



Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**Expression und Regulation  
einer neuen  
Signaltransduktionskaskade  
in exokrinen Azinuszellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von:  
Martina Pinschke

aus:  
Berlin

München 2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Claus Schäfer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Max Schnurr  
Prof. Dr. Helmut Bartels  
Prof. Dr. Hans Arnholdt

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Das Pankreas	5
1.2 Die akute Pankreatitis	7
1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie, Verlauf und Therapie der akuten Pankreatitis	7
1.2.2 Pathophysiologische Konzepte der akuten Pankreatitis	7
1.3 Cholezystokinin und dessen Rolle bei der akuten Pankreatitis	11
1.4 Eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade zu Aktin-bindenden Proteinen	12
1.5 Fragestellung	24
<b>2. Methodik</b>	<b>25</b>
2.1 Versuchstiere	25
2.2 Verwendete Chemikalien, technische Geräte und Materialien	25
2.2.1 Chemikalien	25
2.2.2 Technische Geräte und Materialien	29
2.3 Versuchsdurchführung	30
2.3.1 Präparation von Pankreasläppchen	30
2.3.2 CCK-Stimulation der Pankreasläppchen <i>in-vitro</i>	30
2.3.3 CCK-Stimulation des Pankreas <i>in-vivo</i>	31
2.3.4 Gewinnung der Zytosol- und Zytoskelettfraction	32
2.3.5 Herstellung von Y-27632-Inhibitorproben	32
2.3.6 Immunopräzipitation	33
2.4 Protein-Bestimmung	33
2.5 Analyse der Proteine mittels Western-Blot	34

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1 Expression von RhoA, ROCK II, MYPT1, MLC, MLCK, mDia und Cofilin in Pankreasazinuszellen	38
3.2 Regulation von RhoA, MYPT1, MLC, MLCK, mDia und Cofilin durch CCK	39
3.3 Untersuchung der Zytosol- und Zytoskelettfraktion	49
3.4 Assoziation der Enzyme untereinander	50
3.5 Hemmung der Signaltransduktionskaskade durch Y-27632	54
<b>4. Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1 Zusammenfassung und kritische Bewertung der Experimente	57
4.1.1 Expression von RhoA, ROCK II, MYPT1, MLC, MLCK, mDia und Cofilin in Pankreasazinuszellen	57
4.1.2 Regulation der Enzyme des Signaltransduktionsweges durch CCK	61
4.1.3 Hemmung der Signaltransduktionskaskade durch Y-27632	64
4.2 Mögliche Bedeutung des untersuchten Signaltransduktionsweges zu Aktin-bindenden Proteinen im Pankreas	65
4.3 Ausblick und weiterführende Untersuchungen	66
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>7. Lebenslauf</b>	<b>78</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADF	Aktin-depolymerisierender Faktor
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCK	Cholezystokinin
Dtl.	Deutschland
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
FH	Formin-Homolog
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
G-Protein	Guaninnukleotide-bindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
kDa	Kilodalton, Molekulargewicht eines Proteins
LIMK	LIM-Kinase
mDia	in Säugetieren vorkommendes Homolog von <i>Drosophila diaphanous</i>
MLC	Myosin-Leichte-Kette
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosinphosphatase
MYPT1	Zieluntereinheit der Myosinphosphatase
nM	nanomolar
Pi	Phosphat
pM	picomolar
pMLC	phosphorylierte Myosin-Leichte-Kette
pMYPT1	phosphorylierte Zieluntereinheit der Myosinphosphatase
PP1c $\delta$	Typ 1 Phosphatase $\delta$ Isoform
ROCK II	Rho-Kinase
Ser	Serin
Thr	Threonin
WB	Western-Blot

Die Erklärungen für Abkürzungen chemischer Reagenzien sind Tabelle 1 zu entnehmen.

## **1. Einleitung**

Die physiologischen Aufgaben der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) sind bis zum heutigen Tag weitestgehend erforscht.

Die Ausschüttung des Hormons Insulin und die bei dessen absolutem bzw. relativem Mangel resultierende Erkrankung Diabetes mellitus Typ 1 bzw. Typ 2 ist schon aufgrund der Häufigkeit dieser Krankheit Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen.

Die von dieser Funktion unabhängige Produktion und Sekretion von Verdauungsenzymen ist ebenfalls zum großen Teil bekannt. Nach heutigem Kenntnisstand ist diese Aufgabe des Organs beteiligt an der Entwicklung einer Bauchspeicheldrüsenentzündung (Pankreatitis) (Yamaguchi, Kimura et al. 1989; Lerch, Saluja et al. 1992). Extrazelluläre Auslöser, die zu einer solchen Organreaktion führen, sind ausführlich beschrieben. Jedoch sind die zellulären Ursachen und Pathomechanismen größtenteils noch unbekannt. Um ein besseres Verständnis der Erkrankung zu erlangen und um frühzeitige Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können, ist die Kenntnis dieser intrazellulären Vorgänge von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit werden die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Expression und Regulation einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade erläutert, welche so zu einem besseren Verständnis sowohl der physiologischen als auch der pathophysiologischen Vorgänge in Azinuszellen des Pankreas beitragen.

Im Folgenden soll kurz auf die Physiologie und die Aufgaben des Pankreas eingegangen (1.1) sowie kurz das aktuelle gedankliche Rahmenkonzept zur Pathogenese der akuten Pankreatitis dargelegt werden (1.2). Anschließend wird die Bedeutung des Hormons Cholezystokinin (CCK) bzw. dessen synthetischen Analogons Caerulein bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts bei der akuten Pankreatitis erläutert (1.3). Darauf folgt eine Vorstellung des Signaltransduktionsweges, welcher die Enzyme RhoA, Rho-Kinase (ROCK II), Myosinphosphatase (MLCP), Myosin-Leichte-Kette (MLC),

Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK), mDia und Cofilin beinhaltet sowie eine Charakterisierung des verwendeten ROCK-Inhibitors Y-27632 (1.4). Abschließend wird auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit eingegangen (1.5).

## 1.1 Das Pankreas

Das Pankreas hat zwei voneinander unabhängige Funktionen: Eine endokrine, die für die Regulierung des Glukosestoffwechsels mittels Insulin sowie Glukagon verantwortlich ist, und eine exokrine Funktion. Hierbei ist das Organ maßgeblich an der intestinalen Verdauung durch Sekretion verschiedener Enzyme im Pankreassekret beteiligt.

### Physiologie des exokrinen Pankreas

Zunächst soll zum besseren Verständnis der akuten Pankreatitis die Physiologie des exokrinen Pankreas erläutert werden:

Das exokrine Pankreas hat zwei Bestandteile: Das duktale System, welches Flüssigkeiten und Elektrolyte nach Sekretinstimulation freisetzt, und die Azinuszellen, die durch Cholezystokinin (CCK) oder muskarinartige cholinerge Stimulation Verdauungsenzyme sezernieren (Steer and Meldolesi 1987).

Unter physiologischen Bedingungen findet der Vorgang der Sekretion wie folgt statt: Sowohl Verdauungsenzyme als auch lysosomale Hydrolasen werden an Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Von dort werden die Verdauungsenzyme zum Golgi-Apparat transportiert, wo die Proteine in Vakuolen verpackt werden. Diese Vakuolen reifen zu Zymogengranula, in denen die enthaltenen Enzyme höher konzentriert werden. Schließlich wird der Inhalt der Organellen per Exozytose aus der Zelle in den Pankreasgang hinausgeschleust (Palade 1975).

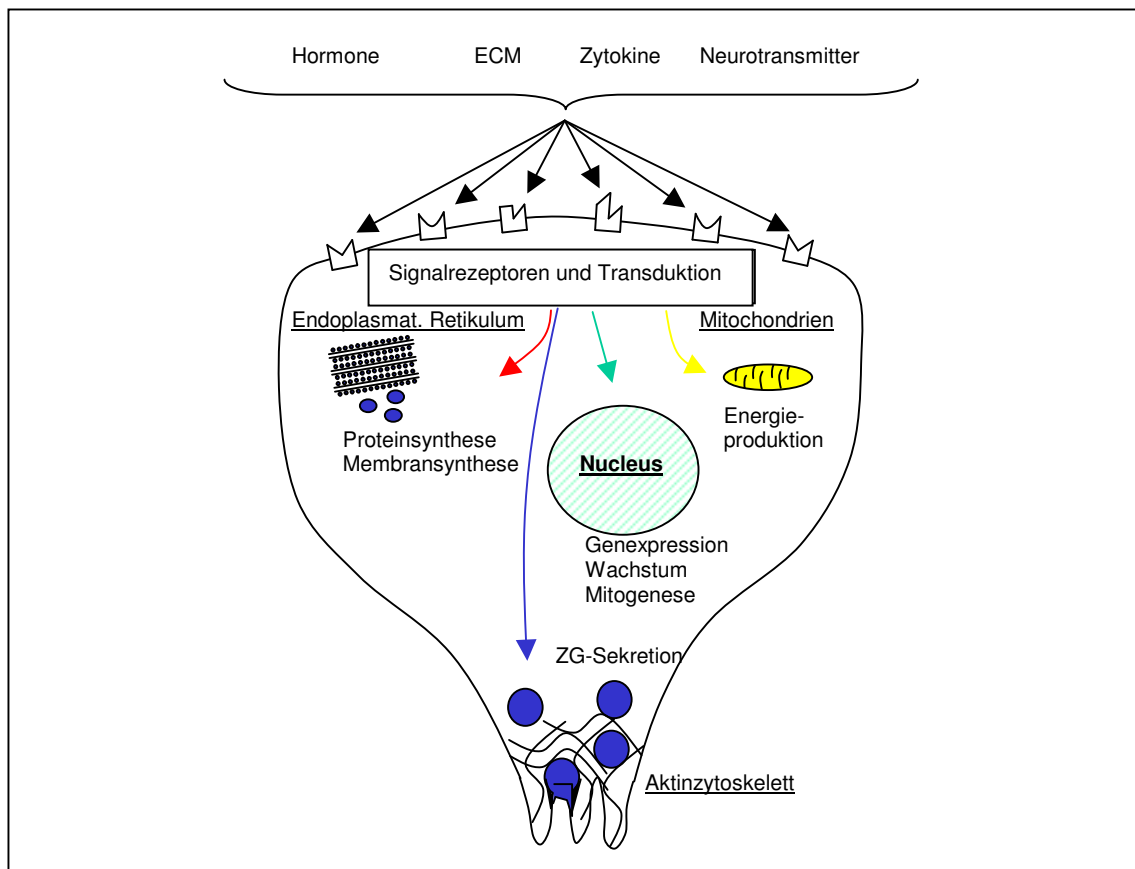


Abbildung 1: Übersicht über eine exokrine Azinuszelle des Pankreas. An der basalen Zellmembran erfolgt die Ligandenbindung über Rezeptoren. Dadurch werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, und an der apikalen Seite erfolgt die Sekretion von Zymogengranula (ZG). Im apikalen Zellteil findet sich auch ein dichtes Netzwerk aus Aktinfilamenten.

Um die Azinuszelle vor einer Schädigung der produzierten Proteine zu bewahren, besitzt das Pankreas folgende Schutzmechanismen:

Die synthetisierten Verdauungsenzyme werden als inaktive Vorstufen oder Zymogene sezerniert und erst später, außerhalb der Azinuszellen, aktiviert. Als weiteren Schutz besitzen diejenigen Granula, welche die Verdauungsenzyme enthalten, Enzyminhibitoren. Hierdurch wird eine vorzeitige Aktivierung verhindert. Während des gesamten Vorgangs der Sekretion befinden sich die Enzymvorstufen in separaten Organellen, welche sie vom Zytoplasma der Zellen und von lysosomalen Hydrolasen trennen. Außerdem liegt der pH-Wert der Zymogengranula im sauren Bereich und somit unterhalb des pH-Optimums der meisten proteolytisch wirksamen Enzyme. Zusätzlich sorgen intrazelluläre



Proteasen dafür, dass schon vorhandene, aktive Enzyme degradiert werden (Lerch and Gorelick 2000).

## 1.2 Die akute Pankreatitis

### 1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie, Verlauf und Therapie der akuten Pankreatitis

Die akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse stellt das klinische Korrelat einer Organreaktion auf unterschiedliche schädliche Einflüsse und Noxen dar. Die akute Pankreatitis ist eine relativ häufige gastrointestinale Erkrankung mit einer Inzidenz von 10-46 Fälle je 100.000 Einwohner p.a. Die Hauptursachen sind Gallenwegserkrankungen (Cholelithiasis, Gallengangsstenosen) und Alkoholabusus. Folglich sind typische Auslöser der Erkrankung voluminöse, fettreiche Mahlzeiten und Alkoholexzess. Seltener Ursachen sind hereditäre Formen (autosomal-dominanter Erbgang), Infektionen (z.B. Mumps, Hepatitis), Traumata, iatrogene Formen nach ERCP, verschiedene Medikamente, Mukoviszidose, primärer Hyperparathyreoidismus und Hyperlipidämie. In circa 10% der Fälle liegt eine idiopathische Form vor.

Klinisch und morphologisch wird zwischen der ödematösen und der nekrotisierenden Verlaufsform der Erkrankung unterschieden. Bezogen auf die Gesamtanzahl der Erkrankungen beträgt die Sterblichkeit bei der unkomplizierten, ödematösen Form unter 1%, bei der komplizierten, nekrotisierenden Verlaufsform hingegen 10-24%.

Bis heute steht keine spezifische medikamentöse Therapie der akuten Pankreatitis zur Verfügung. Die Therapie erfolgt rein symptomatisch.

### 1.2.2 Pathophysiologische Konzepte der akuten Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine plötzlich auftretende, primär nicht-infektiöse Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Von der chronischen Pankreatitis unterscheidet sie sich dadurch, dass nach Ausschalten der Auslöser und Komplikationen in der Regel eine Ausheilung, gegebenenfalls mit

morphologischen Defekten, zu erwarten ist. Die Pathophysiologie der akuten Pankreatitis konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden.

Erstmals im Jahre 1901 veröffentlichte der Pathologe Eugene Opie eine Hypothese, welche besagt, dass ein Abflusshindernis der Pankreassekretion die Pankreatitis auslöst (Opie 1901). Jedoch ließen die morphologischen Veränderungen der Azinuszellen (Lerch, Saluja et al. 1992) viele Wissenschaftler vermuten, dass der Vorgang der akuten Pankreatitis eine Zerstörung des Organs durch die in den Azinuszellen synthetisierten Verdauungsenzyme darstellt. Somit erklärt die oben erwähnte Vermutung Opies nach heutigem Kenntnisstand nicht, wie die als inaktive Vorstufen sezernierten Verdauungsenzyme intrazellulär aktiviert werden. Diese vorzeitige Aktivierung blieb lange Zeit unklar.

In den letzten Jahren konnten drei wichtige Phänomene in der Frühphase der akuten Pankreatitis definiert werden (Steer 1997): Die sekretorische Blockade (Saluja, Saluja et al. 1989), die frühzeitige intrazelluläre Aktivierung von Verdauungsenzymen (Saluja, Donovan et al. 1997; Hofbauer, Saluja et al. 1998) und die Bildung entzündlich aktiver Mediatoren, Zytokinen und Chemokinen (Gross, Leser et al. 1993; Grady, Liang et al. 1997; Brady, Christmas et al. 1999).

Auf diese pathophysiologischen Ereignisse soll im Folgenden näher eingegangen werden.

- Sekretorische Blockade

Das unter Punkt 1.4 näher beschriebene, unter der Plasmamembran lokalisierte Aktinzytoskelett ist am intrazellulären Transport und an der Exozytose von in der Zelle gebildeten Proteinen, wie z.B. den Verdauungsenzymen der Azinuszellen, beteiligt. Während der frühen Phase der akuten Pankreatitis wurde eine Reorganisation und Zerstörung des Aktinzytoskeletts an der basolateralen Membran der Azinuszelle beobachtet (Lampel and Kern 1977). Durch diese Reorganisation des Zytoskeletts wird der intrazelluläre Transport

und somit auch die Sekretion von Enzymen blockiert. Untersuchungen zeigten, dass außerdem im apikalen Teil der Zellen das Protein Myosin II aktiviert wird (Torgerson and McNiven 2000). Diese apikalen Veränderungen könnten ebenfalls zu einer Blockierung der Proteinsekretion führen. Die Proteinsynthese der Zellen bleibt jedoch trotz aller zellulärer Umstrukturierungen weiter bestehen, wodurch sich die neu synthetisierten Proteine innerhalb der Zelle anreichern (Steer and Saluja 1993).

- Frühzeitige intrazelluläre Enzymaktivierung

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass durch die bereits beschriebene sekretorische Blockade die Enzymvorstufen mit lysosomalen Hydrolasen in zytoplasmatischen Vakuolen kolokalisiert sind, wodurch eine vorzeitige Aktivierung der Verdauungsenzyme erfolgen kann (Watanabe, Baccino et al. 1984; Saluja, Hashimoto et al. 1987). Durch diesen Vorgang kommt es zu einem Ungleichgewicht von intrazellulären Proteasen und Antiproteasen (Dugernier, Laterre et al. 2005).

Die intrazelluläre Enzymaktivierung stellt sowohl ein frühes als auch ein kritisches Ereignis in der Entwicklung der akuten Pankreatitis dar.

Durch die beschriebenen Analysen wird die Vermutung der Selbstverdauung des Pankreas als ein auslösender Mechanismus der akuten Pankreatitis zunächst bestätigt (Yamaguchi, Kimura et al. 1989). Jedoch zeigten andere Untersuchungen, dass das lysosomale Cathepsin B und Verdauungsenzyme auch in gesundem Pankreasgewebe oder nach Stimulation mit Bombesin, welches keine Organentzündung hervorruft, teils in den gleichen Organellen vorkommen und keine akute Pankreatitis ausgelöst wird (Willemer, Bialek et al. 1990; Grady, Dabrowski et al. 1996).

Folglich ist die Rolle der Kolokalisation bei der Entstehung der akuten Pankreatitis noch nicht vollständig geklärt.

- Bildung entzündlich aktiver Mediatoren und Zytokinen

Durch den bereits näher beschriebenen Vorgang der Selbstverdauung des Pankreas werden Entzündungsmediatoren freigesetzt. Dies kann durch einen

Anstieg der inflammatorischen Serumparameter quantifiziert werden (Gross, Leser et al. 1993).

Diese immunologische Reaktion setzt im Gegensatz zur intrazellulären Trypsinaktivierung relativ spät ein, so dass sie den Schweregrad der akuten Organreaktion stärker beeinflusst.

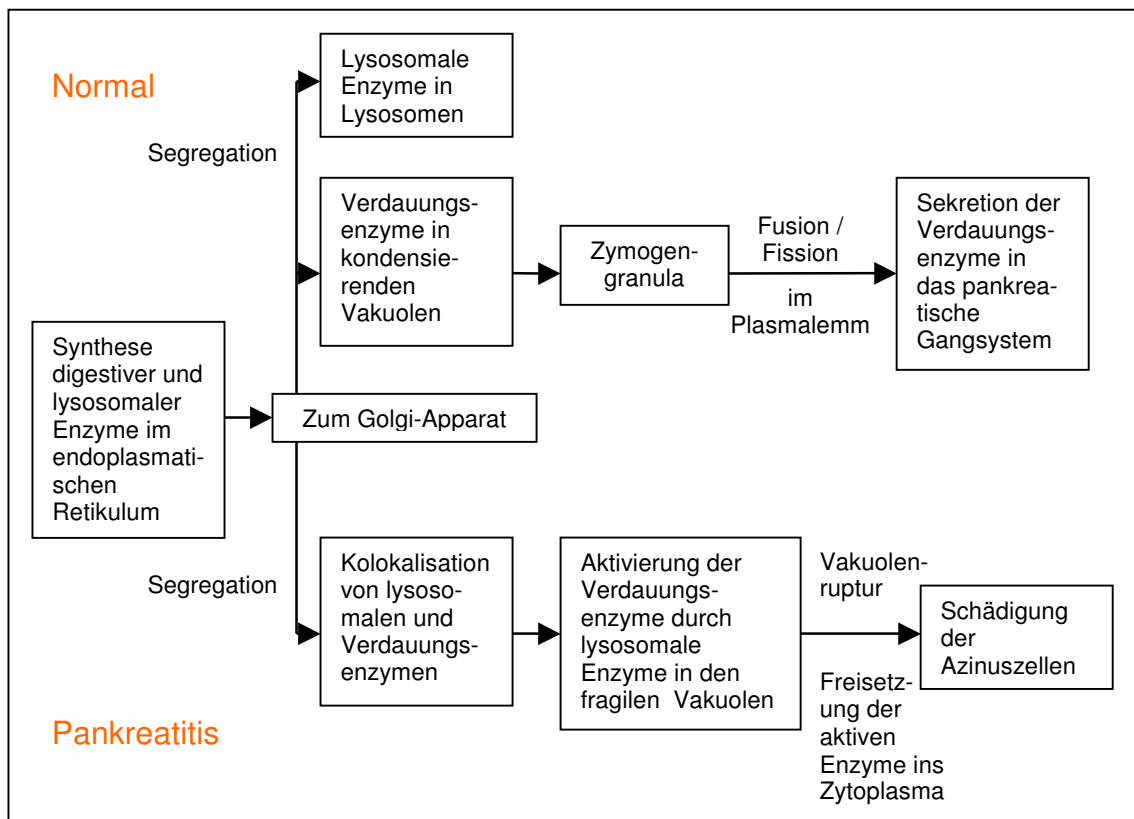


Abbildung 2: Übersicht über zelluläre Ereignisse, die zu einer akuten Pankreatitis führen können. Reproduziert nach Steer (Steer 1997).

Um jedoch therapeutisch eingreifen zu können, bedarf es zunächst dem besseren Verständnis der intrazellulären Vorgänge, die zu einer akuten Pankreatitis führen können. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit tragen dazu bei, einen Teil dieser Ereignisse zu erklären.

### 1.3 Cholezystokinin und dessen Rolle bei der akuten Pankreatitis

Das Hormon Cholezystokinin (CCK) wird als Antwort auf die Nahrungsaufnahme von endokrinen Zellen des Duodenums sezerniert. Über Rezeptoren der Azinuszellen des Pankreas stimuliert CCK die Sekretion von Verdauungsenzymen. Somit trägt das Hormon in physiologischen Konzentrationen nicht nur zur Modulierung der pankreatischen Funktion, sondern auch zu morphologischen Veränderungen innerhalb der Zellen bei (Niederau, Luthen et al. 1994).

Die repetitive Gabe supramaximaler Konzentrationen von CCK oder des Cholezystokinin-Pankreozymin Analogons Caerulein bewirken eine akute Pankreatitis (Lampel and Kern 1977). Diese äußert sich durch eine Erhöhung der Amylase im Serum, ein interstitielles Ödem der Bauchspeicheldrüse, eine verstärkte lysosomale Aktivität in den Azinuszellen sowie durch eine Fusion von Zymogengranula in den Zellen (Lampel and Kern 1977; Adler, Gerhards et al. 1983).

Eine Stimulierung mit supramaximalen Dosierungen von CCK bewirkt zudem eine Aktindepolymerisation in Azinuszellen, wodurch der Vorgang der Exozytose in den Zellen gestört wird (Adler, C. et al. 1991; O'Konski and Pandol 1993). Durch bisher nicht vollständig geklärte Signalwege wird im apikalen Teil der Zellen das Protein Myosin II aktiviert sowie im basolateralen Teil Aktin und Myosin II reorganisiert (Torgerson and McNiven 2000).

Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, dass Cholezystokinin über CCK-Rezeptoren eine Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen in Azinuszellen aktiviert, welche nicht nur die Proteinsynthese, das Zellwachstum und den Metabolismus regulieren, sondern auch den Vorgang der Sekretion (O'Konski and Pandol 1990). Die vorliegende Arbeit soll die Untersuchungen einer neuen Signaltransduktionskaskade in Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse erläutern.

#### 1.4 Eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade zu Aktin-bindenden Proteinen

Intrazelluläre Signalübertragung ist eine wichtige Voraussetzung für die Regulation der Entwicklung, des Wachstums und der Homöostase in vielzelligen Organismen.

Um diesen Vorgang zu beschreiben, soll im Folgenden zunächst das daran beteiligte Aktinzytoskelett näher erläutert werden:

Myosin II ist wesentlicher kontraktiler Bestandteil im Muskel und außerdem gemeinsam mit Aktin am intrazellulären Transport von Vesikeln, Zellorganellen und anderen biologischen Lasten beteiligt. Somit spielen diese beiden Proteine eine wichtige Rolle bei einer Reihe von Zellfunktionen. Beispiele hierfür sind: Kontraktion von glatten Muskel- und anderen Körperzellen, Gefäßtonus, Thrombozytenaggregation, Zellmotilität, Tumorzellinvasion, Zellbefestigung, Zytokinese und schließlich Zytoskelettstruktur, Formation von Mikrofilamenten und fokalen Adhäsionen sowie Sekretion.

Aktin ist ein Strukturprotein, welches in allen eukaryotischen Zellen vorkommt und Bestandteil des Aktinzytoskeletts ist. Das Protein bildet in der Zelle dynamische Filamente, die sogenannten Aktinfilamente oder F-Aktin. Diese Filamente sind nicht nur zentraler Bestandteil des Kontraktionsapparates der Muskeln, sondern dienen auch der Stabilisierung der äußeren Zellform sowie intrazellulären Transporten, wie z.B. dem Vorgang der Sekretion.

Der äußerst komplexe Prozess der Aktinpolymerisation und –depolymerisation wird durch eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine direkt und indirekt beeinflusst (siehe Abbildung 8). Dieser Vorgang wird als „Tretmühlenreaktion“ bezeichnet (Carlier 1998; Pantaloni, Le Clainche et al. 2001). Ein Signalweg zu diesen Aktin-bindenden Enzymen wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Ein bedeutender Regulationsmechanismus des Aktinzytoskeletts und somit der oben genannten Zellfunktionen stellt die Phosphorylation von Myosin II dar (Somlyo and Somlyo 1994). Myosin II wird nicht nur durch Fluktuationen der

intrazellulären Calciumkonzentration reguliert, sondern auch durch andere wichtige  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Signalmechanismen.

Einer dieser Signalwege führt über die GTPase RhoA zu einer Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK II), welche daraufhin die Myosin-bindende Untereinheit (MYPT1) der Myosinphosphatase (MLCP) phosphoryliert. Dadurch wird die Phosphatase in ihrer Aktivität gehemmt und es resultiert eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK). Die Myosin-Leichte-Kette (MLC) wird vermehrt phosphoryliert, wodurch eine Interaktion von Myosin mit den Aktinfilamenten und somit eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts bewirkt wird (siehe Abbildung 3).

Außerdem wird das Enzym mDia von RhoA aktiviert und führt über eine Interaktion mit Profilin zu einer Aktinpolymerisation. Über ROCK II aktiviert RhoA die LIM-Kinase, welche Cofilin phosphoryliert. Dies führt über eine Hemmung der Aktindepolymerisation zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts.

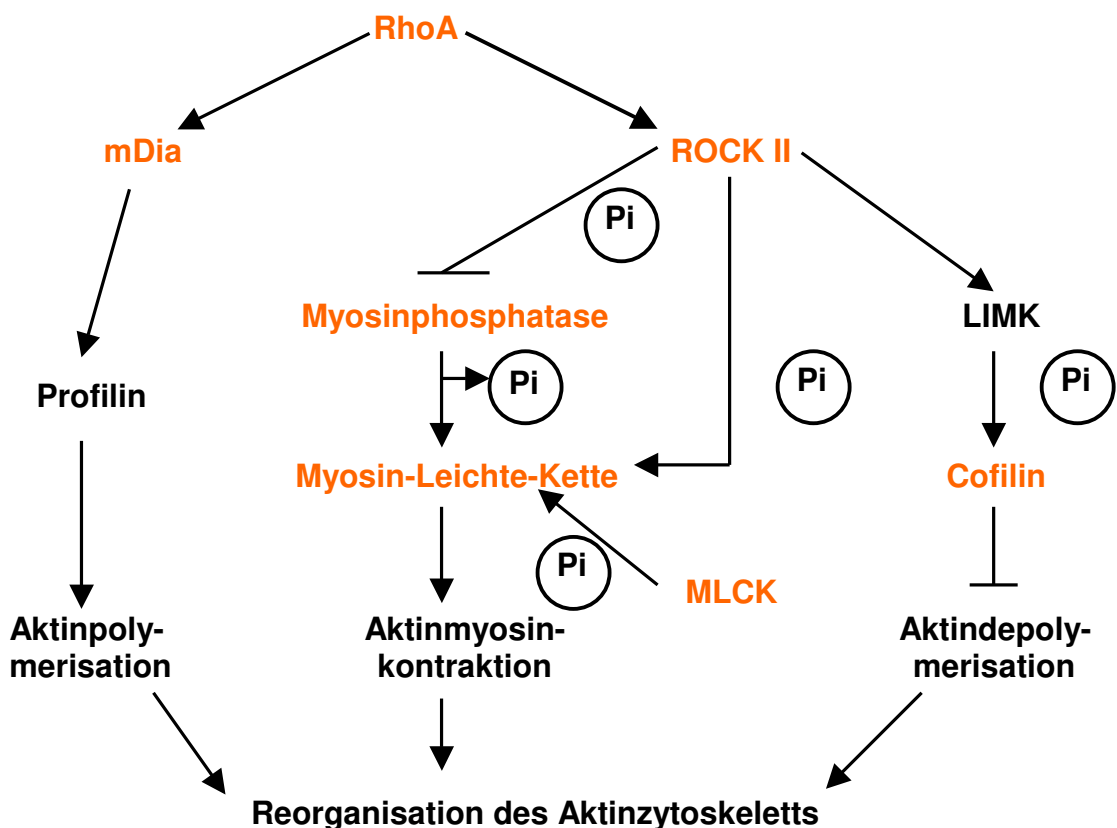


Abbildung 3: Übersicht der untersuchten Signaltransduktionskaskade zu Aktin-bindenden Proteinen über RhoA [modifiziert nach Maekawa et al. (Maekawa, Ishizaki

*et al. 1999)]. Die in orange dargestellten Enzyme wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Die Abkürzung Pi gibt die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Enzymen wieder.*

Die beschriebene Signaltransduktionskaskade wurde bereits in verschiedenen Körperzellen untersucht (Somylo and Somylo 2000).

Im Folgenden soll dieser intrazelluläre Signalweg und die beteiligten Enzyme näher erläutert werden:

Agonisten, wie das in dieser Arbeit untersuchte Cholezystokinin, führen über die Bindung an spezifische heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. spezifische CCK-Rezeptoren, zu einer Aktivierung eines G-Proteins (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein) (Williams and McChesney 1987), welches mit der im folgenden beschriebenen GTPase Rho interagiert.

#### ▪ **RhoA**

Die Rho-Genfamilie gehört zur Superfamilie der Ras-Proteine, zu welcher über 50 GTPasen gezählt werden. Diese werden unterteilt in sechs Proteinfamilien: Ras, Rho, Arf, Sar, Ran und Rab (Lamarche and Hall 1994). Die Rho-Familie wiederum besteht aus den Unterfamilien Rho (Isoformen A-E), Cdc42, Rac (Isoformen 1 und 2) und TC10.

Viele Mitglieder der Rho-Familie, welche erstmals im Jahre 1985 von Madaule und Axel beschrieben wurden (Madaule and Axel 1985), sind beteiligt an der Organisation und der Dynamik des Zytoskeletts (Ridley and Hall 1992; Hall 1994; Gutkind and Vitale-Cross 1996). Neueste Untersuchungen zeigten, dass das Enzym Rho auch an CCK-induzierten Zellveränderungen in Azinuszellen des Pankreas beteiligt ist (Bi, Le Page et al. 2005).

Im Folgenden soll insbesondere die Isoform RhoA beschrieben werden, welche auch Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war.

RhoA, RhoB und RhoC sind zu circa 85% identisch, jedoch scheinen diese drei Isoformen in unterschiedlichen zellulären Abschnitten vorzukommen.

RhoA ist eine circa 24 kDa große GTPase und besitzt wie andere Mitglieder der Ras-Superfamilie eine CAAX-Sequenz (C, Cystein; A, aliphatische Aminosäure;



X, meist Leucin) am C-terminalen Ende, welche für die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms verantwortlich ist. Zum größten Teil liegt RhoA im Zytosol vor, nur ein kleiner Teil befindet sich an der Plasmamembran (Adamson, Paterson et al. 1992). Für die Aktivierung des Enzyms ist jedoch die Assoziation mit der Membran nötig (Gong, Iizuka et al. 1996).

Der genaue Mechanismus der Aktivierung und Inaktivierung soll im Folgenden beschrieben werden:

Wie andere GTPasen besitzt RhoA sowohl eine GDP/GTP-bindende Aktivität als auch eine GTPase-Aktivität. Somit wechselt RhoA zwischen der GDP-gebundenen, inaktiven Form (GDP-RhoA) und der GTP-gebundenen, aktiven Form (GTP-RhoA) (Nobes and Hall 1994). In inaktiven Zellen bindet Rho-GDI (Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor) an GDP-RhoA, wodurch letzteres von der Membran ins Zytosol transloziert. Nach Stimulation mit Agonisten wird GDP-RhoA mit Hilfe von GEFs (Guaninnukleotid-Austauschfaktoren) zu GTP-RhoA umgewandelt. Diese aktive Form transloziert anschließend zur Plasmamembran und interagiert dort mit spezifischen Substraten. GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) konvertieren die aktive Form von RhoA wieder zur inaktiven Form GDP-RhoA.

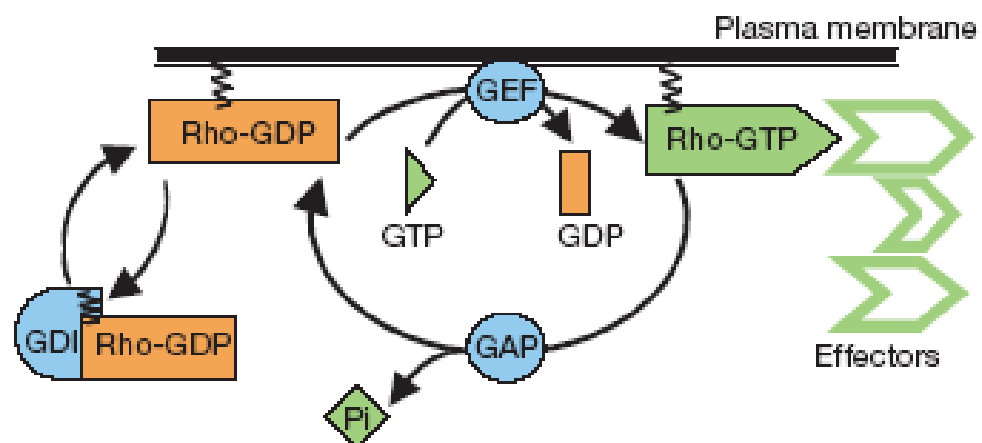


Abbildung 4: Modell des Rho-GTPase-Zyklus [modifiziert nach Etienne-Manneville et al. (Etienne-Manneville and Hall 2002)]. Die inaktive Form Rho-GDP wird durch GEFs (Guaninnukleotid-Austauschfaktoren), welche den Nukleotidaustausch vermitteln, zur aktiven Form Rho-GTP umgewandelt. GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) stimulieren die Hydrolyse von Rho-GTP, wodurch es zu einer Inaktivierung des Enzyms kommt. GDIs (GDP-Dissoziationsinhibitoren) führen zu einer Dissoziation der inaktiven GTPase Rho-GDP von der Plasmamembran.

Verschiedene nachgeschaltete Effektoren von RhoA wurden identifiziert: Protein Kinase N [PKN (PRK1)], Rhoophilin, Rhotekin, Citron, Citronkinase, Rho-Kinase, die Myosin-bindende Untereinheit der Myosinphosphatase (MYPT1) und mDia (Fukata, Amano et al. 2001). Auf die letzten drei erwähnten Enzyme soll im Folgenden näher eingegangen werden.

- **Rho-Kinase**

Die Rho-Kinase (ROK $\alpha$ /ROCK II) ist eine circa 160 bis 180 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinase. Die Bindung des C-terminalen Teils an RhoA erfolgt nur in dessen GTP-gebundener Form (Rho-GTP). Durch diese Interaktion wird die Aktivität von ROCK II gesteigert, und es transloziert vom Zytoplasma zur Plasmamembran (Leung, Manser et al. 1995; Leung, Chen et al. 1996). Die Assoziation des Enzyms mit der Membran scheint eine große Bedeutung hinsichtlich der Kinaseaktivität zu haben (Miyazaki, Komatsu et al. 2006).

ROCK II phosphoryliert die Myosin-bindende Untereinheit der Myosinphosphatase (MYPT1) an dessen C-terminalem Ende, insbesondere an den Bereichen Serin 854 und Threonin 697, und führt dadurch zu einer Hemmung der Phosphatase (Kimura, Ito et al. 1996; Kawano, Fukata et al. 1999).

Jedoch inhibiert ROCK II nicht nur MYPT1, sondern phosphoryliert die Myosin-Leichte-Kette (MLC) auch direkt (Amano, Ito et al. 1996). Diese Phosphorylation erfolgt an denselben Bereichen wie durch das unten näher beschriebene Enzym MLCK.

Somit kontrolliert ROCK II nicht nur die Phosphorylation von MLC direkt, sondern auch dessen Dephosphorylation über die Hemmung der MLCP.

- **Myosinphosphatase (MLCP)**

Das Enzym Myosinphosphatase ist unter physiologischen Bedingungen verantwortlich für die Dephosphorylation der Myosin-Leichte-Kette (MLC) von Myosin II. Das Holoenzym besteht aus drei Untereinheiten: Aus einer katalytischen Untereinheit vom Typ 1 Phosphatase  $\delta$  Isoform (PP1c $\delta$ ) von 38

kDa, einer 110 bis 130 kDa großen Myosin-bindenden Untereinheit namens MYPT1 (myosin phosphatase targeting subunit 1) und aus einer kleineren Untereinheit M20 von circa 20 kDa, deren Funktion bis zum heutigen Tage unklar ist (Alessi, MacDougall et al. 1992; Hartshorne, Ito et al. 1998).

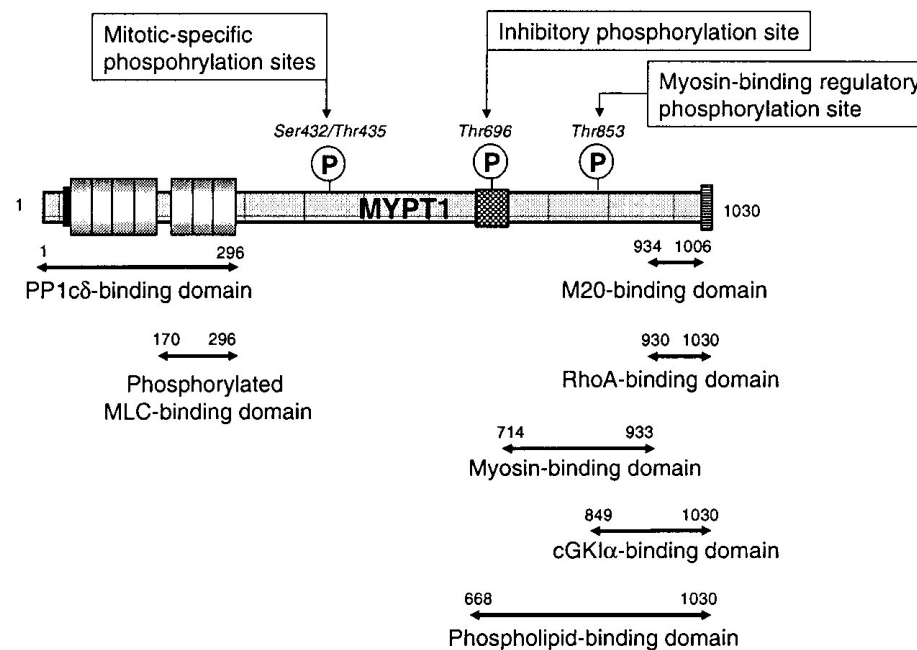


Abbildung 5: Struktur der MYPT1-Zieluntereinheit der Myosinphosphatase mit Phosphorylierungsstellen und für verschiedene Interaktionen bedeutsame Regionen [modifiziert nach Ito et al. (Ito, Nakano et al. 2004)].

Durch eine Änderung der Interaktionen der einzelnen Untereinheiten untereinander wird die Myosinphosphatase reguliert. So wird die Aktivität der MLCP durch die Phosphorylation von MYPT1 (Trinkle-Mulcahy, Ichikawa et al. 1995) an den Proteinabschnitten Thr695/697, Ser849/854 und Thr850/855 gehemmt (Feng, Ito et al. 1999; Kawano, Fukata et al. 1999).

Es wird angenommen, dass MYPT1 eine Zieluntereinheit darstellt und sowohl PP1cδ als auch das Substrat Myosin II bindet. Der N-terminale Teil von MYPT1 ist verantwortlich für die Aktivierung von PP1cδ (Johnson, Cohen et al. 1997). Die Interaktion von PP1cδ mit MYPT1 erhöht die Substratspezifität gegenüber phosphoryliertem Myosin II und führt zu einer Aktivitätssteigerung des Holoenzym. Die Bindung der Myosinphosphatase an das Substrat führt zu

einer Dephosphorylation von Myosin II (Shimizu, Ito et al. 1994) und somit zu einer Dissoziation des Myosin II von den Aktinfilamenten.

Der C-terminale Teil von MYPT1 bindet sowohl M20 als auch das Substrat Myosin II. Die Bindung von M20 an MYPT1 beeinflusst die Aktivität des Holoenzym nicht, jedoch wird diskutiert, ob M20 das Myosindimer bindet (Johnson, Cohen et al. 1997).

Bislang wurde die Untereinheit MYPT1 in vielen Geweben nachgewiesen, wie z.B. in glatten Muskelzellen, in Gehirnzellen, in der Milz, in Herzmuskelzellen, in der Niere und in der Lunge (Okubo, Ito et al. 1994) sowie durch andere Arbeitsgruppen in Fibroblasten, in humanen Thrombozyten und anderen Zelltypen. Es wurde deutlich, dass die Myosinphosphatase an der Regulation vieler Funktionen in glatten Muskelzellen beteiligt ist, so z.B. am Gefäßtonus, dem Blutdruck, der gastrointestinalen Motilität, dem Atemwegswiderstand, der erektilen Funktion und der Uteruskontraktion. In Azinuszellen des Pankreas ist das Enzym bislang nicht nachgewiesen worden.

- **Myosin-Leichte-Kette (MLC)**

Das Enzym Myosin II besteht aus zwei schweren (jeweils circa 200 kDa) und vier leichten Ketten (MLC) mit einem Molekulargewicht von jeweils 16 bis 20 kDa, die den Myosinkopf bilden. Der Myosinschwanz setzt sich aus Anteilen der beiden schweren Ketten zusammen.

Die ATPase Myosin II ist essentiell für den zur Kraftentwicklung in Muskelzellen notwendigen sogenannten Querbrückenzyklus: Myosin II-Moleküle binden mit hoher Affinität an Aktinfilamente. Dadurch wird eine Kippbewegung der gebundenen Myosinköpfe hervorgerufen und eine Bewegung der Aktinfilamente in Längsrichtung bewirkt. Nach Freisetzung von ADP dissoziiert Myosin II von den Filamenten und letztere kehren wieder in den Anfangszustand zurück. Durch Hydrolysierung von ATP durch Myosin II kann eine erneute Bindung der Myosin II-Moleküle an die Filamente erfolgen (Schmidt and Thews 1997).

Die erstmals von Perrie et al. (Perrie, Smillie et al. 1973) demonstrierte Phosphorylation einer der erwähnten leichten Ketten reguliert die Aktivität des

Gesamtzyklus. Diese leichte Kette wird deshalb auch regulatorische MLC genannt. Es gibt zwei durch das bereits beschriebene Enzym ROCK II sowie durch das unten näher charakterisierte Enzym Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) phosphorylierbare Bereiche des Myosin II: Serin-19 und Threonin-18, wobei Serin-19 die primäre Phosphorylationsstelle darstellt (Colburn, Michnoff et al. 1988). Dadurch kommt es zu einer erhöhten ATPase-Aktivität von Myosin II (Adelstein and Conti 1975), und eine Interaktion des Enzyms mit Aktinfilamenten wird eingeleitet. Durch diesen Vorgang wird z.B. eine Kontraktion im Skelettmuskel oder in glatten Muskelzellen bewirkt (Itoh, Ikebe et al. 1989).

Außerdem kann Myosin II auch durch andere Kinasen phosphoryliert werden (Tan, Ravid et al. 1992), welche in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher untersucht wurden, wie z.B. durch die Protein Kinase C.

Die Dephosphorylation des Enzyms wird durch die oben bereits näher beschriebene Myosinphosphatase bewirkt (Shimizu, Ito et al. 1994).

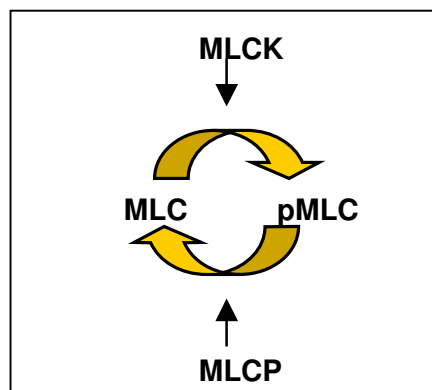


Abbildung 6: Darstellung der Regulation von MLC. Die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) phosphoryliert MLC zu pMLC. Die Dephosphorylation von pMLC zu MLC erfolgt durch die MYPT1-Untereinheit der Myosinphosphatase (MLCP).

Somit wird die Aktivität der MLC hauptsächlich durch ein Gleichgewicht von MLCK und ROCK II einerseits und der MLCP andererseits reguliert.

#### ▪ **Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK)**

Wie zuvor bereits erwähnt ist das  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Enzym MLCK für die Phosphorylation der Myosin-Leichten-Kette (MLC) des Myosin II verantwortlich und trägt somit zur Kraftentwicklung in Muskelzellen und zu

Kontraktionsprozessen in anderen Körperzellen, wie zum Vorgang der Sekretion bei.

MLCK ist ein 130 bis 150 kDa schweres Enzym, das aus einem katalytischen Kern besteht, welcher ATP und MLC bindet und damit essentiell für die Übertragung der Phosphatgruppe von ATP auf MLC ist. Das regulatorische Segment am C-terminalen Ende der MLCK ist in den Vorgang der Autoinhibition involviert und stellt die Bindungsstelle für den N-terminalen Teil von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin dar, welches eine Aktivierung des katalytischen Kerns bewirkt. Durch diese Aktivierung kann die MLCK die bereits erwähnte Phosphorylation von MLC einleiten (Stull, Lin et al. 1998).

In glatten Muskelzellen ist das Enzym mit Aktinfilamenten und Myosinstrukturen kolokalisiert (Guerrero, Rowley et al. 1981). Es zeigt sich eine Aktin-bindende Sequenz im N-terminalen Teil des Proteins. Neuere Untersuchungen haben die Bedeutung von drei Wiederholungsmotiven (DFRXXL) in der Struktur des Proteins ergeben, welche möglicherweise jeweils an ein Aktinmonomer binden (Smith, Su et al. 1999).

Die Regulierung der MLCK erfolgt durch dessen Phosphorylation mittels verschiedener Kinasen. Diese Phosphorylation findet an unterschiedlichen Bereichen des Enzyms statt (Stull, Hsu et al. 1990) und führt zu einer reduzierten Affinität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und somit auch zu einer verminderten Phosphorylationsaktivität der MLCK gegenüber der MLC (Tansey, Luby-Phelps et al. 1994).

Die MLCK wurde bereits in exokrinen Azinuszellen des Pankreas nachgewiesen (Burnham, Soling et al. 1988; Bissonnette, Kuhn et al. 1989) und spielt eine bedeutende Rolle bei der Sekretion von Verdauungsenzymen (Mizuno, Naruse et al. 2000; Torgerson and McNiven 2000).

Zur Vervollständigung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von MLCK in Azinuszellen nochmals untersucht.

Im Folgenden sollen mit mDia und Cofilin kurz zwei Enzyme vorgestellt werden, welche ebenfalls von RhoA aktiviert werden und über einen alternativen Signalweg zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts führen. Außerdem soll der in dieser Arbeit verwendete ROCK-Inhibitor Y-27632 charakterisiert werden.

#### ▪ **mDia**

Das Enzym mDia ist ein in Säugetieren vorkommendes Homolog von *Drosophila diaphanous*, ist circa 140 kDa groß und gehört zu der Proteingruppe der Formin-Homologe (FH). Es besitzt eine N-terminale Bindestelle für Rho und eine FH1- und FH2-Region am C-terminalen Ende (Castrillon and Wasserman 1994). Zwischen dem N- und dem C-terminalen Ende besteht eine intramolekulare Interaktion, welche durch die Bindung von Rho aufgelöst und das Enzym aktiviert wird (siehe Abbildung 7) (Watanabe, Kato et al. 1999). Die prolinreiche FH1-Region bindet an das Aktinmonomer-bindende Protein Profilin, auf welches in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wurde (Carlier and Pantaloni 1997). Durch diese Bindung wird eine Aktinpolymerisation hervorgerufen.

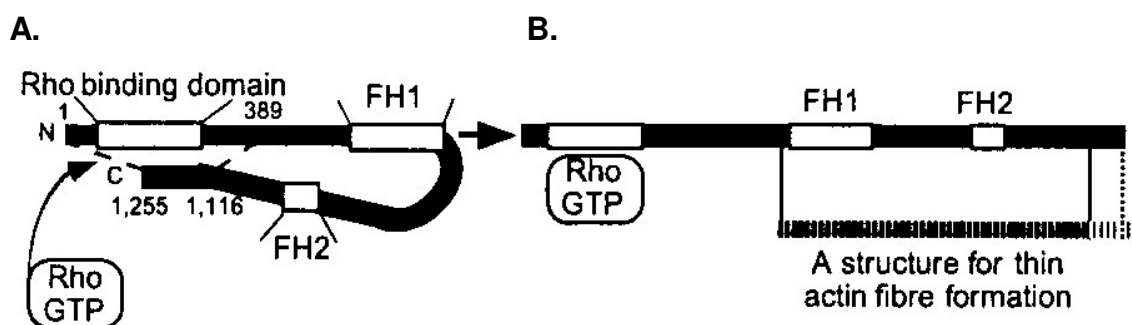


Abbildung 7: Modell der Aktivierung von mDia durch die GTPase Rho [reproduziert nach Watanabe et al. (Watanabe, Kato et al. 1999)]. Rho bindet an die Rho-Bindungsdomäne am N-terminalen Teil von mDia. Dadurch wird die intramolekulare Bindung des N-terminalen an das C-terminale Ende des inaktiven mDia aufgelöst, wodurch die FH1- und FH2-Regionen die Formation des Aktinzytoskeletts bewirken.

Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die FH2-Region auch direkt mit den Mikrotubuli interagieren kann (Pruyne, Evangelista et al. 2002). Die Aktinfilamente werden parallel in Längsrichtung der Zelle ausgerichtet.

Außerdem werden die Mikrotubuli parallel zu den Filamenten orientiert (Ishizaki, Morishima et al. 2001).

Somit spielt mDia bei der durch RhoA vermittelten Formation von Aktinfilamenten eine bedeutende Rolle und könnte durch die Beeinflussung der Sekretion von Verdauungsenzymen zu einer akuten Pankreatitis beitragen.

### ▪ **Cofilin**

Zu den Aktin-depolymerisierenden Enzymen werden drei phylogenetisch unterschiedliche Enzyme gezählt: die ADF (Aktin-depolymerisierender Faktor)/Cofiline, die Twinfiline und Drebrin. Das zur Klasse der ADF/Cofiline gehörende Cofilin (cofilamentous protein) ist ein 15 bis 20 kDa großes, aus einem  $\beta$ -Teil und zwei diesen umgebenden  $\alpha$ -Helices bestehendes Protein (Lappalainen, Kessels et al. 1998). Cofilin bindet sowohl an Aktinmonomere als auch an Aktinfilamente durch Überbrückung von zwei Aktinuntereinheiten (McGough, Pope et al. 1997)

Das Enzym stellt das sogenannte „capping“ Protein dar, welches die Depolymerisation am „pointed end“ beschleunigt und somit als limitierender Faktor der oben erwähnten „Tretmühlenreaktion“ bezeichnet wird. Durch diesen Prozess wird ein schnelleres Wachstum der Aktinfilamente am „barbed end“ erreicht (siehe Abbildung 8) und es erfolgt ein erhöhter Umsatz von Aktin (Pantaloni, Le Clainche et al. 2001).

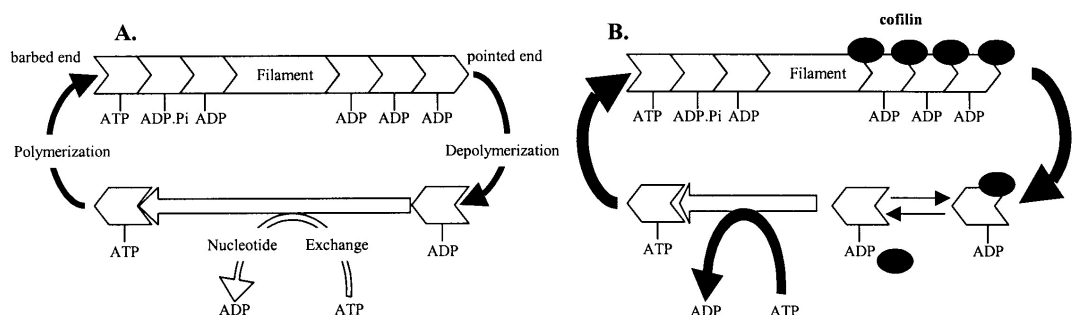


Abbildung 8: „Tretmühlenreaktion“ der Aktinfilamente [modifiziert nach Pantaloni et al. (Pantaloni, Le Clainche et al. 2001)].

A: Die Depolymerisation als limitierender Faktor des Aktin-ATPase-Zyklus kontrolliert das Wachstum am „barbed end“.

B: Die Bindung von Cofilin bewirkt eine schnellere Depolymerisation am „pointed end“ und somit eine schnellere Polymerisation am „pointed end“.



Die Aktivität des Enzyms hängt von seiner Phosphorylation ab. Enzyme, wie das bereits erwähnte RhoA, aktivieren die LIM-Kinase (LIMK), welche in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht wurde. Diese phosphoryliert den Serin-Rest an Position 3 der N-terminalen Region von Cofilin, was zu einer Inaktivierung des Enzyms und so zu einer Hemmung der Depolymerisation von Aktinfilamenten führt (Agnew, Minamide et al. 1995; Yang, Higuchi et al. 1998). Neueste Untersuchungen zeigten, dass Cofilin durch den unten näher beschriebenen ROCK-Inhibitor Y-27632 dephosphoryliert und somit aktiviert wird (Koga, Koga et al. 2006).

Durch die oben bereits beschriebene Aufgabe des Aktinzytoskeletts spielt auch das Enzym Cofilin beim Vorgang der Sekretion eine wichtige Rolle.

#### ▪ **Y-27632**

Y-27632 [(R)-(+)-*trans*-N-(4-Pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxanide dihydrochlorid (Herstellerangaben)], ist ein synthetischer, lichtempfindlicher, hochpotenter, selektiver ROCK-Inhibitor, der ROCK-I und ROCK-II in gleichem Maße hemmt (Uehata, Ishizaki et al. 1997).

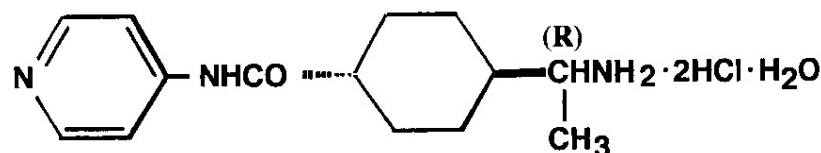


Abbildung 9: Struktur des ROCK-Inhibitors Y-27632

Diese Hemmung wird erreicht durch eine kompetitive Bindung an die ATP-Bindestelle des Enzyms ROCK II, sowie vermutlich durch eine zusätzliche Interaktion mit an das Protein bindenden spezifischen Substraten. Der Inhibitor wird durch eine Transporter-vermittelte erleichterte Diffusion in die Zellen aufgenommen (Ishizaki, Uehata et al. 2000).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die hemmenden Effekte von Y-27632 von der Höhe der vorhergehenden Zellstimulation durch Agonisten abhängen. Außerdem wurde beobachtet, dass die Wirkung des Inhibitors in

kultivierten Zellen nach einer bestimmten Zeit nachlässt, und er inaktiviert wird (Narumiya, Ishizaki et al. 2000).

Durch die Bindung an ROCK II bewirkt Y-27632 eine spezifische Hemmung von zellulären Prozessen, wie z.B. der Bindung von Aktinfilamenten, und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit verwendet, um den intrazellulären Signalweg zu Aktin-bindenden Proteinen näher untersuchen zu können.

Die Auswirkung des Inhibitors auf das Enzym ROCK II wurde bereits in isolierten Azinuszellen des Pankreas untersucht (Kusama, Nozu et al. 2003). Inwiefern Y-27632 dadurch die Expression von MYPT (pMYPT) und MLC (pMLC) beeinflusst, soll in dieser Arbeit dargestellt werden.

### 1.5 Fragestellung

1. Werden die Enzyme RhoA, ROCK II, MYPT1, MLC, MLCK, mDia und Cofilin in exokrinen Azinuszellen des Pankreas exprimiert?
2. Sind diese Proteine im Pankreas durch die Stimulierung mit CCK regulierbar?
3. Besteht eine Assoziation zwischen den oben genannten Enzymen (sind die Proteine an der Signaltransduktionskette beteiligt)?
4. In welcher intrazellulären Region liegen die Proteine MYPT1 und MLC, sowie deren phosphorylierte Formen pMYPT1 bzw. pMLC vor (Zytoskelett- oder Zytosolfraktion)?
5. Ist der untersuchte Signaltransduktionsweg durch den spezifischen ROCK-Inhibitor Y-27632 hemmbar?

## 2. Methodik

Die für die vorliegende Dissertation notwendige Versuchssystematik, die einzelnen Versuchsschritte und –durchführungen werden im Folgenden erläutert.

### 2.1 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere wurden von Charles River Laboratories in Sulzfeld, Deutschland geliefert. Es wurden pathogenfreie männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von circa 150 g verwendet. Die Tiere wurden mit der Rattendiät „ssniff“ der Spezialdiäten GmbH aus Soest, Deutschland gefüttert und vor den Versuchen keiner weiteren speziellen Behandlung unterzogen. Die Experimente an den Tieren wurden jeweils zwischen 8.00 Uhr und 10.00 Uhr begonnen, um eine etwaige, vom circadianen Rhythmus abhängige, Änderung des Sekretionsverhaltens zu vermeiden.

Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde, Regierung von Oberbayern, genehmigt.

### 2.2 Verwendete Chemikalien, technische Geräte und Materialien

#### 2.2.1 Chemikalien

Firma	Präparat	Vollname, Artikelnummer	Zweck
Sigma Seelze, Dtl.	Caerulein	pGlu-Gln-Asp-Tyr[SO <sub>3</sub> H]-Thr-Gly- Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	Stimulation
	D-Glucose L-Glutamine NaCl MgCl <sub>2</sub> KCl		HEPES-Puffer

	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaOH HEPES  CaCl <sub>2</sub>	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]	
	Tris-HCl	Tris[hydroxymethyl]aminomethane pH 7,4	Homo-, SDS-Puffer
	EDTA EGTA  DTT NaF β-Glycerophosphat Benzamidine Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> NP-40	Ethylenediaminetetraacetic acid Ethylene glycol-bis[2 aminoethyl-ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid DL-Dithiothreitol  Hydrochloride: Hydrate Sodium Orthovanadate	Homo-Puffer
	Bromphenolblau  Glycerol 2-Mercaptoethanol	3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfonephthalein	SDS-Puffer
	TRIS Base	Tris[hydroxymethyl]aminomethane	Gele, WB-Puffer
	Ammonium Per-sulfate Glycin		WB-Puffer
	TWEEN	Polyoxyethylene Sorbitan Mono-laurate	Blocking-Lösung
	Kodak BioMax MS	Film MS-1	Chemilumineszenz
Research Plus Manasquan, NJ, USA	CCK	Cholecystokinin 26-33, sulfated ("CCK 8"), product: 01-0340-02 [Asp-Tyr(SO <sub>3</sub> H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> ]	Stimulation

BIO RAD München, Dtl.	Triton	Triton X-100	Homo-Puffer
	Dye Reagent Concentrate	enthält Phosphorsäure und Methanol	Protein-Assay
	SDS	Sodium dodecyl sulfate	SDS-Puffer, Gele, WB-Puffer
	30% Acrylamide/Bis Solution TEMED	N,N'-Methylenbisacrylamid Electrophoresis Purity Reagent N,N,N',N'-Tetra-methylethylenediamine	Gele
	Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk		Blocking-Lösung
Prestained SDS-Page Standard Broad Range	Catalog 161-0318 Control 95620	WB-Gele	
GIBCO Karlsruhe, Dtl.	100 x nicht-essentielle Aminosäuren		HEPES-Puffer
FLUKA Biochemika Seelze, Dtl.	BSA	Albumin from bovine serum	HEPES-Puffer
	Top-Block		Blocking-Lösung
PIERCE Bonn, Dtl.	Protein-A-Beads Protein-G-Beads		Immunopräzipitation
MERCK Darmstadt, Dtl.	Methanol		WB-Puffer
Calbiochem Darmstadt, Dtl.	ECL 1 und 2	Detection Reagent 1 und 2	Chemilumineszenz
	ROCK-Inhibitor	Y-27632 #688000	Stimulation
	Protease-Inhibitor-Cocktail	Cat # 529131 10VL, Lot # B69408	Homo-Puffer

AMERSHAM BIOSCIENCE Freiburg, Dtl.	Anti-rabbit Ig Anti-mouse Ig		sekundäre AK
Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA	Anti-goat Ig RhoA (119) RhoA (26C4) MLC (FL-172) MLC (A-20) pMLC (Thr18/Ser19) Stat 1 Positivkontrolle A-10	sc-179 sc-418 sc-15370 sc-9449 sc-12896 E-23,#K161 sc-3806	sekundärer AK primäre AK Blot-Kontrolle
BD Biosciences Heidelberg, Dtl.	MYPT1 ROCK II/ROK $\alpha$ p140mDia	612165 610624 610849	primäre AK
upstate cell signaling solu- tions Dundee, UK	pMYPT (Thr 696)	#07-251 Lot #23745	primärer AK
Cytoskeleton Offenbach, Dtl.	Cofilin	#ACFL02	primärer AK
Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Dtl.	p-Cofilin (ser3)	#3311	primärer AK

*Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Reagenzien*

### 2.2.2 Technische Geräte und Materialien

Firma	Technische Geräte
Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK	Hyperfilm™ ECL™ Power Supply Ultrospec 3100 pro
Bandelin Electronic, Berlin, Dtl.	Sonoplus Bandelin HD 2070
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.	Kanülen, 27G
BioRad, München, Dtl.	Blot Kammer
Dräger, Lübeck, Dtl.	Isofluran Vaporator
Eppendorf, Hamburg, Dtl.	MiniSpin Zentrifuge Pipetten Zentrifuge 541712
Fröbel Labortechnik, Lindau, Dtl.	Kreisrüttler Rocky 3D Überkoprotator
GFL, Burgwedel, Dtl.	Wasserbad GFL 1083
IKA Werke, Staufen, Dtl.	Magnetrührer RTCbasic
NeoLab, Heidelberg, Dtl.	Vortex Mixer 2020
Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.	Einmal-Küvetten, UV
Satorius, Göttingen, Dtl.	Analysenwaage
Schleicher & Schüll, Dassel, Dtl.	Gel-Blotting Papier Nitrocellulosemembran „Protran“
WTW, Weilheim, Dtl.	pH Meter InoLab pH Level 1

*Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten technischen Geräte und Materialien*

## 2.3 Versuchsdurchführung

### 2.3.1 Präparation von Pankreasläppchen

Die hier angewendete Methode zur Gewinnung von Pankreasläppchen wurde erstmals 1975 von Scheele und Palade (Scheele and Palade 1975) beschrieben und später von Louie et al. (Louie, Williams et al. 1985) optimiert. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Nach der Dekapitation der Versuchstiere wurden diese gründlich ausgeblutet. Zur Gewinnung des Pankreas wurde die Bauchhöhle großflächig eröffnet und das Organ unter besonderer Beachtung des Magens und des Duodenums präpariert, um eine Denaturierung der später zu untersuchenden Proteine des Pankreas durch Proteinase zu vermeiden. Anschließend wurde die Milz vom Präparat gelöst und das Pankreas in eine Petrischale mit gekühlter, 0,9 %iger NaCl-Lösung gelegt. Zuletzt wurden Fettgewebe, Blutgefäße und Lymphknoten entfernt.

### 2.3.2 CCK-Stimulation der Pankreasläppchen *in-vitro*

Basismedium für die Stimulation der Pankreasläppchen war ein modifizierter HEPES-Puffer mit folgender Zusammensetzung (alle Angaben in mM): 11,1 mmol/L Glucose, 2 mmol/L Glutamine, 127 mmol/L NaCl, 0,57 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 4,7 mmol/L KCl, 0,55 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mmol/L NaOH, 10 mmol/L HEPES, 1,28 mmol/L CaCl<sub>2</sub> und 20 ml/L einer 100 x nicht-essentiellen Aminosäurenlösung.

Der Puffer wurde mit 100 % Sauerstoff über 15 Minuten begast, der pH-Wert auf 7,46 eingestellt und zuletzt 200 mg BSA hinzugegeben. Anschließend wurden die Lämpchen in einem Wasserbad mit der Temperatur von 37°C unter leichtem Rütteln mit Cholezystokinin stimuliert. Die dosisabhängige Stimulation erfolgte über 15 Minuten mit einer Cholezystokinin-Konzentration von 10 pM, 30 pM, 100 pM, 300 pM, 1 nM, 10 nM bzw. 100 nM. Bei der zeitabhängigen Stimulation wurden den Proben jeweils 100 nM Cholezystokinin über einen Zeitraum von 1, 3, 5, 10, 15 bzw. 30 Minuten hinzugefügt. Sowohl bei der dosis-



als auch bei der zeitabhängigen Stimulation wurde jeweils eine unstimulierte Probe als Kontrolle über 15 Minuten unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach erfolgter Stimulation wurden alle Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in jeweils 300 µl Homo-Puffer homogenisiert. Der Puffer setzte sich wie folgt zusammen (alle Angaben in mM): 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7,4), 100 mmol/L KCl, 0,2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaF, 50 mmol/L β-Glycerophosphat, 1 mmol/L Benzamidine, 0,5 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 ml/L Protease-Inhibitor-Cocktail (Bragado, Tashiro et al. 2000).

Nach der Homogenisation wurden die Proben dreimal für 15 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand jeweils abpipettiert und das Pellet verworfen. Anschließend folgte die Messung der Proteine, auf deren Durchführung unter Punkt 2.4 noch eingegangen wird. 4 mg/ml Proteinlysate wurde mit Homo-Puffer auf ein Volumen von 325 µl aufgefüllt und 125 µl 4 x SDS-Puffer hinzugefügt. Der SDS-Puffer hatte folgende Zusammensetzung (alle Angaben in mM): 253,81 mmol/L Tris-HCl, 20 Spatelspitzen/L Bromphenolblau, 400 mmol/L Glycerol und 600 ml/L destilliertes Wasser wurden auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt, anschließend 277,41 mmol/L SDS beigefügt und vor der Verwendung 100 ml/L Mercaptoethanol hinzugegeben. Nach einem fünfminütigen Aufkochen bei 97°C folgte die Western-Blot-Analyse.

### 2.3.3 CCK-Stimulation des Pankreas *in-vivo*

Den Versuchstieren wurde entsprechend einer dosisabhängigen *in-vivo*-Stimulation 20 µg bzw. 50 µg Caerulein pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert und die Tiere nach 30 Minuten dekapitiert, ausgeblutet und das jeweilige Organ entnommen. Bei der zeitabhängigen *in-vivo*-Stimulation wurde den Versuchstieren jeweils 50 µg Caerulein gespritzt und das Organ, nach vorherigem Dekapitieren und Ausbluten, nach 5, 15 bzw. 30 Minuten gewonnen.

Nach der Präparation des Pankreas wurde dieses in vier große Fragmente zerteilt und schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Pankreaslappen wurden anschließend in 2 ml Homo-Puffer, dessen Zusammensetzung bereits unter Punkt 2.3.2 erläutert wurde, homogenisiert und mehrmals zentrifugiert, wobei jeweils nur das Pellet weiterverwendet wurde. Die darauffolgende Proteinmessung und Herstellung von Proben für eine Western-Blot-Analyse erfolgte entsprechend der oben beschriebenen *in-vitro*-Versuche.

#### 2.3.4 Gewinnung der Zytosol- und Zytoskelettfraktion

Nach erfolgter Pankreaspräparation und –stimulation wurden die Pankreasfragmente in 300 µl des bereits beschriebenen Homo-Puffers, der jedoch zusätzlich mit 0,1 % Triton X-100 versetzt wurde, homogenisiert und anschließend für 10 Minuten bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, welcher die löslichen Proteine und somit die Zytosolfraktion darstellte, wurde abpipettiert. Das Pellet, welches den unlöslichen Proteinen und somit der Zytoskelettfraktion entsprach, wurde mit 100 µl Homo-Puffer inklusive 2 % NP-40 gelöst, und die Proben wurden in einem Sonicator bearbeitet. Die anschließende Proteinmessung erfolgte jeweils in beiden Fraktionen.

#### 2.3.5 Herstellung von Y-27632-Inhibitorproben

Die präparierten Pankreasläppchen wurden in jeweils 3 ml des unter Punkt 2.3.2 beschriebenen HEPES-Puffers und 6 µl Inhibitor (entspricht 20 µM) über 30 Minuten im Wasserbad unter leichtem Rütteln und Lichtabschirmung inkubiert und anschließend mit Cholezystokinin entsprechend den *in-vitro*-Versuchen dosisabhängig stimuliert. Als Kontrolle diente eine Probe, die zunächst 30 Minuten ohne Inhibitor in das Wasserbad gestellt und darauffolgend mit 100 nM Cholezystokinin über ebenfalls 30 Minuten stimuliert wurde. Anschließend wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff

schockgefroren. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem der alleinigen Stimulation mit Cholezystokinin.

### 2.3.6 Immunopräzipitation

Das Pankreas wurde wie gehabt präpariert und die Läppchen anschließend unstimuliert bzw. mit 10 nM Cholezystokinin für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Lysieren in Homo-Puffer folgte die Zentrifugation, nach welcher der Überstand abgesaugt und 500 µl frischer Homo-Puffer hinzugefügt wurde. Daraufhin wurde die später beschriebene Proteinbestimmung durchgeführt. Zu 1 mg/ml Proteinlysat wurden eine 1:50 Verdünnung des entsprechend zu untersuchenden Antikörpers pipettiert und auf 500 µl mit Homo-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben über Nacht im Kühlraum bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden jeweils 30 µl Protein-Beads hinzupipettiert und die Proben im Kühlraum für weitere zwei Stunden rotiert. Die Protein-Beads wurden wie folgt verwendet: Bei anti-goat und anti-mouse Antikörpern wurden Protein-G-Beads und bei anti-rabbit Antikörpern Protein-A-Beads benutzt. Nach der erneuten Inkubation wurden die Proben bei 4°C und 12000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und wiederum 500 µl Homo-Puffer hinzugefügt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde zu dem gewaschenen Überstand 20 µl 4 x SDS-Puffer gegeben, dessen Zusammensetzung unter Punkt 2.3.2 beschrieben wurde. Nachdem die Proben für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht wurden, erfolgte die Proteinanalyse per Western-Blot.

### 2.4 Protein-Bestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde zunächst eine Kalibriergerade mithilfe einer Verdünnungsreihe aus BSA-Protein-Lösung hergestellt. Die verwendete Dye-Lösung wurde 1:5 verdünnt und für die Messungen jeweils 1 ml verwendet. Aus der BSA-Verdünnungsreihe wurden jeweils 20 µl zu der Dye-Lösung gegeben

und nach 5 Minuten UV-spektrometrisch nach der Bradford-Methode vermessen. Anschließend wurden die zu bestimmenden Pankreasproben 1:10 verdünnt und je nach Bedarf 10 µl bzw. 20 µl verwendet. Die Messung wurde wie bei der zuvor angefertigten Kalibriergeraden durchgeführt.

## 2.5 Analyse der Proteine mittels Western-Blot

Diese Methode wurde entwickelt, um die Molmasse eines Proteins über die Bindung spezifischer Antikörper zu ermitteln oder um die Spezifität von Antikörpern gegenüber einem Antigen bzw. einem Protein zu überprüfen, und wurde erstmals beschrieben von Towbin und Staehelin (Towbin, Staehelin et al. 1979) und Burnette (Burnette 1981). Bei diesem Gel-Blot wurden Proteine elektrophoretisch getrennt und anschließend aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Unter Berücksichtigung des Molekulargewichts der zu untersuchenden Proteine wurde ein dementsprechendes Trenngel mit einem jeweils unterschiedlichen Gehalt an Acrylamid angefertigt: für MYPT1, pMYPT1 und ROCK II ein 7,5 %iges, für mDia ein 8 %iges und für RhoA, MLC, pMLC, Cofilin und pCofilin ein 12 %iges Gel. Das jeweilige Trenngel wurde wie folgt hergestellt:

Acrylamid		7,5 %	8,0 %	10,0 %	12,0 %
Trenngelpuffer		4,0 ml	4,0 ml	4,0 ml	4,0 ml
Destilliertes Wasser		8,0 ml	7,7 ml	6,7 ml	5,6 ml
30% Acrylamid/Bis-Lösung		4,0 ml	4,3 ml	5,3 ml	6,4 ml
10% Ammonium Persulfate		50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED		25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

*Tabelle 3: Übersicht über die Herstellung der jeweiligen Trenngele*

Bei einem pH-Wert von 8,8 setzte sich der in der obigen Tabelle erwähnte Trenngelpuffer zusammen aus (alle Angaben in mM): 1492,54 mmol/L TRIS Base, 13,87 mmol/L SDS. Je nach Acrylamid-Gehalt wies das Gel eine

Porengröße von 0,5-0,2 nm Durchmesser auf. Um einen effizienten Transfer zu gewährleisten, wurden Gele von 1 mm Dicke verwendet und außerdem als Schutz vor Austrocknung eine Schicht Methanol über die Oberfläche gegeben. Nachdem das Trenngel getrocknet war, wurde das Methanol wieder abgegossen. Anschließend wurde ein Sammelgel über das Trenngel pipettiert. Das Sammelgel bestand aus:

Sammelgelpuffer		2,5 ml
Destilliertes Wasser		5,9 ml
30% Acrylamid/Bis-Lösung		1,6 ml
10% Ammonium Persulfate		60 µl
TEMED		20 µl

*Tabelle 4: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Sammelgele*

Der Sammelgelpuffer wurde bei einem pH-Wert von 6,8 hergestellt aus (alle Angaben in mM): 500,00 mmol/L TRIS Base, 13,87 mmol/L SDS. Um die Kammern für die Proteinproben zu erhalten, wurden 1 mm dicke Kämme in das jeweilige Sammelgel vor dessen Trocknung gesteckt. Für die Methode der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben als Vorbereitung für 5 Minuten aufgekocht, um die Polypeptide im SDS-Probenpuffer zu hitzedenaturieren (Frey 2002) und anschließend in die jeweiligen Kammern des Sammelgels gegeben. Mithilfe der jeweils in die erste Kammer aufgetragenen genormten Markerproteine ließen sich später die Molekulargewichte der Proteine ermitteln. Hierzu wurden Prestained SDS-PAGE Standards verwendet. Die Laufkammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt, der sich wie folgt zusammensetzte (alle Angaben in mM): 25,02 mmol/L TRIS Base, 192,30 mmol/L Glycin, 3,47 mmol/L SDS.

Zur Fokussierung wurde zu Beginn eine Spannung von 100 Volt über 15 Minuten angelegt, danach folgten 150 Volt über 60-90 Minuten. Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran, wobei die Proteine durch Anlegen eines Stroms von 300 mA aus dem Gel auf die Membran überführt wurden. Der elektrophoretische Transfer wurde nach dem Wet-Blot-

Verfahren (Towbin, Staehelin et al. 1979) durchgeführt, wodurch das geblottete Protein sehr schonend übertragen und aufgrund des großen Transferpuffervolumens nur geringfügig erwärmt wurde. Der Transferpuffer wurde wie folgt hergestellt (alle Angaben in mM): 24,75 mmol/L TRIS Base, 192,31 mmol/L Glycin, 10,40 mmol/L SDS und zusätzlich 20% Methanol, um das Benetzen der Membran zu erleichtern und die Bindung der Proteine an SDS zu lockern, wodurch eine höhere Transferrate gewährleistet wurde (Jacobson and Karsnäs 1990).

Als zusätzliche Kühlung wurde ein Eisblock verwendet und der Transferpuffer durch einen Rührfisch in Bewegung gehalten. Nach diesem Vorgang wurde die Membran für 60 Minuten in eine Blocking-Lösung auf einen Rundschüttler gegeben, um überschüssige Proteinbindstellen der Membran zu sättigen und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern (Frey 2002). Die verwendete Lösung bestand bei einem pH-Wert von 7,6 aus folgendem (alle Angaben in mM): 19,90 mmol/L TRIS Base, 136,89 mmol/L NaCl und 1,5 ml/L TWEEN 20, sowie 50 g/L Topblock bzw. 50 g/L entfettete Trockenmilch, je nach primärem Antikörper.

Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran mit der primären Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Der entsprechende Antikörper wurde mit der oben erwähnten Blocking-Lösung verdünnt, jedoch mit nur 20 g/L Topblock bei RhoA, ROCKII, MLC, pMLC und mDia bzw. Trockenmilch bei MYPT1, pMYPT1, Cofilin und pCofilin. Die Verdünnungen sind im Ergebnisteil (3.) bei den jeweiligen Versuchen mit angegeben.

Am nächsten Tag wurde die jeweilige Membran zunächst für zweimal 5 Minuten und zweimal 10 Minuten mit der Blocking-Lösung gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper für 60 Minuten auf einen Rundschüttler gegeben. Um die an das geblottete Protein gebundenen Reagenzien sichtbar zu machen, trug der sekundäre Antikörper eine Enzym-Markierung zur indirekten Visualisierung (Ramlau 1987; Kricka 1993). Die Verdünnungen wurden ebenfalls mit der beim ersten Antikörper verwendeten Blocking-Lösung hergestellt und sind bei den jeweiligen Versuchen beschrieben. Anschließend wurde die Membran in der oben bereits erwähnten Weise wiederum

gewaschen. Danach erfolgte unter Schwenken eine jeweils einminütige Inkubation mit den zu gleichen Teilen verwendeten, mit Meerrettichperoxidase markierten Lösungen ECL 1 und 2, durch die das Enzym ein Licht emittierendes Produkt lieferte (Chemilumineszenz). Dadurch wurde die Position der Nachweisreagenzien auf der Membran sichtbar gemacht. Dokumentiert wurden die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms (Dechert 2002). Die entsprechende Belichtungsdauer des auf die Membran aufgelegten Filmes differierte je nach Antikörper und ist bei den jeweiligen Versuchen mit angegeben. Durch das Scannen der jeweiligen Röntgenfilme boten die Signalintensitäten der Proteine verschiedene Graustufen, welche zueinander ins Verhältnis gesetzt und digitalisiert wurden. Daraus konnte eine graphische Darstellung erfolgen, und eine Quantifizierung der Ergebnisse war möglich.

### 3. Ergebnisse

Zum Ausschluss von Pipettierfehlern, systematischen Fehlern und zum Beweis der Reproduzierbarkeit wurden alle Experimente mindestens dreimal durchgeführt. Es wurden jeweils vergleichbare Ergebnisse erzielt, wovon jeweils eines beispielhaft abgebildet ist. Von diesen Ergebnissen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die relevanten Ausschnitte der Western-Blots dargestellt. Um einen Größenvergleich der untersuchten Proteine in Bezug auf den verwendeten Marker nachvollziehen zu können wurden unter Punkt 3.4 exemplarisch die kompletten Abbildungen wiedergegeben.

#### 3.1 Expression von RhoA, ROCK II, MYPT1, MLC, MLCK, mDia und Cofilin in Pankreasazinuszellen

Die Expression der einzelnen Enzyme in Azinuszellen des Pankreas wurde sowohl in *in-vivo*-Pankreasproben als auch in *in-vitro*-Pankreasläppchen der Ratte untersucht. Nach der Präparation des Organs wurden die Proben mittels Western-Blot untersucht.

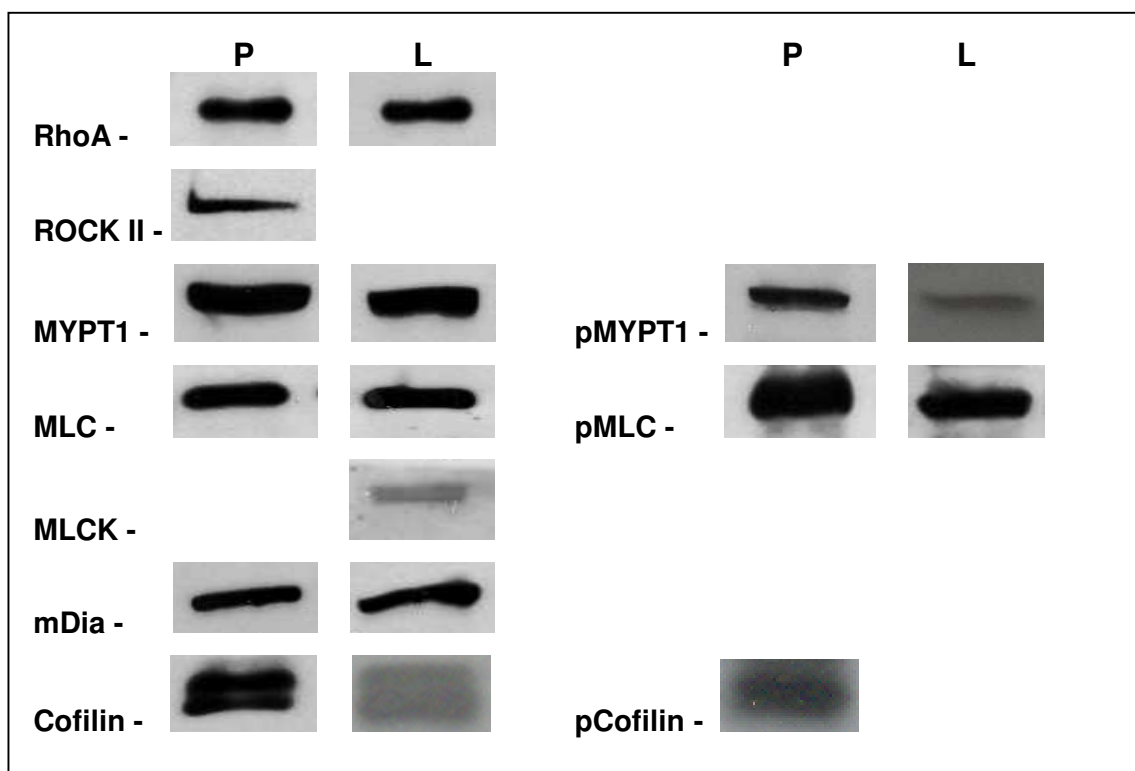




Abbildung 10: Expression von RhoA, ROCK II, MYPT1, pMYPT1, MLC, pMLC, MLCK, mDia, Cofilin und pCofilin im Pankreas. Es wurden *in-vivo*-Versuche mit dem Pankreas (P) und *in-vitro*-Versuche mit Pankreasläppchen (L) der Ratte durchgeführt. Von ROCK II und MLCK liegen nur Ergebnisse aus *in-vivo*-Versuchen vor.

Um die verschiedenen Untersuchungsergebnisse der jeweiligen Proteine vergleichen zu können, wurde auf jede Probenflasche jeweils die gleiche Menge Protein der *in-vitro*- bzw. der *in-vivo*-Probe aufgetragen und anschließend anhand der unter Punkt 2.5 beschriebenen Versuchsdurchführung weiterverarbeitet. Die jeweilig verwendeten Proteinmengen sind je nach Antikörper unter Punkt 3.2 erwähnt.

Die Proteine ROCK II und pCofilin wurden nur durch *in-vivo*-, das Enzym MLCK nur durch *in-vitro*-Versuche am Pankreas der Ratte nachgewiesen.

Sowohl in den Pankreas- als auch in den Läppchenproben konnte eine deutliche Expression aller untersuchten Proteine verzeichnet werden. Jedoch war die Signalintensität der jeweiligen Enzyme in den *in-vivo*-Analysen etwas stärker ausgeprägt.

### 3.2 Regulation von RhoA, MYPT1, MLC, MLCK, mDia und Cofilin durch CCK

Wie im Methodenteil dieser Arbeit unter den Punkten 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben, wurde das Pankreasgewebe *in-vivo* und die einzelnen Pankreasläppchen *in-vitro* mit verschiedenen Dosierungen Cholezystokinin über definierte Zeiträume stimuliert. Hierbei wurden sowohl Konzentrationen im physiologischen Bereich (10 pM, 100 pM), als auch im supraphysiologischen Bereich (1 nM, 10 nM, 100 nM) verwendet. Die Stimulation erfolgte über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten. So ergab sich eine dosis- und eine zeitabhängige CCK-Regulation der einzelnen Enzyme.

Die durch eine CCK-Stimulation hervorgerufene Änderung in der Signalintensität der einzelnen nachgewiesenen Proteine war in den *in-vivo*-Versuchen an der Ratte jeweils deutlicher ausgeprägt.

Bei den jeweiligen Analysen wurde jeweils eine unstimulierte Probe des Pankreas mit auf das Gel aufgetragen, welche unter den gleichen Versuchsbedingungen gewonnen wurde wie die stimulierten Proben. Durch

diesen Vorgang konnte die beschriebene Pankreas- bzw. Läppchenprobe jeweils als Referenzwert zu den durch CCK regulierten Proben verwendet werden.

### ▪ **RhoA**

Bei allen Untersuchungen von RhoA wurden 12%ige Gele verwendet, auf welche 20  $\mu\text{g}$  Protein/Tasche aufgetragen wurde. Der primäre Antikörper wurde in einer Dosierung von 1:400, der sekundäre Rabbit-Antikörper von 1:10.000 verwendet.

Sowohl die zeit- als auch die dosisabhängigen *in-vivo*-Stimulationsversuche mit CCK zeigten deutlich eine stetige Abnahme der Expression von RhoA. In den *in-vitro*-Versuchen war dieser Rückgang ebenfalls zu verzeichnen, jedoch geringer ausgeprägt.

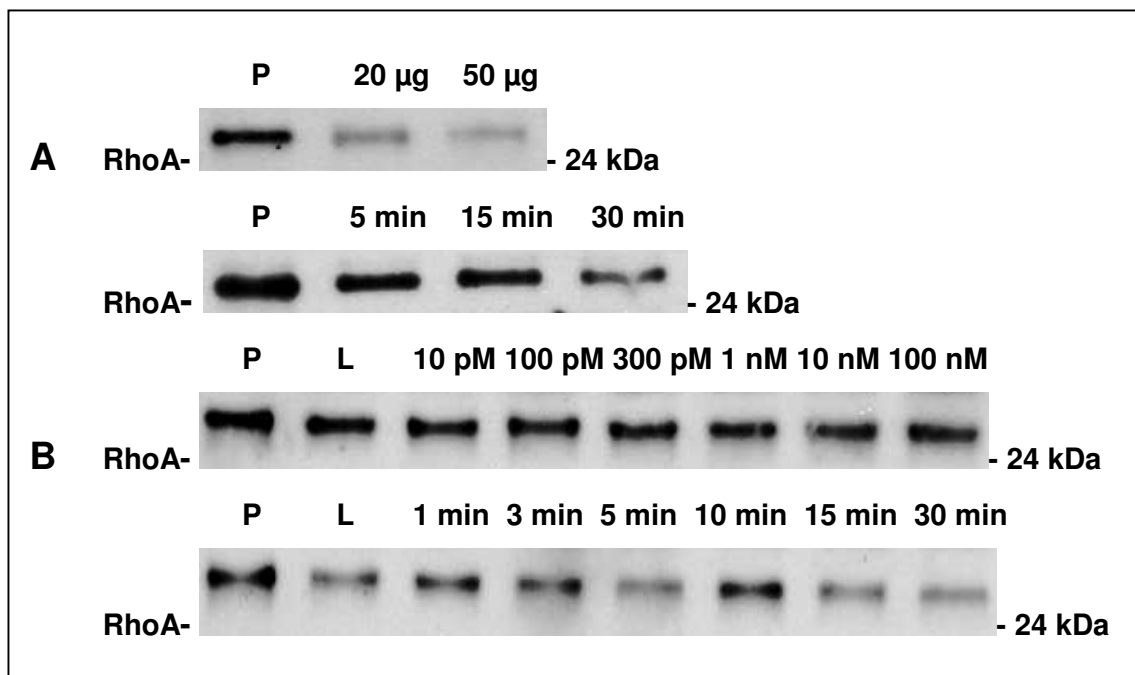


Abbildung 11: Darstellung der dosis- und zeitabhängigen Regulation von RhoA durch *in-vivo*-Stimulation (A) und *in-vitro*-Stimulation (B) mit Cholezystokinin.

A: Die erste Bande zeigt eine unstimulierte Pankreasprobe (P) als Kontrolle. Darauf folgen die mit 20  $\mu\text{g}$  und 50  $\mu\text{g}$  CCK über jeweils 30 Minuten bzw. in der zweiten Abbildung mit 50  $\mu\text{g}$  CCK über 5, 15 und 30 Minuten stimulierten Proben.

B: Es wurde jeweils eine unstimulierte Pankreasprobe (P) und eine unstimulierte Läppchenprobe (L) als Referenz verwendet. Die dosisabhängige Lappchenstimulation erfolgte mit 10 pM, 100 pM, 300 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM CCK über jeweils 15 Minuten. Bei der zeitabhängigen Stimulation wurden die Proben mit je 10 nM CCK über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten inkubiert.

### ▪ **MYPT1**

Die Untersuchungen von MYPT1 erfolgten mit 7,5%igen Gelen. Bei den *in-vivo*-Versuchen wurden 40 µg, bei den *in-vitro*-Stimulationen 60 µg Protein/Tasche aufgetragen. Die Antikörper wurden wie folgt dosiert: Der Erstantikörper mit 1:1.000 und der Mouse-Zweitantikörper mit 1:15.000 bei den *in-vivo*-Versuchen bzw. 1:10.000 bei der Stimulation von Läppchen.

Wie schon in den Versuchen mit RhoA war auch bei der Myosinphosphatase-Untereinheit MYPT1 nach Stimulation mit CCK eine Abnahme der Enzymexpression im Pankreasgewebe zu erkennen. Generell war die Regulation durch Cholezystokinin in den *in-vivo*-Untersuchungen deutlicher ausgeprägt. Bei den zeitabhängigen Stimulationen des Pankreas der Ratte (A, zweites Bild) und der Pankreasläppchen (B, zweites Bild) zeigte sich eine prägnantere Reduktion der Signalintensität als in den jeweils dosisabhängigen Analysen. In den Stimulationen mit 50 µg CCK über 30 Minuten (*in-vivo*-Versuche) bzw. mit 10 nM CCK über 30 Minuten (*in-vitro*-Analysen) ist kein Signal mehr zu verzeichnen.

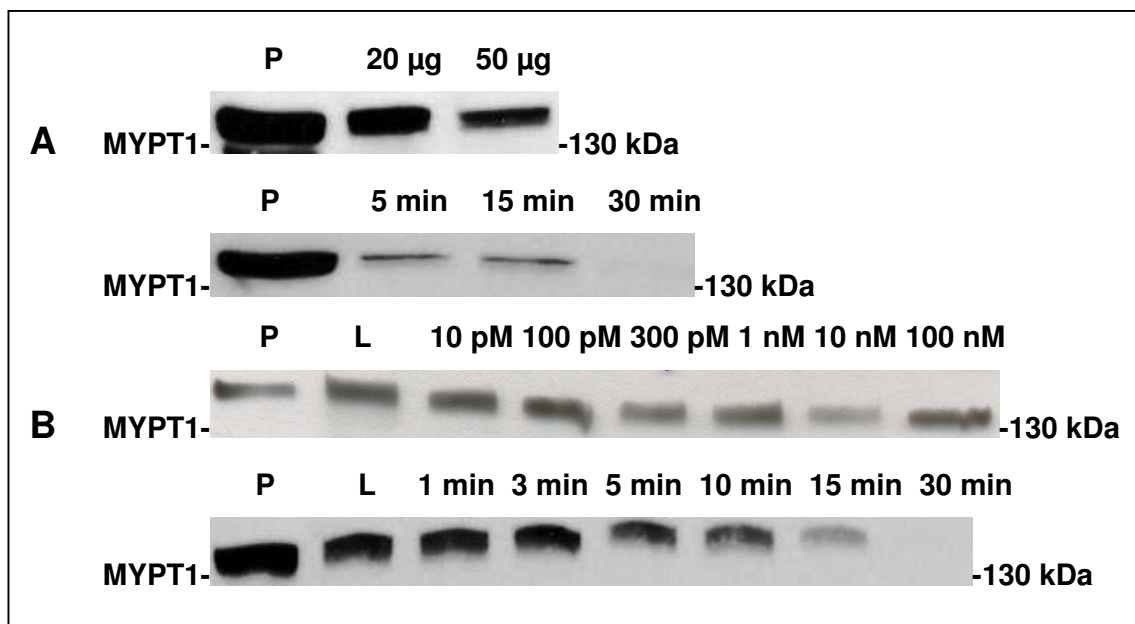


Abbildung 12: Regulation von MYPT1 durch *in-vivo*- (A) und *in-vitro*-Stimulation (B) mit Cholezystokinin.

A: Nach einer Darstellung der unstimulierten Pankreasprobe (P) als Referenz folgen die Banden der dosisabhängigen *in-vivo*-Stimulation mit 20 µg und 50 µg Cholezystokinin über 30 Minuten, sowie die zeitabhängige Stimulation mit 50 µg über 5, 15 und 30 Minuten.

B: Die Abbildungen der *in-vitro*-Versuche zeigen eine Pankreasprobe (P) und eine unstimulierte Läppchenprobe (L) als Kontrolle. Die dosisabhängige Stimulation erfolgte mit 10 pM, 100 pM, 300 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM CCK über jeweils 15 Minuten. Die Proben der zeitabhängigen Inkubation über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten mit 10 nM CCK werden im letzten Bild dargestellt.

### ▪ **pMYPT1**

Bei den Analysen von pMYPT1 wurden, wie auch bei der unphosphorylierten Form des Enzyms, 7,5%ige Gele verwendet. Es wurden 60 g, bei den zeitabhängigen *in-vitro*-Versuchen 80 g Protein/Tasche benötigt. In allen Untersuchungen wurde der Erstantikörper mit 1:2.000, der Rabbit-Zweitantikörper mit 1:5.000 dosiert.

Das phosphorylierte Enzym war nach Stimulation mit Cholezystokinin weder in den *in-vivo*- noch in den *in-vitro*-Versuchen mehr nachzuweisen.

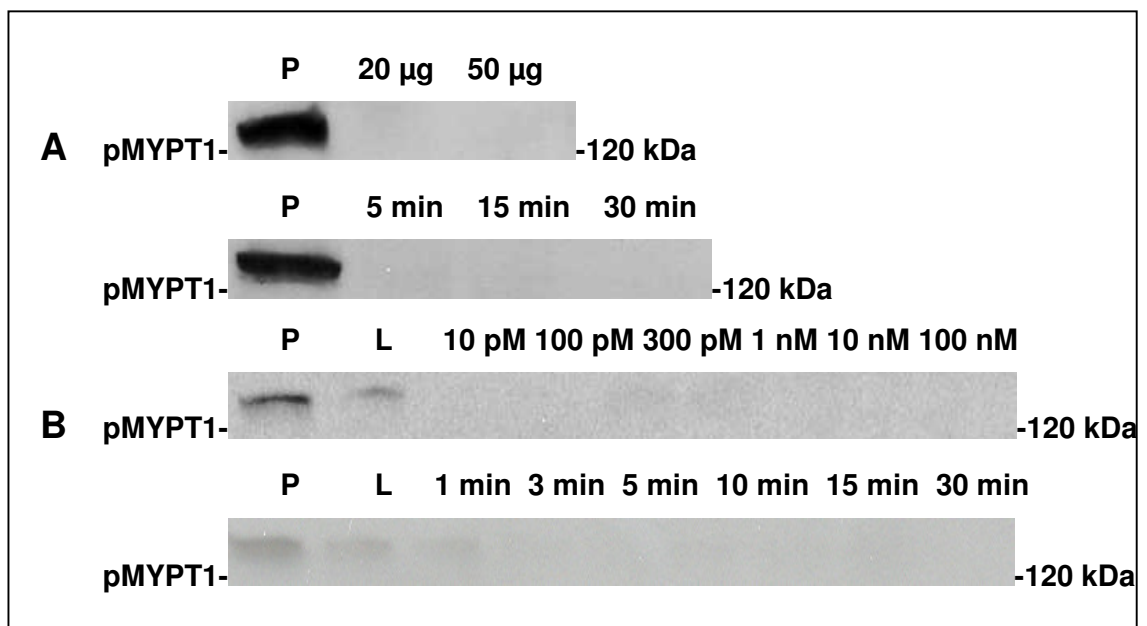


Abbildung 13: Darstellung von pMYPT1, welches zeit- bzw. dosisabhängig durch Cholezystokinin reguliert wird.

A: Die ersten beiden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der *in-vivo*-Versuche. Die erste Bande zeigt eine als Kontrolle verwendete unstimulierte Pankreasprobe (P). Auf den folgenden Banden erkennt man die dosisabhängige Stimulation mit 20 g und 50 g CCK über 30 Minuten bzw. die zeitabhängige Regulation über 5, 15, und 30 Minuten durch 50 g CCK.

B: Die beiden unteren Bilder stellen die *in-vitro*-Versuche mit pMYPT1 dar. Zunächst wurden eine unstimulierte Pankreasprobe (P) und eine unstimulierte Läppchenprobe (L) aufgetragen. Darauf folgt die dosisabhängige Stimulation mit 10 pM, 100 pM, 300

pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM CCK über 15 Minuten bzw. die zeitabhängige Inkubation mit 10 nM CCK über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten.

#### ▪ **MLC**

Bei allen Versuchen wurden 12%ige Gele und 20 µg Protein/Tasche benötigt. Der Erstantikörper wurde in einer Dosierung von 1:1.000, der Rabbit-Zweitantikörper mit 1:10.000 verwendet.

Als Referenzwert wurde zusätzlich zu einer unstimulierten Pankreas- und einer unstimulierten Läppchenprobe 2,5 µl einer Positivkontrolle aus einem Rattenzellysat von Myoblastzellen der thorakalen Aorta (A-10) verwendet. Da in dieser Kontrollprobe das Enzym maximal exprimiert wurde, konnte ein direkter Vergleich zu den untersuchten Proben hergestellt werden.

Sowohl bei den *in-vivo*- als auch bei den *in-vitro*-Stimulationen mit CCK war eine deutliche Abnahme der Signalintensität gegenüber den unstimulierten Proben und der Positivkontrolle zu verzeichnen, jedoch zeigte sich dies stärker ausgeprägt bei den *in-vivo*-Versuchen. In den Analysen der *in-vitro*-Proben war bei den Stimulationen über einen größeren Zeitraum (30 Minuten) bzw. bei einer höheren Konzentration von CCK (1 nM, 10 nM) wieder eine leichte Zunahme des Signals zu erkennen.

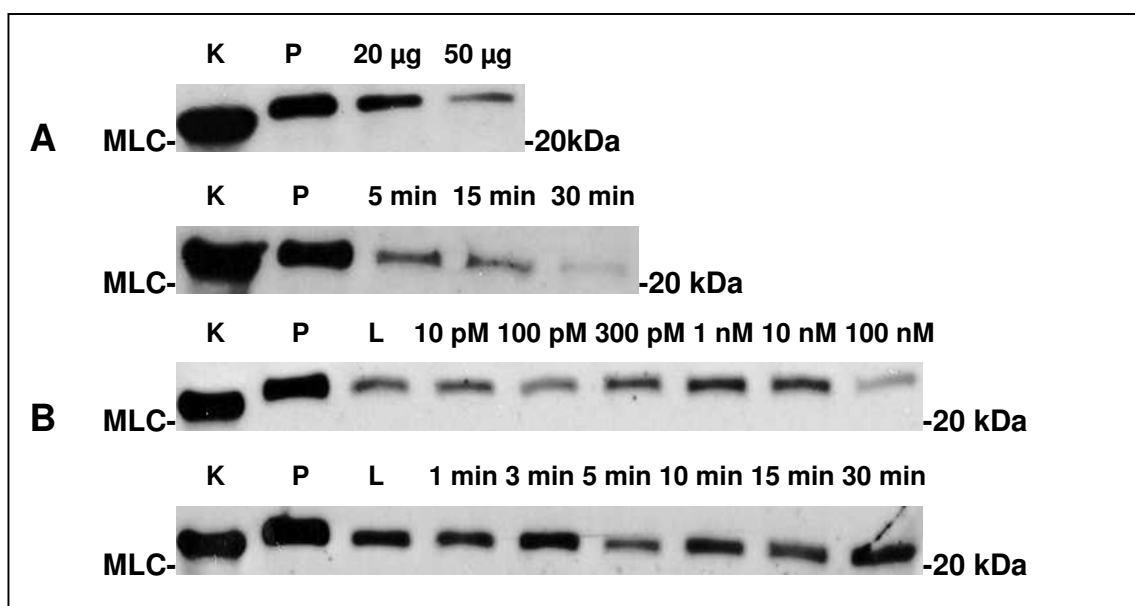


Abbildung 14: Dosis- und zeitabhängige Regulation von MLC durch Cholezystokinin in *in-vivo*- (A) und *in-vitro*-Versuchen (B).

A: Die erste Bande stellt eine Positivkontrolle (K), die zweite eine unstimulierte Pankreasprobe (P) als Referenz dar. Anschließend ist die dosisabhängige Stimulation mit 20 µg und 50 µg CCK über jeweils 30 Minuten, sowie die zeitabhängige Regulation mit 50 µg CCK über 5, 15 und 30 Minuten aufgetragen.

B: Bei den *in-vitro*-Versuchen wurden zunächst eine Positivkontrolle (K), eine unstimulierte Pankreas- (P), sowie eine unstimulierte Läppchenprobe (L) als Referenz verwendet. Die dosisabhängige Stimulation erfolgte über jeweils 15 Minuten mit 10 pM, 100 pM, 300 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM CCK. Bei der zeitabhängigen Regulation wurden die Proben mit jeweils 10 nM CCK über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten inkubiert.

#### ▪ pMLC

Die Versuche wurden mit 12%igen Gelen durchgeführt und jeweils 40 µg Protein/Tasche verwendet. Die Antikörper wurden wie folgt dosiert: der primäre Antikörper 1:200, der sekundäre Rabbit-Antikörper 1:10.000.

Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse der CCK-regulierten Expression von pMLC zeigen deutlich, dass die Signalintensität der dosis- und zeitabhängigen Stimulation gegenüber den unstimulierten Proben etwas zunimmt. Dies ist sowohl in den *in-vivo*- (A) als auch in den *in-vitro*-Analysen (B) zu erkennen.

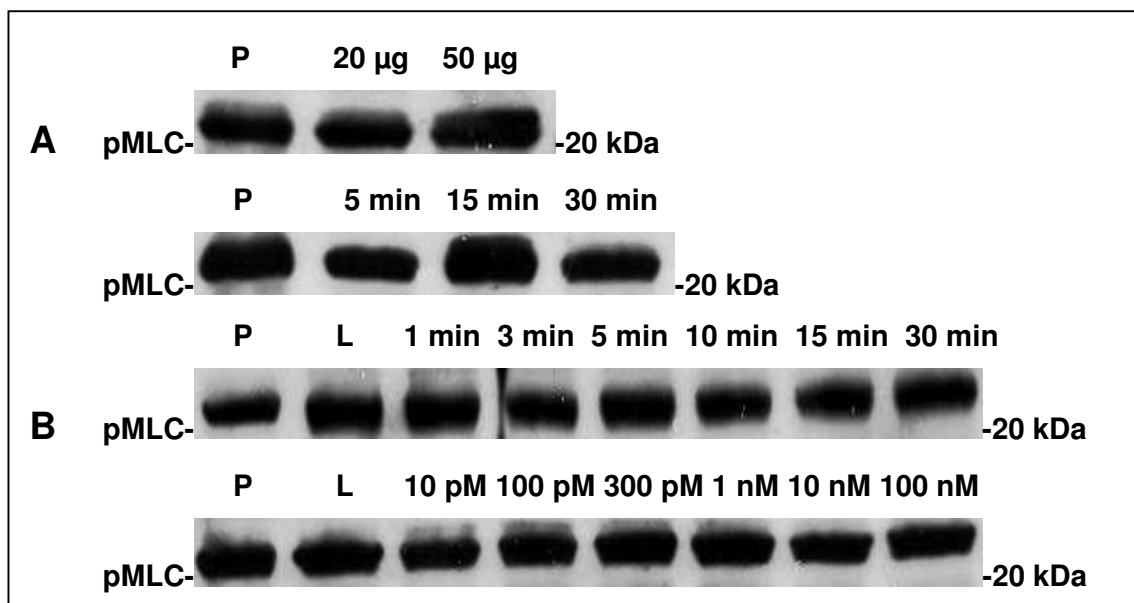


Abbildung 15: Darstellung der *in-vivo*- (A) und *in-vitro*-Stimulation (B) von pMLC mit Cholezystokinin.

*A: Zunächst wurde eine unstimulierte Pankreasprobe (P) aufgetragen, danach folgt die dosisabhängige Stimulation mit 20 µg und 50 µg CCK über 30 Minuten bzw. die zeitabhängige Stimulation mit 50 µg CCK über 5, 15 und 30 Minuten.*

*B: Bei den in-vitro-Versuchen ist in der ersten Bande eine unstimulierte Pankreasprobe (P), in der zweiten eine unstimulierte Lämpchenprobe (L) zu erkennen. Die dosisabhängige Inkubation erfolgte über 15 Minuten mit 10 pM, 100 pM, 300 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM CCK, die zeitabhängige Stimulation mit 10 nM CCK über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten.*

#### ▪ **MLCK**

Bei den Untersuchungen von MLCK wurden 7,5%ige Gele und 40 µg Protein/Tasche verwendet. Der primäre Antikörper wurde mit 1:500, der sekundäre Goat-Antikörper mit 1:10.000 dosiert.

Der Prozess der Detektion von MLCK mittels Western-Blot stellte sich als kompliziert dar. Unter Verwendung von Gelen mit verschiedenen niedriger Prozentzahl (5% und 7,5%) konnte das Enzym schließlich nachgewiesen werden. Es zeigte sich bei einem deutlich höheren Molekulargewicht als erwartet. Wie unter Punkt 1.4 bereits erwähnt, hat das Protein in verschiedenen untersuchten Zellen eine Größe von circa 135 kDa. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war MLCK bei circa 250 kDa exprimiert.

Die Analysen der CCK-abhängigen Regulation von MLCK wurden nicht mit den bei den anderen untersuchten Enzymen verwendeten verschiedenen Dosierungen bzw. Stimulationszeiten von CCK durchgeführt, sondern auf die Expression und eine Stimulation mit 10 nM CCK über 15 Minuten beschränkt (siehe Abbildung 16).

Wie in der dargestellten Abbildung eines Western-Blots und in der graphischen Übersicht deutlich wurde, nahm die Signalintensität von MLCK nach Stimulation mit Cholezystokinin gegenüber der unstimulierten Probe ab.

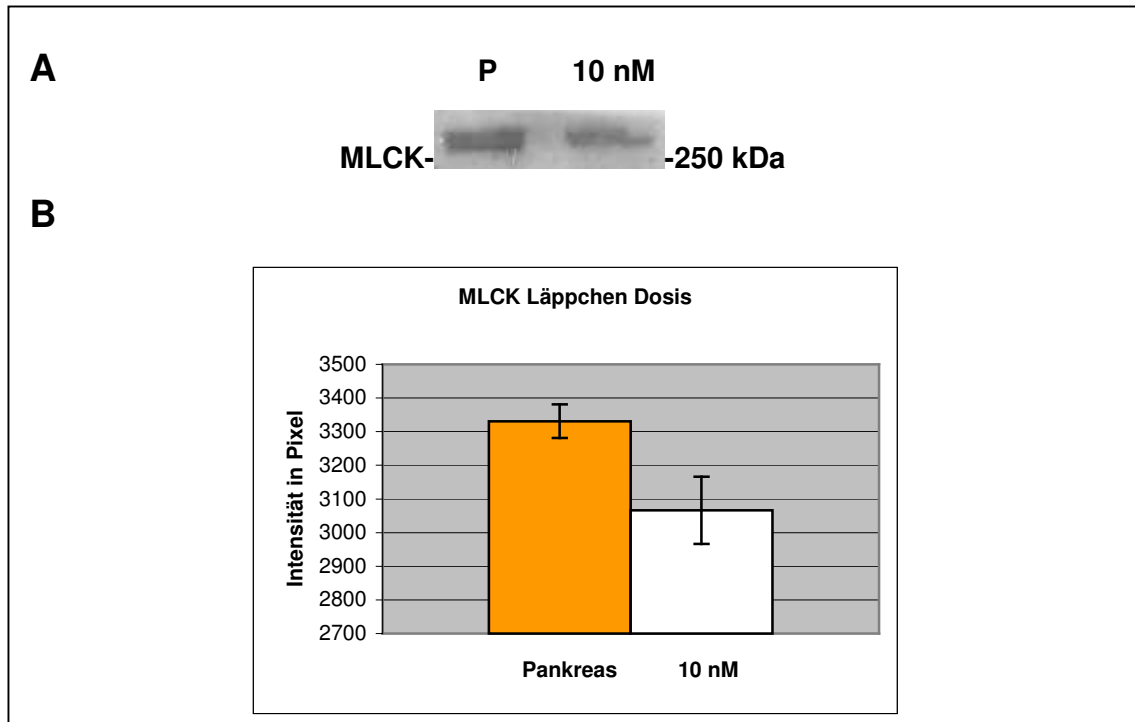


Abbildung 16: Expression von MLCK und Regulation des Enzyms durch Cholezystokinin.

A: Die obere Abbildung zeigt die *in-vitro*-Stimulation des Rattenpankreas mit 10 nM Cholezystokinin über 15 Minuten. Als Referenzwert ist zusätzlich eine unstimulierte Pankreasprobe (P) aufgetragen.

B: Die untere Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der durchgeführten Western-Blot-Untersuchungen.

#### ▪ mDia

Für die Untersuchungen von mDia wurden 8%ige Gele und 40 µg Protein/Tasche verwendet. Es wurde eine Antikörperdosierung von 1:3.000 (Erstantikörper) und 1:20.000 (Mouse-Zweitantikörper) benötigt.

Die Ergebnisse der *in-vivo*-Versuche (A) zeigten besonders in der dosisabhängigen Stimulation mit CCK eine deutliche Abnahme des Signals. Bei der dosisabhängigen *in-vitro*-Regulation war zunächst ein leichter Rückgang, bei höheren CCK-Konzentrationen (300 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM) wieder eine leichte Zunahme der Signalintensität zu erkennen. Die zeitabhängige Läppchenstimulation zeigte bei längerer Inkubation mit CCK (10, 15 und 30 Minuten) eine minimale Regression.



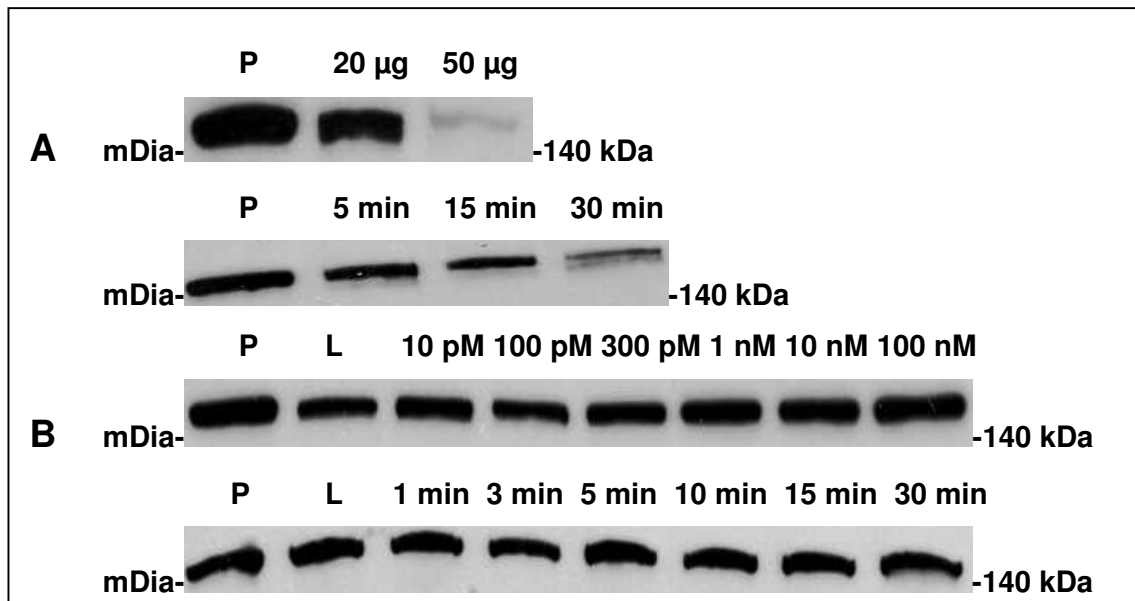


Abbildung 17: Regulation von mDia durch Cholecystokinin in *in-vivo*- (A) und *in-vitro*-Versuchen (B).

A: Die erste Bande zeigt eine unstimulierte Pankreasprobe (P) als Referenz, darauf folgt die dosisabhängige Regulation mit 20 µg und 50 µg CCK über jeweils 30 Minuten bzw. die zeitabhängige Stimulation über 5, 15 und 30 Minuten mit jeweils 50 µg CCK.

B: Nach den unstimulierten Pankreas- (P) und Läppchenproben (L) zeigen die Bilder die dosisabhängige Stimulation mit 10 pM, 100 pM, 300 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM CCK über jeweils 15 Minuten bzw. die zeitabhängige Inkubation mit je 10 nM CCK über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten.

#### ▪ **Cofilin**

Auf 12%ige Gele wurde 40 µg Protein/Tasche aufgetragen. Der primäre Antikörper wurde mit 1:1.000, der sekundäre Rabbit-Antikörper mit 1:10.000 dosiert.

Bei den Western-Blot-Untersuchungen zeigten sich jeweils zwei Banden mit Proteinen ähnlichen Molekulargewichts. Da besonders in den *in-vitro*-Analysen (B) bei der unteren Bande eine deutlichere CCK-abhängige Regulation zu erkennen war, gab diese das untersuchte Enzym Cofilin wieder. Die obere Bande schien eine Isoform des pankreatischen Cofilins darzustellen.

Sowohl die *in-vivo*- als auch die *in-vitro*-Experimente zeigten bei höheren Dosierungen von CCK bzw. bei längerer Inkubation mit dem Hormon einen deutlichen Rückgang der Expression von Cofilin.

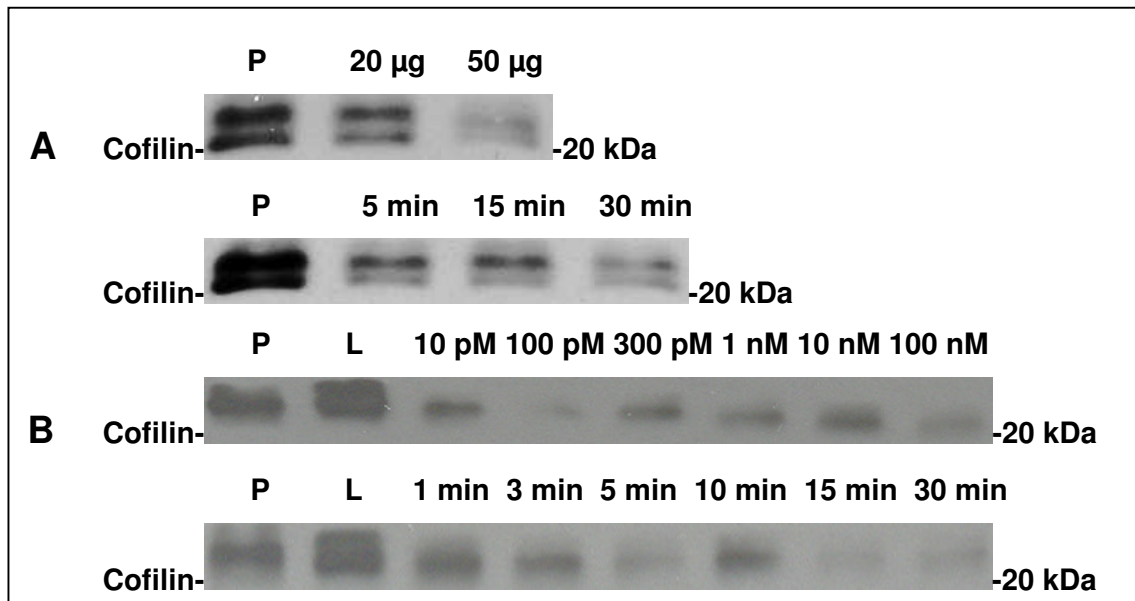


Abbildung 18: Darstellung von Cofilin reguliert durch Cholecystokinin in *in-vivo*- (A) und *in-vitro*-Experimenten.

A: Eine unstimulierte Pankreasprobe (P) wurde als Referenzwert aufgetragen. Danach folgt die dosisabhängige Stimulation mit 20 µg und 50 µg CCK über je 30 Minuten, sowie die zeitabhängige Regulation mit 50 µg über 5, 15 und 30 Minuten.

B: Als Kontrolle wurden eine unstimulierte Pankreas- (P) und eine Läppchenprobe (L) verwendet. Die dosisabhängige Stimulation wurde mit 10 pM, 100 pM, 300 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM CCK über jeweils 15 Minuten, die zeitabhängige mit 10 nM CCK über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten durchgeführt.

#### ▪ **pCofilin**

Für die Analysen von pCofilin wurden 12 %ige Gele und 40 µg Protein/Tasche verwendet. Die Antikörper wurden mit 1:1.000 (primärer Antikörper) und 1:15.000 (sekundärer Rabbit-Antikörper) dosiert. Die Untersuchungen von pCofilin wurden auf *in-vivo*-Versuche beschränkt.

Nach Phosphorylation zeigte das Enzym gegenüber der unstimulierten Pankreaskontrolle eine deutliche Zunahme der Expression. Bei Stimulationen über einen längeren Zeitraum (30 Minuten) oder bei höheren CCK-Dosierungen (50 µg) war wieder eine Abnahme der Signalintensität zu verzeichnen.

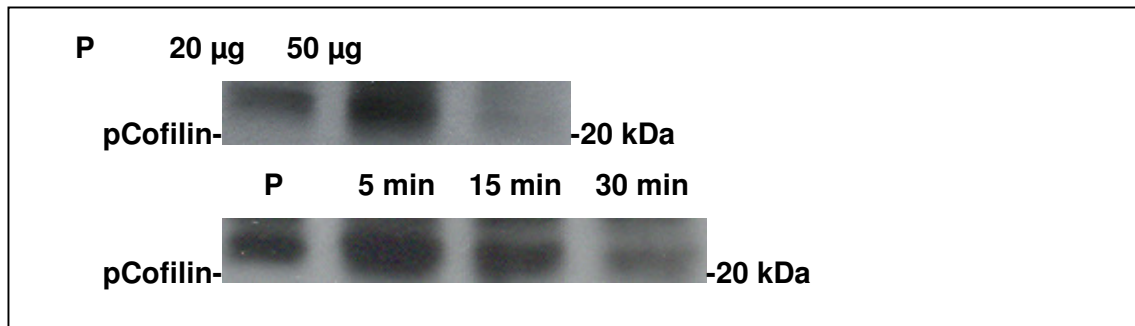


Abbildung 19: Dosis- und zeitabhängige Regulation von pCofilin durch *in-vivo*-Stimulation mit Cholezystokinin.

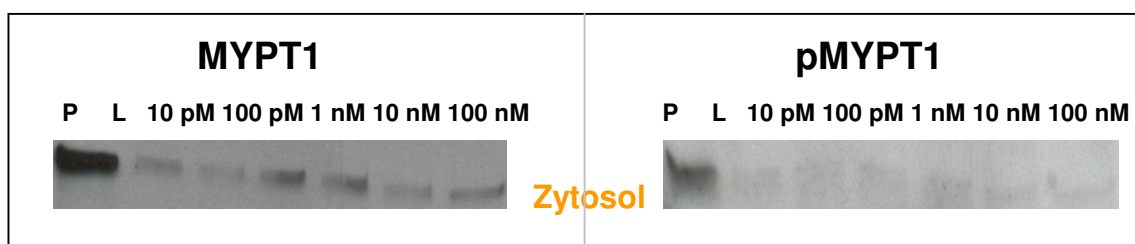
Die erste Bande zeigt eine unstimulierte Pankreasprobe (P). Darauf folgen die dosisabhängige Stimulation mit 20 µg und 50 µg CCK über 30 Minuten bzw. die zeitabhängige Stimulation mit 50 µg CCK über 5, 15 und 30 Minuten.

### 3.3 Untersuchung der Zytosol- und Zytoskelettfraktion

Wie bereits unter Punkt 2.3.4 erwähnt können die Proteine einer Zelle in eine lösliche (Zytosol) und eine unlösliche Fraktion (Zytoskelett) unterteilt werden. Die folgende Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse beschränkt sich auf die Begriffe Zytosol- und Zytoskelettfraktion.

Um festzustellen, in welchem Zellkompartiment die Proteine MYPT1, MLC und deren phosphorylierte Formen pMYPT1 bzw. pMLC vorhanden sind, wurden eine Zytosol- und eine Zytoskelettfraktion sowohl der unstimulierten als auch der mit verschiedenen Konzentrationen CCK stimulierten *in-vitro*-Proben hergestellt (siehe Punkt 2.3.4).

Die Zieluntereinheit der Myosinphosphatase MYPT1 ist sowohl im Zytosol als auch im Zytoskelett nachzuweisen. Jedoch geben die Zytosoluntersuchungen eine stärkere Signalintensität wider. Nach Phosphorylation (pMYPT1) zeigt das Enzym eine starke Expression im Zytosol, jedoch ist es in der Zytoskelettfraktion nicht nachzuweisen.



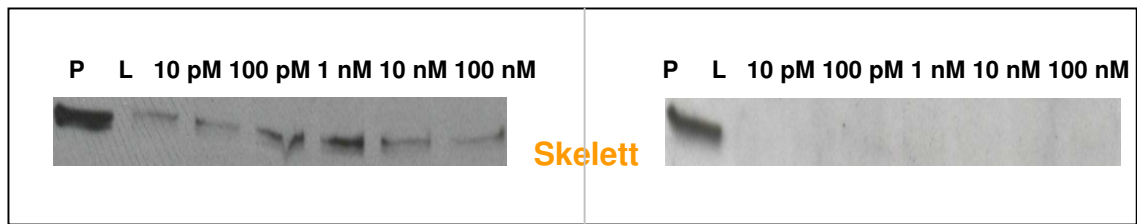


Abbildung 20: Die Abbildung zeigt die Expression des Enzyms MYPT1 bzw. pMYPT1 in den verschiedenen zellulären Kompartimenten. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse von MYPT1, auf der rechten die von pMYPT1 zu erkennen. In den oberen Abbildungen ist jeweils die Expression im Zytosol, in den unteren die im Zytoskelett wiedergegeben. Zunächst sind jeweils eine unstimulierte Pankreas- (P) und eine unstimulierte Lämpchenprobe (L) aufgetragen. Die anderen Banden zeigen die dosisabhängige CCK-Stimulation mit 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM über 30 Minuten.

Das Enzym MLC zeigt nach Stimulation mit CCK ein deutlich stärkeres Signal in der Zytosol- als in der Zytoskelettfraktion. Nach Phosphorylation war das Protein fast ausschließlich im Zytoskelett nachzuweisen.

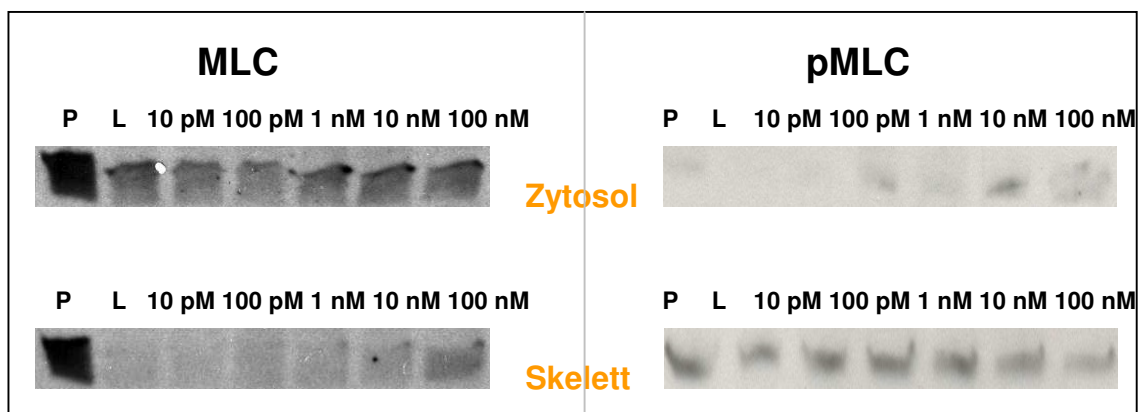


Abbildung 21: Darstellung der Expression von MLC und pMLC in der Zytosol- und Zytoskelettfraktion. Die linke Seite zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen mit MLC, die rechte Seite die mit pMLC. Die oberen beiden Abbildungen geben die Expression der beiden Enzyme im Zytosol, die beiden unteren das Vorhandensein im Zytoskelett wider. Die ersten beiden aufgetragenen Proben jedes Bildes zeigen eine unstimulierte Pankreas- (P) und Lämpchenprobe (L) als Referenzwert. Darauf folgen die in-vitro-Proben der dosisabhängigen CCK-Regulation mit 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM über 30 Minuten.

### 3.4 Assoziation der Enzyme untereinander

Der Vorgang der Immunopräzipitation (siehe Punkt 2.3.6) wurde durchgeführt, um eine Assoziation verschiedener Proteine der Signaltransduktionskaskade untereinander nachzuweisen. So konnte nicht nur die Reihenfolge festgelegt

werden, in welcher die jeweiligen Enzyme in der Signaltransduktionskaskade vorkommen, sondern auch, ob ein Enzym vom in der Kaskade davor liegenden reguliert wurde.

In dieser Arbeit wurde jeweils die Assoziation der Enzyme RhoA mit MYPT1, RhoA mit pMYPT1, MYPT1 mit ROCK II und RhoA mit mDia untersucht.

Bei den im Folgenden einzeln beschriebenen Versuchsergebnissen wurden zur Kontrolle jeweils eine unstimulierte und eine mit CCK stimulierte Läppchenprobe verwendet.

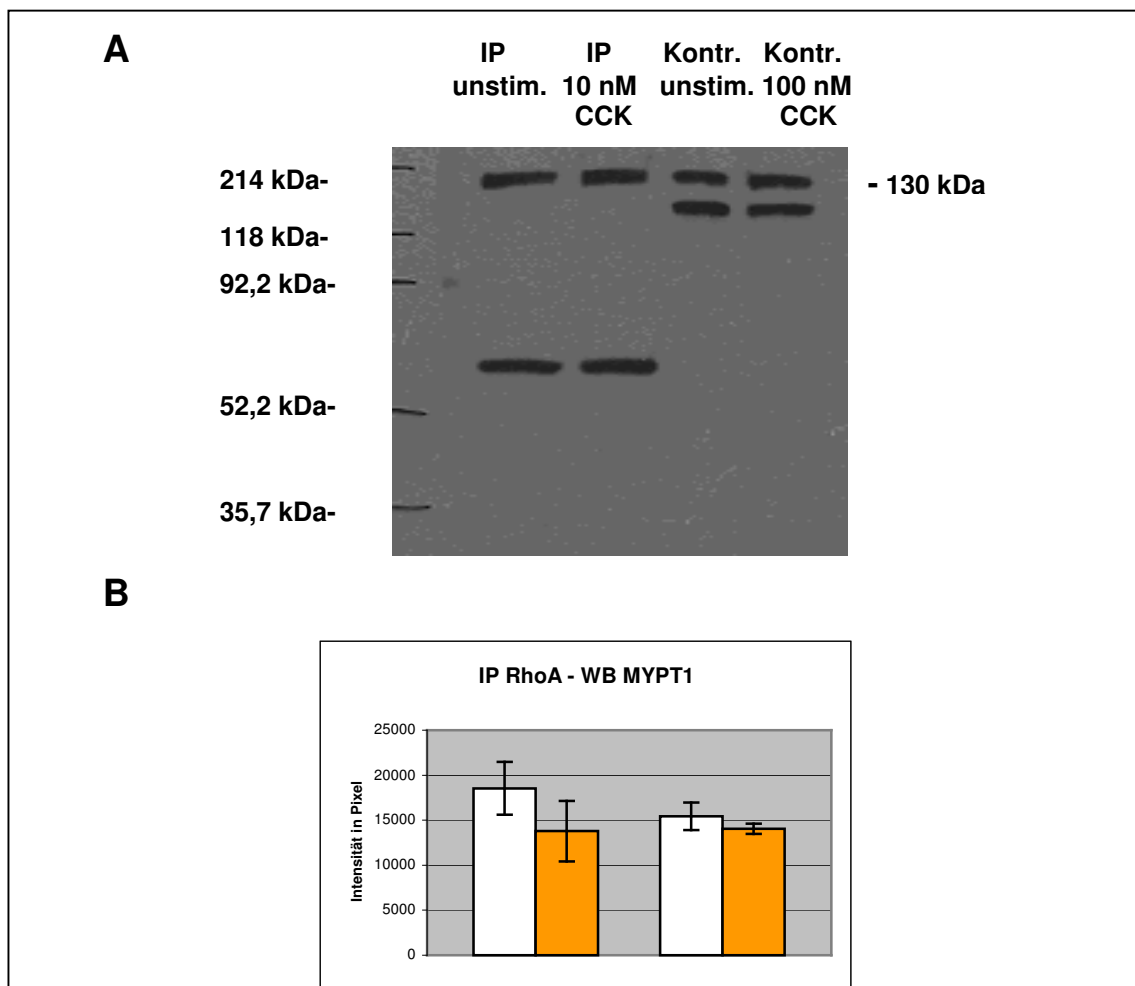


Abbildung 22: Darstellung der Assoziation von RhoA mit MYPT1.

A: Die beiden linken Banden zeigen die Immunopräzipitation mit RhoA und anschließendem Western-Blot mit MYPT1 mit einer unstimulierten und einer mit 10 nM CCK über 15 Minuten inkubierten Läppchenprobe. Als Referenzwerte wurden jeweils eine unstimulierte und eine mit 10 nM CCK über 15 Minuten stimulierte Kontrollprobe aufgetragen.

B: Die Graphik zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der im Western-Blot untersuchten IP- und Kontrollproben.

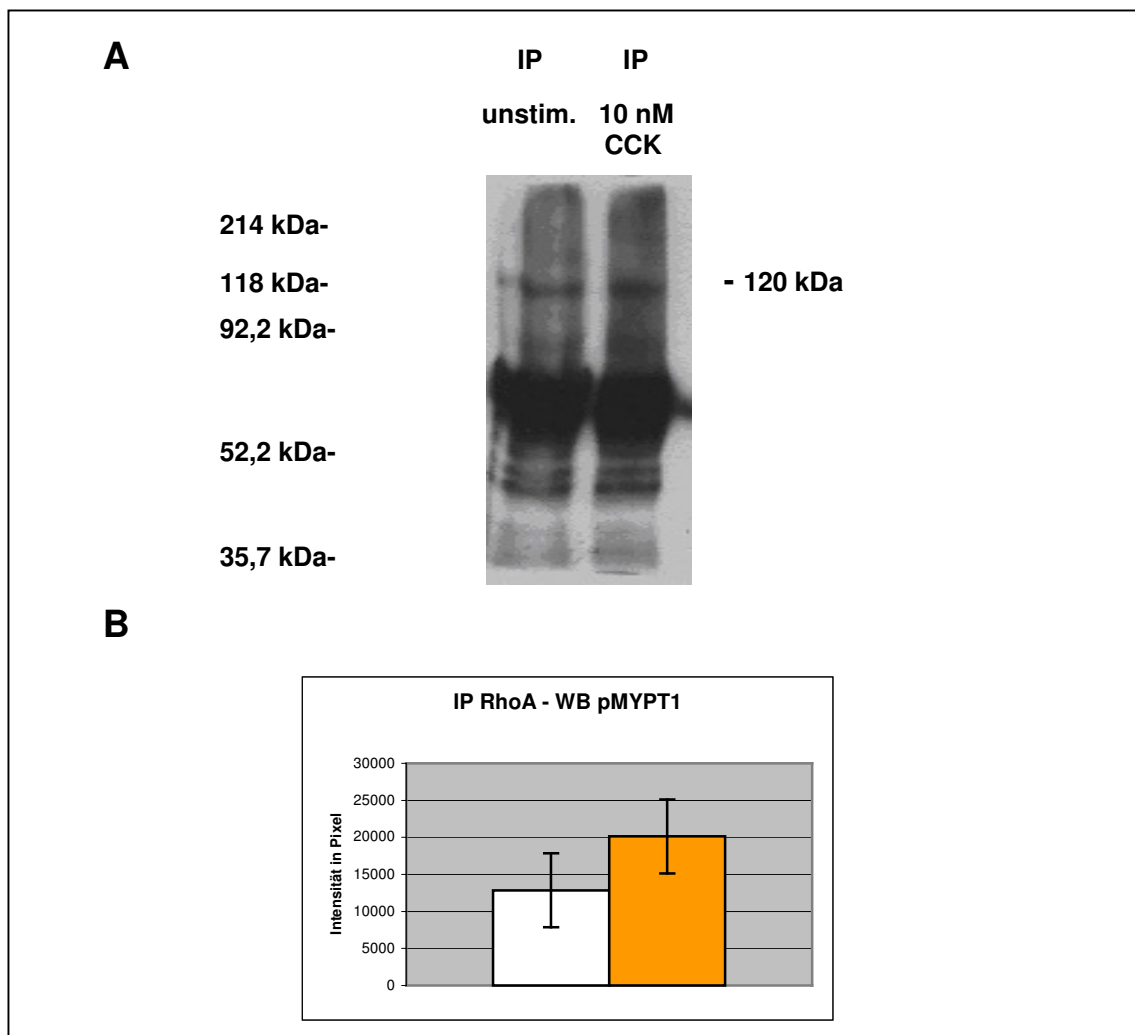


Abbildung 23: Darstellung der Assoziation von RhoA mit pMYPT1.

A: Die beiden linken Banden zeigen die Immunpräzipitation mit RhoA und anschließendem Western-Blot mit pMYPT mit einer unstimulierten und einer mit 10 nM CCK über 15 Minuten inkubierten Läppchenprobe. Als Referenzwerte wurden jeweils eine unstimulierte und eine mit 10 nM CCK über 15 Minuten stimulierte Kontrollprobe aufgetragen.

B: Die Graphik zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der im Western-Blot untersuchten IP- und Kontrollproben.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen, dass in den Untersuchungen eine Assoziation von RhoA und MYPT1 bzw. pMYPT bestand. Nach Stimulation mit Cholezystokinin war eine Abnahme bzw. eine Zunahme der Signalintensität in den Immunpräzipitationsproben zu erkennen.

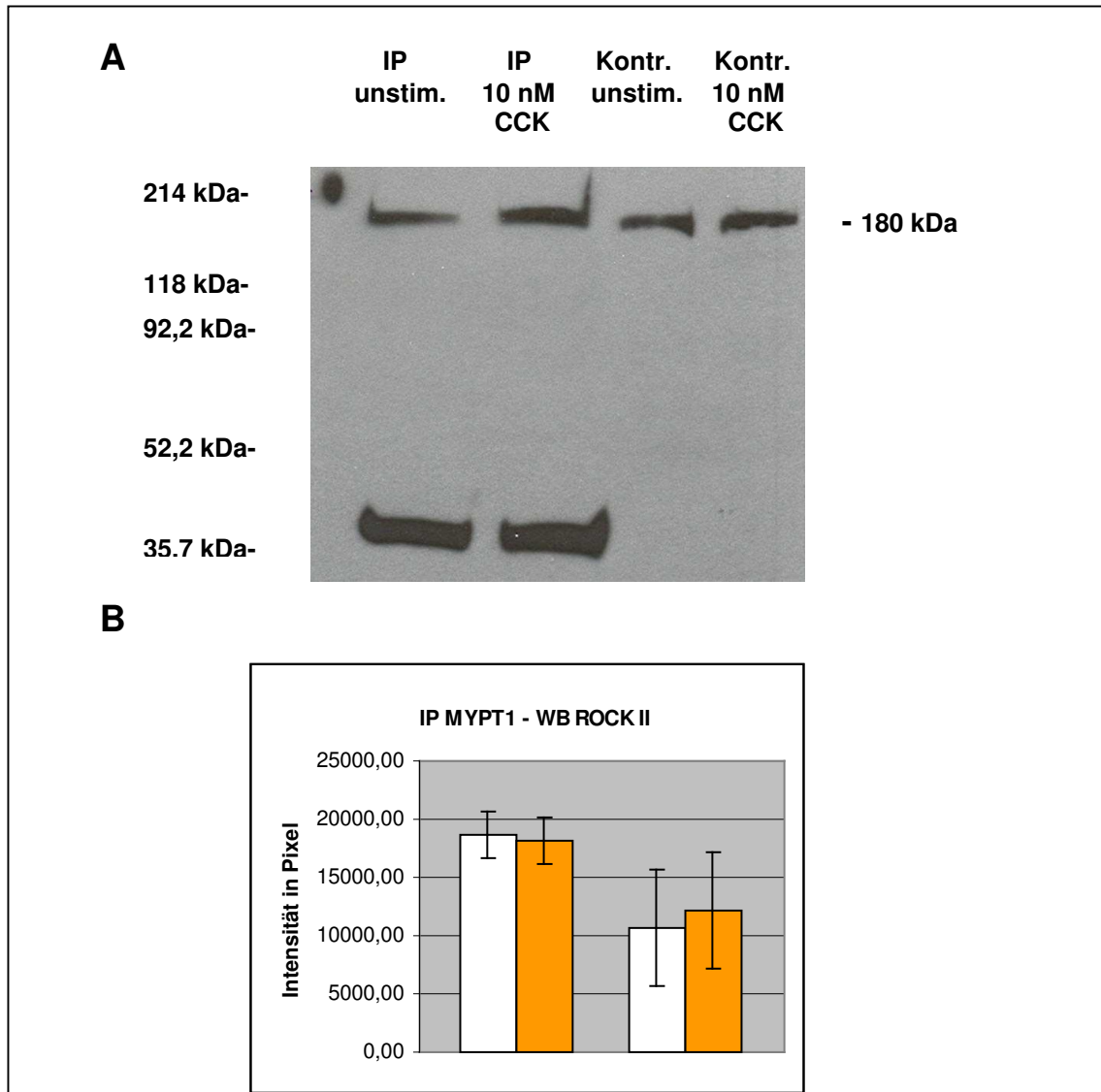


Abbildung 24: Darstellung der Assoziation von MYPT1 mit ROCK II.

A: Die beiden linken Banden zeigen die Immunpräzipitation mit MYPT1 und anschließendem Western-Blot mit ROCK II mit einer unstimulierten und einer mit 10 nM CCK über 15 Minuten inkubierten Läppchenprobe. Als Referenzwerte wurden jeweils eine unstimulierte und eine mit 10 nM CCK über 15 Minuten stimulierte Kontrollprobe aufgetragen.

B: Die Graphik zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der im Western-Blot untersuchten IP- und Kontrollproben.

Wie schon beim der Immunpräzipitation mit RhoA wurde deutlich, dass auch eine Assoziation von ROCK II mit MYPT1 bestand. Die dargestellte Graphik stellt den Mittelwert der mit diesen Antikörpern durchgeführten Versuche dar. Die Signalintensität nahm nach Hormonstimulation minimal ab.

Die in Abbildung 25 dargestellte Assoziation von RhoA mit mDia nahm im Mittelwert der durchgeführten Versuche nach Stimulation mit Cholezystokinin etwas ab.

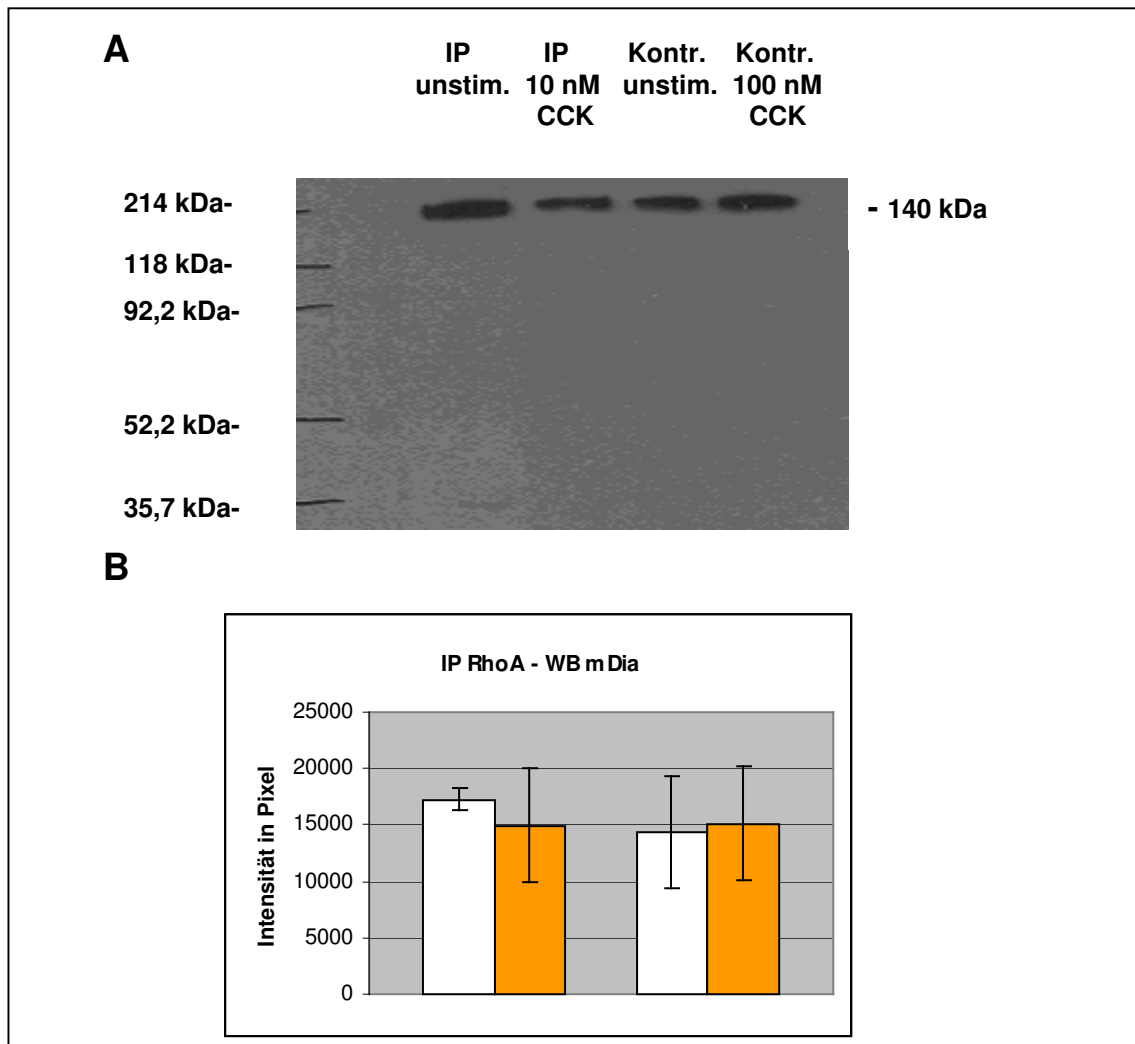


Abbildung 25: Assoziation von RhoA mit mDia.

A: Zunächst wurde die unstimulierte bzw. mit 10 nM CCK über 15 Minuten stimulierte Probe der Immunopräzipitation mit RhoA und dem anschließenden Western-Blot mit mDia aufgetragen. Als Kontrolle zeigen die beiden rechten Banden eine unstimulierte bzw. eine mit 100 nM CCK über 15 Minuten inkubierte Läppchenprobe.

B: Das untere Bild zeigt die graphische Darstellung der Assoziation der beiden Enzyme.

### 3.5 Hemmung der Signaltransduktionskaskade durch Y-27632

Zur näheren Untersuchung der Signaltransduktionskaskade wurden die Pankreasläppchen mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 über 30 Minuten inkubiert



und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen CCK über ebenfalls 30 Minuten stimuliert (siehe Punkt 2.3.5). Da der verwendete Inhibitor lichtempfindlich ist, wurden die Versuche unter Abschirmung von Licht durchgeführt.

Die mit Y-27632 behandelten Proben wurden anschließend auf eine Expression von MYPT1, MLC und die jeweils phosphorylierten Formen pMYPT1 bzw. pMLC untersucht.

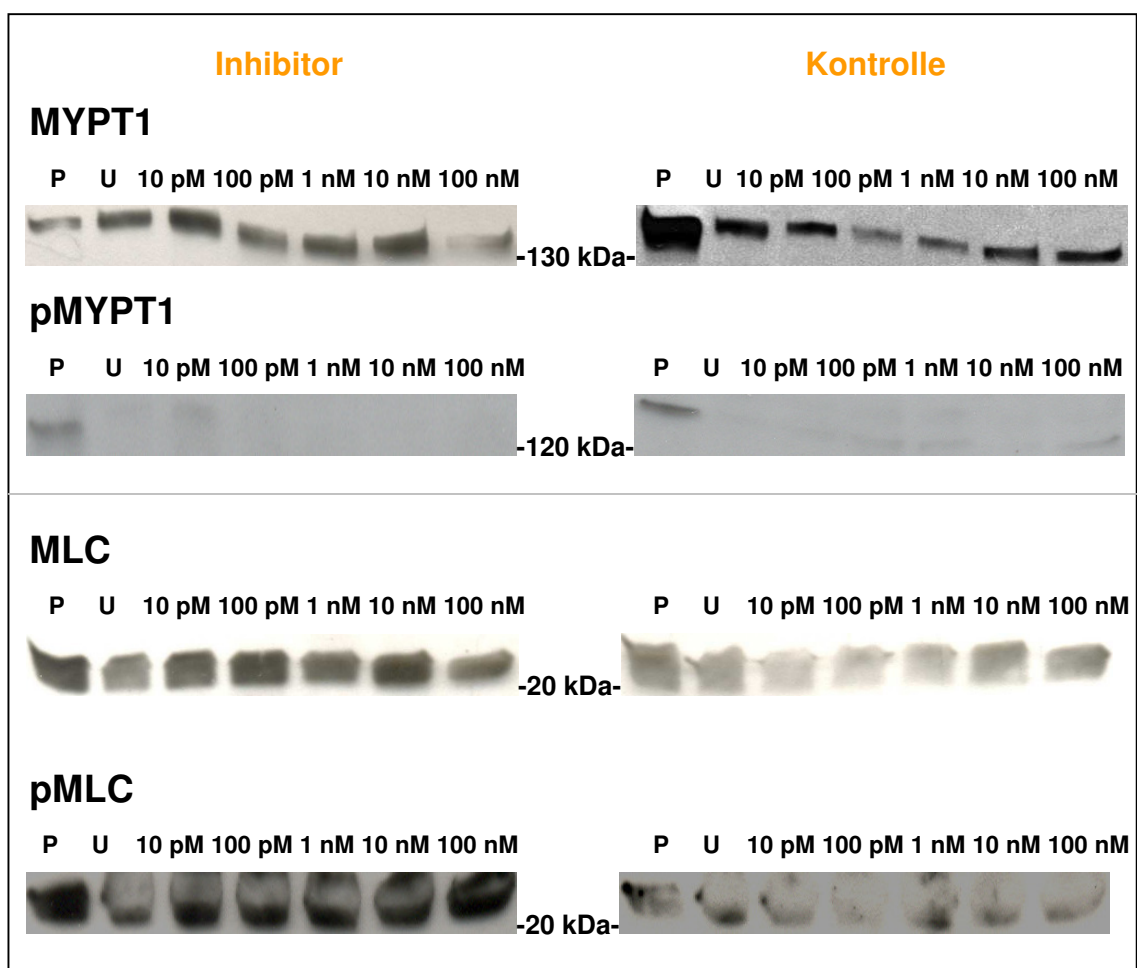


Abbildung 26: Diese Abbildungen zeigen die Auswirkungen des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf die Expression von MYPT1, pMYPT1, MLC und pMLC in Abhängigkeit von der Stimulationsdosis mit Cholezystokinin. Auf der linken Seite sind jeweils die Versuchsergebnisse mit dem Inhibitor aufgetragen, die rechte Seite zeigt die zum jeweilig untersuchten Enzym entsprechenden Kontrollproben.

Die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung mit Y-27632 und die nachfolgende Untersuchung von MYPT1 bzw. pMYPT1 keinen relevanten Unterschied gegenüber den Kontrollproben ergab.

Die Untersuchungen von MLC nach vorheriger Inkubation der Proben mit dem Inhibitor Y-27632 zeigten eine stärkere Expression des Enzyms im Gegensatz zu den dargestellten Kontrollproben.

Bei den Analysen von pMLC wurden bei den untersuchten Inhibitorproben ebenfalls stärkere Signale verzeichnet als bei den dazugehörigen Kontrollproben.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Zusammenfassung und kritische Bewertung der Experimente**

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen deutlich, dass die schon in anderen Zellen nachgewiesenen Proteine ROCK II und mDia sowie die phosphorylierbaren Enzyme MYPT1, MLC und Cofilin (Okubo, Ito et al. 1994; Leung, Manser et al. 1995; Lappalainen, Kessels et al. 1998) auch in den exokrinen Azinuszellen des Pankreas exprimiert werden. Wie in der Einleitung unter Punkt 1.4 erwähnt, wurden die Proteine RhoA und MLCK bereits in exokrinen Pankreaszellen untersucht (Burnham, Soling et al. 1988; Bissonnette, Kuhn et al. 1989; Bi, Le Page et al. 2005). Die Analysen der vorliegenden Arbeit bestätigen die Expression dieser beiden Enzyme im untersuchten Organ.

Außerdem wurde nachgewiesen, dass die aus Muskel- und anderen Körperzellen bereits bekannte, in dieser Arbeit untersuchte Signaltransduktionskaskade (siehe Abbildung 3) (Somylo and Somylo 2000), welche alle genannten Enzyme beinhaltet, auch in Azinuszellen des Pankreas vorhanden und durch CCK reguliert ist. Dieser zu Aktin-bindenden Proteinen führende Signalweg konnte durch eine dosis- und zeitabhängige Stimulation des Pankreas mit Cholezystokinin reguliert werden.

Somit konnte eine Signaltransduktionskaskade in exokrinen Azini des Pankreas identifiziert werden. Diese wird dosis- und zeitabhängig gehemmt und könnte die Veränderung des Aktinzytoskeletts bei akuter experimenteller Pankreatitis erklären.

#### **4.1.1 Expression von RhoA, ROCK II, MYPT1, MLC, MLCK, mDia und Cofilin in Pankreasazinuszellen**

Die Untersuchungen der einzelnen Proteine mittels Western-Blot ergaben jeweils ein starkes Signal sowohl in den *in-vivo*- als auch in den *in-vitro*-Versuchen. Damit wird deutlich, dass RhoA, ROCK II, MLCK, mDia, Cofilin,

MYPT1, MLC und die phosphorylierten Formen pCofilin, pMYPT1 und pMLC im unstimulierten Pankreas exprimiert werden.

Die stärkere Signalintensität der *in-vivo*- gegenüber den *in-vitro*-Analysen kann bedingt sein durch den höheren Organstress, welcher bei der Präparation der einzelnen Pankreasläppchen *in-vitro* ausgelöst wurde (Blinman, Gukovsky et al. 2000). Die *in-vivo*-stimulierten Pankreata wurden sofort nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei den *in-vitro*-Versuchen wurde das Organ nach der Präparation in gekühlter NaCl-Lösung in Läppchen unterteilt und erst anschließend schockgefroren. Damit ergab sich ein größerer Präparationsstress bei der Gewinnung der Läppchenproben. Durch diesen Stress könnte bereits der zu untersuchende Signalweg induziert und damit die Aussagekräftigkeit der Versuchsergebnisse beeinträchtigt worden sein.

Da die untersuchten Proteine sowohl in den *in-vivo*- als auch in den *in-vitro*-Analysen bei gleichen Proteinmengen und vergleichbaren Signalintensitäten exprimiert werden, kann man darauf schließen, dass die Enzyme ihren Ursprung in den exokrinen Azinuszellen des Pankreas haben und nicht in anderen Zellen, wie endokrine Pankreas-, Endothel- oder Blutzellen, welche in den Organpräparaten ebenfalls in sehr geringem Prozentsatz (< 3%) vorhanden waren.

Wie im Ergebnisteil unter Punkt 3.2 beschrieben, stellte sich die Detektion von MLCK mittels Western-Blot als schwierig dar. Zum einen kann man dies damit begründen, dass das Enzym in Pankreaszellen ein unerwartet hohes Molekulargewicht aufweist. In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigte sich das Protein bei circa 250 kDa. Frühere Untersuchungen an Azinuszellen zeigten jedoch, dass MLCK in exokrinen Pankreaszellen bei 138 kDa detektiert wurde (Bissonnette, Kuhn et al. 1989). In embryonalen Fibroblasten von Hühnern wurden größere Formen des Enzyms identifiziert, welche ein Molekulargewicht von 210 kDa besaßen (Fisher and Ikebe 1995). Somit besteht die Möglichkeit, dass auch in exokrinen Azinuszellen des Pankreas eine größere Isoform vorkommt. Da bei der Durchführung eines

Western-Blots das zum Schutz vor Austrocknung verwendete Methanol eine Schrumpfung des Gels bewirken kann, und somit der Transfer von hochmolekularen Proteinen verschlechtert werden kann, lässt sich die komplizierte Detektion von MLCK erklären.

Ebenso kann eine Dimer-Bildung der MLCK nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies ist eine weitere Überlegung, durch die das hohe Molekulargewicht des Proteins erklärt werden könnte. Jedoch wurde durch die Verwendung von verschiedenen Puffern und das Erhitzen der Proben vor dem Gebrauch die Möglichkeit der Disulfidbrücken-Bildung minimiert.

Vergleichende Analysen von ROCK II und MLCK in 3T3 Zellen zeigten, dass ROCK II im Zentrum der Zelle, MLCK jedoch in der Zellperipherie exprimiert wird (Totsukawa, Yamakita et al. 2000).

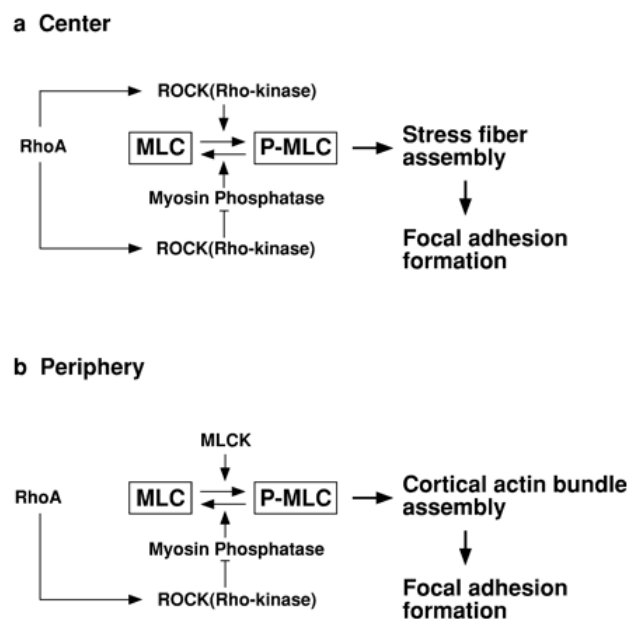


Abbildung 27: Darstellung der verschiedenen Regulationsmöglichkeiten von MLC im Zentrum der Zelle durch ROCK II (a) bzw. in der Zellperipherie durch MLCK (b) [modifiziert nach Totsukawa et al. (Totsukawa, Yamakita et al. 2000)].

Somit bewirken ROCK II und MLCK in unterschiedlichen Zellabschnitten über eine Phosphorylierung von MLC eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts.

Einen weiteren Erklärungsversuch für die Detektierungsschwierigkeiten stellt der verwendete Antikörper dar. Es existieren nur wenige gute Antikörper-

präparate auf dem Markt, so dass die Auswahl gering ausfällt. Der in dieser Arbeit gebrauchte könnte eine zu geringe Spezifität für die MLCK in Azinuszellen aufgewiesen haben und so die Darstellung von MLCK mittels Western-Blot erschwert haben.

Da die Untersuchungen dieser Arbeit nur an *in-vitro*-hergestellten Pankreasläppchen durchgeführt wurden, könnte durch den bereits erwähnten höheren Präparationsstress eine vorzeitige Aktivierung von Signalwegen stattgefunden haben. Dies könnte morphologische Veränderungen in der Zellperipherie bewirkt haben. Hierdurch bestände die Möglichkeit, dass das Enzym MLCK in geringerem Maße exprimiert und damit schwieriger zu detektieren war.

Abschließend ist noch anzumerken, dass das verwendete System zur Beurteilung von MLCK offensichtlich nicht optimal ist, so dass die dargestellten Ergebnisse nicht als endgültig zu betrachten sind. Um eine detailliertere Analyse des Enzyms anzufertigen, sind weiterführende Untersuchungen, insbesondere *in-vivo*-Studien, nötig.

Zur Feststellung, in welchem zellulären Kompartiment die Proteine sowohl im unphosphorylierten als auch im phosphorylierten Zustand vorliegen, wurden für MYPT1 und MLC detaillierte Untersuchungen durchgeführt (siehe Punkt 3.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 übersichtlich dargestellt.

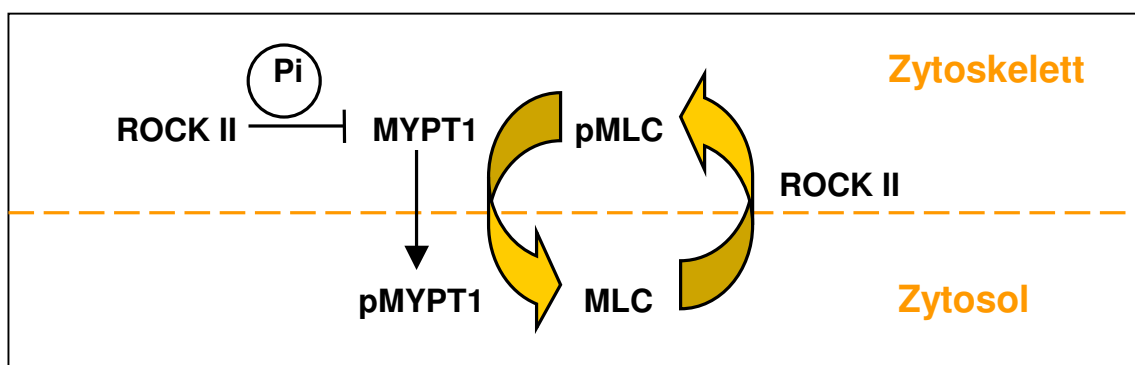


Abbildung 28: Darstellung des Signalweges in exokrinen Azinuszellen unter Berücksichtigung der Zytosol- und Zytoskelettfraktion. Pi gibt die Phosphorylierung des Enzyms MYPT1 an.

Die Analysen von MYPT1 zeigen, dass das Enzym in seiner unphosphorylierten und damit aktiven Form im Zytosol und ebenso im Zytoskelett nachzuweisen ist.

Da das inaktive pMYPT1 nur noch in der Zytosolfraktion vorhanden ist, kann man darauf schließen, dass die Myosinphosphatase nach Phosphorylation durch ROCK II vollständig in diesen Teil der Azinuszelle transloziert.

Bei den Fraktionsanalysen von MLC wird deutlich, dass das Enzym hauptsächlich im Zytosol vorhanden ist. Die phosphorylierte Form pMLC hingegen zeigt fast ausschließlich eine Expression in der Zytoskelettfraktion. Somit bewirkt eine Phosphorylation des Enzyms durch ROCK II oder MLCK eine beinahe vollständige Translokation vom Zytosol ins Zytoskelett. Durch die Versuche mit dosisabhängig CCK-stimulierten Pankreasläppchen zeigt sich, dass bei höheren, supraphysiologischen Hormonkonzentrationen die Expression von MLC im Zytoskelett wieder zunimmt und analog dazu die Expression von pMLC im Zytoskelett reduziert wird (siehe Abbildung 21). Dies lässt darauf schließen, dass der durch CCK gehemmte Signalweg, der über eine Inhibition der Myosinphosphatase zu einem Überwiegen der MLCK und damit der Phosphorylation von MLC führt (siehe Punkt 4.1.2), nach diesen hohen Dosierungen langsam wieder aktiviert wird.

#### 4.1.2 Regulation der Enzyme des Signaltransduktionsweges durch CCK

Die durch das Hormon CCK in Azinuszellen ausgelöste Signalübertragung beinhaltet viele unterschiedliche intrazelluläre Mechanismen (Williams 2001). Zum einen ist bekannt, dass das Hormon Cholezystokinin in supraphysiologischen Konzentrationen eine akute Pankreatitis auslöst (Lampel and Kern 1977). Die Proteine RhoA, ROCK II, MLCK, mDia, Cofilin (pCofilin), MYPT1 (pMYPT1) und MLC (pMLC) wurden in anderen Körperzellen identifiziert und konnten mit dieser Arbeit im Pankreas nachgewiesen werden. Der beschriebene Signalweg (siehe Abbildung 3) ist durch CCK regulierbar.

Bei allen untersuchten Proteinen wurde eine Veränderung ihrer Signalintensität und somit eine CCK-abhängige Enzymregulation deutlich.

Die GTPase RhoA zeigte bei der dosis- und zeitabhängigen Stimulation mit CCK eine Abnahme der Expression bei einer höheren Konzentration bzw. längeren Inkubation mit dem Hormon. Durch die resultierende verringerte Aktivität von ROCK II, welche in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt wurde,

wurde die Untereinheit MYPT1 der Myosinphosphatase vermindert phosphoryliert und somit die Gesamtaktivität des Enzyms gehemmt. Dies wurde in einer Regression der Expression von MYPT1 und einem völligen Fehlen der Signale von pMYPT1 verdeutlicht. Dadurch wurde das Gleichgewicht zwischen der Dephosphorylation der MLC durch MYPT1 auf der einen Seite und der Phosphorylation des Enzyms durch MLCK und ROCK II auf der anderen Seite zugunsten der Phosphorylation der MLC verschoben. In den Ergebnissen wird dies durch eine Abnahme der Expression von MLC und eine Zunahme von pMLC bei Stimulation mit CCK dargestellt. Die erhöhte Expression von pMLC könnte zu einer Reorganisation und somit zu einer Kontraktion der Aktinzytoskeletts in exokrinen Pankreaszellen führen, wie dies z.B. schon bei Muskelzellen beschrieben wurde (Itoh, Ikebe et al. 1989).

Der intrazelluläre Signalweg über RhoA zu Aktin-bindenden Proteinen kann, wie bereits unter Punkt 1.4 beschrieben, auch über andere Enzyme vermittelt werden.

RhoA bewirkt eine Aktivierung von mDia, welches über das Enzym Profilin eine Polymerisation der Aktinfilamente vermittelt (siehe Abbildung 3).

Auf einem alternativen Signalweg führt RhoA über ROCK II zu einer Aktivierung der LIM-Kinase, welche das Enzym Cofilin phosphoryliert. Dies bewirkt eine Hemmung der Aktindepolymerisation.

In dieser Arbeit wurden die Enzyme mDia und Cofilin mit dessen phosphorylierter Form pCofilin untersucht. Wie in den Analysen deutlich wurde, bewirkt eine durch Cholezystokininstimulation ausgelöste Abnahme der Expression von RhoA eine verminderte Signalintensität sowohl von mDia, als auch von Cofilin. Analog zu diesen Ergebnissen zeigt pCofilin bei supraphysiologischer Hormonstimulation eine Abnahme der Expression. Bei physiologischen Konzentrationen von CCK ist jedoch eine Zunahme des Signals zu verzeichnen. Die primäre Erhöhung der Signalintensität von pCofilin kann dadurch erklärt werden, dass der Signalweg über RhoA, ROCK II und LIMK zu Cofilin erst bei höheren Dosierungen des Hormons Cholezystokinin inhibiert wird.



Die durch CCK-Stimulation hervorgerufene veränderte Aktivität der beiden Enzyme mDia und Cofilin führt ebenso wie der Signalweg über MYPT1 und MLC zu einer Reorganisation der Aktinzytoskeletts.

Mittels der durchgeführten Immunopräzipitationsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl RhoA als auch ROCK II mit dem Enzym Myosinphosphatase (MYPT1 bzw. pMYPT1) assoziiert ist. Durch die Interaktion dieser Proteine untereinander ist bei der bereits diskutierten CCK-abhängigen Stimulation der Azinuszellen eine Regulation der MLCP durch RhoA bzw. ROCK II möglich.

Außerdem wurde die Assoziation von RhoA mit dem Enzym mDia untersucht. Die Ergebnisse zeigen nicht nur eine Interaktion der Enzyme, sondern ebenfalls eine stimulationsabhängige Regulation der Enzymaktivität.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass ein durch CCK regulierbarer Signalweg über RhoA, ROCK II und anschließend über die Myosinphosphatase bzw. über RhoA und mDia in exokrinen Azinuszellen des Pankreas existiert. Durch eine Stimulation von RhoA bzw. ROCK II mit CCK kann eine in den vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht immer deutliche Regulation der nachfolgenden Enzyme MYPT1 und mDia erfolgen.

Wie in Abbildung 8 dargestellt führen intrazelluläre Signalwege zu Aktin-modulierenden Proteinen, wie der in der vorliegenden Arbeit untersuchte, zu einer vermehrten Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente. Dies führt dazu, dass mit Vorstufen von Verdauungsenzymen beladene Vesikel nicht mehr zum apikalen Zellpol transportiert und somit nicht in den Pankreasgang entleert werden können. Die Vesikel verbleiben im basalen Zellteil, wo es zu einer vorzeitigen Aktivierung der Enzyme kommen kann. Wie unter Punkt 1.2.2 beschrieben, kann dieser Vorgang zu einer akuten Pankreatitis führen. Somit trägt die in dieser Arbeit untersuchte Signaltransduktionskaskade zur Entwicklung dieser Erkrankung bei.

#### 4.1.3 Hemmung der Signaltransduktionskaskade durch Y-27632

Zur näheren Analyse der Signaltransduktionskaskade wurde der ROCK-Inhibitor Y-27632 verwendet. Es wurden die Auswirkungen auf die Enzyme MYPT1 (pMYPT1) und MLC (pMLC) untersucht.

Durch eine Hemmung von ROCK II sollte eine vermehrte Phosphorylation der Zieluntereinheit der Myosinphosphatase MYPT1 bewirkt werden. Analog dazu sollte eine Regression von MYPT1 erfolgen. Dadurch würde das Gleichgewicht zwischen MLCK und MLCP zugunsten der Myosinphosphatase verschoben und somit MLC vermehrt dephosphoryliert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch keinen wesentlichen Unterschied der Expression von MYPT1 und pMYPT1 in den Inhibitor- und Kontrollproben. Dies kann zum einen darauf begründet sein, dass der Präparationsstress zu einer Aktivierung des Signalweges vor Inkubation mit Y-27632 führte und somit die Dephosphorylation des Enzyms bereits eingesetzt hatte. Auf der anderen Seite kann die durch den Versuchsaufbau bedingte lange Inkubationszeit von über 30 Minuten diese Aktivierung bewirkt haben.

Die Analysen der MLC bei vorheriger Inkubation mit Y-27632 zeigten jedoch analog zu den oben angeführten theoretischen Überlegungen eine Intensitätszunahme des Signals gegenüber den Kontrollproben. Bei den Versuchen mit pMLC zeigt sich hingegen eher eine Zunahme der Signalintensität in den Inhibitorproben gegenüber den Kontrollproben. Dies kann, wie schon bei den Versuchen mit MYPT1 und pMYPT1 erläutert, an der vorzeitigen Aktivierung des Signalweges durch erhöhten Zellstress und lange Inkubationszeiten liegen.

Eine alternative Erklärung wäre die in früheren Untersuchungen des Inhibitors festgestellte Abnahme der Wirkung von Y-27632 nach einer längeren Inkubation (Ishizaki, Uehata et al. 2000), die jedoch 24 Stunden betrug. Da in der vorliegenden Arbeit die Stimulierung über lediglich 30 Minuten erfolgte, ist diese Möglichkeit wohl eher ausgeschlossen. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine optimale Inhibition bei einer Inkubation von 30 Minuten erfolgt (Narumiya, Ishizaki et al. 2000).

Somit stellt der in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsaufbau offenbar nicht das optimale System für eine Inhibierung des Signalweges in Pankreasläppchen dar. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, sollten zusätzlich *in-vivo*-Analysen durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind somit nicht als endgültig zu betrachten.

Eine Erklärungsmöglichkeit, die nicht außer Acht gelassen werden darf, ist das Vorhandensein von anderen, die Enzyme dieses Signalweges und dessen Inhibierung beeinflussenden Kinasen und Phosphatasen. Wie in anderen Zellen schon beschrieben und unter Punkt 1.4 dieser Arbeit am Rande erwähnt, spielen diese anderen Enzyme und ihre Regulation eine große Rolle. Ob sie für die analysierte intrazelluläre Kaskade in exokrinen Azinuszellen eine Bedeutung haben, ist noch unklar.

#### 4.2 Mögliche Bedeutung des untersuchten Signaltransduktionsweges zu Aktinbindenden Proteinen im Pankreas

In dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass in exokrinen Azinuszellen des Pankreas ein funktioneller Signaltransduktionsweg über RhoA zu Aktinbindenden Proteinen existiert. Dieser kann durch eine Stimulation mit physiologischen und insbesondere supraphysiologischen Dosierungen Cholezystokinin gehemmt werden. Die Inhibierung konnte offensichtlich auch bereits durch Präparationsstress eingeleitet werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass ein diagnostisch-therapeutischer Eingriff, wie die unter Punkt 1.2.1 erwähnte ERCP, einen adäquaten Reiz für eine Organentzündung darstellen könnte.

Da Cholezystokinin durch eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts bei der Entwicklung einer akuten Pankreatitis eine bedeutende Rolle spielt, kann man aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf schließen, dass die maximale Aktivierung bzw. in diesem Fall Inhibierung der Aktin-modulierenden Mechanismen einen der frühesten Prozesse bei diesem pathologischen Vorgang darstellt. Es wurde beobachtet, dass die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, welches unter ruhenden Bedingungen auf die apikalen

Zellregionen der Azinuszellen des Pankreas begrenzt ist, zu einer unkoordinierten Fusion von Vesikeln und zu einer Inhibierung des regulären Sekretionsmechanismus führt (Kiehne, Herzig et al. 2002).

Durch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen können die intrazellulären Vorgänge, welche zu einer physiologischen und pathophysiologischen Aktivierung der Verdauungsenzyme führen, näher charakterisiert werden.

Zusammengefasst heben die beschriebenen Resultate die besondere Bedeutung der über das Hormon CCK vermittelten Signalwege bei der physiologischen Organfunktion und der Entwicklung einer akuten Pankreatitis hervor.

#### 4.3 Ausblick und weiterführende Untersuchungen

Die in dieser Arbeit beschriebene Signaltransduktionskaskade trägt möglicherweise sowohl zur Regulation des Aktinzytoskeletts als auch zur Exozytose und damit zur Sekretion in Azinuszellen bei. Um eine durch CCK-Stimulation hervorgerufene Reorganisation des Aktinzytoskeletts nachzuweisen, sollten zur Vervollständigung der vorliegenden Ergebnisse Immunfluoreszenzuntersuchungen von exokrinen Pankreaszellen durchgeführt werden.

Da die wohl vorzeitige Aktivierung des Signalweges durch Präparationsstress in den *in-vitro*-Analysen keine Generalisierbarkeit der Ergebnisse in Pankreasläppchen zulassen kann, würden weiterführende *in-vivo*-Experimente, insbesondere mit MLCK, zu einer Klärung der Frage der Expression und CCK-abhängigen Regulation des Enzyms beitragen.

Zusätzlich sollten ergänzend zu den Untersuchungen mit Cholezystokinin andere Sekretagoga, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Hormone, welche den Schweregrad der akuten Pankreatitis beeinflussen, eingesetzt werden, damit die Regulation des Signalweges durch verschiedene Stimuli in ihrer Gesamtheit erfasst werden kann. Bei der Interpretation aller Analysen

sollte jedoch der durch die Präparation hervorgerufene Organstress berücksichtigt werden.

In früheren Untersuchungen wurden bisher drei verschiedene, mögliche Therapieansätze zur Intervention einer akuten Pankreatitis postuliert: Die durch Zytokine vermittelte Inhibierung der inflammatorischen Prozesse, welche zu einer Pankreasnekrose führen, die antiinflammatorischen Zytokine, um ein Organversagen zu verhindern und die von Zytokinen unabhängige Hemmung der frühen Zymogenaktivierung in Azinuszellen (Nagar and Gorelick 2004). Zur Klärung des zuletzt erwähnten Ansatzes tragen die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse bei. Somit könnte der analysierte Signalweg ein geeignetes Ziel für eine Prävention oder eine Therapie der akuten Pankreatitis darstellen.

So könnte z.B. die Modulation der Aktivität des Enzyms ROCK II, z.B. durch den in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor Y-27632, eine neue Möglichkeit für die Therapie der akuten Organentzündung bieten. ROCK II könnte als therapeutisches Zielenzym für viele verschiedene, auf einer Veränderung des Aktinzytoskeletts beruhende Krankheiten fungieren. Dazu müssten jedoch detailliertere Untersuchungen und *in-vivo*-Analysen durchgeführt werden. Eine erfolgreiche Hemmung und somit eine Unterbrechung des RhoA-Signalweges konnte jedoch in Azinuszellen bislang nicht nachgewiesen werden. Weiterführende Analysen wären nötig, um ein besseres Verständnis der zellulären Mechanismen zu erhalten. Außerdem muss festgestellt werden, ob die Ergebnisse der Tierexperimente auf menschliche Zellen übertragbar sind. Schließlich könnte dies zur Entwicklung einer Präventionsmöglichkeit und eines neuen Therapieansatzes der akute Pankreatitis führen.

## **5. Zusammenfassung**

Die akute Pankreatitis beginnt in den exokrinen Azinuszellen des Pankreas und wird durch verschiedene, bisher nicht vollständig geklärte, intrazelluläre Vorgänge ausgelöst. Das Hormon Cholezystokinin stimuliert Signaltransduktionskaskaden, welche über eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts zu einer akuten Organentzündung führen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein über das Enzym RhoA vermittelter intrazellulärer Signalweg zu Aktin-bindenden Proteinen im Pankreas diese Reaktion hervorruft und durch Cholezystokinin reguliert werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bringen den Nachweis der Existenz der im Folgenden beschriebenen Signaltransduktionskaskade in exokrinen Azinuszellen: RhoA führt über eine Aktivierung von ROCK II zu einer Phosphorylierung der Zieluntereinheit MYPT1 der Myosinphosphatase und somit zu einer Hemmung des Gesamtzyms. Dadurch transloziert die sowohl in der Zytosol- als auch in der Zytoskelettfraction vorkommende, unphosphorylierte Form MYPT1 vollständig ins Zytosol. Die Myosinphosphatase führt zu einer Dephosphorylierung der MLC von Myosin. Die fast vollständig in der Zytoskelettfraction exprimierte phosphorylierte Form pMLC transloziert im dephosphorylierten Zustand ins Zytosol. Durch die Interaktion mit MYPT1 kann MLC zu einer Aktinmyosinkontraktion und somit zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts führen.

Über alternative Signalwege bewirkt RhoA eine Aktivierung von mDia, welches mittels Profilin zu einer Aktinpolymerisation führt. Über ROCK II wird eine Aktivierung der LIMK durch RhoA vermittelt. Dadurch wird Cofilin vermehrt phosphoryliert, wodurch die Depolymerisation der Aktinfilamente gehemmt wird. Durch eine dosis- und zeitabhängige Stimulation mit physiologischen und supraphysiologischen Dosierungen Cholezystokinin wird der Signalweg über RhoA gehemmt. Dadurch kann eine Kontraktion des Aktinzytoskeletts stattfinden und es zu einer Fusion von Vesikeln und zu einer Inhibierung des regulären Sekretionsmechanismus der Pankreaszellen kommen.

Da die Hemmung von Aktin-modulierenden Proteinen eine bedeutende Rolle bei der Organfunktion und Entwicklung der akuten Pankreatitis spielt, trägt diese Arbeit dazu bei, sowohl die physiologischen als auch die pathophysiologischen Vorgänge innerhalb der Azinuszellen näher zu charakterisieren. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der dieser Erkrankung zugrundeliegenden Mechanismen führen und somit einen therapeutischen Ansatz bei der akuten Pankreatitis darstellen.

## **6. Literaturverzeichnis**

Adamson, P., H. F. Paterson, et al. (1992). "Intracellular localization of the P21rho proteins." J Cell Biol. **119**(3): 617-27.

Adelstein, R. S. and M. A. Conti (1975). "Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity." Nature **256**(5518): 597-8.

Adler, G., B. C., et al. (1991). "Interaction of the cholinergic system and cholecystinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of the pancreatic secretion in humans." Gastroenterology **100**(2): 537-43.

Adler, G., G. Gerhards, et al. (1983). "Effects of in vivo cholinergic stimulation of rat exocrine pancreas." Am J Physiol **244**(6): G623-9.

Agnew, B. J., L. S. Minamide, et al. (1995). "Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site." J Biol Chem. **270**(29): 17582-7.

Alessi, D., L. K. MacDougall, et al. (1992). "The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1." Eur J Biochem. **210**(3): 1023-35.

Amano, M., M. Ito, et al. (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." J Biol Chem. **271**(34): 20246-9.

Bi, Y., S. Le Page, et al. (2005). "Rho and Rac promote acinar morphological changes, actin reorganization and amylase secretion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**: G561-G570.

Bissonnette, M., D. Kuhn, et al. (1989). "Purification and characterization of myosin light-chain kinase from the rat pancreas." Biochem J. **258**(3): 739-47.

Blinman, T. A., I. Gukovsky, et al. (2000). "Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase." Am J Physiol Cell Physiol **279**(6): C1993-2003.

Brady, M., S. Christmas, et al. (1999). "Cytokines and acute pancreatitis." Baillieres Best Pract Rev Clin Gastroenterol. **13**(2): 265-89.

Bragado, M. J., M. Tashiro, et al. (2000). "Regulation of the initiation of pancreatic digestive enzyme protein synthesis by cholecystinin in rat pancreas in vivo." Gastroenterology **119**(6): 1731-9.

Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose



and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal. Biochem. **112**: 195-203.

Burnham, D. B., H. D. Soling, et al. (1988). "Evaluation of myosin light chain phosphorylation in isolated pancreatic acini." Am J Physiol **254(1 Pt 1)**: G130-4.

Carrier, M. F. (1998). "Control of actin dynamics." Curr Opin Cell Biol. **10(1)**: 45-51.

Carrier, M. F. and D. Pantaloni (1997). "Control of actin dynamics in cell motility." J Mol Biol. **269(4)**: 459-67.

Castrillon, D. H. and S. A. Wasserman (1994). "Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene." Development **120(12)**: 3367-77.

Colburn, J. C., C. H. Michnoff, et al. (1988). "Sites phosphorylated in myosin light chain in contracting smooth muscle." J Biol Chem. **263(35)**: 19166-73.

Dechert, U. (2002). Gelelektrophoresen. Gentechnische Methoden. G. Schrimpf. Heidelberg; Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH. **3. Auflage**: 39-42.

Dugernier, T., P. F. Laterre, et al. (2005). "Compartmentalization of the protease-antiprotease balance in early severe acute pancreatitis." Pancreas **31(2)**: 168-73.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**: 629-35.

Feng, J., M. Ito, et al. (1999). "Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase." J Biol Chem. **274(52)**: 37385-90.

Fisher, S. A. and M. Ikebe (1995). "Developmental and tissue distribution of expression of nonmuscle and smooth muscle isoforms of myosin light chain kinase." Biochem Biophys Res Commun. **217**: 696-703.

Frey, A. (2002). Protein-Blotting und Nachweis membran-gebundener Proteine. Gentechnische Methoden. G. Schrimpf. Heidelberg; Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH: 343-360.

Fukata, Y., M. Amano, et al. (2001). "Rho- Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells." TRENDS in Pharmacological Science **22(No.1)**: 32-39.

Gong, M. C., K. Iizuka, et al. (1996). "Role of guanine nucleotide-binding proteins--ras-family or trimeric proteins or both--in Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1340-5.

Grady, T., A. Dabrowski, et al. (1996). "Stress-activated protein kinase activation is the earliest direct correlate to the induction of secretagogue-induced pancreatitis in rats." Biochem Biophys Res Commun. **227**(1): 1-7.

Grady, T., P. Liang, et al. (1997). "Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis." Gastroenterology **113**(6): 1966-75.

Gross, V., H. G. Leser, et al. (1993). "Inflammatory mediators and cytokines--new aspects of the pathophysiology and assessment of acute pancreatitis." Hepatogastroenterology **40**(6): 522-30.

Guerriero, V. J., D. R. Rowley, et al. (1981). "Production and characterization of an antibody to myosin light chain kinase and intracellular localization of the enzyme." Cell. **27**(3 Pt 2): 449-58.

Gutkind, J. S. and L. Vitale-Cross (1996). "The pathway linking small GTP-binding proteins of the Rho family to cytoskeletal components and novel signaling kinase cascades." Seminars in Cell and Developmental Biology **7**(5): 683-90.

Hall, A. (1994). "Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton." Ann. Rev. Cell Biol. **10**: 31-54.

Hartshorne, D. J., M. Ito, et al. (1998). "Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation." Journal of Muscle Research and Cell Motility **19**: 325-41.

Hofbauer, B., A. K. Saluja, et al. (1998). "Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats." Am J Physiol **275**: G352-62.

Ishizaki, T., Y. Morishima, et al. (2001). "Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1." Nature Cell Biology **3**: 8-14.

Ishizaki, T., M. Uehata, et al. (2000). "Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases." Molecular Pharmacology **57**: 976-83.

Ito, M., T. Nakano, et al. (2004). "Myosin phosphatase: structure, regulation and function." Molecular and Cellular Biochemistry **259**: 197-209.

Itoh, T., M. Ikebe, et al. (1989). "Effects of modulators of myosin light-chain kinase activity in single smooth muscle cells." Nature **338**(6211): 164-7.

Jacobson, G. and P. Karsnäs (1990). "Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer." Electrophoresis **11**: 46-52.

Johnson, D., P. Cohen, et al. (1997). "Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1 M that interact with the M21 subunit and with myosin." Eur J Biochem. **244**: 931-9.

Kawano, Y., Y. Fukata, et al. (1999). "Phosphorylation of Myosin-binding subunit (MBS) of Myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo." The Journal of Cell Biology **147**(5): 1023-37.

Kiehne, K., K. H. Herzig, et al. (2002). "CCK-stimulated changes in pancreatic acinar morphology are mediated by Rho." Digestion **65**(47-55).

Kimura, K., M. Ito, et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-8.

Koga, T., T. Koga, et al. (2006). "Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells." Exp Eye Res. **82**(3): 362-70.

Kricka, L. J. (1993). "Ultrasensitive immunoassay techniques." Clin. Biochem. **26**: 325-331.

Kusama, K., F. Nozu, et al. (2003). "Deactivation of ROCK-II by Y-27632 enhances basolateral pancreatic enzyme secretion and acute pancreatitis induced by CCK analogues." Biochem Biophys Res Commun. **305**(2): 339-44.

Lamarche, N. and A. Hall (1994). "GAPs for Rho related GTPases." Trends Genet. **10**: 436-40h.

Lampel, M. and H. F. Kern (1977). "Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue." Virchows Arch A Pathol Anat histol. **373**(2): 97-117.

Lappalainen, P., M. M. Kessels, et al. (1998). "The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module." Molecular Biology of the Cell **9**: 1951-9.

Lerch, M. M. and F. S. Gorelick (2000). "Early trypsinogen activation in acute pancreatitis." Med Clin North Am. **84**(3): 549-63.

Lerch, M. M., A. K. Saluja, et al. (1992). "Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells." Gastroenterology **103**(1): 205-13.

Leung, T., X.-Q. Chen, et al. (1996). "The p160 RhoA-Binding Kinase ROK $\alpha$  Is a Member of a Kinase Family and Is Involved in the Reorganization of the Cytoskeleton." Molecular and Cellular Biology **16**(No.10): 5313-27.

Leung, T., E. Manser, et al. (1995). "A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes." The Journal of Biological Chemistry **270**(49): 29051-54.

Louie, D. S., J. A. Williams, et al. (1985). "Action of pancreatic polypeptide on rat pancreatic secretion: in vivo and in vitro." Am J Physiol **249**: G489-95.

Madaule, P. and R. Axel (1985). "A novel ras-related gene family." Cell. **41**(1): 31-40.

Maekawa, M., T. Ishizaki, et al. (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." Science **285**(5429): 895-8.

McGough, A., B. Pope, et al. (1997). "Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function." J Cell Biol. **138**(4): 771-81.

Miyazaki, K., S. Komatsu, et al. (2006). "Dynamics of RhoA and ROK $\alpha$  translocation in single living cells." Cell Biochem Biophys. **45**(3): 243-54.

Mizuno, K., S. Naruse, et al. (2000). "Effects of an inhibitor of Myosin light chain kinase on amylase secretion from rat pancreatic acini." biochemical and Biophysical Research Communications **269**: 792-97.

Nagar, A. B. and F. S. Gorelick (2004). "Acute pancreatitis." Curr Opin Gastroenterol **20**: 439-43.

Narumiya, S., T. Ishizaki, et al. (2000). "Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632." Methods in Enzymology **325**: 273-84.

Niederau, C., R. Luthen, et al. (1994). "Effects of CCK on pancreatic function and morphology." Ann N Y Acad Sci. **713**: 180-98.

Nobes, C. and A. Hall (1994). "Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases." Curr Opin Genet Dev. **4**(1): 77-81.

O'Konski, M. S. and S. J. Pandol (1990). "Effects of Caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell." The Journal of Clinical investigation **86**: 1649-57.

O'Konski, M. S. and S. J. Pandol (1993). "Cholecystokinin JMV-180 and caerulein effects on the pancreatic acinar cell cytoskeleton." Pancreas **8**(5): 638-46.

- Okubo, S., M. Ito, et al. (1994). "A regulatory subunit of smooth muscle bound phosphatase." Biochem Biophys Res Commun. **200**(1): 429-34.
- Opie, F. (1901). "Etiology of acute hemorrhagic pancreatitis." Bull Johns Hopkins Hospital **12**: 182-5.
- Palade, G. (1975). "Intracellular aspects of the process of protein synthesis." Science **189**: 347-58.
- Pantaloni, D., C. Le Clairche, et al. (2001). "Mechanism of actin-based motility." Science **292**(5521): 1502-6.
- Perrie, W. T., L. B. Smillie, et al. (1973). "A phosphorylated light-chain component of myosin from skeletal muscle." Biochem J. **135**(1): 151-6.
- Pruyne, D., M. Evangelista, et al. (2002). "Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association." Science **297**(5581): 612-5.
- Ramlau, J. (1987). "Use of secondary antibodies for visualization of bound primary reagents in blotting procedures." Electrophoresis **8**: 398-402.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell. **70**(3): 389-99.
- Saluja, A., S. Hashimoto, et al. (1987). "Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis." Am J Physiol **253**(4 Pt 1): G508-16.
- Saluja, A. K., E. A. Donovan, et al. (1997). "Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B." Gastroenterology **113**(1): 304-10.
- Saluja, A. K., M. Saluja, et al. (1989). "Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **86**: 8968-71.
- Scheele, G. A. and G. E. Palade (1975). "Studies on the Guinea Pig Pancreas." The Journal of Biological Chemistry **250**(April 10): 2660-70.
- Schmidt, R. F. and G. Thews (1997). Physiologie des Menschen. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- Shimizu, H., M. Ito, et al. (1994). "Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase." J Biol Chem. **269**(48): 30407-11.

- Smith, L., Y. Su, et al. (1999). "Identification of a novel actin binding motif in smooth muscle Myosin light chain kinase." The Journal of Biological Chemistry **274**(41): 29433-38.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1994). "Signal transduction and regulation in smooth muscle." Nature **372**(6503): 231-6.
- Somylo, A. P. and A. V. Somylo (2000). "Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II." Journal of Physiology **522.2**: 177-85.
- Steer, M. (1997). "Pathogenesis of acute pancreatitis." Digestion **58**: 46-9.
- Steer, M. and J. Meldolesi (1987). "The cell biology of experimental pancreatitis." The New England Journal of Medicine **316**(3): 144-50.
- Steer, M. and A. Saluja (1993). "Experimental acute pancreatitis: studies of the early events that lead to cell injury." The Pancreas: Biology, Pathophysiology and Disease **2**. **New York Raven Press**: 489-99.
- Stull, J. T., L. C. Hsu, et al. (1990). "Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle." J Biol Chem. **265**(27): 16683-90.
- Stull, J. T., P. J. Lin, et al. (1998). "Myosin light chain kinase: functional domains and structural motifs." Acta Physiol Scand. **164**(4): 471-82.
- Tan, J. L., S. Ravid, et al. (1992). "Control of nonmuscle myosin by phosphorylation." Annu. Rev. Biochem. **61**: 721-59.
- Tansey, M. G., K. Luby-Phelps, et al. (1994). "Ca(2+)-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells." J Biol Chem. **269**(13): 9912-20.
- Torgerson, R. R. and M. A. McNiven (2000). "Agonist-induced changes in cell shape during regulated secretion in rat pancreatic acini." J Cell Physiol. **182**(3): 438-47.
- Totsukawa, G., Y. Yamakita, et al. (2000). "Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts." The Journal of Cell Biology **150**(4): 797-806.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

- Trinkle-Mulcahy, L., K. Ichikawa, et al. (1995). "Thiophosphorylation of the 130-kDa subunit is associated with decreased activity of myosin light chain phosphatase in alpha-toxin-permeabilized smooth muscle." J Biol Chem. **270**(31): 18191-4.
- Uehata, M., T. Ishizaki, et al. (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." Nature **389**(6654): 990-4.
- Watanabe, N., T. Kato, et al. (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." Nature Cell Biology **1**: 136-43.
- Watanabe, O., F. M. Baccino, et al. (1984). "Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis." Am J Physiol **246**(4 Pt 1): G457-67.
- Willemer, S., R. Bialek, et al. (1990). "Localization of lysosomal and digestive enzymes in cytoplasmatic vacuoles in caerulein-pancreatitis." Histochemistry **94**(2): 161-70.
- Williams, J. A. (2001). "Intracellular signaling mechanisms activated by Cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells." Annu. Rev. Physiol. **63**: 77-97.
- Williams, J. A. and D. J. McChesney (1987). "Cholecystokinin induces the interaction of its receptor with a guanine nucleotide binding protein." Regul Pept. **18**(2): 109-17.
- Yamaguchi, Y., T. Kimura, et al. (1989). "Activation of proteases in cerulein-induced pancreatitis." Pancreas **4**(5): 565-71.
- Yang, N., O. Higuchi, et al. (1998). "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." Nature **393**(6687): 809-12.

## **7. Lebenslauf**

### Angaben zur Person

Name : Martina Pinschke

Wohnort : Maximilianstrasse 20; 82319 Starnberg, Deutschland

Geburtsdatum/-ort : 07.02.1980 in Berlin, Deutschland

Nationalität : deutsch

Eltern : Dipl.-Kfm. Wilfried Pinschke, Steuerberater  
Ingrid Pinschke, geb. Becker, kaufmännische  
Angestellte

### Schulbildung

1986 – 1990 Grundschole am Tegelschen Ort in Berlin-Tegelort

1990 – 1996 Staatliche Ballettschule Berlin

1996 – 1999 Sophie-Charlotte-Oberschule in Berlin

### Hochschulbildung

04.2000 – 03.2003 Humboldt-Universität Berlin

04.2003 – 11.2006 Ludwig-Maximilians-Universität München

03.2002 Ärztliche Vorprüfung

03.2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

08.2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10.2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung



Praktisches Jahr

17.10.2005 – 05.02.2006 Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum Starnberg, Deutschland

06.02.2006 – 28.05.2006 Innere Medizin Kantonsspital Laufen, Schweiz

29.05.2006 – 17.09.2006 Chirurgie Kantonsspital Sursee/Wolhusen, Schweiz

Berufliche Tätigkeit

seit 10.01.2007 Assistenzärztin im Städtischen Krankenhaus München-Harlaching, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe

Promotion

08.2003 – 10.2004 Universitätsklinikum Großhadern, München, Labor PD Dr. Claus Schäfer

11.2004 Vortrag „Expression und Regulation von MLC und MYPT1 in exokrinen Azini“ auf der 25. Jahrestagung des Deutschen Pankreas-Clubs in Berlin

05.2005 internationale Prämierung mit höchster Punktzahl als „poster of distinction“ bei der Jahrestagung der amerikanischen Gesellschaft für Gastroenterologie in Chicago, USA

2006/2007 Werner-Creutzfeldt-Dissertationspreis der Ludwig-Maximilians-Universität München