

Universität Ulm
Abt. Innere Medizin I
Leiter Prof. G. Adler

**Regulation des Aktinzytoskelettes in Pankreasazinuszellen
durch die Tyrosinkinase Yes**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Grit Lynch
aus Frankenberg
2002

Amtierender Dekan: Prof. Klotz

1. Berichterstatter: PD Dr. Lutz

2. Berichterstatter: Dr. Siech

Tag der Promotion: 20.12.2002

Widmung

*Für meine Eltern,
die immer meine Träume unterstützt haben*

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
ABKÜRZUNGEN	3
1. EINLEITUNG.....	5
2. ZIEL.....	19
3. MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1. Material und Tiere.....	20
3.1.1. ANTIKÖRPER	20
3.1.2. CHEMIKALIEN.....	21
3.1.3. TIERE.....	21
3.2. Methoden	22
3.2.1. ISOLIERUNG VON AZINI AUS DEM RATTENPANKREAS.....	22
3.2.2. AMYLASESEKRETIONSSTUDIEN AN FRISCH ISOLIERTEN RATTENAZINI.....	23
3.2.3. IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	23
3.2.4. HERSTELLUNG VON PROTEINEXTRAKTEN.....	24
3.2.5. PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	25
3.2.6. SUBZELLULÄRE FRAKTIONIERUNG	26
3.2.7. IMMUNPRÄZIPITATION.....	27
3.2.7. GELELEKTROPHORETISCHE ANALYSE VON PROTEINEN DURCH SDS-PAGE	28
3.2.8. WESTERN-BLOTTING.....	29
3.2.9. DETEKTION DER PROTEINE MIT ANTIKÖRPERN.....	29
3.2.10. INDIA-INKFÄRBUNG.....	30
3.2.11. KINASE AKTIVITÄT VON YES	31
3.2.12. DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG VON IMMUNOBLOTS	32
3.2.13. ISOLIERUNG VON RNA AUS AZINI.....	32
3.2.14. ÜBERPRÜFEN DER REINHEIT UND QUALITÄT DER RNA	32
3.2.15. HYBRIDISIERUNG DER GENE ARRAYS	34
4. ERGEBNISSE.....	37

4.1. Regulation auf Proteinebene.....	37
4.1.1. PROTEINEXPRESSION DER SRC-KINASEN.....	37
4.1.2. TYROSINPHOSPHORYLIERUNG VON YES NACH CCK STIMULATION.....	38
4.1.3. KINASEAKTIVITÄT VON YES.....	41
4.1.4. LOKALISATION UND UMVERTEILUNG VON YES.....	44
4.1.5. KORRELATION ZWISCHEN AKTINZUSAMMENBRUCH UND YES-AKTIVITÄT.....	46
4.1.6. SEKRETION AUS ISOLIERTEN AZINI.....	49
4.1.7. YES-ASSOZIIERTE PROTEINE.....	51
4.2. Genexpression	53
4.2.1. AUSTESTEN DER KONZENTRATIONEN FÜR DIE ISOLATION VON RNA.....	54
4.2.2. GENEXPRESSION NACH STIMULATION MIT CCK.....	55
5. DISKUSSION.....	60
5.1. Regulation von Proteinen.....	60
5.2. Differentielle Genexpression.....	66
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	69
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	71
ANHANG.....	83

ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
Wasser	doppelt destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
CCK	Cholecystokinin
CCK-R	CCK Rezeptor
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
et al	und andere
Exp	Experiment
FAK	Focal Adhesion Kinase
g	Gramm
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
H+L	Heavy + Light (beide Ketten des IgG)
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
M	Molar
min	Minute
mk	monoklonal
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
N	Normal
nm	Nanometer
nm	nanomolar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
pk	polyklonal

pM	picomolar
PVDF	Polyvinyliden Difluorid
Pyk2	prolinreiche Tyrosinkinase 2
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SH	Src-Homologie
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Tyr	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

Die akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse (Pankreatitis) ist eine insgesamt eher seltene Erkrankung, die jedoch in etwa 15 % der Fälle tödlich endet. Bei der akuten Pankreatitis wird zwischen zwei Verlaufsformen unterschieden: der interstitiellen ödematösen Verlaufsform, die etwa 80 % der akuten Pankreatitiden repräsentiert und der hämorrhagisch nekrotisierenden Pankreatitis. Diese betrifft etwa 20 % der Pankreatitiden und hat eine Letalität von 20-30 % (Bradley 1993).

Die Bauchspeicheldrüse, auch Pankreas genannt, hat als Drüse eine doppelte Funktion. Der endokrine Anteil der Drüse produziert u.a. Hormone zur Blutzuckerregulierung, welche ins Blut abgegeben werden. Nur ca. 5 % der Zellmasse des Pankreas wirken endokrin und sind vorwiegend in den Langerhansschen Inseln lokalisiert. Der exokrine Anteil des Pankreas macht ca. 90 % der Zellmasse aus und stellt in den azinären Zellen Verdauungsenzyme her. Die Verdauungsenzyme bilden zusammen mit Wasser und alkalischem Bikarbonat, welches aus den dukталen Zellen des Pankreas sezerniert wird, den Verdauungssaft. Um eine Selbstverdauung des Pankreas zu verhindern, werden inaktive Enzymvorstufen hergestellt. Sie werden erst nach dem Verlassen des Pankreas im Dünndarm aktiviert.

Bei der Pankreatitis werden Verdauungsenzyme initial bereits im Pankreas aktiviert, welche dann die Azinuszelle schädigen. In einer zweiten Phase kommt es zur inflammatorischen Reaktion im Organ, bei der Chemokine inflammatorische Zellen zum Pankreas anziehen und diese aktivieren, was zur Nekrose der Azinuszellen führt (Grady et al. 1997; Han et al. 1999). In der letzten, der systemischen Phase, werden auch andere Gewebe geschädigt und dadurch können systemische Entzündungsreaktionen wie z.B. das „adult respiratory distress syndrom“ (ARDS) ausgelöst werden (Steer 2002).

Die Untersuchung der Entstehungsmechanismen der akuten Pankreatitis ist am Menschen nicht möglich, da die Krankheit meistens erst dann diagnostiziert wird, wenn sie bereits voll ausgeprägt ist. Zu diesem Zeitpunkt sind die zellulären Änderungen der Initialphase nicht mehr nachvollziehbar.

Zur Untersuchung der anfänglichen pathophysiologischen Vorgänge der Krankheit wurden deshalb mehrere Tiermodelle entwickelt, welche in vielen biochemischen und klinischen Aspekten den Krankheitsmerkmalen der akuten Pankreatitis beim Menschen ähneln (Tabelle 1).

Modell	Auslöser	Symptome
Hämorrhagisch nekrotisierende Pankreatitis des Opossums	Ligation des Pankreasgangs allein bzw. zusammen mit dem Gallengang	Hämorrhagische Pankreatitis, 14 Tage Sterberate bei 100% (im Vgl. zu den meisten Tierarten, wo es nur ein Ödem mit milder Entzündung ausbildet)
Akute hämorrhagische Nekrose des Pankreas in der Maus, Diät-induziert	Fütterung einer Cholin-defizienten Diät mit 0,5 % Ethionin (ad libitum, bzw. abgeändert für 24 Stunden)	Hämorrhagische Nekrose des Pankreas, bei Fütterung ad libitum letal innerhalb von 5 Tagen, bei abgeänderter Form werden Untersuchungen innerhalb der ersten 2 Tage durchgeführt (vor starker Pankreasschädigung)
Cerulein induzierte akute ödematöse Pankreatitis der Ratte oder Maus	Infusion des amphibischen CCK-Analogs Cerulein in supramaximal sekretorischen Konzentration	Massives Ödem im Pankreas und umgebendem Gewebe, milde Entzündung im Interstitium, Entwicklung der Symptome in wenigen Stunden mit vollständiger Heilung nach 14 Tagen
Pankreasgangobliteration bei Ratte oder Kaninchen	Temporäre Kanülierung des Gangs	innerhalb 4-7 Stunden Hyperamylasemie und mildes interstitielles Ödem, keine Entzündung zu beobachten (Modell ähnelt mechanischen Vorgängen nach Verstopfung durch Gallensteine)

Tabelle 1: Tiermodelle der experimentellen Pankreatitis

Innerhalb der Tiermodelle der akuten Pankreatitis stellt die Überstimulation des Pankreas durch Cerulein das am besten charakterisierte und standardisierte Modell

dar (Adler et al. 1979; Lampel et al. 1977). Hierbei wird eine akute ödematöse Pankreatitis durch die 12stündige intravenöse Infusion von 10 µg Cerulein je kg Körpergewicht des Tieres und je Stunde ausgelöst. Cerulein ist ein amphibisches Analog des humanen Hormons Cholecystokinin (CCK). CCK ist in physiologischen Konzentrationen für die Enzymsekretion aus den azinären Pankreaszellen verantwortlich. Die zur Induktion der Pankreatitis eingesetzte Konzentration entspricht einer mindestens 10fachen (supramaximal) sekretorischen Konzentration von CCK. Die durch Cerulein ausgelöste Pankreatitis ist mild, reversibel und wurde wegen des gut reproduzierbaren Verlaufs das am meisten verwendete Modell für die Untersuchung zellbiologischer Vorgänge.

Die Schädigung des Pankreas während der durch Cerulein induzierten Pankreatitis beginnt in den azinären Zellen und ist durch die Zerstörung des Aktinnetzwerkes und eine vorzeitige Aktivierung der Verdauungsenzyme gekennzeichnet (Lerch et al. 1992). Sowohl physiologische Sekretion als auch Zellschädigung werden durch den CCK-Rezeptor vermittelt. Um die Signaltransduktion vom CCK-Rezeptor zur Induktion der Pankreatitis genauer zu untersuchen, eignet sich das Modell der isolierten Azini der Ratte. Hierbei handelt es sich um native sekretorische Zellen, die durch enzymatische und mechanische Dissoziation aus dem Organ isoliert werden (Yule et al. 1994). Physiologische Konzentrationen (10-100 pM) von Cholecystokinin (CCK) stimulieren die Enzymsekretion aus diesen Zellen, während Konzentrationen über 1 nM die maximale Enzymsekretion um ca. 50 % hemmen, das Aktinnetzwerk schädigen, Zellblebbing verursachen und Verdauungsenzyme vorzeitig aktivieren (Grady et al. 1998; O'Konski et al. 1993; Torgerson et al. 1998).

Die Cholecystokininwirkung wird über die Aktivierung des heptahelikalen membrangebundenen CCK-Rezeptors vermittelt. Es gibt zwei Subklassen des CCK-Rezeptors. Der CCK-A-Rezeptor ist hochaffin für die Bindung von CCK, während der CCK-B-Rezeptor CCK und Gastrin mit gleicher Affinität bindet (Wank 1995). In den azinären Zellen des Rattenpankreas wird nur der CCK-A-Rezeptor exprimiert (Wank et al. 1994). Die Bindung des Substrates CCK an den Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung, welche das G-Protein aktiviert. Die α -

Untereinheit löst sich vom Rezeptor-Ligand-Komplex und aktiviert Phospholipase C_{β} (PLC), welche PIP_2 (Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat) spaltet um IP_3 (Inosit-(1,4,5)-triphosphat) und DAG (1,2-Diacylglycerin) zu bilden. Während IP_3 intrazellulär Kalzium freisetzt, aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC) (Williams 2001). Mehrere Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Aktivierung der PKC an den zellbiologischen Ereignissen während der initialen Phase der Zellschädigung beteiligt ist (Gaisano et al. 1994a; Smeets et al. 1998). So sind mehrere partielle Agonisten des CCK-Rezeptors (z.B. CCK-OPE, JMV-180), welche nur den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration stimulieren, ebenso potente und effiziente Stimulatoren der Enzymsekretion wie CCK (Marino et al. 1993);(Gaisano et al. 1994b);(O'Konski et al. 1993). Diese Agonisten hemmen jedoch im Gegensatz zu CCK nicht die Enzymsekretion, sie führen nicht zur intrazellulären Aktivierung von Trypsin und sie üben keinen destruktiven Effekt auf das Aktinfilamentsystem der Azinuszelle aus (Kaplan et al. 1994; O'Konski et al. 1993; Wang et al. 2000). Wird allerdings PKC durch niedrige Konzentrationen eines Phorbolesters zusätzlich aktiviert, so führt die Stimulation mit maximal sekretorischen CCK Konzentrationen zusammen mit diesen Agonisten zum Zusammenbruch des Aktinfilamentsystems und zur nachfolgenden Hemmung der Enzymsekretion (Gaisano et al. 1994a; O'Konski et al. 1990; O'Konski et al. 1993). Die zusätzliche Stimulation von PKC führt auch zu einer Änderung des Calciumsignals vom physiologischen Muster (Ca^{2+} Oszillation) zu einem bei der Zellschädigung beobachteten konstant erhöhten Ca^{2+} Spiegel (Gaisano et al. 1994a). Umgekehrt wird nach Hemmung des durch supramaximal sekretorischem CCK induzierten Calciumsignals keine Aktivierung von Trypsin mehr beobachtet (Raraty et al. 2000). Die intrazelluläre Aktivierung der Verdauungsenzyme allein reicht jedoch nicht aus, um die Zelle zu schädigen. Erst eine kombinierte frühzeitige Aktivierung der Verdauungsenzyme gemeinsam mit der Retention dieser Enzyme führt zur azinären Zellschädigung (Gorelick et al. 1993; Grady et al. 1998).

Zur Retention der Enzyme kommt es wahrscheinlich durch den Zusammenbruch des Aktin in der azinären Zelle, welches auch für die physiologische Sekretion notwendig ist (Jungermann et al. 1995; Muallem et al.

1995; O'Konski et al. 1993). Das Aktinzytoskelett ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. Die erste Funktion ist der Aufbau und die Erhaltung der zellulären Struktur (Matsudaira 1991; Matsudaira 1994). Es wird jedoch ebenfalls für die Zellbewegung (Calautti et al. 1998);(Fishkind et al. 1995), für Interaktionen zwischen zwei Zellen oder einer Zelle mit der extrazellulären Matrix (Burridge et al. 1996; Ding et al. 2001; Yamada et al. 1997) und für den Vesikel- und Organellentransport (Kubler et al. 1993; Langford 1995) benötigt. Diese Vielfalt der Funktionen, an denen Aktin beteiligt ist, erfordert die Existenz verschiedener Aktinstrukturen *in vivo*, welche funktionell unterschiedliche biophysikalische und biochemische Eigenschaften aufweisen müssen.

Aktin liegt in der Azinuszelle in zwei verschiedenen Aggregationszuständen vor. Überwiegend findet man globuläres Aktin (G-Aktin) welches gleichmäßig im Zytosol verteilt ist und sich zu filamentösem Aktin (F-Aktin) zusammen lagern kann. Organisiert ist das Aktinfilamentsystem der Azinuszelle entweder als Faserbündel in den apikalen Mikrovilli oder als Band in einem dichten subapikalen Netzwerk. Bei Stimulation der Azini mit sekretionshemmenden CCK Konzentrationen kommt es zu einem Abbau der apikalen Aktinstrukturen (O'Konski et al. 1990). Das deutet daraufhin, dass ein funktionelles Aktinnetz für die Sekretion notwendig ist. Gleichzeitig dient das apikale Aktin als Barriere für Enzymgranula, welches durch die Stabilisation von Aktin durch Phalloidin gezeigt werden konnte (Muallem et al. 1995). Erst wenn z.B. durch Stimulation mit Sekretagoga diese Aktinstruktur aufgelockert wird, kommt es zur Fusion der Enzymgranula mit der apikalen Membran und damit wird eine regulierte Sekretion ermöglicht. Wird jedoch zu viel Aktin abgebaut, kann auch keine Sekretion mehr stattfinden, da wahrscheinlich die nötigen Strukturen für die Fusion der Enzymgranula mit der Zellmembran fehlen (Valentijn et al. 2000).

Die Stabilisierung des Aktinfilamentsystems in der Zelle erfolgt durch dessen Verankerung in der Plasmamembran und durch Aktin quervernetzende Proteine. Als multimerer Proteinkomplex welcher Aktin mit der extrazellulären Matrix (ECM) verbindet, wurden in Zellkulturzellen die sogenannten „Focal Adhesions“ beschrieben. „Focal Adhesions“ sind an der Regulation von Morphologie,

Wachstum, Differenzierung und Migration der Zellen beteiligt (Ding et al. 2001). Die Proteine welche den Komplex mit der extrazellulären Matrix verankern, gehören zur Familie der Integrine, einer Gruppe heterodimerer Transmembranproteine (Critchley et al. 1999; Giancotti 1997). Auf zytoplasmatischer Seite wurden inzwischen zahlreiche strukturelle und regulatorische „Focal Adhesion“ Proteine identifiziert. Zu den Brückenproteinen, welche Integrine mit dem Aktin verbinden, gehören z.B. Talin, Vinculin, α -Aktinin und Paxillin. Paxillin wird durch seine LIM Domäne an den „Focal Adhesions“ lokalisiert. Es dient als molekularer Adapter für eine große Gruppe anderer Signal- und Strukturproteine (Turner 2000), z.B. kann Paxillin an Crk, Src, Pyk2, Vinculin und Talin binden (Giancotti 1997; Jena et al. 1991). Außerdem bindet es auch an das regulatorische Protein FAK (Focal Adhesion Kinase) in dessen carboxyterminalem Bereich. Diese in zahlreichen Zellsystemen exprimierte zytosolische Kinase wurde ursprünglich als tyrosinphosphoryliertes Protein in Src transfizierten Hühnerembryozellen identifiziert (Schaller et al. 1992). FAK assoziiert, wenn es tyrosinphosphoryliert ist, mit anderen Proteinen, darunter Paxillin, Src, Tensin und Cas (Giancotti 1997). Sowohl FAK als auch Paxillin scheinen an der Organisation und Regulation fokaler Adhäsionspunkte und der Bildung von Aktinfilamentsystemen beteiligt zu sein (Yamada et al. 1997). In Azini führt die Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen zur Tyrosinphosphorylierung einer Reihe von Proteinen, darunter auch FAK und Paxillin (Garcia et al. 1997; Leser et al. 1999). Nach Phosphorylierung von Paxillin kommt es zur transienten Umverteilung vom Zytosol zur Membran. Im weiteren Verlauf wird Paxillin im Zytosol degradiert (Leser et al. 1999).

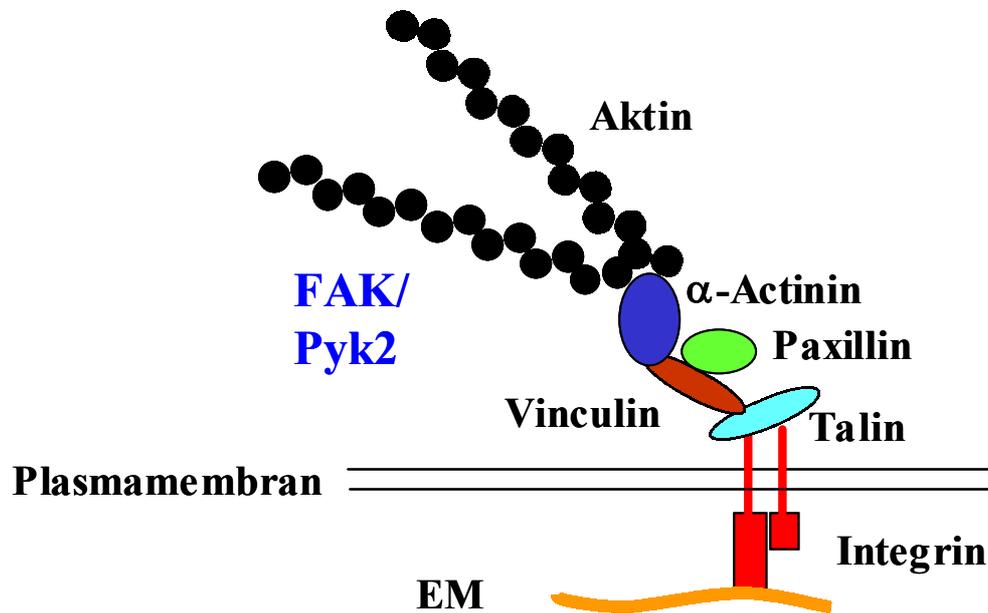


Abb. 1: Graphische Darstellung des Aktinankerkomplexes „Focal Adhesion“. Die Integrine verankern als transmembranöse Heterodimere die Zelle an der extrazellulären Matrix (EM). Die Bindung zum Aktinfilamentsystem erfolgt auf zytoplasmatischer Seite über eine Gruppe von Adapterproteinen wie Talin, Vinculin α -Aktinin und Paxillin. Die Regulation dieses Aktinankerkomplexes erfolgt durch andere Proteine wie zum Beispiel die Kinasen FAK und Pyk2.

Ein zweiter aktinverankernder Proteinkomplex ist die „Adherens junction“ (oder Zonula adherens). Dort findet zwischen polarisierten epithelialen Zellen ein Kalzium vermittelter Zell-Zell-Kontakt durch die homophile Interaktion von E-Cadherinen benachbarter Zellen statt. E-Cadherine sind Glykoproteine, bestehend aus einer Transmembrandomäne und fünf extrazellulären Domänen, die je zwei hochkonservierte Ca^{2+} -bindende Motive enthalten. Intrazellulär ist E-Cadherin über Brückenproteine mit dem Aktinfilamentsystem verknüpft (Nagafuchi 2001; Pokutta et al. 2002). Diese Brückenproteine gehören größtenteils zur Proteinfamilie der Catenine. β - und γ -Catenin binden dabei direkt an E-Cadherin, α -Catenin dagegen bildet eine Brücke zwischen dem Proteinkomplex und dem Aktinfilamentsystem.

Ein weiteres Catenin, p120ctn, koppelt in unmittelbarer Nähe der Bindestelle von β - und γ -Catenin an E-Cadherin und gehört somit ebenfalls zum Komplex der

„Adherens junction“ (Ohkubo et al. 1999). p120ctn ist nicht direkt an der Protein-Protein-Interaktion mit dem Aktinfilamentsystem beteiligt, da es nicht an α -Catenin binden kann.

Ein möglicher Regulationsmechanismus der Zonula adherens Proteine ist die Tyrosinphosphorylierung, da β - und γ -Catenin, sowie p120ctn durch die Stimulation mit Wachstumsfaktoren tyrosinphosphoryliert werden können (Hazan et al. 1998; Rosato et al. 1998). P120ctn stabilisiert die Zell-Zell Adhäsion durch die Bindung an E-Cadherin (Yap et al. 1998), dies wird durch die Hyperphosphorylierung von p120ctn während der Mitose gehemmt (Hazan et al. 1998). So könnte die Tyrosinphosphorylierung der Catenine eine Schlüsselrolle in der Stabilität bzw. Instabilität der Zonula adherens und damit der Verankerung des Aktinfilamentsystems mit der Plasmamembran sein (Behrens et al. 1993). In Untersuchungen in isolierten Azini wurde nach Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen ebenfalls eine Änderung des Phosphorylierungsgrades von p120ctn beobachtet (Leser et al. 2000).

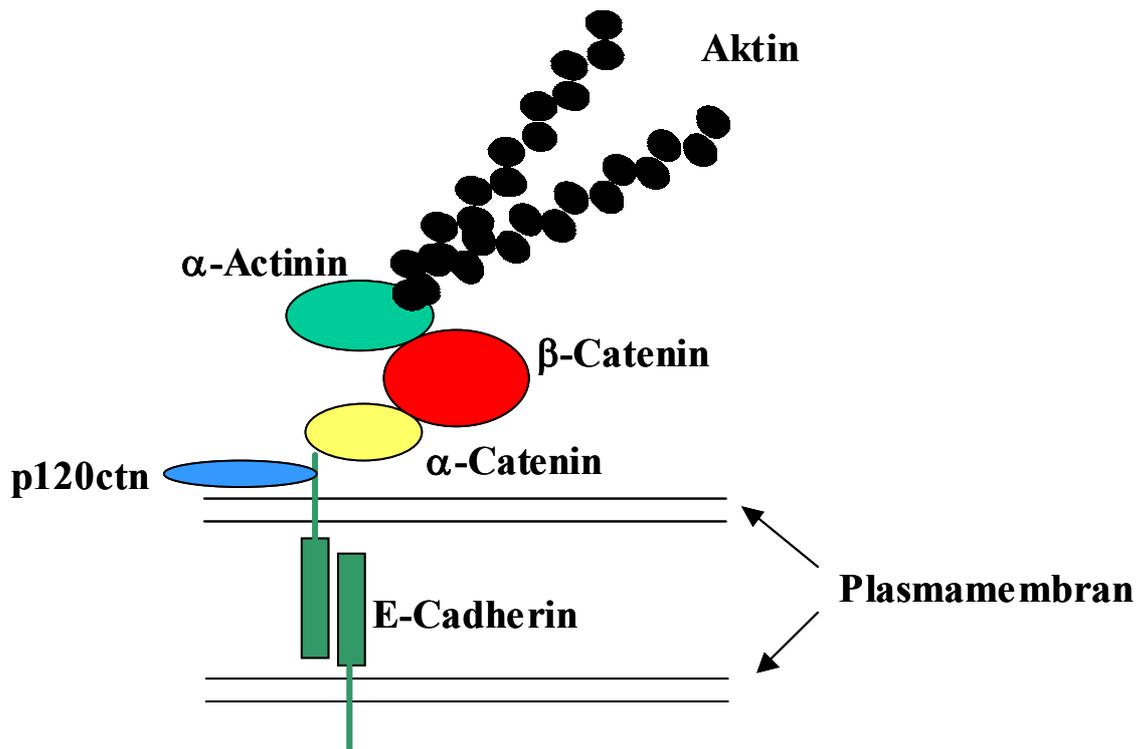


Abb. 2: Graphische Darstellung des Aktinankerkomplexes des Typs Adherens junction (Zonula Adherens). Der Zell-Zell Kontakt wird durch eine homophile Interaktion von E-Cadherinen benachbarter Zellen vermittelt. E-Cadherin ist im Zytosol über Linkerproteine mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verknüpft (Catenine und α Aktinin). Eine dritte Gruppe von Proteinen reguliert den Komplex (p120ctn).

Ein weiterer Mechanismus der Stabilisierung und Regulation des Aktinzytoskelettes ist die Quervernetzung z.B. durch Plectin, welche auch in der azinären Pankreaszelle beobachtet wurde. Beil et al. (Beil et al. 2002) konnte zeigen, dass die Degradation von Plectin vor dem Zusammenbruch des Aktins stattfindet und teilweise an der Reduktion der Amylasesekretion bei durch CCK induzierter azinärer Zellschädigung beteiligt ist.

Es ist bisher nicht bekannt wie diese verschiedenen aktinstabilisierenden Strukturen während der azinären Zellschädigung nach Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK reguliert werden. In Fibroblasten wurden Src-Kinasen als wichtige Regulatoren beider Aktinankerkomplexe beschrieben (Behrens et al. 1993; Polte et al. 1997). Als Mediatoren kommen mehrere auch in Azini exprimierte Proteine, wie das Catenin p120ctn und die „Focal Adhesion“ Proteine

FAK und Paxillin in Frage. Alle 3 Proteine wurden in anderen Zellsystemen als Substrate der Src-Kinasen beschrieben (Calautti et al. 1998);(Schlaepfer et al. 1999; Shen et al. 2001).

Zur Familie der Src-Kinasen gehören 9 Proteine mit ausgeprägter struktureller Homologie. Die meisten Kinasen der Src-Familie werden ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, wo sie oft redundant sind, wie in Knock-out Modellen gezeigt wurde (Smith et al. 2001). Die Src-Kinasen Yes, Lyn, Fyn und Src sind andererseits ubiquitär exprimiert und scheinen eher differenzierte Rollen zu übernehmen (Thomas et al. 1995).

Src-Kinasen sind zunächst zytoplasmatisch lokalisiert und binden als aktive Enzyme praktisch ausschließlich an zelluläre Membranen. Basierend auf Sequenzhomologien können insgesamt sechs funktionell relevante Domänen mit unterschiedlichen Aufgaben differenziert werden (Abb. 3). (Brown et al. 1996)

intrazelluläre Membranen (ohne Palmitat) oder als palmitoyliertes Protein an Caveolae im Bereich der Plasmamembran binden (Shenoy-Scaria et al. 1994). Die Bindung des Palmitats ist reversibel und kann somit über die intrazelluläre Lokalisation die Interaktion der Src-Kinasen mit unterschiedlichen Signalwegen steuern.

Als nächstes folgt ein kurzer Bereich mit großer Variabilität zwischen den Src Familienmitgliedern, die „unique region“. In diesem Bereich sind zwei Cystein, die über Disulphidbrücken z.B. in Lymphozyten an die Transmembranrezeptoren CD4 und CD8 binden können (Shaw et al. 1989; Turner et al. 1990). Diese Bindung scheint allein durch die Sequenz der „unique region“ der jeweiligen Src-Kinase vermittelt zu sein (Bijlmakers et al. 1997). Die Aktivierung von Src in der M-Phase des Zellzyklus korreliert mit der Phosphorylierung der „unique region“ an Serin und Threonin (Shenoy et al. 1992). Es gibt Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von Serin59 die Spezifität der entfernt lokalisierten SH2 Domäne regulieren kann (Joung et al. 1995; Park et al. 1995). Durch die große Variabilität ist die „unique region“ am ehesten dazu geeignet, die unterschiedliche Substratspezifität und Funktion der verschiedenen Src-Kinasen zu erklären.

Die beiden folgenden Domänen – SH2 und SH3 – sind in allen Kinasen der Src-Familie konserviert (Brown et al. 1996). Es sind Aminosäuremotive mit hoher Affinität für Phosphotyrosin (SH2 Domäne) oder für prolinreiche Sequenzen (SH3 Domäne), die in fast identischer Form auch in vielen anderen Proteinen beobachtet werden und ein ubiquitäres Regulationsprinzip darstellen (Sudol 1998). Bei den Src-Kinasen haben beide Domänen eine doppelte Funktion. Sie können entweder intramolekular binden oder sie vermitteln die Bindung an andere Signalmoleküle und regulieren so die Kinaseaktivität.

Inaktives Src kann man sich als ein zusammengefaltetes Protein vorstellen dessen SH3 Domäne an eine interne prolinreiche Helix gebunden ist und die SH2 Domäne mit dem phosphorylierten Tyrosine 527 interagiert (Abb. 4) (Goodsell 2001; Schwartzberg 1998). Diese starre Bindung bei der die SH3 Domäne eng an der katalytischen Domäne liegt, führt zum Blockieren der Aktivierungsstelle. Die Autophosphorylierungsstelle der Kinasedomäne (Tyr 416) liegt somit im Inneren

des gefalteten Proteins und kann nicht phosphoryliert werden (Gonfloni et al. 2000). Auch eine Bindung von Substraten an die SH2 Domäne ist nur erschwert möglich.

Zur Aktivierung der Src-Kinasen gibt es mehrere Möglichkeiten:

- Dephosphorylierung von Tyr 527 durch eine Phosphatase
- kompetitive Bindung eines hochaffinen Substrats an die SH2 oder SH3 Domäne, wodurch das phosphorylierte Tyr 527 verdrängt wird
- allosterischer Aktivator oder Proteinmodifizierung (z.B. Serin/Threoninphosphorylierung) welches die geschlossene Konformation destabilisiert.

In allen Fällen kommt es zur Auffaltung des Proteins und die Autophosphorylierung der Kinasedomäne wird ermöglicht (Abb. 4). Dadurch wird die Kinase aktiviert. Als negativ regulatorisches Protein ist Csk beschrieben, welches für die Phosphorylierung von Tyr 527 verantwortlich ist (Brown et al. 1996).

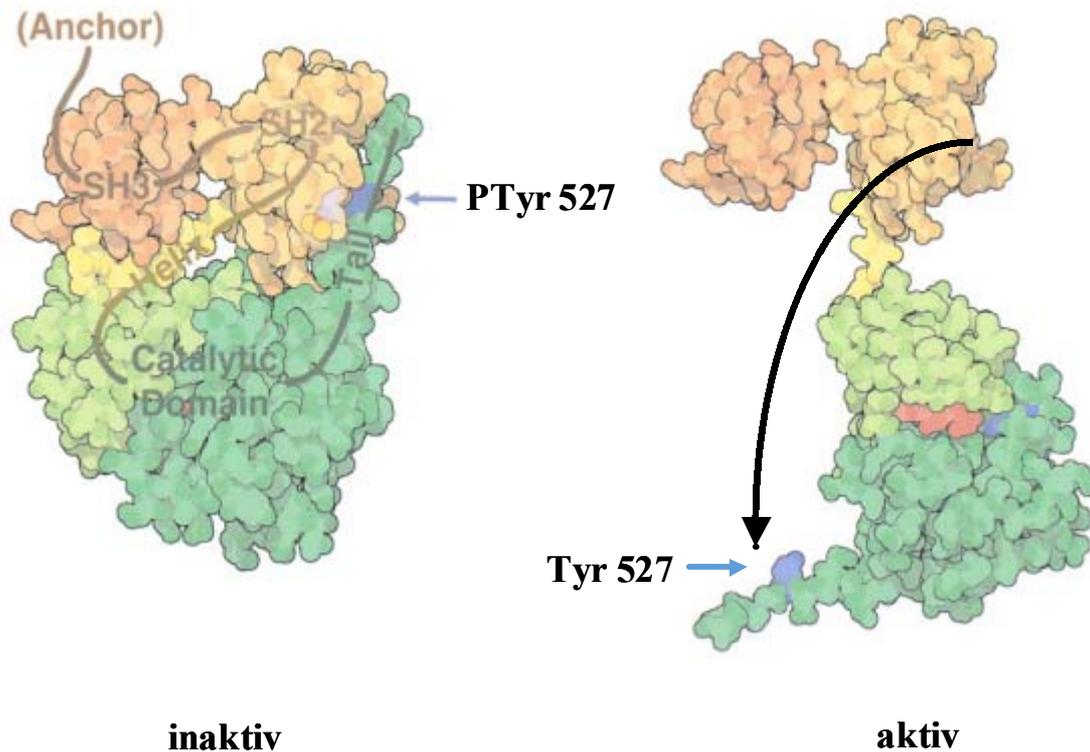


Abb. 4: Regulation der Aktivität der Src Kinasen. In der inaktiven Form (links) ist das Protein in einem stark gefalteten Zustand. In der aktiven Form löst sich die SH3 Domäne von der prolinreichen Helix und die SH2 Domäne bindet nicht mehr an die „tail“ Region (jetzt mit einem unphosphorylierten Tyrosinrest). Die aktive Seite bindet ATP (rot), welches die Phosphatgruppe für die Aktivierung bereithält. Die erste Reaktion ist die Phosphorylierung des Tyrosinrestes direkt neben der ATP-Bindestelle (Autophosphorylierung). Wenn dieses Tyrosin phosphoryliert ist, ist das Enzym maximal aktiviert. (nach Godsell 2001)

2. ZIEL

Azinäre Zellen des exokrinen Pankreas benötigen ein funktionelles apikales Aktinnetzwerk für die Sekretion von Verdauungsenzymen. Während der frühen Phase der experimentellen akuten Pankreatitis kommt es zum Zerfall dieses Aktinnetzes in der Zelle. Das führt dazu, dass Verdauungsenzyme nicht sezerniert werden. Eine gleichzeitige Aktivierung der Enzyme führt dann zur Zellschädigung. Aktinfilamente werden durch multifunktionelle Proteinkomplexe an der Membran verankert und reguliert. In anderen Modellsystemen wurden die Kinasen der Src-Familie für die Regulation dieser Proteinkomplexe beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, ob Kinasen der Src-Familie an den pathophysiologischen Vorgängen der induzierten Pankreatitis beteiligt sind. Folgende Fragen wurden bearbeitet: Wird Src bzw. Yes durch CCK reguliert? Hat die Aktivität der Src-Kinasen einen Einfluss auf Aktinstrukturen während der Induktion der akuten Pankreatitis? Ist Yes an der Sekretionshemmung während der Pankreatitis involviert und mit welchen anderen Proteinen interagiert es, um auf dessen Funktion schließen zu können. Welche anderen Proteine sind an der Regulation der initialen Phase beteiligt und kommt es bereits zu diesem frühen Zeitpunkt zu einer Regulation der Genexpression?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. MATERIAL UND TIERE

3.1.1. Antikörper

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2) sind sämtliche verwendeten primären Antikörper/Antiseren und deren Bezugsquelle angegeben.

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	IB	IP	IF
Yes	Maus, mk	Transduction	1:5000	3 – 5 µg, für 350 – 750µg Protein	1:1000
Pyk2	Maus, mk	Transduction	1:1000	5 µg für 750 µg Protein	
Pyk2	Kaninchen, pk	Biomol, Hamburg			1:200
Phosphotyrosin (PY20)	Maus, mk	Transduction	1:2500		
Src	Maus, mk	UBI	1:200		
Fyn	Hase, pk	UBI	1:500		
Lyn	Hase, pk	Santa Cruz	1 :500		
FAK	Maus, mk	Transduction	1:1000		
P120ctn	Maus, mk	Transduction	1:1000	5 µg für 650 µg Protein	

Tabelle 2: Primärantikörper

Sämtliche sekundären mit Peroxidase gekoppelten Antikörper wurden von der Firma Pierce bezogen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Alexa 488 gekoppelte sekundäre Antikörper von Molecular Probes (Eugene, USA) und Cy3 gekoppelte sekundäre Antikörper von Dianova (Hamburg) bezogen.

3.1.2. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aminosäuren (nicht essentiell, MEM 100x)	Life Technologies, Karlsruhe
CCK-8, sulfatiert (CCK 25-32)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Kollagenase, (CLSPA)	Worthington, Cell Systems, Hamburg
L-Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
OregonGreen-Phalloidin	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Fluka, Buchs
Sojabohnen-Trypsininhibitor	Boehringer, Mannheim

Tabelle 3: Substanzen

Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht anders im Text angegeben, in p. A. bzw. „ultra pure“ Qualität von den Herstellern Fluka (Buchs), Merck (Frankfurt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.1.3. Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche Wistarratten des Inzuchtstammes WAG/RijCrl (Charles River, Sulzfeld). Die Haltung erfolgte in Gruppen mit maximal 3 Ratten pro Käfig unter kontrollierten Licht-Dunkel-Bedingungen, mit einer 12-stündigen Dunkelphase zwischen 19 und 7 Uhr. Die Räume waren klimatisiert (21°C Raumtemperatur, 55% Luftfeuchte). Die Tiere wurden mit der Zucht- und Haltungsdiät Altromin® ad libitum gefüttert. In den Versuchen setzten wir Ratten mit einem Gewicht von 100-200g ein, die über Nacht nüchtern gesetzt wurden.

3.2. METHODEN

3.2.1. Isolierung von Azini aus dem Rattenpankreas

Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRH):

HEPES	25 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM
NaCl	104 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	2 mM
D-Glucose	2,5 mM
BSA	0,2 %
Sojabohnen-Trypsininhibitor	0,01 %
Glutamin	2 mM
Aminosäuren (MEM)	1 x

Die Ratten wurden enthauptet, das gesamte Pankreas vorsichtig präpariert und in eiskalten oxygenierten KRH-Puffer gegeben. Zunächst wurden Fett- und Bindegewebe entfernt und 200 Einheiten Kollagenase (1 Einheit/ μ l in KRH) in 6 ml KRH in das Pankreas mehrfach injiziert. Nach dem Zerkleinern mit einer Schere wurde das Gewebe für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgten weitere 20 Minuten manuelles Schütteln in einem Reaktionsgefäß bis die Azini die gewünschte Größe erreicht haben. Die Zellen wurden dann durch ein Netz (Porengröße 200 μ m) gestrichen und anschließend für 5 Minuten bei 100xg zentrifugiert. Um die restliche Kollagenase zu entfernen wurden die Azini in kollagenasefreiem KRH-Puffer zweimal gewaschen. Vor allen weiteren Versuchen, wurden die Azini zwischen 1 bis 2 Stunden im Wasserbad bei leichtem Schütteln und Begasung mit O₂ (in 30 Minuten Intervallen) äquilibriert, um Stressreaktionen durch die Isolation abklingen zu lassen.

Die Qualität der Präparation wurde lichtmikroskopisch nach Zusatz von Trypanblau überprüft. Der Anteil geschädigter, permeabler Zellen, die durch Trypanblau angefärbt werden, lag regelmäßig unter 5 %.

3.2.2. Amylasesekretionsstudien an frisch isolierten Rattenazini

Frisch isolierte Rattenpankreasazini wurden in 80 ml KRH-Puffer resuspendiert und langsam gerührt. Je 1 ml Azinisuspension wurden in Reaktionsgefäßen verteilt, kurz mit O₂ begast und dann entsprechend stimuliert. Die Stimulation mit CCK-Konzentrationen zwischen 1 pM und 100 nM erfolgte für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Am Ende der Stimulation wurde von jeder Zellsuspension eine Probe entnommen und in ein Mikrozentrifugengefäß überführt, welches ein 2:1 Gemisch (v/v) bestehend aus Phtalsäuredibutylester und Phtalsäure-di-,„isononyl“-ester (Fluka, Buchs, Schweiz) mit einem spezifischen Gewicht von 1,063 enthielt. Durch Zentrifugation (10000xg) wurden die Zellen vom Überstand getrennt. Die sezernierte Amylase wurde im Überstand mittels der AMYL MPR2-Methode (Roche, Basel, Schweiz) bestimmt. Die gesamte in der Zelle vorhandene Amylase wurde nach Lyse der Zellen in 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,8 und 0,1 % SDS ermittelt. Für jede Parameter wurde 3-fach Messungen durchgeführt.

3.2.3. Immunfluoreszenzfärbung

PBS (phosphate buffered saline):

NaCl	123,2 mM
Na ₂ HPO ₄	20,13 mM
KH ₂ PO ₄	10,43 mM

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Deckgläschen (Ø13cm) mit Poly-L-Lysin (Sigma)/Wasser (1:9) beschichtet, nach 15min Inkubation mit Wasser gewaschen und über Nacht luftgetrocknet. Stimulierte oder unstimulierte Azini wurden auf die Deckgläschen mit „Cell Saver“ Spitzen aufgetragen und für 3-5 Minuten absetzen gelassen. Anschließend folgte eine 10 minütige Fixierung mit 4 % Formaldehyd in PBS. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 10 min) erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch 0,5 % Triton X-100 in PBS. Die unspezifische Bindung von Antikörpern wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 3 % BSA

in PBS geblockt. Die primären Antikörper (in PBS) inkubierten entweder für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Fluorochrom gekoppelten Antikörper oder mit 0,2 µM Oregon Green konjugiertem Phalloidin erfolgte für zwei Stunden im Dunkeln bei Raum Temperatur. Danach wurden die Objektträger dreimal gewaschen, bevor die Azini in Mowiol (Calbiochem, Bad Soden) eingebettet und auf Objektträger aufgebracht wurden. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (TCS 4D, Leica, Heidelberg).

3.2.4. Herstellung von Proteinextrakten

Je nach Fragestellung wurden die folgenden Lysepuffer verwendet.

Deoxycholat/Triton-Lysepuffer:

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EGTA	1 mM
EDTA	0,4 mM
Triton X-100	1 %
Deoxycholat	1 % (wt/vol)
Na-Orthovanadat	0,5 mM
Na-Fluorid	5 mM
Sojabohnen-Trypsininhibitor	1 mg/ml
PMSF	1 mM
Aprotinin	1,4 µg/ml
Leupeptin	10 µg/ml

Dieser Puffer wurde für die Analyse tyrosinphosphorylierter Proteine und die Kinaseaktivitätsbestimmung verwendet.

DTT/Triton X-100-Lysepuffer (nach Antibody Array, Biocat, Heidelberg):

Tris/HCl, pH 7,5	15 mM
NaCl	120 mM
KCl	25 mM
EGTA	2 mM
EDTA	2 mM
DTT	0,1 mM
Triton X-100	0,5 %
Na-Orthovanadat	0,5 mM
Na-Fluorid	5 mM
Sojabohnen-Trypsininhibitor	1 mg/ml
PMSF	1 mM
Aprotinin	1,4 µg/ml
Leupeptin	10 µg/ml

Dieser Puffer wurde zur Ko-Immünpräzipitation der Yes-Pyk2 Proteinkomplexe verwendet.

Die jeweiligen Stimulationen wurden durch die Zugabe von eiskaltem KRH-Puffer gestoppt und anschließend wurden die Zellen bei 500xg pelletiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Azini wurden in je 200 – 400 µl Lysepuffer resuspendiert und für 5 Sekunden mit Ultraschall homogenisiert. Die anschließende Inkubation auf Eis dauerte für die Isolation von Protein-Protein Komplexen 30 Minuten und für alle anderen Isolationen 10 Minuten. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für mindestens 20 Minuten bei 10000xg bei 4°C pelletiert.

3.2.5. Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt der Extrakte wurde nach einer modifizierten Methode nach Bradford unter Verwendung des BioRad Protein Assays (BioRad, München) und einer BSA-Eichgeraden bestimmt (0,7mg/ml; 0,5mg/ml; 0,3mg/ml; 0,1mg/ml).

Die Probe wurde 1:10 mit Wasser verdünnt. In Einmal-Küvetten wurden je 790 μl Wasser (für die Proben und Standards) bzw. 800 μl (für den Leerwert) vorgelegt. Alle Werte wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Je 10 μl der verdünnten Proben bzw. der Standards wurden in die Küvetten pipettiert und auf dem Vortex gut gemischt. Nach Zugabe von je 200 μl verdünntem BioRad Reagenz (1:5) wurden die Proben abermals auf dem Vortex gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm bestimmt und mit Hilfe der Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration berechnet.

3.2.6. Subzelluläre Fraktionierung

Die jeweiligen Stimulationen wurden durch die Zugabe von eiskaltem KRH-Puffer und Zentrifugation bei 500xg gestoppt. Das Zellpellet wurde in 200 μl eiskaltem KRH inklusive der in den Lysepuffern angegebenen Phosphatase- und Proteaseinhibitoren resuspendiert und in einem Hand-Homogenisator (Dounce, eng) homogenisiert. Nach Zentrifugation mit 150.000xg (20 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand als zytosolische Fraktion abgenommen. Das Pellet wurde in 500 μl 0,3 M Saccharose resuspendiert und anschließend mit 750 μl 2 M Saccharose gemischt, um eine Endkonzentration von 1,32 M Saccharose zu erreichen. Überschichtet wurde mit 500 μl 0,3 M Saccharose und bei 4°C mit 100.000xg für 30 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das weiße Membranband zwischen den beiden Phasen vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgezogen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Membranfraktion wurde mit dem 3-fachen Volumen KRH gemischt und bei 4 °C mit 100.000xg für 45 Minuten abzentrifugiert. Das Membranpellet wurde in Deoxycholat/Triton X-100 Lysepuffer resuspendiert und zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

3.2.7. Immunpräzipitation

3.2.7.1. Tyrosinphosphorylierung und Kinaseaktivität

350 – 500 µg Protein wurden in 700 µl Lysepuffer aufgenommen. Zu diesem Gemisch wurden die jeweiligen Mengen Primärantikörper zugegeben (siehe Tabelle 1). Gleichzeitig wurden je 4 µg Brückenantikörper (anti-Maus IgG H+L, Pierce) und 30 µl Protein-A-Agarose Beads (Oncogene) dazu pipettiert und bei 4°C über Nacht kontinuierlich gemischt. Danach wurden die Beads 3x mit Lysepuffer gewaschen, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen. Beim letzten Waschen, wurde der gesamte Überstand abgezogen und das so konzentrierte und gereinigte Protein konnte für weitere Untersuchungen verwendet werden.

3.2.7.2. Isolation von Protein-Protein Komplexen

500 – 750 µg Protein wurden ebenfalls in 700 µl Lysepuffer aufgenommen. Zu diesem Gemisch wurde der Primärantikörper gegeben und über Nacht kontinuierlich bei 4 °C gemischt. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe von Brückenantikörper und Protein-A-Beads. Die Proben wurden für 2 weitere Stunden bei 4 °C unter ständigem Mischen inkubiert. Nach 3maligem Waschen mit Lysepuffer, wurde der letzte Überstand vollkommen abgesaugt, und die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 Minuten von den Beads getrennt anschließend gelelektrophoretisch aufgearbeitet.

3.2.7. Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE

Verwendete Puffer (nach Lämmler 1970):

10 x SDS-Laufpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	191 mM
	SDS	10 % (w/v)
Trenngelpuffer	Tris, pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4 %
Sammelgelpuffer	Tris, pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4 %
4 x SDS-Probenpuffer	Tris, pH 6,8	250 mM
	Glycerin	40%
	SDS	10%
	2-Mercaptoethanol	20%
	Bromphenolblau	1 mg

Es wurde das System der diskontinuierlichen SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese in modifizierter Form nach Lämmler 1970 angewandt. Als Elektrophoreseapparatur diente die Mini-Protean II (BioRad, München). Aufgetragen wurde je 20 µg Gesamtprotein der Lysate bzw. der Überstand der Immunpräzipitate, die zuvor mit 4x-SDS-Probenpuffer versetzt und hitzedenaturiert (5 min, 95°C) wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA im Sammelgel und 35 mA im Trenngel.

3.2.8. Western-Blotting

Übertragungspuffer für den Immunblot:

Anodenpuffer I:	Tris-Base	0,3 M
	Methanol	20%
Anodenpuffer II:	Tris-HCl, pH 10,4	0,025 M
	Methanol	20%
Kathodenpuffer:	6-Aminocapronsäure	0,04 M

Um die im SDS-Polyacrylamidgel vorliegenden Proteine für Antikörper zugänglich zu machen, wurden sie mit Hilfe des „Semi-dry-blotting“ Verfahrens auf PVDF-Membranen (Immobilon™ 0,45 µm, Millipore, Eschborn) für 40 Minuten bei einer Stromstärke von 0,85 mA pro cm² übertragen. Dies erfolgte mit der Blotapparatur Novablot von Pharmacia (Freiburg). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2.9. Detektion der Proteine mit Antikörpern

Blockpuffer: a) TBS-Earp + 2% BSA (Fraction V, Fluka, Buchs) + 0,1% Tween20

b) TBS-Earp + 2% BSA (Fraction V, Fluka, Buchs) + 2% fettfreie Trockenmilch

c) TBS-Earp + 3 – 5 % fettfreie Trockenmilch + 0,1 % Tween20

TBS-Earp:	Tris-HCl, pH 7.2	10 mM
	NaCl	150 mM

Um unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Membranen 1h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C in dem entsprechenden Blockpuffer unter leichtem Schwenken abgesättigt. Zum Blockpuffer wurde anschließend die Antikörperlösung bzw. das Antiserum in der entsprechenden Arbeitsverdünnung (siehe Tab. 1) zugesetzt und darin die Membranen 1h bei RT bis maximal über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nicht gebundene Antikörper

wurden durch dreimaliges Waschen (10 min, RT) mit TBS-Earp + 0,05% Tween20 entfernt. Die Detektion erfolgte mit einem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten sekundären Antikörper, mit dem die Membran in Blockpuffer für 1 Stunde unter leichtem Schwenken inkubiert wurde. Nach weiterem dreimaligem Waschen, wie oben beschrieben, wurde unter Verwendung des Chemilumineszenz-Kits Super Signal[®] (Pierce, Rockford) die Lichtreaktion gestartet und die Signale durch Auflegen eines Röntgenfilmes (AGFA Cronex 5, Köln) detektiert. Zur mehrmaligen Verwendung der PVDF Membranen wurde die Membran mit Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, IL) nach der Beschreibung verwendet.

3.2.10. India-Inkfärbung

Diese Färbung wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinladung verwendet.

PBSI:	NaCl	165 mM
	Na ₂ HPO ₄	16,3 mM
	NaH ₂ PO ₄	1,5 mM
	Tween 20	0,05 %
Ink-Färbelösung:	PBSI	100 ml
	Ecoline Tinte	200 µl
	Eisessig	200 µl

Nach dem Immunoblot wurden die Membranen für 5 – 10 min in 0,2 N NaOH inkubiert. Anschließend folgten 3 10minütige Waschschrte mit PBSI. Danach wurden die Membranen für 15 min bis mehrere Stunden in der Ink-Färbelösung inkubiert. Nach einem anschließenden 2 x 2 min waschen in Wasser. wurden die Membranen luftgetrocknet und anschließend in Folie eingeschweißt.

3.2.11. Kinase Aktivität von Yes

Nach der Immunpräzipitation wurden die Beads einmal mit Lysepuffer und 2 mal mit Kinasepuffer gewaschen.

Kinasepuffer:	Mops, pH 7,0	20 mM
	MgCl ₂	5 mM
	Na-Orthovanadat	0,5 mM

Radioaktiver Kinaseassay

Der Src-Kinase-Assay wurde nach der von Bolen und Mitarbeitern (1987) beschriebenen Methode durchgeführt. Nach dem letzten Waschen wurde der gesamte Puffer abgesaugt und folgender Reaktionsansatz auf Eis zu den Proben pipettiert.

Reaktionsansatz:	20 µl Kinasepuffer
	2,5 µL 100 µM ATP
	10 µCi ³² P-γATP
	16 mg/ml Enolase

Die Reaktion erfolgte 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 12,5 µl 4 x SDS-Probenpuffer (nach Lämmler 1970) abgestoppt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C gekocht, 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und die erhaltenen Überstände gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf PVDF Membran übertragen und diese in Folie eingeschweißt. Gebundene Radioaktivität wurde durch Exposition bei -70°C auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Kodak, Baden-Baden) sichtbar gemacht.

Nichtradioaktiver Kinaseassay

Nach dem letzten Waschschrift wurde die gesamte Flüssigkeit abgesaugt und die Proben mit Hilfe des Kits von Boehringer Mannheim untersucht (Nonradioactive Tyrosine Kinase Kit, Boehringer Mannheim). Als Substrat wurde PKS2 verwendet

und die Kinasereaktion wurde mit einer ATP Konzentration von 10 mM bei 37 °C für eine Stunde durchgeführt. Alle weiteren Schritte wurden nach Anleitung bearbeitet. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen (Referenzwellenlänge 620 nm).

3.2.12. Densitometrische Auswertung von Immunoblots

Zum densitometrischen Vergleich der Bandenstärken wurden exponierte Röntgenfilme mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Sharp JX-330) gescannt und mit der 1D Software der Firma Phoretix (New Castle upon Thyne, Großbritannien) analysiert.

3.2.13. Isolierung von RNA aus Azini

Die Stimulation von isolierten Azini wurde mit eiskaltem RNase freiem PBS abgestoppt, bei 1000 rpm 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolation der RNA wurde nach dem Protokoll von Promega (SV Total RNA Isolation System, Promega, Mannheim) durchgeführt.

3.2.14. Überprüfen der Reinheit und Qualität der RNA

Konzentrationsbestimmung

Die isolierte RNA wurde 1:100 mit Wasser verdünnt und die Absorption wurde bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Aus der Absorption bei 260 nm wurde die RNA-Konzentration berechnet und aus dem Verhältnis 260/280 nm ergab sich die Reinheit der isolierten RNA.

Konzentrationsberechnung: Absorption von 1 = 40 µg/ml

Agarosegel-Elektrophorese

Zur weiteren Kontrolle der Qualität der isolierten RNA wurden jeweils 5 µg RNA in der Gelelektrophorese untersucht.

10x Mops-Puffer:	Mops	4,2 g
	Natriumacetat (3M, pH 8,8)	1,67 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8, mit DEPC)	2 ml
	NaOH (10 M, mit DEPC)	→ auf pH 7
	DEPC-Wasser	→ auf 100 ml

Vor dem Giessen des Gels wurde die Laufkammer und die Gelkammer mit 30 % H₂O₂ für eine halbe Stunde inkubiert und anschließend mit DEPC-Wasser ausgespült. Für das Agarosegel wurden 0,5 g Agarose mit 37 ml H₂O in der Mikrowelle aufgeköcht und danach 5 ml 10x Mops hinzugegeben. Die Agarosemischung wurde unter fließendem Wasser auf ca. 60°C abgekühlt und danach 8 ml 37 % ige Formaldehyd dazu pipettiert und gut gemischt. Bei 50° C wurde dann die Agarosemischung in die Gelkammer gegossen. Nachdem des Gel fest war (ca. 45 Minuten Polymerisationszeit) wurde die Laufkammer mit 1 x Mops aufgefüllt.

Probenpuffer:	Formamid	500 µl
	Formaldehyd	167 µl
	10 x Mops-Puffer	100 µl
	DEPC-Wasser	233 µl

Ladepuffer:	100 µl LB (nach Maniatis, mit DEPC-Wasser)
	15 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Für die Elektrophorese wurden 5 µg RNA pro Ansatz eingesetzt. Die Proben wurden für ca. 15 Minuten im Speed Vac Concentrator (Savant, Bachhofer GmbH) zentrifugiert um die Lösungsmittel abzdampfen. Das RNA-pellet wurde in je 16 µl Probenpuffer gelöst und bei 95°C für 5 Minuten gekocht und anschließend kurz auf Eis gestellt. Danach wurden je 5 µl Ladepuffer/Ethidiumbromid dazugegeben und

leicht gemischt. Die Proben wurden in das Gel geladen und bei 50 V für ca. 1 - 2 h getrennt.

3.2.15. Hybridisierung der Gene Arrays

Prähybridisierung der Filter

0,5 % iges SDS wurde gekocht und die Membranen (GF300 - GeneFilters® Rat Microarrays Release 1, Res Gen, Invitrogen) wurden vor jeder Prähybridisierung mit dieser Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

90 µl salmon sperm DNA (ssDNA) wurden 5 Minuten bei 95°C gekocht und kurz auf Eis abgekühlt. Danach wurde die ssDNA und 120 µl tRNA zu 12 ml Prähybridisierungspuffer gegeben. Die Prähybridisierung wurde für mehrere Stunden bei 42°C im Hybridisierungsofen durchgeführt.

Prähybridisierungspuffer:

Formamid	50 %
SSC	6x
Denhardt's	5x
NaPO ₄	50 mM
SDS	0,5 %

Reverse Transkriptase Reaktion (RT)

Jeweils 25 µg der RNA wurden auf 11 µl Flüssigkeit in der Speed Vac eingedampft. Für die RT wurde der Ambion Strip-EZ™ RT-Kit (Ambion, Austin, TX) eingesetzt.

25 µg RNA/ 11 µl
2 Ml Oligo (dt) von Ambion

→ Diese Mischung wurde 5 Minuten bei 65 °C gekocht und anschließend auf 42 °C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von:

- 2 µl 10x RT-Puffer
- 2 µl 10x dNTP
- 1 µl MMLV RT (Reverse Transkriptase)
- 2 µl (= 20 µCi) P³³-α dATP (Amersham)

→ Die RT wurde bei 37 °C für 1 – 2 Stunden durchgeführt.

Aufreinigung der cDNA

Zuerst wurde eine RNase H Verdau durchgeführt um die RNA zu entfernen. Dafür wurde jeweils 1 µl RNase H zur Probe gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die Aufreinigung der cDNA wurde mit Hilfe des Nukleotide Removal Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurde die Probe mit 50 µl EDTA (50 mM) aus den Säulen eluiert.

Kompetitierung der repetitiven cDNA-Sequenzen

- Kompetitions-Mix:
- 50 µl 20x SSC
 - 70 µl 10 mM Tris pH 8,0
 - 45 µl Rat Hybloc (1mg/ml) (Applied Genetics Laboratories, Melbourne, Australia)
 - 20 µl 1 % SDS

Der Kompetitions-Mix und die aufgereinigte cDNA wurden getrennt für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Danach wurden beide Ansätze zusammengegeben und für 40 Minuten bei 56 °C inkubiert.

Die kompetitierte cDNA wurde in frische Prähybridisierungslösung pipettiert und zu den Genfiltern gegeben. Die Hybridisierung wurde für mindestens 18 Stunden bei 42 °C im Hybridisierungsofen durchgeführt.

Waschen der Filter

Die Probe wurde verworfen und die Filter wurden 2 mal 5 Minuten mit 2x SSC; 0,1 % SDS bei RT gewaschen. Danach folgte zwei stringentere Waschschrirte bei 68 °C mit 0,2x SSC; 0,1 % SDS für jeweils 15 min. Die Gene Arrays wurden zwischen 2 Lagen Filterpapier gelegt um die restliche Flüssigkeit zu entfernen und in Folie eingepackt. Ein Phosphorscreen (Kodak, Stuttgart) wurde für ca. 5 Tage aufgelegt. Das Signal wurde mit Hilfe eines Phosphorscanners (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Sunnyville, CA) eingescannt und mit der Software Array Vision 6.0 (Imaging Research) ausgewertet.

4. ERGEBNISSE

4.1. REGULATION AUF PROTEINEBENE

4.1.1. Proteinexpression der Src-Kinasen

Um das Proteinexpressionsmuster der Src-Kinasen in azinären Pankreaszellen der Ratte zu untersuchen wurde 20 µg Gesamtprotein aus isolierten Azini des Rattenpankreas extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Western Blot wurde das Protein auf PVDF Membran übertragen und auf die Expression ubiquitär exprimierter Kinasen der Src-Familie untersucht. Es wurden Antikörper gegen die Kinasen Yes, Src, Lyn und Fyn eingesetzt.

Yes und Lyn werden in den azinären Pankreaszellen der WAG Ratte exprimiert, wohingegen Src und Fyn nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 5). Für die Kinase Src setzten wir eine Kontrolle ein (Zelllysat der Zelllinie A431) da in der Literatur Src in azinären Zellen beschrieben ist (Nozu et al. 1999). In unseren Ratten ist jedoch die Kinase Src nicht nachweisbar.

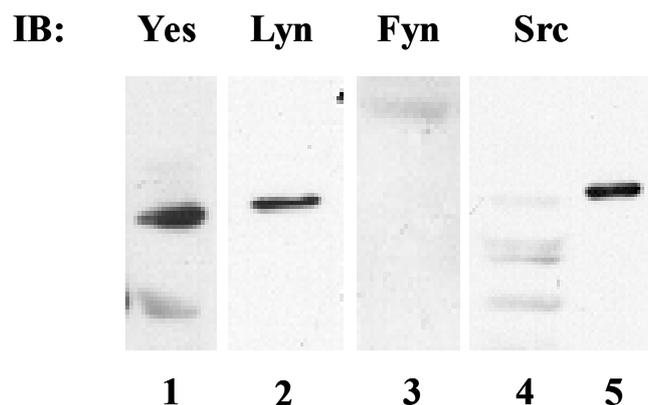
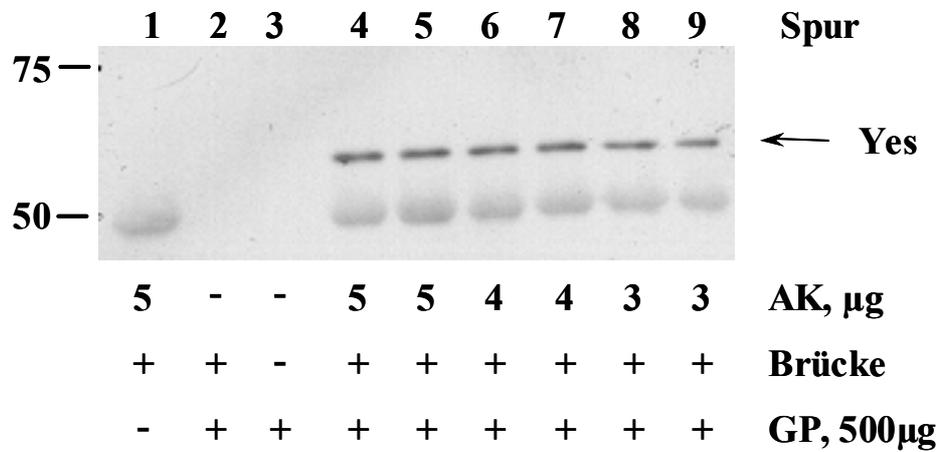


Abb. 5: Expression von Kinasen der Src Familie in den azinären Zellen der WAG Ratte. Spur 1 bis 4: Gesamtprotein; Spur 5: Positivkontrolle für Src (Zelllysat von A431).

4.1.2. Tyrosinphosphorylierung von Yes nach CCK Stimulation

Austesten der Konzentrationen für die Immunpräzipitation mit Yes

Um reines Protein mit maximaler Ausbeute aus den Gesamtlysaten zu isolieren, wurden die Bedingungen für die Immunpräzipitation mit Yes ausgetestet. Verschiedene Mengen Gesamtprotein wurden mit unterschiedlichen Mengen Antikörper inkubiert. Außerdem wurde die Spezifität des Antikörpers gegen Yes untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunpräzipitation spezifisch ist, da es keine unspezifischen Bindungen mit der Brücke oder den Protein-A Agarose Beads gibt. Der Antikörper erkennt auch keine anderen Bestandteile des Lysepuffers. Für eine Menge von 500 µg Gesamtprotein ist eine Antikörpermenge von 4 µg ausreichend.

IP Yes : IB Yes

Spur	AK Menge	absolute Intensität
1	Negativkontrolle	0,2
2	Negativkontrolle	0,2
3	Negativkontrolle	0,3
4	5 µg	5,9
5	5 µg	5,6
6	4 µg	5,4
7	4 µg	5,6
8	3 µg	4,7
9	3 µg	4,0

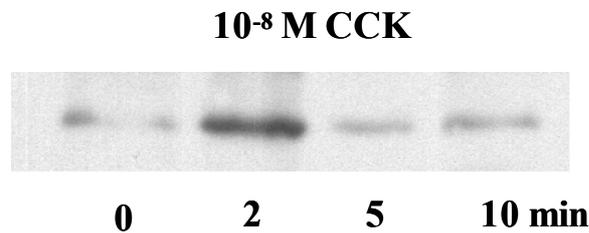
Abb. 6: Bestimmung der Antikörperkonzentrationen für die Immunpräzipitation mit Yes. 3 Kontrollen für die Spezifität der Antikörpers (AK): ohne Gesamtprotein (GP), ohne AK und ohne AK und Brücke. 500 µg Gesamtprotein wurden mit verschiedene Mengen primärem Antikörper (anti-Yes) inkubiert. Für diese Menge Gesamtprotein ist 4 µg AK ausreichend um die gesamte Menge Yes aus dem Lysat zu konzentrieren. Die Tabelle zeigt die densitometrische Auswertung des Immunoblot.

Abhängigkeit der Yes-Tyrosinphosphorylierung von CCK

Die Aktivität von Kinasen der Src-Familie wird durch die Änderung der Phosphorylierung an ihren Tyrosinresten reguliert. Deshalb untersuchten wir als erstes die Änderung der Tyrosinphosphorylierung der Kinase Yes nach Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK-Konzentrationen. Isolierte Azini wurden mit CCK (10^{-8} M) für unterschiedliche Zeiten stimuliert. Gesamtprotein wurde aus den stimulierten Azini isoliert und mit Hilfe der Immunpräzipitation wurde Yes aus dem Lysat konzentriert. Die Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF Membran übertragen und mit einem Phosphotyrosin spezifischen Antikörper gefärbt. Dieser Antikörper ist direkt mit HRP gekoppelt, deshalb war die Färbung mit einem sekundären Antikörper nicht notwendig.

Die Stimulation von isolierten Azini mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen (10^{-8} M) führt zu einer reversiblen Tyrosinphosphorylierung der Src-ähnlichen Kinase Yes. Die densitometrische Analyse von 4 unabhängigen Experimenten ergab eine maximale Erhöhung der Phosphorylierung um den Faktor $2,3 \pm 0,4$ (Mittelwert \pm Standardfehler) gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Maximale Phosphorylierung wurde bereits nach 2 Minuten Stimulation erreicht. Es handelt sich um eine transiente Phosphorylierung, welche bereits nach wenigen Minuten wieder abfällt (Abb. 6).

A)



B)

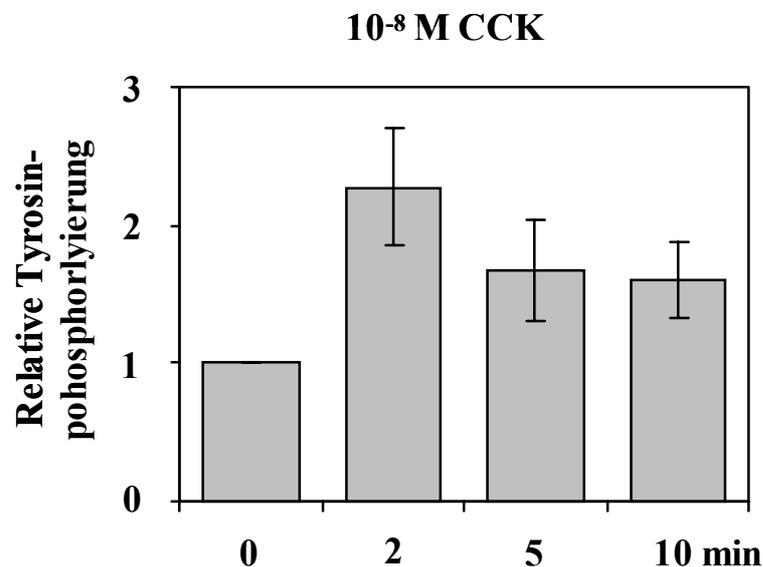


Abb. 6: Tyrosinphosphorylierung von Yes nach Stimulation mit 10⁻⁸ M CCK. A) zeigt die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung von Yes nach Stimulation. B) Densitometrische Auswertung von 4 unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM).

4.1.3. Kinaseaktivität von Yes

Kinasen der Src-Familie haben zwei Tyrosinreste welche für den Aktivitätszustand der Kinasen verantwortlich sind. Im Fall von Yes befindet sich am Tyr 527 die Deaktivierungsstelle. Wenn dieses Tyrosin phosphoryliert ist, liegt die Kinase in einer geschlossenen Konformation vor und ist inaktiv. Erst in der offenen

Konformation ist es möglich, dass der Tyrosinrest in Position 424 autophosphoryliert wird und dies führt zur vollständigen Aktivierung von Yes als Kinase. Aus den Ergebnissen der Änderung der Tyrosinphosphorylierung kann man also noch nicht eine Aktivitätssteigerung schlussfolgern. Deshalb wurde im Folgenden die Kinaseaktivität von Yes untersucht.

Autophosphorylierung

Isolierte Azini wurden mit CCK stimuliert. Aus dem Gesamtlisat wurde Yes immunpräzipitiert und ein radioaktiver Kinase Assay wurde durchgeführt. Die Proben wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF Membran übertragen und ein Film für 24 Stunden aufgelegt. Maximale Autophosphorylierung wurde bereits nach einer Minute Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen erreicht. Die maximale Autophosphorylierung lag beim 2,5 fachen der unstimulierten Kontrolle (Abb. 7).

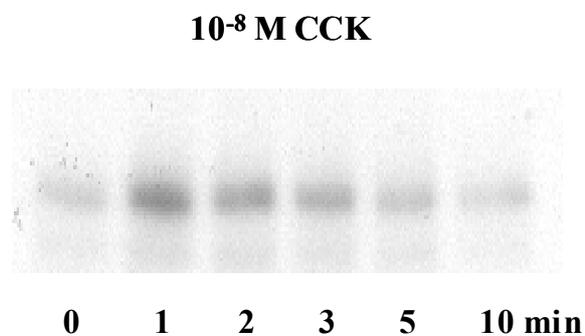


Abb. 7: Autophosphorylierung von Yes nach Stimulation mit 10^{-8} M CCK. Nach der Stimulation mit CCK wurde aus dem Gesamtlisat Yes immunpräzipitiert und in einem Kinaseassay mit radioaktiven ATP versetzt.

Substratphosphorylierung durch Yes

Die Autophosphorylierung von Yes ist ein Indikator für dessen Kinaseaktivität, da die volle Aktivität erst durch den Einbau eines Phosphorrestes am Tyr 424 erreicht wird. Um die Aktivitätsänderung der Kinase zu bestätigen, benutzten wir ein

spezifisches Substrat für Src-ähnliche Kinasen. Nach Stimulation mit CCK wurde Yes aus dem azinären Zelllysate durch Immunpräzipitation isoliert. Dieses IP-Produkt wurde in einem nichtradioaktiven Kinaseansatz verwendet.

Der Anstieg der Aktivität von Yes nach CCK war zeit- und konzentrationsabhängig (Abb. 8). Bereits nach 2 Minuten Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK-Konzentrationen (10^{-8} M) kam es zur maximalen Substratphosphorylierung. Diese erreichte eine Peak von $2,5 \pm 0,5$ (Mittelwert \pm Standardfehler) über der unstimulierten Kontrolle. Die Aktivität fiel bereits nach 3 Minuten leicht ab und blieb dann jedoch auf diesem niedrigeren Niveau von 2x im Vergleich zur Kontrolle. Die Aktivitätssteigerung von Yes folgt dem zeitlichen Verlauf der gemessenen Tyrosinphosphorylierung und erreicht auch das gleiche Maximum. Die Stimulation mit maximal sekretorischen CCK-Konzentrationen (10^{-10} M) hingegen zeigte keine Aktivierung von Yes.

Um zu verdeutlichen, dass Yes nur über den niederaffinen CCK-Rezeptor stimuliert wird (da Aktivierung bei 10^{-8} M und nicht bei 10^{-10} M), untersuchten wir die Aktivität der Kinase mit Hilfe eines partiellen Agonisten des CCK-Rezeptors. CCK-OPE zeigt auch bei hohen Konzentrationen (10^{-8} M) keine Inhibition der Sekretion von Amylase, welches darauf hinweist, dass CCK-OPE kein Agonist des niederaffinen CCK-Rezeptors ist. Selbst bei der Stimulation mit sehr hohen Konzentrationen von CCK-OPE (10^{-8} M) wurde Yes nicht aktiviert (Abb. 8).

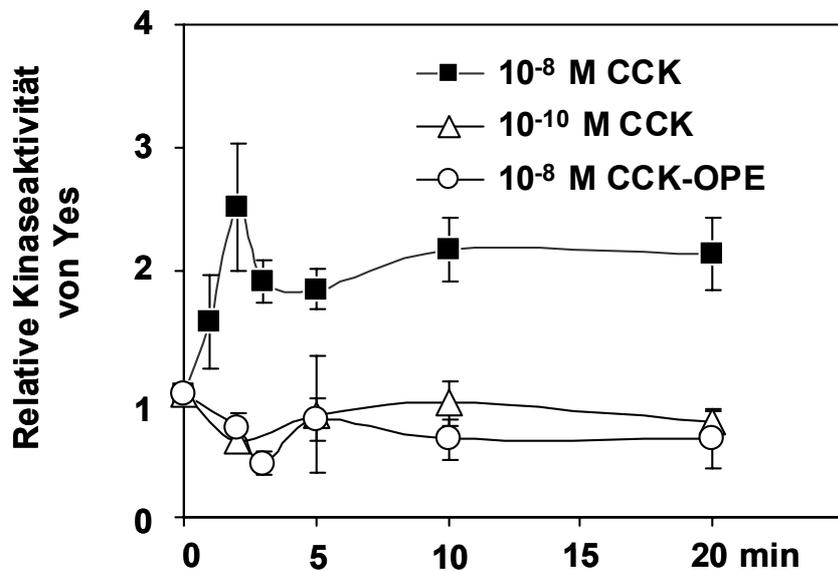


Abb. 8: Untersuchung der Kinaseaktivität von Yes. Azini wurden mit verschiedenen Konzentrationen von CCK und CCK-OPE stimuliert und die Änderung der Kinaseaktivität wurde gemessen. Quantitative Auswertung von je 3 unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM).

4.1.4. Lokalisation und Umverteilung von Yes

Biochemische Untersuchung

Um auf die Funktion von Yes zu schließen, wurde zuerst die intrazelluläre Lokalisation der Kinase bestimmt. Aus isolierten und stimulierten Azini wurden plasmamembran- und zytosolische Fraktion isoliert und elektrophoretisch untersucht. Yes war in beiden Fraktionen nachweisbar. Nach Stimulation mit CCK (10^{-8} M) kam es zu einer transienten Umverteilung zur Membranfraktion. Bereits nach 5 Minuten Stimulation konnte in der Membran $2,7 \pm 0,5$ mal mehr Yes als in der unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden. Als Kontrolle für das gleichmäßige Beladen des Gels, wurde die Membran von allen gebundenen Antikörpern mit Hilfe gereinigt und mit E-Cadherin gefärbt. Für E-Cadherin konnte durch Leser et al. gezeigt werden, dass sich nach supramaximaler CCK-Stimulation von Rattenazini das Verteilungsmuster des Proteins nicht ändert (Abb. 9).

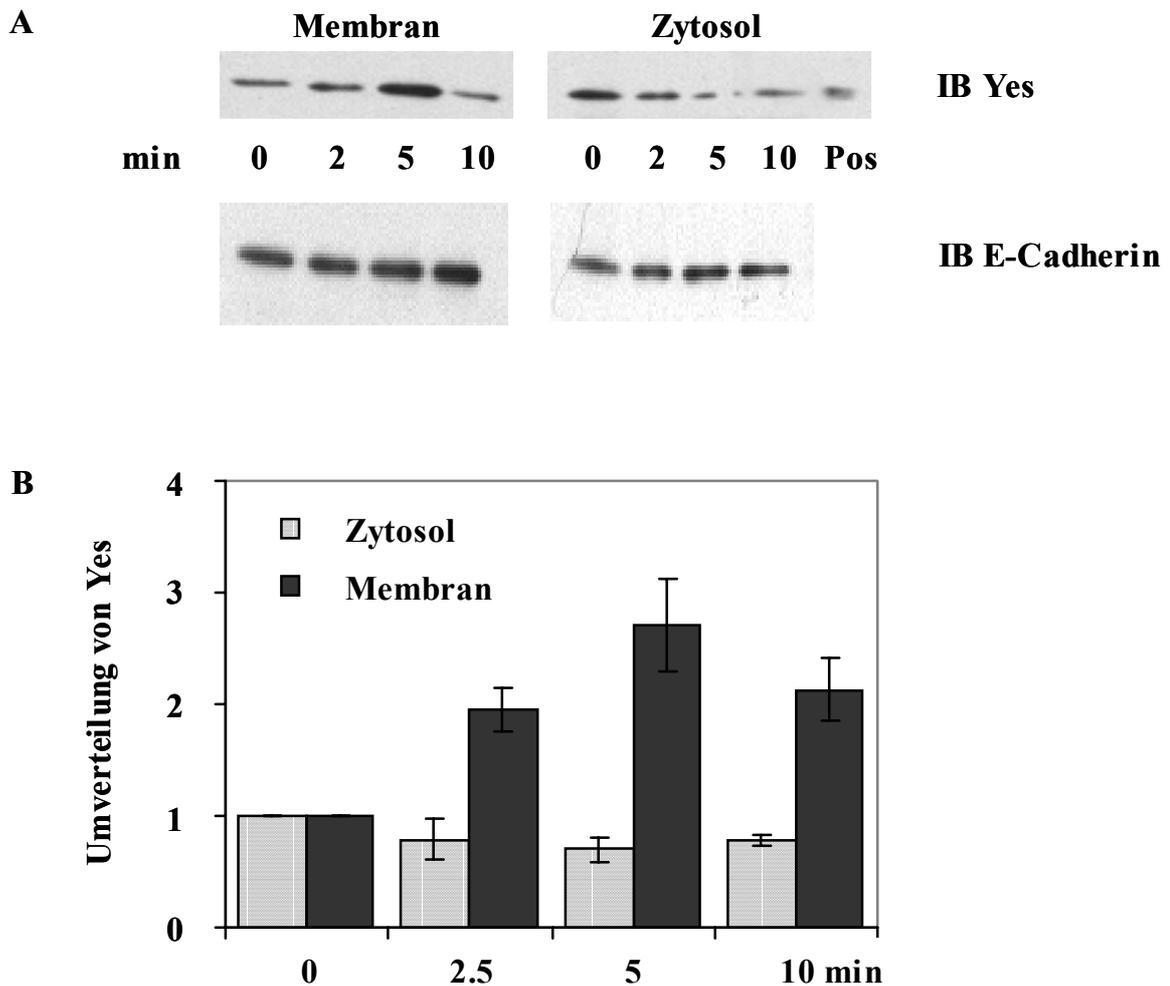


Abb. 9: Umverteilung von Yes nach Stimulation mit 10^{-8} CCK.

A) zeigt einen repräsentativen Immunoblot (Pos - Positivkontrolle für den anti-Yes Antikörper von Transduction – Zellysat Skn). Gleichmäßiges Laden wurde mit dem Immunoblot gegen E-Cadherin geprüft.

B) ist die quantitative Auswertung von 4 unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM).

Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisation von Yes in Rattenazini nach Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK genauer zu untersuchen, wurden isolierte Azini mit Hilfe der Immunfluoreszenz dargestellt. Nach Stimulation mit CCK (10^{-8} M) konnte die

Zunahme des Signals zur apikalen Membran spezifiziert werden (Abb. 10A). Dort lokalisiert Yes mit dem Aktinzytoskelett (Abb. 10B).

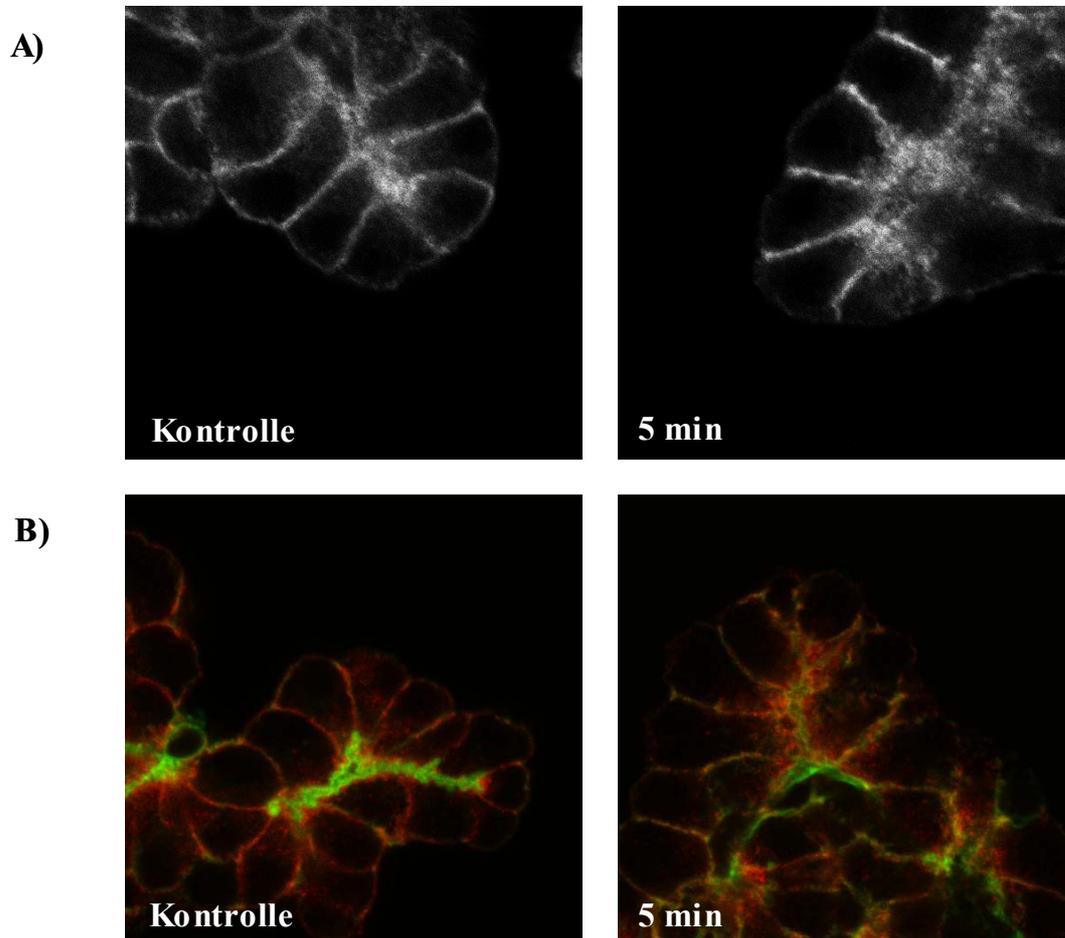


Abb. 10: Immunfluoreszenz nach Stimulation isolierter Azini mit 10^{-8} CCK.

- A) Lokalisation und Umverteilung von Yes.
- B) Kolokalisation von Yes (Cy3) mit dem F-Aktin. (Oregon Green Phalloidin).

Repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Experimenten.

4.1.5. Korrelation zwischen Aktinzusammenbruch und Yes-Aktivität

Der Zusammenbruch des apikalen Aktins in der azinären Pankreaszelle wird als einer der initialen Vorgänge bei der Zellschädigung durch eine supramaximal sekretorische CCK-Konzentration (10^{-8} M) beschrieben. Um den Einfluss von Yes

auf diese Aktinregulation zu untersuchen, wurden isolierte Azini mit 100 nM PP2 vorinkubiert und anschließend mit supramaximal sekretorischem CCK (10^{-8} M) stimuliert. Anschließend wurde filamentöses Aktin (F-Aktin) mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht.

In ruhenden Zellen findet man F-Aktin vor allem im apikalen Bereich der Zelle, wo es ein terminales Netzwerk bildet, welches in Fluoreszenzaufnahmen als scharf begrenztes Band sichtbar ist. In Zellen die mit maximal sekretorischen CCK Konzentrationen stimuliert wurden, ist der apikale Bereich weniger kontrastreich und dies deutet auf eine Auflockerung des F-Aktin hin. (Abb. 11) Diese Auflockerung scheint für die Sekretion notwendig zu sein, damit Enzymgranula mit der apikalen Membran verschmelzen können und die Exozytose stattfindet (Muallem et al. 1995; O'Konski et al. 1990; Valentijn et al. 1999b). Nach Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK-Konzentrationen kommt es bereits nach wenigen Minuten zum Zusammenbruch des Aktinzytoskelettes. Die Hemmung der Kinasen der Src-Familie (mit 100 nM PP2) reduziert den Zusammenbruch des F-Aktins. (Abb. 11)

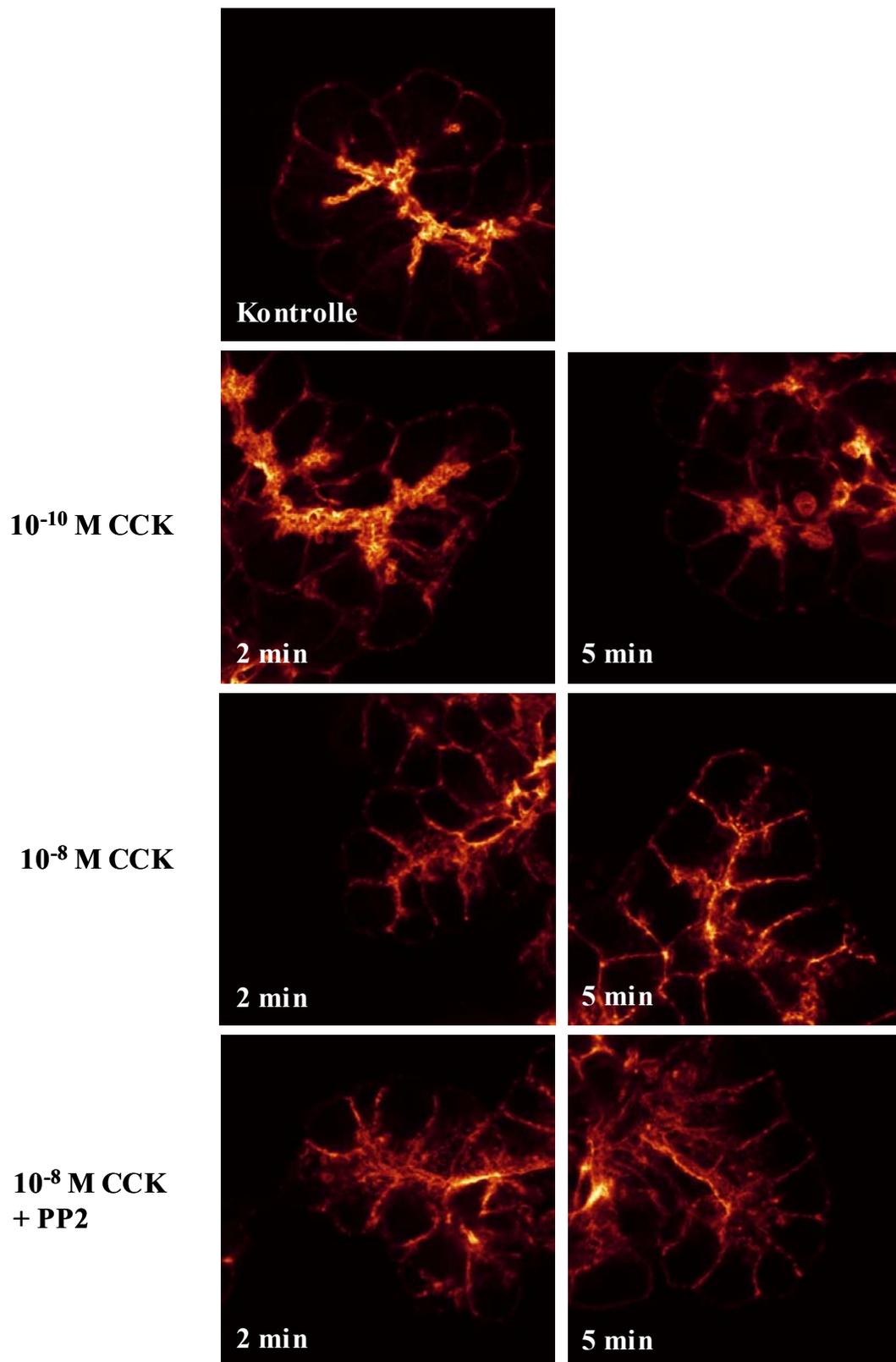


Abb. 11: Verminderung des Aktinzusammenbruchs nach Stimulation mit supramaximal sekretorischer CCK Konzentration durch Inhibition der Src-Kinasen. Isolierte Azini wurden mit verschiedenen Konzentrationen CCK stimuliert und wenn zutreffend mit 100 nM PP2 vorinkubiert. Repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Experimenten

4.1.6. Sekretion aus isolierten Azini

Die Funktion der Azini des Pankreas ist die Sekretion von Verdauungsenzymen. Während der induzierten Zellschädigung der azinären Pankreaszellen durch die Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK wird die Amylasesekretion inhibiert. Um den Einfluss von Yes auf die Sekretion zu untersuchen wurde die Amylasesekretion unter Einsatz eines spezifischen Src-Familien Inhibitors (PP2) bestimmt. Isolierte Azini wurden mit unterschiedlichen CCK Konzentrationen für 30 Minuten stimuliert und die Freisetzung von Amylase ins Medium wurde gemessen.

Die Sekretion zeigte einen biphasischen Verlauf mit maximaler Amylasefreisetzung bei einer CCK Konzentration von 10^{-10} CCK. Höhere CCK Konzentrationen führten zu einem Abfall der Sekretion auf $49 \pm 1,3\%$ bei zellschädigenden CCK Konzentrationen (10^{-8} M) im Vergleich zur maximalen Sekretion (Abb. 12A). Durch die Inhibition mit PP2 wurde der Abfall der Sekretion bei supramaximal sekretorischer CCK Konzentration (10^{-8} M) verringert. Dieser Effekt war abhängig von der Konzentration des Inhibitors. Bei einer Konzentration von 100 nM PP2 stieg die Amylasesekretion auf $73 \pm 7\%$ der maximalen Antwort an (Abb. 12B). PP2 hatte mit dieser Konzentration keinen Effekt auf die maximale Sekretion (Abb. 13).

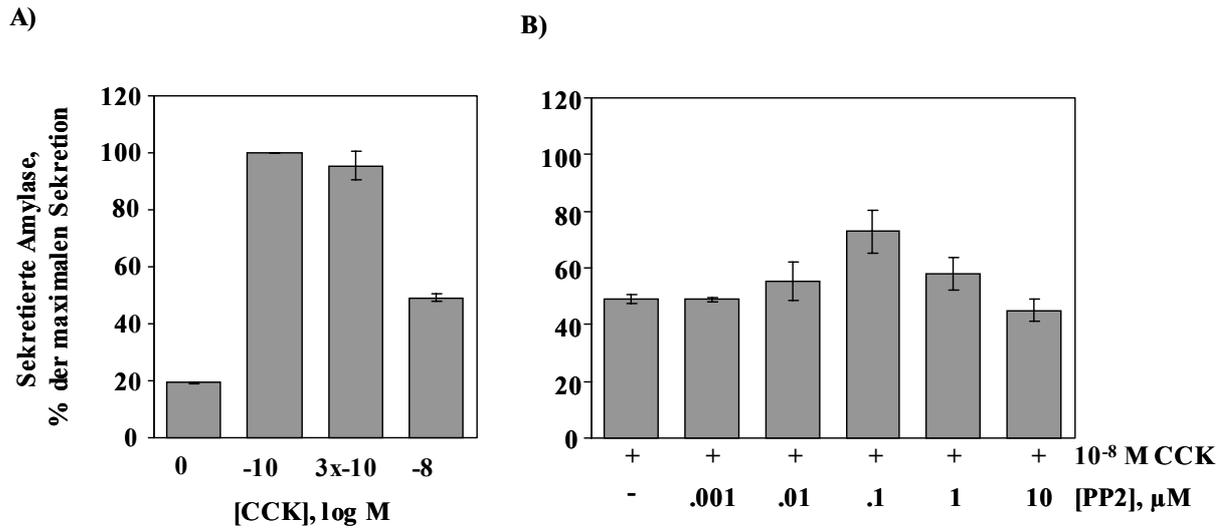


Abb. 12: Amylasesekretion in isolierten Azini. A) biphasische Sekretionskurve nach 30 min Stimulation mit CCK. B) Inhibition von Yes mit dem spezifischen Inhibitor PP2 bei Stimulation mit supramaximalen (10^{-8} M) CCK-Konzentrationen. Quantitative Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM)

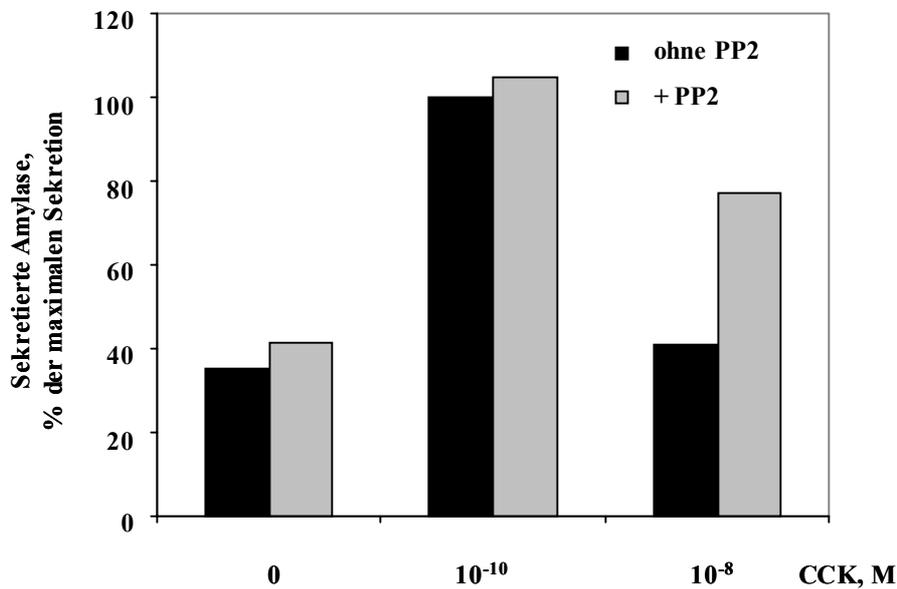


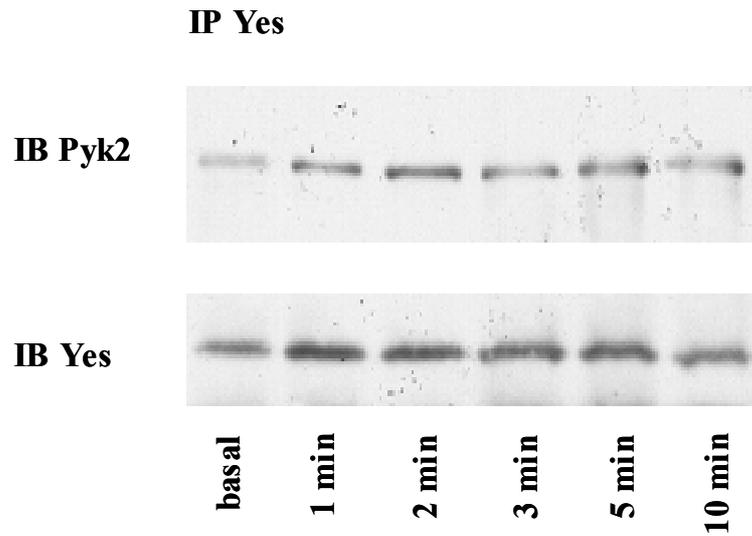
Abb. 13: Amylasesekretion in isolierten Azini. Einfluss von 100 nM PP2 auf die Amylasesekretion bei maximal sekretorischen (10^{-10} M) und supramaximalen (10^{-8} M) CCK-Konzentrationen.

4.1.7. Yes-assoziierte Proteine

Für die Kinasen der Src-Familie sind viele Substrate beschrieben, welche sowohl in „Focal Adhesion“ als auch in „Adherens junctions“ zu finden sind. Mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation versuchten wir Bindeproteine für Yes zu finden, um auf dessen Funktion beim Zusammenbruch des Aktins schließen zu können.

Isolierte Azini wurden mit CCK (10^{-8} M) stimuliert und Yes wurde mit Hilfe der Immunpräzipitation aus den Proteinextrakten isoliert. Im Immunoblot wurde nach potentiellen Bindungspartnern gesucht. Ko-Immunpräzipitation zeigte das mit FAK verwandte Protein Pyk2 als Bindepartner. Die Bindung stieg bereits nach 1 min Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen auf das $1,9 \pm 0,3$ fache an. (Abb. 14) Die dem Pyk2 verwandte Kinase FAK und das „Adherens junction“ Protein p120^{ctn} welche beide als Substrat der Src-Kinasen in anderen Zellsystemen beschrieben sind, konnten nicht als Bindepartner nachgewiesen werden.

A)



B)

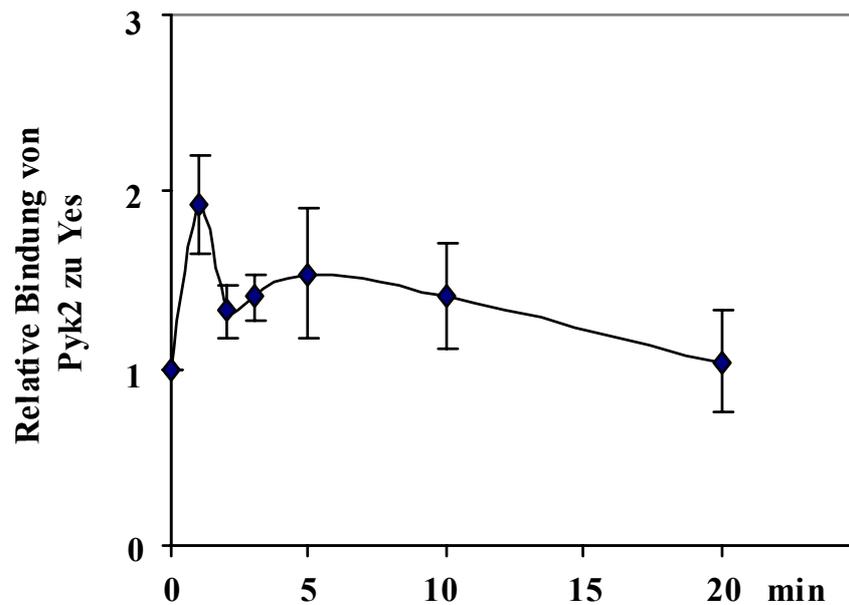


Abb. 13: Isolierte Azini wurden mit 10^{-8} M CCK stimuliert. Yes wurde immunpräzipitiert (IP) und der Immunoblot (IB) wurde mit Yes und Pyk2 gefärbt. A) Repräsentativer Immunoblot. B) Quantitative Analyse von 3 unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM).

Zur Bestätigung der Interaktion beider Proteine, untersuchten wir die Lokalisation von Pyk2 in unstimulierten und stimulierten Azini mit Hilfe der Immunfluoreszenz.

Pyk2 war in ruhenden Azini vorwiegend im Zytosol zu finden. Nach Stimulation mit 10^{-8} M CCK kam es zu einer transienten Umverteilung von Pyk2 zum apikalen Bereich der Zelle (Abb. 14). Die maximale Umverteilung war bereits nach 1 Minute Stimulation erreicht. Pyk2 Färbung befand sich im gleichen Bereich wie Yes und F-Aktin.

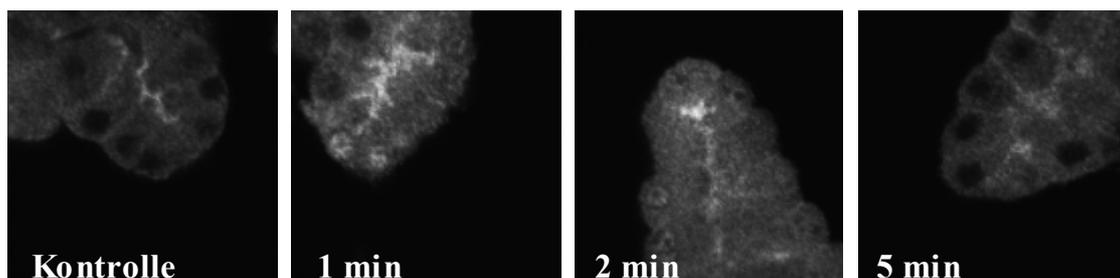


Abb.14: Subzelluläre Lokalisation von Pyk2 in isolierten Azinis. Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen (10^{-8} M). Immunfluoreszenzfärbung mit Pyk2 und Cy3-markiertem sekundärem Antikörper. Repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Experimenten.

4.2. GENEXPRESSION

Um weitere Proteine zu identifizieren welche bei der akuten Pankreatitis eine Rolle spielen, verglichen wir die Genexpression zwischen der durch CCK (10^{-10} M) induzierten Sekretion und der azinären Zellschädigung (10^{-8} M). Die initiale Phase der Pankreatitis geht mit dem Zusammenbruch des Aktins und einer Verringerung der Sekretion einher, wobei es in einer zweiten Phase zu einer entzündlichen Reaktion kommt, die jedoch noch nicht systemisch ist. Wir wählten eine Stimulation von 30 Minuten, da es möglich ist nach dieser Zeitspanne eine Expression von „immediate early“ Genen zu messen und es im Organ noch nicht zu einer systemischen Reaktion kommt.

4.2.1. Austesten der Konzentrationen für die Isolation von RNA

Für die Isolierung der RNA aus Azini wurde der SV Total RNA Isolation Kit von Promega benutzt. Da wir in unseren Versuchen keine Kulturzellen und auch keine gesamtes Organ für die Isolation benutzten, musste die Menge der isolierten Azini pro RNA Isolierung zuerst ausgetestet werden. Nach der Isolation der azinären Zellen wurde der Puffer kurzzeitig abgezogen und die Gesamtmenge der Zellen bestimmt (Gewicht). Nach dem Wiegen wurden die Zellen sofort wieder in KRH suspendiert. Verschiedene Mengen isolierter Zellen wurden für die Isolierung von RNA eingesetzt. Die optimale Menge azinärer Zellen für eine RNA Isolierung wurde anhand der Qualität, welche im Agarosegel untersucht wurde und der Menge isolierter RNA pro Ansatz ausgewählt. Die Reinheit bei den verschiedenen Ansätzen war ungefähr gleich (OD 260 nm/280 nm). Die beste Ausbeute bei durchschnittlicher Reinheit und guter Qualität wurde bei einer Menge von 30 mg eingesetzter Azini erreicht (Abb.15)

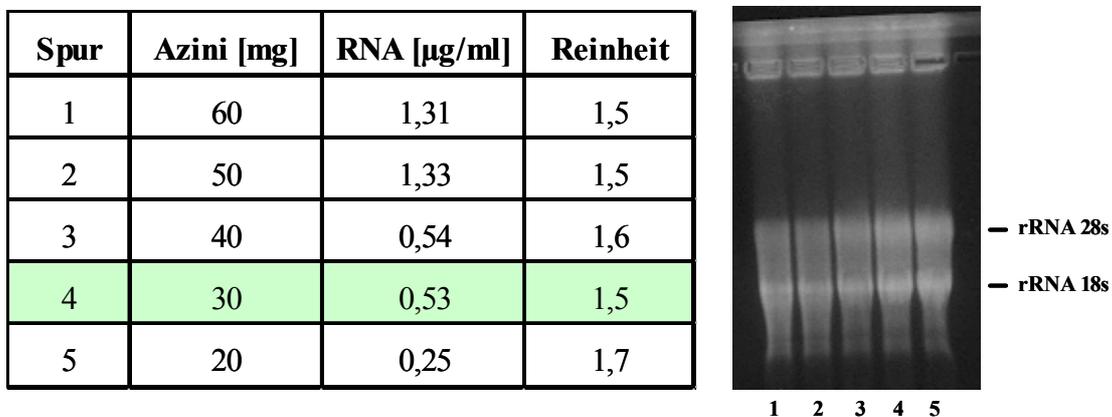


Abb. 15: Bestimmung der Menge Azini pro RNA Isolierung: Verschiedene Mengen Azini wurden pro RNA Säule eingesetzt und hinterher Konzentration, Reinheit und Qualität bestimmt. Zur Kontrolle der Qualität wurden je 10 μg RNA in einem Agarosegel aufgetrennt.

4.2.2. Genexpression nach Stimulation mit CCK

Isolierte Azini wurden mit maximal sekretorischen (10^{-10} M) und supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen bzw. KRH Pufferkontrolle für jeweils 30 Minuten stimuliert. Pro Stimulationsansatz wurden 30 mg isolierte Azini eingesetzt (siehe Austesten der maximalen Menge an Azini pro RNA-Isolation). Zur Kontrolle der erfolgreichen Stimulation wurden Parallelproben in der Immunfluoreszenz auf die Struktur von F-Aktin untersucht. In unstimulierten Kontrollen liegt F-Aktin als scharf begrenztes Band im apikalen Bereich der Zelle vor (siehe Abb. 11). Bei Stimulation mit maximal sekretorischen Konzentrationen wird das Aktinband breiter und stärker. Bei der Stimulation mit zellschädigenden CCK Konzentrationen (10^{-8} M) hingegen wird das F-Aktinsignal im apikalen Bereich sehr schwach. Nur wenn diese Merkmale bei allen 3 Ansätzen des Versuches auftraten, wurde die isolierte RNA für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Nach der Stimulation wurde RNA isoliert und im Agarosegel auf deren Qualität überprüft. Die RNA wurde wie im Methodenteil beschrieben weiter verarbeitet um für Expressionsstudien eingesetzt zu werden. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und das Expressionsmuster der Versuche miteinander verglichen. Als Erstes wurde für jeden Versuch separat das Verhältnis der Stimulation zur Kontrolle gebildet.

$$X = \text{Stimulation (S)}/\text{Kontrolle (K)}$$

Alle Werte größer 1 wurden als hochregulierte Gene eingeordnet ($X > 1$) und alle Werte kleiner 1 wurden der Gruppe der herunterregulierten Gene ($X < 1$) zugeteilt. Wenn in der unstimulierten Probe keine Expression vorhanden war, im Vergleich dazu die stimulierte Probe Expression aufwies, handelte es sich um Gene die angeschaltet wurden ($K = 0, S > 0$). War hingegen das Gen bei der Stimulation nicht exprimiert, zeigte aber eine Expression in der Kontrolle, so wurde dieses Gen als ausgeschaltet eingeordnet ($K > 0, S = 0$).

Hoch regulierte Gene:	$X > 1$
Herunter regulierte Gene:	$X > 1$
Angeschaltete Gene:	$K = 0, S > 0$
Ausgeschaltete Gene:	$K > 0, S = 0$

Es wurden nur Gene ausgewählt, welche in allen drei Versuchen parallel reguliert wurden. Alle gespotteten EST's ohne Annotation, wurden für die Auswertung nicht beachtet. Für die ca. 240 so ausgewählten Gene, wurden die bisher bekannten Funktionen ermittelt und diese in einer Tabelle im Anhang dargestellt.

Die bisher auf Proteinebene untersuchten Vorgänge zeigen, dass während der frühen Phase der Pankreatitis vor allem die Regulation des Aktins und der Sekretion gestört ist. Deshalb wurden in den Tabellen 4 und 5 die Gene zusammengefasst, deren Funktion der Aktinregulation bzw. dem Vesikeltransport der Zymogengranula zugeordnet werden kann. Aus diesen beiden Tabellen wird ersichtlich, dass die meisten Gene dieser beiden Gruppen sowohl bei maximal sekretorischen als auch bei supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen ähnlich reguliert werden.

Protein	10 ⁻⁸ M	10 ⁻¹⁰ M	Funktion
Calpactin I (schwere Kette)		+	Crosslinker zwischen Plasmamembranlipiden und Aktin (Zytoskelett), Exozytose
Chaperonin Cofactor A (große Homologie)		-	Faltung von Tubulin
Cyclase assoziiertes Protein	+++	(+++)	Regulation des Aktinumbau, nach zellulärem Signal
Myosin regulatory light chain	-	--	activated and redistributed in Azini after CCK (Torgerson 1999, 2000)
Myosin, unkonventionell	-	(-)	notwendig für intrazelluläre Motility, Umbau des Aktinzytoskelettes, bindet mit hoher Affinität an Aktin
Profilin	++	(++)	in Komplex mit Aktin, hohe Konz. Verhindern Aktinpolymerisation, niedrige Konz. Verstärken Polymerisation
Tetraspan AG 3 (Platelet, endothelial)	-	(-)	interagiert mit Integrin
Troponin I, cardiac	-		bindet an Actin-Tropomyosin
Tubulin, beta, Klasse I	+++		Bestandteil des Zytoskelettes

Tabelle 4: Aktin assoziierte Gene. +++ angeschaltet, ++ mindestens doppelte Expression, + 1,5fache Expression, --- ausgeschaltete Gene, -- mindestens um die Hälfte herunterreguliert, - entspricht mindestens 75 % der Kontrolle. Die Klammern bedeuten, dass bei diesen Genen nur zwei von drei Versuchen die parallele Regulation aufweisen.

Protein	10 ⁻⁸ M	10 ⁻¹⁰ M	Funktion
Amphiphysin 2	+++		reguliert Exozytose in endokrinen Zellen
AP50	+++	+++	Teil des Adapterkomplexes, welcher Clathrin mit den Rezeptoren in "coated" Vesikeln verbindet
Flotillin (reggie1)	-	(-)	"scaffolding" Protein in Membranen der Caveolae
Rab10	+++	(+++)	Transport von Vesikeln, Exozytose
Rab3B		+	Transport von Vesikeln, Exozytose
Rab8	-	-	Transport von Vesikeln, Exozytose
Synaptogyrin 2 (Cellugyrin)	++	(++)	beteiligt am Vesikeltransport und der Morphogenese der Membran, wird von Src phosphoryliert
Synaptophysin	-	-	Gehört zur Synaptobrevinfamilie, wahrscheinlich verantwortlich für "targeting" der Vesikel zur Membran
VPP1 (Clathrin coated vesicle proton pump)	-	(-)	notwendig für ATPase der Vakuolen

Tabelle 5: Vesikeltransport assoziierte Proteine. +++ angeschaltet, ++ mindestens doppelte Expression, + 1,5fache Expression, --- ausgeschaltete Gene, -- mindestens um die Hälfte herunterreguliert, - entspricht mindestens 75% der Kontrolle. Die Klammern bedeuten, dass bei diesen Genen nur zwei von drei Versuchen die parallele Regulation aufweisen.

Während der zweiten Phase der akuten Pankreatitis kommt es zu einer entzündlichen Reaktion im gesamten Organ. In Tabelle 6 sind zwei Mediatoren einer Entzündungsreaktion aufgeführt, welche bereits bei der akuten Pankreatitis beschrieben wurden. Diese werden durch die Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK anders reguliert als bei physiologischen Konzentrationen.

Protein	10 ⁻⁸ M	10 ⁻¹⁰ M	Funktion
mob-1 (IP-10)	(+++)		Chemokin, zieht inflammatorische Zellen an und aktiviert diese
I-kappa-B-beta	--[10%]	--[30%]	Inhibitor des Transkriptionsfaktor NF-kappa B

Tabelle 6: Gene, welche an der Vermittlung einer Entzündungsreaktionen beteiligt sein können. +++ angeschaltet, ++ mindestens doppelte Expression, + 1,5fache Expression, --- ausgeschaltete Gene, -- mindestens um die Hälfte herunterreguliert, - entspricht mindestens 75% der Kontrolle. Die Klammern bedeuten, dass bei diesen Genen nur zwei von drei Versuchen die parallele Regulation aufweisen. In der eckigen Klammer ist die Expression der stimulierten Proben im Vgl. zur Kontrolle dargestellt.

5. DISKUSSION

5.1. REGULATION VON PROTEINEN

Der Zusammenbruch des apikalen Aktins in der azinären Zelle ist eines der frühen pathophysiologischen Ereignisse während der CCK-induzierten experimentellen Pankreatitis (Jungermann et al. 1995). In diesem Modell stimuliert CCK im physiologischen Bereich dosisabhängig, maximal bei 10^{-10} M, die Sekretion. Bei höheren Konzentrationen (10^{-8} M) kommt es zur Schädigung der azinären Zelle und zur Inhibition der Sekretion. In unserer Studie wird zum ersten mal gezeigt, dass die Tyrosinkinase Yes, welche zur Familie der Src-Kinasen gehört, nach Stimulation mit supraphysiologischem CCK am Tyrosin phosphoryliert, aktiviert und umverteilt wird und dass die aktivierte Kinase an der Membran mit dem apikalen Aktin assoziiert.

Tyrosinphosphorylierung und -dephosphorylierung von Proteinen sind grundlegende Signalmechanismen welche Mitogenese, Differenzierung und andere Funktionen wie Adhäsion, Bewegung und Sekretion regulieren. Im Modell der induzierten Pankreatitis in isolierten Azini wurden Tyrosinphosphorylierungen von mehreren Proteinen beschrieben, z.B.: Focal Adhesion Kinase, Paxillin und Pyk2 (Garcia et al. 1997; Leser et al. 1999; Lutz et al. 1993). In unseren Untersuchungen konnten wir nun erstmals zeigen, dass eine spezifische Kinase der Src-Familie – Yes – nach Stimulation mit supraphysiologischem CCK an ihren Tyrosinresten phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung zu einer Aktivierung der Kinase führt. Unsere Ergebnisse passen sehr gut zu den Untersuchungen von Tsunoda et al. (Tsunoda et al. 1996), welcher ebenfalls eine Kinaseaktivität gegenüber einem Src-Substrat beobachtete. Der zeitliche Verlauf und die Aktivitätsänderung ähnelt unseren Untersuchungen und entspricht wahrscheinlich der Yes-Aktivität. Tsunoda konnte jedoch die gemessene Kinaseaktivität nicht näher eingrenzen, da in seinen Studien Gesamtlisat für die Aktivitätsuntersuchung eingesetzt wurde. In unseren Untersuchungen isolierten wir zuerst die Kinase Yes mit Hilfe der Immunpräzipitation und bestimmten dann deren Aktivität gegenüber einem spezifischen Substrat der Src-Familie. Ähnlich wie bei Tsunoda et al. erfolgte

die Aktivierung sehr früh und erreichte ihren Peak bereits nach 2 Minuten Stimulation.

Das gastrointestinale Hormon CCK kann prinzipiell an mehrere Rezeptoren binden, von denen allerdings nur der CCK-A Rezeptor in azinären Zellen des Rattenpankreas exprimiert ist (Wank et al. 1994). An diesem Rezeptormolekül befinden sich mindestens 2 Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität für CCK (Talkad et al. 1994); (Ji et al. 2000). Liegt CCK in physiologischen Konzentrationen vor, dann bindet es vorwiegend an eine Bindungsstelle die durch ihre hohe Affinität gekennzeichnet ist. Bei steigenden Konzentrationen bindet CCK zusätzlich an eine niederaffine Bindungsstelle (Matozaki et al. 1990). Durch die unterschiedlich affinen CCK-Bindungsstellen werden separate Signalkaskaden aktiviert, welche verschiedene Funktionen in der azinären Zelle steuern. Die Aktivierung des CCK Rezeptors durch hochaffine Bindung führt zum Umbau des Aktin und zur regulierten Sekretion von Verdauungsenzymen (Muallem et al. 1995; Torgerson et al. 2000). Im Gegensatz zu dieser physiologischen Stimulation kommt es durch die Aktivierung der zweiten Kaskade (niederaffine Bindung) zur Inhibition der Sekretion. In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass Yes nur durch supramaximal sekretorisches CCK aktiviert wird. Das deutet darauf hin, dass Yes durch die Signalkaskade aktiviert wird, welche an die niederaffine Bindungsstelle gekoppelt ist. Dies wird durch die Verwendung des CCK Analog CCK-OPE bestätigt. CCK-OPE wird als Agonist des hochaffinen und als Antagonist des niederaffinen CCK Rezeptors beschrieben (Williams 2001). Das bedeutet bei hochaffiner Bindung wird die normale Signalkaskade (wie bei CCK) aktiviert, bindet CCK-OPE an die niederaffine Stelle, wird diese Signalkaskade inhibiert. Die Stimulation der isolierten Azini mit unterschiedlichen Konzentrationen CCK-OPE führte in unseren Versuchen nicht zu einer Aktivitätssteigerung der Src-Kinase Yes. Wir können schlussfolgern, dass Yes allein durch die Signalkaskade der niederaffinen CCK Bindung aktiviert wird, da es nur bei supramaximalen CCK Konzentrationen zur Aktivitätssteigerung von Yes kommt und CCK-OPE keinen Effekt zeigt.

Durch die Aktivierung des niederaffinen CCK-Rezeptors kommt es wie bereits erwähnt zur Sekretionshemmung in den azinären Zellen. Da die Src-Kinase Yes nur durch diese Signalkaskade aktiviert wird, besteht die Möglichkeit das die Src-Kinase Yes an der Hemmung der Sekretion beteiligt ist. Diese Vermutung untersuchten wir mit Hilfe eines spezifischen Inhibitor der Src-Familie (PP2). Eine Vorinkubation mit PP2 hebt die Sekretionshemmung teilweise auf (75% der maximalen Sekretion). Das deutet daraufhin, dass die Src-Kinasen möglicherweise an der Inhibition der Sekretion nach Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK beteiligt sind. Zur Sekretionshemmung nach Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen kommt es durch den Zusammenbruch bzw. Umbau des apikalen Aktins in den azinären Zellen (Jungermann et al. 1995; Tashiro et al. 2001).

In der Pankreasazinuszelle ist das Aktinfilamentsystem in den apikalen Mikrovilli als Faserbündel organisiert und reicht als breites apikales Netzwerk bis in den oberen lateralen Bereich der Zelle (O'Konski et al. 1990). Hier dient es der Aufrechterhaltung der zellulären Struktur, ist aber auch an der Regulation der sekretorischen Funktion der Azinuszelle beteiligt (Muallem et al. 1995; Valentijn et al. 1999a). Die Verankerung des Aktinfilamentsystems mit der Plasmamembran erfolgt durch Adhärenzverbindungen von Zelle zu Zelle (Adherens junction) und von der Zelle zur extrazellulären Matrix (Focal Adhesion). Da die Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK zum Zusammenbruch des Aktinnetzwerkes in den azinären Zellen führt, liegt es nahe dass dessen Ankersysteme beeinträchtigt werden. Beide Ankersysteme wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe in Bezug auf deren Regulation während der induzierten akuten Pankreatitis untersucht.

Für die Adherens junction konnte im Modell der experimentellen Pankreatitis eine Änderung des Phosphorylierungsgrades des Proteins p120ctn gezeigt werden, welches tyrosinphosphoryliert wird, jedoch weiterhin am E-Cadherin gebunden bleibt (Leser et al. 2000). Die Funktion dieses Proteins in Adherens junctions der azinären Zelle ist nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass es an der Regulation des Adhesion Komplexes beteiligt ist (Magie et al. 2002). In anderen Zellsystemen wurde p120ctn als Substrat der Kinasen der Src-Familie beschrieben (Gomez et al.

1999; Mariner et al. 2001; Ozawa et al. 2001). Da das Protein p120ctn mehrere Src Phosphorylierungsstellen besitzt und es nur nach der Stimulation mit 10⁻⁸ M CCK phosphoryliert wird, besteht die Möglichkeit, dass Src für diese Phosphorylierung verantwortlich ist. Um andere Proteine zu phosphorylieren ist es notwendig dass Yes für kurze Zeit eine direkte Interaktion mit dem Substrat eingeht (Brown et al. 1996). Wir konnten solch eine Interaktion zwischen p120ctn und Yes weder im Grundzustand der Zelle noch nach supramaximaler Stimulation mit CCK zeigen.

Ein weiterer Angriffspunkt für aktinregulierende Proteine sind die Proteinkomplexe der „Focal Adhesions“. Auch hier wurden mehrere Proteine beschrieben (FAK, Paxillin und Pyk2), welche durch Stimulation mit hohen CCK Konzentrationen in ihrem Phosphorylierungsmuster geändert werden (Garcia et al. 1997; Leser et al. 1999; Tapia et al. 1999). Als möglicher Interaktionspartner der Focal Adhesion Proteine mit Yes wurde die Focal Adhesion Kinase (FAK) beschrieben (Li et al. 2002; Polte et al. 1997; Volberg et al. 2001). In unserem Zellsystem konnten wir keine Bindung von FAK an die Src-Kinase Yes mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation nachweisen. Als Bindepartner fanden wir allerdings die prolinreiche Tyrosinkinase-2 (Pyk2), welche zur Familie der Focal Adhesion Kinasen gehört und eine große Homologie mit FAK aufweist.

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass Pyk2 nach Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK sehr schnell an den Tyrosinresten phosphoryliert wird (Tapia et al. 1999). In unseren Studien fanden wir, dass Pyk2 bereits in unstimulierten Azini an Yes gebunden vorliegt. Durch die Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK erfolgte eine rapide, transiente Zunahme dieser Bindung. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnten wir zeigen, dass der Hauptteil des Proteins in unstimulierten Azini im Zytosol zu finden ist und ein kleiner Teil nach Stimulation mit zellschädigenden CCK Konzentrationen zur apikalen Membran umverteilt wird. Das von uns beobachtete Verteilungsmuster von Pyk2 in unstimulierten Azini war jedoch anders als in den Untersuchungen von Tapia et al. in SD Ratten (Tapia et al. 1999). Dies könnte an den unterschiedlichen Rattenstämmen liegen.

Die Umverteilung von Pyk2 deutet auf eine Funktion der Kinase im apikalen Bereich der azinären Zelle hin. In Swiss 3T3 Fibroblasten wurde Pyk2 als regulierendes Protein bei der Umverteilung des Aktinzytoskelettes beschrieben (Du et al. 2001). In anderen Studien wurden Src-Kinasen als Regulatoren von Pyk2 impliziert (Andreev et al. 2001; Byron et al. 2002). Aus unseren Beobachtungen und den Angaben in der Literatur lässt sich ein Modell der Interaktion beider Proteine entwickeln (Abb.16). Nach Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK kam es sehr schnell zur Zunahme der Bindung beider Proteine zueinander. Die maximale Bindung war bereits nach 1 Minute Stimulation erreicht, wohingegen die maximale Aktivierung von Yes erst nach 2 Minuten erreicht war. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von Pyk2 an Yes zu dessen Aktivierung führt. Eine Möglichkeit der generellen Aktivierung der Src-Kinasen ist die Bindung von Proteinen an die SH2 oder SH3 Domäne der Kinase. Durch diese Interaktion wird das inhibierende Phosphotyrosin des Tail-Bereichs verdrängt und es kommt zur Auffaltung des Proteins, wodurch die Kinasedomäne für die Autophosphorylierung und damit für die Aktivierung frei wird. Pyk2 bindet wahrscheinlich an die SH2 Domäne von Yes, da diese Interaktion von Pyk2 mit Src-Kinasen bereits in anderen Zellen nachgewiesen wurde (Espiritu et al. 2002). Die maximale Umverteilung von Pyk2 zur Membran ist bereits nach 1 min erreicht, wohingegen Yes erst nach 5 Minuten maximal in der Membran zu finden ist. Diesen Unterschied in der zeitlichen Umverteilung beider Proteine könnte man so erklären, dass die Auffaltung von Yes wiederum zur Dissoziation von Pyk2 führt. Das freie Pyk2-Molekül kann erneut mit einem Yes Molekül interagieren und deshalb nimmt die Menge an Pyk2 in der Membranfraktion nur kurzzeitig zu.

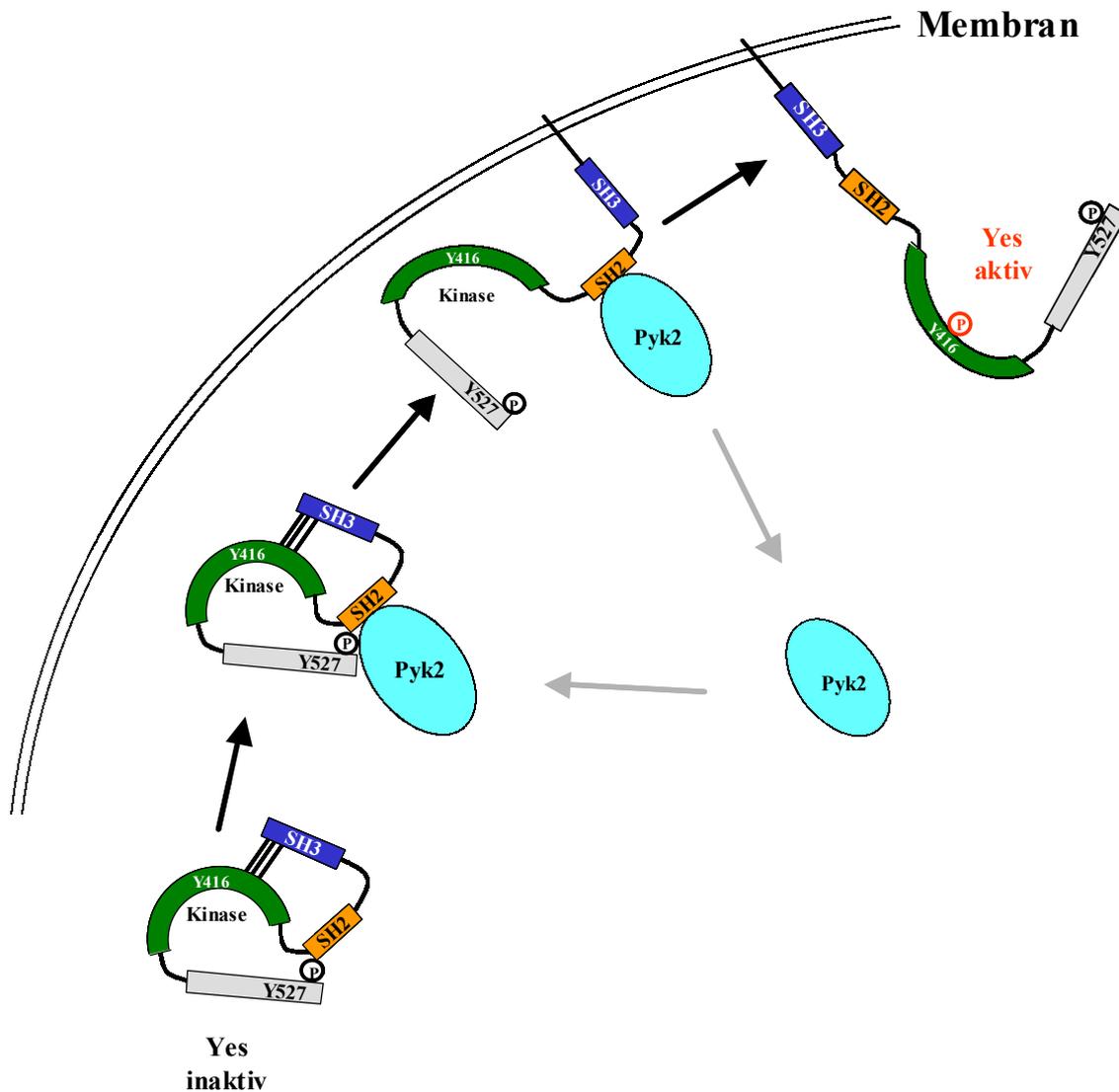


Abb. 16 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Yes und Pyk2 nach Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK. Pyk2 bindet nach 1min Stimulation an die SH2-domäne von Yes und verdrängt die Bindung der SH2-domäne mit dem phosphorylierten Tyrosin der „Tail“ Region. Beide Proteine werden zu diesem Zeitpunkt an membranöse Strukturen gebunden. Pyk2 löst sich ab und das aufgefaltete Yes autophosphoryliert sein Tyrosin 416 und wird dadurch aktiv. Yes bleibt an der membranösen Struktur gebunden und Pyk2 kann ein neues Yes Molekül binden.

Obwohl Pyk2 eine sehr starke Homologie zu FAK besitzt, gibt es in der Literatur Hinweise für entgegengesetzte Funktionen beider Proteine. In Swiss 3T3 Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Pyk2 für die Deregulation der „Focal

Adhesions“ notwendig ist, wohingegen FAK diesen Umbau verhindert. Es scheint also, dass beide Proteine als Gegenspieler in der Regulation der „Focal Adhesions“ agieren und somit auch gegensätzliche Funktionen bei der Regulation des gebundenen Aktins aufweisen.

Der Aktinzusammenbruch nach Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen führt zu einer Hemmung der Amylasesekretion (Muallem et al. 1995; Torgerson et al. 2000). In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass die Inhibition der Src-Kinasen mit dem Inhibitor PP2 diesen Aktinzusammenbruch verringert und ebenfalls die Hemmung der Sekretion um 50 % reduziert. Die Src-Kinase Yes wird weder durch maximal sekretorische CCK Konzentrationen noch durch das CCK Analog CCK-OPE aktiviert. Die Aktivierung von Yes erfolgt nur durch supramaximal sekretorische CCK Konzentrationen, was auf die Regulation von Yes durch die Besetzung des niederaffinen CCK Rezeptors hinweist, welcher auch den Aktinzusammenbruch und die Sekretionshemmung vermittelt. Die Bindung von Yes an die Focal Adhesion Kinase Pyk2 erhöht sich nach Stimulation mit supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen und beide Proteine werden in Richtung der apikalen Membran der Azinuszelle umverteilt. Alle Ergebnisse weisen darauf hin, dass die negative Regulation der „Focal Adhesions“ durch Yes und Pyk2 wahrscheinlich am Zusammenbruch des Aktin nach induzierter azinärer Zellschädigung durch CCK beteiligt ist. Da jedoch Kinasen der Src-Familie oft überlappende Funktionen haben und da PP2 alle Src ähnlichen Kinasen inhibiert, können wir nicht vollends ausschließen, dass einige der beobachteten Vorgänge durch die Src-Kinase Lyn vermittelt werden, welche auch in den azinären Zellen der WAG Ratte exprimiert wird.

5.2. DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION

Während der durch supramaximal sekretorische CCK Konzentrationen induzierten Zellschädigung kommt es zur Inhibition der Sekretion aus den azinären Zellen. Im ersten Teil der Arbeit haben wir gezeigt, dass es bereits sehr frühzeitig nach der

Induktion der Zellschädigung zur Regulation des Aktinzytoskelettes und damit zur Inhibition der Sekretion kommt. Die Tabellen 4 und 5 zeigen, dass Gene welche an der Aktinregulation bzw. am Vesikeltransport der sekretorischen Enzyme beteiligt sind sowohl bei physiologischen als auch bei zellschädigenden CCK Konzentrationen gleich reguliert werden. Aus diesen Beobachtungen können wir schlussfolgern, dass die initialen Ereignisse der Zellschädigung – die Deregulation des Aktinnetzwerkes – nicht auf Ebene der Genexpression reguliert werden, sondern durch die Aktivierung bzw. Deaktivierung bereits vorhandener Proteine und Signalkaskaden.

Als Kontrolle für die Richtigkeit der Ergebnisse des Gene Arrays kann die Expression des Chemokins mob-1 (IP10) genutzt werden. Dieses Chemokin wurde in Untersuchungen der induzierten Pankreatitis als differentiell exprimiert beschrieben (Han et al. 1999). Die Arbeitsgruppe von Han et al. konnte zeigen, dass nach Induktion der Pankreatitis in Ratten die Aktivität von NF-kappa B zunimmt, was ein Anschalten des Chemokins mob-1 bewirkt. Das Anschalten der Expression von mob-1 wurde durch unsere Untersuchungen in isolierten Azini bestätigt.

Chemokine vermitteln Entzündungsreaktionen durch das Anziehen inflammatorischer Zellen zum geschädigten Gewebe (Grady et al. 1997; Vaquero et al. 2001). Auch während der induzierten Pankreatitis kommt es in einer zweiten Phase der Erkrankung zur Inflammation des Organs. Der spätere Schweregrad der Pankreatitis scheint von der Kombination aktivierter pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und Chemokine abhängig zu sein (Bhatia et al. 2001; Saluja et al. 1999). Hier handelt es sich jedoch um späte Ereignisse während der akuten Pankreatitis. Das Anschalten von mob-1 hingegen findet bereits 30 Minuten nach der Induktion der Pankreatitis statt und ist damit ein sehr frühes Ereignis.

NF-kappa B wird durch den Inhibitor I-kappa B negativ reguliert. Han et al. konnte zeigen, dass nach Induktion der Pankreatitis I-kappa B degradiert wird (Han et al. 1999). In unseren Genexpressionsstudien fanden wir zudem, dass die Expression von I-kappa B durch die Induktion der Zellschädigung in azinären

Zellen viel stärker reduziert ist, als bei physiologischer CCK Stimulation. Das Protein I-kappa B wird also während der induzierten Pankreatitis nicht nur degradiert, sondern es wird auch weniger Protein nachgebildet. Diese Abnahme der Menge I-kappa B in der Zelle führt zu einer stärkeren Aktivierung von NF-kappa B und damit wird die Expression des Chemokins mob-1 erhöht bzw. angeschaltet.

In unseren Untersuchungen der Genexpression konnten wir zeigen, dass Gene welche für die Aktinregulation bzw. den Transport der sekretorischen Vesikel zur Membran verantwortlich sind, sowohl bei physiologischen als auch bei zellschädigenden CCK Konzentrationen synchron exprimiert werden. Die Expression zweier Mediatoren der Entzündungsreaktionen unterscheidet sich jedoch zwischen der Stimulation der Zellen mit maximal sekretorischem CCK und der Induktion der Zellschädigung durch supramaximale Konzentrationen. Das würde darauf hindeuten, dass die akute Phase der Zellschädigung auf Ebene der Proteine reguliert wird, wohingegen die spätere Entzündungsreaktion auch auf transkriptioneller Ebene kontrolliert wird.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die akute Pankreatitis ist eine Erkrankung welche durch die Schädigung der azinären Zellen der Bauchspeicheldrüse initiiert wird. Eines der wichtigsten Ereignisse ist der Zusammenbruch des Aktins, welches für eine regulierte Sekretion von Verdauungsenzymen benötigt wird. Dies führt zur Retention der Verdauungsenzyme in der Zelle und durch eine zusätzliche Aktivierung dieser Enzyme kommt es zum Zellschaden.

Aktinfilamente werden durch membranassoziierte Proteinkomplexe verankert, welche in anderen Modellsystemen als Substrate der Src-Kinasen beschrieben wurden. Hier zeigen wir, dass die Src-Kinasen Yes und Lyn, jedoch nicht Src und Fyn in azinären Zellen der WAG Ratte exprimiert werden. Nach Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK wird Yes an Tyrosinresten innerhalb von 2 Minuten reversibel phosphoryliert und damit aktiviert. Die reversible Umverteilung von Yes zur apikalen Membran erreicht ein Maximum nach 5 Minuten Stimulation. Yes ist in unstimulierten Zellen an die „Focal Adhesion“ Kinase Pyk2 gebunden. Nach Stimulation mit supramaximal sekretorischem CCK erreicht diese Bindung sehr schnell zu und Pyk2 wird ebenfalls zur Membran umverteilt. Die Inhibition von Yes mit dem spezifischen Src-Kinasen Inhibitor PP2 führt zur partiellen Aufhebung des Aktinzusammenbruchs und erhöht die Sekretion auf 75 % des Maximums. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgern wir, dass Yes an der Regulation des azinären Aktin beteiligt ist, und dass diese Regulation durch die „Focal Adhesion“ Kinase Pyk2 vermittelt wird.

Eine Regulation der Genexpression aktinassoziierter Proteine findet in diesem anfänglichen Stadium der Pankreatitis nicht statt, da die Expression dieser Gene sowohl bei physiologischen als auch bei supramaximal sekretorischen CCK Konzentrationen ähnlich reguliert wird. Im Gegensatz dazu konnten wir die bereits beschriebene differentielle Expression von Chemokinen bestätigen, welche für die zweite Phase der Pankreatitis wichtig sind.

Wir schlussfolgern das die initiale Zellschädigung der azinären Zellen des Rattenpankreas durch den Zusammenbruch des apikalen Aktins verursacht wird, welcher teilweise durch die Aktivierung der Src-Kinase Yes vermittelt wird. Dies führt zur Inhibition der Sekretion von Verdauungsenzymen und verursacht zusammen mit der frühzeitigen Aktivierung dieser Enzyme die Schädigung der azinären Zellen. Diese erste Phase kann von einer zweiten unterschieden werden, bei der es zur differentiellen Aktivierung von Chemokinen kommt, welche dann inflammatorische Zellen zum geschädigten Gewebe ziehen und diese aktivieren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adler G, Hupp T and Kern HF : Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. *Virchows Arch.A.Pathol.Pathol.Anat.* 382: 31-47 (1979)
2. Andreev J, Galisteo ML, Kranenburg O, Logan SK, Chiu ES, Okigaki M, Cary LA, Moolenaar WH and Schlessinger J : Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J.Biol.Chem.* 276: 20130-20135 (2001)
3. Bagrodia S, Taylor SJ and Shalloway D : Myristylation is required for Tyr-527 dephosphorylation and activation of pp60c-src in mitosis. *Mol.Cell Biol.* 13: 1464-1470 (1993)
4. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM and Birchmeier W : Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J.Cell Biol.* 120: 757-766 (1993)
5. Beil M, Leser J, Lutz MP, Gukovskaya A, Seufferlein T, Lynch G, Pandol SJ and Adler G : Caspase 8-mediated cleavage of plectin precedes F-actin breakdown in acinar cells during pancreatitis. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.*2002.Mar.;282.(3.):G450.-60. 282: G450-G460 (2002)
6. Bhatia M, Neoptolemos JP and Slavin J : Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr.Opin.Investig.Drugs* 2: 496-501 (2001)
7. Bijlmakers MJ, Isobe-Nakamura M, Ruddock LJ and Marsh M : Intrinsic signals in the unique domain target p56(lck) to the plasma membrane independently of CD4. *J.Cell Biol.* 137: 1029-1040 (1997)

-
8. Bradley EL : A clinically based classification system for acute pancreatitis. *Ann.Chir.* 47: 537-541 (1993)
 9. Brown MT and Cooper JA : Regulation, substrates and functions of src. *Biochim.Biophys.Acta* 1287: 121-149 (1996)
 10. Burridge K and Chrzanowska WM : Focal adhesions, contractility, and signaling. *Ann.Rev.Cell Dev.Biol.* 12: 463-518 (1996)
 11. Byron KL and Lucchesi PA : Signal transduction of physiological concentrations of vasopressin in A7r5 vascular smooth muscle cells. A role for PYK2 and tyrosine phosphorylation of K⁺ channels in the stimulation of Ca²⁺ spiking. *J.Biol.Chem.* 277: 7298-7307 (2002)
 12. Calautti E, Cabodi S, Stein PL, Hatzfeld M, Kedersha N and Paolo DG : Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J.Cell Biol.* 141: 1449-1465 (1998)
 13. Critchley DR, Holt MR, Barry ST, Priddle H, Hemmings L and Norman J : Integrin-mediated cell adhesion: the cytoskeletal connection. *Biochem.Soc.Symp.* 65: 79-99 (1999)
 14. Ding XQ, Dolu V, Hadac EM, Holicky EL, Pinon DI, Lybrand TP and Miller LJ : Refinement of the structure of the ligand-occupied cholecystokinin receptor using a photolabile amino-terminal probe. *J.Biol.Chem.* 276: 4236-4244 (2001)
 15. Du QS, Ren XR, Xie Y, Wang Q, Mei L and Xiong WC : Inhibition of PYK2-induced actin cytoskeleton reorganization, PYK2 autophosphorylation and focal adhesion targeting by FAK. *J.Cell Sci.* 114: 2977-2987 (2001)
 16. Espiritu DJ, Bernardo AA, Robey RB and Arruda JA : A central role for Pyk2-Src interaction in coupling diverse stimuli to increased epithelial NBC activity. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 283: F663-F670 (2002)

-
17. Fishkind DJ and Wang YL : New horizons for cytokinesis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7: 23-31 (1995)
 18. Gaisano HY and Miller LJ : Low concentrations of protein kinase C-activating agonists suppress cholecystokinin-OPE-evoked Ca²⁺ mobilization in rat pancreatic acini. *Pancreas* 9: 450-453 (1994a)
 19. Gaisano HY, Wong D, Sheu L and Foskett JK : Calcium release by cholecystokinin analogue OPE is IP₃ dependent in single rat pancreatic acinar cells. *Am.J.Physiol* 267: C220-C228 (1994b)
 20. Garcia LJ, Rosado JA, Tsuda T and Jensen RT : CCK causes rapid tyrosine phosphorylation of p125FAK focal adhesion kinase and paxillin in rat pancreatic acini. *Biochim.Biophys.Acta* 1358: 189-199 (1997)
 21. Giancotti FG : Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 691-700 (1997)
 22. Gomez S, del Mont LM, Verdu J, Roura S, Lloreta J, Fabre M and Garcia dH : Independent regulation of adherens and tight junctions by tyrosine phosphorylation in Caco-2 cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1452: 121-132 (1999)
 23. Gonfloni S, Weijland A, Kretschmar J and Superti-Furga G : Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src. *Nat.Struct.Biol.* 7: 281-286 (2000)
 24. Goodsell DS : The molecular perspective: the src oncogene. *Oncologist.* 6: 474-476 (2001)
 25. Gorelick FS, Adler G and Kern HF : *Cerulein-Induced Pancreatitis* Second Edition: 501-526 (1993)
 26. Grady T, Liang P, Ernst SA and Logsdon CD : Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 113: 1966-1975 (1997)

-
27. Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM and Gorelick FS : Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am.J.Physiol.* 275: G1010-G1017 (1998)
 28. Han B and Logsdon CD : Cholecystokinin induction of mob-1 chemokine expression in pancreatic acinar cells requires NF-kappaB activation. *Am.J.Physiol* 277: C74-C82 (1999)
 29. Hazan RB and Norton L : The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E- cadherin with the actin cytoskeleton. *J.Biol.Chem.* 273: 9078-9084 (1998)
 30. Jena BP, Padfield PJ, Ingebritsen TS and Jamieson JD : Protein tyrosine phosphatase stimulates Ca(2+)-dependent amylase secretion from pancreatic acini. *J.Biol.Chem.* 266: 17744-17746 (1991)
 31. Ji B, Kopin AS and Logsdon CD : Species differences between rat and mouse CCKA receptors determine the divergent acinar cell response to the cholecystokinin analog JMV-180. *J.Biol.Chem.* 275: 19115-19120 (2000)
 32. Joung I, Kim T, Stolz LA, Payne G, Winkler DG, Walsh CT, Strominger JL and Shin J : Modification of Ser59 in the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck regulates specificity of its Src homology 2 domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 5778-5782 (1995)
 33. Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, Lutz MP, Kruger B and Adler G : Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. *Am.J.Physiol* 268: G328-G338 (1995)
 34. Kaplan KB, Bibbins KB, Swedlow JR, Arnaud M, Morgan DO and Varmus HE : Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *EMBO J.* 13: 4745-4756 (1994)

-
35. Kubler E and Riezman H : Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J.* 12: 2855-2862 (1993)
 36. Lampel M and Kern HF : Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch.A.Pathol.Pathol.Anat.* 373: 97-117 (1977)
 37. Langford GM : Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7: 82-88 (1995)
 38. Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, Ramarao P, Saluja M and Steer ML : Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells [see comments]. *Gastroenterology* 103: 205-213 (1992)
 39. Leser J, Beil MF, Musa OA, Adler G and Lutz MP : Regulation of adherens junction protein p120(ctn) by 10 nM CCK precedes actin breakdown in rat pancreatic acini. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 278: G486-G491 (2000)
 40. Leser J, Lührs L, Beil MF, Adler G and Lutz MP : Cholecystokinin-induced redistribution of paxillin in rat pancreatic acinar cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 254: 400-405 (1999)
 41. Li L, Okura M and Imamoto A : Focal adhesions require catalytic activity of Src family kinases to mediate integrin-matrix adhesion. *Mol.Cell Biol.* 22: 1203-1217 (2002)
 42. Lutz MP, Sutor SL, Abraham RT and Miller LJ : A role for cholecystokinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation in regulated secretion by the pancreatic acinar cell. *J.Biol.Chem.* 268: 11119-11124 (1993)
 43. Magie CR, Pinto-Santini D and Parkhurst SM : Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development* 129: 3771-3782 (2002)

-
44. Mariner DJ, Anastasiadis P, Keilhack H, Bohmer FD, Wang J and Reynolds AB : Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. *J.Biol.Chem.* 276: 28006-28013 (2001)
 45. Marino CR, Leach SD, Schaefer JF, Miller LJ and Gorelick FS : Characterization of cAMP-dependent protein kinase activation by CCK in rat pancreas. *FEBS Lett JID - 0155157 316:* 48-52 (1993)
 46. Matozaki T, Goke B, Tsunoda Y, Rodriguez M, Martinez J and Williams JA : Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of action on Ca²⁺ mobilization and phospholipid hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. Studies using a new cholecystokinin analog, JMV-180. *J.Biol.Chem.* 265: 6247-6254 (1990)
 47. Matsudaira P : Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends.Biochem.Sci.* 16: 87-92 (1991)
 48. Matsudaira P : Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin.Cell Biol.* 5: 165-174 (1994)
 49. Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X and Yin HL : Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J.Cell Biol.* 128: 589-598 (1995)
 50. Nagafuchi A : Molecular architecture of adherens junctions. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13: 600-603 (2001)
 51. Nozu F, Tsunoda Y, Ibitayo AI, Bitar KN and Owyang C : Involvement of RhoA and its interaction with protein kinase C and Src in CCK-stimulated pancreatic acini. *Am.J.Physiol* 276: G915-G923 (1999)
 52. O'Konski MS and Pandol SJ : Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. *J.Clin.Invest* 86: 1649-1657 (1990)

-
53. O'Konski MS and Pandol SJ : Cholecystokinin JMV-180 and caerulein effects on the pancreatic acinar cell cytoskeleton. *Pancreas* 8: 638-646 (1993)
 54. Ohkubo T and Ozawa M : p120(ctn) Binds to the Membrane-proximal Region of the E-cadherin Cytoplasmic Domain and Is Involved in Modulation of Adhesion Activity. *J.Biol.Chem.* 274: 21409-21415 (1999)
 55. Ozawa M and Ohkubo T : Tyrosine phosphorylation of p120(ctn) in v-Src transfected L cells depends on its association with E-cadherin and reduces adhesion activity. *J.Cell Sci.* 114: 503-512 (2001)
 56. Park I, Chung J, Walsh CT, Yun Y, Strominger JL and Shin J : Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the src homology 2 (SH2) domain of p56lck and its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 12338-12342 (1995)
 57. Pokutta S and Weis WI : The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 12: 255-262 (2002)
 58. Polte TR and Hanks SK : Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J.Biol.Chem.* 272: 5501-5509 (1997)
 59. Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R and Petersen OH : Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 13126-13131 (2000)
 60. Resh MD : Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76: 411-413 (1994)

-
61. Resh MD : Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal.* 8: 403-412 (1996)
 62. Rosato R, Veltmaat JM, Groffen J and Heisterkamp N : Involvement of the tyrosine kinase fer in cell adhesion. *Mol.Cell Biol.* 18: 5762-5770 (1998)
 63. Saluja AK and Steer MLP : Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation. *Digestion* 60 Suppl 1: 27-33 (1999)
 64. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB and Parsons JT : pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89: 5192-5196 (1992)
 65. Schlaepfer DD, Hauck CR and Sieg DJ : Signaling through focal adhesion kinase. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 71: 435-478 (1999)
 66. Schwartzberg PL : The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* 17: 1463-1468 (1998)
 67. Shaw AS, Amrein KE, Hammond C, Stern DF, Sefton BM and Rose JK : The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 59: 627-636 (1989)
 68. Shen TL and Guan JL : Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts. *FEBS Lett.* 499: 176-181 (2001)
 69. Shenoy S, Chackalaparampil I, Bagrodia S, Lin PH and Shalloway D : Role of p34cdc2-mediated phosphorylations in two-step activation of pp60c-src during mitosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89: 7237-7241 (1992)
 70. Shenoy-Scaria AM, Dietzen DJ, Kwong J, Link DC and Lublin DM : Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J.Cell Biol.* 126: 353-363 (1994)

-
71. Smeets RL, Fouraux MA, van Emst-de Vries SE, De Pont JJ and Willems PH : Protein kinase C-mediated inhibition of transmembrane signalling through CCK(A) and CCK(B) receptors. *Br.J.Pharmacol.* 123: 1189-1197 (1998)
 72. Smith CL, Mittaud P, Prescott ED, Fuhrer C and Burden SJ : Src, Fyn, and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilization of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J.Neurosci.* 21: 3151-3160 (2001)
 73. Steer M : Pancreatitis severity: who calls the shots? *Gastroenterology* 122: 1168-1172 (2002)
 74. Sudol M : From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene* 17: 1469-1474 (1998)
 75. Talkad VD, Patto RJ, Metz DC, Turner RJ, Fortune KP, Bhat ST and Gardner JD : Characterization of the three different states of the cholecystikinin (CCK) receptor in pancreatic acini. *Biochim.Biophys.Acta* 1224: 103-116 (1994)
 76. Tapia JA, Ferris HA, Jensen RT and Garcia LJ : Cholecystikinin activates PYK2/CAKbeta by a phospholipase C-dependent mechanism and its association with the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic acinar cells. *J.Biol.Chem.* 274: 31261-31271 (1999)
 77. Tashiro M, Schafer C, Yao H, Ernst SA and Williams JA : Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut* 2001.Aug.;49.(2.):241.-50. 49: 241-250 (2001)
 78. Thomas SM, Soriano P and Imamoto A : Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton. *Nature* 376: 267-271 (1995)
 79. Torgerson RR and McNiven MA : The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing. *J.Cell Sci.* 111 (Pt 19): 2911-2922 (1998)

-
80. Torgerson RR and McNiven MA : Agonist-induced changes in cell shape during regulated secretion in rat pancreatic acini. *J.Cell Physiol* 182: 438-447 (2000)
 81. Tsunoda Y, Yoshida H, Africa L, Steil GJ and Owyang C : Src kinase pathways in extracellular Ca(2+)-dependent pancreatic enzyme secretion. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 227: 876-884 (1996)
 82. Turner CE : Paxillin interactions. *J.Cell Sci.* 113: 4139-4140 (2000)
 83. Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM and Littman DR : Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60: 755-765 (1990)
 84. Valentijn JA, Valentijn K, Pastore LM and Jamieson JD : Actin coating of secretory granules during regulated exocytosis correlates with the release of rab3D. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 1091-1095 (2000)
 85. Valentijn K, Valentijn JA and Jamieson JD : Role of actin in regulated exocytosis and compensatory membrane retrieval: insights from an old acquaintance. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 266: 652-661 (1999a)
 86. Valentijn KM, Gumkowski FD and Jamieson JD : The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and membrane retrieval in pancreatic acinar cells. *J.Cell Sci.* 112 (Pt 1): 81-96 (1999b)
 87. Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS and Pandol SJ : Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 280: G1197-G1208 (2001)
 88. Volberg T, Romer L, Zamir E and Geiger B : pp60(c-src) and related tyrosine kinases: a role in the assembly and reorganization of matrix adhesions. *J.Cell Sci.* 114: 2279-2289 (2001)

-
89. Wang Y, Sugita S and Sudhof TC : The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J.Biol.Chem.* 275: 20033-20044 (2000)
 90. Wank SA : Cholecystokinin receptors. *Am.J.Physiol* 269: G628-G646 (1995)
 91. Wank SA, Pisegna JR and de Weerth A : Cholecystokinin receptor family. Molecular cloning, structure, and functional expression in rat, guinea pig, and human. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 713: 49-66 (1994)
 92. Williams JA : Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulation synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu.Rev.Physiol* 63: 77-97 (2001)
 93. Yamada KM and Geiger B : Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 76-85 (1997)
 94. Yap AS, Niessen CM and Gumbiner BM : The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J.Cell Biol.* 141: 779-789 (1998)
 95. Yule DI and Williams JA : CCK antagonists reveal that CCK-8 and JMV-180 interact with different sites on the rat pancreatic acinar cell CCKA receptor. *Peptides* 15: 1045-1051 (1994)

Danksagung

Mein Dank gilt meiner Arbeitsgruppe (Dr. Manfred Lutz, Sandra Kohler, Stefan Westhoff, Ulla Nolte, Eljana Schacher, Elke Wolff-Hieber, Michael Beil) die mich sowohl im wissenschaftlichen Bereich unterstützt haben, als auch in den letzten drei Jahren zu guten Freunden geworden sind.

Außerdem möchte ich meinem Mann Damien danken, der mich auch in schweren Zeiten davon überzeugt hat, dass ich alle Schwierigkeiten überwinden kann.

ANHANG

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
3-phosphoglycerate dehydrogenase	up		1,8645	2,1638	2,1512	serine biosynthesis	
Acyl CoA synthetase, long chain	down		0,5418	0,9899	0,4684	in peroxisomes, AMP binding protein	
acyl-CoA hydrolase		on	0,1520	0,2800	0,8730		
aggrecon, structural proteoglycon of cartilage		on	0,1840	0,6990	0,0220		
arginase type II	down		0,5718	0,6257	0,9848	down regulation of nitric oxide synthesis	
ATPase inhibitor (rat mitochondrial IF1 protein)		down	0,9739	0,1706	0,8442	regulator of ATP synthesis in mitochondria	
ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	on		0,1010	0,5870	0,1330	ATP binding	
Bax inhibitor 1, Testis enhanced gene transcript		down	0,6563	0,0659	0,9752	Inhibitor of apoptosis	apoptosis
bone morphogenetic protein 2	up		5,9617	3,4970	11,4627	induces bone formation	
bronched chain keto acid dehydrogenase kinase		down	0,4943	0,1815	0,6187	key regulator of valin, leucine and isoleucin metabolic pathway	
butyrate response factor 1	down		0,5367	0,1980	0,4595	regulatory protein for response to growth factors	
cain		down	0,5272	0,1102	0,3013	inhibits calcineurin signalling	Insulin
Calcineurin subunit A alpha	on		0,3190	0,1290	0,2140	secretion from beta cells, provides calcium regulated phosphatase activity	Insulin
calcium chonnel beta 1 subunit		up	1,7143	4,7681	1,1649	no information	
ESTs, Moderately similar to ABP2_HUMon ENDOTHELIAL ACTIN-BINDING PROTEIN [H.sapiens]		on	0,0050	0,3860	0,5090		
Catalase		down	0,5264	0,3297	0,7796	breaks down hydrogen peroxide into water and oxygen, cell protection	
Cathepsin H		up	1,5629	1,6553	1,8294	in disease found in serum, Can activate trypsinogen	pancreatitis
CD24 ontigen		on	0,1740	0,2830	0,5620		
CD38 ontigen (ADP-ribosyl cyclase / cyclic ADP-ribose hydrolase)	down		0,4018	0,3984	0,8985	second messenger for glucose induced insulin secretion	Insulin
Chymotrypsin B		down	0,7024	0,7943	0,7698	digestion	Secretion
cis-Golgi matrix protein GM130	on		0,3660	0,2130	0,3480	role probably in maintenance of cis-golgi structure	
Complement component 3		on	0,1150	0,2400	0,7200	no information	
core promoter element binding protein		down	0,6565	0,1262	0,2391	transcriptional coactivator	protein synthesis
corticosteroid-induced protein	down		0,2297	0,8565	0,8435	induces potassium channel	
cyclase-associated protein homologue	on		0,2800	1,0840	0,3190	regulates actin remodelling in response to cellular signals	actin
cytochrome c oxidase subunit VIIa 3		on	0,2190	0,2660	0,5480		
cytochrome P450, 2b19	down		0,8651	0,9958	0,3548	in microsomes, NADP depending electron transport	
cytochrome P450, 2b19		down	0,9340	0,9704	0,4747	in microsomes, NADP depending electron transport	
D site albumin promoter binding protein	on		0,1520	0,0950	0,3480	modulates circadian rhythm proteins	
Death-associated like kinase	down		0,4914	0,3952	0,1989	mediates IF-gamma induced	apoptosis

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
						cell death	
DNA-damage-inducible transcript 1		down	0,3631	0,3226	0,3779	inhibits entry of proliferating cell into S1 phase	protein synthesis
E-cadherin		on	0,5080	0,1310	0,0590	Adherens junction, links extra cellular matrix to actin	actin
Emerin	on		0,4100	0,3960	1,2530	associated with inner nuclear membrane, interacts with lamins	
endothelin-converting enzyme 1	down		0,5108	0,6675	0,2688	endothelium	
endothelin-converting enzyme 1		down	0,2114	0,1721	0,4092	endothelium	
Epidermal growth factor		up	1,1027	2,0056	8,4694	growth stimulation of epithelial tissue	Protein synthesis
Epoxide hydrolase 1 (microsomal xenobiotic hydrolase)		on	0,1410	0,1390	0,9770	peptidase, on microsomes	
EST, Highly similar to preproopiomelanocortin [R.norvegicus]	down		0,2209	0,2630	0,4243	no information	
EST, Highly similar to preproopiomelanocortin [R.norvegicus]		down	0,4207	0,3467	0,4993	no information	
EST, Moderately similar to HSPB2 [R.norvegicus]	down		0,8037	0,8119	0,8406	heat shock protein	
EST, Moderately similar to S55054 Sm protein G [H.sapiens]		down	0,7542	0,5432	0,4324	no information	
EST, Moderately similar to S55054 Sm protein G [H.sapiens]	down		0,6765	0,4073	0,3925	no information	
EST, Weakly similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L35A [R.norvegicus]	down		0,8346	0,8394	0,6763		
EST, Weakly similar to Frg1 [M.musculus]	down		0,9833	0,7242	0,7262		
EST, Weakly similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase B14.5B subunit [H.sapiens]	down		0,9316	0,3984	0,8088		
EST, Weakly similar to VPP1 RAT CLATHRIN-COATED VESICLE/SYNAPTIC VESICLE PROTON PUMP 116 KDA SUBUNIT [R.norvegicus]	down		0,9597	0,5350	0,7626	required for assembly and activity of vacuolar ATPase, coated vesicle	Vesicle
ESTs, Highly similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L7A [R.norvegicus]	up		1,7158	1,0742	1,9583		
ESTs, Highly similar to CU4A_HUMon CULLIN HOMOLOG 4A [H.sapiens]		up	4,1746	1,1232	8,1429	cell cycle	Protein synthesis
ESTs, Highly similar to CY1_HUMon CYTOCHROME C1, HEME PROTEIN PRECURSOR [H.sapiens]		up	1,9925	1,2273	1,0145	no information	
ESTs, Highly similar to G02237 neighbour-of-FAU protein NOF1 [H.sapiens]	down		0,2304	0,2100	0,7823	ribosomal protein	
ESTs, Highly similar to I56542 calmodulin-binding protein - rat [R.norvegicus]	up		1,5762	1,6484	1,4837	no information	
ESTs, Highly similar to JC5105 stromal cell-derived factor 2 - mouse [M.musculus]		on	0,1560	0,4540	0,0300	no information	
ESTs, Highly similar to JC7301 Down syndrome		down	0,9703	0,5772	0,8522		

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
critical region protein 5 alpha [H.sapiens]							
ESTs, Highly similar to JG0162 TBP-like protein [H.sapiens]		down	0,1378	0,9311	0,3584		
ESTs, Highly similar to MTRP MOUSE GOLGI 4-TRonSMEMBRonE SPonNING TRonSPORTER [M.musculus]	up		1,0243	2,6379	1,4371		
ESTs, Highly similar to PRP8 protein [H.sapiens]	on		0,1130	0,5400	0,3160		
ESTs, Highly similar to putative spliceosome associated protein [H.sapiens]	on		0,3900	0,8170	0,4430	involved in pre mRNA splicing	Protein synthesis
ESTs, Highly similar to SNG2 RAT SYNAPTOGYRIN 2 [R.norvegicus]	up		22,5833	1,5580	3,0935	also cellugyrin (none neuronal), phosphorylated by Src	Vesicle
ESTs, Highly similar to SPT4_HUMon TRonSCRIPTION INITIATION PROTEIN SPT4 HOMOLOG 1 [M.musculus]		down	0,4638	0,5278	0,8889	important for Transcription initiation	protein synthesis
ESTs, Highly similar to T08747 hypothetical protein DKFZp586B0519.1 [H.sapiens]		down	0,3464	0,4249	0,3016	no information	
ESTs, Highly similar to T46486 chromosomal protein CAPC homolog DKFZp434F205.1 [H.sapiens]		down	0,8514	0,4885	0,5325		
ESTs, Highly similar to TCP1-CHAPERONIN COFACTOR A [M.musculus]		down	0,8317	0,6105	0,7433	Tubulin folding protein	actin
ESTs, Highly similar to Y126_HUMon HYPOTHETICAL PROTEIN KIAA0126 [H.sapiens]	down		0,6046	0,0697	0,8684	no information	
ESTs, Moderately similar to 2020285A BRG1 protein [M.musculus]	down		0,8262	0,9055	0,5431	transcriptional coactivator	protein synthesis
ESTs, Moderately similar to A59262 tetraspon TSPon-1 [H.sapiens]	on		0,0410	0,1890	0,0260	no information	
ESTs, Moderately similar to ABP2_HUMon ENDOTHELIAL ACTIN-BINDING PROTEIN [H.sapiens]		on	0,0050	0,3860	0,5090		
ESTs, Moderately similar to AF072864 1 peroxisomal membrane protein PMP 24 [H.sapiens]		down	0,7441	0,1115	0,1397		
ESTs, Moderately similar to LCT2 MOUSE LEUKOCYTE CELL-DERIVED CHEMOTAXIN 2 PRECURSOR [M.musculus]	down		0,3260	0,6047	0,1867		
ESTs, Moderately similar to N4BM_HUMon NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE SUBUNIT B14.5B [H.sapiens]		down	0,5126	0,9653	0,5108	microtubuli associated (neuronal), transport of organelles	Vesicle
ESTs, Moderately similar to		down	0,5135	0,0407	0,9638	no information	

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
S12207 hypothetical protein [M.musculus]							
ESTs, Moderately similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	down		0,5129	0,1785	0,7549		
ESTs, Moderately similar to T08697 hypothetical protein DKFZp564A063.1 [H.sapiens]	down		0,6913	0,9143	0,9195	no information	
ESTs, Weakly similar to A Chain A, The C2b-Domain Of Rabphilin: Structural Variations In A Junus-Faced Domain [R.norvegicus]	up		1,1654	1,4482	1,4697		
ESTs, Weakly similar to A60716 somatotropin intron-related protein RDE.25 - rat [R.norvegicus]	down		0,8398	0,6097	0,0838		
ESTs, Weakly similar to ARL4 MOUSE ADP-RIBOSYLATION FACTOR-LIKE PROTEIN 4 [R.norvegicus]	down		0,9837	0,5753	0,7879		
ESTs, Weakly similar to B Chain B, Crystal Structure Of The Humon Acyl Protein Thioesterase 1 At 1.5 A Resolutio [H.sapiens]		down	0,3669	0,8102	0,2245		
ESTs, Weakly similar to C210_HUMon PROTEIN C21ORF2 [H.sapiens]		up	1,2529	1,2779	2,2254		
ESTs, Weakly similar to CALU MOUSE CALUMENIN PRECURSOR [M.musculus]		down	0,9153	0,6674	0,3199		
ESTs, Weakly similar to CIRP MOUSE COLD-INDUCIBLE RNA-BINDING PROTEIN [R.norvegicus]		up	1,1198	2,8035	1,7455		
ESTs, Weakly similar to cyclophilin B [R.norvegicus]		down	0,2195	0,9880	0,3700	ppiase, accelerates protein folding	protein synthesis
ESTs, Weakly similar to cyclophilin B [R.norvegicus]	down		0,5170	0,4141	0,1028	ppiase, accelerates protein folding	protein synthesis
ESTs, Weakly similar to dJ413H6.1.1 [H.sapiens]		down	0,8389	0,8673	0,9508		
ESTs, Weakly similar to GLUTATHIONE S-TRonSFERASE P [R.norvegicus]	down		0,7917	0,6358	0,9577		
ESTs, Weakly similar to JE0343 terf protein - rat [R.norvegicus]		up	5,7439	2,6548	2,0184		
ESTs, Weakly similar to JE0343 terf protein - rat [R.norvegicus]	up		4,5183	3,0660	3,2270		
ESTs, Weakly similar to JG0163 glucuronyltransferase - rat [R.norvegicus]		down	0,2577	0,0917	0,7248		
ESTs, Weakly similar to KCC1 RAT CALCIUM/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE TYPE I [R.norvegicus]		on	0,1800	0,2570	0,0920	phosphorylates synapsin I, which coats synaptic vesicles	Vesicle
ESTs, Weakly similar to KPCG MOUSE PROTEIN KINASE C, GAMMA		up	2,2368	1,3281	2,2056		

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
TYPE [R.norvegicus]							
ESTs, Weakly similar to LOX5 RAT ARACHIDONATE 5-LIPOXYGENASE [R.norvegicus]		up	1,2002	1,4088	7,3729	no information	
ESTs, Weakly similar to PON1 RAT SERUM PARAOXONASE/ARYLESTERASE 1 [R.norvegicus]	down		0,9473	0,8209	0,5079		
ESTs, Weakly similar to regulatory protein rpt-1 [M.musculus]	down		0,8141	0,4656	0,5870		
ESTs, Weakly similar to ROA1 RAT HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN A1 [R.norvegicus]		down	0,8640	0,8199	0,8180		
ESTs, Weakly similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	down		0,6865	0,0368	0,6604		
ESTs, Weakly similar to S25288 BTEB protein - rat [R.norvegicus]	up		1,1057	63,1250	2,4074		
ESTs, Weakly similar to S26689 hypothetical protein hc1 - mouse [M.musculus]	down		0,7004	0,9847	0,2426		
ESTs, Weakly similar to SERA RAT D-3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE [R.norvegicus]		down	0,9464	0,2703	0,3506		
ESTs, Weakly similar to SERA RAT D-3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE [R.norvegicus]	down		0,6834	0,0421	0,5775		
ESTs, Weakly similar to T02247 hypothetical protein P1.11659_5 [H.sapiens]		up	1,5977	1,8346	1,8117	no information	
ESTs, Weakly similar to T13747 hypothetical protein EG:22E5.9 - fruit fly [D.melonogaster]	down		0,5490	0,4837	0,9174	no information	
ESTs, Weakly similar to T15704 hypothetical protein C29H12.1 - Caenorhabditis elegans [C.elegans]		down	0,9657	0,5092	0,4052	no information	
ESTs, Weakly similar to T15704 hypothetical protein C29H12.1 - Caenorhabditis elegans [C.elegans]	down		0,7910	0,4499	0,7770	no information	
ESTs, Weakly similar to T15946 hypothetical protein F01F1.9 - Caenorhabditis elegans [C.elegans]	down		0,5291	0,4042	0,9110	no information	
ESTs, Weakly similar to T18290 FYVE finger-containing phosphoinositide kinase - mouse [M.musculus]	on		0,2090	0,7550	0,1970	no information	actin
ESTs, Weakly similar to T19073 hypothetical protein C08B11.9 - Caenorhabditis elegans [C.elegans]		on	0,0390	0,3310	0,0080	no information	
ESTs, Weakly similar to T19073 hypothetical protein C08B11.9 - Caenorhabditis elegans [C.elegans]	on		0,8540	0,1340	0,1810		
ESTs, Weakly similar to T23396 hypothetical protein		up	1,5768	1,5331	228,0000		

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
K07A12.1 - <i>Caenorhabditis elegans</i> [C.elegans]							
ESTs, Weakly similar to T24523 hypothetical protein T05E11.5 - <i>Caenorhabditis elegans</i> [C.elegans]		on	0,0430	0,0740	0,4240		
ESTs, Weakly similar to T27095 hypothetical protein Y51H1A.4 - <i>Caenorhabditis elegans</i> [C.elegans]		down	0,4431	0,2043	0,9775	no information	
ESTs, Weakly similar to T33225 hypothetical protein W02G9.1 - <i>Caenorhabditis elegans</i> [C.elegans]	on		0,2320	0,1880	0,3800	no information	
ESTs, Weakly similar to T33987 hypothetical protein T12B3.4 - <i>Caenorhabditis elegans</i> [C.elegans]		down	0,3670	0,5945	0,5276	no information	
ESTs, Weakly similar to T33987 hypothetical protein T12B3.4 - <i>Caenorhabditis elegans</i> [C.elegans]	down		0,6684	0,5615	0,6434	no information	
ESTs, Weakly similar to T34029 hypothetical protein C32F10.1 - <i>Caenorhabditis elegans</i> [C.elegans]		down	0,7696	0,3635	0,4943		
ESTs, Weakly similar to T43493 hypothetical protein DKFZp434C119.1 [H.sapiens]		down	0,7527	0,3353	0,6892	no information	
ESTs, Weakly similar to T43493 hypothetical protein DKFZp434C119.1 [H.sapiens]	down		0,7819	0,5501	0,6762		
ESTs, Weakly similar to T46402 hypothetical protein DKFZp434H2121.1 [H.sapiens]	down		0,8699	0,6646	0,6466		
ESTs, Weakly similar to T47146 hypothetical protein DKFZp761C169.1 [H.sapiens]	down		0,9095	0,3980	0,7917		
ESTs, Weakly similar to UB5D RAT UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2-17 KD 4 [R.norvegicus]	down		0,9899	0,9128	0,4988		
ESTs, Weakly similar to YKAE_CAEEL PROBABLE RIBOSOMAL PROTEIN B0303.15 IN CHROMOSOME III [C.elegans]	up		12,3547	2,7230	1,2407		
eukaryotic translation elongation factor 2		down	0,2389	0,2146	0,0934		
fetuin beta		down	0,8788	0,5937	0,8289	contains 2 cystatin like domains	
fibromodulin		down	0,4772	0,9109	0,0114	collagen fibrillogenesis	pancreatitis
fibromodulin	down		0,0651	0,7915	0,6635	collagen fibrillogenesis	pancreatitis
flag structure-specific endonuclease		down	0,3110	0,7060	0,5500	Endonuclease (DNA)	
Flotillin reggie1-1	down		0,9172	0,5219	0,6071	Scaffolding protein in caveolar membranes, vesicle	Vesicle
fumarylacetoacetate hydrolase	down		0,8774	0,8014	0,9156	no information	
G protein gamma-5 subunit	up		2,6402	1,6532	2,2799	gamma subunit required for replacement of GDP by GTP	Signalling
Glucagon receptor	on		0,8980	0,3590	1,3430	g-protein coupled receptor, regulation of level of blood glucose	Insulin

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
Glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)		on	0,5280	0,1050	1,0670	aminotransferase	
Glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase, cytosolic) see also D1Mgh12		up	3,4917	1,6675	3,6341	no information	
Glutamine synthetase (glutamate-ammonia ligase)		down	0,0571	0,0372	0,4327	no information	
Glutathione-S-transferase, alpha type (Ya)		down	0,8118	0,8971	0,3411		
Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2)	down		0,4524	0,2010	0,9924	no information	
golgi peripheral membrane protein p65		down	0,2856	0,0882	0,7059	no information	golgi
golgi peripheral membrane protein p65	down		0,4501	0,6944	0,9106	no information	golgi
gronulin	down		0,6323	0,2292	0,5837	may play a role in inflammation, tissue remodelling, cytokine like	pancreatitis
growth hormone releasing hormone	up		2,0863	1,2609	1,1157	stimulates release of growth hormone in brain	
HLA-B associated transcript 3		down	0,9158	0,9723	0,7658	function unknown	
HLA-B associated transcript 3	down		0,9947	0,6225	0,8330	function unknown	
hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, type II		down	0,2793	0,4286	0,6706	oxidoreductase	
I-kappa-B-beta		down	0,1714	0,1589	0,6660	NF-kappa B inhibitor, binds it and transports it to the nucleus	protein synthesis
I-kappa-B-beta	down		0,0797	0,1775	0,0830	NF-kappa B inhibitor, binds it and transports it to the nucleus	protein synthesis
Inhibitor of DNA binding 1, helix-loop-helix protein (splice variation)	down		0,9451	0,2761	0,4072	no information	
inositol triphosphate receptor type 2	on		0,1580	0,0480	0,2850		Signalling
Islet amyloid polypeptide		down	0,5792	0,4921	0,9863	in Langerhans, inhibits insulin stimulated glucose utilization	
Islet amyloid polypeptide	down		0,4590	0,3223	0,6350	in Langerhans, inhibits insulin stimulated glucose utilization	
karyopherin (importin) alpha 2		on	1,0380	0,2490	0,0090	nuclear import of pore complex	
K-kininogen, differential splicing leads to HMW Kngk		down	0,7398	0,7182	0,3588	no information	
Malate dehydrogenase-like enzyme		down	0,1262	0,0251	0,7449	no information	
mast cell protease 1		down	0,5687	0,6385	0,7225	peptidase	
matrix metalloproteinase 14, membrane-inserted	up		1,1286	1,4244	1,2483	peptidase, activates pro-gelatinase A which cleaves gelatine and collagen	pancreatitis
MYB binding protein (P160) 1a	on		0,0060	0,0500	0,8120	no information	
myosin regulatory light chain		down	0,5464	0,2831	0,4786	torgerson, active in membrane blebbing after CCK	Actin
myosin regulatory light chain	down		0,6143	0,5580	0,8178	torgerson, active in membrane blebbing after CCK	actin
NADH ubiquinone oxidoreductase subunit B13		down	0,8993	0,4875	0,7614	mitochondrial, transfer of electrons	
NADH ubiquinone oxidoreductase subunit B13	down		0,9325	0,4984	0,9282	mitochondrial, transfer of electrons	
Poncreatic lipase		on	0,4210	0,3500	1,4470		Secretion

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
pancreatic lipase related protein 1		down	0,5970	0,8164	0,6014	belongs to the lipase family, secreted	Secretion
Peripheral myelin protein		down	0,8600	0,4228	0,4041	nerve protein, down regulated after sciatic nerve injury	
Peripheral myelin protein	down		0,4865	0,5850	0,1955	nerve protein, down regulated after sciatic nerve injury	
peroxisomal membrane protein 2, 22 kDa	down		0,8761	0,5376	0,7350	integral membrane protein, peroxisome	
phosphatidylinositol 4-kinase		on	0,4560	0,1610	0,1320	production of second messenger inositol 1,4,5 triphosphat	Signalling
phosphatidylinositol 4-kinase	on		0,4740	0,3760	0,3440	production of second messenger inositol 1,4,5 triphosphat	Signalling
phosphofruktokinase, muscle	up		2,0607	1,3557	5,4489	key control step of glycolysis	pancreatitis
plasma glutathione peroxidase precursor	down		0,6387	0,3526	0,2220	protects cells from oxidative damage	pancreatitis
Plasminogen activator inhibitor		on	0,6530	0,3160	0,4840		
Plasminogen activator, tissue		down	0,2279	0,2802	0,8002	converts plasminogen to plasmin, peptidase, tissue remodelling and degradation	
platelet endothelial tetraspan ontigen-3	down		0,8729	0,7162	0,6566	integral membrane protein, interacts with integrins	actin
preproenkephalin 2		down	0,7998	0,5595	0,5095	opiod neuropeptide, role in pain reception and stress	
preproenkephalin 2	down		0,7824	0,4261	0,7349	opiod neuropeptide, role in pain reception and stress	
procollagen, type 1, alpha 1		down	0,9817	0,1538	0,8613	fibrillar forming collagen	
profilin	up		1,1148	5,4937	1,0559	forms complex with actin (1:1), at high conc. It prevents actin polymerisation, low conc. enhance polym. Through binding to pip2, which inhibits formation of ip3 and DAG	actin
programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)		down	0,7035	0,7999	0,4585	caspase independent mitochondrial effector of apoptosis	apoptosis
programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)	down		0,6610	0,8269	0,6962	caspase independent mitochondrial effector of apoptosis	apoptosis
Prosaposin (sulfated glycoprotein, sphingolipid hydrolase activator)	on		0,2960	0,6300	0,1520	no information	
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 5		on	0,5040	0,5420	0,2830	non-lysosomal proteolytic pathway, peptidase	
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform		down	0,8824	0,6077	0,3123	no information	
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	down		0,4020	0,5998	0,1787	no information	
R.norvegicus mRNA for histone H3.3		on	0,0350	0,2550	0,1870		
R.norvegicus mRNA for mammalion fusca protein	down		0,5487	0,0234	0,1294	no information	
R.norvegicus mRNA for muscle LIM protein		down	0,5860	0,9340	0,8084	no information	
Rab 8 Sprague-Dawley (clone LRB11) RAB8 mRNA, complete cds		down	0,9458	0,5422	0,5006	vesicular trafficking	Vesicle
Rab 8 Sprague-Dawley (clone LRB11) RAB8 mRNA, complete cds	down		0,6725	0,4448	0,7348	vesicular trafficking	Vesicle
Rab3B protein		up	1,0047	1,4969	2,8603	vesicular trafficking	actin

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
RAS p21 protein activator 3		on	0,4440	0,3940	0,1470	stimulates Atpase of normal ras (not oncogenic)	Signalling
ras-related protein rab10	on		0,3440	0,2040	0,2630	vesicular trafficking	actin
Rat anti-acetylcholine receptor antibody gene, rearranged Ig gamma-2a chain, VDJC region, complete cds		down	0,7481	0,1739	0,4348	no information	
Rat assembly protein (AP50) associated with clathrin-coated vesicles mRNA, complete cds		on	1,6850	0,8610	0,3740	part of adaptor complex which link clathrin to receptors in coated vesicles	Vesicle
Rat assembly protein (AP50) associated with clathrin-coated vesicles mRNA, complete cds	on		1,1480	1,0390	0,2070	part of adaptor complex which link clathrin to receptors in coated vesicles	Vesicle
Rat casein-alpha mrna	on		0,1630	0,1440	0,1320	milk protein???	
Rat glutathione S-transferase mRNA, complete cds		down	0,7107	0,5632	0,5327	conjugation of reduced glutathione to a wide number of hydrophobic electrophiles	
Rat heart mRNA serine/threonine protein kinase, complete cds	on		0,0320	0,6440	0,1100	no information	
Rat urate oxidase 2 mRNA, complete cds		down	0,5774	0,8449	0,8986		
Rattus norvegicus carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase mRNA, complete cds	on		0,5300	0,4120	0,4330	no information	
Rattus norvegicus cell adhesion-like molecule mRNA, complete cds	down		0,9693	0,0031	0,6687	in brain	
Rattus norvegicus GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein mRNA, complete cds		down	0,5532	0,4123	0,3407	no information	
Rattus norvegicus GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein mRNA, complete cds	down		0,9050	0,4912	0,5160	no information	
Rattus norvegicus mRNA for amphiphysin, amph2	on		0,0580	0,4450	0,2430	regulated exocytosis in endocrine cells, vesicle	Vesicle
Rattus norvegicus mRNA for cathepsin Y, partial cds		down	0,7553	0,6722	0,5096	Peptidase	pancreatitis
Rattus norvegicus mRNA for class I beta-tubulin, complete cds	on		0,0960	1,1040	0,2930	part of the cytoskeleton	actin
Rattus norvegicus mRNA for Vesl-2(delta 11), complete cds	on		0,4790	0,6270	0,8880	no information	
Rattus norvegicus Na ⁺ /Pi cotransporter-1 mRNA, complete cds		down	0,5777	0,6316	0,9988	no information	
Rattus norvegicus natural killer cell protease 4 (RNKP-4) mRNA, complete cds		on	0,2800	0,1620	0,1310		
Rattus norvegicus Nclone10 mRNA		down	0,6007	0,4872	0,8690	no information	
Rattus norvegicus Nclone10 mRNA	down		0,5318	0,5193	0,5352	no information	
Rattus norvegicus nuclear pore complex protein NUP107 mRNA, complete cds		on	0,2550	0,1700	0,5030	essential component of nuclear pore complex	
Rattus norvegicus nuclear pore complex protein NUP107 mRNA, complete cds	on		0,0030	0,4660	0,7250	essential component of nuclear pore complex	

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
Rattus norvegicus protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) mRNA, complete cds		on	0,3830	0,4590	0,1130		
Rattus norvegicus rearranged IgG-2b gene, last 4 exons	down		0,6497	0,9434	0,5380		
Rattus norvegicus serine protease gene, complete cds		up	1,1055	1,8413	1,2488	Serine protease	pancreatitis
Regeneration protein, lithostatin, poncreatic stone protein	down		0,2615	0,7924	0,4362	secreted in pancreatic juice, stops calcium precipitation	
ribosomal protein L29		down	0,7268	0,1384	0,9897	Ribosome, translation of mRNA	
ribosomal protein S11		down	0,6539	0,9664	0,9495		
ribosomal protein S2	up		1,0535	3,7719	1,6900		
Ryudocon/syndecon 4		down	0,9436	0,9254	0,6909	cell surface proteoglykan	
Ryudocon/syndecon 4	down		0,9413	0,7204	0,5695	cell surface proteoglykan	
S-adenosylhomocysteine hydrolase	down		0,7778	0,4589	0,4014	no information	
secretory carrier membrone protein 3	down		0,8779	0,4520	0,3974	recycling carrier from golgi to cell surface	Secretion
Serine protease inhibitor	down		0,7559	0,7084	0,6488	inhibitor of trypsin, but not chymotrypsin or elastase, often mutated in pancreatitis	pancreatitis
Short stature homeobox 2		up	1,0201	4,4000	2,7980		
Small proteoglycon I (biglycon), bone (BSPG1) (bone/cartilage proteoglycon 1 precursor)		down	0,9169	0,3767	0,7687		
Solute carrier family 2 A2 (glucose transporter, type 2)	down		0,6086	0,0673	0,9078	glucose transport across membrane, sensor for glucose in beta cells	Insulin
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ -system), member 7		down	0,5211	0,8682	0,8086	no information	
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ -system), member 7	down		0,8397	0,7404	0,8762	no information	
Sperm outer dense fiber major protein 1	on		0,2690	0,1530	0,0330	no information	
Steroidogenic acute regulatory protein		down	0,9029	0,7526	0,2993		
Superoxide dimutase 3		down	0,5914	0,2468	0,7118	destroys toxic radicals which are produced in the cell	
Synaptophysin		down	0,5083	0,9943	0,4791	member of synaptobrevin family, possibly involved in targeting vesicle to membrane	Vesicle
Synaptophysin	down		0,9544	0,2225	0,7171	member of synaptobrevin family, possibly involved in targeting vesicle to membrane	Vesicle
Testosterone-repressed prostate message 2	down		0,6812	0,7068	0,3997	anti-apoptotic, function not yet clear	apoptosis
Thyroid transcription factor 1 TTF-1 NK-2 (Drosophila) homolog A (thyroid nuclear factor)	down		0,4365	0,3190	0,6870	transcription factor for thyroid specific genes	
troponin I, cardiac	down		0,7391	0,1852	0,8611	binds to actin-tropomyosin,	actin
trypsin inhibitor Rat poncreatic secretory trypsin inhibitor type II (PSTI-II) mRNA, complete cds		down	0,9945	0,1688	0,7944	Trypsin Inhibitor	pancreatitis
Unconventional myosin from rat 3	down		0,9618	0,8881	0,3844	intracellular movement, remodelling of actin	actin

Protein	10-8 M	10-10 M	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Function	area
						cytoskeleton, binds to actin with high affinity	
Uncoupling protein 2, mitochondrial		down	0,7482	0,7105	0,6964		
Uteroglobin (Clara cell secretory protein)		down	0,5921	0,3339	0,5924	PLA2 inhibitor	Signalling
Uteroglobin (Clara cell secretory protein)	down		0,8746	0,5148	0,7061	PLA2 inhibitor	
zinc finger protein 265	on		0,1850	0,6910	0,3290	no information	

Die Werte der 3 Experimente ergeben sich wie folgt: An- und ausgeschaltete Gene zeigen Absolutwerte. Bei einer Hoch- bzw. Herunterregulation der Gene handelt es sich um vielfache der korrespondierenden Kontrolle.