

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

Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

Die Rolle von Cannabinoid 2 (CB2) - Rezeptoren bei der akuten Pankreatitis

- Untersuchungen am Mausmodell -

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von:

Thomas Michler

aus Friedrichshafen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Claus Schäfer
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Susanna Müller Priv. Doz. Dr. Max Schnurr
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. med. Martin Storr
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	29.07.2010

.....meinen Eltern, Inge und Gert Michler.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....

1 EINLEITUNG..... 1

1.1 EINFÜHRUNG..... 1

1.2 PANKREAS 2

 1.2.1 *Physiologie* 2

1.3 AKUTE PANKREATITIS 8

 1.3.1 *Ätiologie*..... 8

 1.3.2 *Klinik*..... 8

 1.3.3 *Pathophysiologie* 9

1.4 MITOGEN-AKTIVIERTE-PROTEIN-KINASEN (MAPK)13

 1.4.1 *c-jun n-terminale Kinase (JNK)*..... 14

 1.4.2 *p38-MAPK (p38)*..... 15

 1.4.3 *Hitze-Schock-Proteine (Hsp)* 16

1.5 CANNABINOIDE18

 1.5.1 *Cannabis sativa* 18

 1.5.2 *Endocannabinoid-System (ECS)* 19

 1.5.3 *Übersicht der Liganden*..... 26

1.6 GEGENSTAND DIESER ARBEIT29

2 METHODEN.....30

2.1 TIERMODELL30

 2.1.1 *Versuchsaufbau*..... 30

 2.1.2 *Versuchstiere*..... 31

 2.1.3 *injizierte Substanzen*..... 31

 2.1.4 *Versuchsablauf*..... 32

2.2 ENZYMAKTIVITÄTSMESSUNGEN.....34

 2.2.1 *Aktivität der Amylase im Serum* 34

 2.2.2 *aktiviertes Trypsin im Pankreas* 35

 2.2.3 *Aktivität der Myeloperoxidase in der Lunge* 37

2.3 INTERLEUKIN-6 MESSUNG38

2.4 HISTOLOGIE39

2.5 PANKREASÖDEM39

 2.5.1 *Pankreasgewicht-/Körpergewicht-Ratio*..... 39

 2.5.2 *Feucht-/Trockengewicht-Ratio*..... 40

2.6 WESTERNBLOT.....40

 2.6.1 *Aufbereitung der Proben*..... 41

 2.6.2 *Gelelektrophorese und Proteinnachweis* 42

 2.6.3 *Quantifizierung*..... 43

INHALTSVERZEICHNIS

2.7	PCR.....	44
2.7.1	Amplifikation	44
2.7.2	Detektion.....	45
2.7.3	Mixturen und Primer	45
2.8	IMMUNHISTOCHEMIE	45
2.9	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD	46
2.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG	47
2.11	SONSTIGES MATERIAL	48
2.11.1	Chemikalien.....	48
2.11.2	Geräte.....	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	REZEPTOR-NACHWEIS	51
3.1.1	RT-PCR.....	51
3.1.2	Westernblot.....	51
3.1.3	Immunhistochemie.....	52
3.2	TIERVERSUCHE	54
3.2.1	Versuche mit Wildtyp Mäusen	56
3.2.2	Versuche mit MK2-knockout Mäusen	66
4	DISKUSSION	70
4.1	ALLGEMEINE DISKUSSION	70
4.1.1	Akute Pankreatitis.....	70
4.1.2	Endocannabinoid-System (ECS)	71
4.2	SPEZIELLER TEIL	76
4.2.1	Kritische Auseinandersetzung mit den Experimenten.....	76
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse	77
4.2.3	CB2-Rezeptoren bei der akuten Pankreatitis.....	80
4.2.4	Rolle der Stresskinasen bei der Vermittlung der Wirkung des CB2-Rezeptors.....	81
4.3	AUSBLICK.....	83
4.3.1	weitere Fragestellungen	83
4.3.2	Studien am Menschen	84
4.4	ZUSAMMENFASSUNG	85
	LITERATURVERZEICHNIS.....	
	DANKSAGUNG	
	LEBENSLAUF	

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
0,9 % NaCl	0,9 % Natrium Chlorid - Lösung
2-AG	2-Arachidonoylglycerol
A	Ampère
Ach	Acetylcholin
AK	Antikörper
AMT	Anandamid membran transporter
Anandamid	N-Arachidonylethanolamin
APS	Ammonium Persulfat (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
ARDS	adult respiratory distress syndrome
BSA	bovines serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB1R / CB2R	Cannabinoid 1 - Rezeptor / Cannabinoid 2 - Rezeptor
CCK	Cholezystokinin
CCK1R / CCK2R	Cholezystokinin 1 - Rezeptor / Cholezystokinin 2 - Rezeptor
CNS / ZNS	zentrales Nerven System
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
DAGL a und b	Diacylglycerol selektive Lipase a und b
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
ECS	Endocannabinoid-System
EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent-Assay
EMT	Endocannabinoid-Membran-Transporter
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und andere
FAAH	Fettsäure-Amid-Hydrolase 1
g	Gramm
GPCR	G-protein coupled receptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
Hsp	Hitze-Schock-Protein
IAP	idiopathische akute Pankreatitis
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

JNK	c-jun n-terminale Kinase
kD	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Ki	Affinitätskonstante
KO	knockout
MAGL	Monoacylglycerollipase
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MK2 = MAPKAP-Kinase 2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MOPS	(3-N-Morpholino) propanesulfonic acid
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	Stückzahl
NAPE-PLD	N-Acyl-Phosphatidylethanolamine selektive Phosphodiesterase
NArPE	N-Acyl-Phosphatidylethanolamine
p38	p38-Map-Kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PEA	Palmitylethanolamid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Hydroniumionen [H ₃ O ⁺]
PKA	zyklisches AMP abhängige Protein Kinase A
PLA	Phospholipase
PMSF	phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	nuclear peroxisome proliferator activated receptor
PTPN22	Protein Tyrosin Phosphatase N22
raues ER	raues, endoplasmatisches Retikulum
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	receptor tyrosin kinase
S.E.M.	Standardfehler
Sap-1	serum response factor accessory protein-1
SBTI	soy bean trypsin inhibitor
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TAB	Trypsin assay buffer
TBST	Tris-buffered saline Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TRIS base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPV1	transient receptor potential vanilloid - Rezeptor 1
TWEEN 20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Einführung

„Von dieser Drüse fließt eine dem Speichel ähnliche Flüssigkeit in den Darm, die der Verbesserung der Verdauung dient.“ Dieses die exokrine Funktion des Pankreas beschreibende Zitat wird einem griechischem Anatom, Eudemos, bereits um das Jahr 300 v. Chr. zugeschrieben (Schirmer 1893; Howard and Hess 2002). Es erscheint umso erstaunlicher, da die vermutete Erstbeschreibung des Pankreas durch den griechischen Anatom und Chirurg Herophilus (335 - 280 v.Chr.) nur wenige Jahre zurücklag (Fitzgerald 1980). Fast 2 ½ Jahrtausende später hat die Aussage Eudemos immer noch Gültigkeit. Die Physiologie des Pankreas scheint weitgehend erforscht. Dies steht jedoch in starkem Kontrast zu der Tatsache, dass wir bis heute für eine seiner bedeutendsten Erkrankungen, der akuten Pankreatitis, keine spezifische Behandlungsform bzw. Prophylaxe kennen. Auch sind die pathophysiologischen Vorgänge, die zur Auslösung der Pankreatitis führen, zum Teil noch immer unklar.

In den letzten Jahrzehnten gab es große Fortschritte beim Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge, die zur Pankreatitis führen. Zum Beispiel wurde die zentrale Rolle der intrazellulären Zymogenaktivierung bewiesen, die Kolokalisationstheorie beschrieben sowie die Rolle der MAP-Kinasen und Hitzeschockproteine bei der akuten Pankreatitis gezeigt (Schafer and Williams 2000). Experimentelle Studien lassen auf mögliche neue Therapieformen aus diesen Erkenntnissen hoffen, bis jetzt konnte aber noch kein Modell wirksam auf den Menschen übertragen werden.

In einem anderen, sehr viel jüngeren Bereich der biomedizinischen Forschung kam es in den letzten Jahren zu bedeutenden Fortschritten: dem Endocannabinoidsystem (ECS): Dieses stellt ein aus mindestens zwei verschiedenen Rezeptor-Typen (Cannabinoid 1 und Cannabinoid 2-Rezeptoren) und zahlreichen endogenen Liganden bestehendes Informationssystem dar. Neben seinen physiologischen Aufgaben, deren Fülle sich uns gerade erst aufzudecken scheint, wurden einige Aspekte beschrieben, die in Hinblick auf die akute Pankreatitis hoffnungsvoll erscheinen. So besitzt das ECS und besonders der Cannabinoid 2-Rezeptor anti-

inflammatorische sowie analgetische Potenz (Burstein and Zurier 2009) und scheint die oben erwähnten MAP-Kinasen (Derkinderen, Ledent et al. 2001) zu beeinflussen. Mittlerweile wurde bereits der protektive Effekt des selektiven Cannabinoid 1-Rezeptor-Agonisten HU210 am Mausmodell der Pankreatitis beschrieben (Michalski, Laukert et al. 2007). Das therapeutische Potential des Cannabinoid 2-Rezeptors wurde hingegen noch nicht weiter untersucht.

Aufgrund dieser Tatsachen liegt es nahe, die Rolle von Cannabinoid 2-Rezeptoren bei der akuten Pankreatitis näher zu untersuchen. Im Weiteren sollen zuerst die Grundlagen des Pankreas (1.2), der akuten Pankreatitis (1.3), der MAP-Kinasen (1.4) und der Cannabinoide (1.5) erläutert, danach die verwendete Methodik (2) erklärt, die Ergebnisse (3) dargestellt und anschließend die Rolle der Cannabinoid 2-Rezeptoren bei der akuten Pankreatitis diskutiert werden (4).

1.2 Pankreas

Im Wesentlichen stellt das Pankreas eine exokrine und endokrine Drüse dar. Es liegt hinter dem Magen, retroperitoneal auf Höhe des zweiten Lendenwirbels am Boden des Omentum minus. Makroskopisch lässt sich das Pankreas in Drüsenläppchen untergliedern. Diese setzen sich wiederum aus kleinen Lobuli zusammen, die sich durch mehrere Gangverzweigungen in beerenförmige Endstücke, die Azini, aufteilen. Diese Azini stellen sowohl die morphologische als auch die funktionelle Grundeinheit des exokrinen Pankreas dar. Diffus im Pankreas verteilt liegen die Langerhans-Inseln. Sie stellen Zellagglomerate mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 bis 200 μm dar. Insgesamt sind dies ca. 1 bis 2 Millionen. Sie bilden etwa ein bis drei Prozent der Gesamtmasse des Pankreas.

1.2.1 Physiologie

Die Hauptaufgaben des Pankreas bestehen in der Synthese und Sekretion des für die Verdauung wichtigen Pankreassekrets und der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels mittels Hormonen. Histologisch und funktionell lassen sich ein endokriner und ein exokriner Anteil voneinander unterscheiden.

1.2.1.1 Endokrines Pankreas

Repräsentanten des endokrinen Pankreas sind die Langerhans-Inseln, in denen die Hormone Insulin, Glukagon, Somatostatin und das Pankreatische Polypeptid gebildet werden. Bei den pathophysiologischen Vorgängen der akuten Pankreatitis spielen

die endogenen Funktionen des Pankreas nach heutigem Kenntnisstand keine wesentliche Rolle. In der vorliegenden Arbeit soll deswegen nicht näher auf sie eingegangen werden.

1.2.1.2 Exokrines Pankreas

Neben den endokrinologischen Funktionen durch die Langerhans-Inseln erfüllt das Pankreas wichtige Funktionen für die Verdauung mit der Synthese und Sezernierung des Pankreassekrets. Diese bestehen in der Neutralisation des sauren pH-Wertes des Nahrungsbreis nach der Magenpassage und der Sezernierung von Enzymen für die Verdauung.

1.2.1.2.1 Histologischer Aufbau

Der exokrine Anteil des Pankreas ist eine rein seröse Drüse. Er macht 97 – 99 % der Gesamtmasse des Pankreas aus (Welsch 2003) und besteht aus tubuloazinären Endstücken (Azini), die ihr Sekret in ein umfangreiches Gangsystem abgeben.

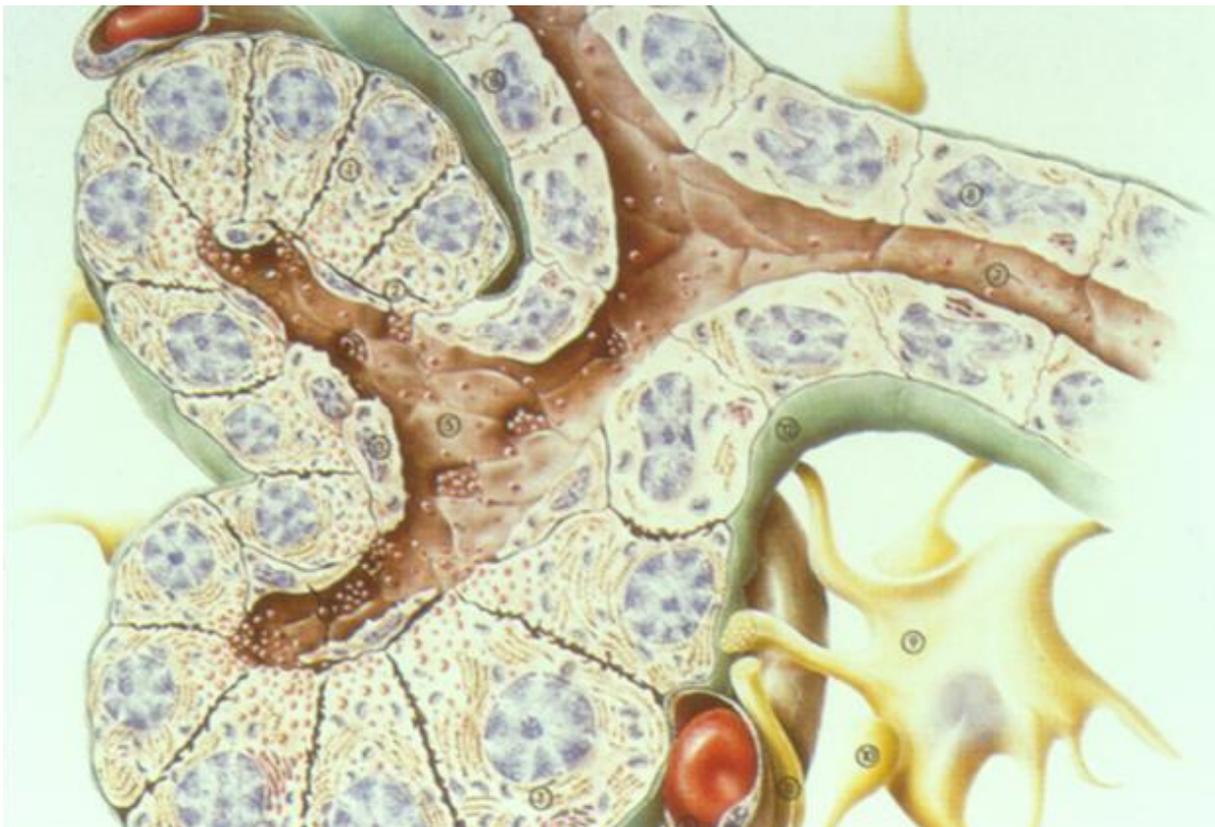


Abbildung 1: Darstellung eines Azinus

Die Azini sind aus den pyramidenförmigen Azinuszellen aufgebaut und begrenzen das Azinulumen mit ihrer mit Mikrovilli besetzten, apikalen Membran. Azinuszellen stellen typische proteinsezernierende Drüsenzellen mit einem großen, aktiven Zellkern, viel rauem ER, einem großen supranukleären Golgi-Apparat und apikal gelegenen, azidophilen Sekretionsgranula dar. Zwischen den Azini befinden sich Fibrozyten, zwischen denen eingebettet die Aufzweigungen der Blutgefäße und der Nerven verlaufen. Diese enden mit ihren Synapsen an der basalen Plasmamembran der Azinuszellen, wobei sie von deren Basallamina umhüllt werden.

1.2.1.2.2 Pankreassekret

Das menschliche Pankreas bildet am Tag ca. 1,5 l des Pankreassekrets. Dieses ist eine isotone Lösung mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 8,3 (Schwacha and Semmo 2006). Bicarbonat (HCO_3^-) macht den größten Anteil der Anionen aus, gefolgt vom Chlorid (Cl^-). Natrium (Na^+) und Kalium (K^+) stellen den Hauptteil der Kationen. Die Verdauungsenzyme setzen sich aus verschiedenen Protein- (Proteasen), Kohlenhydrat- (Amylase), Fett- (Lipase) und Nukleinsäure-spaltenden Enzymen (Nukleasen) zusammen. Die Hauptvertreter der Proteasen sind das Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und die Carboxypeptidase (Siegenthaler 2006).

1.2.1.2.3 Stimulation

Die Erforschung der Sekretionsmechanismen des exokrinen Pankreas läutete zu Beginn des 19. Jahrhunderts ein neues Zeitalter für das Verständnis der Physiologie ein. Pawlow stellte durch seine Versuche an Hunden fest, dass die Bauchspeicheldrüse schon beim Anblick von Essen durch einen über den Nervus Vagus vermittelten Reflex zur Sekretion angeregt wird, was ihn schlussendlich auch zur Beschreibung der Konditionierten Reflexe führte (Pawlov 1898; Pawlov 1901; Pawlov 1906). Bayliss und Starling beschrieben daraufhin 1902 die Herstellung eines Präparates aus Mukosa des Jejunums, welches auch nach Durchtrennung der nervalen Versorgung des Pankreas dieses zur Sekretion anregte, und nannten es Sekretin (Bayliss and Starling 1902). Drei Jahre später schlug Starling daraufhin erstmals den Begriff „Hormon“ für ähnliche körpereigene mit dem Blut transportierte fernwirkende Stoffe vor (Starling 1905). Einige dieser Präparate regten auch die Gallenblase zur Kontraktion an, woraufhin Ivy und Oldberg 1928 aus diesen eine Substanz, die für diese Wirkung verantwortlich gemacht werden konnte, isolierten und sie „Cholezystokinin“ nannten (Ivy and Oldberg 1928).

Heute wissen wir, dass sowohl die durch Pawlov beschriebenen muskarinergen, cholinergen Nerven (Dufresne, Seva et al. 2006) als auch die strukturell eng verwandten Hormone Sekretin (Gregory, Hardy et al. 1964) und Cholezystokinin (Mutt and Jorpes 1968; Dufresne, Seva et al. 2006) eine Rolle bei der Stimulation des exokrinen Pankreas spielen. Das exokrine Pankreas sezerniert sein Sekret auf zwei verschiedene Weisen: Sekretin stimuliert die Abgabe eines dünnflüssigen Elektrolyt und Bicarbonat reichen Sekretes (hydrokinetische Funktion) aus den Zellen des duktales Systems. Cholezystokinin (CCK) sowie muskarinerge, cholinerge

Stimulation führen zur Sezernierung der Verdauungsenzyme (ekbolische Funktion) aus den Azinuszellen (Siegenthaler 2006). Cholezystokinin wird von den I-Zellen des Duodenums und Jejunum gebildet und als Antwort auf die Nahrungsaufnahme ins Blut abgegeben. Seine Wirkung entfaltet es durch Stimulation spezifischer CCK Rezeptoren.

1.2.1.2.4 CCK-Rezeptoren

Die CCK-Rezeptoren (CCKR) gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Es existieren zwei Subtypen, CCK1R (Wank, Harkins et al. 1992) und CCK2R (Wank, Pisegna et al. 1992), wobei CCK1R spezifisch von Cholezystokinin (Gigoux, Escrieut et al. 1998), CCK2R in gleichem Maße von Gastrin aktiviert wird und von seiner Funktion als der „Gastrin Rezeptor“ begriffen werden kann (Dufresne, Seva et al. 2006).

Die CCK-Rezeptoren aktivieren in der Zelle zahlreiche Signalwege. Beschrieben ist unter anderem die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen c-jun n-terminale Kinase (JNK) (Dabrowski, Grady et al. 1996) und p38 (Schafer, Ross et al. 1998) durch CCK1-Rezeptoren (Dufresne, Seva et al. 2006).

Die Stimulation des exokrinen Pankreas zur Sekretion der Verdauungsenzyme geschieht beim Menschen wie auch beim Nager über die Aktivierung von CCK1-Rezeptoren (Cantor, Olsen et al. 1991). Es liegen widersprüchliche Studien zu der Lokalisation der CCK1-Rezeptoren auf den Azinuszellen vor. Beim Menschen lassen sie sich dort, im Unterschied zum Nager, nur in geringer Konzentration nachweisen. Unter anderem befinden sie sich jedoch auf abdominalen Ästen des afferenten Nervus Vagus und können so über einen vagalen Reflex vermittelt die Azinuszellen zur Sekretion anregen (Dufresne, Seva et al. 2006). Die Stimulation der Azinuszellen durch CCK scheint zumindest in physiologischen Dosen im Wesentlichen über diesen indirekten Weg zu geschehen (Adler, Beglinger et al. 1991; Beglinger, Hildebrand et al. 1992; Soudah, Lu et al. 1992; Owyang and Logsdon 2004). Die weitere Unterscheidung der CCK1R in Rezeptoren mit niedriger und hoher Affinität, welche unterschiedliche Wirkungen von CCK übermitteln, könnte Diskrepanzen früherer Studien erklären (Owyang and Logsdon 2004). Nach externer Gabe unnatürlich hoher Dosen CCK, wie in den hier beschriebenen Versuchen, ist jedoch zusätzlich eine direkte Wirkung an den Azinuszellen anzunehmen.

Neben der Regulierung der Proteinsynthese und vermehrter Bildung der Verdauungsenzyme sind auch morphologische Veränderungen der Azinuszelle nach CCK-Stimulation beobachtbar (Niederau, Luthen et al. 1994). So kommt es zum Umbau des Zytoskeletts (O'Konski and Pandol 1990) und zur Regulation des Zellwachstums (Povoski, Zhou et al. 1994; Feurle, Hamscher et al. 1995).

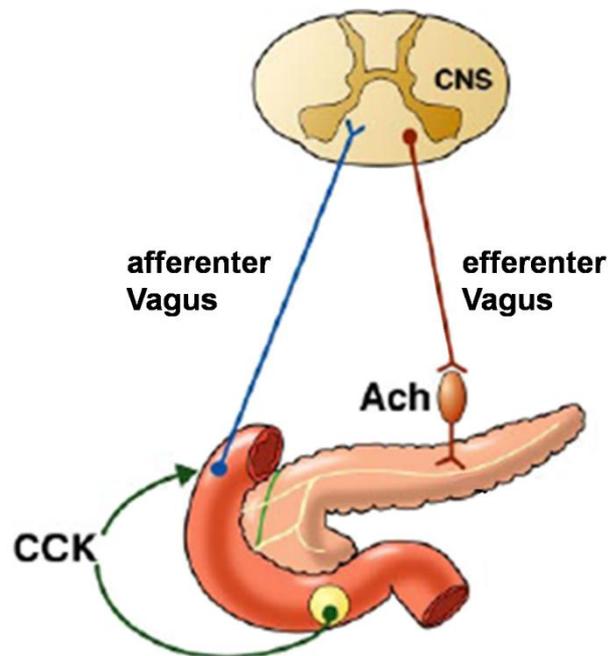


Abbildung 2: Wirkmechanismus physiologischer Dosen CCK auf die Sekretion der Azinuszellen (Modifiziert nach Dufresne, Seva et al. 2006)

Das in den I-Zellen des Duodenums gebildete CCK aktiviert CCK-Rezeptoren auf afferenten, vagalen Nerven. Über einen Reflex werden daraufhin die Azinuszellen zur Sekretion angeregt. (Ach = Acetylcholin; CNS = Zentrales Nerven System)

1.2.1.2.5 Sekretionsvorgang

Für das pathophysiologische Verständnis der akuten Pankreatitis ist besonders der Vorgang der Sekretion interessant, für dessen Charakterisierung George E. Palade 1974 den Nobelpreis für Medizin erhielt. Nach der Bildung der Verdauungsenzyme und lysosomaler Hydrolasen an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums werden diese zum Golgi-Apparat transportiert. Dort werden sie in Vakuolen verpackt, welche zu Zymogengranula mit einer höheren Konzentration der Enzyme heranreifen. Die Verdauungsenzyme und die Hydrolasen werden getrennt voneinander in verschiedenen Vakuolen transportiert und aufbewahrt, um ihre gegenseitige Aktivierung zu verhindern. Die Vesikeln mit den Verdauungsenzymen wandern zur apikalen Membran und entleeren ihren Inhalt per Exozytose in das Azinulumen (Palade 1975). Am apikalen Zellpol befinden sich Aktinmikrofilamente des Zytoskeletts, die dort das sogenannte „terminal web“ bilden und vermutlich an

der Exozytose der Zymogengranula beteiligt sind (Bendayan, Marceau et al. 1982; Drenckhahn and Mannherz 1983).

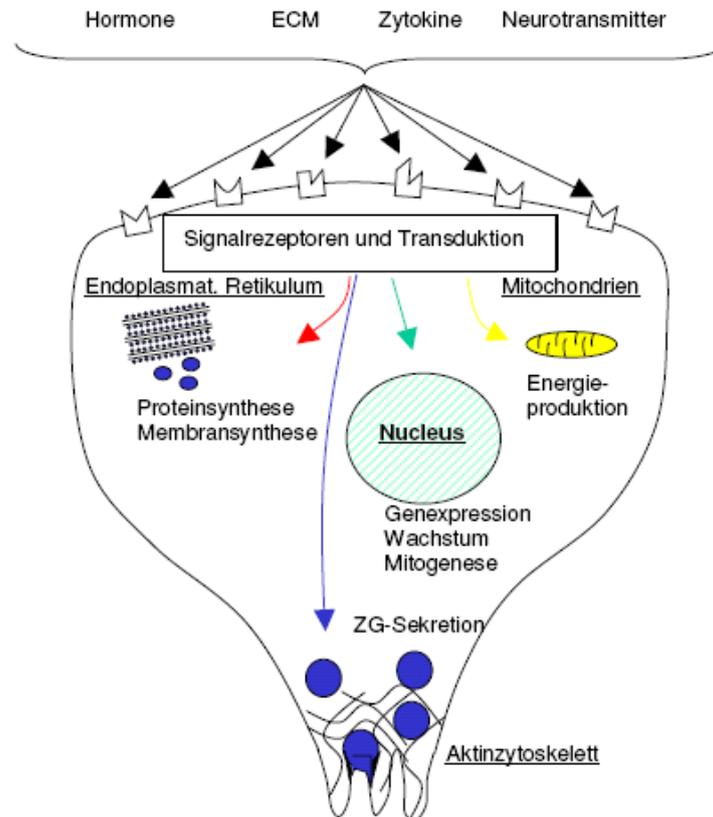


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionen einer Azinuszelle

Durch die Bindung der Liganden an den Rezeptoren der basalen Zellmembran werden verschiedene Signalwege aktiviert. Neben der Regulation der Proteinsynthese, der Energieproduktion, der Genexpression, des Wachstums und der Mitogenese wird auch die Sekretion der Verdauungsenzyme induziert. Am apikalen Zellpol bilden Aktinmikrofilamente das „terminal web“, welches vermutlich an der Sekretion beteiligt ist.

1.2.1.2.6 Autoprotektive Mechanismen

Die Azinuszelle ist darauf spezialisiert ein Sekret zur Verdauung von organischem Gewebe zu bilden. Um sich dabei vor der Selbstverdauung zu schützen, sind im Laufe der Evolution mehrere Mechanismen entstanden. Zum einen werden sämtliche Proteasen und die Phospholipase A in inaktiven Vorstufen, sogenannten Zymogenen (z.B. Trypsinogen), synthetisiert, in Vesikeln gespeichert und sezerniert. Zusätzlich bilden die Azinuszellen einen spezifischen Trypsininhibitor, welcher ca. 20 % der sich im Pankreas befindenden Trypsinaktivität (Teich, Ockenga et al. 2000) bindet und mit dem Trypsinogen sezerniert wird. Durch das Überangebot an aktiviertem Trypsin wird dieser im Duodenum inaktiviert (Schwacha and Semmo 2006). Weitere Schutzmechanismen sind zudem der für die Enzyme nichtoptimale pH-Wert in den Vesikeln sowie Proteasen, die aktivierte Verdauungsenzyme degradieren (Pandol, Saluja et al. 2007).

1.3 Akute Pankreatitis

Im Wesentlichen stehen drei Krankheiten des exokrinen Pankreas im Vordergrund: Dies sind die chronische und die akute Pankreatitis sowie das Pankreaskarzinom. Im Gegensatz zur chronischen Pankreatitis ist bei der akuten Pankreatitis nach dem Ausschalten der Auslöser bzw. Komplikation mit einer Ausheilung, ggf. mit morphologischen Defekten zu rechnen (Renz-Polster, Krautzig et al. 2004).

1.3.1 Ätiologie

Yadav und Lowenfels verglichen 12 europäische Longitudinalstudien zur Epidemiologie der akuten Pankreatitis. Die häufigsten Ursachen sind Gallensteine (10.8 - 56 %), Alkohol (3 - 66 %) sowie die idiopathische akute Pankreatitis (IAP) (8 - 44 %). Prädestinierendes Alter ist die 6. Lebensdekade. Die Inzidenz scheint zu steigen, vermutlich durch einen Anstieg der durch Alkohol und Gallensteine induzierten Pankreatitiden (Yadav and Lowenfels 2006). Die Gesamtmortalität beträgt ca. 5 %, wobei sie bei den Patienten mit nekrotisierender (17 %) höher ist als bei denen mit ödematöser (3 %) Pankreatitis. Allerdings haben weit mehr Patienten eine ödematöse Pankreatitis (85 % verglichen mit 15 % mit nekrotisierender Pankreatitis). Ist das nekrotische Gewebe wiederum infiziert, beträgt die Mortalität 30 % im Gegensatz zu 12 % (Banks and Freeman 2006).

Das Vorhandensein eines Organversagens spielt eine entscheidende Rolle für die Prognose der akuten Pankreatitis. Die Mehrzahl der frühen Tode (innerhalb der ersten zwei Wochen) werden einem Organversagen zugeschrieben und stellen zumindest die Hälfte der Gesamtmortalität (Banks and Freeman 2006). Patienten mit nekrotisierender Pankreatitis entwickeln weitaus häufiger ein Organversagen (50 % im Vergleich zu 5 - 10 % bei ödematöser Pankreatitis). Bei Patienten mit nekrotisierender Pankreatitis und fehlendem Organversagen beträgt die Mortalität nahezu 0 %. Versagt ein Organ, ist die Mortalität unter 10 %, versagen mehrere Organe, beträgt sie 35 % - 50 % (Yadav and Lowenfels 2006). Besonders das akute Lungenversagen (ARDS) stellt eine der Hauptursachen für die Mortalität bei der akuten Pankreatitis dar (Bhatia, Neoptolemos et al. 2001).

1.3.2 Klinik

Die Leitsymptome der akuten Pankreatitis sind abdominale Schmerzen und die Erhöhung der Amylase und Lipase im Blut. Typisch sind abrupt einsetzende heftige, dumpf empfundene Oberbauchschmerzen. Oft strahlen diese gürtelförmig in den

Rücken aus. Bei biliärer Genese können diese gleichzeitig von rechtsseitigen, ggf. kolikartigen Oberbauchschmerzen überlagert sein. Oft bestehen Übelkeit und Erbrechen (Renz-Polster, Krautzig et al. 2004). Bis heute existiert keine effektive spezifische Therapie der Pankreatitis. Die angewandten Therapieformen bestehen hauptsächlich aus supportiven sowie schmerzstillenden Maßnahmen. Dazu gehören eine adäquate Schmerztherapie, eine ausreichende parenterale Flüssigkeitszufuhr, parenterale Ernährung zur Schonung des exokrinen Pankreas und eventuell die Verhinderung von Infektionen nekrotischen Gewebes durch Antibiotikaprophylaxe.

1.3.3 Pathophysiologie

Bei der Pankreatitis spielen mehrere intra- sowie extrazelluläre Faktoren eine Rolle. Am Anfang des pathologischen Verlaufes stehen intrazelluläre Ereignisse in den Azinuszellen. Im Modell der Cerulein-Pankreatitis sind diese teilweise schon wenige Minuten nach Cerulein-Injektion nachweisbar: Dies sind ein erhöhter Kalziumspiegel, die Kolokalisation von lysosomalen und Verdauungsenzymen, die intrazelluläre Aktivierung von Verdauungsenzymen, der Zusammenbruch des Zytoskeletts mit einhergehender sekretorischer Blockade und die Bildung entzündlicher Mediatoren (DiMagno and DiMagno 2007). Im weiteren Verlauf spielen wahrscheinlich extrazelluläre Ereignisse die Hauptrolle: Es kommt zu Gefäßreaktionen bis hin zur Bildung von Nekrosen, Immigration von Entzündungszellen, Bildung inflammatorischer Zytokine bis hin zum SIRS und ARDS.

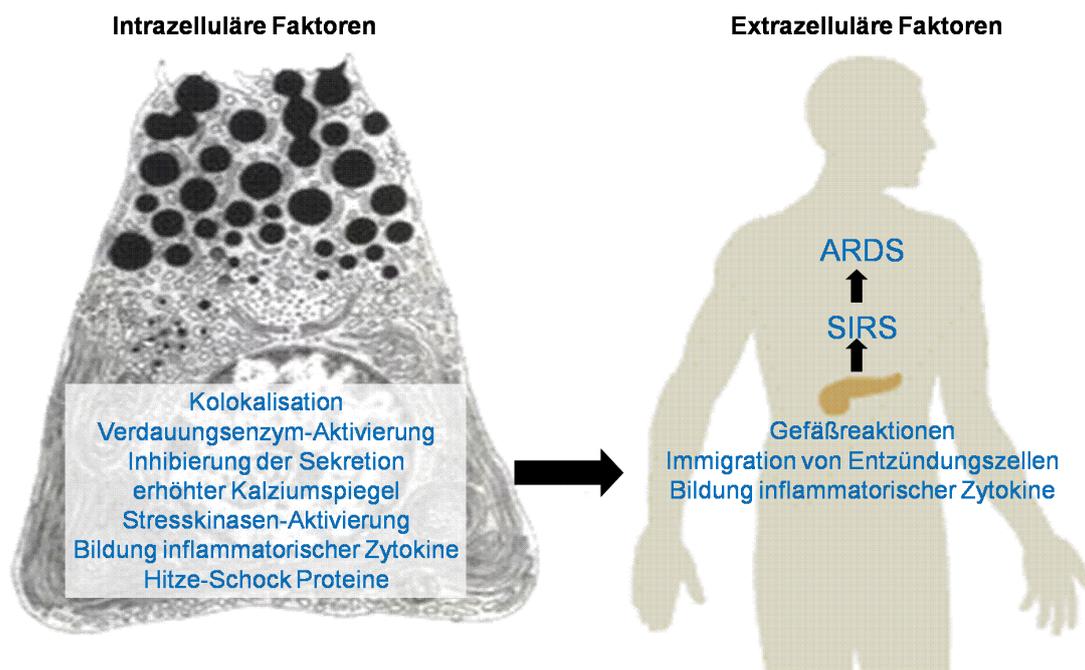


Abbildung 4: Übersicht der Geschehnisse bei der akuten Pankreatitis

1.3.3.1 Model der Autodigestion

Das Modell der Autodigestion bei der Pankreatitis besagt, dass es nach einer intrazellulären Aktivierung der Verdauungsenzyme zur „Selbstverdauung“ des Pankreas kommt. In der Tat konnte nachgewiesen werden, dass die intrazelluläre Aktivierung von Zymogenen ganz am Anfang der pathophysiologischen Vorgänge, lange vor dem Auftreten der anderen Kennzeichen der Pankreatitis, stattfindet (Bialek, Willemer et al. 1991; Luthen, Niederau et al. 1995; Mithofer, Fernandez-del Castillo et al. 1998). So lässt sich im Tiermodell bereits 10 Minuten nach dem Auslösen einer Pankreatitis eine Zymogenaktivierung im Pankreasgewebe nachweisen. Die anderen Merkmale der Pankreatitis wie das Auftreten einer erhöhten Vakuolisierung in den Azinuszellen, erhöhte Amylasewerte im Blut und ein Pankreasödem treten hingegen erst frühestens nach 30 Minuten auf (Grady, Saluja et al. 1996). Dies beweist, dass die intrazelluläre Zymogenaktivierung nicht als die Folge der Pankreatitis gesehen werden kann sondern vielmehr ganz am Anfang der pathophysiologischen Vorgänge eingeordnet werden muss. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass die Cerulein-induzierte Pankreatitis durch Vorbehandlung mit Protease Inhibitoren verbessert wird und den Schaden an den Azinuszellen lindert (Suzuki, Isaji et al. 1992; Grady, Mah'Moud et al. 1998; Saluja, Bhagat et al. 1999). Ein Modell zur Kausalität der Zymogenaktivierung stellt die Kolokalisationstheorie dar.

1.3.3.1.1 Kolokalisationstheorie

Die Kolokalisationstheorie besagt, dass zu einem frühen Zeitpunkt der Pankreatitis die Zymogene in das gleiche Organell mit den lysosomalen Enzymen wie zum Beispiel Cathepsin B kolokalisiert werden und durch diese aktiviert werden. Die Kolokalisierung von Lysosomen und Zymogengranula konnte durch subzelluläre Fraktionierung (Saluja, Hashimoto et al. 1987) und Immunolokalisationsstudien (Watanabe, Baccino et al. 1984) beobachtet werden. Die Kolokalisation hatte bereits nach 15 min, der gleichen Zeit, zu der auch die Trypsinaktivierung gemessen wurde, stattgefunden (Grady, Saluja et al. 1996). Die anderen mit der Pankreatitis einhergehenden Phänomene wie die Erhöhung des Amylasespiegels im Serum, das Pankreasödem und der Azinuszellschaden konnten erst später beobachtet werden. Die Kolokalisationstheorie konnte nicht nur in der Cerulein-induzierten Pankreatitis sondern auch in anderen Modellen der Pankreatitis beobachtet werden und könnte auch auf die Pankreatitis des Menschen anwendbar sein (Saluja, Saluja et al. 1989;

Hirano, Manabe et al. 1993; Hirano 1999). Zwar besitzt Cathepsin B ein pH-Optimum von 5 und damit am Ort der Kolokalisation bei einem neutralen pH nicht viel Aktivität. Jedoch haben Studien gezeigt, dass dies zur Aktivierung von Trypsinogen ausreicht (Greenbaum, Hirshkowitz et al. 1959; Figarella, Miszczuk-Jamska et al. 1988; Lerch, Saluja et al. 1993). Unterstützt wird dies durch die Feststellung, dass die Vorbehandlung mit zellgängigen Cathepsin-Inhibitoren die Aktivierung von Trypsinogen verhindert (Saluja, Donovan et al. 1997; Van Acker, Saluja et al. 2002). Die Rolle von Cathepsin B konnte auch durch Cathepsin B - knockout Mäuse bestätigt werden. So kam es zu einer um 80 % verminderten Trypsinaktivität. Die spezifische Inhibition von Cathepsin B verhindert zudem nicht die Kolokalisation jedoch die Aktivierung von Trypsin. Dies zeigt, dass die Zymogenaktivierung als Folge der Kolokalisation und nicht anders herum betrachtet werden muss (Van Acker, Weiss et al. 2007).

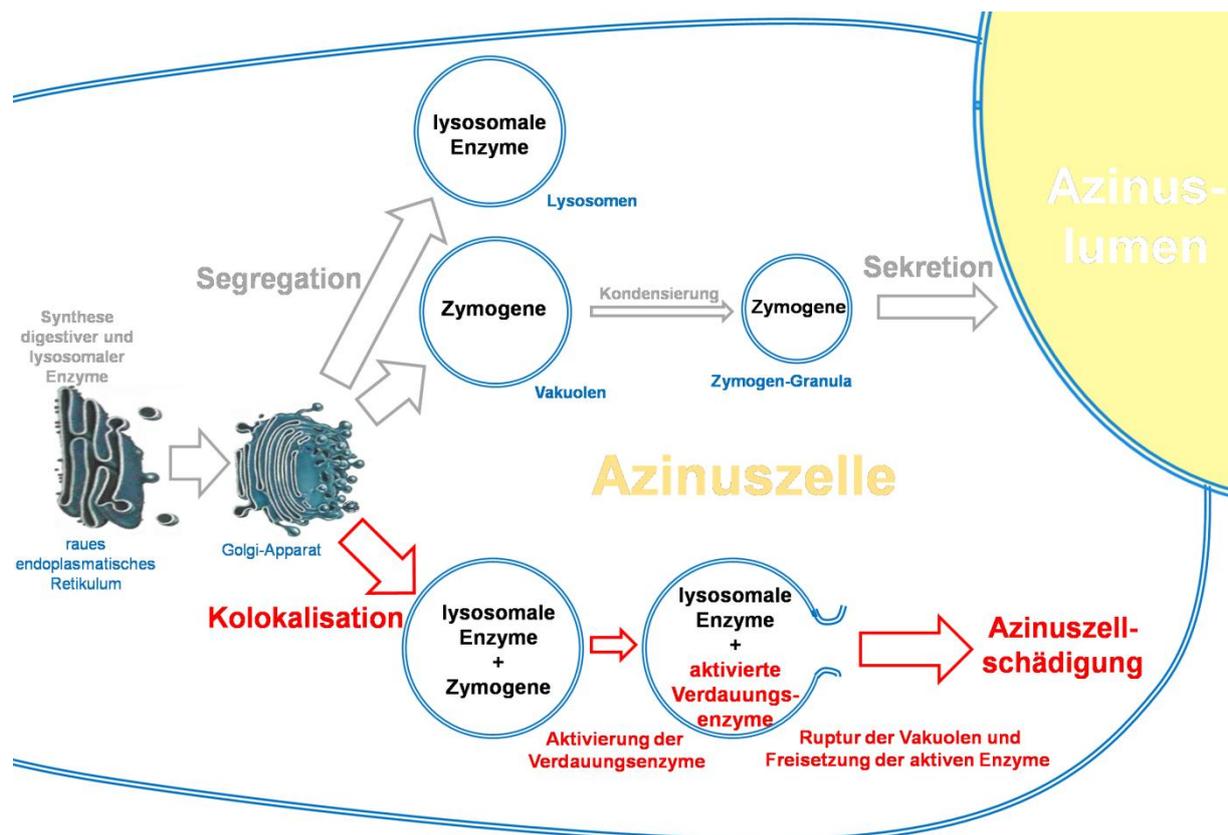


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kolokalisationstheorie

Die Verdauungsenzyme und lysosomalen Enzyme werden am rauen ER gebildet und in den Golgi-Apparat transportiert. Dort werden sie in Vakuolen getrennt voneinander verpackt. Die Vakuolen mit den Zymogenen kondensieren zu kleineren Zymogengranula höherer Dichte und werden am apikalen Zellpol ins Azinulumen sezerniert. Durch bisher unbekannte Vorgänge kommt es bei der Ausbildung der Pankreatitis zur Kolokalisation lysosomaler Enzyme und der Zymogene. Die Zymogene werden durch die lysosomalen Enzyme aktiviert. Es kommt zur Ruptur der Vakuolen, der Zerstörung des Zytoskeletts und der Blockade der Sekretion.

1.3.3.1.2 Erhöhte Kalziumspiegel

Intrazelluläres Kalzium stellt einen zentralen Baustein der Stimulus-Sekretionskopplung dar (Williams 2008). Zusätzlich ist Kalzium sowohl für die Aktivierung der Zymogene als auch zur Ausbildung einer Pankreatitis notwendig. Fragwürdig ist jedoch, ob ein erhöhter Kalziumspiegel an sich schon eine Pankreatitis auslösen kann. Obwohl es Befürworter dieser Theorie gibt (Raraty, Ward et al. 2000) sprechen einige Studien dafür, dass ein alleinig erhöhter Kalziumspiegel nicht zur Trypsinaktivierung ausreicht (Pandol, Saluja et al. 2007).

1.3.3.1.3 Hemmung der Sekretion

Wie oben beschrieben ist das Aktinskelett am Vorgang der Exozytose der Zymogengranula involviert. Während der Frühphase der Cerulein-induzierten Pankreatitis lässt sich eine Reorganisation und Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Azinuszelle beobachten (O'Konski and Pandol 1990; Jungermann, Lerch et al. 1995). Es kommt zur Blockade des intrazellulären Transportes und zum Ausbleiben der Exozytose (Lampel and Kern 1977).

1.3.3.2 Extrazelluläre Faktoren

Es wird davon ausgegangen, dass der Schweregrad der Pankreatitis durch Ereignisse bestimmt wird, die nach dem Azinuzellschaden auftreten.

1.3.3.2.1 Perfusionsstörungen

Unter anderem kommt es zum Auftreten von Makro- (Takeda, Mikami et al. 2005) und Mikrozirkulationsstörungen (Klar, Endrich et al. 1990; Bockman 1992; DiMagno, Williams et al. 2004), wobei den Mikroperfusionsstörung eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung von Nekrosen zuzuschreiben zu sein scheint (Pandol, Saluja et al. 2007).

1.3.3.2.2 Bildung inflammatorischer Mediatoren, SIRS und ARDS

Die Azinuszellen des Pankreas können in Stresssituationen selbstständig Zytokine synthetisieren und sezernieren (Pandol, Saluja et al. 2007). Van Acker konnte zeigen, dass die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 nicht als Folge der Zymogenaktivierung sondern als parallel verlaufendes Phänomen angesehen werden muss (Van Acker, Weiss et al. 2007). Durch die erhöhten Zytokinspiegel werden Entzündungszellen wie Makrophagen und Granulozyten rekrutiert, die wiederum weitere pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 usw. sowie anti-inflammatorische Faktoren wie IL-10 und IL-1-Rezeptor-Antagonisten

sezernieren (Makhija and Kingsnorth 2002). Im weiteren Verlauf können sich durch Einschwemmung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 in die Lunge und der daraus folgenden Einwanderung von Entzündungszellen ein Lungenschaden und ein akutes Lungenversagen (ARDS) entwickeln (Bhatia and Moochhala 2004; Puneet, Moochhala et al. 2005). Dabei stellt die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten ein entscheidendes pathologisches Ereignis dar (Frossard, Saluja et al. 1999). Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten lässt sich im Tierversuch durch Messung der Aktivität der Myeloperoxidase im Lungengewebe quantifizieren (Siehe Abschnitt 2.2.3.).

1.4 Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK)

Die Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) gehören zur Gruppe der Serin/Threonin-Protein-Kinasen. Sie stellen intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden dar und kommen in einer Vielzahl eukaryotischer Zellen von der Hefe bis hin zum Säugetier vor. Es werden drei Untergruppen unterschieden:

- extrazellular-signal-regulated kinases (ERK): Die wichtigsten Vertreter, Erk 1 und Erk 2 sind auch nach ihrem Molekulargewichten von 42 bzw. 44 kD als p42/p44 bekannt (Boulton, Yancopoulos et al. 1990)
- c-Jun N-terminale Kinasen (JNK): Sie sind nach der Fähigkeit, den Transkriptionsfaktor c-Jun zu aktivieren (Hibi, Lin et al. 1993; Derijard, Hibi et al. 1994; Kyriakis, Banerjee et al. 1994) benannt.
- p38: Ist nach ihrem Molekulargewicht von 38 kD (Han, Lee et al. 1994; Lee, Laydon et al. 1994; Rouse, Cohen et al. 1994) benannt.

Aktiviert werden sie durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone und Stressoren und kontrollieren Prozesse wie Zellwachstum und Differenzierung, Inflammation und Apoptose (Xia, Dickens et al. 1995). Ihre Funktionen variieren jedoch in den verschiedenen Spezies und sogar in den verschiedenen Zelltypen eines Gewebes (Schafer and Williams 2000).

Gemeinsam ist den MAP-Kinasen, dass das Signal durch jeweils drei in Serie geschaltete Proteinkinase weitergegeben wird. Die Aktivierung geschieht dabei durch duale Phosphorylierung von Thyrosin- und Threonin-Resten. Die MAP-Kinasen

(p38, JNK und Erk) werden durch die MAPK-Kinasen (MAPKK) phosphoryliert, diese wiederum durch die MAPKK-Kinasen (MAPKKK). Initiiert wird die Signalkaskade durch die Aktivierung der MAPKKK durch sogenannte „kleine GTPasen“ (small guanosin triphosphat (GTP) binding proteins) der Ras-Superfamilie (Minden and Karin 1997). Diese stellen den molekularen Schalter der Signalkaskade dar und sind eng mit der Zellmembran assoziiert. Sie können entweder durch zelluläre Stressoren direkt oder durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche in ihren aktiven Zustand überführt werden. Hierfür sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Wan, Kurosaki et al. 1996), Integrine (Lin, Aplin et al. 1997) und Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) (Marshall 1995) beschrieben. Die MAP-Kinasen (p38, JNK, Erk1/2) geben das Signal auf verschiedene Weisen weiter. Zum einen phosphorylieren und damit aktivieren sie diverse Kinasen im Zytosol der Zelle, zum anderen tragen sie die Information auch in den Zellkern, indem sie in den Zellkern translozieren (Chen, Sarnecki et al. 1992; Raingeaud, Gupta et al. 1995; Kallunki, Deng et al. 1996) und bestimmte Transkriptionsfaktoren aktivieren.

Im Gegensatz zu den ERK, welche hauptsächlich durch Hormone und Wachstumsfaktoren aktiviert werden, werden JNK und p38 durch pro-inflammatorische Zytokine (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Lipopolysaccharide (Raingeaud, Gupta et al. 1995) und Stressoren wie UV-Strahlung (Radler-Pohl, Sachsenmaier et al. 1993), Hyperosmolarität und Hitzeschock (Davis 1994; Karin 1995; Haussinger, Schliess et al. 1999) aktiviert, weswegen sie auch Stress-aktivierte-Protein-Kinasen (SAPK) oder „Stresskinasen“ genannt werden. P38 (Schafer, Ross et al. 1998; Wagner, Metzler et al. 1999) und die JNK (Dabrowski, Grady et al. 1996; Schafer and Williams 2000) spielen eine Rolle in der Pathologie der akuten Pankreatitis und der vorliegenden Arbeit. Deswegen sollen sie im Folgenden näher dargestellt werden.

1.4.1 c-jun n-terminale Kinase (JNK)

Die Hauptaufgabe der JNK scheint die Auslösung der Inflammation und der Apoptose zu sein (Xia, Dickens et al. 1995; Robinson and Cobb 1997; Ip and Davis 1998). Die JNK-Signalkaskade wird durch die GTPasen Cdc42, Rac1 und Rho initiiert (Coso, Chiariello et al. 1995; Teramoto, Coso et al. 1996; Teramoto, Crespo et al. 1996). Diese aktivieren die MAPKK-Kinasen MEKK1-5, MLK2/3, ASK1, TAK und Tpl2 (Minden, Lin et al. 1994; Yan, Dai et al. 1994; Derijard, Raingeaud et al.

1995; Liu, Gorospe et al. 1995; Fanger, Gerwins et al. 1997; Gerwins, Blank et al. 1997), welche wiederum die MAPK-Kinasen MKK4 und MKK7 aktivieren (Tournier, Whitmarsh et al. 1997; Wu, Wu et al. 1997). Es existieren drei verschiedene Isoformen der JNK (JNK1/2/3). Diese phosphorylieren unter anderem c-jun, c-fos und das „serum response factor accessory protein-1“ (Sap-1).

Die JNK wird auch in den Azinuszellen des Pankreas exprimiert und im Tiermodell der Cerulein-induzierten Pankreatitis ist ihre Phosphorylierung eines der ersten beobachtbaren Phänomene (Duan and Williams 1994; Dabrowski, Grady et al. 1996; Grady, Dabrowski et al. 1996). Wagner et al konnten zeigen, dass die Inhibition der JNK durch den spezifischen Inhibitor CEP-1347 den Verlauf der Cerulein-induzierten Pankreatitis verbessert (Wagner, Mazzucchelli et al. 2000), was auf eine pro-inflammatorische Rolle der JNK bei der Pankreatitis hinweist.

1.4.2 p38-MAPK (p38)

Cdc42 ist als beteiligte GTPase der p38-Signaltransduktionskette bekannt (Bagrodia, Derijard et al. 1995) und aktiviert vier parallel geschaltete MAPKKK. Diese sind ASK1, TAK, MLK2 und MEKK1 (Ichijo, Nishida et al. 1997), die wiederum drei MAPK-Kinasen, K3, MKK4 und MKK6 aktivieren (Derijard, Raingeaud et al. 1995; Liu, Gorospe et al. 1995; Han, Lee et al. 1996; Raingeaud, Whitmarsh et al. 1996; Stein, Brady et al. 1996). Als nächste Stufe (MAPK) werden vier verschiedene Isoformen von p38 (α , β , γ und δ) (Widmann, Gibson et al. 1999) aktiviert, welche mehrere Wirkungen vermitteln. Bekannte Substrate für p38 sind die Kinasen Mnk1/2 (Fukunaga and Hunter 1997; Waskiewicz, Flynn et al. 1997) und MAPKAPK-2/3 (MK2/3) (Freshney, Rawlinson et al. 1994; Rouse, Cohen et al. 1994; McLaughlin, Kumar et al. 1996) sowie die Transkriptionsfaktoren CREB, ATF-1 (Tan, Rouse et al. 1996), ATF-2 (Raingeaud, Whitmarsh et al. 1996), CHOP (Wang and Ron 1996) und MEF-2C (Han, Jiang et al. 1997).

MK2 befindet sich im Nukleus und transloziert nach Aktivierung durch p38 ins Zytosol (Engel, Kotlyarov et al. 1998). Dort aktiviert es unter anderem das Hitze-Shock-Protein 27 (Hsp 27) (Stokoe, Engel et al. 1992), welches zur Regulierung des Aktinskeletts beiträgt (Miron, Vancompernelle et al. 1991) (Näheres zu Hsp 27 in Abschnitt 1.4.3). MK2 ist zudem ein notwendiges Element in der Regulation der Zytokin-Sekretion (Kotlyarov, Neininger et al. 1999).

Auch p38 spielt eine Rolle bei der Auslösung der Apoptose (Graves, Draves et al. 1996; Brenner, Koppenhoefer et al. 1997; Kawasaki, Morooka et al. 1997; Kummer, Rao et al. 1997) und induziert die Bildung einiger pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF- α (Lee, Laydon et al. 1994; Brook, Sully et al. 2000) und IL-6 (Beyaert, Cuenda et al. 1996). Zudem induziert p38 die Proliferation von T-Zellen (Crawley, Rawlinson et al. 1997) und verstärkt die Stress-induzierte Transkription von c-jun und c-fos in Fibroblasten (Hazzalin, Cano et al. 1996).

Die p38-MAPK wird auch in den Azinuszellen exprimiert und ihre Aktivierung ist eines der ersten beobachtbaren intrazellulären Phänomene nach Stimulation durch CCK (Wagner, Metzler et al. 1999). Schäfer et al. zeigten, dass p38 an den durch CCK verursachten Veränderungen des Aktinzytoskeletts beteiligt ist (Schafer, Ross et al. 1998). Jedoch ist die Rolle von p38 bei der akuten Pankreatitis nicht so eindeutig wie die der JNK. Sie aktiviert teils pro-, teils anti-inflammatorische Mechanismen. Die Beobachtung, dass die Inhibition von p38 mit dem spezifischen Inhibitor SB203580 den Verlauf der Pankreatitis verschlechtert (Fleischer, Dabew et al. 2001), lässt auf einen überwiegend protektiven Einfluss schließen. Speziell die durch p38 aktivierte Kinase MK2 vermittelt teils pro-, teils anti-inflammatorische Effekte. Zum einen führt die MK2-Aktivierung zur Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α (Kotlyarov, Neiningen et al. 1999) und IL-6 (Beyaert, Cuenda et al. 1996; Kotlyarov, Neiningen et al. 1999). Zum anderen aktiviert MK2 das Hsp 27 (Freshney, Rawlinson et al. 1994; Rouse, Cohen et al. 1994; Wang and Ron 1996; Groblewski, Grady et al. 1997), welches sich abmildernd auf die Pankreatitis auswirkt (Schafer, Clapp et al. 1999; Kubisch, Dimagno et al. 2004). MK2-knockout Mäuse (MK2 $-/-$) reagieren auf Stimulation durch CCK zum einen mit drastisch verminderten Anstiegen von TNF- α und IL-6 und mit dem Ausbleiben der Phosphorylierung von Hsp 27 (Tietz, Malo et al. 2006).

1.4.3 Hitze-Schock-Proteine (Hsp)

In Stresssituationen produzieren Zellen sogenannte Hitze-Schock-Proteine (Hsp), die sie vor toxischen Einflüssen schützen (Jacquier-Sarlin, Fuller et al. 1994). Diese stellen molekulare Chaperone dar, die den Proteinen helfen, während der Stresssituation in ihrer für ihre Funktion notwendigen Struktur zu verweilen (Ellis 1987; Schlesinger 1990; Craig, Weissman et al. 1994; Schafer and Williams 2000). Im Pankreas werden sie durch Stressoren wie Hitzeschock, Wassereinstrom,

Hyperosmolarität, Chemikalien oder supramaximalen Dosen CCK (Groblewski, Grady et al. 1997; Schafer, Ross et al. 1998) aktiviert (Pandol, Saluja et al. 2007). Nach Injektion von Cerulein werden verstärkt HSP 27 (Groblewski, Grady et al. 1997; Schafer, Clapp et al. 1999), HSP 60 und HSP 70 (Otaka, Okuyama et al. 1997) in den Azinuszellen gebildet. Die HSP schützen die Zellen und lindern den Verlauf der Pankreatitis ab (Wagner, Weber et al. 1996; Lee, Bhagat et al. 2000; Weber, Wagner et al. 2000; Bhagat, Singh et al. 2002). Hsp 27 wird indirekt durch p38 (Guay, Lambert et al. 1997) über MK2 vermittelt, aktiviert (Stokoe, Campbell et al. 1992; Stokoe, Engel et al. 1992). Hsp 27 agiert als ein molekulares Chaperon, indem es die Faltung von teilweise denaturierten Proteinen in ihre aktiven Konformationen erleichtert (Jakob, Gaestel et al. 1993; Knauf, Jakob et al. 1994). Zusätzlich können sich kleine Oligomere oder Monomere von Hsp 27 (Welsh and Gaestel 1998) am Zytoskelett anlagern und die Aktinpolymerisation hemmen (Miron, Vancompernelle et al. 1991; Lavoie, Hickey et al. 1993; Benndorf, Hayess et al. 1994; Huot, Houle et al. 1996). Auf diese Weise stabilisiert Hsp 27 die Mikrofilamente der Zellen gegen verschiedene Stressoren. Die Überexpression von Hsp 27 schützt vor Cerulein-induzierter Pankreatitis (Kubisch, Dimagno et al. 2004). Auch bei den durch CCK-Stimulation verursachten Veränderungen des Zytoskeletts spielt Hsp 27 eine Rolle (Schafer, Ross et al. 1998). Die Hauptaufgabe scheint dabei im Erhalt der für die Funktion der Zelle notwendigen Struktur der Aktinfilamente zu bestehen (Schafer, Clapp et al. 1999; Kubisch, Dimagno et al. 2004). Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der Funktionen der Stresskinasen p38 und JNK in der Azinuszelle.

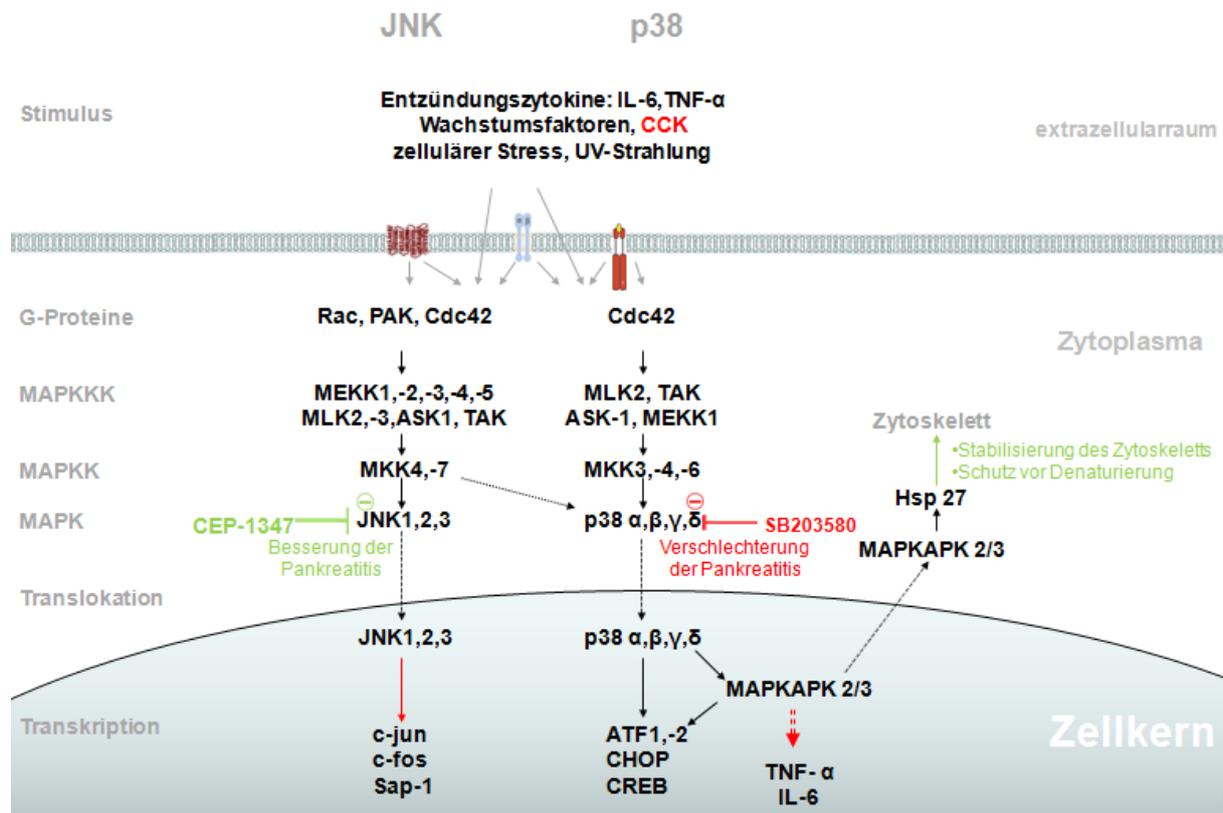


Abbildung 6: Übersicht über die Funktionen der Stresskinasen p38 und JNK in der Azinuszelle

Die Stresskinasen p38 und JNK werden bei der Pankreatitis verstärkt aktiviert. Die JNK aktiviert die Transkriptionsfaktoren c-jun, c-fos und Sap-1. Die Inhibition durch den spezifischen Hemmstoff CEP-1347 mildert die Pankreatitis ab, was für eine pro-inflammatorische Rolle der JNK spricht. Die p38 MAP-Kinase vermittelt sowohl protektive als auch pro-inflammatorische Effekte, wobei die protektiven Effekte zu überwiegen scheinen, da die Inhibition durch den spezifischen Hemmstoff SB203580 zur Verstärkung der Pankreatitis führt. Unter anderem werden diese Effekte durch die downstream Kinase MAPKAPK 2 (MK2) vermittelt. Diese sind die Stabilisierung des Zytoskeletts und der Schutz vor Denaturierung verschiedener Proteine durch die Aktivierung von Hsp 27 und die Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6.

1.5 Cannabinoide

Cannabinoide erhielten ihren Namen von den natürlichen Wirkstoffen (Phytocannabinoide) der Hanfpflanze (*Cannabis sativa*). Zu Ihnen zählen neben diesen auch körpereigene Signalstoffe, die Endocannabinoide sowie synthetisch hergestellte Wirkstoffe.

1.5.1 Cannabis sativa

Die Hanfpflanze (*Cannabis sativa*) ist eine der am längsten vom Menschen kultivierten Pflanzen. Es gibt Hinweise durch Radiokohlenstoff-Datierungen, dass *Cannabis sativa* schon vor ca. 6000 Jahren in China vom Menschen zur Herstellung von Seilen, Öl und als Nahrungsmittel genutzt wurde (Li 1973). Der erste bekannte medizinische Einsatz von *Cannabis* wurde mündlich aus dem 28. Jahrhundert v. Chr. übermittelt. Kaiser Shen-Nung soll damit Krankheiten wie Beriberi und Malaria behandelt haben (Russo 2004).

Trotz der langen Geschichte des Hanfs als Therapeutikum und Droge wurden seine Wirkstoffe verhältnismäßig spät entdeckt. Zwar gelang es zu Beginn des 20. Jahrhunderts, Wirkstoffe der Cannabispflanze zu isolieren (Adams 1940). Es dauerte allerdings bis 1963 bzw. 1964 bis die Hauptwirkstoffe, Cannabidiol (Mechoulam and Shvo 1963) und δ -9-THC (Gaoni 1964), in ihrer Struktur endgültig entschlüsselt werden konnten. Heute sind über 60 pflanzliche Cannabinoide bekannt (EISOhly 2002). Zu den Strukturformeln der Phytocannabinoide gibt Abbildung 10 Auskunft.

1.5.2 Endocannabinoid-System (ECS)

1.5.2.1 Rezeptoren

Aufgrund ihrer starken Fettlöslichkeit wurde zuerst eine unspezifische Penetration der Zellmembranen als Wirkmechanismus der Cannabinoide angenommen. Durch die synthetische Herstellung der Cannabinoide und ihrer Enantiomere konnte jedoch beobachtet werden, dass ihre Aktivität von ihrer stereochemischen Struktur abhängig ist, das heißt, dass die verschiedenen Enantiomere unterschiedlich starke Wirkungen hervorrufen, was einen spezifischeren Wirkmechanismus nahe legt (Mechoulam, Lander et al. 1980; Mechoulam, Lander et al. 1987). 1988 konnte dann ein spezifischer Bindungsort im Gehirn von Ratten identifiziert (Devane, Dysarz et al. 1988) und 1990 das heute als CB1-Rezeptor bekannte Protein geklont werden (Matsuda, Lolait et al. 1990). Drei Jahre später konnte ein Protein mit teilweise homologen Abschnitten geklont werden (Munro, Thomas et al. 1993), welches sich als zweiter Cannabinoid-Rezeptor (CB2-Rezeptor) herausstellte.

Der CB1- und der CB2-Rezeptor gehören beide zur Rhodopsin-Untergruppe der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren. Ihre Proteinstrukturen sind nur zu 44 % identisch (Bei den anderen Rezeptor-Untergruppen sind es durchschnittlich 70 - 80 % Identität (Howlett, Barth et al. 2002)). An der extrazellulär gelegenen Bindungsstelle für die Liganden sind die Proteinsequenzen zu 68 % identisch. Die CB1-Rezeptoren der Maus und des Menschen besitzen zu 97 – 99 % identische Aminosäuresequenzen (Howlett, Barth et al. 2002). Die CB2-Rezeptoren der Maus und des Menschen sind nur zu 82 % identisch (Shire, Calandra et al. 1996; Howlett, Barth et al. 2002). Beide Rezeptoren bestehen aus sieben transmembranösen Domänen mit jeweils drei intra- und extrazellulären Schleifen und sind intrazellulär an ein G-Protein gekoppelt.

1.5.2.2 Wirkungen an nicht-CB1-, nicht-CB2-Rezeptoren

Die Komplexität des Endocannabinoid-Systems scheint sich uns gerade erst zu offenbaren. So wurden neben den CB1- und CB2-Rezeptoren diverse andere Wirkmechanismen für die gängigen Cannabinoide beschrieben (Kreitzer and Stella 2009). Die Vielfalt der beschriebenen Wirkungen soll am Beispiel von Anandamid, einem körpereigenem Cannabinoid, dargestellt werden: So wurde beschrieben, dass Anandamid Serotonin- (Kimura, Ohta et al. 1998; Xiong, Hosoi et al. 2008) und Glyzinrezeptoren (Lozovaya, Yatsenko et al. 2005) sowie muskarinerge (Christopoulos and Wilson 2001) und nikotinerge (Oz, Ravindran et al. 2003) Acetylcholinrezeptoren aktiviert. Anandamid hemmt zudem verschiedene Typen von Kalzium- und Kaliumkanälen (Oz 2006) und fungiert als Agonist am Vanilloid Rezeptor 1 (TRPV1) (Zygmunt, Petersson et al. 1999; Smart, Gunthorpe et al. 2000), einem nichtselektivem Kationenkanal der Familie der „sechs-transmembranösen-Domänen transient Rezeptor Potential“ (TRP) Kanäle. Durch Versuche mit TRPV1-knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass zumindest einige der pharmakologischen Effekte von Anandamid durch TRPV1 vermittelt werden (Pacher, Batkai et al. 2004). Anandamid aktiviert zusätzlich den nuclear-peroxisome-proliferator-activated-Rezeptor (PPAR) α (Sun, Alexander et al. 2006) und γ (Bouaboula, Hilairet et al. 2005). PPAR sind eine sich im Zellkern befindliche Rezeptorklasse, die die Expression verschiedener Gene zur Regulation des Metabolismus und der Immunantwort kontrollieren (O'Sullivan, Randall et al. 2007).

In letzter Zeit verdichten sich zudem die Hinweise, dass das bisher als „Waisen“-Rezeptor bekannte Protein GRP55 als Cannabinoid-Rezeptor angesehen werden muss (Pertwee 2002; Ryberg, Larsson et al. 2007; Lauckner, Jensen et al. 2008). GRP55 befindet sich sowohl im ZNS als auch in peripheren Organen und zeigt wenig Homologie mit den CB1- oder CB2-Rezeptoren (De Petrocellis and Di Marzo 2009). Es liegen jedoch widersprüchliche Daten hinsichtlich der Wirkungen der einzelnen Cannabinoide am GRP55 Rezeptor vor; einige Studien streiten die Wirkungen von Anandamid und 2-AG in physiologischen Dosen sogar ab (Oka, Nakajima et al. 2007; Henstridge, Balenga et al. 2009). Auch lassen sich einige der bisher ungeklärten Wirkungen der Cannabinoide nicht durch den GRP55 erklären, sodass weitere Cannabinoid-Rezeptoren denkbar scheinen (Mackie and Stella 2006; Johns, Behm et al. 2007).

1.5.2.3 Intrazelluläre Wirkungen der Cannabinoid-Rezeptor-Aktivierung

Die Bindung eines Agonisten an den Cannabinoid-Rezeptoren führt zu einer Konformitätsänderung und damit zur Aktivierung eines G-Proteins an der Innenseite der Zellmembran. Die beiden Cannabinoid-Rezeptoren vermitteln daraufhin verschiedene Wirkungen in der Zelle. Im Gegensatz zu den Cannabinoid 1-Rezeptoren, welche zahlreiche Ionenkanäle und intrazelluläre Signalwege beeinflussen (Howlett 2005), kommt es nach Aktivierung der CB2-Rezeptoren lediglich zur Hemmung der Adenylatzyklase (Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1994) und dadurch verminderten Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) was die verminderte Phosphorylierung deren Zielproteine zur Folge hat, sowie zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration an freiem Ca^{2+} (Sugiura, Kodaka et al. 1996; Sugiura, Kodaka et al. 1997) und zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK): Bouaboula beschrieben 1995 bzw. 1996 erstmals, dass CB1- und CB2-Rezeptoren die MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 aktivieren (Bouaboula, Pointot-Chazel et al. 1995; Bouaboula, Pointot-Chazel et al. 1996). Auch die Aktivierung der p38 MAP-Kinase (Derkinderen, Ledent et al. 2001; Chen, Errico et al. 2005) und der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK-Kinase) (Derkinderen, Ledent et al. 2001) in Zellen des Hippocampus von Mäusen wurden beschrieben. Der Einfluss der Cannabinoid-Rezeptor-Aktivierung auf die MAPK im Pankreas wurde bisher nicht untersucht.

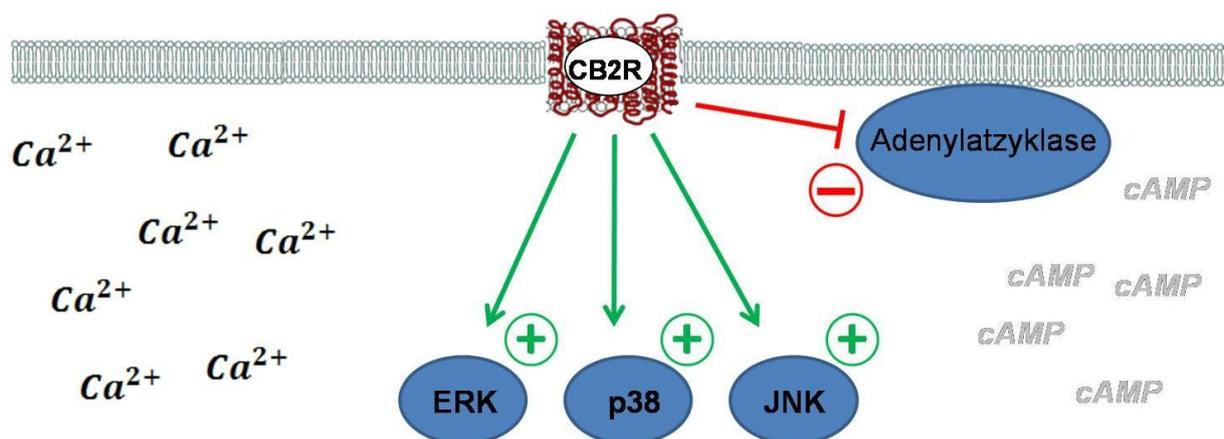


Abbildung 7: Intrazelluläre Wirkmechanismen der CB2-Rezeptor-Aktivierung

Die Aktivierung von CB2-Rezeptoren führt zur Hemmung einer membranständigen Adenylatzyklase, zur Aktivierung der MAP-Kinasen Erk 1/2, p38 und JNK sowie zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

1.5.2.4 Verteilung der Rezeptoren

Die beiden Cannabinoid-Rezeptoren zeigen hinsichtlich ihrer Expression eine unterschiedliche Verteilung im Körper. Die ursprüngliche Einteilung in zentrale (CB1-

Rezeptoren) und periphere Cannabinoid-Rezeptoren (CB2-Rezeptoren) scheint aber zunehmend an Gültigkeit zu verlieren:

Der CB1-Rezeptor ist hauptsächlich im ZNS, mit besonders hohen Dichten in den Basalganglien, der Pars Retikulata der Substantia nigra, dem inneren und äußeren Kern des Globus Pallidus sowie im Gyrus Dentatus des Hippocampus, im Kleinhirn und im limbischen Teil des Cortex (Herkenham, Lynn et al. 1991) zu finden und wird somit für die zentralen, allen voran für die psychischen Effekte der Cannabinoide verantwortlich gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass CB1-Rezeptoren im Hippocampus und in den sensiblen Bahnen des Rückenmarks präsynaptisch auf GABA-haltigen Interneuronen lokalisiert sind und die Ausschüttung von GABA hemmen (Katona, Sperlagh et al. 1999; Katona, Sperlagh et al. 2000; Pertwee 2001). Außerhalb des ZNS konnte der CB1-Rezeptor beim Menschen in diversen Geweben, wie z.B. im Vas Deferens, Hoden (Gerard, Mollereau et al. 1991), in Spermazellen (Schuel, Chang et al. 1991), Endothelzellen (Sugiura, Kondo et al. 1996), präsynaptisch auf sympathischen Nervenendigungen (Ishac, Jiang et al. 1996) und im Gastrointestinaltrakt im Ösophagus, Magen, Ileum (Storr, Gaffal et al. 2002), in der Leber (Lotersztajn, Teixeira-Clerc et al. 2008) sowie dem intestinalen Nervensystem (Crocì, Manara et al. 1998; Coutts, Irving et al. 2002; Casu, Porcella et al. 2003) nachgewiesen werden. Im Pankreas wurde der CB1-Rezeptor auf Azinuszellen, Blutgefäßen, Nerven sowie den Sternzellen beschrieben (Michalski, Laukert et al. 2007; Michalski, Maier et al. 2008).

Der CB2-Rezeptor ist hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems zu finden: Neben B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen auch im Thymus, in der Milz und den Tonsillen (Howlett, Barth et al. 2002). Er wird jedoch in zunehmendem Maße in anderen Geweben nachgewiesen. So ist er im Gastrointestinaltrakt präsent, nachweislich in Ösophagus, im Magen, Ileum (Storr, Gaffal et al. 2002), in der Leber (Lotersztajn, Teixeira-Clerc et al. 2008) und dem intestinalen Nervensystem (Duncan, Davison et al. 2005). Im Pankreas wurde der CB2-Rezeptor ebenfalls - jedoch in einer schwächeren Konzentration wie der CB1-Rezeptor - nachgewiesen. In der Immunhistochemie konnten ihn verschiedene Arbeitsgruppen mit schwachem Signal auf Azinuszellen und Nerven nachweisen, auf den Zellen des Tubulussystems stellten sie eine starke Expression fest (Michalski, Laukert et al. 2007; Michalski, Maier et al. 2008; Linari, Agostini et al. 2009).

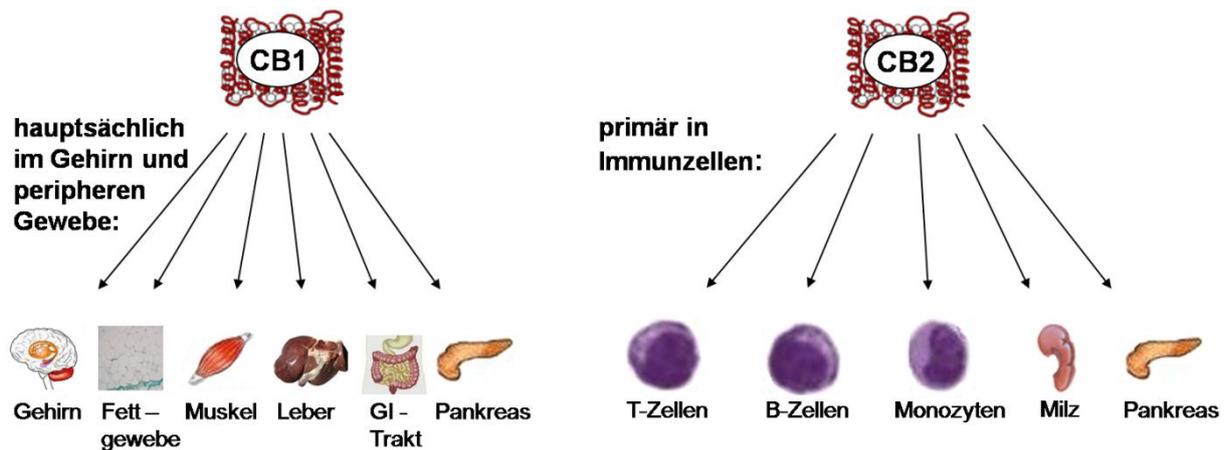


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Verteilung der Cannabinoid-Rezeptoren

1.5.2.5 Anti-inflammatorische und analgetische Potenz der CB2-Rezeptoren

Immunzellen exprimieren neben den CB2- auch CB1-Rezeptoren. Die Quantität der Expression variiert jeweils mit dem Reifegrad der Immunzelle. So exprimieren reife B-Zellen viele CB1- und CB2-Rezeptoren, naive T-Zellen jedoch nur sehr wenige (Bouaboula, Rinaldi et al. 1993). Speziell dem CB2-Rezeptor wird dabei eine immunmodulatorische (Lunn, Reich et al. 2006) und analgetische (Anand, Whiteside et al. 2009) Wirkung zugesprochen. Die analgetische Wirkung kommt zum einen durch die Unterdrückung der Inflammation und der dadurch reduzierten Sensibilisierung afferenter Nerven für Schmerzreize als auch durch Aktivierung von CB2-Rezeptoren direkt auf afferenten Nerven zustande (Wright, Duncan et al. 2008). Die Aktivierung der CB1- und CB2-Rezeptoren auf Immunzellen führt zur Hemmung der Produktion verschiedener Immunmodulatoren wie diverser Zytokine (Klein, Newton et al. 2003; Walter and Stella 2004; Cabral and Staab 2005). In der Folge kommt es zu einer verringerten Migration, Adhäsion und Infiltration von Immunzellen (Lunn, Reich et al. 2006; Wright, Duncan et al. 2008). Ein Großteil der anti-inflammatorischen Eigenschaften der Cannabinoide werden vermutlich auf diese Weise vermittelt. Jedoch haben Versuche mit Palmitylethanolamide (PEA), einem Analog von Anandamid mit starker anti-inflammatorischer Potenz (Lambert, Vandevorode et al. 2002), einen weiteren bisher unbekanntem Rezeptor auf Immunzellen vermuten lassen. PEA reduziert den mit einer Inflammation verbundenen Schmerz (Calignano, La Rana et al. 1998; Jaggar, Hasnie et al. 1998). Dieser Schmerz kann durch den selektiven CB2-Antagonisten SR144528 geblockt werden, obwohl PEA nicht an den CB2-Rezeptoren bindet (Griffin, Tao et al. 2000).

Dies lässt die Existenz eines weiteren PEA sensitiven Rezeptors, an dem SR144528 ebenfalls antagonisiert, vermuten.

1.5.2.6 Endocannabinoide

Nachdem spezifische Rezeptoren entdeckt waren, stellte sich die Frage nach ihrer physiologischen Bedeutung und damit ihrer physiologischen Liganden. 1992 entdeckten Devane et al im Gehirn von Schweinen einen Stoff (Arachidonoyl Ethanolamid), der an dem CB1-Rezeptor bindet (Devane, Hanus et al. 1992). Dieser wurde Anandamid (nach dem Wort "Ananda", das in der altindischen Sprache Sanskrit „Glückseligkeit“ bedeutet) benannt. Bald darauf wurde festgestellt, dass der bereits bekannte endogene Metabolit 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) ebenfalls als Ligand an CB-Rezeptoren agiert (Mechoulam, Ben-Shabat et al. 1995; Sugiura, Kondo et al. 1995). Seitdem wurden mehrere Endocannabinoide entdeckt. Sie gehören alle zu den Eicosanoiden (Pertwee 2005). Darunter befinden sich unter anderem 2-Arachidonoyl-Glycerolether (Noladin Ether) (Hanus, Abu-Lafi et al. 2001), N-Arachidonoyl-Dopamin (NADA) (Bisogno, Melck et al. 2000; Huang, Bisogno et al. 2002) und Virodhamin (Porter, Sauer et al. 2002). Zu ihren Strukturformeln siehe Abbildung 10.

1.5.2.7 Bildung, Abbau und transmembranöser Transport

Anandamid und 2-AG stellen heute die am besten erforschten und verstandenen Endocannabinoide dar. Ihre Stoffwechselwege sind weitestgehend bekannt. Beide werden bei Bedarf durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration vermittelt und aus Phospholipiden der Zellmembran gebildet (Howlett, Barth et al. 2002; DiMarzo, De Petrocellis et al. 2005). Anandamid wird durch vier alternative Stoffwechselwege aus N-Arachidonoyl-Phosphatidylethanolamin (NArPE) gebildet, wobei eine N-Acyl-Phosphatidylethanolamin-selektive Phosphodiesterase (NAPE-PLD) eine Hauptrolle spielt (Di Marzo, Fontana et al. 1994). N-Arachidonoyl-Phosphatidylethanolamin (NArPE) wiederum wird durch den Transfer von Arachidonsäure von der sn-1 Position von Phospholipiden auf das Stickstoffatom von Phosphatidylethanolamin durch N-Acyltransferasen gebildet (Cadas, di Tomaso et al. 1997). Vorläufermoleküle für 2-AG stellen fast ausschließlich Diacylglycerole (DAG) mit Arachidonsäure in der 2. Position dar. Die Umwandlung geschieht durch Hydrolyse mittels den sn-1 selektiven DAG-Lipasen (DAGL a und b). Die Diacylglycerole werden entweder durch eine von der Phospholipase C katalysierten

Hydrolyse von Phosphatidylinositol oder durch Hydrolyse von Phosphatidilsäure gebildet (Di Marzo, De Petrocellis et al. 1996; Bisogno, Sepe et al. 1997; Stella, Schweitzer et al. 1997)(Bisogno, Melck et al. 1999).

Die Beendigung der Wirkung der Endocannabinoide geschieht durch ihre Wiederaufnahme in die Zelle und anschließendem Abbau. Der Mechanismus der Wiederaufnahme ist unter Forschern umstritten. Während einige Forscher auf Grund der lipophilen Eigenschaften der Endocannabinoide von einem unspezifischen Übertritt durch die Zellmembran mittels Diffusion ausgehen (Glaser, Abumrad et al. 2003; Glaser, Kaczocha et al. 2005; Kaczocha, Hermann et al. 2006), mehren sich die Anzeichen eines spezifischeren, durch Proteine vermittelten Transportes (Beltramo, Stella et al. 1997; Hillard, Edgmond et al. 1997; Beltramo and Piomelli 2000; Hillard and Jarrahan 2000; Rakhshan, Day et al. 2000). So kann durch spezifische Inhibitoren die Aufnahme von Anandamid unabhängig von seinem enzymatischen Abbau gehemmt werden (Ortar, Ligresti et al. 2003; Fegley, Kathuria et al. 2004; Ligresti, Morera et al. 2004). Dieser Mechanismus wurde hauptsächlich für Anandamid erforscht und deswegen zunächst Anandamid Membran Transporter (AMT) benannt. Es mehren sich jedoch die Anzeichen, dass auch die anderen Endocannabinoide über den Selben Mechanismus transportiert werden (Beltramo and Piomelli 2000; Fezza, Bisogno et al. 2002), weswegen er auch Endocannabinoid Membran Transporter (EMT) genannt wird. Er konnte auf molekularer Basis noch nicht näher identifiziert werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Wiederaufnahme von Anandamid und 2-AG temperaturabhängig verläuft (Rakhshan, Day et al. 2000), durch NO aktiviert wird (Maccarrone, Bari et al. 2000; Bisogno, MacCarrone et al. 2001), einer Sättigung unterliegt (Hillard, Edgmond et al. 1997) sowie unabhängig von Energie in Form von ATP-Hydrolyse oder in Form eines Ionengradienten abläuft (Maccarrone, Bari et al. 2000; Rakhshan, Day et al. 2000; Bisogno, MacCarrone et al. 2001; Day, Rakhshan et al. 2001; Deutsch, Glaser et al. 2001; Hillard and Jarrahan 2003; Hermann, Kaczocha et al. 2006).

Nachdem Anandamid und 2-AG wieder in die Zelle aufgenommen wurden, werden sie durch enzymatische Hydrolyse ihrer Amid- bzw. Esterbindung inaktiviert. Dies wird bei Anandamid durch die Fettsäure-Amid-Hydrolase-1 (FAAH) (Cravatt, Giang et al. 1996) und bei 2-AG hauptsächlich durch verschiedene Monoacylglycerollipasen

(MAGL) aber ebenfalls durch FAAH katalysiert (Karlsson, Contreras et al. 1997; Dinh, Carpenter et al. 2002). Einen Überblick verschafft Abbildung 9.

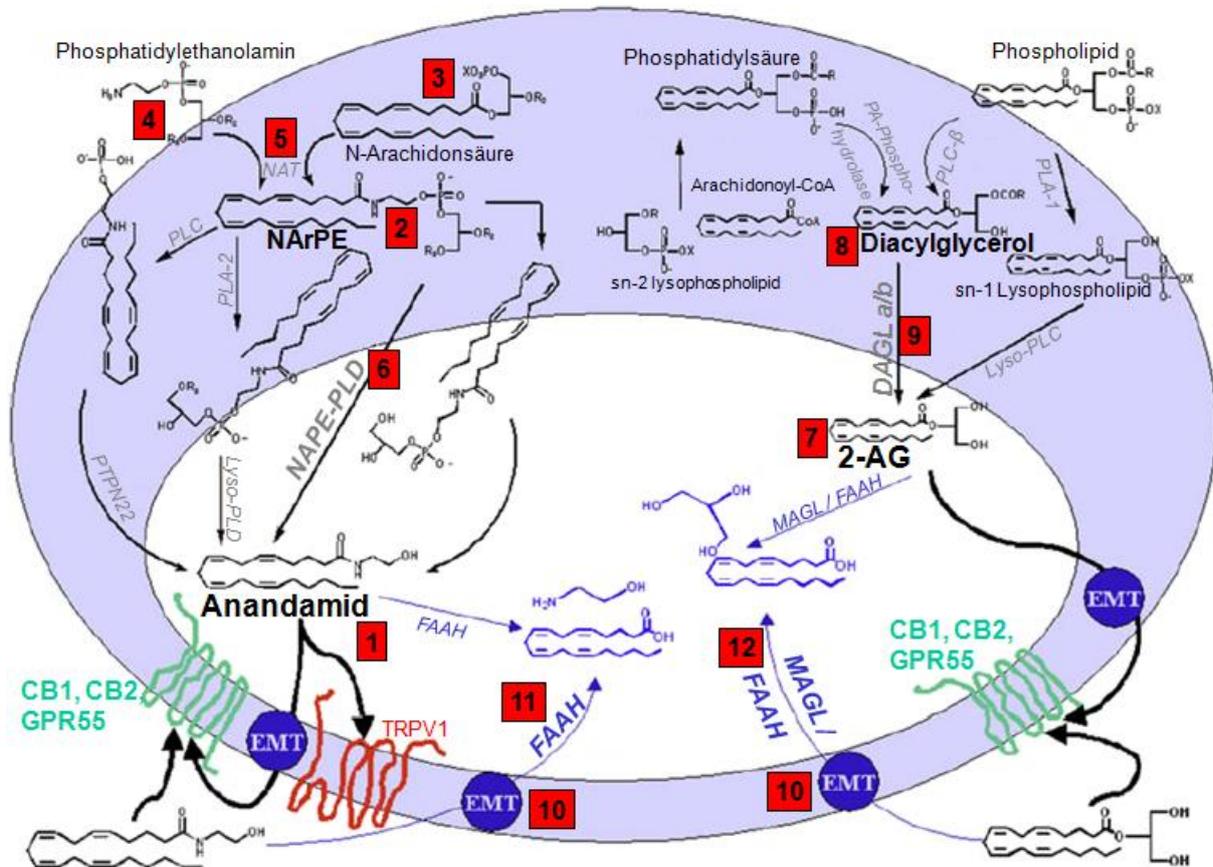


Abbildung 9: Übersicht über die Biosynthese und Inaktivierung der beiden am besten erforschten Endocannabinoiden, Anandamid und 2-AG (Modifiziert nach Petrocellis 2009)

Es existieren jeweils mehrere Stoffwechselwege für Bildung und Abbau. Anandamid (1) stammt von einem Phospholipid, dem N-Arachidonyl-Phosphatidyl-Ethanolamine (NArPE)(2) ab, welches wiederum durch Transfer von N-Arachidonsäure (3) auf Phosphatidylethanolamin (4) durch N-Acyltransferasen (NAT) (5) gebildet wird. NArPE wird durch vier alternative Stoffwechselwege in Anandamid umgewandelt, wobei dies hauptsächlich durch eine N-Acyl-Phosphatidylethanolamine-selektive Phosphodiesterase (NAPE-PLD) (6) katalysiert wird. 2-AG (7) wird fast ausschließlich aus Diacylglycerolen mit Arachidonsäure in der 2- Position (8) gebildet. Die Umwandlung geschieht durch Hydrolyse durch die sn-1 selektiven DAG Lipasen (DAGL a und b) (9). Nach der Wiederaufnahme in die Zelle durch einen bisher ungenügend charakterisierten Prozess (Endocannabinoid Membran Transporter = EMT) (10), wird Anandamid durch die Fatty Acid Amide Hydrolase-1 (FAAH) (11) und 2-AG durch verschiedene Monoacylglycerol-Lipasen (MAGL) (12) metabolisiert. 2-AG kann ebenfalls durch FAAH degradiert werden. (PLD = Phospholipase D; PLA_{1/2} = Phospholipase A₁/A₂; PTPN22 = Protein Tyrosin Phosphatase N22, Biosynthesewege in schwarz, Degradierung in blau dargestellt. Dicke Pfeile stellen Fortbewegung dar)

1.5.3 Übersicht der Liganden

Mittlerweile sind diverse Liganden an den Cannabinoid-Rezeptoren bekannt, die sich nach ihrer Aktivität, ihrer Selektivität für die beiden Cannabinoid-Rezeptoren, ihrer Herkunft (pflanzlich, endogen, synthetisch) sowie ihrer Struktur unterscheiden lassen.

1.5.3.1 Selektivität

Es gelang Wirkstoffe zu entwickeln, die an den beiden Cannabinoid-Rezeptoren jeweils selektiv binden. Mittlerweise existieren jeweils diverse selektive Agonisten, neutrale Antagonisten und inverse Agonisten für die beiden Cannabinoid-Rezeptoren.

1.5.3.2 Aktivität an den Cannabinoid-Rezeptoren

Nach ihrer Aktivität an den Cannabinoid-Rezeptoren können die Liganden in Agonisten, neutrale Antagonisten und inverse Agonisten unterteilt werden (Pertwee 2005). Ohne der Bindung eines Liganden befinden sich die Cannabinoid-Rezeptoren zu einer bestimmten Wahrscheinlichkeit im aktiven Zustand. Die Bindung eines Agonisten erhöht diese Wahrscheinlichkeit. Die Bindung eines neutralen Antagonisten ändert die Wahrscheinlichkeit nicht, blockiert jedoch die Aktivierung durch andere Cannabinoide. Die Bindung eines inversen Agonisten vermindert hingegen die Öffnungswahrscheinlichkeit und führt zu den Agonisten entgegengesetzten Wirkungen. Am CB2-Rezeptor ist dieses Phänomen besonders stark bei SR144528 (Ross, Gibson et al. 1999) ausgeprägt aber auch bei AM630 vorhanden (Ross, Brockie et al. 1999). Neutrale Antagonisten können jedoch ähnliche den Agonisten entgegengesetzte Wirkungen hervorrufen, indem sie die Wirkung endogener Agonisten am Rezeptor kompetitiv hemmen und so einen inversen Agonismus vortäuschen (Pertwee 2005).

1.5.3.3 Struktur

Anhand ihrer Struktur können die Cannabinoid-Rezeptor-Liganden in fünf Gruppen unterteilt werden (Howlett, Barth et al. 2002; Kreitzer and Stella 2009):

- Klassische Cannabinoide: trizyklische Dibenzopyranderivate bestehend aus einem Phenolring mit einer Pentylgruppe in Metastellung, einem zentralen Pyranring und einem einfach ungesättigten Zylohexylring (Mechoulam 1970; Mechoulam, Shani et al. 1970). Hierzu gehören sämtliche Phytocannabinoide sowie einige synthetische Analoga (z.B.: HU210 und JWH133).
- Nichtklassische Cannabinoide: ähnliche Struktur wie die klassischen Cannabinoide jedoch fehlender Dihydropyranring (z.B.: CP55940)
- Aminoalkylindole (z.B.: AM630)

- Eicosanoide: Arachidonsäurederivate (z.B.: Anandamid und andere Endocannabinoide)
- Diarylpyrazole: Diese stellen inverse Agonisten am CB1-Rezeptor dar: z.B.: SR141716A und AM251 (Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1994; Felder, Joyce et al. 1995; Ruiu, Pinna et al. 2003)

Abbildung 10 zeigt eine Übersicht typischer Vertreter:

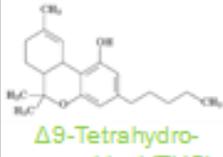
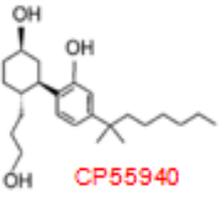
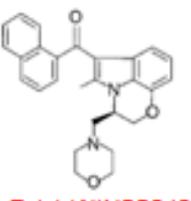
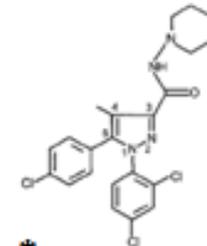
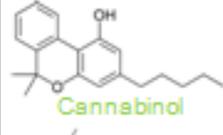
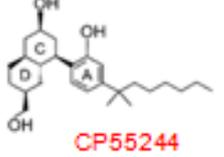
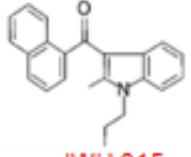
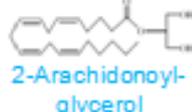
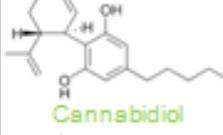
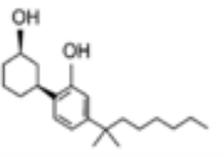
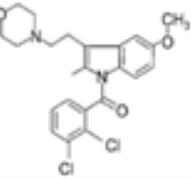
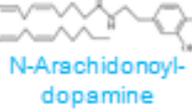
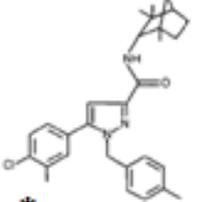
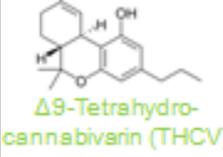
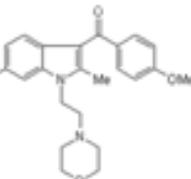
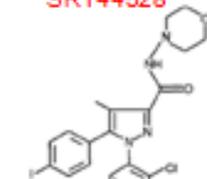
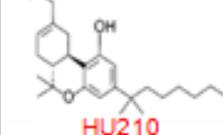
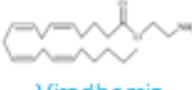
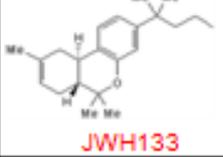
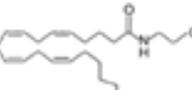
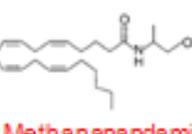
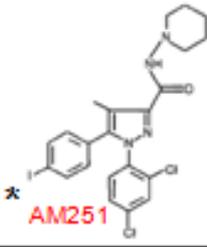
Klassische Cannabinoide	Nichtklassische Cannabinoide	Aminoalkylindole	Eicosanoide	Diarylpyrazole
 Δ9-Tetrahydrocannabinol (THC)	 CP55940	 R-(+)-WIN55212	 Anandamid	 * SR131716A
 Cannabindol	 CP55244	 JWH-015	 2-Arachidonoyl-glycerol	
 Cannabidiol	 CP47497	 L-768242	 N-Arachidonoyl-dopamine	 * SR144528
 Δ9-Tetrahydrocannabivarin (THCV)		 * AM630	 Noladin-Ether	 * AM281
 HU210			 Virodhamin	
 JWH133			 ACEA	
			 Methanandamid	 * AM251
Herkunft	 Phytocannabinoid	 Endocannabinoid	 synthetischer Wirkstoff	
Aktivität	* Antagonist / inverser Agonist			

Abbildung 10: Übersicht der Liganden der Cannabinoid-Rezeptoren (Modifiziert nach Howlett, 2002)

Die Liganden lassen sich nach ihrer Struktur, ihrer Aktivität, ihrer Selektivität sowie ihrer Herkunft unterteilen.

1.5.3.4 Verwendete Wirkstoffe

JWH133 ist ein spezifischer Agonist ($K_i = 3,4 \text{ nM}$) am CB2-Rezeptor. Er hat eine ca. 200 mal stärkere Aktivität am CB2- als am CB1-Rezeptor (Huffman, Liddle et al. 1999; Pertwee 1999).

AM630 ist ein Antagonist / inverser Agonist ($K_i = 31,2 \text{ nM}$) am CB2-Rezeptor (Ross, Brockie et al. 1999). Die Aktivität am CB1-Rezeptor wird widersprüchlich beschrieben: Hier wird er entweder als partieller Agonist (Pertwee, Fernando et al. 1996; Hosohata, Quock et al. 1997; Hosohata, Quock et al. 1997; Pertwee 1999; Ross, Brockie et al. 1999) mit geringer Affinität oder als niedrigpotenter inverser Agonist (Landsman, Makriyannis et al. 1998; Vasquez, Navarro-Polanco et al. 2003) beschrieben. Seine Affinität zum CB2-Rezeptor ist jedoch 165 mal stärker (Hosohata, Quock et al. 1997; Hosohata, Quock et al. 1997; Landsman, Makriyannis et al. 1998; Ross, Brockie et al. 1999).

1.6 Gegenstand dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden die Rolle und therapeutische Potenz von Cannabinoid 2 (CB2) - Rezeptoren in einem Tiermodell der akuten Pankreatitis untersucht. Die wesentlichen Fragestellungen hierbei sind:

- Werden CB2-Rezeptoren im Pankreas der Maus exprimiert? Wenn ja, auf welchen Zellen? Werden sie im Verlauf der Pankreatitis verstärkt exprimiert?
- Wie sieht die physiologische Rolle der CB2-Rezeptoren bei der akuten Pankreatitis aus? Werden sie bei der akuten Pankreatitis verstärkt aktiviert?
- Hat die prophylaktische Aktivierung der CB2-Rezeptoren durch synthetische Agonisten einen protektiven Einfluss auf den Verlauf der akuten Pankreatitis?
- Welche Rolle spielen die Stresskinasen JNK und p38 sowie die MAPKAP-Kinase 2 bei der Vermittlung der Wirkung?

2 Methoden

2.1 Tiermodell

Um eine akute Pankreatitis experimentell zu simulieren, wurde das Modell der Cerulein-induzierten Pankreatitis gewählt (Lampel and Kern 1977). Dieses äußert sich in Ratten als rein ödematöse Pankreatitis, in Mäusen kommt es auch zum Auftreten von Nekrosen. Zur Induktion der Pankreatitis werden den Versuchstieren repetitiv supraphysiologische Konzentrationen des Cholezystokinin-Analoga Cerulein (siehe Abschnitt 2.1.3.3) verabreicht. Insgesamt wurden sechs stündliche Gaben in den Intraoperitonealraum injiziert, woraufhin es zum Zusammenbrechen des Aktinskeletts, dem Verlust der Zellpolarität, der Akkumulation großer intrazellulärer Vakuolen und der funktionellen Blockade der Verdauungsenzymsekretion kommt (Burnham and Williams 1982; O'Konski and Pandol 1990; Jungermann, Lerch et al. 1995; Torgerson and McNiven 2000). Klinisch äußert sich die Pankreatitis bei den Versuchstieren unter anderem durch eine erhöhte Aktivität der Amylase im Serum, ein interstitielles Ödem des Pankreas, eine verstärkte lysosomale Aktivität in den Azinuszellen sowie durch die Fusion von Zymogengranula (Lampel and Kern 1977).

2.1.1 Versuchsaufbau

Aus den Fragestellungen im Vorfeld der Versuche (siehe 1.6) ergaben sich folgende 4 Versuchs-Settings:

Fragestellung	Versuchssetting	Aussage
Haben die mit dem CB2-Antagonisten vorbehandelten Mäuse einen besseren, schlimmeren oder vergleichbaren Verlauf der Pankreatitis?	Vergleich der Gruppen: Antagonist+Cerulein/Cerulein	Physiologische Bedeutung der CB2-Rezeptoren
Haben die mit dem CB2-Agonisten vorbehandelten Mäuse einen milderen Verlauf der Pankreatitis?	Vergleich der Gruppen: Agonist+Cerulein/Cerulein	Anwendung als Medikament denkbar?
Falls eine protektive Wirkung vorhanden ist: Kann diese durch die vorherige Gabe des CB2-Antagonisten verhindert werden?	Vergleich der Gruppen: Antagonist+Agonist+Cerulein/ Cerulein	Nachweis des Wirkmechanismus über den CB2-Rezeptor
Wie wirkt der CB2-Agonist in MK2 -/- mit akuter Pankreatitis?	Vergleich der Gruppen: Agonist+Cerulein/Cerulein in MK2 -/-	Ist MK2 bei der Vermittlung der Wirkung des CB2-Rezeptors beteiligt?

Um zusätzlich die Wirkung der Cannabinoide auf das gesunde Pankreas zu erforschen und trotzdem die Versuchsbedingungen für die verschiedenen Behandlungsgruppen gleich zu halten, wurde jeweils einigen Tieren anstelle von Cerulein das gleiche Volumen an physiologischer Kochsalzlösung injiziert.

2.1.2 Versuchstiere

Für die Versuche in Wildtyp Tieren wurden C57 / black - Mäuse von Charles River (Wiga, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die MK2-knockout Mäuse wurden ebenfalls aus C57 / black - Mäusen generiert (Kotlyarov, Neininger et al. 1999).

Genotyp	Anzahl	Geschlechterverteilung Männlich / weiblich	Durchschnittliches Gewicht	Minimales Gewicht	Maximales Gewicht
Wildtyp	79	65 / 14	24,3 g	16 g	35 g
MK2 -/-	27	13/14	29,0 g	21,0 g	43,5 g

Tabelle 1: Übersicht der Versuchstiere

Die Tiere wurden in vollklimatisierten Ställen mit einem konstanten 12 h Licht-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Ssniff Soest, Deutschland) und entsprechend den Bedingungen des Tierschutzgesetzes gehalten. Ein Mindestabstand von zwei Tagen wurde zwischen Transport und Experiment eingehalten, um Stresszustände zu vermeiden. Vor der Durchführung von Experimenten wurden die Tiere über Nacht nüchtern gehalten mit freiem Zugang zu Wasser. Die Tierversuche waren von der zuständigen Behörde genehmigt.

2.1.3 injizierte Substanzen

Alle Substanzen wurden den Mäusen intraperitoneal ins linke untere Abdomen injiziert. Verwendet wurden hierfür Kanülen der Größe 27G. Die injizierten Volumina betragen jeweils 10 µl / g Körpergewicht für NaCl, Cerulein und AM630. JWH133 wurde wegen unterschiedlichem Lösungsverhalten in einem Volumen von 20 µl / g Körpergewicht injiziert.

2.1.3.1 CB2-Agonist

JWH133 gelöst in Tocrisolve™ von Tocris®

2.1.3.2 CB2-Antagonist

AM630 von Tocris®. AM630 wurde mit Hilfe von Dimethylsulfoxid (DMSO) in 0,9 % NaCl gelöst. In der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass DMSO in dieser

Konzentration (1,2 % DMSO) keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter bei der Cerulein-induzierten Pankreatitis hat.

2.1.3.3 Cerulein

Cerulein ist ein Cholezystokinin-Analoga welches ursprünglich von der Haut des in Australien heimischen Frosches „*Hyla caerulea*“ gewonnen wurde (De Caro, Endean et al. 1968). Dieses Dekapeptid unterscheidet sich von Cholezystokinin nur durch 2 zusätzliche Aminosäuren, die sich im Anschluss an das für die biologische Aktivität zwingend notwendige Heptapeptid befinden (Mutt and Jorpes 1968). Die Wirkung von Cerulein und CCK an den CCK-Rezeptoren sind aber identisch.

2.1.3.4 0,9 % NaCl

Als Kontrollsubstanz an Stelle der Präkonditionierung und der Cerulein-Injektionen wurde 0,9 % NaCl in den jeweils gleichen Volumina (10 µl / g KG) verabreicht.

2.1.4 Versuchsablauf

2.1.4.1 Präkonditionierung

Da es sich in diesem Versuchsaufbau um die Untersuchung von protektiven Effekten von CB2-Rezeptoren handelte, wurden die Tiere bereits vor dem Auslösen einer Pankreatitis mit den zu untersuchenden Pharmaka oder Kontrollsubstanzen behandelt. Am Versuchstag wurden die Tiere gewogen und unter ständigem Zugang zu Futter und Wasser zu höchstens drei Tieren in einem Käfig gehalten. Zum Versuchsbeginn wurden der CB2-Agonist JWH133 bzw. der CB2-Antagonist AM630 oder im Falle der Kontrolltiere 0,9 % NaCl intraperitoneal ins linke untere Abdomen injiziert. Bei den Tieren, die sowohl JWH133 als auch AM630 verabreicht bekamen, wurde zuerst AM630 und 30 min später JWH133 injiziert. Anstelle der Pharmaka wurde einigen Tieren 0,9 % NaCl im gleichen Volumen (10 µl / g KG) verabreicht.

2.1.4.2 Induktion der Pankreatitis

30 Minuten nach der Injektion der Pharmaka bekamen die Tiere die erste Cerulein-Dosis verabreicht. In stündlichen Abständen wurden insgesamt 6 mal 50 µg Cerulein/g Körpergewicht injiziert. Den Kontrolltieren, die zwar mit den zu untersuchenden Substanzen (JWH133 / AM630 / JWH133 & AM630 / NaCl), jedoch nicht mit Cerulein behandelt wurden, wurde jeweils analog zu den Cerulein-Injektionen 0,9 % NaCl in den gleichen Volumina injiziert.

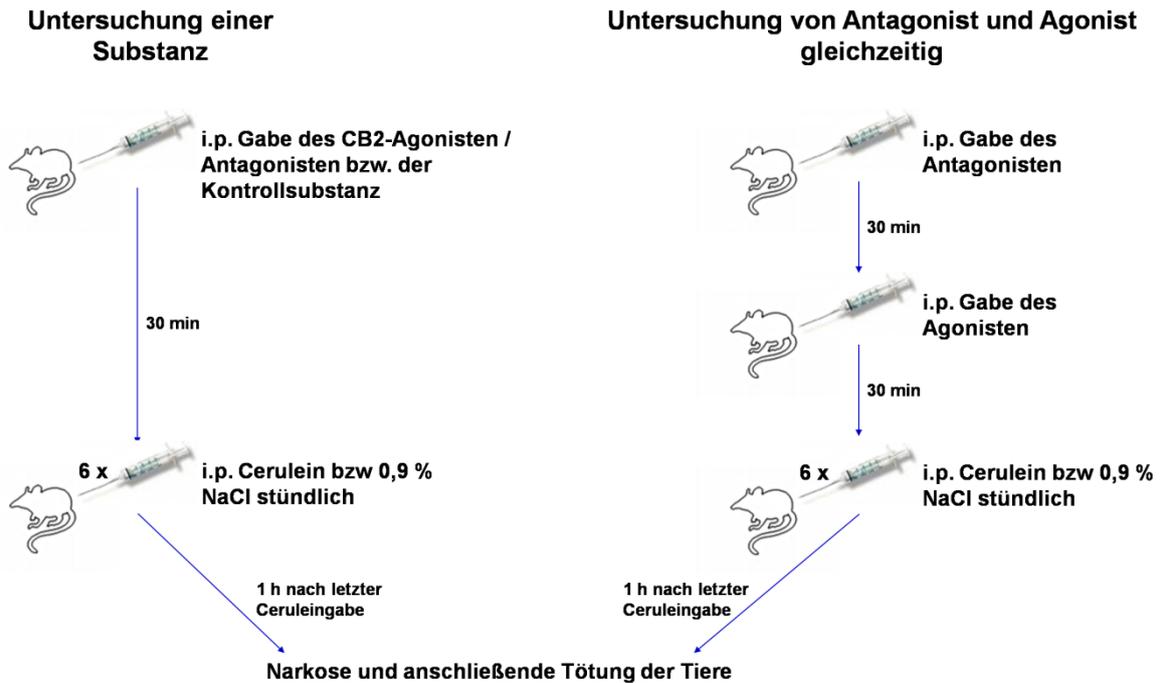


Abbildung 11: Versuchsablauf

2.1.4.3 Versuchssettings

Um die Versuchsbedingungen für die verschiedenen Tiere so konstant wie möglich zu halten, wurden an einem Versuchstag jeweils 8 - 9 Tiere parallel behandelt. Dies beinhaltet z.B. den selben zeitlichen Ablauf, die Verwendung des gleichen Materials wie etwa die selben Medikamentenansätze und Spritzen sowie gleiche Bedingungen aller äußeren Einflussfaktoren und möglichen Stressoren. Insbesondere für die quantitative Bestimmung der Stresskinasen-Phosphorylierung erschien dies sinnvoll, da diese auf mögliche Störgrößen sehr empfindlich reagieren.

Setting # 1:

Tier #	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vorbehandlung:	-	Antagonist	Antagonist	Antagonist	Antagonist	Antagonist	-	-	-
Injektionen: 6xVolumen/KG	0,9% NaCl	0,9 % NaCl	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Cerulein

Setting # 2:

Tier #	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vorbehandlung:	-	Agonist	Agonist	Agonist	Agonist	Agonist	-	-	-
Injektionen: 6xVolumen/KG	0,9% NaCl	0,9 % NaCl	Cerulein						

Setting # 3:

Tier #	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vorbehandlung:	-	Antagonist +Agonist	Antagonist +Agonist	Antagonist +Agonist	Antagonist +Agonist	Antagonist +Agonist	-	-	-
Injektionen: 6xVolumen/KG	0,9% NaCl	0,9 % NaCl	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Cerulein

Abbildung 12: Übersicht der verschiedenen Versuchssettings

Jedes Versuchssetting wurde mindestens dreimal durchgeführt. Setting # 1 wurde zusätzlich bei den MK2 -/- angewandt.

2.1.4.4 Tötung und Präparation

Eine Stunde nach der letzten Cerulein-Injektion wurden die Tiere durch Inhalation mit 4 % Isofluran und Sauerstoff narkotisiert und anschließend durch Dekapitation getötet. Dabei wurde das Blut gesammelt und nach Zentrifugation (10 min bei 14.000 rpm und 4°C) das Serum gewonnen. Dieses wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur späteren Bestimmung der Amylase (siehe 2.2.1) und Interleukin-6 (siehe 2.3) bei -80°C aufbewahrt. Anschließend folgte die Präparation des Pankreas und der Lunge. Nach der Eröffnung des Abdomens durch einen medialen Längsschnitt wurde die Milz aufgesucht und von ihrer Unterseite aus das Pankreas vorsichtig von Magen, Duodenum, Dünndarm und dem Mesenterium abgetrennt. Nach kompletter Darstellung und Freilegung des Pankreas wurde dieses in isotoner Kochsalzlösung gespült und von den letzten Gewebs-, Fett- und Blutresten gesäubert. Anschließend wurde das Pankreas mit Zellstoff getrocknet und gewogen. Jetzt folgte die Entnahme eines Stückchens des Caput für die Histologie und eines für die Bestimmung der Feucht- / Trockengewichtsratio (zum weiteren Vorgehen 2.5.1). Die Gewebeprobe für die Histologie wurde sofort in Paraformaldehyd gegeben und bis zur Übergabe ans Pathologische Institut der LMU München, Klinikum Innenstadt, bei +4°C aufbewahrt. Das restliche Pankreas wurde nun in vier gleichgroße Teile zerschnitten, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Nach der Präparation des Pankreas folgte die Eröffnung des Thorax durch einen radiären Schnitt durch das Zwergfell und durch das Sternum. Die beiden Lungenflügel wurden am Hilus von Gefäßen und Trachea getrennt und gründlich in isotoner Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gespült. Anschließend mit Zellstoff getrocknet und einzeln gewogen. Nach dem Schock-Gefrieren in flüssigem Stickstoff folgte die Aufbewahrung bei -80°C.

2.2 Enzymaktivitätsmessungen

2.2.1 Aktivität der Amylase im Serum

Die Aktivität der α -Amylase im Blutserum wurde mit dem Phadebas®-Amylase Test nach Herstellerangaben durchgeführt (Arbeitsanweisung, Phadebas Amylase Test, 1994, Pharmacia AB, Uppsala, Schweden). Bei diesem Verfahren wird einem definiertem Volumen Serum als Substrat Stärke zugeführt, an welche blaue Farbmoleküle gebunden sind. In der zugeführten Form ist dieses Substrat

weitgehend wasserunlöslich. Wird es jedoch durch die α -Amylase im Serum gespalten, so entstehen kleinere, wasserlösliche Fragmente. Die Menge der sich im Überstand befindenden löslichen Fragmente ist also proportional zur Aktivität der Amylase im Serum und zur im Photometer messbaren Absorption bei 620 nm.

2.2.1.1 Durchführung

2 Phadebas®-Tabletten wurden in 28 ml Amylase-Puffer unter ständigem Rühren gelöst. Zu 10 μ l Serumprobe, beziehungsweise 10 μ l destilliertem Wasser für den Nullabgleich, wurden jeweils 1000 μ l dieses Gemisches gegeben, im Vortex-Mischer gemischt und im Wasserbad bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach fünf Minuten wurde diese Reaktion durch Zugabe von 300 μ l Stopplösung (0,5 M NaOH, 4°C) durch einen pH-Umschlag ins Alkalische gestoppt und nach der Verdünnung mit 5 ml destilliertem Wasser im Vortex-Mischer gemischt. Sofort danach folgte die Zentrifugation bei 4°C für 5 Minuten bei 4000 rpm. Anschließend wurde 1 ml Überstand vorsichtig in eine Küvette überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm im UV-Spektrometer gegen den Nullabgleich gemessen. Die Aktivität der Amylase wurde jeweils im Doppelansatz bestimmt.

2.2.1.2 Auswertung

Zur Auswertung wurden zuerst die Mittelwerte der beiden gemessenen Absorptionen aus dem Doppelansatz bei 620 nm ermittelt. Dieser Mittelwert wurde mit dem Verdünnungsfaktor 725 multipliziert um die Aktivität der Amylase pro Volumen Serum zu erhalten [U/l].

2.2.1.3 Mixturen

Stopp-Lösung	0,5 M NaOH, 4°C
Amylase-Puffer	0,5 M NaCl 0,02 M NaH ₂ PO ₄ 0,02 % NaN ₃ pH 7,4

2.2.2 aktiviertes Trypsin im Pankreas

Die Trypsin-Aktivität wurde nach der Methode von Kawabata et al. (Kawabata, Miura et al. 1988) in einem Lumineszenz Spektrometer (Perkin Elmer) fluorimetrisch bestimmt. Hierbei wird der Probe eine definierte Menge Substrat zugeführt (Boc-Glu-Ala-Arg-MCA•HCl). Trypsin, nicht jedoch Trypsinogen, spaltet dieses Substrat in eine fluoreszierende Verbindung. Nach der Anregung mit einer Wellenlänge von 380 nm

werden dessen Emissionen bei 440 nm gemessen. Die zeitliche Zunahme der gemessenen Emissionen kann mit einer Standardkurve verglichen werden und so Rückschluss auf die Trypsin-Aktivität geben.

2.2.2.1 Aufbereitung der Proben

Ein ca. 0,05 – 0,1 g schweres, bei -80°C gefrorenes Stück Pankreasgewebe wurde in 1 ml eiskaltem (4°C) MOPS-Puffer aufgenommen und bei 2400 rpm unter ständiger Kühlung mittels Potter-Homogenisator homogenisiert. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 3.000 rpm wurde der Überstand gewonnen und zur späteren Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Abschnitt 2.9) 5 µl entnommen.

2.2.2.2 Messung

Vor jeder Messung wurde jeweils eine Standardkurve mit definierten Trypsin-Konzentrationen vermessen. Hierzu wurde ein Trypsin-Stock (10 mg/ml) durch TAB-Puffer (Trypsin assay buffer) auf 0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,25 ng/ml bzw. 0,5 ng/ml verdünnt und anschließend Substrat zugesetzt. Aus der Zunahme der Fluoreszenz pro Zeit in Abhängigkeit von der Trypsin-Konzentration im Volumen ließ sich die Eichgerade zur späteren Auswertung (in Substratumsatzes / Zeit / mg Trypsin) bestimmen. Nun wurde den Proben Substrat zugesetzt und die Zunahme der Fluoreszenz / Zeit gemessen. Zur Auswertung wurde die Steigung mit der Eichgerade verglichen und die erhaltene Trypsin-Aktivität / ml auf die vorher gemessenen Proteinkonzentration (Methode nach Bradford, siehe Abschnitt 2.9) der Probe bezogen. Die Ergebnisse wurden anschließend in Trypsin-Aktivität (in mU) pro mg Protein angegeben. Die Messungen der Standardkurve und der Proben wurden jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

2.2.2.3 Mixturen

TAB-Puffer (=Trypsin-Assay-Buffer):	50 mM TRIS Base
	150 nM NaCl
	1 mM CaCl ₂
	0,01 % BSA
	pH 8,1
	Aufbewahrung bei 4°C
	Gebrauch bei Raumtemperatur

MOPS-Puffer:	250 mM Sucrose 5 mM MOPS 1 mM MgSO ₄ pH 6,5 Aufbewahrung und Gebrauch bei 4°C
Substrat:	Boc-Gln-Ala-Arg-AMC•HCl Bachem I-1550 Stammlösung: 10 mM Lösung in DMSO Aufbewahrung bei 4°C Arbeitslösung: 1:50 verdünnt mit H ₂ O
Trypsin für die Kalibrier-Kontrolle:	Sigma T-4665 Stammlösung: 10 mg/ml Aufbewahrung bei 4°C

2.2.3 Aktivität der Myeloperoxidase in der Lunge

Als zusätzlichen Parameter für die systemische Inflammation und der Schädigung der Lunge wurde die Aktivität der Myeloperoxidase aus Lungenhomogenisat gemessen, wodurch sich die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Lunge abschätzen lässt. Hierzu wurde die Methode nach Molero et al in modifizierter Weise verwendet (Molero, Guarner et al. 1995; Kubisch, Dimagno et al. 2004).

2.2.3.1 Herstellung der Proben

Zur Herstellung der Probe wurde jeweils ein Lungenflügel verwendet, der seit der Präparation bei -80°C aufbewahrt wurde. Das Gewicht der Lungenflügel wurde bereits am Präparationstag gemessen. Am Tag der Probenherstellung wurde ein Stück unter ständigem Kühlen mit Eis 1:10 mit eiskalten (4°C) Homogenisations-Puffer verdünnt (Gewebegewicht x 9 = Menge an Homogenisations-Puffer und in einem Polytron-Homogenisator bei 2.400 rpm homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend für 10 Minuten bei 10.000 G und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl Extraktionspuffer (weniger bei kleineren Stücken) resuspendiert. Jetzt wurden alle Proben in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und für 5 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Dieser Zyklus wurde jeweils 4 mal wiederholt. Danach wurden alle Proben 2 x für 10s mit jeweils 7 x 10 Zyklen/min bei 75 % Leistung mit Ultraschall behandelt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 10.000 G und 4°C wurde der Überstand gewonnen, Schock gefroren und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Messung

Zur Messung wurde der Überstand in ein Reaktionsmix, bestehend aus 1 ml KH_2PO_4 -Puffer (pH 6,0), 10 μl o-Dianisidine und 10 μl H_2O_2 , gegeben. Zuerst wurde die Absorption des Reaktionsgemisches bei 460 nm über eine Minute gemessen und dann 50 – 200 μl des Überstands hinzugefügt und die Absorption für weitere 4 min gemessen. Anschließend wurde die Aktivität der MPO aus der Steigung der Absorption errechnet. Die gemessene Aktivität der Myeloperoxidase wurde auf das Feuchtgewicht der verwendeten Lungenflügel bezogen. Hierfür wurden die Lungenflügel gleich nach der Präparation gewogen.

2.2.3.3 Mixturen

Homogenisations-Puffer:	20 mM KH_2PO_4 pH 7,4 gelagert bei 4°C
Mess-Puffer:	50 mM KH_2PO_4 pH 6,0 gelagert bei Raumtemperatur
Extraktionspuffer-Stock:	5 mM EDTA pH 6,0 gelagert bei 4°C
SBTI (Soy Bean Trypsin Inhibitor):	100 μM SBTI in HEPES Ringer Puffer pH 7,4 Hepes: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure (SIGMA) gelagert bei -20°C
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid):	1 mM PMSF gelöst in Methanol/Isopropanol 1:1 gelagert bei -20°C
Hexadecyltrimethylammoniumbromid:	5 % Hexadecyltrimethylammoniumbromid / Messpuffer gelagert bei Raumtemperatur
H_2O_2 :	7 μl 30 % H_2O_2 / ml Messpuffer gelagert auf Eis

2.3 Interleukin-6 Messung

Zur Messung des Interleukin-6 Spiegels im Serum wurde ein ELISA Kit (Quantikine® Mouse IL-6 Kit, R&D Systems, Inc., 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA) verwendet. Anfangs wurde eine Standardreihe durch Verdünnung der Standardlösung mit Calibrator Diluent mit Konzentrationen von 500 pg/ml, 250 pg/ml in absteigenden Konzentrationen bis hin zu einer Verdünnung von 7,8 pg/ml

hergestellt. Zuerst wurden alle zu benutzenden Wells mit 25 µl Assay Diluent gefüllt, um eine bessere Antikörperbindung zu gewährleisten. Anschließend wurden je 50 µl der Standard-Verdünnungsreihe im Doppelansatz in aufsteigenden Konzentrationen in die Wells eingebracht und anschließend ebenfalls je 50 µl der zu testenden Serumproben im Doppelansatz in die verbleibenden Wells verteilt. Nach vorsichtigem Schütteln für 1 min wurde die Platte für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Wells verworfen und die Wells jeweils 5 mal mit 300 - 400 µl Waschlösung (bestehend aus 25 ml Konzentrat in 600 ml H₂O) gespült. Nach Einbringen von 100 µl des Konjugates pro Well wurde wiederum für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und die oben beschriebenen Waschgänge wiederholt. Jetzt wurden die Color Reagents A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 100 µl in die Wells pipettiert. Nach Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min und Einbringen von 100 µl Stopplösung pro Well wurde im ELISA-Reader die Absorption bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Die IL-6 Spiegel der Proben konnten nun aus dem Vergleich der Absorptionen mit der Standardreihe errechnet werden.

2.4 Histologie

Die Pankreasstücke für die Histologien wurden nach der Präparation in Paraformaldehyd aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt in Paraffin fixiert. Anschließend wurden 5 µm dicke Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und diese anhand von 4 Kriterien (Ödembildung, Vakuolisierung, Nekrose und Inflammation) bewertet.

2.5 Pankreasödem

Bei der akuten Pankreatitis kommt es durch Wassereinstrom zu einer Ödembildung und damit Gewichtszunahme des Pankreasgewebes. Um dieses zu quantifizieren wurden zwei Methoden angewandt.

2.5.1 Pankreasgewicht-/Körpergewicht-Ratio

Um einen Anhalt auf den Grad der Ödemisierung des Pankreas zu erhalten, wurde innerhalb der Arbeitsgruppe der Begriff des Ödemisierungsgrades eingeführt. Um diesen zu bestimmen, werden die Pankreata direkt nach der Präparation gewogen. Anschließend wird das Verhältnis zwischen dem Pankreasgewicht x 1.000 und dem Körpergewicht der Mäuse gebildet:

$$\text{"Ödemisierungsgrad"} = \frac{\text{Pankreasgewicht} \times 1.000}{\text{Körpergewicht}}$$

Eine Ödembildung des Pankreas geht mit einer Zunahme des Wassergehalts und damit der Masse des Pankreas einher. Ein hoher Ödemisierungsgrad spricht somit für eine starke Ödembildung.

2.5.2 Feucht-/Trockengewicht-Ratio

Bei der Präparation der Pankreata wurde zusätzlich jeweils ein Stück für die anschließende Bestimmung des Wassergehalts reserviert. Dieses wurde sofort nach der Präparation mit einer Feinwaage gewogen und danach für mindestens 48 Stunden in einem Ofen bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Gewebe noch einmal gewogen. Der Gewichtsverlust entspricht der Masse des verdunsteten Wassers. Nun wurde das Verhältnis des Gewichtsverlusts bei der Trocknung zum Feuchtgewicht bestimmt. Diese Ratio stellt den Anteil des Wassers an der Gesamtmasse des Pankreasstückchens in % dar und ist bei einer Ödembildung erhöht:

$$\text{Anteil des Wassers an der Gesamtmasse} = \frac{\text{Feuchtgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Feuchtgewicht}}$$

2.6 Westernblot

Der Nachweis der Stresskinasen und des CB2-Rezeptors erfolgte durch Westernblot, ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen (Renart, Reiser et al. 1979; Towbin, Staehelin et al. 1979; Burnette 1981). Dabei werden zuerst die verschiedenen Proteine voneinander getrennt. Dies geschieht durch das Anlegen einer elektrischen Spannung, woraufhin die Proteine in unterschiedlicher Geschwindigkeit, abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung, durch ein Acrylamidgel wandern. Durch unterschiedlich hohe Spannungen und unterschiedliche Konzentrationen Acrylamid im Gel kann die Wanderungsgeschwindigkeit variiert werden. Nach dem Auftrennen werden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dies geschieht durch das Anlegen einer weiteren Spannung, diesmal quer zur vorherigen Laufrichtung, woraufhin die Proteine aus dem Gel auf die seitlich aufliegende Nitrozellulose-Membran wandern. Anschließend werden die nachzuweisenden Proteine durch spezifische Antikörper gebunden. In einem weiteren Arbeitsschritt werden sogenannte Zweitantikörper, die gegen die bereits gebundenen Antikörper gerichtet sind, hinzugefügt. An diesen Zweitantikörpern ist ein Enzym gebunden,

welches durch Reaktion mit einem zugegebenen Substrat die Visualisierung der Antikörper-Proteinbindung ermöglicht. Hier wurden Zweitantikörper verwendet, an denen eine Meerrettich-Peroxidase gebunden war. Nach Zugabe des Substrates Luminol (bzw. dessen Derivate) wird dieses durch die Meerrettich-Peroxidase in seine oxidierte Form umgewandelt. Bei diesem Vorgang kann eine Lumineszenz detektiert werden, welche durch einen gewöhnlichen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

2.6.1 Aufbereitung der Proben

Zur Herstellung der Westernblot-Lysate wurde jeweils ein 50 - 100 µg schweres, bei -80°C aufbewahrtes Pankreasstück in 1 ml Homogenisations-Puffer homogenisiert (Polychrom). Nach der Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 14.000 rpm wurde der Überstand überführt und das Pellet verworfen. Nach Mischen im Vortex-Mischer wurde der Überstand für 30 min auf Eis gelagert und alle 5 min im Vortex-Mischer erneut gemischt. (Ablauf der Lyse). Danach wurde das Lysat für 30 Minuten erneut bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand überführt. Nun wurden 5 µl für die anschließende Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (siehe Abschnitt 2.9) entnommen. Nachdem die Proteinkonzentrationen der Lysate gemessen waren, wurden die Lysate jeweils mit den entsprechenden Mengen des Homogenisations-Puffer, SDS-Puffer und Mercaptoethanol gemischt, sodass das Gemisch eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml mit einem Volumenanteil von 25 % SDS-Puffer und 0,025 % Mercaptoethanol erhielt. Anschließend wurden diese für 5 min auf 95°C erhitzt und bis zum Ablauf der Gelelektrophorese bei -80°C aufbewahrt.

2.6.1.1 Mixturen

SDS-Puffer: 253,81 mmol/L Tris-HCl,
 20 Spatelspitzen/L Bromphenolblau,
 400 mmol/L Glycerol
 600 ml/L destilliertes Wasser
 277,41 mmol/L SDS
 pH 6,8

Homogenisations-Puffer: 50 mM Tris / HCl
100 mM KCl
50 mM β -Glycerolphosphat
1 mM DTT
20 mM NaF
2 mM EGTA
0,2 mM EDTA
1 mM Benzamidin
pH 7,4
vor Verwendung Zugabe 1 Spatelspitze Na_3VO_4 / 10 ml und
100 μl Proteaseinhibitor-Cocktail Set 1 (Calbiochem, La Jolla,
Kanada) / 10 ml
gelagert auf Eis

2.6.2 Gelelektrophorese und Proteinnachweis

Die Proben der Tiere eines Versuchstages (siehe 2.1.1) wurden jeweils in der gleichen Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Gießen der Gele (10 % Acrylamid) wurden diese in eine mit dem Trennpuffer gefüllte Elektrophorese-Vorrichtung gegeben und mit jeweils 40 μg Protein/Tasche beladen. Als Referenzmarker wurde dabei 5 μl Proteinstandard (All Blue der Firma BioRad) verwendet. Danach wurden die Proteine bei 150 V für ca. 90 min getrennt und unter Kühlung bei 300 mA unter Verwendung des Transferpuffers auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Daraufhin wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % entfetteter Trockenmilch (Firma BioRad; in TBST gelöst) geblockt, um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Nun folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper bei 4°C über Nacht unter ständigem Schwenken. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3 mal für jeweils 5 min in TBST gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Es folgten weitere 3 Waschgänge mit TBST. Daraufhin wurde die Membran unter Schwenken in dem im Mischverhältnis 1:1 verwendeten Lösungen ECL1 und ECL2 inkubiert. Anschließend wurden die Filme mit einer Belichtungszeit zwischen wenigen Sekunden bis zu einer Stunde (abhängig vom nachzuweisenden Protein) entwickelt.

Da der Nachweis der phosphorylierten Proteine (Phospho-p38 und Phospho-JNK) eine weitaus längere Belichtungszeit (Faktor > 100) benötigte wie der Nachweis der unphosphorylierten Proteine (p38 und JNK), konnten beide Proteine hintereinander auf derselben Membran nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Membran zuerst mit dem Antikörper gegen das phosphorylierte Protein verwendet, anschließend eine Reprobe mit dem Antikörper gegen das unphosphorylierte Protein durchgeführt.

Durch die kurze Belichtungszeit für Anti-p38 und Anti-JNK konnte das schwache Signal des Anti-Phospho-p38 und Anti-Phospho-JNK-Antikörpers bei der Reprobe vernachlässigt werden. Die nachzuweisenden Proteine wurden anschließend anhand ihrer Größe identifiziert. Die JNK lässt sich als Dimer mit Molekülgrößen von 42 bzw. 50 kD, die p38-MAPK mit 38 kD und der CB2-Rezeptor mit einer Molekülgröße von 45 kD nachweisen.

2.6.2.1 Mixturen

Trenn-Gel (10 % Acrylamid):	4 ml Trenngelpuffer 6,7 ml destilliertes Wasser 5,3 ml 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 50 µl 10 % Ammonium Persulfat 25 µl TEMED
Trenn-Gel-Puffer:	1492,54 mmol/l TRIS Base 13,87 mmol/l SDS pH 8,8
Sammel-Gel:	2,5 ml Sammelgelpuffer 5,9 ml destilliertes Wasser 1,6 ml 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 60 µl 10 % Ammonium Persulfat 20 µl TEMED
Sammel-Gel-Puffer:	500 mmol/l TRIS Base 13,87 mmol/l SDS pH 6,8
Lauf-Puffer:	25,02 mmol/l TRIS Base 192,3 mmol/l Glycin 3,47 mmol/l SDS
Transfer-Gel-Puffer:	24,75 mmol/l TRIS Base 192,31 mmol/l Glycin 10,40 mmol/l SDS 20 % Methanol
Lösung für Waschgänge und zur Herstellung der Milch:	19,9 mmol/l TRIS Base 136,89 mmol/l NaCl 1,5 ml/l TWEEN 20 pH 7,6 eventuell zusätzlich 50 g/l entfettete Trockenmilch zur Herstellung der Milch

2.6.3 Quantifizierung

Wie im Abschnitt 2.1.1 beschrieben wurden bei den Tierversuchen jeweils 9 Tiere zeitgleich behandelt, getötet und präpariert. Die gewonnen Proben eines

Versuchstages, so auch die für die Westernblots, wurden zeitgleich verarbeitet und auf dem selben Gel bei den Westernblots aufgetrennt. Dies sollte auf größtmögliche Weise Störfaktoren ausschließen. Nach dem Entwickeln der Filme wurden diese eingescannt und mit dem Programm ImageJ Version 1.41 bearbeitet. Hierbei wurden die Scans der Westernblots in Graustufen umgewandelt und die Pixel der einzelnen Proteinnachweise quantifiziert. Anschließend wurden diese ins Verhältnis zum NaCl-Kontrolltier des gleichen Scans gesetzt, um weitere Störfaktoren wie verschiedene Inkubationszeiten und Belichtungszeiten bei verschiedenen Gelelektrophoresen und Filmentwicklungen auszuschließen. Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 15.0.

2.7 PCR

2.7.1 Amplifikation

Die RT-PCR zum Nachweis der Expression des CB2-Rezeptors wurde nach dem „hot start“- Verfahren durchgeführt. Dieses unterscheidet sich von der konventionellen PCR nur im ersten Schritt. Dabei wird die Polymerase-Kettenreaktion erst gestartet, nachdem das Reaktionsgemisch auf eine Mindesttemperatur erwärmt wurde. Die Polymerisation beginnt somit erst nachdem die Primer spezifisch an die DNA Sequenz gebunden haben, wodurch weniger Artefakte entstehen. Es wurde das „HotStar Taq DNA Polymerase Kit®“ der Firma „Qiagen®“ verwendet und nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen. Nach dem Umschreiben der mRNA in DNA mittels einer reversen Transkriptase wurde das Master-Mix entsprechend dem Protokoll aus dem mitgelieferten PCR-Puffer, dem dNTP Gemisch, der Primer-Lösungen und des $MgCl_2$ entsprechend dem Protokoll angefertigt und in Tubes verteilt. Nach Zugabe der Template-DNA und genomischer DNA als Positiv- sowie Wasser als Negativkontrolle wurden die Tubes in den Thermozykler gegeben und das Thermozyklus-Programm gestartet. Dieses lief wie folgt ab:

Vorgang	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung:	95	5 min
Denaturierung:	95	30 s
Annealing:	58	50 s
Polymerisation:	72	1 min
abschließende Polymerisation:	72	3 min
Zyklen: 38		

2.7.2 Detektion

Anschließend wurde das PCR-Produkt durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand seiner Molekülgröße identifiziert. Hierfür wurde 3 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer gegeben und in einer Mikrowelle für 1 min aufgekocht. Nach Mischen und Abkühlen wurden 10 µl Ethidiumbromid zugegeben und wiederum gemischt. Anschließend wurde das Gel gegossen und nach dem Abkühlen mit TAE-Puffer bedeckt. Nun wurden jeweils 10 µl der Proben mit 1 µl Bromphenolblau gemischt und in die Geltaschen geladen. In die erste Geltasche wurden 10 µl eines Basenpaarleiters gegeben. Jetzt wurden die Proben bei 120 V und 300 A für 10 min aufgetrennt und das Gel anschließend Photographiert.

2.7.3 Mixturen und Primer

Reaktionsgemisch:	104,5 µl H ₂ O dest. 22 µl Puffer 8,25 MgCl ₂ 5,5 dNTP 11 µl Primer 44 µl Q-Solution 2,75 µl Taq-Polymerase 198 µl Gesamtvolumen
-------------------	---

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):	242,3 g/l Tris 18,6 g/l EDTA-Na ₂ 60,05 g/l Acetat
---------------------------------------	---

Primer:

muriner CB2R:	10 pmol/µl	
CB2-forward:		5' – CCC TAC CTG TAA TCC CAG CA – 3'
CB2-backward :		5' – GCA GTC TGT GCT CTC AAC CA – 3'

murines β-actin:	4 pmol/µl	
β-actin mouse forward:		5' – CAT TGC TGA CAG GAT GCA GAA – 3'
β-actin mouse backward:		5' – GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA – 3'

2.8 Immunhistochemie

Von den vorher in Paraffin gebetteten Stücken der Pankreata wurden jeweils ca. sechs 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und zu je 2 - 3 Schnitten auf zwei Objektträger verteilt. Ein Objektträger wurde später zur Analyse und der andere als Negativ-Kontrolle verwendet. Danach wurde das Gewebe durch je 5-minütige Spülungen mit Xylol und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %, 50 % Ethanol, 100 % Aqua dest.) entparaffiniert und rehydriert. Nach 3

5-minütigen Waschgängen mit TBS wurde das Gewebe in Citratpuffer (pH 6,0) für 30 min bei 120°C im Autoklaven aufgekocht, um die Proteine zu demaskieren. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschgängen mit TBS wurde die endogene Peroxidase durch Zugabe von 0,3 %igem H₂O₂ (in Methanol) für 10 min bei Raumtemperatur geblockt und anschließend zuerst 3 mal für je 5 min mit TBS-Tween (0,1 % Tween 20, pH 7,4) gewaschen und danach für 45 min bei Raumtemperatur mit Blotto (1 % BSA und 1 % Milch in TBST) geblockt. Die Inkubation mit dem CB2-Antikörper (CB2-Receptor Polyclonal Antibody, Cayman Chemicals, Katalognr.: 101550, Verdünnung 1:100 in Blotto) erfolgte nun bei 4°C über Nacht. Der Objektträger mit den Negativ-Kontrollen wurde nicht mit dem 1. Antikörper inkubiert, ansonsten gleich behandelt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe erneut 3 mal für je 5 min mit TBST gewaschen und daraufhin mit dem mitgelieferten Super Enhancer (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Peppenbütteler Chaussee 36, 22397 Hamburg) vorbehandelt. Nach erneutem 3-maligem Waschen in TBST für je 5 min folgte die Inkubation mit einem an Meerrettichperoxidase gebundenen 2. Antikörper für 20 min bei Raumtemperatur (Polymer-HRP IHC-kit ebenfalls von DCS). Nach erneutem 3-maligem Waschen in TBST für je 5 min folgte die Visualisierung durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) für ca. 5 min bei Raumtemperatur. Es folgte ein Waschgang mit destilliertem Wasser für 5 min und die Gegenfärbung mit Hämalaun (1:10 in H₂O) für 5 min. Abschließend folgten eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100%) und Behandlung mit Xylol für 10 min bei Raumtemperatur. Die fertigen Präparate wurden von zwei unabhängigen Beobachtern auf verblindete Art und Weise mikroskopiert (Mikroskop: Olympus BX41, Vergrößerungen: 200 / 400, Software: Olympus Cell[^]A) und bewertet.

2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Westernblot- und der Trypsin-Proben wurde die Methode nach Bradford angewandt (Bradford 1976). Dies ist eine empfindliche Methode zur quantitativen, photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration. Sie beruht auf der Komplexbildung des Triphenylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit den kationischen und hydrophoben Seitenketten der Proteinkomplexe. Der ungebundene Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum bei 465 nm (rot). Durch die Komplexbildung kommt es zu einer Ladungsverschiebung innerhalb des Farbstoffes, und das Absorptionsmaximum

verschiebt sich auf 595 nm (Compton and Jones 1985). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm gegenüber der Nullprobe ist proportional zur Proteinkonzentration.

Nach der Homogenisation der Westernblot-Proben (vor dem Mischen mit SDS und Mercaptoethanol, siehe Abschnitt 2.6.1) und der Trypsin-Proben wurden diesen nach dem Mischen im Vortex-Mischer jeweils 5 µl entnommen und mit 45 µl destilliertem Wasser auf 1:10 verdünnt. Das Protein-Dye Reagenz wurde auf 1:5 verdünnt und jeweils zu 1 ml in Plastikküvetten verteilt. Zu Anfang jeder Messung wurde eine Eichgerade hergestellt. Hierfür wurde ein BSA Proteinstandard mit definierter Konzentration mit dem 1:5 verdünnten Protein-Dye-Reagenz gemischt, um die verschiedenen Konzentrationen für die Standardreihe zu erhalten. Für die Messung wurden jeweils 10 – 20 µl der Proben für die Standardreihe und der zu untersuchenden Proben in die vorbereiteten Plastikküvetten gegeben, gemischt und für mindestens 5 min inkubiert. Nun wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Auswertung wurde aus den Absorptionen der Standardreihe ein Koeffizient und die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet.

2.10 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Daten wurden die Programme SPSS Version 15.0 und Microsoft Excel 2007 verwendet. Die Diagramme zeigen jeweils die Mittelwerte und die Fehlerbalken den einfachen Standardfehler (S.E.M.). Die Signifikanzen wurden mit dem Student-T-Test für unabhängige Stichproben bestimmt ($p < 0,05$ wurde als Signifikant definiert).

2.11 Sonstiges Material

2.11.1 Chemikalien

Firma	Präparat	Vollnamen, Artikelnr.	Verwendungszweck
R&D Systems, Inc, 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA	ELISA IL-6 Kit	Quantikine® Mouse IL-6 Kit	IL-6 Bestimmung
QIAGEN QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden	HotStarTaq DNA Polymerase; 10x PCR Buffer, 5x Q-Solution, 25 mM MgCl ₂	203203	PCR: CB2-Rezeptor
Abbott GmbH & Co. KG Wiesbaden, Dtl.	Forene	Isofluran (1-Chloro- 2,2,2,-trifluorethyl- difluoromethylether)	Narkosegas
Aldrich	Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂ 30%	
AMERSHAM BIOSCIENCE Freiburg, Dtl	Anti-mouse IgG	peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) NA 931	Antikörper
AMERSHAM BIOSCIENCE Freiburg, Dtl	Anti-rabbit IgG	peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey) NA 934	Antikörper
Bachem, Bubendorf, Schweiz	Trypsin Substrat	Bachem I-1550	Substrat zur Trypsin- Bestimmung
BIO RAD München, Dtl.	Blotting Grade	Blocking Non Fat Dry Milk	
BIO RAD München, Dtl.	Protein Dye	Protein Assay Dye reagent concentrate	Protein-Bestimmung
BIO RAD München, Dtl.	TEMED		Quervernetzung des SDS-Gel Pages
Calbiochem, USA	Proteaseinhibitor	Cat# 539131	Protease-Inhibierung
Cayman Chemicals,	CB2-Rezeptor Polyclonal Antibody	Katalognr.: 101550	
Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Dtl	phospho p38	Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody #9211	Antikörper
Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Dtl	phospho SAPK/JNK	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody #9251	Antikörper

Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Dtl	SAPK/JNK	SAPK/JNK Antibody #9252	Antikörper
FLUKA Biochemika Seelze, Dtl.	BSA	Bovines Serum Albumin	Blocking Lösung
FLUKA Biochemika Seelze, Dtl	SDS	Sodium dodecyl sulfat $C_{12}H_{25}NaO_4S$	
MERCK Darmstadt, Dtl.	TRIS	Tris(hydroxy- methyl)- aminomethan $H_2NC(CH_2OH)_3$	
Pharmacia&Upjohn Uppsala, S	Glycin	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Amylase Bestimmung
PIERCE Bonn, Dtl.	Phadebas-Tabletten	Phadebas Amylase Test	
R&D	ELISA IL-6 Kit		ELISA IL 6 Bestimmung
Roth	Tween 20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate	Blocking-Lösung
Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA	p38 phospho ATF2 (F1) ATF2 (N96)	sc-535	Antikörper
Sigma Seelze, Dtl.	MOPS	(3-N-Morpholino) propanesulfonic acid $C_7H_{15}NO_4S$	
Sigma Seelze, Dtl.	o-Dianisidine	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	
Sigma Seelze, Dtl.	Cerulein	pGlu-Gln-Asp- Tyr[SO ₃ H]-Thr-Gly- Trp-Met-Asp-Phe- NH ₂	Stimulation
Sigma Seelze, Dtl.	EDTA	EDTA $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$	
Sigma Seelze, Dtl.	APS	Ammonium Persulfat $(NH_4)_2S_2O_8$	Auslösung der Polymerisationsreaktion im SDS-Gel
Sigma Seelze, Dtl.	Trypsin	T-4665	Kalibrier-Kontrolle
Sigma Seelze, Dtl.	SBTI	Trypsin inhibitor, Type I-S From Soybean T9003	Trypsin-Bestimmung
Sigma Seelze, Dtl.	PMSF	Phenylmethylsulfat- flourid	
Sigma Seelze, Dtl.	Natrium orthovandate	Na_3VO_4	Funktion als Protease- Inhibitor

2.11.2 Geräte

Firma	Gerät
Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK	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, Käbme, Glasplatten
B. Braun, Dtl.	Wasserbad Thermomix 1441
Corning, NY, USA	Stripette (2ml – 25ml)
Dräger, Lübeck, Dtl.	Isofluran Vaporator
Eppendorf, Hamburg, Dtl.	MiniSpin Zentrifuge Pipetten Zentrifuge 541712
Fröbel Labortechnik, Lindau, Dtl.	Kreisrüttler Rocky 3D
GFL, Burgwedel, Dtl.	Wasserbad GFL 1083
Hettich, Dtl.	Zentrifuge EBA 12R
Hybraid	Mini Oven Trockenofen
IKA Werke, Staufen, Dtl.	Magnetrührer RTCbasic
Kinematika, Luzern, Ch.	Polytron Homogenisator PT 2100
Millipore	MilliQ A10TOC Entsalzungsanlage
NeoLab, Heidelberg, Dtl.	Vortex Mixer 2020
PerkinElmer	Luminescence Spectrometer LS 50B
Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.	Einmal-Küvetten, 10x4x45mm Ref. 67.742
Satorius, Göttingen, Dtl.	Analysenwaage
Scaltec, Heiligenstadt, Dtl.	Waage
Schleicher & Schüll, Dassel, Dtl.	Gel-Blotting Papier Nitrocellulosemembran „Protran“
Schütt, Dtl.	HomogenPlus Teflon-Pistille Glaskolben konisch 40ml
Techne	DriBlock DB 2A Heizblock
WTW, Weilheim, Dtl.	pH-Meter InoLab pH Level 1

3 Ergebnisse

3.1 Rezeptor-Nachweis

Der Nachweis der Expression des CB2-Rezeptors im Pankreasgewebe erfolgte zum einen auf mRNA-Ebene durch RT-PCR und zum anderen auf Protein-Ebene durch Westernblot. Zusätzlich wurde die genaue Verteilung der CB2-Rezeptoren im Pankreasgewebe mittels Immunhistochemie untersucht.

3.1.1 RT-PCR

Bei der RT-PCR wurde Gewebe von Hirn, Milz, Herz sowie der Pankreata der Versuchstiere miteinander verglichen. Die mRNA des CB2-Rezeptors ließ sich in allen Pankreasproben sowie der Milz nachweisen.

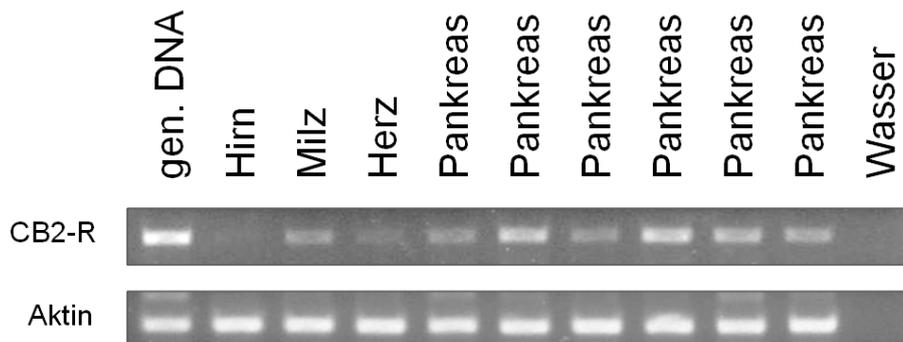


Abbildung 13: Nachweis der Expression der CB2-Rezeptoren im exokrinen Pankreas durch RT-PCR

Genetische DNA diente als Positiv- und Wasser als Negativkontrolle. Es ließ sich ein positives Signal in sämtlichen Pankreasproben sowie der Milz nachweisen.

3.1.2 Westernblot

Durch Westernblot ließ sich das Protein des CB2-Rezeptors mit starkem Signal im Pankreasgewebe sowie mit schwächerem Signal im Hirn und der Milz der Versuchstiere nachweisen.

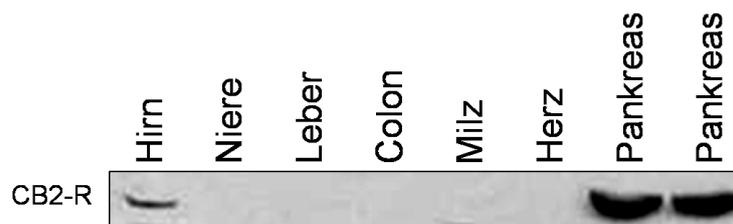


Abbildung 14: Nachweis des CB2-Rezeptors im exokrinen Pankreas durch Westernblot

3.1.3 Immunhistochemie

Die Expression bzw. Verteilung der CB2-Rezeptoren im Gewebe des exokrinen Pankreas wurde durch Immunhistochemie in physiologischen Bedingungen (NaCl-Gruppe) und bei der Pankreatitis (Cerulein-Gruppe) untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Aktivierung (JWH133-Gruppe) bzw. Antagonisierung (AM630-Gruppe) der CB2-Rezeptoren auf deren Expression untersucht, um eventuelle Regulierungsmechanismen aufzudecken. In den Kontrolltieren, die kein Cerulein erhalten hatten, ließ sich ein schwaches Signal des CB2-Rezeptors auf Gang-, Nerven- und Azinuszellen beobachten. Nach dem Auslösen der Pankreatitis kam es zu einer leichten Erhöhung der Expression der CB2-Rezeptoren auf den Azinus- sowie Gangzellen. In nekrotischem Gewebe kam es hingegen zu einer starken Zunahme der Immunreaktivität auf den Azinuszellen. Die Negativ-Kontrollen, die nicht mit dem 1. Antikörper inkubiert wurden, zeigten keine Immunreaktivität, was auf eine spezifische Reaktion schließen lässt. Die Vorbehandlung mit dem CB2-Agonisten (JWH133) sowie Antagonisten (AM630) hatte weder bei den Kontrolltieren noch bei den Pankreatitis-Tieren einen signifikanten Einfluss auf die Expression der CB2-Rezeptoren. Eine Übersicht zeigt Abbildung 15.

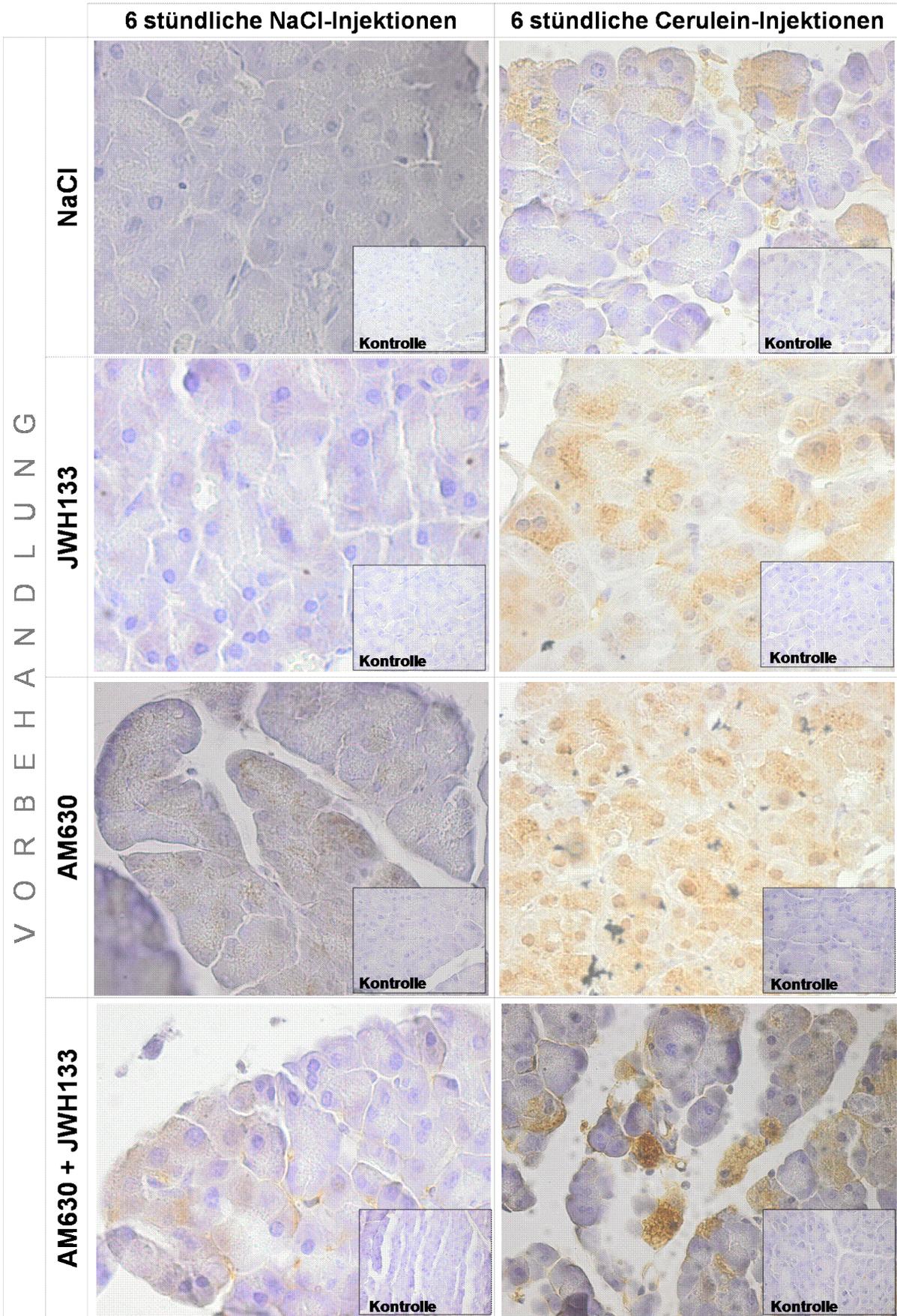


Abbildung 15: Immunhistochemische Untersuchung der CB2-Rezeptor Expression im exokrinen Pankreas

3.2 Tierversuche

Als Basiswert für die Bewertung sämtlicher Parameter diente die nur mit NaCl behandelte Gruppe. Die Tiere, die die Pharmaka (AM630 und JWH133), jedoch kein Cerulein erhielten, verhielten sich hinsichtlich der Laborparameter grundsätzlich gleich oder ähnlich wie die der NaCl-Gruppe. Der besseren Übersicht wegen wird in den Erklärungen der klinischen Parameter nicht näher auf sie eingegangen werden.

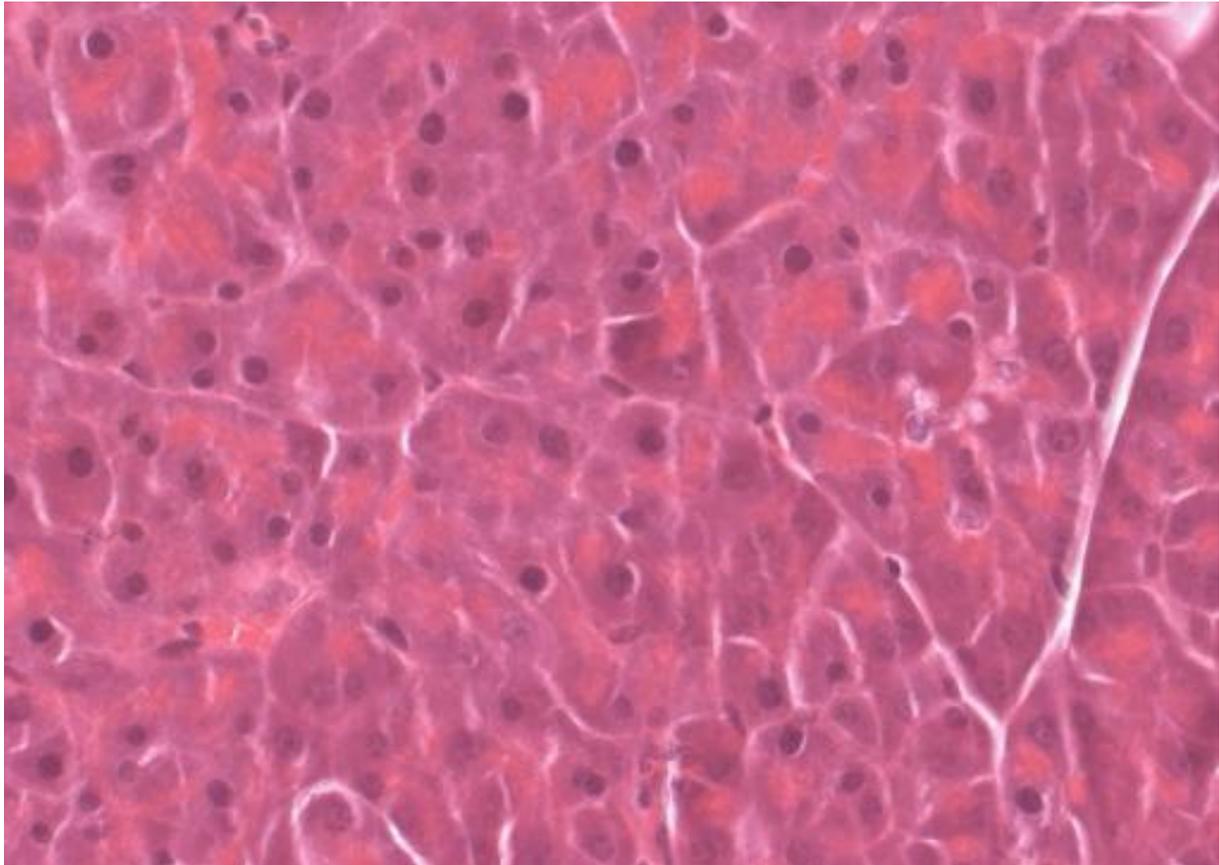


Abbildung 16: Histologie des exokrinen Pankreas eines nur mit NaCl behandelten Tieres (HE-Färbung)

Das normale Pankreasgewebe zeigt die polaren Azinuszellen mit apikal gelegenen, azidophilem Sekretionsgranula. Zwischen den Azini befinden sich Fibrozyten, zwischen denen eingebettet die Aufzweigungen der Blutgefäße und der Nerven verlaufen. Es zeigt sich kein Anzeichen für Ödem, erhöhter Vakuolisierung, Einwanderung von Immunzellen oder Nekrose.

Die repetitiven Gaben Cerulein führten bei den Versuchstieren wie erwartet zur Ausbildung einer akuten Pankreatitis, was in einem starken Anstieg aller gemessenen Parameter deutlich wurde. Das aktivierte Trypsin (+ 73 %), die Aktivität der Amylase (+ 173 %), IL-6 (+ 82 %) und der Ödemisierungsgrad (+ 29 %) stiegen dabei mit einer Signifikanz von $p < 0,01$, die Aktivität der MPO in der Lunge (+ 114 %) mit einer Signifikanz von $p < 0,05$. Hinsichtlich der Stresskinasen kam es zu einer leicht verminderten Phosphorylierung von p38 (- 50 %, $p < 0,01$) und einer erheblich verstärkten Phosphorylierung der JNK (+ 351 %, $p < 0,01$).

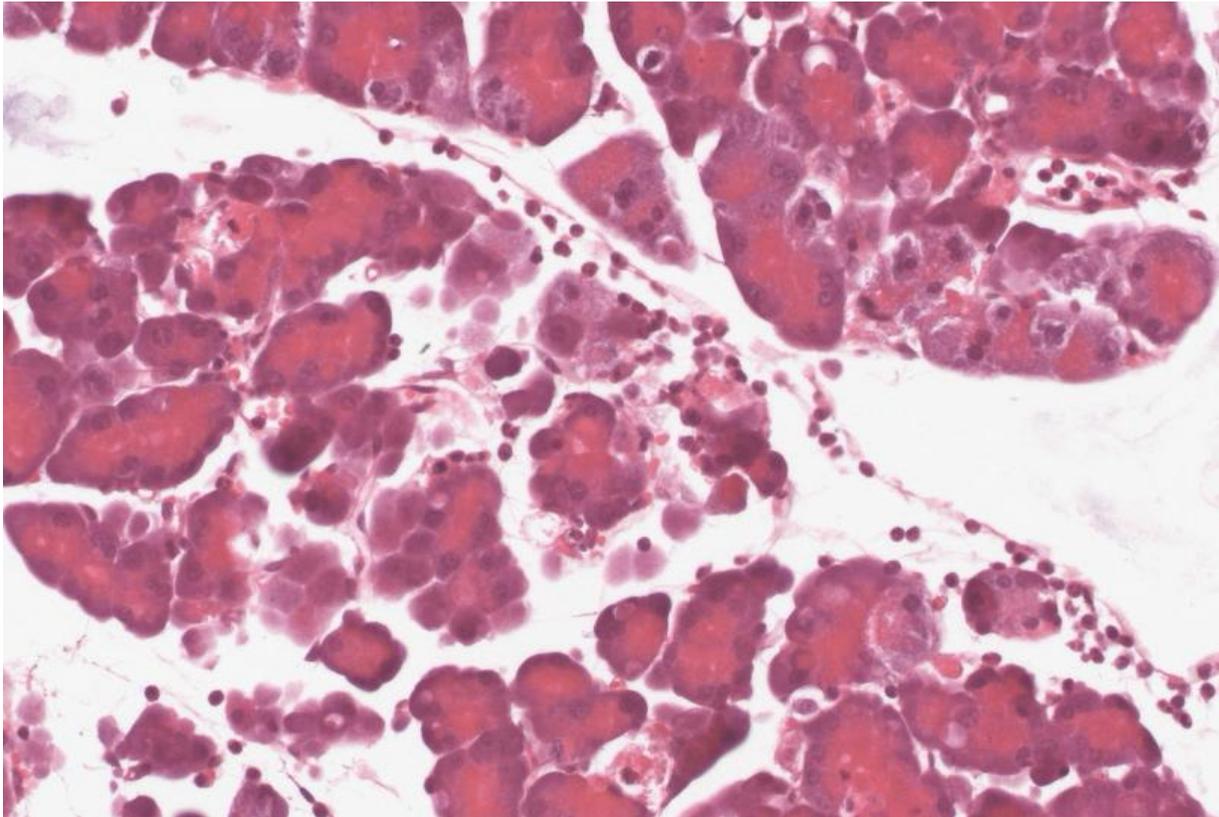


Abbildung 17: Histologie des exokrinen Pankreas eines mit Cerulein behandelten Tieres (HE-Färbung)

Es zeigt sich das histologische Bild der akuten Pankreatitis mit erhöhter (azidophiler) intraacinarer Vakuolisierung, Ödembildung, der Einwanderung von Immunzellen wie neutrophiler Granulozyten und vereinzelterm Auftreten von Nekrosen.

Die Wirkung der Pharmaka auf den Schweregrad der Pankreatitis wird jeweils in Relation zur Cerulein-Gruppe bewertet werden. Als Referenzwerte dienen dabei die durch Cerulein-Gabe verursachten Anstiege der Laborparameter, also die Differenz der Mittelwerte der Cerulein-Gruppe und der der NaCl-Gruppe. Wirkt sich ein Pharmakon z.B. protektiv aus, so bedeutet dies, dass die klinischen Parameter weniger stark ansteigen als die der Cerulein-Gruppe. Es kommt also zu einer Reduktion des Anstiegs. Diese errechnet sich wie folgt:

$$\frac{([X \text{ Gruppe}] - [NaCl \text{ Gruppe}]) - ([Cerulein \text{ Gruppe}] - [NaCl \text{ Gruppe}])}{[Cerulein \text{ Gruppe}] - [NaCl \text{ Gruppe}]}$$

Grundsätzlich wurde die Phosphorylierung der Stresskinasen in allen Versuchstieren bestimmt. Der besseren Übersicht halber werden pro Versuchssetting exemplarisch ein Westernblot der p38- und einer der JNK-Phosphorylierung gezeigt. Die Auswertungen der Pixelmessungen der Westernblots enthalten die Daten aller Versuchstiere.

3.2.1 Versuche mit Wildtyp Mäusen

3.2.1.1 Prophylaktische CB2-Stimulation

3.2.1.1.1 Histologie

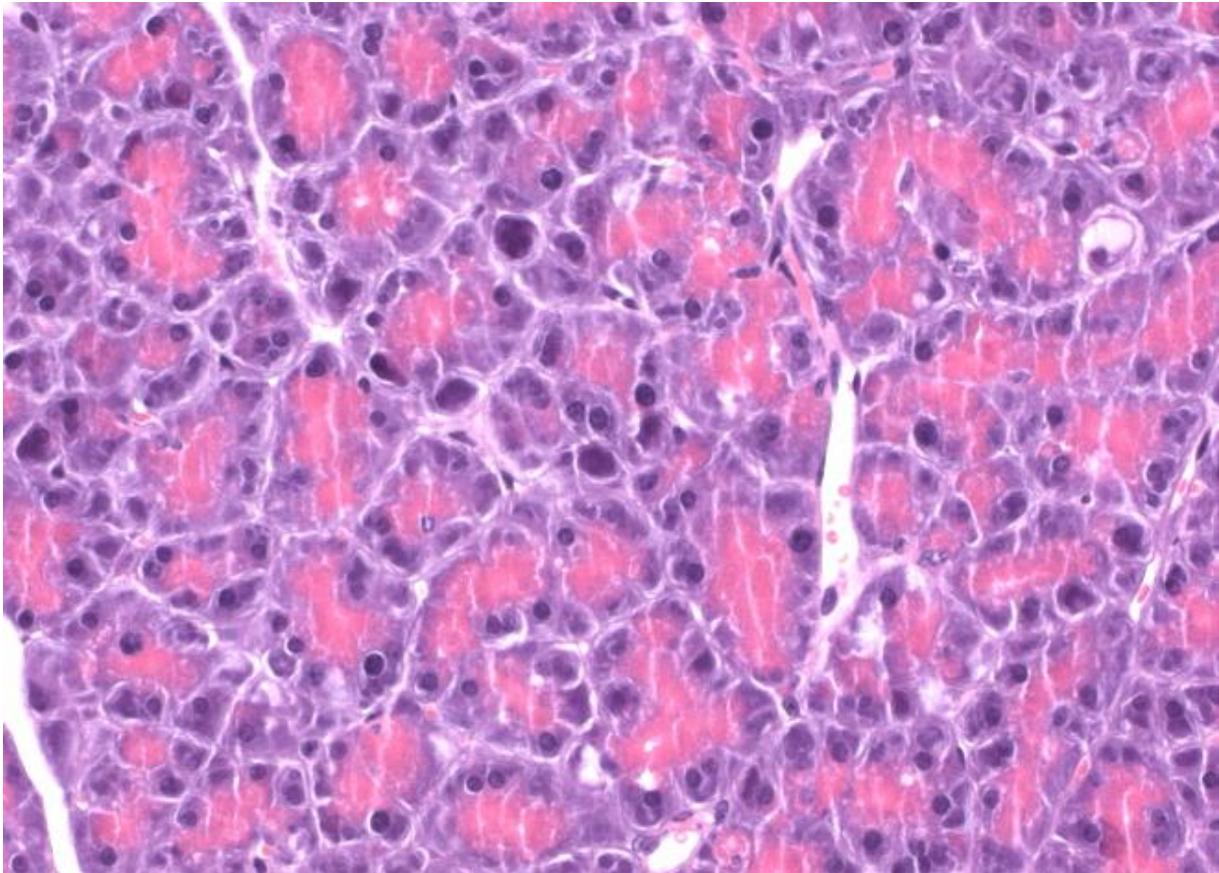


Abbildung 18: Histologie des exokrinen Pankreas eines mit JWH133 und Cerulein behandelten Tieres

Es zeigt sich das Bild der akuten Pankreatitis. Dieses ist gegenüber der Cerulein-Gruppe abgeschwächt mit einer geringeren Ödembildung, einer verminderten (azidophilen) Vakuolisierung und nur sehr vereinzeltm Auftreten von Nekrosen. Im Vergleich zur Cerulein-Gruppe ist eine starke Verminderung der Immigration von Immunzellen zu erkennen.

3.2.1.1.2 Einfluss auf die klinischen Parameter

Die Vorbehandlung mit JWH133 wirkte sich protektiv gegenüber den Cerulein-Injektionen aus und resultierte in abgeschwächten Anstiegen sämtlicher Parameter. Dies ließ sich besonders ausgeprägt beim aktivierten Trypsin mit einer Reduktion des Anstiegs um - 92 % ($p < 0,01$) sowie beim IL-6 mit einer Reduktion des Anstiegs um - 62 % ($p < 0,05$) beobachten. Die Abschwächungen der Anstiege der Aktivitäten der MPO (- 7 %, n.s.), der Amylase (- 8 %, n.s.) und des Ödemisierungsgrades (- 17 %, n.s.) fielen leichter aus und waren nur als Trend beobachtbar.

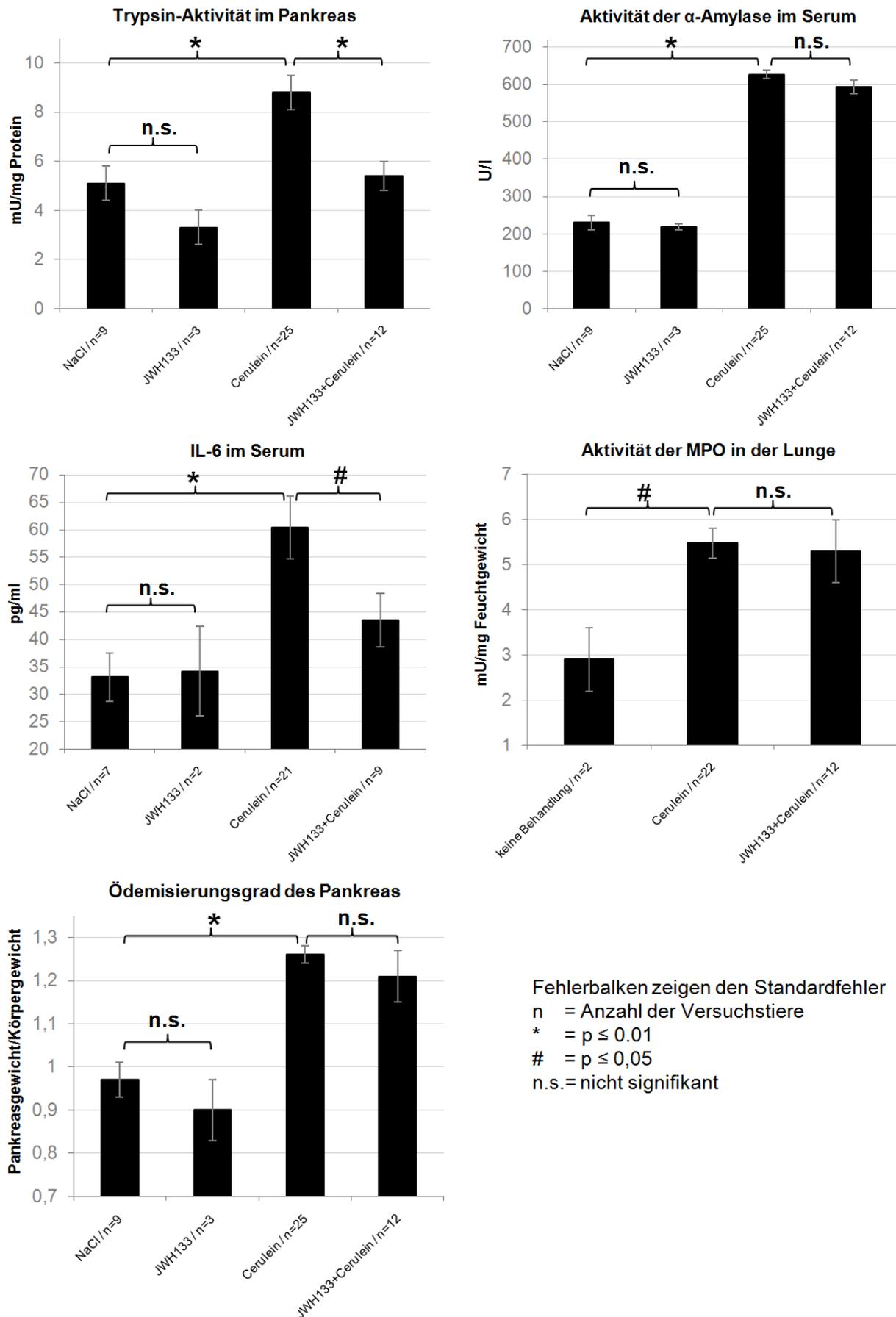


Abbildung 19: Einfluss der JWH133-Vorbehandlung auf die klinischen Parameter in Wildtyp Mäusen

3.2.1.1.3 Einfluss auf die Stresskinasen-Phosphorylierung

3.2.1.1.3.1 p38

Die Vorbehandlung mit JWH133 führte zu einer verstärkten p38-Phosphorylierung. Dies ließ sich sowohl bei den Kontrolltieren im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Tieren (+ 255 %, $p < 0,01$) als auch nach der Induktion der Pankreatitis durch Cerulein (+ 119 %, $p < 0,05$) nachweisen.

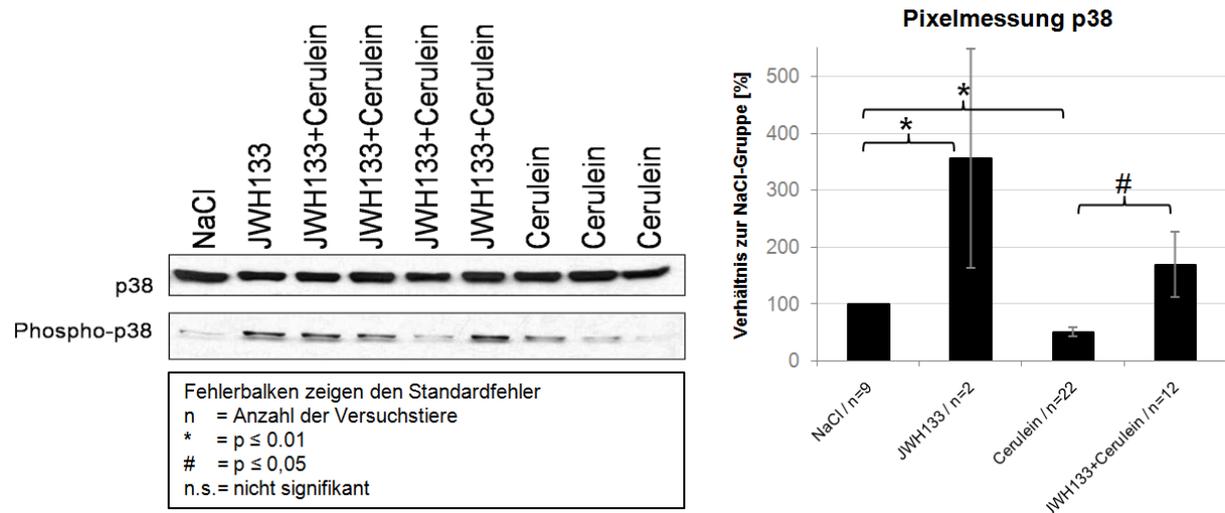


Abbildung 20: Einfluss der JWH133-Vorbehandlung auf die p38-Phosphorylierung in Wildtyp Mäusen

3.2.1.1.3.2 JNK

Die Vorbehandlung mit JWH133 hatte zwar einen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung der JNK bei den Kontrolltieren (+ 74,8 %, $p < 0,01$), dieser war jedoch bei den mit Cerulein behandelten Tieren nicht mehr nachzuweisen (+ 5,3 %, n.s.).

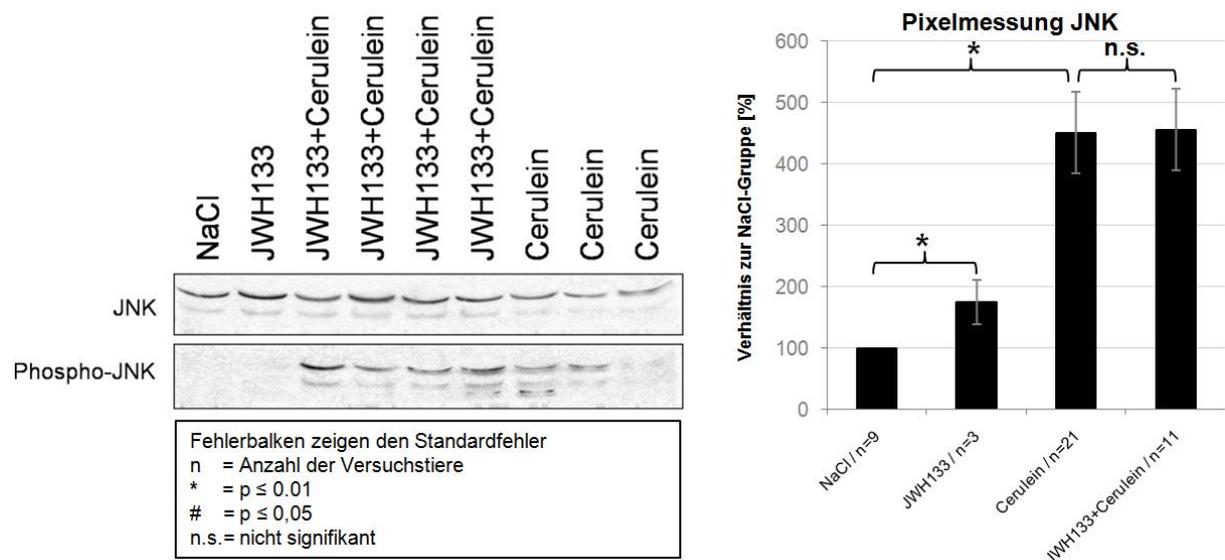


Abbildung 21: Einfluss der JWH133-Vorbehandlung auf die JNK-Phosphorylierung in Wildtyp Mäusen

3.2.1.2 Prophylaktische CB2-Antagonisierung

3.2.1.2.1 Histologie

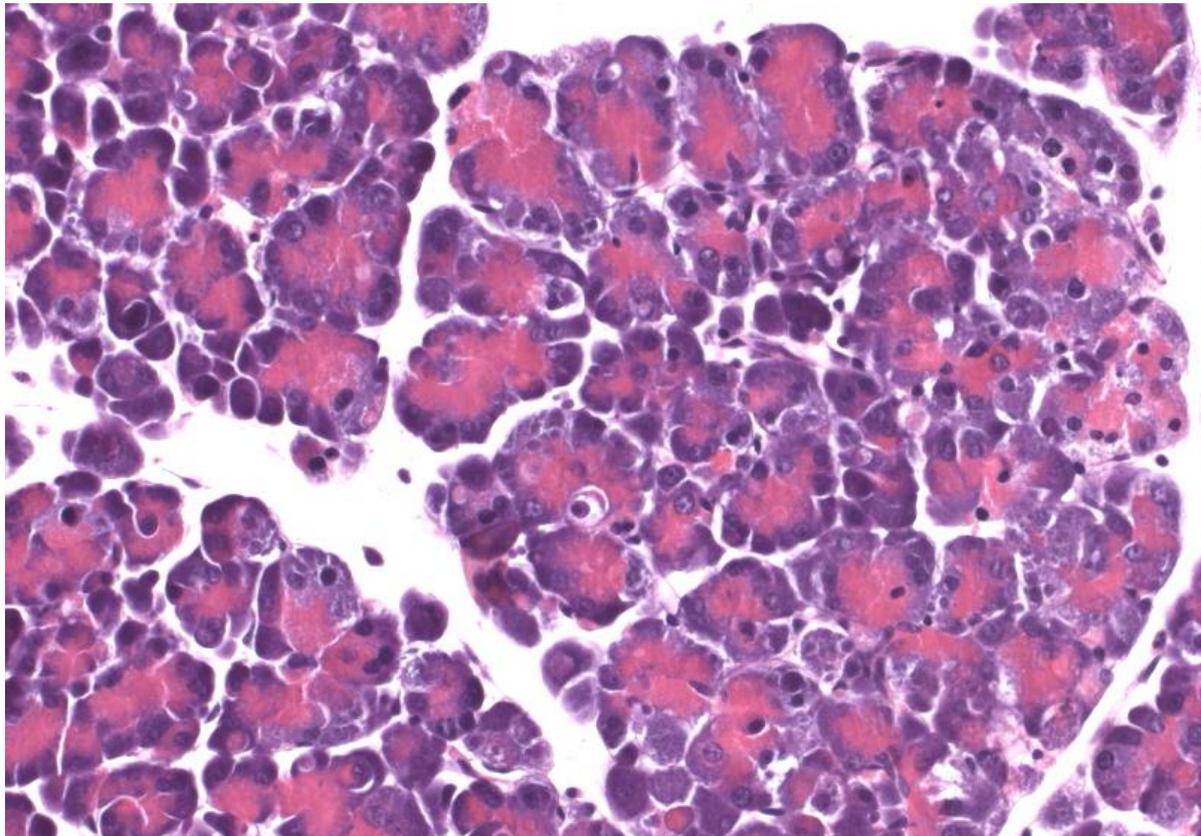


Abbildung 22: Histologie eines mit AM630 und Cerulein behandelten Tieres (HE-Färbung)

Es zeigt sich das Bild der akuten Pankreatitis mit stark erhöhter (azidophilen) Vakuolisierung, Ödembildung, verstärkter Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und dem Auftreten von Nekrosen. Im Vergleich zur Cerulein-Gruppe lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen.

3.2.1.2.2 Einfluss auf die klinischen Parameter

Die Vorbehandlung mit AM630 führte nach dem Auslösen der Pankreatitis zu einem stark erhöhten Anstieg der gemessenen Laborwerte. Besonders die systemischen Parameter IL-6 im Serum und die Aktivität der MPO in der Lunge stiegen drastisch an. Nach Cerulein-Administration stiegen die IL-6 Serumspiegel bei den mit AM630 vorbehandelten Tieren um 196 % stärker an als bei den nicht vorbehandelten Tieren ($p < 0,01$). Die Aktivität der Myeloperoxidase stieg um 195 % stärker an ($p < 0,01$). Die für das Pankreas spezifischen Parameter, aktiviertes Trypsin (+ 27 %, n.s) und der Ödemisierungsgrad (+ 21 %, n.s.) stiegen im Verhältnis nur leicht verstärkt an oder blieben wie im Falle der Aktivität der Amylase annähernd unverändert (- 6 %, n.s.).

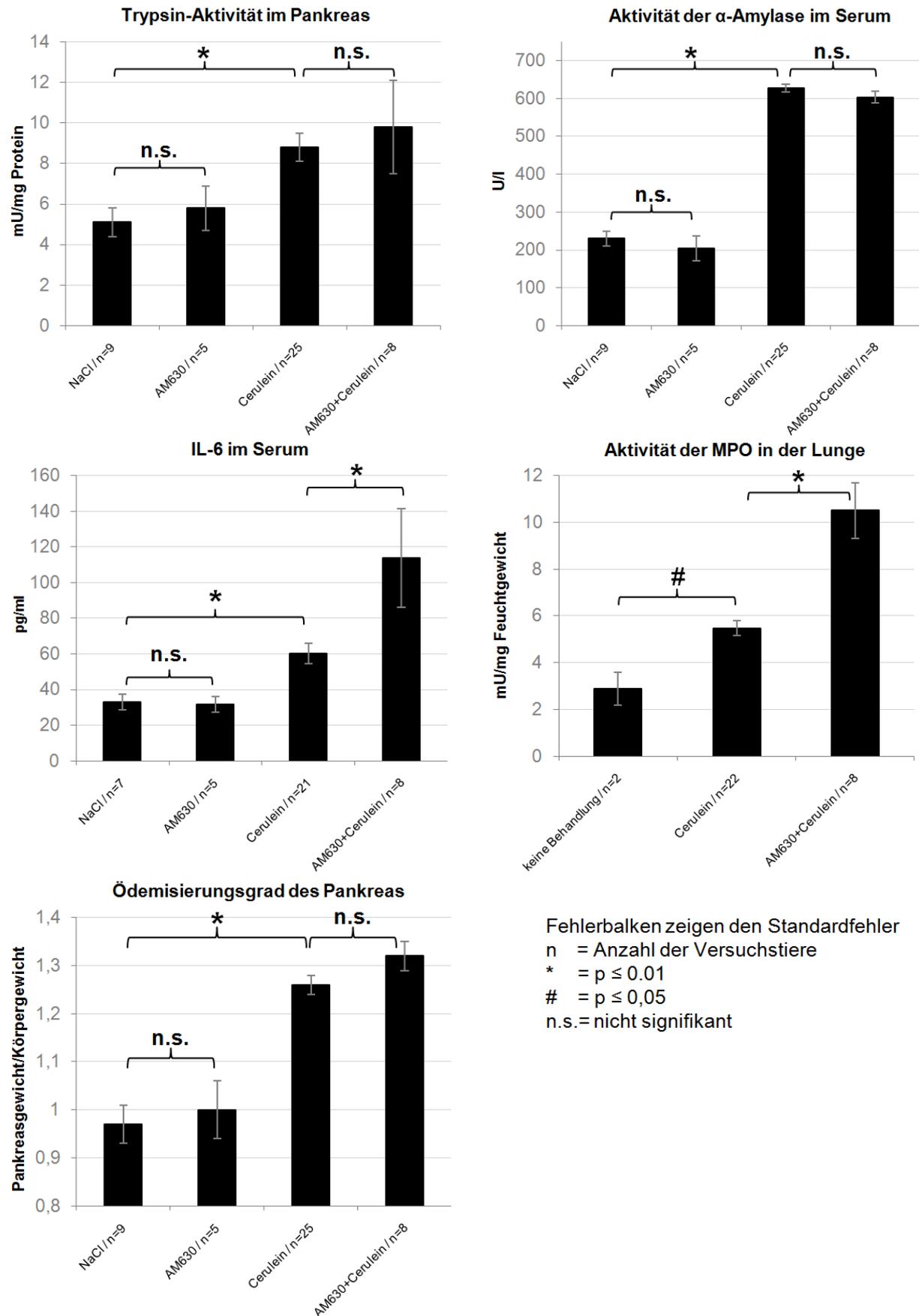


Abbildung 23: Einfluss der AM630-Vorbehandlung auf die klinischen Parameter in Wildtyp Mäusen

3.2.1.2.3 Einfluss auf die Stresskinasen-Phosphorylierung

3.2.1.2.3.1 p38

AM630 hatte weder bei den Kontrolltieren noch bei den mit Cerulein behandelten Tieren einen signifikanten Einfluss auf die p38-Phosphorylierung.

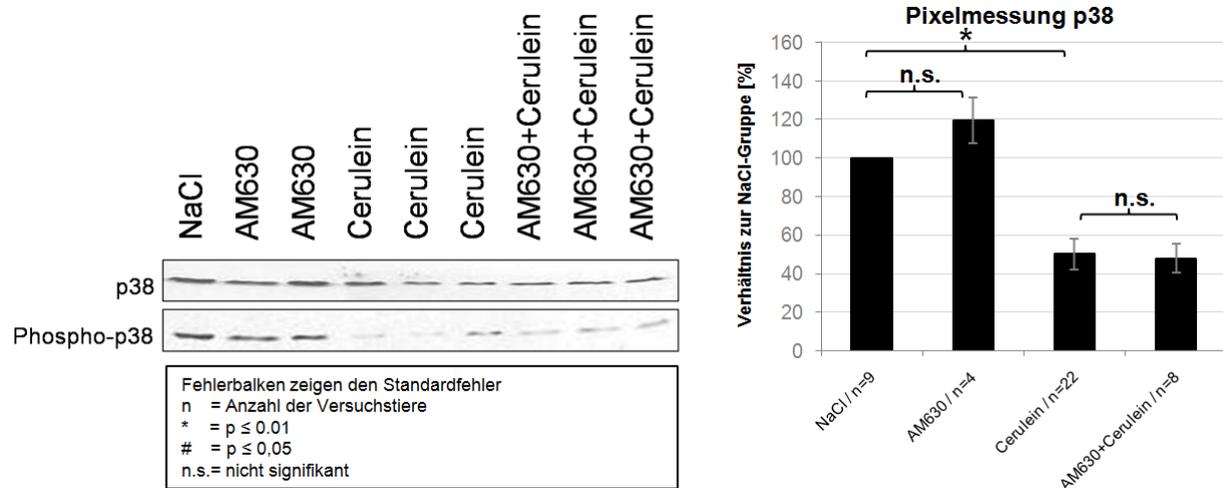


Abbildung 24: Einfluss der AM630-Vorbehandlung auf die p38-Phosphorylierung in Wildtyp Mäusen

3.2.1.2.3.2 JNK

Die Gabe des CB2-Antagonisten führte bei den Kontrolltieren zu einer leicht verstärkten JNK-Phosphorylierung (+ 54 %, $p < 0,05$). Nach der Auslösung einer Pankreatitis durch Cerulein kam es zu einer drastisch verstärkten Phosphorylierung der JNK durch die Vorbehandlung mit dem CB2-Antagonisten (+ 204 %, $p < 0,01$).

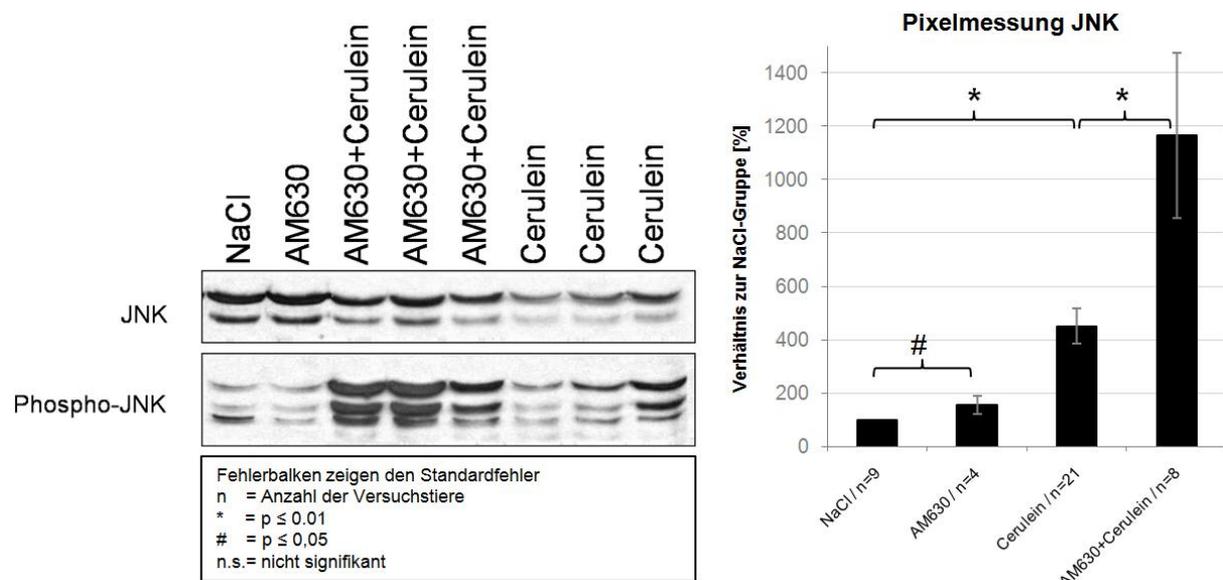


Abbildung 25: Einfluss der AM630-Vorbehandlung auf die JNK-Phosphorylierung in Wildtyp Mäusen

3.2.1.3 Vorbehandlung mit Antagonist und Agonist

3.2.1.3.1 Einfluss auf die klinischen Parameter

AM630 konnte die protektive Wirkung von JWH133 auf die Cerulein-induzierte Pankreatitis hinsichtlich aller klinischen Parameter antagonisieren. Einige Parameter stiegen sogar gegenüber der Cerulein-Gruppe an. Der Anstieg fiel jedoch schwächer aus als bei den nur mit AM630 behandelten Tieren. So kam es zu einem um 103 % erhöhten Anstieg des aktivierten Trypsins ($p < 0,01$), zu einem um 57 % erhöhten Anstieg des IL-6 ($p < 0,05$), einem um 34 % erhöhten Anstieg des Ödemisierungsgrades ($p < 0,05$) und einer um 28 % erhöhten Aktivität der MPO (n.s.). Hinsichtlich der Aktivität der Amylase (- 6 %, n.s.) verhielten sich die Tiere annähernd wie die nicht vorbehandelten Tiere.

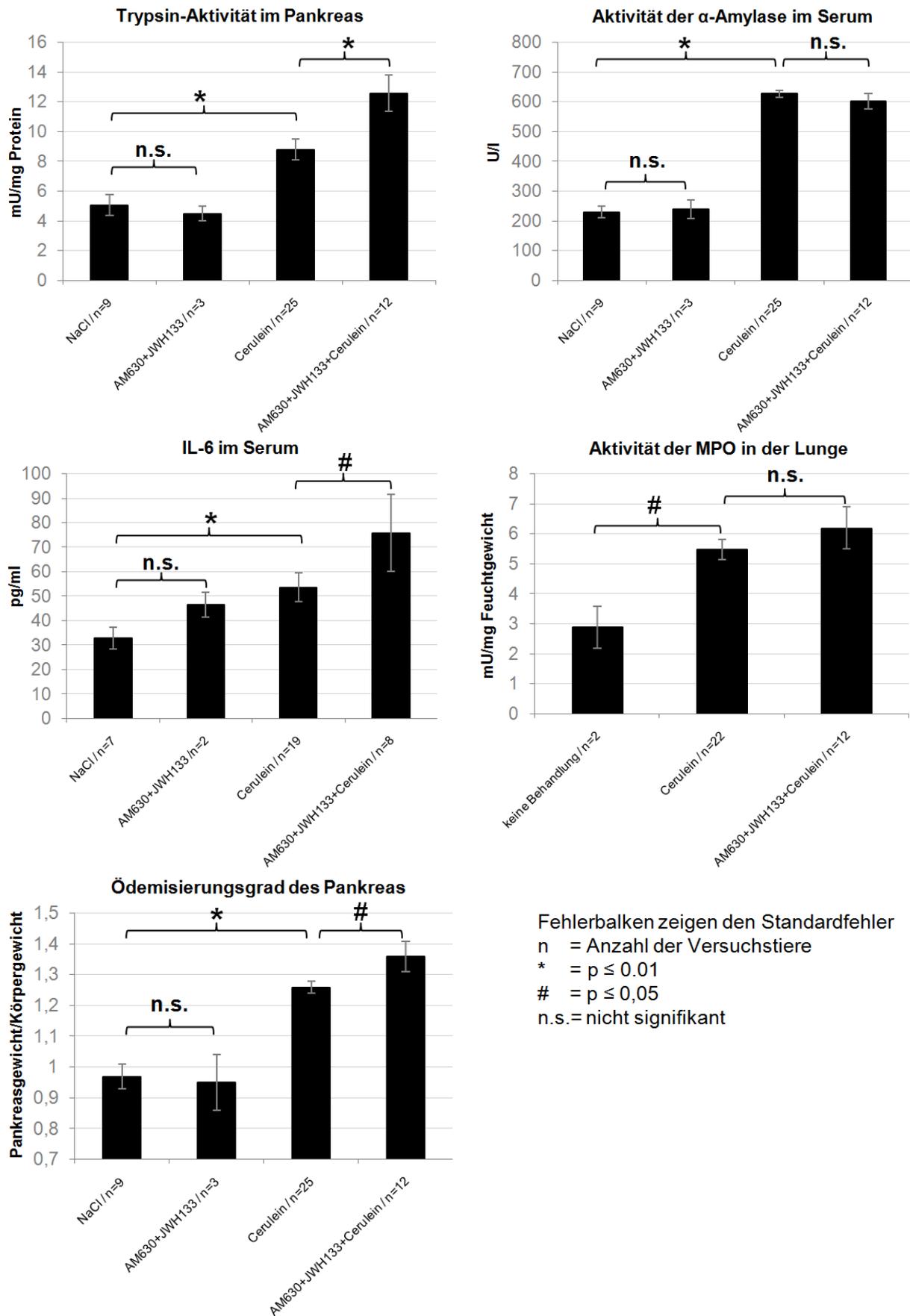


Abbildung 26: Einfluss der AM630 und JWH133 - Vorbehandlung auf die klinischen Parameter in Wildtyp Mäusen

3.2.1.3.2 Einfluss auf die Stresskinasen-Phosphorylierung

3.2.1.3.2.1 p38

AM630 konnte die Wirkung von JWH133 auf die p38-Phosphorylierung nur teilweise antagonisieren. So kam es noch immer zu einer verstärkten Phosphorylierung von p38 bei den mit beiden Medikamenten vorbehandelten Tieren. Dies konnte bei den Kontrolltieren (+ 51 %, $p < 0,05$) und den mit Cerulein behandelten Tieren (+ 39 %, n.s.) beobachtet werden, fiel jedoch schwächer aus als bei den nur mit JWH133 vorbehandelten Tieren.

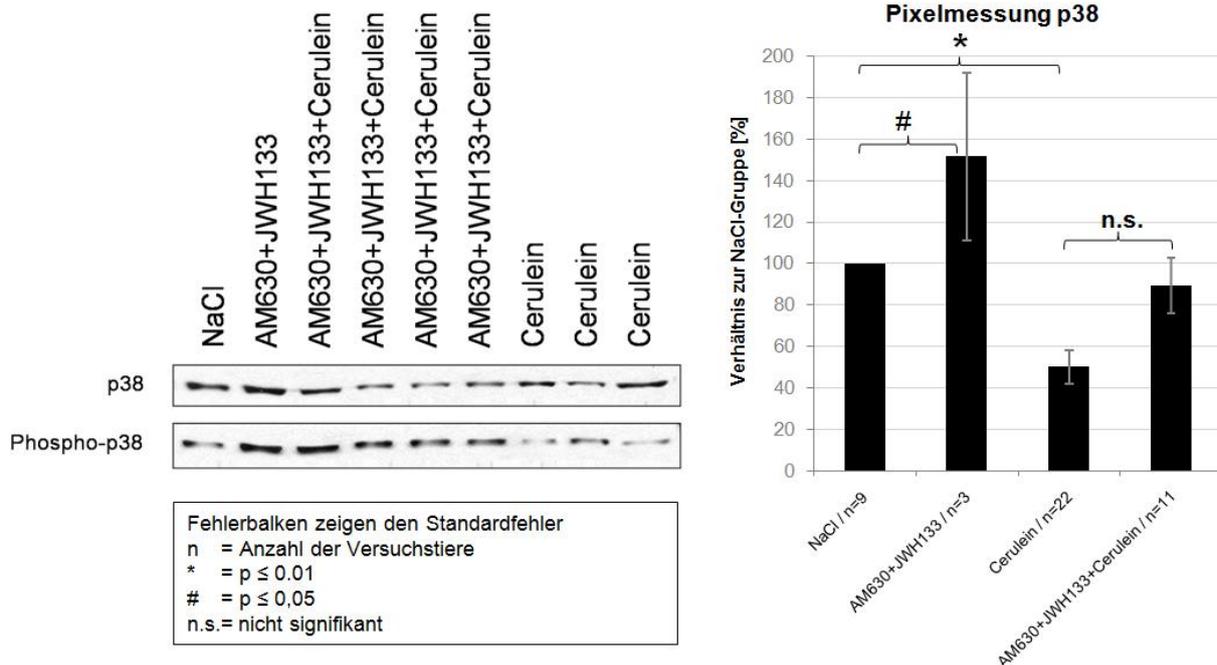


Abbildung 27. Einfluss der AM630 und JWH133 -Vorbehandlung auf die p38-Phosphorylierung in Wildtyp Mäusen

3.2.1.3.2.2 JNK

Die Vorbehandlung mit AM630 und JWH133 führte bei den Kontrolltieren zu keiner wesentlichen Veränderung der JNK-Phosphorylierung (- 6 %, n.s.). Bei den Pankreatitis-Tieren kam es zu einem leicht erhöhten Anstieg um 41 % (n.s.).

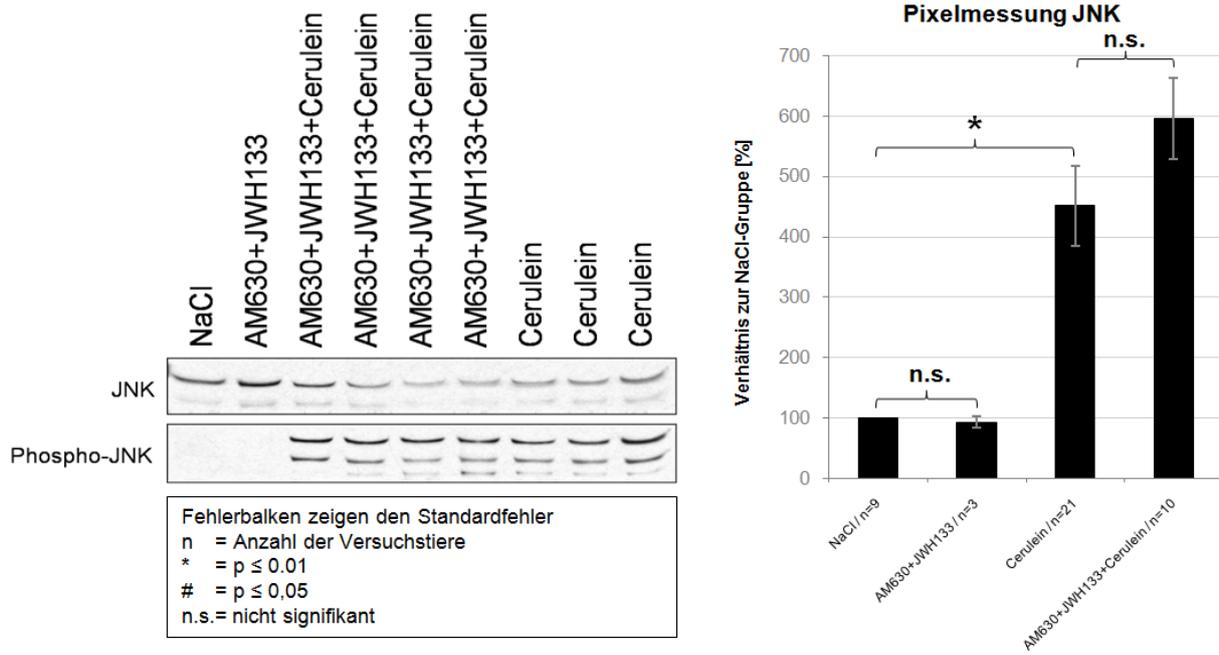


Abbildung 28: Einfluss der AM630 und JWH133 - Vorbehandlung auf die JNK-Phosphorylierung in Wildtyp Mäusen

3.2.2 Versuche mit MK2-knockout Mäusen

3.2.2.1 Wirkung auf die klinischen Parameter

Die Cerulein-Injektionen führten auch in den MK2 $-/-$ Mäusen zur Auslösung einer akuten Pankreatitis, was sich im Anstieg sämtlicher Parameter äußerte. Das aktivierte Trypsin stieg um 83 % (n.s.), die Aktivität der Amylase um 116 % ($p < 0,01$), die IL-6 Spiegel um 75 % ($p = 0,058$), die Aktivität der MPO um 30 % (n.s.) und der Ödemisierungsgrad um 55 % ($p < 0,05$).

Die prophylaktische CB2-Stimulation hatte in den MK2 $-/-$ einen ähnlichen Einfluss auf die für die Pankreatitis spezifischen Parameter aktivierte Trypsin und Aktivität der Amylase wie in den Wildtyp Tieren: Nach dem Auslösen der Pankreatitis kam es zu einem um - 15 % (n.s.) reduzierten Anstieg des aktivierten Trypsins und um - 8 % (n.s.) reduzierten Anstieg der Aktivität der Amylase. Allerdings ließ sich dies nur als Trend beobachten, was unter anderen an den geringen Stückzahlen liegen könnte. Erstaunlicherweise hatte die CB2-Stimulation in den MK2 $-/-$ bezüglich der Parameter der systemischen Inflammation genau den gegenteiligen Effekt wie in den Wildtyp Mäusen. So kam es zu einer Verstärkung der Inflammation durch JWH133. Diese äußerte sich durch einen um 287 % erhöhten Anstieg der IL-6 Spiegel ($p = 0,06$), einem um 103 % erhöhten Anstieg der Aktivität der MPO (n.s.) sowie einen um 35 % erhöhten Anstieg des Ödemisierungsgrades (n.s.).

Interessanterweise verhielt sich AM630 in den MK2 $-/-$ bezogen auf seine Wirkung in Wildtyp Mäusen analog zu JWH133. So hatte auch AM630 bezüglich des aktivierten Trypsins und der Aktivität der Amylase in den MK2 $-/-$ den gleichen Effekt wie in Wildtyp Tieren. Dies äußerte sich in einer mittleren Erhöhung des Anstiegs der Werte des aktivierten Trypsins (46 %, n.s.) und in nahezu unveränderten Werten der Amylase (- 1 %, n.s.). Bezüglich der anderen Parameter verhielt sich AM630 in MK2 $-/-$ zwar nicht grundlegend gegensätzlich wie in Wildtyp Mäusen, jedoch keinesfalls gleich. So kam es zu einer vergleichsweise sehr schwachen Erhöhung des Anstiegs des IL-6 (+ 8 %, n.s.) und der Aktivität der MPO (+ 26 %, n.s.) und sogar zu einem abgeschwächten Anstieg des Ödemisierungsgrades gegenüber der Cerulein-Gruppe um - 18 % (n.s.).

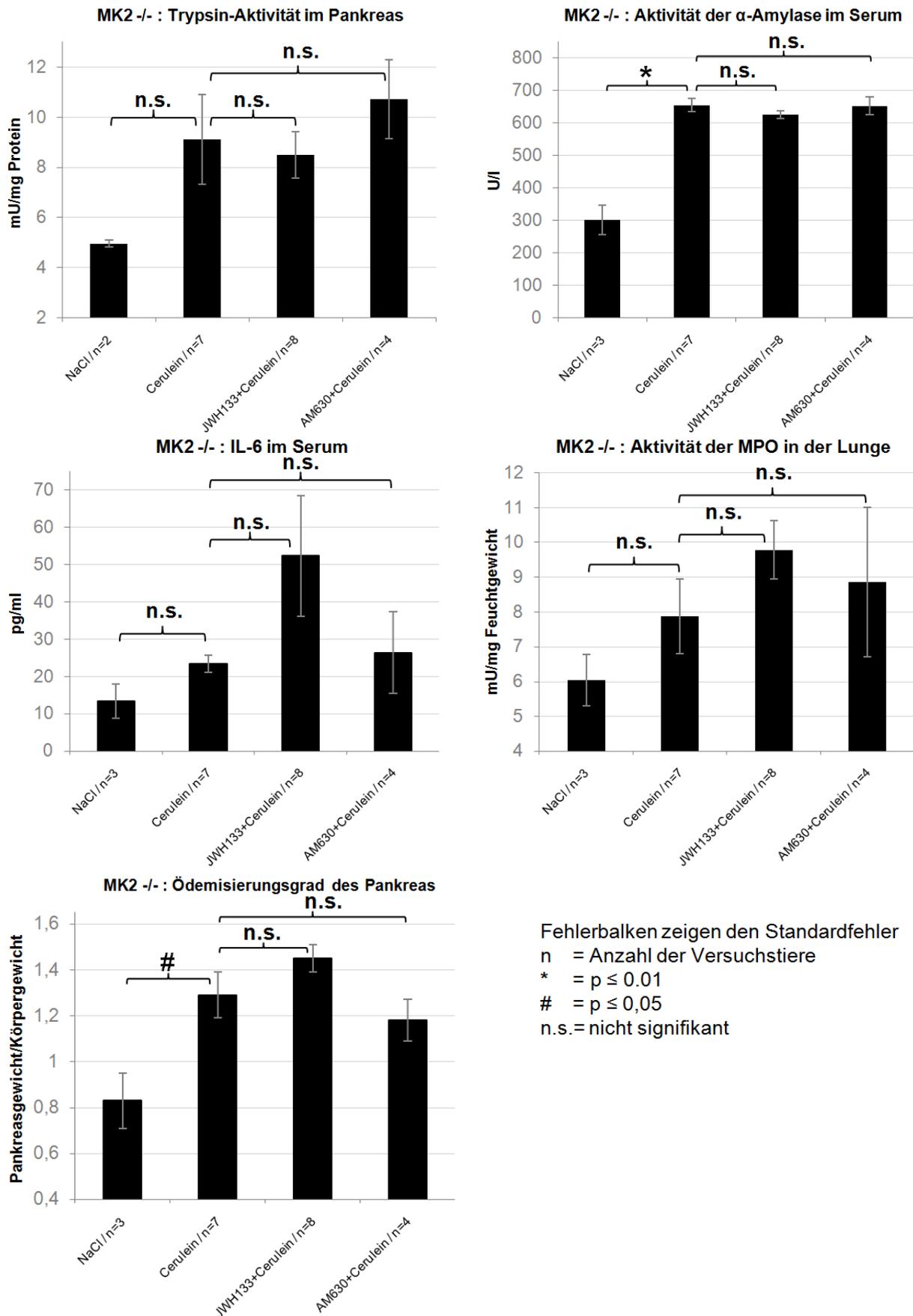


Abbildung 29: Einfluss der JWH133-Vorbehandlung auf die klinischen Parameter in MK2^{-/-}

3.2.2.2 Wirkung auf die Stresskinasen-Phosphorylierung

3.2.2.2.1.1 p38

Die MK2 ^{-/-} reagierten bezüglich der intrapancreatischen p38-Phosphorylierung ähnlich auf die Vorbehandlung mit JWH133 wie die Wildtyp Mäuse. Es kam zu einer verstärkten Phosphorylierung bei den Kontrolltieren (+ 77,84 %, n.s.) sowie den mit Cerulein behandelten Tieren gegenüber den nicht mit JWH133 vorbehandelten Tieren (+ 199 %, $p < 0,01$).

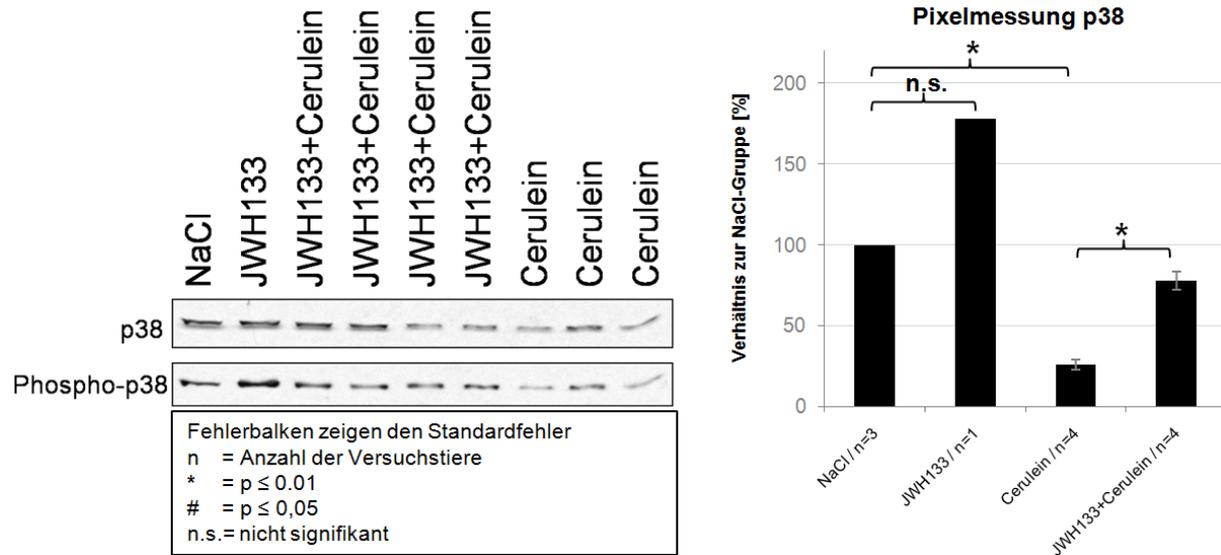


Abbildung 30: Einfluss der JWH133-Vorbehandlung auf die p38-Phosphorylierung in MK2 ^{-/-}

3.2.2.2.1.2 JNK

JWH führte bei der Pankreatitis in MK2 ^{-/-} parallel zu den verstärkten systemischen Laborparametern ebenfalls zu einer (+ 137 %, $p < 0,01$) verstärkten Phosphorylierung der JNK. Die verstärkte JNK-Phosphorylierung war auch in den Kontrolltieren (+ 22 %, n.s.) als Trend beobachtbar.

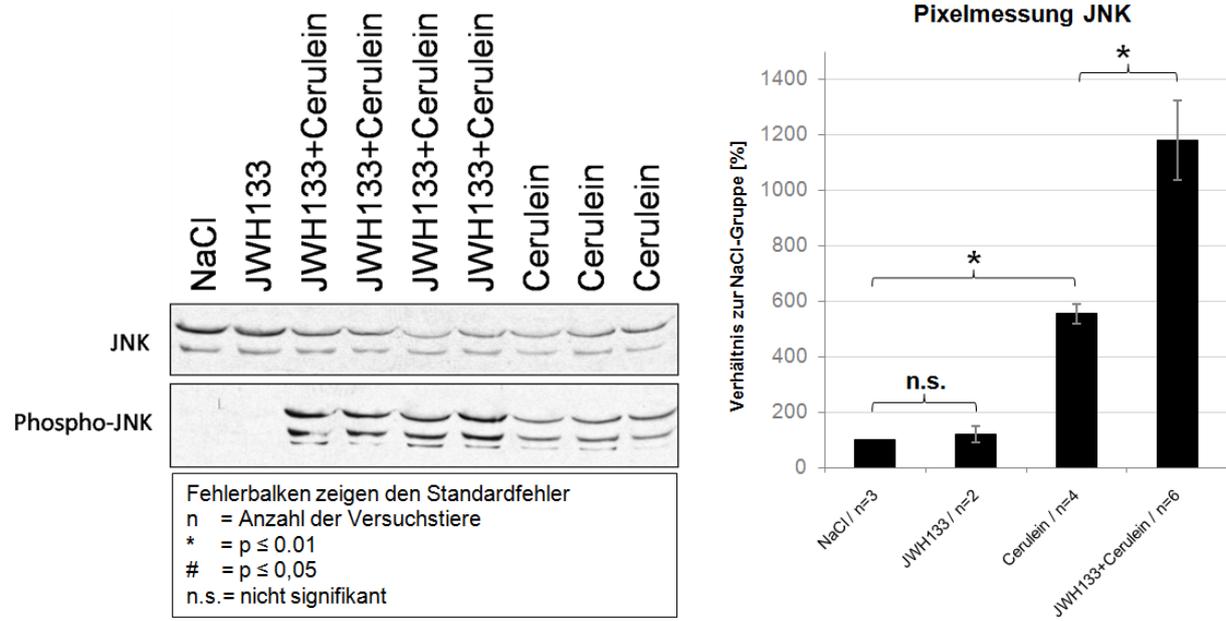


Abbildung 31: Einfluss der JWH133-Vorbehandlung auf die JNK-Phosphorylierung in MK2 -/-

4 Diskussion

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Beantwortung mehrerer Fragen liefern: Als wichtigsten Punkt soll sie klären, ob CB2-Agonisten eine Option zur Entwicklung spezifischer Medikamente für die Behandlung oder Prophylaxe der akuten Pankreatitis darstellen. Zum anderen soll sie unserem Verständnis der physiologischen Rolle der Cannabinoid 2-Rezeptoren im Pankreas und bei den pathophysiologischen Vorgängen der akuten Pankreatitis Hilfe leisten. Die Untersuchung der Stresskinasen p38 und JNK im Pankreas lässt Aussagen über deren Rolle bei der Vermittlung der Wirkungen der Cannabinoide sowie über ihre grundsätzliche Rolle bei der akuten Pankreatitis zu, was durch die Verwendung von MK2 -/- Mäusen weiter spezifiziert werden kann.

4.1 Allgemeine Diskussion

4.1.1 Akute Pankreatitis

Trotz grundlegender Fortschritte im Verständnis des Krankheitsgeschehens der Pankreatitis und den daraus folgenden vielversprechenden neuen Therapieansätzen konnte bisher kein Modell erfolgreich auf den Menschen übertragen werden. Speziell zur Prophylaxe der Post-ERCP-Pankreatitis wurden bereits diverse klinische Studien durchgeführt.

4.1.1.1 Post-ERCP-Pankreatitis Prophylaxe

Nach erfolgter ERCP entwickeln 3,8 (Bhatia, Garg et al. 2006) bis 10 % (Wilcox, Varadarajulu et al. 2006) der Patienten eine akute Pankreatitis, sodass eine Prophylaxe erstrebenswert ist. Zudem könnte die frühzeitige, prophylaktische Administration eines Medikamentes die Möglichkeit eröffnen, auch auf die frühen azinären Ereignisse einzuwirken und diese eventuell verhindern. Es wurden zahlreiche Studien mit verschiedenen Pharmaka durchgeführt, z.B. mit N-Acetylcystein (Milewski, Rydzewska et al. 2006), Octreotid (Thomopoulos, Pagoni et al. 2006; Li, Pan et al. 2007), dem Protease Inhibitoren Gabexat (Xiong, Wu et al. 2006) und Ulinastatin (Fujishiro, Adachi et al. 2006) und Glyceryltrinitrat (Kaffes, Bourke et al. 2006). Die Studienlage zu den Wirkungen ist teils widersprüchlich. Trotz einzelner Erfolgsmeldungen wird an der Wirksamkeit gezweifelt (DiMagno and DiMagno 2007).

4.1.1.2 Rolle der Stresskinasen

Die Rolle von p38 bei der akuten Pankreatitis wurde in der Literatur bisher widersprüchlich beschrieben. Zum einen werden ihr pro-inflammatorische, zum anderen auch protektive Fähigkeiten zugeschrieben. Mögliche Erklärungen sind die Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α auf der einen Seite und die Aktivierung des protektiv agierenden Hsp 27 auf der anderen Seite. Die durch JWH133 verursachte p38-Phosphorylierung korrelierte mit einem abgemilderten Verlauf der Pankreatitis, was die Hypothese der protektiven Rolle von p38 unterstützt.

Die Rolle der JNK bei der akuten Pankreatitis ist eindeutiger. Die JNK wird durch Entzündungsmediatoren aktiviert und induziert selbst pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren. Die Hemmung von Cathepsin B führt zwar zur verminderten Trypsinaktivierung, nicht jedoch zur Verminderung der JNK-Phosphorylierung (Van Acker, Weiss et al. 2007). Dies zeigt, dass die JNK-Aktivierung nicht die Folge der Zymogenaktivierung ist und somit entweder in der Chronik der pathophysiologischen Abläufe vor die Zymogenaktivierung eingeordnet werden muss oder ein parallel ablaufendes Phänomen ist, dass die Klinik der Pankreatitis verschlimmert. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Theorie, dass die JNK-Aktivierung in der Azinuszelle als Reaktion auf pro-inflammatorische Zytokine angesehen werden muss. Die verstärkte JNK-Phosphorylierung durch JWH133 in den Azinuszellen der MK2 $-/-$ ging mit einer verringerten Aktivierung von Trypsinogen einher, korrelierte aber mit den erhöhten IL-6 Werten im Serum.

4.1.1.3 IL-6

Wie auch die JNK-Aktivierung, so stellt auch die Bildung und Sezernierung von IL-6 bei der akuten Pankreatitis ein zu der Zymogenaktivierung zumindest in der Anfangsphase parallel und nicht als Folge verlaufendes Phänomen dar. So werden durch Inhibierung von Cathepsin B zwar die Aktivierung von Trypsin und der Schweregrad der Pankreatitis vermindert, nicht jedoch die IL-6 Spiegel (Van Acker).

4.1.2 Endocannabinoid-System (ECS)

Das Endocannabinoid-System stellt ein hochaktuelles Forschungsthema dar, in dem es jährlich zur Entdeckung neuer Komponenten wie neuen Wirkorten, Endocannabinoid-verwandten Molekülen ohne Aktivität an den bekannten CB-

Rezeptoren und neuen Enzymen zur Biosynthese und Abbau der Endocannabinoide kommt. Infolge dessen ist mehr Grundlagenforschung über das Endocannabinoid-System notwendig, um die Bedeutung dieser Arbeit vollkommen interpretieren zu können, da z.B. die Wirkungen der verwendeten Pharmaka an bisher unbekanntem Rezeptoren möglich scheint.

4.1.2.1 Physiologische Bedeutung

Zahlreiche Studien lassen vermuten, dass das Endocannabinoid-System ein parakrines Informations- und Regulationssystem mit räumlich und zeitlich begrenzter Wirkung darstellt. Es dient der Homöostase verschiedener anderer Systeme, indem es durch Rückkopplung einer überschießenden Aktivität entgegenwirkt. Zum Beispiel inhibieren CB1-Rezeptoren die Sekretion verschiedener Neurotransmitter und verhindern so die Entwicklung exzessiver neuronaler Aktivität im ZNS (Pertwee 2008). Desweiteren wird dem Endocannabinoidsystem eine Rolle bei der Regulation von Stimmung (Witkin *et al.*, 2005), Appetit (Kirkham and Tucci, 2006), Fortpflanzung (Wang *et al.*, 2006), Spastizität (Pertwee, 2002), Schmerz (Hohmann and Suplita, 2006), Neurodegeneration (Battista *et al.*, 2006) und der Immunantwort (Ashton, 2007) zugesprochen.

Ziring *et al.* stellten fest, dass CB2-knockout Mäuse schwerwiegende Defizite der Immunkompetenten Zellen der Nieren-„Randzone“, B- und T Lymphozyten sowie natürlichen Killer Zellen aufzeigen und stellten die Vermutung auf, dass CB2-Agonisten die Entwicklung und Aktivität von Immunregulatorischen Zellen verändern und das Endocannabinoid-System für die Bildung der verschiedenen Untertypen von T- und B- Zellen und damit der Immunhomöostase notwendig sei (Ziring, Wei *et al.* 2006). Die Aktivierung von CB2-Rezeptoren auf Immunzellen hemmt zudem die Freisetzung von Zytokinen (Ehrhart, Obregon *et al.* 2005); ihre Migration (Miller and Stella 2008) und die Antigen-Präsentation (Buckley, McCoy *et al.* 2000). CB2-Agonisten stellen somit vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung von Medikamenten gegen entzündliche Krankheiten dar. So konnte bereits gezeigt werden, dass die CB2-Stimulation vor entzündlichen Darmerkrankungen schützt (Ziring, Wu *et al.* 2007; Storr, Keenan *et al.* 2009). Da der CB1-Rezeptor ebenfalls auf Immunkompetenten Zellen gefunden wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die Wirkungen der Cannabinoide auf das Immunsystem nicht alleine durch die CB2-Rezeptoren vermittelt werden (Kreitzer and Stella 2009).

4.1.2.2 Gastrointestinales Endocannabinoid-System

Dem Endocannabinoid-System werden diverse Funktionen im Gastrointestinaltrakt zugesprochen. Es scheint in verschiedenen Extremsituationen hochreguliert zu werden, um die Homöostase wiederherzustellen. So wurden zum Beispiel erhöhte Endocannabinoid-Spiegel in Vergiftungszuständen (Izzo, Capasso et al. 2003), bei Nahrungsmangel (Gomez, Navarro et al. 2002) und beim kolorektalem Karzinom (Ligresti, Bisogno et al. 2003) gefunden. Auch bei inflammatorischen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts wurden durchweg erhöhte Endocannabinoid-Spiegel gemessen (D'Argenio, Valenti et al. 2006; Di Marzo and Izzo 2006; Izzo and Camilleri 2009). Hierzu zählen die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Massa, Marsicano et al. 2004; D'Argenio, Valenti et al. 2006), die Divertikulitis (Guagnini, Valenti et al. 2006) und die Zöliakie (D'Argenio, Petrosino et al. 2007). Michalski et al. konnten auch beim Cerulein-induzierten Modell der akuten Pankreatitis einen um das 6,6-fach erhöhten Anandamid-Spiegel messen (Michalski, Laukert et al. 2007).

CB1-Rezeptoren werden im Intestinaltrakt während eines Entzündungszustandes hochreguliert (Izzo et al., 2001; D'Argenio et al., 2006) und der erhöhte Endocannabinoid-Spiegel schützt das Epithel vor Schaden (Wright et al., 2005) sowie erhöhter intestinaler Motilität (Izzo et al., 2003; Massa et al., 2004). Auch die Relaxation des unteren Ösophagus sphinkters und die Inhibition der Säuresekretion im Magen werden weitestgehend dem CB1-Rezeptor zugesprochen (Massa, Storr et al. 2005). Bei der akuten Pankreatitis werden ebenfalls vermehrt CB1-Rezeptoren exprimiert. Die Zunahme konnten Michalski et al. besonders stark in den Azinuszellen und in mittlerer Stärke in den Azini und Nerven feststellen. In nekrotischem Gewebe kam es zu einer starken Zunahme der CB1-Rezeptor-Expression auf Azinuszellen (Michalski, Laukert et al. 2007).

Die Funktionen des CB2-Rezeptors und seine genauen Lokalisationen im Gastrointestinaltrakt sind bisher weniger eindeutig. Im menschlichen Gastrointestinaltrakt wurden CB2-Rezeptoren primär in Makrophagen und Plasmazellen der Lamina Propria gefunden. Dem CB2-Rezeptor scheint hauptsächlich die Rolle eines Bremssystems der Inflammation und der Erleichterung ihrer Symptome zuzukommen (Wright, Duncan et al. 2008). So spielt er unter anderem eine Rolle bei der Regulation abnormer Motilität (Izzo 2004). CB2-Rezeptoren werden bei Entzündungsreaktionen verstärkt exprimiert.

So können CB2-Rezeptoren, die im normalen Kolongewebe kaum nachweisbar sind, in der akuten Phase chronisch entzündlicher Darmerkrankungen mit relativ starkem Signal im Zytoplasma und der Zellmembranen nachgewiesen werden (Wright, Rooney et al. 2005). Ihre verstärkte Aktivierung durch synthetische CB2-Agonisten mildert die Colitis im Tierversuch ab (Storr, Keenan et al. 2009). Die CB2-Rezeptor-Aktivierung soll auch vor akuten und chronischen Leberschäden sowie Leberfibrose schützen (Lotersztajn, Teixeira-Clerc et al. 2008). Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten Michalski et al. eine Zunahme der Expression von CB2-Rezeptoren auf Azinus- und Gangzellen bei der akuten Pankreatitis feststellen. Diese fiel wie auch bei den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen bei der ödematösen Pankreatitis schwach, in nekrotischem Gewebe und dabei besonders auf Azinuszellen stark aus (Michalski, Laukert et al. 2007).

4.1.2.3 Bisherige Literatur zu Cannabinoiden und Pankreatitis

Bisher wurden widersprüchliche Daten über die Rolle von Cannabinoiden bei der Pankreatitis veröffentlicht: Neben den von Michalski et al. beschriebenen protektiven Effekten von HU210 in Mäusen zeigen andere Studien, dass die CB1-Aktivierung durch Anandamid die Pankreatitis in Raten verstärkt (Dembinski, Warzecha et al. 2006) und dass die Vorbehandlung mit dem CB1-Rezeptor-Antagonisten AM251 die Überlebensrate von Raten mit akuter Pankreatitis erhöht (Matsuda, Mikami et al. 2005). Eine weitere Studie beschreibt, dass die Wirkung von Anandamid vom Zeitpunkt der Administration abhängt. Die prophylaktische Gabe führte zur Verstärkung, die therapeutische zur Abmilderung (Dembinski, Warzecha et al. 2008). Zusätzlich wurden Fälle akuter Pankreatitiden nach Cannabiskonsum beschrieben (Grant and Gandhi 2004; Wargo, Geveden et al. 2007).

Linari et al. berichteten, dass WIN55.212, ein Agonist an CB1- und CB2-Rezeptoren, die Sekretion der Amylase verminderte. Da diese Wirkung in isolierten Azini, in denen keine Nerven vorhanden sind, ausblieb, nahmen sie keine direkte Wirkung von WIN55.212 an der Azinuszelle sondern eine indirekte Wirkung über die Beeinflussung der nervalen und CCK-vermittelten Stimulation an. Sie stellten fest, dass CB1-Rezeptoren sich auch im Pankreas in hoher Konzentration auf Synapsen befinden, die unter anderem CCK sezernieren und vermuteten, dass die Aktivierung der CB1-Rezeptoren zur verminderten Ausschüttung von CCK führte (Linari, Agostini et al. 2009). Diese Theorie wird durch eine Studie unterstützt, die eine verminderte

CCK-Ausschüttung durch CB1-Stimulation im Hippocampus von Raten fand (Beinfeld and Connolly 2001).

Michalski beschrieb 2007 die protektive Rolle des selektiven CB1-Agonisten HU210 auf den Verlauf der Cerulein-induzierten Pankreatitis. HU210 besitzt allerdings auch eine ca. 8,5-fach schwächere Aktivität am CB2-Rezeptor (Felder, Joyce et al. 1995). Zwar liegt bisher keine Literatur zur Wirkung von CB2-Agonisten auf die akute Pankreatitis vor, jedoch verwendeten Michalski et al. ebenfalls AM630, um die Wirkungen von HU210 am CB2-Rezeptor zu antagonisieren, woraufhin es zu einer Abschwächung der Wirkung von HU210 kam (Michalski, Laukert et al. 2007). Da AM630 sehr spezifisch am CB2-Rezeptor bindet, lässt dies indirekt eine Aussage über die Beteiligung von CB2-Rezeptoren an der protektiven Wirkung von HU210 zu und bestätigt das in dieser Arbeit beschriebene protektive Potential der CB2-Rezeptor-Aktivierung.

Eine mögliche Erklärung der sich widersprechenden Studien zur Rolle von Cannabinoiden auf den Verlauf der Pankreatitis liefern Izzo und Camilleri. Sie stellen die Vermutung auf, dass Anandamid in niedrigen Dosen über die Aktivierung von CB1- und CB2-Rezeptoren anti-inflammatorisch, in höheren Dosen jedoch durch die Aktivierung von TRPV1 pro-inflammatorisch wirken könnte (Izzo and Camilleri 2009) (Siehe Abbildung 32).

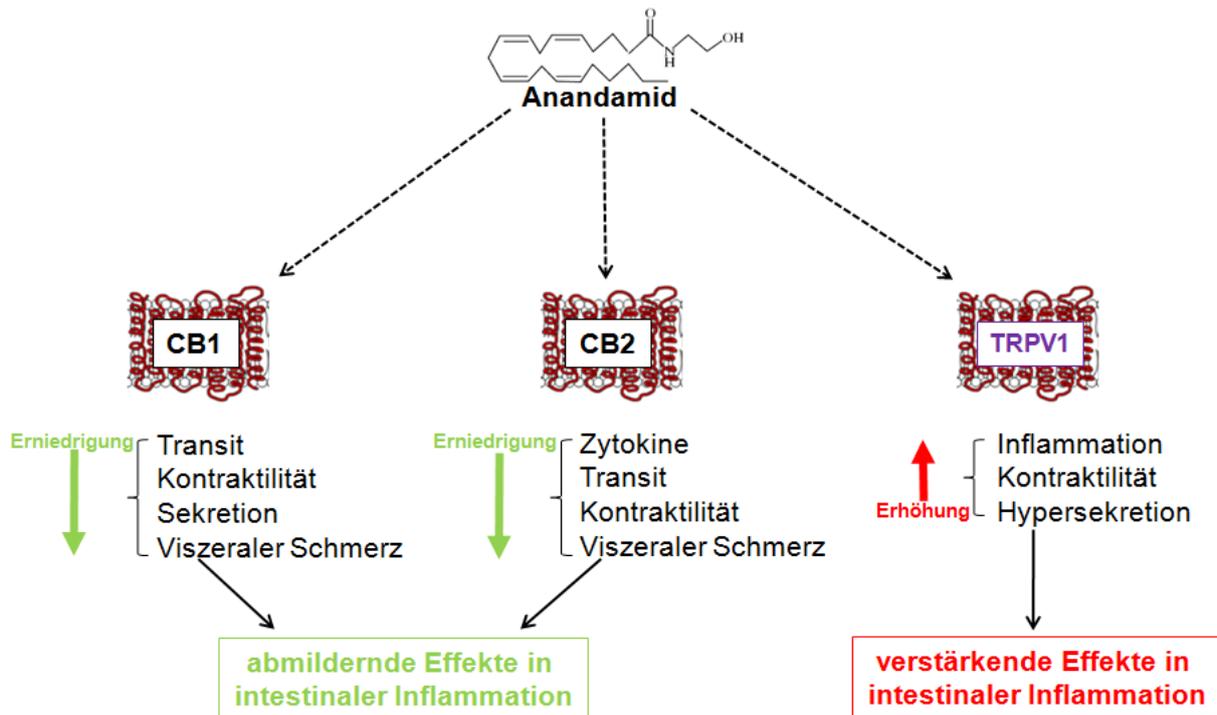


Abbildung 32: Mögliche Erklärung der widersprüchlichen Wirkungen von Anandamid auf die Inflammation im Gastrointestinaltrakt (Modifiziert nach Izzo et al. 2009)

Anandamid kann über die Aktivierung von CB1- und CB2-Rezeptoren anti-inflammatorische, über die Aktivierung von TRPV1 Rezeptoren pro-inflammatorische Wirkungen vermitteln. Da die Aktivierung von TRPV1 höhere Konzentrationen Anandamid benötigt als die Aktivierung der Cannabinoid-Rezeptoren könnten in niedrigen Dosen die anti-, in höheren Dosen die pro-inflammatorischen Wirkungen überwiegen.

4.2 Spezieller Teil

4.2.1 Kritische Auseinandersetzung mit den Experimenten

Wie jedes Modell, so stellt auch die Cerulein-induzierte Pankreatitis bei der Maus nur ein Abbild dar, dass nicht unbedingt 1:1 auf den Menschen übertragen werden kann. Zum einen verläuft die durch repetitive Gaben von Cerulein verursachte Pankreatitis nicht zwangsläufig exakt wie die Pankreatitis des Menschen, die ja auch durch andere Noxen (z.B. Alkohol oder Gallengangs-Obstruktion) ausgelöst wird. Ein anderes Problem stellt dar, dass man bei der Pankreatitis des Menschen (mit Ausnahme der Post-ERCP-Pankreatitis) wohl nie prophylaktisch, also vor der Auslösung der Pankreatitis, die Medikamente verabreichen kann. Deshalb steht zumindest vor therapeutischen Versuchen am Menschen noch der Beweis aus, dass CB2-Agonisten auch bei der Administration nach dem Auslösen der Pankreatitis einen positiven Effekt aufweisen. Desweiteren könnten zu hohe oder zu niedrige Dosen der verwendeten Medikamente auch fehlende oder übertriebene Wirkungen darstellen, da die hier verwendete Dosis wegen eventueller starker Nebenwirkungen nicht unbedingt auf den Menschen übertragbar ist. Weitere Probleme z.B. bei der Bewertung der Rolle der Stresskinasen sind die bei in vivo Versuchen zahlreich

vorhandenen Störfaktoren und damit einhergehenden Fehlerquellen, die die Bewertung molekularbiologischer Vorgänge stark erschweren.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.2.1 Wirkung der JWH133-Vorbehandlung

Die Vorbehandlung mit JWH133 führte zu einer um 92 % verminderten Aktivierung des Trypsinogens nach Induktion der Pankreatitis. Diese Reduktion war hochsignifikant ($p < 0,01$) und beweist, dass die Aktivierung der CB2-Rezeptoren durch JWH133 ein protektives Potential gegenüber der Pankreatitis besitzt. Die Reduktion der Anstiege der IL-6 Spiegel um - 62 % viel ebenso sehr deutlich aus und muss als signifikant bezeichnet werden ($p < 0,05$). Die Reduktionen der anderen Parameter fielen nicht so eklatant aus, sodass die Größe des protektiven Potentials der CB2-Stimulation unklar erscheint.

Die Aktivierung von p38 durch JWH133 (Anstieg: 255 %, $p < 0,01$) fiel deutlich aus. Interessanterweise blieb die verstärkte Aktivierung auch nach dem Auslösen der Pankreatitis erhalten (Anstieg: 119 %, $p < 0,05$), sodass die Vermittlung der protektiven Wirkungen von JWH133 durch p38 möglich erscheint. Im Vergleich zu den Kontrolltieren ließ sich grundsätzlich die Phosphorylierung von p38 nach Cerulein-Injektion nicht verstärkt nachweisen, es kam sogar zu einer Reduktion (- 50 %, $p < 0,01$). Dies steht im Kontrast zur bisherigen Literatur. Wagner et al. untersuchten den zeitlichen Verlauf der p38-Phosphorylierung nach Cerulein-Stimulation in Raten und stellten fest, dass der Zenit bereits nach 30 min erreicht war und die p38-Phosphorylierung danach stark abfiel (Wagner, Metzler et al. 1999). Ein ähnlicher Verlauf der p38-Phosphorylierung in Mäusen könnte die hier beobachtete niedrige p38-Phosphorylierung in den Cerulein-Tieren erklären, bleibt jedoch bis auf weiteres spekulativ.

4.2.2.2 Wirkung der AM630-Vorbehandlung

Die Vorbehandlung mit AM630 führte zum drastischen Anstieg sämtlicher gemessener Laborparameter sowie der JNK-Phosphorylierung bei den Tieren mit Pankreatitis, nicht jedoch bei den Kontrolltieren. Dies zeigt, dass es beim Ablauf der Pankreatitis zu einer verstärkten Aktivierung der CB2-Rezeptoren vermutlich durch eine erhöhte Bildung endogener Liganden kommt, wodurch der Verlauf der Pankreatitis abgemildert wird. Dies könnte durch den von Michalski et al.

beschriebenen starken (6,6-fachen) Anstieg des Anandamid-Spiegels im Pankreasgewebe bei der akuten Pankreatitis erklärbar sein (Michalski, Laukert et al. 2007). Die der CB2-Stimulation durch JWH133 entgegengesetzte Wirkung von AM630 kann somit vermutlich zum Großteil durch die Antagonisierung endogener Liganden und nicht nur durch inversen Agonismus erklärt werden. Die verstärkte Aktivierung der CB2-Rezeptoren bei der Pankreatitis resultiert ebenfalls in einer Hemmung der Phosphorylierung der JNK. Dies könnte entweder direkt über CB2-Rezeptoren auf den Azinuszellen oder indirekt über die Hemmung der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine durch Zellen des Immunsystems vermittelt werden. Die Tatsache, dass die AM630-Administration mit verhältnismäßig stark erhöhten Anstiegen der allgemeinen, nicht Pankreatitis-spezifischen Parametern IL-6 (+ 196 %, $p < 0,01$) und MPO (+ 195 %, $p < 0,01$) einhergeht, deutet jedoch an, dass der Hauptwirkmechanismus der physiologischen CB2-Rezeptor-Aktivierung in der Hemmung der systemischen Entzündungsreaktion und nicht in der direkten Wirkung an der Azinuszelle zu suchen ist. Die beobachtete verstärkte JNK-Phosphorylierung (+ 204 %, $p < 0,01$) muss somit vermutlich als Antwort auf eine vermehrte Bildung pro-inflammatorischer Zytokine durch Immunzellen erklärt werden.

4.2.2.3 Wirkung der AM630 und JWH133 - Vorbehandlung

AM630 konnte die protektiven Effekte von JWH133 auf den Verlauf der Pankreatitis hinsichtlich aller klinischen Parameter antagonisieren und zeigt, dass die protektive Wirkung von JWH133 über die Aktivierung von CB2-Rezeptoren vermittelt wird. Die Werte des aktivierten Trypsins, der IL-6 Spiegel und des Ödemisierungsgrades stiegen sogar an. Dies könnte durch die zusätzliche Antagonisierung der Endocannabinoide erklärbar sein.

Die vorherige Gabe von AM630 konnte allerdings nicht die verstärkte p38-Phosphorylierung durch JWH133 aufheben. Dies war bei den Kontrolltieren und den mit Cerulein behandelten Tieren zu beobachten und könnte durch ungenügende Antagonisierung von JWH133 durch AM630 (eventuell durch zu hohe Dosen JWH133 oder zu niedrige Dosen AM630) an den CB2-Rezeptoren verursacht sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass JWH133 über einen anderen, bisher unbekanntem CB2-Rezeptor unabhängigen Mechanismus, der nicht durch AM630 antagonisiert wird, zur p38-Phosphorylierung führt.

Die durch Vorbehandlung mit AM630 verstärkte Phosphorylierung der JNK in der Cerulein-Gruppe war nach der zusätzlichen Gabe von JWH133 nicht mehr nachweisbar. Die JWH133 Administration hatte nach Gabe von AM630 einen abmildernden Effekt auf die intra-azinäre JNK-Aktivierung. Dies könnte abermals zum einen durch ungenügende Antagonisierung durch AM630 der relativ hohen Dosen JWH133 erklärbar sein. Wie im Fall der p38-Phosphorylierung könnte jedoch auch ein vom CB2-Rezeptor unabhängiger Wirkmechanismus für JWH133 existieren. Auch diese Mechanismen könnten sich entweder direkt an der Azinuszelle oder vermittelt durch eine geänderte Zytokin-Bildung auch an den Immunzellen abspielen.

4.2.2.4 Versuche in MK2-knockout Mäusen

Auch in den MK2 $-/-$ führte die Vorbehandlung mit JWH133 zu reduzierten Anstiegen der Aktivitäten von Trypsin und Amylase. Allerdings ließ sich dies, vermutlich auf Grund der geringen Stückzahlen, nur als Trend beobachten. Bezüglich der Parameter der systemischen Inflammation hatte die CB2-Stimulation in den MK2 $-/-$ erstaunlicherweise den gegenteiligen Effekt wie in den Wildtyp Mäusen. So kam es zu einem verstärktem Anstieg von IL-6 Spiegel ($+ 287 \%$, $p = 0,06$) und der MPO-Aktivität ($+ 103 \%$, n.s.) sowie des Ödemisierungsgrades des Pankreas.

Die MK2 $-/-$ reagierten bezüglich der intrapankreatischen p38-Phosphorylierung ähnlich auf die Vorbehandlung mit JWH133 wie die Wildtyp Mäuse. Es kam zu einer verstärkten Phosphorylierung sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den mit Cerulein behandelten Tieren gegenüber den nicht mit JWH133 vorbehandelten Tieren. Da die verstärkte intra-azinäre p38-Phosphorylierung auch mit reduzierten Aktivitäten von Trypsin und Amylase einherging, bestätigt dies die Theorie der Vermittlung der protektiven Wirkung der CB2-Stimulation auf die Zymogenaktivierung über die Aktivierung von p38.

Interessanterweise führte JWH in den MK2 $-/-$ parallel zu den verstärkten systemischen Laborparametern ebenfalls zu einer verstärkten Phosphorylierung der JNK nach dem Auslösen der Pankreatitis. Dies ist ein Indiz dafür, dass die protektiven Effekte von JWH133 nicht durch Inhibierung der JNK in den Azinuszellen vermittelt werden, denn die verstärkte JNK-Phosphorylierung wurde in den Azinuszellen gemessen, wo ein protektiver Effekt von JWH133 auf die Trypsinogen-

Aktivierung festgestellt wurde. Die verstärkte JNK-Phosphorylierung korrelierte hingegen mit den erhöhten IL-6 und MPO Werten. Vermutlich ist die JNK-Phosphorylierung somit nur als Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 usw. zurückzuführen.

4.2.3 CB2-Rezeptoren bei der akuten Pankreatitis

CB2-Rezeptoren werden im Pankreas der Maus unter anderem auf Gang- und Azinuszellen exprimiert. Bei der akuten Pankreatitis kommt es zu einer verstärkten Expression, die in nekrotischem Gewebe besonders stark ausfällt. Während der akuten Pankreatitis werden die CB2-Rezeptoren, vermutlich durch vermehrt gebildete Endocannabinoide, verstärkt aktiviert und schwächen die Pathologie der Pankreatitis ab. Zusätzlich kommt es zu einer verminderten JNK-Phosphorylierung durch die endogene CB2-Stimulation. Dies könnte indirekt durch Aktivierung von CB2-Rezeptoren auf Immunzellen und konsekutiv verminderter Bildung pro-inflammatorischer Zytokine und daraufhin verminderter Aktivierung der intra-azinären JNK vermittelt werden. Die prophylaktische, pharmakologische Überstimulation der CB2-Rezeptoren wirkt sich protektiv auf den Verlauf der akuten Pankreatitis aus und führt unter anderem zur verminderten Aktivierung von Trypsinogen in den Azinuszellen und verminderten IL-6 Spiegeln im Serum. Parallel zu der protektiven Wirkung lässt sich auch eine verstärkte Phosphorylierung von p38 beobachten. Diese könnte die protektive Wirkung vermitteln, was dadurch bestätigt wird, dass JWH133 in MK2 $-/-$ zumindest auf die Parameter der systemischen Inflammation, IL-6 und MPO, nicht protektiv wirkt. Die protektive Wirkung von JWH133 auf die Aktivierung von Trypsinogen verläuft somit MK2-unabhängig, die Verminderung der systemischen Inflammation hingegen MK2-abhängig. Daraus lässt sich folgern, dass die positive Beeinflussung der frühen azinären Ereignisse durch CB2-Aktivierung nicht durch MK2 vermittelt wird. Die Beeinflussung der darauffolgenden systemischen Inflammation wird jedoch zumindest teilweise über MK2 und damit vermutlich auch über die p38-Aktivierung vermittelt.

Die Beobachtung, dass die Vorbehandlung mit AM630 mit einem starkem Anstieg hauptsächlich der Parameter der systemischen Inflammation IL-6 und MPO einherging, legt nahe, dass die physiologische Aktivierung der CB2-Rezeptoren bei der akuten Pankreatitis ihre Hauptwirkung nicht auf die frühen azinären Ereignisse sondern auf die darauffolgende Immunreaktion ausübt. Da die Stimulation mit dem

synthetischen Cannabinoid JWH133 jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Trypsin-Aktivierung führte, ist eine Beeinflussung der frühen azinären Ereignisse ebenfalls vorhanden. Eine weitere Erklärung des starken inversen Agonismus durch AM630 wäre auch, dass AM630 nicht nur den CB2-Rezeptor sondern auch einen anderen, noch unbekanntem Rezeptor antagonisiert. Versuche in CB2-knockout Tieren könnten die tatsächliche Vermittlung der Wirkung von JWH133 durch die CB2-Rezeptoren beweisen.

4.2.4 Rolle der Stresskinasen bei der Vermittlung der Wirkung des CB2-Rezeptors

Die JNK-Phosphorylierung korrelierte stark mit den IL-6 Spiegeln im Serum und der Aktivität der MPO in der Lunge, jedoch nicht so stark mit den Pankreatitis-spezifischen Parametern Trypsin und Amylase. Da zudem die JWH133 Vorbehandlung in MK2 $-/-$ zu einer verstärkten intra-azinären JNK-Phosphorylierung führte, diese aber mit verringerten Trypsin und Amylase Werten einherging, scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen JNK-Aktivierung und Zymogenaktivierung unwahrscheinlich. Die JNK-Aktivierung scheint somit als ein zu der Zymogen-Aktivierung parallel verlaufendes Phänomen angesehen werden zu müssen, welches durch Induktion pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren die Entzündungsreaktion auslöst und im weiteren Verlauf durch erhöhte Zytokin-Spiegel im Plasma wiederum aktiviert wird und die Entzündungsreaktion weiter verstärkt.

Die Blockade der endogenen CB2-Stimulation durch AM630 führte zu einer drastisch verstärkten JNK-Phosphorylierung, die mit stark erhöhten IL-6 Spiegeln und MPO-Aktivitäten korrelierte. Die endogene CB2-Stimulation bei der Pankreatitis führt somit zur Hemmung der JNK-Phosphorylierung in den Azinuszellen. Diese könnte entweder direkt durch CB2-Rezeptoren auf der Azinuszelle und intrazellulären Hemmung der JNK-Aktivierung oder indirekt durch die Hemmung der Zytokin-Bildung durch Immunzellen und konsekutiv verminderter Aktivierung der JNK in Azinuszellen vermittelt werden. Weitere Studien sind notwendig, um die genauen Wirkmechanismen, die zur JNK-Inhibition durch die CB2-Rezeptoren führen, aufzuklären. Zum Beispiel könnte die Phosphorylierung der MAPK an isolierten Azinuszellen untersucht werden, um festzustellen, ob die Cannabinoide auch in Abwesenheit der Immunzellen die Phosphorylierung der Stresskinasen beeinflussen.

Die beobachtbare p38-Phosphorylierung korrelierte mit protektiven Effekten von JWH133 auf den Verlauf der Pankreatitis. Diese protektiven Effekte scheinen, zumindest bezogen auf die Abmilderung der systemischen Entzündungsreaktion, durch Aktivierung von MK2 vermittelt zu werden. In den Azinuszellen werden die protektiven Effekte von JWH133 nicht über MK2 vermittelt, da es auch in MK2 $-/-$ zu einer Reduktion der Trypsinaktivität kam. Da die p38-Phosphorylierung besonders stark mit verringerten Trypsin-Aktivitäten korrelierte, scheint jedoch ein durch p38 vermittelter, MK2-unabhängiger Wirkmechanismus nicht unwahrscheinlich.

4.2.4.1 Rolle von MK2 bei der Vermittlung der Wirkung von JWH133

Die verwendeten Medikamente vermitteln unterschiedliche Wirkungen in Wildtyp und MK2 $-/-$ Mäusen. Dies bedeutet, dass MK2 zumindest teilweise an den Wirkungen von AM630 und JWH133 beteiligt sein muss. MK2 könnte durch die Aktivierung der CB2-Rezeptoren entweder aktiviert oder gehemmt werden. Allerdings erscheint ein aktivierender Einfluss sehr viel wahrscheinlicher, da p38, ein direkter Aktivator von MK2 nachweislich verstärkt durch die CB2-Stimulation aktiviert wurde. JWH133 und AM630 verhalten sich bezüglich der Trypsinaktivierung gleich in MK2 $-/-$ wie in Wildtyp Mäusen, nicht jedoch bezüglich MPO und IL-6. Die Wirkungen des CB2-Rezeptors auf die Trypsinogen-Aktivierung werden zumindest nicht zum Hauptteil über MK2 vermittelt, da ansonsten unterschiedliche Wirkungen von AM630 und JWH133 in Wildtyp und in MK2 $-/-$ Mäusen zu erwarten wären. Die Wirkungen des CB2-Rezeptors auf die Reduktion von IL-6 und MPO sind jedoch zum Großteil über MK2 vermittelt, da ansonsten AM630 und JWH133 in Wildtyp als auch in MK2 $-/-$ Mäusen gleiche Wirkungen hervorrufen würden.

Die Beteiligung von MK2 an der Zytokin-Ausschüttung und der systemischen Inflammation wird durch Studien bestätigt, allerdings führt ein nicht vorhandenes oder insuffizientes MK2 dabei zu einer Reduktion von TNF- α und IL-6, sodass die durch den CB2-Rezeptor vermutete Aktivierung von MK2 mit einhergehender Reduktion von IL-6 dazu im Widerspruch steht (Kotlyarov, Neininger et al. 1999; Tietz, Malo et al. 2006).

In der Anwesenheit von MK2 hat JWH133 keinen Einfluss auf die JNK-Aktivierung. Ein mögliches Modell zur Erklärung wäre, dass durch JWH133 verschiedene Signalwege aktiviert werden, darunter pro-inflammatorische und anti-inflammatorische, wobei die anti-inflammatorischen in der Wildtyp Maus dominieren.

MK2 ist Teil des anti-inflammatorischen Signalweges oder hemmt in der Wildtyp Maus den pro-inflammatorischen Signalweg, sodass in MK2 $-/-$ nun die pro-inflammatorische Signalwege überwiegen. MK2 könnte, aktiviert durch den CB2-Rezeptor, zum Beispiel die Phosphorylierung der JNK hemmen oder durch Hemmung der Zytokinproduktion durch Immunzellen indirekt die Aktivierung der intra-azinären JNK abschwächen.

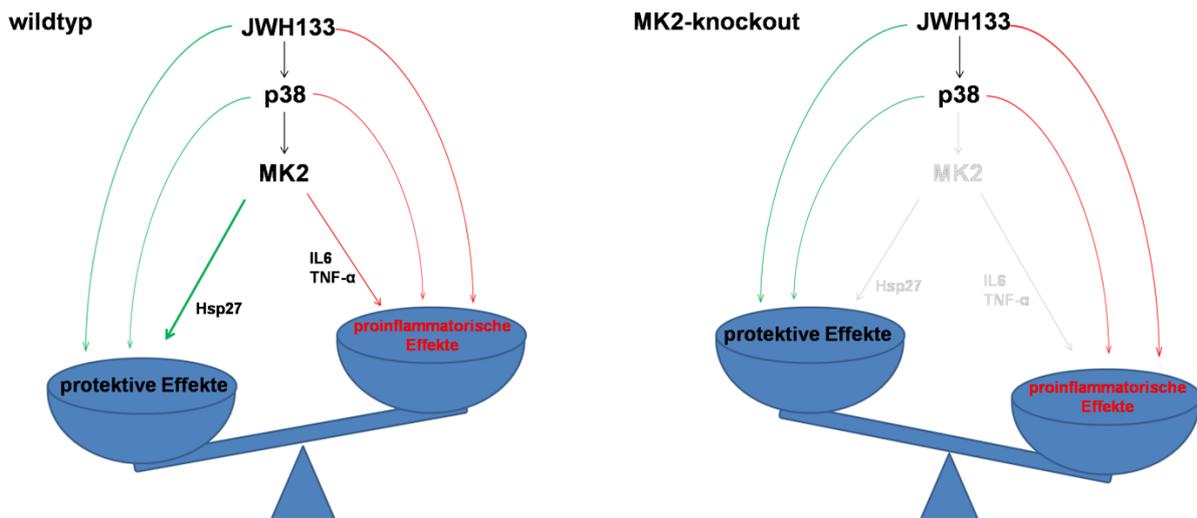


Abbildung 33: Theorie zur möglichen Rolle von MK2 bei der Vermittlung der Wirkungen von JWH133

JWH133 vermittelt unterschiedliche Wirkungen, teils protektiv, teils pro-inflammatorisch. In den Wildtyp Mäusen führte die JWH133 Vorbehandlung zur Abschwächung der systemischen Inflammation. Dies wird vermutlich über die Aktivierung von CB2-Rezeptoren die wiederum p38 aktivieren vermittelt. P38 aktiviert wiederum MK2 welches seine protektiven Effekte über Hsp 27, seine pro-inflammatorischen Effekte über die Induktion von IL-6 und TNF- α ausübt. In den MK2 $-/-$ führte die Vorbehandlung mit JWH133 zu überwiegend pro-inflammatorischen Effekten. Die durch MK2 vermittelten protektiven Effekte scheinen das Quäntchen an der Waage darzustellen.

4.3 Ausblick

4.3.1 Weitere Fragestellungen

Weitere Studien könnten klären, ob sich JWH133 auch in einem therapeutischen Versuchsansatz d.h. bei der Gabe nach Induktion der Pankreatitis ebenfalls lindernd auf die Pankreatitis auswirkt. Es könnten verschiedene Zeitpunkte, Applikationsformen und Dosen von JWH133 variiert werden, um die optimale Wirkung zu erhalten. Zusätzlich könnte durch Einsatz von CB2 $-/-$ Mäusen der Beweis erbracht werden, dass die Wirkungen von JWH133 tatsächlich über die CB2-Rezeptoren vermittelt werden. In isolierten Azini könnte desweiteren durch die Abwesenheit von Immunzellen untersucht werden, ob die Beeinflussung der Stresskinasen-Aktivitäten direkt durch CB2-Rezeptoren auf den Azinuszellen geschieht. Weitere Studien könnten die Regulationsmechanismen, die zur erhöhten Expression der CB2-Rezeptoren auf Azinuszellen führen, sowie die Möglichkeit,

diese für therapeutische Zwecke (z.B. durch eine pharmakologische „Hochregulation“) zu nutzen, untersuchen.

4.3.2 Studien am Menschen

4.3.2.1 Übertragbarkeit des Pankreatitis Modells auf den Menschen

Für diese Arbeit wurde das Modell der Cerulein-induzierten Pankreatitis verwendet. Auch viele zitierte andere Studien beruhen auf diesem Modell, sodass, obwohl die verschiedenen Studien in sich schlüssig sein sollten, noch zu beweisen gilt, ob CB2-Rezeptoren und die MAP-Kinasen p38 und JNK bei der akuten Pankreatitis des Menschen die gleiche Rolle spielen. Die Cerulein-induzierte Pankreatitis scheint beim Nagetieren durch direkte Aktivierung von CCK1-Rezeptoren auf den Azinuszellen ausgelöst zu werden (Saluja, Saluja et al. 1989), jedoch sind die CCK1-Rezeptoren auf den Azinuszellen des Menschen kaum nachweisbar (Dufresne, Seva et al. 2006), was somit die Übertragbarkeit des Modelles auf den Menschen in Frage stellt. Allerdings zeigte eine klinische Studie am Menschen mit dem CCK-Antagonisten Loxiglumide einen lindernden Effekt auf die Pankreatitis, was wiederum die Rolle von CCK bei der Pankreatitis des Menschen bestätigt (Shiratori, Takeuchi et al. 2002). Zum anderen könnten die Ergebnisse auf Grund von genetischen Unterschieden der Arten schlichtweg nicht auf den Menschen übertragbar sein. So unterscheiden sich z.B. CB2-Rezeptoren von Mensch und Maus relativ stark. Ihre Primärstruktur ist nur zu 82 % identisch (Shire, Calandra et al. 1996; Howlett, Barth et al. 2002).

4.3.2.2 Mögliche Nebenwirkungen

Die Durchführung klinischer Studien mit CB1-Rezeptor Liganden bereitet wegen ihrer psychotropen Nebenwirkungen Probleme. So wurde der CB1-Antagonist Rimonabant (SR141716), der von der Firma Sanofi Aventis zur Therapie der Adipositas vertrieben wurde, wegen des Auftretens von Depressionen und Suizidalität wieder vom Markt genommen. Auf den selektiven CB2-Agonisten ruht viel Hoffnung, da durch die weitestgehende Abwesenheit der CB2-Rezeptoren im Endhirn keine psychotropen Effekten vermutet werden (Malan, Ibrahim et al. 2003; Fox and Bevan 2005; Lunn, Reich et al. 2006). Mittlerweile wurden allerdings CB2-Rezeptoren im ZNS, genauergesagt im Hirnstamm nachgewiesen (Van Sickle, Duncan et al. 2005), sodass die tatsächliche Abwesenheit der psychotropen Effekte von spezifischen CB2-Agonisten zu beweisen bleibt. Andere denkbare

Nebenwirkungen der Cannabinoide könnten z.B. eine Veränderung der Fruchtbarkeit (Maccarrone 2007), des Essverhaltens und Stoffwechsels oder der Muskelspannung sein.

4.3.2.3 Mögliche Anwendungsgebiete

Speziell die dem CB2-Rezeptor zugeschriebene immunomodulatorische und analgetische Wirkung sowie die vermutete Abwesenheit psychotroper Nebenwirkungen macht die Einführung von spezifischen CB2-Agonisten für eine Reihe inflammatorischer Erkrankungen interessant. Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz besteht darin, den Endocannabinoid-Spiegel anzuheben, indem man deren Abbau spezifisch hemmt. Mittlerweile wurden diverse Inhibitoren für FAAH (Ahn, Johnson et al. 2009) und MAGL (King, Duranti et al. 2007) entwickelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass FAAH-Inhibitoren im Tierversuch die Colitis abmildern (Storr, Keenan et al. 2008). Ebenso ist es möglich, durch spezifische Inhibition von DAGL die Bildung der Endocannabinoide zu hemmen (Ortar, Bisogno et al. 2008; Bisogno, Burston et al. 2009)

4.3.2.4 Therapeutische Anwendung

Interessante Aspekte von JWH133 beschrieben Kimball et al.. Nachdem sich JWH133 als protektiv gegenüber einem Tiermodell der Colitis herausgestellt hatte, testeten sie ebenfalls die Gabe von JWH133 nach dem Auslösen der Colitis. Interessanterweise war JWH133 in dem therapeutischen Setting weit wirksamer als in dem protektiven Ansatz (Kimball, Schneider et al. 2006). Diese könnte durch die wahrscheinlich hauptsächliche Wirkung von CB2-Agonisten auf die Hemmung der infiltrierenden Immunzellen zu erklären und auf die akute Pankreatitis übertragbar sein. Da das Zeitfenster zur Beeinflussung der frühen azinären Ereignisse bei der akuten Pankreatitis sehr klein ist, scheint die Chance auf eine medikamentöse Beeinflussung mit Ausnahme bei der Post-ERCP-Pankreatitis begrenzt. Die anschließend ablaufende Entzündungsreaktion spielt nicht nur eine Hauptrolle im weiteren Verlauf der Pathologie, sie ist auch der medikamentösen Therapie besser zugänglich, weswegen sie einen vielversprechenden Ansatzpunkt darstellt.

4.4 Zusammenfassung

Cannabinoid 2-Rezeptoren werden im Pankreas der Maus unter anderem auf Azinuszellen exprimiert. Bei den pathophysiologischen Vorgängen der akuten

Pankreatitis werden Cannabinoid 2-Rezeptoren verstärkt exprimiert und vermutlich durch erhöhte Endocannabinoid-Spiegel verstärkt aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer Abmilderung der akuten Pankreatitis. Mögliche Wirkmechanismen könnten ein direkter Einfluss durch CB2-Rezeptoren auf den Azinuszellen oder indirekt durch Hemmung der Bildung pro-inflammatorischer Zytokine durch Immunzellen sein.

Die prophylaktische Behandlung mit dem CB2-Agonisten JWH133 führt zu einer Abmilderung der Pankreatitis. Vermutlich wird dies durch die Stimulation von CB2-Rezeptoren vermittelt. Da diese Effekte jedoch nicht vollständig durch die vorherige Gabe des Antagonisten aufgehoben werden konnten, scheinen weitere Wirkmechanismen für JWH133 möglich. Versuche mit CB2-knockout Tieren könnten diese Frage klären. Die protektive Wirkung von JWH133 könnte durch eine zu beobachtende verstärkte Phosphorylierung der p38-MAPK in den Azinuszellen vermittelt werden. Die Versuche mit MK2 $-/-$ legen nahe, dass die von p38 downstream gelegene Kinase MK2 an der Vermittlung zumindest eines Teils der Wirkungen wie der Reduktion des IL-6 Spiegels und der Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge beteiligt ist.

Die Aktivierung der CB2-Rezeptoren bei der akuten Pankreatitis führt ebenfalls zur verminderten Phosphorylierung der JNK in den Azinuszellen. Dieses Phänomen ist vermutlich Ausdruck der Hemmung der Bildung pro-inflammatorischer Zytokine durch Aktivierung von CB2-Rezeptoren auf Immunzellen und nicht einer direkten Hemmung durch CB2-Rezeptoren auf den Azinuszellen.

Literaturverzeichnis

- Adams, R., Madison Hunt, J. H. Clark (1940). "Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I." *Journal of the American Chemical Society* **62**(1): 196-200.
- Adler, G., C. Beglinger, et al. (1991). "Interaction of the cholinergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans." *Gastroenterology* **100**(2): 537-43.
- Ahn, K., D. S. Johnson, et al. (2009). "Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain." *Chem Biol* **16**(4): 411-20.
- Anand, P., G. Whiteside, et al. (2009). "Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain." *Brain Res Rev* **60**(1): 255-66.
- Bagrodia, S., B. Derjard, et al. (1995). "Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation." *J Biol Chem* **270**(47): 27995-8.
- Banks, P. A. and M. L. Freeman (2006). "Practice guidelines in acute pancreatitis." *Am J Gastroenterol* **101**(10): 2379-400.
- Bayliss, W. M. and E. H. Starling (1902). "The mechanism of pancreatic secretion." *J Physiol* **28**(5): 325-53.
- Beglinger, C., P. Hildebrand, et al. (1992). "Postprandial control of gallbladder contraction and exocrine pancreatic secretion in man." *Eur J Clin Invest* **22**(12): 827-34.
- Beinfeld, M. C. and K. Connolly (2001). "Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystokinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids." *Neurosci Lett* **301**(1): 69-71.
- Beltramo, M. and D. Piomelli (2000). "Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol." *Neuroreport* **11**(6): 1231-5.
- Beltramo, M., N. Stella, et al. (1997). "Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition." *Science* **277**(5329): 1094-7.
- Bendayan, M., N. Marceau, et al. (1982). "Immunocytochemical localization of actin in the pancreatic exocrine cell." *J Histochem Cytochem* **30**(10): 1075-8.
- Benndorf, R., K. Hayess, et al. (1994). "Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity." *J Biol Chem* **269**(32): 20780-4.
- Beyaert, R., A. Cuenda, et al. (1996). "The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor." *EMBO J* **15**(8): 1914-23.
- Bhagat, L., V. P. Singh, et al. (2002). "Thermal stress-induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats." *Gastroenterology* **122**(1): 156-65.
- Bhatia, M. and S. Moochhala (2004). "Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome." *J Pathol* **202**(2): 145-56.
- Bhatia, M., J. P. Neoptolemos, et al. (2001). "Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis." *Curr Opin Investig Drugs* **2**(4): 496-501.
- Bhatia, V., P. K. Garg, et al. (2006). "Endoscopic retrograde cholangiopancreatography-induced acute pancreatitis often has a benign outcome." *J Clin Gastroenterol* **40**(8): 726-31.
- Bialek, R., S. Willemer, et al. (1991). "Evidence of intracellular activation of serine proteases in acute cerulein-induced pancreatitis in rats." *Scand J Gastroenterol* **26**(2): 190-6.
- Bisogno, T., J. J. Burston, et al. (2009). "Synthesis and pharmacological activity of a potent inhibitor of the biosynthesis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol." *ChemMedChem* **4**(6): 946-50.
- Bisogno, T., M. MacCarrone, et al. (2001). "The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors." *Eur J Biochem* **268**(7): 1982-9.
- Bisogno, T., D. Melck, et al. (2000). "N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo." *Biochem J* **351 Pt 3**: 817-24.
- Bisogno, T., D. Melck, et al. (1999). "Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin." *J Neurochem* **72**(5): 2113-9.
- Bisogno, T., N. Sepe, et al. (1997). "Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells." *Biochem J* **322 (Pt 2)**: 671-7.

- Bockman, D. E. (1992). "Microvasculature of the pancreas. Relation to pancreatitis." *Int J Pancreatol* **12**(1): 11-21.
- Bouaboula, M., S. Hilairet, et al. (2005). "Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation." *Eur J Pharmacol* **517**(3): 174-81.
- Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, et al. (1995). "Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1." *Biochem J* **312** (Pt 2): 637-41.
- Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, et al. (1996). "Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression." *Eur J Biochem* **237**(3): 704-11.
- Bouaboula, M., M. Rinaldi, et al. (1993). "Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes." *Eur J Biochem* **214**(1): 173-80.
- Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, et al. (1990). "An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control." *Science* **249**(4964): 64-7.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brenner, B., U. Koppenhoefer, et al. (1997). "Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153." *J Biol Chem* **272**(35): 22173-81.
- Brook, M., G. Sully, et al. (2000). "Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade." *FEBS Lett* **483**(1): 57-61.
- Buckley, N. E., K. L. McCoy, et al. (2000). "Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor." *Eur J Pharmacol* **396**(2-3): 141-9.
- 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**(2): 195-203.
- Burnham, D. B. and J. A. Williams (1982). "Effects of high concentrations of secretagogues on the morphology and secretory activity of the pancreas: a role for microfilaments." *Cell Tissue Res* **222**(1): 201-12.
- Burstein, S. H. and R. B. Zurier (2009). "Cannabinoids, endocannabinoids, and related analogs in inflammation." *AAPS J* **11**(1): 109-19.
- Cabral, G. A. and A. Staab (2005). "Effects on the immune system." *Handb Exp Pharmacol*(168): 385-423.
- Cadas, H., E. di Tomaso, et al. (1997). "Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain." *J Neurosci* **17**(4): 1226-42.
- Calignano, A., G. La Rana, et al. (1998). "Control of pain initiation by endogenous cannabinoids." *Nature* **394**(6690): 277-81.
- Cantor, P., O. Olsen, et al. (1991). "Inhibition of cholecystokinin-stimulated pancreaticobiliary output in man by the cholecystokinin receptor antagonist MK-329." *Scand J Gastroenterol* **26**(6): 627-37.
- Casu, M. A., A. Porcella, et al. (2003). "Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastrointestinal tract." *Eur J Pharmacol* **459**(1): 97-105.
- Chen, J., S. L. Errico, et al. (2005). "Reactive oxygen species and p38 phosphorylation regulate the protective effect of Delta9-tetrahydrocannabinol in the apoptotic response to NMDA." *Neurosci Lett* **389**(2): 99-103.
- Chen, R. H., C. Sarnecki, et al. (1992). "Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases." *Mol Cell Biol* **12**(3): 915-27.
- Christopoulos, A. and K. Wilson (2001). "Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors." *Brain Res* **915**(1): 70-8.
- Compton, S. J. and C. G. Jones (1985). "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay." *Anal Biochem* **151**(2): 369-74.
- Coso, O. A., M. Chiariello, et al. (1995). "The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway." *Cell* **81**(7): 1137-46.
- Coutts, A. A., A. J. Irving, et al. (2002). "Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus." *J Comp Neurol* **448**(4): 410-22.
- Craig, E. A., J. S. Weissman, et al. (1994). "Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell." *Cell* **78**(3): 365-72.
- Cravatt, B. F., D. K. Giang, et al. (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." *Nature* **384**(6604): 83-7.

LITERATURVERZEICHNIS

- Crawley, J. B., L. Rawlinson, et al. (1997). "T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation." *J Biol Chem* **272**(23): 15023-7.
- Croci, T., L. Manara, et al. (1998). "In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum." *Br J Pharmacol* **125**(7): 1393-5.
- D'Argenio, G., S. Petrosino, et al. (2007). "Overactivity of the intestinal endocannabinoid system in celiac disease and in methotrexate-treated rats." *J Mol Med* **85**(5): 523-30.
- D'Argenio, G., M. Valenti, et al. (2006). "Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation." *FASEB J* **20**(3): 568-70.
- Dabrowski, A., T. Grady, et al. (1996). "Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **271**(10): 5686-90.
- Davis, R. J. (1994). "MAPKs: new JNK expands the group." *Trends Biochem Sci* **19**(11): 470-3.
- Day, T. A., F. Rakhshan, et al. (2001). "Role of fatty acid amide hydrolase in the transport of the endogenous cannabinoid anandamide." *Mol Pharmacol* **59**(6): 1369-75.
- De Caro, G., R. Endean, et al. (1968). "Occurrence of caerulein in extracts of the skin of *Hyla caerulea* and other Australian hylids." *Br J Pharmacol Chemother* **33**(1): 48-58.
- De Petrocellis, L. and V. Di Marzo (2009). "An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **23**(1): 1-15.
- Dembinski, A., Z. Warzecha, et al. (2006). "Cannabinoids in acute gastric damage and pancreatitis." *J Physiol Pharmacol* **57** Suppl 5: 137-54.
- Dembinski, A., Z. Warzecha, et al. (2008). "Dual, time-dependent deleterious and protective effect of anandamide on the course of cerulein-induced acute pancreatitis. Role of sensory nerves." *Eur J Pharmacol* **591**(1-3): 284-92.
- Derijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell* **76**(6): 1025-37.
- Derijard, B., J. Raingeaud, et al. (1995). "Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms." *Science* **267**(5198): 682-5.
- Derkinderen, P., C. Ledent, et al. (2001). "Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus." *J Neurochem* **77**(3): 957-60.
- Deutsch, D. G., S. T. Glaser, et al. (2001). "The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase." *J Biol Chem* **276**(10): 6967-73.
- Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, et al. (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." *Mol Pharmacol* **34**(5): 605-13.
- Devane, W. A., L. Hanus, et al. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science* **258**(5090): 1946-9.
- Di Marzo, V., L. De Petrocellis, et al. (1996). "Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* **227**(1): 281-8.
- Di Marzo, V., A. Fontana, et al. (1994). "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons." *Nature* **372**(6507): 686-91.
- Di Marzo, V. and A. A. Izzo (2006). "Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation." *Gut* **55**(10): 1373-6.
- DiMagno, M. J. and E. P. DiMagno (2007). "New advances in acute pancreatitis." *Curr Opin Gastroenterol* **23**(5): 494-501.
- DiMagno, M. J., J. A. Williams, et al. (2004). "Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of cerulein-induced acute pancreatitis in mice." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(1): G80-7.
- DiMarzo, V., L. De Petrocellis, et al. (2005). The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Cannabinoids: Handbook of Experimental Pharmacology*. R. Pertwee. Heidelberg, Springer-Verlag. **168**: 147-185.
- Dinh, T. P., D. Carpenter, et al. (2002). "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10819-24.
- Drenckhahn, D. and H. G. Mannherz (1983). "Distribution of actin and the actin-associated proteins myosin, tropomyosin, alpha-actinin, vinculin, and villin in rat and bovine exocrine glands." *Eur J Cell Biol* **30**(2): 167-76.
- Duan, R. D. and J. A. Williams (1994). "Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini." *Am J Physiol* **267**(3 Pt 1): G401-8.

- Dufresne, M., C. Seva, et al. (2006). "Cholecystokinin and gastrin receptors." *Physiol Rev* **86**(3): 805-47.
- Duncan, M., J. S. Davison, et al. (2005). "Review article: endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system." *Aliment Pharmacol Ther* **22**(8): 667-83.
- Ehrhart, J., D. Obregon, et al. (2005). "Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation." *J Neuroinflammation* **2**: 29.
- Ellis, J. (1987). "Proteins as molecular chaperones." *Nature* **328**(6129): 378-9.
- EISOhly, M. A. (2002). Chemical constituents of Cannabis. *Cannabis and Cannabinoids*. E. R. Von Franjo Grotenhermen. Binghamton, NY, The Haworth Integrative Healing Press: 27-39.
- Engel, K., A. Kotlyarov, et al. (1998). "Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation." *EMBO J* **17**(12): 3363-71.
- Fanger, G. R., P. Gerwins, et al. (1997). "MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases?" *Curr Opin Genet Dev* **7**(1): 67-74.
- Fegley, D., S. Kathuria, et al. (2004). "Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8756-61.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, et al. (1995). "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." *Mol Pharmacol* **48**(3): 443-50.
- Feurle, G. E., G. Hamscher, et al. (1995). "The role of CCK and its analogues in the organogenesis of the fetal rat pancreas." *Pancreas* **10**(3): 281-6.
- Fezza, F., T. Bisogno, et al. (2002). "Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues." *FEBS Lett* **513**(2-3): 294-8.
- Figarella, C., B. Miszczuk-Jamska, et al. (1988). "Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid. Activation of human trypsinogen 1." *Biol Chem Hoppe Seyler* **369 Suppl**: 293-8.
- Fitzgerald, P. J. (1980). Medical anecdotes concerning some diseases of the pancreas. *The Pancreas*. P. J. Fitzgerald and A. B. Morisson. Baltimore und London, Williams and Wilkins: 1-29.
- Fleischer, F., R. Dabew, et al. (2001). "Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis." *World J Gastroenterol* **7**(2): 259-65.
- Fox, A. and S. Bevan (2005). "Therapeutic potential of cannabinoid receptor agonists as analgesic agents." *Expert Opin Investig Drugs* **14**(6): 695-703.
- Freshney, N. W., L. Rawlinson, et al. (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." *Cell* **78**(6): 1039-49.
- Frossard, J. L., A. Saluja, et al. (1999). "The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury." *Gastroenterology* **116**(3): 694-701.
- Fujishiro, H., K. Adachi, et al. (2006). "Ulinastatin shows preventive effect on post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis in a multicenter prospective randomized study." *J Gastroenterol Hepatol* **21**(6): 1065-9.
- Fukunaga, R. and T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." *EMBO J* **16**(8): 1921-33.
- Gaoni, Y. (1964). "Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish." *Journal of the American Chemical Society* **84**: 1646-1647.
- Gerard, C. M., C. Mollereau, et al. (1991). "Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis." *Biochem J* **279** (Pt 1): 129-34.
- Gerwins, P., J. L. Blank, et al. (1997). "Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway." *J Biol Chem* **272**(13): 8288-95.
- Gigoux, V., C. Escrieut, et al. (1998). "Met-195 of the cholecystokinin-A receptor interacts with the sulfated tyrosine of cholecystokinin and is crucial for receptor transition to high affinity state." *J Biol Chem* **273**(23): 14380-6.
- Glaser, S. T., N. A. Abumrad, et al. (2003). "Evidence against the presence of an anandamide transporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 4269-74.
- Glaser, S. T., M. Kaczocha, et al. (2005). "Anandamide transport: a critical review." *Life Sci* **77**(14): 1584-604.
- Gomez, R., M. Navarro, et al. (2002). "A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding." *J Neurosci* **22**(21): 9612-7.

LITERATURVERZEICHNIS

- 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., M. Mah'Moud, et al. (1998). "Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury." *Am J Physiol* 275(5 Pt 1): G1010-7.
- Grady, T., A. Saluja, et al. (1996). "Edema and intrapancreatic trypsinogen activation precede glutathione depletion during caerulein pancreatitis." *Am J Physiol* 271(1 Pt 1): G20-6.
- Grant, P. and P. Gandhi (2004). "A case of cannabis-induced pancreatitis." *JOP* 5(1): 41-3.
- Graves, J. D., K. E. Draves, et al. (1996). "Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mlgM-induced apoptosis of human B lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13814-8.
- Greenbaum, L. M., A. Hirshkowitz, et al. (1959). "The activation of trypsinogen by cathepsin B." *J Biol Chem* 234: 2885-90.
- Gregory, H., P. M. Hardy, et al. (1964). "The Antral Hormone Gastrin. Structure of Gastrin." *Nature* 204: 931-3.
- Griffin, G., Q. Tao, et al. (2000). "Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor." *J Pharmacol Exp Ther* 292(3): 886-94.
- Groblewski, G. E., T. Grady, et al. (1997). "Cholecystokinin stimulates heat shock protein 27 phosphorylation in rat pancreas both in vivo and in vitro." *Gastroenterology* 112(4): 1354-61.
- Guagnini, F., M. Valenti, et al. (2006). "Neural contractions in colonic strips from patients with diverticular disease: role of endocannabinoids and substance P." *Gut* 55(7): 946-53.
- Guay, J., H. Lambert, et al. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 357-68.
- Han, J., Y. Jiang, et al. (1997). "Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation." *Nature* 386(6622): 296-9.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." *Science* 265(5173): 808-11.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6)." *J Biol Chem* 271(6): 2886-91.
- Hanus, L., S. Abu-Lafi, et al. (2001). "2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 3662-5.
- Haussinger, D., F. Schliess, et al. (1999). "Involvement of p38MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration." *Gastroenterology* 116(4): 921-35.
- Hazzalin, C. A., E. Cano, et al. (1996). "p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient." *Curr Biol* 6(8): 1028-31.
- Henstridge, C. M., N. A. Balenga, et al. (2009). "The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation." *FASEB J* 23(1): 183-93.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, et al. (1991). "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study." *J Neurosci* 11(2): 563-83.
- Hermann, A., M. Kaczocha, et al. (2006). "2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook." *AAPS J* 8(2): E409-12.
- Hibi, M., A. Lin, et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev* 7(11): 2135-48.
- Hillard, C. J., W. S. Edgmond, et al. (1997). "Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion." *J Neurochem* 69(2): 631-8.
- Hillard, C. J. and A. Jarrahian (2000). "The movement of N-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes." *Chem Phys Lipids* 108(1-2): 123-34.
- Hillard, C. J. and A. Jarrahian (2003). "Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy." *Br J Pharmacol* 140(5): 802-8.
- Hirano, T. (1999). "Cytokine suppressive agent improves survival rate in rats with acute pancreatitis of closed duodenal loop." *J Surg Res* 81(2): 224-9.
- Hirano, T., T. Manabe, et al. (1993). "Protective effect of a cephalosporin, Shiomarin, plus a new potent protease inhibitor, E3123, on rat taurocholate-induced pancreatitis." *J Gastroenterol Hepatol* 8(1): 52-9.

- Hosohata, K., R. M. Quock, et al. (1997). "AM630 is a competitive cannabinoid receptor antagonist in the guinea pig brain." *Life Sci* 61(9): PL115-8.
- Hosohata, Y., R. M. Quock, et al. (1997). "AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [35S]GTP gamma S binding in the mouse brain." *Eur J Pharmacol* 321(1): R1-3.
- Howard, J. M. and W. Hess (2002). *History of the PANCREAS: Mysteries of a Hidden Organ*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Howlett, A. C. (2005). *Cannabinoid Receptor Signaling*. *Cannabinoids: Handbook of Experimental Pharmacology*. R. G. Pertwee. Heidelberg, Springer-Verlag: 53-80.
- Howlett, A. C., F. Barth, et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." *Pharmacol Rev* 54(2): 161-202.
- Huang, S. M., T. Bisogno, et al. (2002). "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 8400-5.
- Huffman, J. W., J. Liddle, et al. (1999). "3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor." *Bioorg Med Chem* 7(12): 2905-14.
- Huot, J., F. Houle, et al. (1996). "HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress." *Cancer Res* 56(2): 273-9.
- Ichijo, H., E. Nishida, et al. (1997). "Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways." *Science* 275(5296): 90-4.
- Ip, Y. T. and R. J. Davis (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 205-19.
- Ishac, E. J., L. Jiang, et al. (1996). "Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves." *Br J Pharmacol* 118(8): 2023-8.
- Ivy, A. C. and E. Oldberg (1928). "A hormone mechanism for gall-Bladder contraction and evacuation." *Am J Physiol*(86): 599-613.
- Izzo, A. A. (2004). "Cannabinoids and intestinal motility: welcome to CB2 receptors." *Br J Pharmacol* 142(8): 1201-2.
- Izzo, A. A. and M. Camilleri (2009). "Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer." *Pharmacol Res*.
- Izzo, A. A., F. Capasso, et al. (2003). "An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice." *Gastroenterology* 125(3): 765-74.
- Jacquier-Sarlin, M. R., K. Fuller, et al. (1994). "Protective effects of hsp70 in inflammation." *Experientia* 50(11-12): 1031-8.
- Jaggar, S. I., F. S. Hasnie, et al. (1998). "The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain." *Pain* 76(1-2): 189-99.
- Jakob, U., M. Gaestel, et al. (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones." *J Biol Chem* 268(3): 1517-20.
- Johns, D. G., D. J. Behm, et al. (2007). "The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects." *Br J Pharmacol* 152(5): 825-31.
- Jungermann, J., M. M. Lerch, et al. (1995). "Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation." *Am J Physiol* 268(2 Pt 1): G328-38.
- Kaczocha, M., A. Hermann, et al. (2006). "Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase." *J Biol Chem* 281(14): 9066-75.
- Kaffes, A. J., M. J. Bourke, et al. (2006). "A prospective, randomized, placebo-controlled trial of transdermal glyceryl trinitrate in ERCP: effects on technical success and post-ERCP pancreatitis." *Gastrointest Endosc* 64(3): 351-7.
- Kallunki, T., T. Deng, et al. (1996). "c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions." *Cell* 87(5): 929-39.
- Karin, M. (1995). "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases." *J Biol Chem* 270(28): 16483-6.
- Karlsson, M., J. A. Contreras, et al. (1997). "cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases." *J Biol Chem* 272(43): 27218-23.
- Katona, I., B. Sperlagh, et al. (2000). "GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus." *Neuroscience* 100(4): 797-804.

LITERATURVERZEICHNIS

- Katona, I., B. Sperlagh, et al. (1999). "Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons." *J Neurosci* 19(11): 4544-58.
- Kawabata, S., T. Miura, et al. (1988). "Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin." *Eur J Biochem* 172(1): 17-25.
- Kawasaki, H., T. Morooka, et al. (1997). "Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells." *J Biol Chem* 272(30): 18518-21.
- Kimball, E. S., C. R. Schneider, et al. (2006). "Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(2): G364-71.
- Kimura, T., T. Ohta, et al. (1998). "Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, also interacts with 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor." *Biol Pharm Bull* 21(3): 224-6.
- King, A. R., A. Duranti, et al. (2007). "URB602 inhibits monoacylglycerol lipase and selectively blocks 2-arachidonoylglycerol degradation in intact brain slices." *Chem Biol* 14(12): 1357-65.
- Klar, E., B. Endrich, et al. (1990). "Microcirculation of the pancreas. A quantitative study of physiology and changes in pancreatitis." *Int J Microcirc Clin Exp* 9(1): 85-101.
- Klein, T. W., C. Newton, et al. (2003). "The cannabinoid system and immune modulation." *J Leukoc Biol* 74(4): 486-96.
- Knauf, U., U. Jakob, et al. (1994). "Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the small heat shock protein Hsp25 by MAPKAP kinase 2 is not essential for chaperone properties and cellular thermoresistance." *EMBO J* 13(1): 54-60.
- Kotlyarov, A., A. Neininger, et al. (1999). "MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis." *Nat Cell Biol* 1(2): 94-7.
- Kreitzer, F. R. and N. Stella (2009). "The therapeutic potential of novel cannabinoid receptors." *Pharmacol Ther* 122(2): 83-96.
- Kubisch, C., M. J. Dimagno, et al. (2004). "Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced pancreatitis." *Gastroenterology* 127(1): 275-86.
- Kummer, J. L., P. K. Rao, et al. (1997). "Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 272(33): 20490-4.
- Kyriakis, J. M., P. Banerjee, et al. (1994). "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." *Nature* 369(6476): 156-60.
- Lambert, D. M., S. Vandevoorde, et al. (2002). "The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents?" *Curr Med Chem* 9(6): 663-74.
- 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.
- Landsman, R. S., A. Makriyannis, et al. (1998). "AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor." *Life Sci* 62(9): PL109-13.
- Lauckner, J. E., J. B. Jensen, et al. (2008). "GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7): 2699-704.
- Lavoie, J. N., E. Hickey, et al. (1993). "Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27." *J Biol Chem* 268(32): 24210-4.
- Lee, H. S., L. Bhagat, et al. (2000). "Water immersion stress induces heat shock protein 60 expression and protects against pancreatitis in rats." *Gastroenterology* 119(1): 220-9.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." *Nature* 372(6508): 739-46.
- Lerch, M. M., A. K. Saluja, et al. (1993). "The effect of chloroquine administration on two experimental models of acute pancreatitis." *Gastroenterology* 104(6): 1768-79.
- Li, H.-L. (1973). "An archaeological and historical account of cannabis in China." *Economic Botany* 28(4): 437-448.
- Li, Z. S., X. Pan, et al. (2007). "Effect of octreotide administration in the prophylaxis of post-ERCP pancreatitis and hyperamylasemia: A multicenter, placebo-controlled, randomized clinical trial." *Am J Gastroenterol* 102(1): 46-51.
- Ligresti, A., T. Bisogno, et al. (2003). "Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth." *Gastroenterology* 125(3): 677-87.

- Ligresti, A., E. Morera, et al. (2004). "Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide." *Biochem J* 380(Pt 1): 265-72.
- Lin, T. H., A. E. Aplin, et al. (1997). "Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts." *J Cell Biol* 136(6): 1385-95.
- Linari, G., S. Agostini, et al. (2009). "Involvement of cannabinoid CB1- and CB2-receptors in the modulation of exocrine pancreatic secretion." *Pharmacol Res* 59(3): 207-14.
- Liu, Y., M. Gorospe, et al. (1995). "Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation." *J Biol Chem* 270(15): 8377-80.
- Lotersztajn, S., F. Teixeira-Clerc, et al. (2008). "CB2 receptors as new therapeutic targets for liver diseases." *Br J Pharmacol* 153(2): 286-9.
- Lozovaya, N., N. Yatsenko, et al. (2005). "Glycine receptors in CNS neurons as a target for nonretrograde action of cannabinoids." *J Neurosci* 25(33): 7499-506.
- Lunn, C. A., E. P. Reich, et al. (2006). "Targeting the CB2 receptor for immune modulation." *Expert Opin Ther Targets* 10(5): 653-63.
- Luthen, R., C. Niederau, et al. (1995). "Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats." *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): G592-604.
- Maccarrone, M. (2007). "CB(2) receptors in reproduction." *Br J Pharmacol*.
- Maccarrone, M., M. Bari, et al. (2000). "Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide." *J Biol Chem* 275(18): 13484-92.
- Mackie, K. and N. Stella (2006). "Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players." *AAPS J* 8(2): E298-306.
- Makhija, R. and A. N. Kingsnorth (2002). "Cytokine storm in acute pancreatitis." *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9(4): 401-10.
- Malan, T. P., Jr., M. M. Ibrahim, et al. (2003). "CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects?" *Curr Opin Pharmacol* 3(1): 62-7.
- Marshall, C. J. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." *Cell* 80(2): 179-85.
- Massa, F., G. Marsicano, et al. (2004). "The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation." *J Clin Invest* 113(8): 1202-9.
- Massa, F., M. Storr, et al. (2005). "The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract." *J Mol Med* 83(12): 944-54.
- Matsuda, K., Y. Mikami, et al. (2005). "The cannabinoid 1 receptor antagonist, AM251, prolongs the survival of rats with severe acute pancreatitis." *Tohoku J Exp Med* 207(2): 99-107.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, et al. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." *Nature* 346(6284): 561-4.
- McLaughlin, M. M., S. Kumar, et al. (1996). "Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase." *J Biol Chem* 271(14): 8488-92.
- Mechoulam, R. (1970). "Marihuana chemistry." *Science* 168(936): 1159-66.
- Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, et al. (1995). "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." *Biochem Pharmacol* 50(1): 83-90.
- Mechoulam, R., N. Lander, et al. (1987). "Stereochemical requirements for cannabimimetic activity." *NIDA Res Monogr* 79: 15-30.
- Mechoulam, R., N. Lander, et al. (1980). "Stereochemical requirements for cannabinoid activity." *J Med Chem* 23(10): 1068-72.
- Mechoulam, R., A. Shani, et al. (1970). "Chemical basis of hashish activity." *Science* 169(945): 611-2.
- Michalski, C. W., T. Laukert, et al. (2007). "Cannabinoids ameliorate pain and reduce disease pathology in cerulein-induced acute pancreatitis." *Gastroenterology* 132(5): 1968-78.
- Michalski, C. W., M. Maier, et al. (2008). "Cannabinoids reduce markers of inflammation and fibrosis in pancreatic stellate cells." *PLoS ONE* 3(2): e1701.
- Michoulam, R. and Y. Shvo (1963). "Hashish. I. The structure of cannabidiol." *Tetrahedron* 19(12): 2073-8.
- Milewski, J., G. Rydzewska, et al. (2006). "N-acetylcysteine does not prevent post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography hyperamylasemia and acute pancreatitis." *World J Gastroenterol* 12(23): 3751-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- Miller, A. M. and N. Stella (2008). "CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way." *Br J Pharmacol* 153(2): 299-308.
- Minden, A. and M. Karin (1997). "Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases." *Biochim Biophys Acta* 1333(2): F85-104.
- Minden, A., A. Lin, et al. (1994). "Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK." *Science* 266(5191): 1719-23.
- Miron, T., K. Vancompernelle, et al. (1991). "A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein." *J Cell Biol* 114(2): 255-61.
- Mithofer, K., C. Fernandez-del Castillo, et al. (1998). "Subcellular kinetics of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis." *Am J Physiol* 274(1 Pt 1): G71-9.
- Molero, X., F. Guamer, et al. (1995). "Nitric oxide modulates pancreatic basal secretion and response to cerulein in the rat: effects in acute pancreatitis." *Gastroenterology* 108(6): 1855-62.
- Munro, S., K. L. Thomas, et al. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." *Nature* 365(6441): 61-5.
- Mutt, V. and J. E. Jorpes (1968). "Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin." *Eur J Biochem* 6(1): 156-62.
- Niederau, C., R. Luthen, et al. (1994). "Effects of CCK on pancreatic function and morphology." *Ann N Y Acad Sci* 713: 180-98.
- O'Konski, M. S. and S. J. Pandol (1990). "Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell." *J Clin Invest* 86(5): 1649-57.
- O'Sullivan, S. E., M. D. Randall, et al. (2007). "The in vitro and in vivo cardiovascular effects of Delta9-tetrahydrocannabinol in rats made hypertensive by chronic inhibition of nitric-oxide synthase." *J Pharmacol Exp Ther* 321(2): 663-72.
- Oka, S., K. Nakajima, et al. (2007). "Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 362(4): 928-34.
- Ortar, G., T. Bisogno, et al. (2008). "Tetrahydrolipstatin analogues as modulators of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol metabolism." *J Med Chem* 51(21): 6970-9.
- Ortar, G., A. Ligresti, et al. (2003). "Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake." *Biochem Pharmacol* 65(9): 1473-81.
- Otaka, M., A. Okuyama, et al. (1997). "Differential induction of HSP60 and HSP72 by different stress situations in rats. Correlation with cerulein-induced pancreatitis." *Dig Dis Sci* 42(7): 1473-9.
- Owyang, C. and C. D. Logsdon (2004). "New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion." *Gastroenterology* 127(3): 957-69.
- Oz, M. (2006). "Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels." *Curr Pharm Des* 12(2): 227-39.
- Oz, M., A. Ravindran, et al. (2003). "The endogenous cannabinoid anandamide inhibits alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes." *J Pharmacol Exp Ther* 306(3): 1003-10.
- Pacher, P., S. Batkai, et al. (2004). "Haemodynamic profile and responsiveness to anandamide of TRPV1 receptor knock-out mice." *J Physiol* 558(Pt 2): 647-57.
- Palade, G. (1975). "Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis." *Science* 189(4206): 867.
- Pandol, S. J., A. K. Saluja, et al. (2007). "Acute pancreatitis: bench to the bedside." *Gastroenterology* 132(3): 1127-51.
- Pawlov, I. P. (1898). "Die Arbeit der Verdauungsdrüsen (Übersetzt aus dem Russischen von Walther, A.)." J.F.Bergmann, Wiesbaden(12).
- Pawlov, I. P. (1901). *Le travail des Glandes Digestives*. Paris.
- Pawlov, I. P. (1906). *Die äußere Arbeit der Verdauungsdrüsen und ihr Mechanismus*. Handbuch Physiologie. Braunschweig, Nagel. 1.
- Pertwee, R. G. (1999). "Pharmacology of cannabinoid receptor ligands." *Curr Med Chem* 6(8): 635-64.
- Pertwee, R. G. (2001). "Cannabinoid receptors and pain." *Prog Neurobiol* 63(5): 569-611.
- Pertwee, R. G. (2002). "Cannabinoids and multiple sclerosis." *Pharmacol Ther* 95(2): 165-74.
- Pertwee, R. G. (2005). *Einleitung. Cannabinoids: Handbook of Experimental Pharmacology*. R. G. Pertwee. Heidelberg, Springer-Verlag: 2-6.

- Pertwee, R. G. (2005). *Pharmacological Actions of Cannabinoids. Cannabinoids: Handbook of Experimental Pharmacology*. R. G. Pertwee. Heidelberg, Spinger-Verlag: 1-53.
- Pertwee, R. G., S. R. Fernando, et al. (1996). "Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine." *Br J Pharmacol* 118(8): 2199-205.
- Porter, A. C., J. M. Sauer, et al. (2002). "Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor." *J Pharmacol Exp Ther* 301(3): 1020-4.
- Povoski, S. P., W. Zhou, et al. (1994). "Stimulation of in vivo pancreatic growth in the rat is mediated specifically by way of cholecystokinin-A receptors." *Gastroenterology* 107(4): 1135-46.
- Puneet, P., S. Moochhala, et al. (2005). "Chemokines in acute respiratory distress syndrome." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(1): L3-15.
- Radler-Pohl, A., C. Sachsenmaier, et al. (1993). "UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase." *EMBO J* 12(3): 1005-12.
- Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." *J Biol Chem* 270(13): 7420-6.
- Raingeaud, J., A. J. Whitmarsh, et al. (1996). "MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." *Mol Cell Biol* 16(3): 1247-55.
- Rakhshan, F., T. A. Day, et al. (2000). "Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells." *J Pharmacol Exp Ther* 292(3): 960-7.
- Raraty, M., J. Ward, et al. (2000). "Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(24): 13126-31.
- Renart, J., J. Reiser, et al. (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3116-20.
- Renz-Polster, H., S. Krautzig, et al. (2004). *Basislehrbuch Innere Medizin*. München, Urban & Fischer.
- Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, et al. (1994). "SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor." *FEBS Lett* 350(2-3): 240-4.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 180-6.
- Ross, R. A., H. C. Brockie, et al. (1999). "Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630." *Br J Pharmacol* 126(3): 665-72.
- Ross, R. A., T. M. Gibson, et al. (1999). "Structural determinants of the partial agonist-inverse agonist properties of 6'-azidohept-2'-yne-delta8-tetrahydrocannabinol at cannabinoid receptors." *Br J Pharmacol* 128(3): 735-43.
- Rouse, J., P. Cohen, et al. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* 78(6): 1027-37.
- Ruiu, S., G. A. Pinna, et al. (2003). "Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor." *J Pharmacol Exp Ther* 306(1): 363-70.
- Russo, E. (2004). *The Medicinal uses of cannabis and cannabinoids. The Medicinal uses of cannabis and cannabinoids*. G. W. G. B. A. W. P. J. Robson, Pharmaceutical Press: 1.
- Ryberg, E., N. Larsson, et al. (2007). "The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor." *Br J Pharmacol* 152(7): 1092-101.
- 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., M. Saluja, et al. (1989). "Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization." *J Clin Invest* 84(4): 1260-6.
- Saluja, A. K., L. Bhagat, et al. (1999). "Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini." *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): G835-42.
- 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(22): 8968-71.
- Schafer, C., P. Clapp, et al. (1999). "HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells." *Am J Physiol* 277(6 Pt 1): C1032-43.

LITERATURVERZEICHNIS

- Schafer, C., S. E. Ross, et al. (1998). "A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini." *J Biol Chem* 273(37): 24173-80.
- Schafer, C. and J. A. Williams (2000). "Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: possible roles in normal function and disease." *J Gastroenterol* 35(1): 1-9.
- Schirmer, A. M. (1893). *Beitrag zur Geschichte und Anatomie des Pankreas*. Hohe Medizinische Fakultät zu Basel. Basel, Hohe Medizinische Fakultät zu Basel.
- Schlesinger, M. J. (1990). "Heat shock proteins." *J Biol Chem* 265(21): 12111-4.
- Schuel, H., M. C. Chang, et al. (1991). "Cannabinoids inhibit fertilization in sea urchins by reducing the fertilizing capacity of sperm." *Pharmacol Biochem Behav* 40(3): 609-15.
- Schwacha, H. and N. Semmo (2006). Kapitel 33 Gallenwege und exokrines Pankreas. *Klinische Pathologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 902-909.
- Shiratori, K., T. Takeuchi, et al. (2002). "Clinical evaluation of oral administration of a cholecystokinin-A receptor antagonist (loxiglumide) to patients with acute, painful attacks of chronic pancreatitis: a multicenter dose-response study in Japan." *Pancreas* 25(1): e1-5.
- Shire, D., B. Calandra, et al. (1996). "Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor." *Biochim Biophys Acta* 1307(2): 132-6.
- Siegenthaler, W. (2006). *Gallenwege und exokrines Pankreas. Klinische Pathophysiologie*. W. B. H. Siegenthaler, Thieme. 9: 902-904.
- Smart, D., M. J. Gunthorpe, et al. (2000). "The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1)." *Br J Pharmacol* 129(2): 227-30.
- Soudah, H. C., Y. Lu, et al. (1992). "Cholecystokinin at physiological levels evokes pancreatic enzyme secretion via a cholinergic pathway." *Am J Physiol* 263(1 Pt 1): G102-7.
- Starling, E. H. (1905). "Croonian Lecture: On the Chemical correlation of the functions of the body 1." *Lancet* 166(August): 339-341.
- Stein, B., H. Brady, et al. (1996). "Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade." *J Biol Chem* 271(19): 11427-33.
- Stella, N., P. Schweitzer, et al. (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." *Nature* 388(6644): 773-8.
- Stokoe, D., D. G. Campbell, et al. (1992). "MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase." *EMBO J* 11(11): 3985-94.
- Stokoe, D., K. Engel, et al. (1992). "Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins." *FEBS Lett* 313(3): 307-13.
- Storr, M., E. Gaffal, et al. (2002). "Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus." *Can J Physiol Pharmacol* 80(1): 67-76.
- Storr, M. A., C. M. Keenan, et al. (2008). "Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors." *J Mol Med* 86(8): 925-36.
- Storr, M. A., C. M. Keenan, et al. (2009). "Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis." *Inflamm Bowel Dis* 15(11): 1678-85.
- Sugiura, T., T. Kodaka, et al. (1997). "Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108-15 cells." *J Biochem* 122(4): 890-5.
- Sugiura, T., T. Kodaka, et al. (1996). "2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca²⁺ in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 229(1): 58-64.
- Sugiura, T., S. Kondo, et al. (1995). "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain." *Biochem Biophys Res Commun* 215(1): 89-97.
- Sugiura, T., S. Kondo, et al. (1996). "Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca²⁺-dependent transacylase and phosphodiesterase activities." *Biochem Biophys Res Commun* 218(1): 113-7.
- Sun, Y., S. P. Alexander, et al. (2006). "Cannabinoids and PPAR α signalling." *Biochem Soc Trans* 34(Pt 6): 1095-7.
- Suzuki, M., S. Isaji, et al. (1992). "Effect of protease inhibitor FUT-175 on acute hemorrhagic pancreatitis in mice." *Int J Pancreatol* 11(1): 59-65.

- Takeda, K., Y. Mikami, et al. (2005). "Pancreatic ischemia associated with vasospasm in the early phase of human acute necrotizing pancreatitis." *Pancreas* 30(1): 40-9.
- Tan, Y., J. Rouse, et al. (1996). "FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2." *EMBO J* 15(17): 4629-42.
- Teich, N., J. Ockenga, et al. (2000). "Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation." *Gastroenterology* 119(2): 461-5.
- Teramoto, H., O. A. Coso, et al. (1996). "Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family." *J Biol Chem* 271(44): 27225-8.
- Teramoto, H., P. Crespo, et al. (1996). "The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway." *J Biol Chem* 271(42): 25731-4.
- Thomopoulos, K. C., N. A. Pagoni, et al. (2006). "Twenty-four hour prophylaxis with increased dosage of octreotide reduces the incidence of post-ERCP pancreatitis." *Gastrointest Endosc* 64(5): 726-31.
- Tietz, A. B., A. Malo, et al. (2006). "Gene deletion of MK2 inhibits TNF-alpha and IL-6 and protects against cerulein-induced pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(6): G1298-306.
- 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.
- Tournier, C., A. J. Whitmarsh, et al. (1997). "Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14): 7337-42.
- 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.
- Van Acker, G. J., A. K. Saluja, et al. (2002). "Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(3): G794-800.
- Van Acker, G. J., E. Weiss, et al. (2007). "Cause-effect relationships between zymogen activation and other early events in secretagogue-induced acute pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(6): G1738-46.
- Van Sickle, M. D., M. Duncan, et al. (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." *Science* 310(5746): 329-32.
- Vasquez, C., R. A. Navarro-Polanco, et al. (2003). "Effects of cannabinoids on endogenous K⁺ and Ca²⁺ currents in HEK293 cells." *Can J Physiol Pharmacol* 81(5): 436-42.
- Wagner, A. C., L. Mazzucchelli, et al. (2000). "CEP-1347 inhibits caerulein-induced rat pancreatic JNK activation and ameliorates caerulein pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(1): G165-72.
- Wagner, A. C., W. Metzler, et al. (1999). "p38 map kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following cerulein hyperstimulation." *Digestion* 60(1): 41-7.
- Wagner, A. C., H. Weber, et al. (1996). "Hyperthermia induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rats." *Gastroenterology* 111(5): 1333-42.
- Walter, L. and N. Stella (2004). "Cannabinoids and neuroinflammation." *Br J Pharmacol* 141(5): 775-85.
- Wan, Y., T. Kurosaki, et al. (1996). "Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors." *Nature* 380(6574): 541-4.
- Wang, X. Z. and D. Ron (1996). "Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase." *Science* 272(5266): 1347-9.
- Wank, S. A., R. Harkins, et al. (1992). "Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7): 3125-9.
- Wank, S. A., J. R. Pisegna, et al. (1992). "Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(18): 8691-5.
- Wargo, K. A., B. N. Geveden, et al. (2007). "Cannabinoid-induced pancreatitis: a case series." *JOP* 8(5): 579-83.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, et al. (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." *EMBO J* 16(8): 1909-20.
- 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.
- Weber, H., A. C. Wagner, et al. (2000). "Heat shock response is associated with protection against acute interstitial pancreatitis in rats." *Dig Dis Sci* 45(11): 2252-64.

LITERATURVERZEICHNIS

- Welsch, U. (2003). *Lehrbuch Histologie*. München, Urban & Fischer.
- Welsh, M. J. and M. Gaestel (1998). "Small heat-shock protein family: function in health and disease." *Ann N Y Acad Sci* 851: 28-35.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* 79(1): 143-80.
- Wilcox, C. M., S. Varadarajulu, et al. (2006). "Role of endoscopic evaluation in idiopathic pancreatitis: a systematic review." *Gastrointest Endosc* 63(7): 1037-45.
- Williams, J. A. (2008). "Receptor-mediated signal transduction pathways and the regulation of pancreatic acinar cell function." *Curr Opin Gastroenterol* 24(5): 573-9.
- Wright, K., N. Rooney, et al. (2005). "Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing." *Gastroenterology* 129(2): 437-53.
- Wright, K. L., M. Duncan, et al. (2008). "Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation." *Br J Pharmacol* 153(2): 263-70.
- Wu, Z., J. Wu, et al. (1997). "Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase." *Mol Cell Biol* 17(12): 7407-16.
- Xia, Z., M. Dickens, et al. (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." *Science* 270(5240): 1326-31.
- Xiong, G. S., S. M. Wu, et al. (2006). "Clinical trial of gabexate in the prophylaxis of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis." *Braz J Med Biol Res* 39(1): 85-90.
- Xiong, W., M. Hosoi, et al. (2008). "Anandamide inhibition of 5-HT3A receptors varies with receptor density and desensitization." *Mol Pharmacol* 73(2): 314-22.
- Yadav, D. and A. B. Lowenfels (2006). "Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review." *Pancreas* 33(4): 323-30.
- Yan, M., T. Dai, et al. (1994). "Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1." *Nature* 372(6508): 798-800.
- Ziring, D., B. Wei, et al. (2006). "Formation of B and T cell subsets require the cannabinoid receptor CB2." *Immunogenetics* 58(9): 714-25.
- Ziring, D. A., S. S. Wu, et al. (2007). "Oral tacrolimus for steroid-dependent and steroid-resistant ulcerative colitis in children." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 45(3): 306-11.
- Zygmunt, P. M., J. Petersson, et al. (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." *Nature* 400(6743): 452-7.

Danksagung

Zu allererst möchte ich PD Dr. med. Claus Schäfer für die sehr gute, freundliche und zuverlässige Betreuung während des gesamten Verlaufs meiner Doktorarbeit danken. Desweiteren danke ich ihm sehr dafür, dass er in mir während dieser Zeit die Freude an der biomedizinischen Forschung geweckt hat.

Für die Einführung und Unterstützung bei der Durchführung der unterschiedlichen Methoden möchte ich Antje Malo, Bettina Ziehe und Steffi Ochs besonders danken. Meinen Mitdoktoranden Florian Fries und Johannes Kramer danke ich für die konstruktiven Gespräche und gute Gesellschaft im Labor.

Last but not least danke ich meinen Eltern Inge und Gert Michler dafür, dass sie mir durch ihre bedingungslose Unterstützung mein Studium und meine Doktorarbeit ermöglichten.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Thomas Michler
geboren am 3. September 1981 in Friedrichshafen

Schul Ausbildung:

09/1988 - 07/1992 Grunds chule in Immenstaad am Bodensee
09/1992 - 07/2001 Gymnasium am Bildungszentrum in Markdorf

Universitäre Ausbildung:

04/2002 - 04/2009 Studium der Humanmedizin an der LMU München
03/2004 Physikum
05/2009 Staatsexamen Note 2,0

Praktisches Jahr:

12/2007 – 03/2008 Anästhesie im Klinikum Garmisch-Partenkirchen
03/2008 – 07/2008 Chirurgie im New Somerset Hospital in Kapstadt
08/2008 – 12/2008 Innere Medizin im Groote Schuur Hospital in Kapstadt

Dissertation:

02/2007 – 10/2007 Laborarbeit in der Arbeitsgruppe PD Dr. med. Claus Schäfer,
Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern
10/2007 Postervorstellung auf der Jahrestagung 2007 der Gesellschaft
für Gastroenterologie in Bayern
11/2007 Postervorstellung beim Deutschen Pankreasclub 2007

veröffentlichte Abstracts:

Schäfer C., Michler T., Kramer J., Malo A., Göke B., Storr M.
The role of CB2-receptors in acute Pancreatitis. *Pancreas* 37
(4), 493: 2008

Storr M., Malo A., Michler T., Göke B., Schäfer C. Rausch
oder neuer Therapieansatz: Die Rolle von CB2-Rezeptoren
bei der akuten Pankreatitis-Untersuchungen an einem
Mausmodell. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 832, A305

Berufliche Tätigkeit:

seit 02/2010 Assistenzarzt im Institut für Virologie, TU München

München, 2010 - 08 - 05

Thomas Michler