des kalziumhaltigen Sekretes ermöglicht. Die so entstehenden Calculi verstärken die Behinderung des Sekretabflusses, so dass schließlich in den vorgeschalteten Lobuli die Azinuszellen verschwinden und durch eine intralobuläre Fibrose ersetzt werden.^{91,92}

Es ist kaum möglich, die Entstehung und den Verlauf der chronischen Pankreatitis am Menschen zu untersuchen. Das Pankreas ist bei der Diagnosestellung meist schon chronisch verändert. Auch ist es ethisch nicht vertretbar, aus Forschungszwecken eine Pankreaspunktion durchzuführen, die viele Risiken für den Patienten birgt. An einem humanen Pankreaspunktat ließe sich außerdem immer nur ein Ist-Zustand feststellen. Für eine Verlaufsbeschreibung ist es deshalb notwendig, die chronische Pankreatitis am Tiermodell zu untersuchen.

Zur Untersuchung der MMP-Expression bei der chronischen Pankreatitis wurde das Modell der DBTC-Pankreatitis gewählt. Nach Injektion von 8 mg/kg DBTC kam es zu einer massiven Einwanderung von Lymphozyten und Monozyten in das Pankreas, die an der Entzündungsreaktion beteiligt waren und während der chronischen Pankreatitis im Pankreas persistierten. Es entwickelte sich eine Dilatation des Ductus pancreaticus durch Obstruktion mit Zelldetritus und einer Stase des Pankreassekretes. HE-Schnitte des Pankreas zeigten eine Schädigung von exokrinem Pankreasgewebe und eine sich entwickelnde Fibrose, die über 60 Tage hinweg progredient war. Es wurden als Ersatz für das untergegangene Pankreasgewebe vermehrt Kollagen und Komponenten der extrazellulären Matrix produziert und abgelagert. Dieser Vorgang war irreversibel und führte im Verlauf zu einer ausgeprägten Fibrose des Pankreas mit Verlust der exokrinen Funktion. Im Finalstadium waren auch Inselzellen betroffen, so dass es auch zu einem Verlust der endokrinen Funktion und damit zu einem insulinabhängigen Diabetes mellitus kam.⁹³

Durch DBTC wird vermutlich zunächst eine akute Pankreatitis induziert, die nach 5-7 Tagen, in einen chronischen Prozess übergeht. Bei der Gabe von einer geringeren Menge DBTC (4 mg/kg) entwickelt sich eine akute interstitielle Pankreatitis, die eine vollständige restitutio et integrum zur Folge hat. Es kommt nicht zu einem chronischen Verlauf der Pankreatitis.⁹⁴

Das Modell der DBTC-Pankreatitis an der Ratte erfüllt die histologischen Kriterien einer chronischen Pankreatitis, wie sie auch beim Menschen vorkommt. Dieses Modell bietet damit eine gute Möglichkeit, an der Ratte die Pathogenese der chronischen Pankreatitis zu untersuchen.

In tierexperimentellen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass nach DBTC-Gabe die Expression von Kollagen zunimmt. Das gebildete Kollagen wird allerdings im Laufe der ersten zwei Wochen nicht im Gewebe abgelagert. Erst nach zwei Wochen ist eine Vermehrung des Bindegewebes und damit eine beginnende Fibrose nachzuweisen.⁹⁵ Der Grund für eine verzögerte Ablagerung von Kollagen könnte an einer nicht abgeschlossenen Proteinsynthese liegen, in der die Expression von Kollagen-RNA ansteigt, während die Translation in das Protein unterbleibt. Auch eine nicht stattfindende Aktivierung von pro-MMP9 zu aktiviertem MMP-9 wäre denkbar. Dies ist allerdings weniger wahrscheinlich, da Aktivatoren von MMP-9, zum Beispiel MMP-2, MT-MMP-1 und Trypsin,⁹⁶ vorhanden wären. Zusätzlich können sich MMPs untereinander selbst aktivieren.^{97,98,99} Das Ausbleiben der Kollagenablagerung in den ersten Tagen der experimentellen chronischen Pankreatitis ließe sich auch durch den sofortigen Abbau der Kollagene durch die im Gewebe vorhandenen MMPs erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von MMPs im Verlauf der chronischen Pankreatitis untersucht. MMPs und deren Inhibitoren spielen eine bedeutende Rolle im Aufbau, bei dem physiologischen und pathologischen Umbau, der Regulation und dem Abbau der extrazellulären Matrix.

4.2 MMP-9

4.2.1 MMP-9 aus Leukozyten

MMPs können von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden, die sowohl MMPs als auch TIMPs produzieren. Dazu zählen unter anderem Epithelzellen,^{100,101} Endothelzellen,¹⁰² Nervenzellen,^{103,104} Makrophagen¹⁰⁵ und neutrophile Granulozyten.¹⁰⁶ Eine steigende Anzahl von Untersuchungen belegte die Beteiligung immunkompetenter Zellen in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis.^{107,108,109}

Es ist bekannt, dass MMP-9 von neutrophilen Granulozyten,¹¹⁰ Monozyten und Makrophagen sezerniert wird.^{111,112} Neutrophile Granulozyten produzieren jedoch kein MMP-2.¹¹³ Unterdrückt wird die Produktion von MMP-9 unter anderem durch IL-4,¹¹⁴ IL-10¹¹⁵ und IF- β .¹¹⁶ Die Produktion kann gesteigert werden durch TNF- α , welches an Fibronectin gebunden ist.¹¹⁷ Die Anwesenheit von TGF- β unterdrückt die Expression.¹¹⁸ Bestimmte Matrixproteine, wie zum Beispiel SPARC (secreted protein acidic and rich in cystine), bilden einen ständigen Stimulus für Makrophagen zur Produktion von MMP-9. SPARC findet sich vor allem im Gewebe mit natürlicher Regeneration, wie zum Beispiel in der Darmmucosa oder heilenden Wunden. Auch ist es besonders häufig in Tumoren und fibrotischem Gewebe zu finden.¹¹⁹ Dies konnte unter anderem bei der Fibrose der

Leber gezeigt werden, ausgehend von den Ito-Zellen.¹²⁰ Da vermutet wird, dass die Fibrose in der Leber und im Pankreas ähnlich verläuft und von einer vergleichbaren Zellpopulation ausgeht, ist es möglich, dass SPARC auch in hohen Konzentrationen während der chronischen Pankreatitis exprimiert wird. Dazu liegen jedoch keine Daten vor.

Die Aufgabe von MMP-9 ist nicht nur die Regulation des Bindegewebes, sondern auch die Aktivierung und Regulation von immunomodulierenden Zytokinen. Ein gutes Beispiel für die Regulation ist die Aktivierung von IL-1 durch Proteolyse.¹²¹ Sie spielt eine entscheidende Rolle für die MMP-9 Produktion in Leukozyten, da aktiviertes IL-1 die MMP-9 Produktion erhöht.¹²²

Ein weiteres Beispiel ist die Potenzierung von bereits aktiven IL-8 durch MMP-9 mittels Abspaltung von sechs Aminosäuren am aminoterminalen Ende. Das daraus entstehende IL-8 hat eine zehnfach höhere Potenz zu Rezeptorbindung, Calcium signaling, Ausschüttung von MMP-9 aus Neutrophilen und Vermittlung von Chemotaxis. Diese Fähigkeit scheint MMP-2 nicht zu haben.¹²³

IL-8 ist in einer hohen Konzentration innerhalb der chronischen Pankreatitis vorhanden, während es im normalen Pankreas nicht nachzuweisen ist.^{124,125} Es ist anzunehmen, dass ein gleichzeitiges Auftreten von Zytokinen und MMP einen verstärkenden Effekt auf den Entzündungsvorgang innerhalb des Pankreas hat, unter anderem durch den potenzierenden Effekt, den MMP-9 auf das IL-8 ausübt. Die Induktion von MMP-9 durch IL-8 setzt wiederum eine Reaktion in Gang, die selbstverstärkend wirken kann.

4.2.2 Beziehung zwischen der Basalmembran und MMP-9

MMP-9 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regeneration der Basalmembran. Eine erhöhte Konzentration von MMP-9 oder eine Reduktion des Inhibitors TIMP-1 kann einen vermehrten Abbau der Basalmembran zur Folge haben. Dies führt zu einer gesteigerten Durchlässigkeit der Basalmembran wodurch Enzyme aus dem Pankreasgang leichter in das Interstitium eindringen können. Unterstützt wird dieser Vorgang durch eine Druckerhöhung innerhalb des Ductus pancreaticus, welche Folge einer Obstruktion des Ganges, u. a. durch Proteinpräzipitate ist.⁸⁷ Immunkompetente Zellen haben ebenfalls die Fähigkeit MMP-9 und TIMP-1 zu bilden. Damit sind sie in der Lage von der Blutbahn ausgehend die Basalmembran der Gefäße zu durchbrechen, um weiter in das Interstitium einwandern zu können.^{126,127,128} Eine erhöhte Durchlässigkeit der Basalmembran erleichtert damit immunkompetenten Zellen die Einwanderung aus der Blutbahn in das Pankreas und verstärkt die Entzündungsreaktion.

4.3 Synthese von MMP-9 in PSC

Bei Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Pankreatitis sind die so genannten pankreatischen Stellatezellen (PSC) in den Vordergrund gerückt. Die PSC werden inzwischen als wesentlicher Pathogenesefaktor für die Fibrose des Pankreas betrachtet.^{9,129} Sie haben die gleiche Eigenschaft wie HSC, sich von ruhenden, retinoid-speichernden Zellen zu aktiven und kollagenproduzierenden Zellen zu entwickeln.^{48,130,131} Diese Aktivierung kann durch mehrere Zellen und Mediatoren vermittelt werden. Dazu gehören aktivierte Makrophagen,¹³² Tumor growth factor- β (TGF- β),¹³³ und Platelet-derived growth factor (PDGF).¹³⁴ Im Entzündungsprozess der Pankreatitis werden PSC unter anderem durch TGF- β aktiviert.

Durch Präparation und Kultivierung *in vitro* wurden PSC aktiviert.¹³⁵ In den kultivierten PSC war die Expression von MMP-9 auf RNA-Ebene gut nachweisbar. Im Verlauf der Aktivierung nahm diese Expression ab. Drei Tage nach PSC Präparation fand sich eine hohe Konzentration von MMP-9 im Kulturmedium, wie die Ergebnisse der Zymografie zeigten. Sieben Tage nach Präparation sank die Konzentration von MMP-9 in der Nährlösung erheblich ab. Somit führt die Aktivierung der PSC zunächst zur Expression von MMP-9 auf RNA- und auf Proteinebene, die jedoch im weiteren Verlauf der Kultivierung deutlich abnimmt.

In vielen Studien wird die MMP-Produktion gemessen, die jedoch keine Aussage darüber zulässt, wie viel aktives MMP wirklich vorhanden ist. Auch die Zymografie zum Nachweis des aktivierten Enzyms ist keine absolut zuverlässige Methode die interstitielle Aktivität von MMP zu messen. Wenn MMPs an TIMPs gebunden werden, sind sie *in vivo* inaktiv. Durch das in der Zymografie-elektrophorese verwendete Natriumdodecylsulfat, dissoziiert der MMP-TIMP-Komplex wieder.¹⁴¹ MMP liegt wieder ungebunden vor. Dies kann über die Proteaseaktivität einen falschen Eindruck vermitteln, da die Aktivität des MMP-9 gemessen wird, welches vorher möglicherweise durch TIMP-1 inaktiviert war. Die Gesamtaktivität von produziertem MMP-9 ist allerdings messbar.

4.4 RNA-Expression von MMP-9 bei der chronischen DBTC-Pankreatitis

Wie gezeigt werden konnte, stieg die Expression von MMP-9 während der experimentellen chronischen Pankreatitis unmittelbar nach der DBTC-Applikation an. Nach etwa einer Woche verringerte sich die Expression, um danach wieder auf ein hohes Niveau anzusteigen, welches bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes persistierte. Der Anstieg von MMP-9 innerhalb der ersten Tage könnte verantwortlich dafür sein, dass in den ersten zwei Wochen keine vermehrte Kollagenablagerung im entzündeten Pankreas festgestellt werden konnte.

Der Anstieg von MMP-9 bei der chronischen Pankreatitis entsprach anderen Untersuchungen an Modellen der akuten Pankreatitis. Zum Beispiel wurde eine vermehrte Enzymaktivierung von MMP-2 und MMP-9 in der Peritonealflüssigkeit und im Lungengewebe von Ratten gefunden, bei denen eine akute Pankreatitis mittels retrograder Injektion von Natrium Taurocholate in den Pankreasgang induziert wurde. In dieser Studie wurden systemische Komplikationen und Lungenversagen bei schwerer akuter Pankreatitis analysiert.¹³⁶ Das Pankreas wurde dabei nicht untersucht. Dies zeigt den Einfluss, den MMPs auf andere, das Pankreas nicht direkt betreffende Organe haben.

Histologisch fand sich im Verlauf der chronischen DBTC-Pankreatitis 5 bis 7 Tage nach der Induktion eine Lymphozyteninfiltration im Pankreas. Die Expression von lymphozytären Zytokinen, wie IL-2 und IFN γ stieg auch erst ab diesem Zeitraum an.¹³⁷ Bei den durchgeführten Untersuchungen nahmen die Konzentration von MMP-9 und die Leukozyteninfiltration in der DBTC-Pankreatitis ebenfalls ab Tag 7 wieder zu und blieben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes auf hohem Niveau. Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen MMP-9 und der Leukozyteneinwanderung während der DBTC-Pankreatitis schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der MMPs und TIMPs innerhalb des chronisch entzündlich veränderten Pankreas erfasst. Daher war es nicht möglich, die MMP-Expression der einzelnen Zellpopulationen getrennt zu analysieren. Die vermehrte Expression von MMP-9 kann

somit sowohl durch die Stellatezellen als auch durch die vermehrte Einwanderung von Leukozyten bedingt sein. Wesentliche Zielstruktur von MMP-9 ist das Kollagen IV in den Basalmembranen. MMP-9 könnte die Durchlässigkeit der Basalmembranen für einwandernde Leukozyten erhöhen, die wiederum MMP-9 produzieren. MMP-9 hilft Leukozyten bei der Migration in das Gebiet einer Entzündung als Antwort auf eine Chemotaxis.¹³⁸ Somit würde ein sich selbst verstärkender Effekt hinsichtlich der Leukozyteninfiltration vorliegen. Gleichzeitig fördert die Degradation der Basalmembran die pathologische Ablagerung von Kollagenen.¹³⁹

Es wurde nachgewiesen, dass sich nach Induktion der DBTC-Pankreatitis Makrophagen vermehrt im Pankreas befinden. Die Makrophagenzahl erreichte ihren Höhepunkt am Tag 3. Es folgt eine Reduktion auf nahezu normale Werte am Tag 5 und ein darauf folgender Anstieg bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 60 Tagen.¹⁴⁰ Diese Kurve korreliert mit der Expression von MMP-9 und TIMP-1, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Offenbar sind auch Makrophagen am Anstieg von MMP-9 im Beobachtungszeitraum beteiligt. Makrophagen produzieren MMP-9 immer in Kombination mit TIMP-1.¹⁴¹ Der Verlauf der Expression von TIMP-1 innerhalb der experimentellen Pankreatitis ließe sich so auch erklären.

4.5 RNA-Expression von MMP-2, MMP-3, TIMP-1 und TIMP-2 bei der chronischen DBTC-Pankreatitis

Die Expressionen von MMP-2 und TIMP-2 wiesen keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der experimentellen chronischen Pankreatitis auf. Ein nahezu paralleler Verlauf zur Expression von MMP-9 zeigte sich bei der Expression von TIMP-1.

TIMP-1-Expression und -Sekretion konnte bei PSC nicht nachgewiesen werden.¹⁴² Allerdings kam es zu einer signifikanten Erhöhung der TIMP-1-Expression im Verlauf der experimentellen chronischen Pankreatitis. Das Vorhandensein einer gesteigerten TIMP-1-Expression im Verlauf der chronischen Pankreatitis und die fehlende Produktion von TIMP-1 in aktivierten PSC zeigt, dass PSC nicht selbst in der Lage sind, das interzellulär anfallende MMP-9 zu hemmen. In Makrophagen werden MMP-9 und TIMP-1 immer in Kombination produziert.¹⁴¹ Es ist anzunehmen, dass der in dieser Arbeit gemessene Anstieg von TIMP-1 zu einem großen Teil den Makrophagen zuzuschreiben ist.

PSC produzieren im Gegensatz zu den hepatischen Stellatezellen kein TIMP-1. Möglicherweise soll die Leukozyteninfiltration im Pankreas gegenüber der Leber erleichtert werden. Dazu sind jedoch keine Daten bekannt.

MMP-9 wurde hochreguliert, während die Hochregulierung von MMP-2 ausblieb. Dies ist möglicherweise auch durch die unterschiedliche Aktivierung durch Zytokine zu erklären. Verschiedene Zytokine beeinflussen unterschiedlich die MMP-Expression, obwohl MMP-2 und MMP-9 das gleiche Substrat als Zielstruktur haben. Unter TNF- α wird MMP-9 vermehrt exprimiert. Auf die MMP-2-Expression hat TNF- α keinen Effekt.^{142,143} PSC wurden *in vitro* erfolgreich durch TNF- α stimuliert. TNF- α kann durch Hochregulierung von MMP-9 einen Einfluss auf die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis haben.

Eine Expression von MMP-3 konnte in der vorliegenden Arbeit weder bei Kontrollpankreatita,

noch bei chronischer Pankreatitis nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen am humanen Pankreas.¹⁴⁴

4.6 Schlussfolgerungen

Die Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 auf RNA-Ebene im Pankreasgewebe wurde im Verlauf der durch DBTC induzierten chronischen Pankreatitis der Ratte untersucht. Zusätzlich konnte die MMP-9-Expression und -Sekretion von PSC im Verlauf der Aktivierung gezeigt werden. Fibroblasten sind dazu nicht in der Lage.¹⁴⁵ Dabei handelt es sich um einen wichtigen Unterschied zwischen Fibroblasten und PSC.

Während MMP-3 im geschilderten Versuchsansatz nicht nachweisbar war, blieb die Expression von MMP-2 und TIMP-2 im Verlauf der chronischen Pankreatitis weitgehend unverändert. Auffällig war ein charakteristischer Verlauf der MMP-9- und der TIMP-1-Expression während der tierexperimentellen Pankreatitis.

Eine Aktivierung der PSC mit gleichzeitiger Expressionssteigerung von MMP-9 könnte möglicherweise ein Schlüsselauslöser für die chronische Pankreatitis sein. Es kommt zunächst zu einer akuten Entzündung des Pankreas mit Kollagenbildung. Das Kollagen wird zu Beginn der chronischen Pankreatitis allerdings noch abgebaut unter Beteiligung des vermehrt gebildeten MMP-9. Die Expression von MMP-9 durch die aktivierten PSC nimmt im weiteren Verlauf der Pankreatitis bis zum 5. Tag wieder ab. Die im gewählten Tiermodell persistierende Obstruktion des Gallen-Pankreasganges stellt jedoch einen anhaltenden Stimulus der Entzündung dar. Zunehmend wandern Makrophagen in das Pankreasgewebe ein. Die anhaltende Expression von MMP-9 durch PSC, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten führt zur Destabilisierung der Basalmembran. Daraufhin kommt es zu einer Einschwemmung von Pankreasenzymen in das Interstitium, die dort aktiviert werden. Dies führt wiederum zu einer vermehrten Leukozyteninfiltration, Zytokin- und auch MMP- Freisetzung. Somit verstärkt sich der Entzündungsprozess im weiteren Verlauf selbst.

Die Pathogenese der chronischen Pankreatitis ist insgesamt zu komplex, um sie allein auf Wechselwirkungen von MMPs und TIMPs zurückführen zu können. Der Verlauf der MMP-9-Expression im tierexperimentellen Modell weist jedoch auf einen interessanten Ansatzpunkt für neue therapeutische Strategien hin.

5 Thesen

- 1) Bei der chronischen Pankreatitis handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung mit irreversibler Schädigung des Pankreasgewebes. Charakteristisch ist der fibrotische Umbau des Pankreasgewebes, der über mehrere Jahre in Schüben verlaufen kann. Häufig ist ein chronischer Alkoholabusus die Ursache der Erkrankung.
- 2) Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs), im Verlauf einer tierexperimentellen chronischen Pankreatitis.
- 3) Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) spielen eine Schlüsselrolle bei dem physiologischen und pathologischen Umbau der extrazellulären Matrix. Sie sind im menschlichen Körper ubiquitär vorhanden und stehen miteinander im Gleichgewicht. Ein Überschuss von Matrix Metalloproteinasen ermöglicht einen verstärkten Abbau von extrazellulärer Matrix. Ein Mangel an Matrix Metalloproteinasen kann zu verstärkter Matrixablagerung und zur Fibrose des umliegenden Gewebes führen.
- 4) Aktivierte pankreatische Stellatezellen (PSC) sind die wichtigsten Produzenten der Extrazellulären Matrixproteine (ECM) im Pankreas. Ihnen kommt eine wesentliche Rolle bei der Fibrogenese im Rahmen der chronischen Pankreatitis zu.
- 5) Da humanes Pankreasgewebe für Verlaufsuntersuchungen bei der chronischen Pankreatitis nicht zur Verfügung steht, sind tierexperimentelle Arbeiten erforderlich. Als Modell wurde die durch Dibutylzinn-Dichlorid (DBTC) induzierte chronische Pankreatitis der Ratte gewählt.
- 6) Zur Untersuchung der Expression von MMPs und TIMPs im Verlauf der DBTC-Pankreatitis wurden die Tiere an den Tagen 1, 3, 5, 7, 14, 28 und 60 nach Induktion der Pankreatitis zur Entnahme des Pankreasgewebes getötet.
- 7) Analysiert wurde die RNA-Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 im Pankreasgewebe der Ratte. Die Analyse der Expression von MMPs und TIMPs erfolgte mit Hilfe der Kompetitiven Polymerase Kettenreaktion.
- 8) In einem weiteren Versuchsansatz wurden PSC der Ratte isoliert und kultiviert. Im Verlauf der während der Kultivierung stattfindenden Aktivierung der Zellen konnte die Expression von MMP-2 und MMP-9 auf RNA-Ebene in den Zellen untersucht werden. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Zymografie im Zellkulturüberstand die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 erfasst.
- 9) Im Verlauf der DBTC-Pankreatitis zeigte sich ein Anstieg der MMP-9-Expression, die am Tag 3 einen Höhepunkt erreichte und bis zum Tag 5 nahezu auf den Normalwert abfiel. Danach stieg die RNA-Expression erneut bis über das 20-fache der Normalwerte an. Diese Erhöhung persistierte bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes.
- 10) Bei der chronischen DBTC-Pankreatitis war der Verlauf der RNA-Expression von TIMP-1 im

Pankreas dem Verlauf der MMP-9-Expression sehr ähnlich. Einem initialen Anstieg folgte die Reduktion und eine erneute ausgeprägte Zunahme.

- 11) Die Expression von MMP-2 und TIMP-2 blieb im Beobachtungszeitraum weitgehend unverändert. MMP-3 konnte nicht nachgewiesen werden.
- 12) Pankreatische Stellatezellen durchlaufen während der Kultivierung einen Aktivierungsprozeß, der in einen myofibroblastären Phänotyp mündet. Die anfänglich deutliche RNA-Expression von MMP-9 verringert sich im Verlauf des Aktivierungsprozesses. Parallel dazu konnte am Tag 3 nach der Zellisolierung eine hohe Aktivität von MMP-9 im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Am Tag 7 sank diese Aktivität deutlich ab.
- 13) In pankreatischen Stellatezellen waren die RNA-Expression und die Produktion von MMP-2 gering und blieben auch unverändert während der Aktivierung der Zellen.
- 14) Da die MMP- und TIMP-Expression im Gewebe untersucht wurde, konnte deren Synthese in den einzelnen Zellpopulationen nicht differenziert werden. Es sind nur indirekte Schlussfolgerungen hinsichtlich der Herkunft von MMP-9 und TIMP-1 möglich. Sowohl PSC als auch Makrophagen und neutrophile Granulozyten können MMP-9 produzieren.
- 15) Aktivierte pankreatische Stellatezellen synthetisieren in beträchtlichem Maße MMP-9. Dies begünstigt möglicherweise die Infiltration immunokompetenter Zellen in das Pankreas, welche zu einer Verstärkung und zur Chronifizierung der Pankreatitis beiträgt.
- 16) An der Expression von MMP-9 und von TIMP-1 sind offenbar Makrophagen wesentlich beteiligt. Auch Ergebnisse anderer Untersuchungen sprechen für eine wesentliche Rolle dieser Zellen bei der Fibrogenese.
- 17) Die beschriebenen Ergebnisse weisen auf Ansatzpunkte neuer therapeutischer Strategien hin, auch wenn sich die komplexe Pathogenese der chronischen Pankreatitis nicht allein auf die Wechselwirkungen von MMPs und TIMPs zurückführen lässt.

6 Abkürzungsverzeichnis

APACHE	Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
cDNA	Copy DNA
CT	Computertomographie
DBTC	Dibutylzinndichlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERCP	Endoskopische Retrograde Cholezysto-pakreatikoskopie
HSC	Hepatische Sternzellen
KF	Kontrollfragment
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOPS	3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MT-MMP	Membrantype MMP
PCR	Polymerase-chain-reaction
PSC	Pankreatische Stellatezellen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	RNA spaltende Enzyme
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat
SMA	Smooth muscle actin
SPARC	Secreted Protein acidic and Rich in Cystine
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Tumor Growth Factor beta
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
tRNA	Transport Ribonukleinsäure

7 Literatur

- 1 **Büchler M, Uhl W, Malfertheiner P.** Pankreaserkrankungen. *Basel: Karger* 1996. ISBN 3-8055-6141-5
- 2 **Lankisch PG.** Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease. *Digestion* 54:148-55 (1993)
- 3 **Vu TH, Werb Z.** Matrix Metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Dev* 14:2123-33 (2000)
- 4 **Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z.** Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122:1723-36 (1996)
- 5 **Terada T, Okada Y, Nakanuma Y.** Expression of matrix ptoteinases during human intra-hepatic bile duct development. *Am J Path* 147:1207-13 (1995)
- 6 **Wysocky AB, Staiano-Coico L, Grinell F.** Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 amd MMP-9. *J Invest Dermatol* 101:64-68 (1993)
- 7 **Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester JV, Wang M, Welgus HG, Shipley JM, Senior RM, Fini ME.** Matrix Metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem* 18:2065-72 (2002)
- 8 **Curran S, Murray GI.** Matrix Metalloproteinases: Molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36:1621-30 (2000)
- 9 **Bachem MG, Zhou Z, Zhou S, Siech M.** Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 3:92-6 (2006)
- 10 **Corfield AP, Cooper MJ, Williamson RC, Mayer AD, McMahon MJ, Dickson AP, Shearer MG, Imrie CW.** Prediction of severity in acute pancreatitis: Prospective comparison of three prognostic indices. *Lancet* 2:403 (1985)
- 11 **Cowen JS, Kelley MA.** Predicting intensive care unit outcome: Errors and bias in using predictive scoring systems. *Crit Care Clin* 10:53-72 (1994)
- 12 **Lankisch PG, Büchler M, Mössner J, Müller-Lissner S.** A primer of pancreatitis. *Berlin: Springer* 1997. ISBN 3-540-63259-X
- 13 **Pitchumoni CS.** Chronic pancreatitis: a historical and clinical sketch of the pancreas and pancreatitis. *Gastroenterologist* 6:24-33 (1998)

- 14 **Tinto A, Lloyd DA, Kang JY, Majeed A, Ellis C, Williamson RC, Maxwell JD.** Acute and chronic pancreatitis--diseases on the rise: a study of hospital admissions in England 1989/90-1999/2000. *Aliment Pharmacol Ther* 16:2097-105 (2002)
- 15 **Ammann RW, Muellhaupt B.** Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. *Gut* 35:552-6 (1994)
- 16 **Ammann R.** [Clinical aspects, spontaneous course and therapy of chronic pancreatitis. With special reference to the problem of nomenclature] *Schweiz Med Wochensch* 119:696-706 (1985)
- 17 **Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Nakae Y, Kondo T, Hayakawa T.** Chronic pancreatitis: overview of medical aspects. *Pancreas* 16:323-8 (1998)
- 18 **Strate T, Knoefel WT, Yekebas E, Izbicki JR.** Chronic pancreatitis: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Int J Colorectal Dis* 18:97-106 (2003)
- 19 **Etemad B, Whitcomb DC.** Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 120:682-707 (2001)
- 20 **Elsässer HP, Adler G, Kern HF.** Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 1:421-9 (1986)
- 21 **Menke A, Yamaguchi H, Gress TM, Adler G.** Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor β 1 in pancreatitis in the rat. *Gastroenterology* 113:295-303 (1992)
- 22 **Gress T, Müller-Pillasch F, Elsässer HP, Bachem M, Ferrara C, Weidenbach H, Lersch M, Adler G.** Enhancement of transforming growth factor β 1 expression in the rat pancreas during regeneration from cerulin-induced pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 24:679-85 (1994)
- 23 **Elsässer HP, Adler G, Kern HF.** Fibroblast structure and function during regeneration from hormone-induced acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 4:169-78 (1989)
- 24 **Elsässer HP, Haake T, Grimmig M, Adler G, Kern HF.** Repetitive cerulein-induces pancreatitis and pancreatic fibrosis in the rat. *Pancreas* 7:385-90 (1992)
- 25 **Lampel M, Kern HF.** Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 11:97-117 (1977)
- 26 **Saluja A, Hofbauer B, Yamaguchi Y, Yamanaka K, Steer M.** Induction of apoptosis reduces the severity of caerulein-induced pancreatitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 220:875-8 (1996)
- 27 **Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS.** Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient

- diet. *Am J Pathol* 79:465-80 (1975)
- 28 **Aho HJ, Nevalainen TJ.** Experimental pancreatitis in the rat. Light and electron microscopical observations on early pancreatic lesions induced by intraductal injection of trypsin, phospholipase A2, lysolecithin and non-ionic detergent. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 40:347-56 (1982)
 - 29 **Ferrie MM, O'Hare R, Joffe SN.** Acute and chronic pancreatitis in the rat caused by a closed duodenal loop. *Digestion* 18:280-5 (1978)
 - 30 **Kataoka K, Sasaki T, Yorizumi H, Sakagami J, Kashima K.** Pathophysiologic studies of experimental chronic pancreatitis in rats induced by injection of zein-oleic acid-linoleic acid solution into the pancreatic duct. *Pancreas* 16:289-99 (1998)
 - 31 **Bockmann DE, Merlino G.** Cytological changes in the pancreas of transgenic mice overexpressing transforming growth factor- α . *Gastroenterology* 103:1883-92 (1992)
 - 32 **Sandgren EP, Luettker NC, Palmiter RD, Brinster RL, Lee DC.** Overexpression of TGF α in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia and carcinoma of the breast. *Cell* 61:1121-35 (1990)
 - 33 **Wagner M, Menke A, Bachem MG, Lührs H, Adler G, Schmid R.** Kinetics of extracellular matrix formation and transdifferentiation in transgenic mice overexpressing transforming growth factor α in the exocrine pancreas. *Gastroenterology* 112:A492 (1997)
 - 34 **Greten FR, Wagner M, Weber CK, Zechner U, Adler G, Schmid RM.** TGF α transgenic mice. A model of pancreatic cancer development. *Pancreatology* 1:363-8 (2001)
 - 35 **Savito F, Nichols A, Herrera PL, Huarte J, Wohlwend A, Vassalli JD, Orchi L.** TGF- β 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF- α triggers insulin-dependent diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 217:1279-86 (1995)
 - 36 **Lee MS, Gu D, Feng L, Curriden S, Arnush M, Krahl T, Gurushanthaiah D, Wilson C, Loskutoff DL, Fox H, Sarvetnik N.** Accumulation of extracellular matrix and developmental dysregulation in the pancreas by transgenic production of transforming growth factor- β 1. *Am J Pathol* 147:42-52 (1995)
 - 37 **Vogelmann R, Ruf D, Wagner M, Adler G, Menke A.** Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGF- β 1 transgenic mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G164-G172 (2001)
 - 38 **Böttlinger EP, Jakubczak JL, Roberts ISD, Mumy M, Hemmati P, Bagnall K, Merlino G, Wakefield LM.** Expression of a dominant-negative mutant TGF β type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF β in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *EMBO J* 16:2621-33 (1997)

- 39 **Puig-Divi V, Molero X, Salas A, Guarner F, Guarner L, Malagelada JR.** Induction of chronic pancreatitis disease by trinitrobenzene sulfonic acid infusion into rat pancreatis ducts. *Pancreas* 13:417-24 (1996)
- 40 **Merkord J, Henninghausen G.** Acute pancreatitis and bile duct lesions in rat induced by dibutyltin dichloride. *Exp Pathol* 36:59-62 (1989)
- 41 **Merkord J, Weber H, Sparmann G, Jonas L, Henninghausen G.** The course of pancreatic fibrosis induced by dibutyltin dichloride. *Ann N Y Acad Sci* 800:231-7 (1999)
- 42 **Sparmann G, Merkord J, Jaschke A, Nizze H, Jonas L, Löhr M, Liebe S, Emmrich J.** Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology* 122:1664-72 (1997)
- 43 **Löhr M, Spies B, Heptner G, Domschke G, Hahn EG.** Parameter des Bindegewebsstoffwechsels als Marker bei akuter und chronischer Pankreatitis. *Z Gastroenterol* 29:231-6 (1991)
- 44 **Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA.** Transforming growth factor- β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6642-6 (1991)
- 45 **Castilla A, Prito J, Fausto N.** Transforming growth factor β 1 and α in chronic liver disease: effects of interferon α therapy. *N Engl J Med* 324:933-40 (1991)
- 46 **Sparmann G, Behrend S, Merkord J, Kleine H, Graser E, Ritter T, Liebe S, Emmrich J.** Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Dig Dis Sci* 46:1647-56 (2001)
- 47 **Gress TM, Menke A, Bachem MG, Muller-Pillasch F, Ellenrieder V, Weidenbach H, Wagner M, Adler G.** Role of extracellular matrix in pancreatic diseases. *Digestion* 59:625-37 (1998)
- 48 **Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G.** Identification, culture and characterisation of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115:421-32 (1998)
- 49 **Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y, Nagase H.** Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early pregnancy* 1:263-9 (1995)
- 50 **Rodgers WH, Matrisan LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG.** Pattern of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 94:946-53 (1994)
- 51 **Dochtery AJ, Murphy G.** The tissue metalloproteinases family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann Rheum Dis* 49:469-79 (1990)

- 52 **Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM.** Matrix Metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18:1135-49 (2000)
- 53 **Woessner J Jr.** The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 732:11-21 (1994)
- 54 **Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI.** Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270:5331-38 (1995)
- 55 **Knäuper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G.** Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271:17124-31 (1996)
- 56 **He C, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldber GI.** Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2632-6 (1989)
- 57 **Sang QX, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE.** Proteolytic and non-proteolytic actiation of human neutrophil progelatinase. *Biochem Biophys Acta* 1251:99-108 (1995)
- 58 **Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolutio, structure and function. *Biochem Biophys Acta* 1477:267-83 (2000)
- 59 **Ponton Am Coulumbe B, Skup D.** Decreased expression of tissue inhibitor of the metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity. *Cancer Res* 51:2138-43 (1991)
- 60 **Chang YC, Yang SF, Tai KW, Chou MY, Hsieh YS.** Increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and inhibition of gelatinase A activity in buccal mucosal fibroblasts by arecoline as possible mechanisms for oral submucous fibrosis. *Oral Oncol* 38:195-200 (2002)
- 61 **Evans JD, Kawesha A, Ghaneh P, Neoptolemos JP.** Metalloproteinases and stromal biology in cancer. / in **Johnson CD, Imrie CW [eds.]** *Pancreatic Disease: towards the year 2000* :281-297 London: Springer 1999. ISBN 1-85233-037-6
- 62 **Valderrama R, Navarro S, Lopez JM, Caballeria J, Gimenez A, Parez A, Adrian MJ, Fernandez-Cruz L, Teres J.** Synthesis and degraation of collagen in pancreatic fibrogenesis. *Pancreas* 18:34-8 (1999)
- 63 **Gress TM, Menke A, Bachem MG, Muller-Pillasch F, Ellenrieder V, Weidenbach H, Lerch MM, Adler G.** Role of extracellular matrix in pancreatic diseases. *Digestion* 59:625-37 (1998)
- 64 **Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Steward NL, Crawford DH, Pirola**

- RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS.** Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 155:1087-95 (1999)
- 65 Casini A, Galli A, Pignalosa P, Frulloni L, Grappone C, Milani S, Pederzoli P, Cavallini G, Surrenti C.** Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) colocalizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J Pathol* 192:81-9 (2000)
- 66 Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S.** Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut* 51:579-84 (2002)
- 67 Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS.** Periacinar stellate cells in rat pancreas: Identification, isolation, and culture. *Gut* 43:128-33 (1998)
- 68 Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G.** Identification, culture, and characterisation of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 155:421-32 (1998)
- 69 Gressner AM.** Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 22:28-36 (1995)
- 70 Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Folsch UR, Schmidt WE.** TGF- β 1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul Pept* 90:47-52 (2000)
- 71 Merkord J, Hennighausen G.** Acute pankreatitis and bile duct lesions in rat induced by dibutyltin dichloride. *Exp Pathol* 36:59-62 (1989)
- 72 Merkord J, Jonas L, Henninghausen G.** Morphological lesions of pancreas and bile ducts in rats induced by dibutyltin dichloride. *Arch Toxicol* (Suppl 14):75-79 (1991)
- 73 Sparmann G, Jäschke A, Loehr M, Liebe S, Emmrich J.** Tissue Homogenization as a key Stepp in extracting RNA from human and rat pancreatic tissue. *BioTechniques* 22:408-12 (1997)
- 74 Chomczinski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9 (1987)
- 75 Wells GMA, Catlin G, Cossins JA, Mangan M, Ward GA, Miller KM, Clements JM.** Quantification of Matrix Metalloproteinases in Cultured Rat Astrocytes Using the Polymerase Chain Reaction With a Multi-Competitor cDNA Standard. *GLIA* 18:331-340 (1996)
- 76 Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* 7:1513-23 (1979)

- 77 **Birnboim HC.** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100:243-55(1983)
- 78 **Mullis K, Faloona F, Schaff D, Saiki R, Horn G, Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:263-73 (1986)
- 79 **Mullis K, Faloona F.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50 (1987)
- 80 **Siegling A, Lehmann M, Platzer C, Emmrich F, Volk HD.** A novel multispecific fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J Immunol Methods* 177:23-8 (1994)
- 81 **Nishiura T, Abe K.** Postnatal changes of gene expression for tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and 2 and cystatins S and C, in rat submandibular gland demonstrated by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 44:15-26 (1999)
- 82 **<http://eatworms.swmed.edu/~tim/primerfinder>** 30.November 1998
- 83 **Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Prola RC, Wilson JS.** Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation and culture. *Gut* 43:128-33 (1998)
- 84 **Kiernan JA.** *Histological & Histochemical Methods: Theory and Praxis.* New York: Pergamon Press 1981. ISBN 0-08-024936-1:81-2
- 85 **Kundt G, Krenz H.** Medizinische Biometrie. Skript zur Vorlesung SS99. Institut für Medizinische Informatik und Biometrie. Uni Rostock (1999)
- 86 **Di Magno EP, Layer P, Clain JE.** Chronic Pancreatitis. *The Pancreas: Biology, Pathology and Disease.* [Eds: Go VLW, Di Mangno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA] 2nd edit. Raven Press New York:665-706 (1993)
- 87 **Braganza JM.** The pathogenesis of chronic pancreatitis. *QJM* 89:243-50 (1996)
- 88 **Etemad B, Whitcomb DC.** Chronic pancreatitis: diagnosis, classification and new genetic developments. *Gastroenterology* 120:682-707 (2001)
- 89 **Klöppel G, Malliet B.** Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 8:659-70 (1993)
- 90 **Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Lühr M, Liebe S.** Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion* 59:192-98 (1998)

- 91 **Klöppel G, Sipos B, Lüttges J.** Das Spektrum der chronischen Pankreatitis. *Pathologie* 26:59-66 (2005)
- 92 **Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS.** Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy. *Gastroenterology* 132:1557-73 (2007)
- 93 **Merkord J, Weber H, Sparmann G, Jonas L, Henninghausen G.** The course of pancreatic fibrosis induced by dibutyltin dichloride (DBTC). *Ann N Y Acad Sci* 880:231-37 (1999)
- 94 **Merkord J, Henninghausen G.** Acute pancreatitis and bile duct lesions in rat induced by dibutyltin dichloride. *Exp Pathol* 36:59-62 (1989)
- 95 **Sparmann G, Merkord J, Jaschke A, Nizze H, Jonas L, Lohr M, Liebe S, Emmrich J.** Pancreatic fibrosis in experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology* 112:1762-5 (1997)
- 96 **Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakanishi I, Iwata K, Yamashita K, Hayakawa T.** Matrix Metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem* 267:21712-9 (1992)
- 97 **Sang QX, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE.** Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochem Biophys Acta* 1251:99-108 (1995)
- 98 **Sang QA, Boddien MK, Windsor LJ.** Activation of progelatinase A by collagenase and matrilysin: activation of progelatinase by matrilysin. *J Protein Chem* 15:243-53 (1996)
- 99 **Crabbe T, O'Connell JP, Smith BJ, Docherty AJ.** Reciprocated matrix metalloproteinase activation: a process performed by interstitial collagenase and progelatinase A. *Biochemistry* 33:14419-25 (1994)
- 100 **Salo T, Makela M, Kylmaniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H.** Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 during early wound healing. *Lab Invest* 70:176-82 (1994)
- 101 **Reynolds JJ.** Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degeneration. *Oral Dis* 2:70-6 (1996)
- 102 **Martelli M, Campana A, Bischof P.** Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro. *J Reprod Fertil* 98:67-76 (1993)
- 103 **Rosenberg GA.** Matrix Metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39:279-91 (2002)
- 104 **Maeda A, Sobel RA.** Matrix Metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:300-9 (1996)

- 105 **Goetzel EJ, Banda MJ, Leppert D.** Matrix Metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 156:1-4 (1996)
- 106 **Nielsen BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C, Borregaard N, Dano K.** 92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int J Cancer* 65:57-62 (1996)
- 107 **Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Lohr M, Liebe S.** Immunohistochemical characterisation of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion* 59:192-8 (1998)
- 108 **Ectors N, Maillet B, Aerts R, Geboes K, Donner A, Bochard F, Lankisch P, Stolte M, Luttgies J, Kremer B, Kloppel G.** Non-alcoholic duct destructive chronic pancreatitis. *Gut* 41:263-8 (1997)
- 109 **Hunger RE, Mueller C, Z'Graggen K, Friess H, Buchler MW.** Cytotoxic cells are activated in cellular infiltrates of alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology* 112:1656-63 (1997)
- 110 **Sopata I, Danciewicz AM.** Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta* 29:510-23 (1974)
- 111 **Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH.** Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J Clin Invest* 80:1644-50 (1987)
- 112 **Mainardi CL, Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM.** Purification of a type V collagen degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. *Coll Relat Res* 4:479-92 (1984)
- 113 **Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL.** Biochemical and immunological characterisation of the secret forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 25:2493-500 (1985)
- 114 **Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM.** Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem* 26:515-9 (1992)
- 115 **Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM.** IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 96:2340-10 (1995)
- 116 **Stuve O, Chabot S, Jung SS, Williams G, Yong VW.** Chemokine-enhanced migration of human peripheral blood mononuclear cells is antagonized by interferon beta-1b through an effect on matrix metalloproteinase-9. *J Neuroimmunol* 80:38-46 (1997)
- 117 **Vaday GG, HersHKoviz R, Rahat MA, Lahat N, Cahalon L, Lider O.** Fibronectin-

- bound TNF-alpha stimulates monocyte matrix metalloproteinase-9 expression and regulates chemotaxis. *J Leukoc Biol* 68:737-47 (2000)
- 118 **Vaday GG, Schor H, Rahat MA, Lahat N, Lieder O.** Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *J Leukoc Biol* 69:613-21 (2001)
- 119 **Brekken RA, Sage EH.** SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biology* 19:816-27 (2001)
- 120 **Frizell E, Liu SL, Abraham A, Ozaki I, Eghbali M, Sage EH, Zern MA.** Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology* 21:847-54 (1995)
- 121 **Schonbeck U, Mach F, Libby P.** Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J immunol* 161:3340-6 (1998)
- 122 **Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J.** Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res.* 10:317-24 (1991)
- 123 **Van den Stehen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G.** Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96:2673-81 (2000)
- 124 **Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Sawabu N.** Induction of cytokines in rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas* 24:198-204 (2002)
- 125 **Saurer L, Reber P, Schaffner T, Buchler MW, Buri C, Kappeler A, Walz A, Freiss H, Mueller C.** Differential expression of chemokins in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 118:356-67 (2000)
- 126 **Trocmé C, Gaudin P, Berthier S, Barro C, Zaoui P, Morel F.** Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 273:20677-84 (1998)
- 127 **Lauffenburger DA, Horwitz AF.** Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-69 (1996)
- 128 **Basbaum CB, Werb Z.** Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 8:731-8 (1996)
- 129 **Jaster R, Emmrich J.** Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 22:17-29 (2008)
- 130 **Friedmann SL, Roll FJ, Boyles J, Bissel DM.** Hepatic lipocytes. The principal collagen-

- producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sc USA* 82:8681-5 (1985)
- 131 **Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Steward NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS.** Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 155:1087-95 (1999)
- 132 **Schmid-Kotsas A, Gross HJ, Menke A, Weidenbach H, Adler G, Siech M, Beger H, Grunert A, Bachem MG.** LPS-activated macrophages stimulate the synthesis of ollagen type I and c-fibronectin in cultured pancreatic stellate cells. *Am J Pathol* 155:1749-58 (1999)
- 133 **Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS.** Pancreatic stellate cells anre activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44:534-41 (1999)
- 134 **Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S.** Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut* 51:579-81 (2002)
- 135 **Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS.** Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43:128-33 (1998)
- 136 **Muhs BE, Patel S, Yee H, Marcus S, Shamamian P.** Increased matrix metalloproteinase expression and activation following experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 101:21-8 (2001)
- 137 **Sparmann G, Behrend S, Merkord J, Kleine HD, Graser E, Ritter T, Liebe S, Emmrich J.** Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chonic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Dig Dis Sci* 46:1647-56 (2001)
- 138 **D'Haese A, Wuyts A, Dillen C, Dubois B, Billau A, Heremans H, Van Damme J, Arnold B, Opdenakker G.** In vivo neutrophil recruitment by granulocyte chemotactic protein-2 is assisted by gelatinase B/MMP-9 in the mouse. *J Interferon Cytokine Res* 20:667-74 (2000)
- 139 **Friedmann SL.** Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275:2247-50 (2000)
- 140 **Sparmann G, Sass S, Bohme HJ, Liebe S, Emmrich J.** Persistence of memory type lymphocytes in an experimental model of chronic pancreatitis in rats. *Cell Mol Biol* 48:309-15 (2002)
- 141 **Opdenakker G, van den Steen PE, van Damme J.** Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 22:571-9 (2001)
- 142 **Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirola R, Kosten M, Wilson JS, Apte**

- MV. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 52:275-82 (2003)
- 143 **Okada Y, Tsuchiya H, Shimizu H, Tomita K, Nakanishi I, Sato H, Seiki M, Yamashita K, Hayakawa T.** Induction and stimulation of 92-kDa gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 171:610-7 (1990)
- 144 **Gress TM, Muller-Pillasch F, Lerch MM, Friess H, Buchler M, Beger HG, Adler G.** Balance of expression of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in chronic pancreatitis. *Z Gastroenterol* 32:221-5 (1994)
- 145 **Sparmann G, Koczan D, Thiesen HJ, Glass A, Jaster R, Liebe S, Emmrich J.** Differential gene expression in rat pancreatic stellate cells and fibroblasts. *Pancreas* 23:461 (2001)

CURRICULUM VITAE
Ib Jammer

Publikationen:

Jammer I, Sparmann G, Merkord J, Liebe S, Emmrich J. Expression of matrix metalloproteinases in experimental chronic pancreatitis. *Digestion* 60:381 (1999)

Jammer I, Sparmann G, Merkord J, Liebe S, Emmrich J. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 118:Suppl 2A615 (2000)

8 Danksagung

Was lange währt wird endlich gut.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Emmrich, der mir diese Forschungsarbeit ermöglichte, Frau Dr. Sparmann, die mich geduldig und motivierend in allen Fragen der Molekularbiologie begleitet hat, Professor Åke André-Sandberg für die ideelle und praktische Unterstützung während und nach meinem Forschungsaufenthalt in Norwegen und Frau Schumacher für ihre unermüdliche Geduld. Ein herzlicher Dank gebührt auch Frau Weber für die Durchführung der Tierversuche und meiner Mutter für das ständige Nachfragen am Telefon.

Für die materielle und finanzielle Unterstützung während meines Auslandsstudiums möchte ich dem „Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin“, dem Chirurgischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Bergen/Norwegen und der Stiftung „Kaptein Leif A. Og Hustru Ingvalda Hermansens Legat“ danken.

Und Anna.

9 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Bergen, den

