

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**Die Wirkung von HU210 am Cannabinoid-1-Rezeptor bei akuter
Cerulein-induzierter Pankreatitis im Tiermodell**

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

vorgelegt von
Johannes Matthias Kramer

aus
Heilbronn

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. C. Schäfer
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Axel Kleespies Prof. Dr. med. Max Schnurr
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. med. M. Storr
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	08.03.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung	8
1.1 Die Physiologie des exokrinen Pankreas	9
1.2 Die akute Pankreatitis	9
1.2.1 Epidemiologie, Verlauf und Therapie der akuten Pankreatitis.....	9
1.2.2 Pathophysiologie der akuten Pankreatitis.....	10
1.3 Die Rolle von Cholezystokinin bei der experimentellen Pankreatitis	11
1.4 Das Cannabinoid-System.....	12
1.4.1 Cannabinoid-Rezeptoren	14
1.4.2 Der CB-Rezeptor Agonist HU210.....	16
1.4.3 Der CB1-Rezeptor-selektive Antagonist AM281.....	16
1.4.4 Auswirkung der CB1-Rezeptor-Bindung	17
1.5 Mitogen-activated-Protein-Kinasen (MAPK) und deren Regulation	18
1.5.1 p44/42 (ERK1/2)	19
1.5.2 p38.....	20
1.5.3 c-Jun-N-terminal Kinase (JNK)	20
1.5.4 Die Aktivierung der Kinasen-Kaskaden.....	21
1.6 Fragestellung dieser Arbeit	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Verwendete Materialien und Geräte	24
2.1.1 Verwendete Materialien	24
2.1.2 Verwendete Geräte	26
2.2 Tiermodell.....	27
2.2.1 Versuchstiere und Versuchsaufbau	27
2.2.1.1 Verabreichte Substanzen.....	29
2.2.1.2 Versuchsdurchführung	30
2.2.1.3 Beendigung der Versuchsreihen und Materialgewinnung	32
2.3 Laborchemische Messwerte.....	33
2.3.1 α -Amylase im Serum.....	33
2.3.2 Myeloperoxidase im Lungenhomogenisat	34
2.3.3 aktiviertes Trypsin im Pankreashomogenisat	35
2.3.4 Interleukin-6 im Serum.....	36

2.4 Histopathologische Untersuchungen	37
2.4.1 Ödemisierungsgrad des Pankreas	37
2.4.2 Histologie	38
2.5 Intrazelluläre Signalwege	38
2.5.1 Western-Blot	38
2.5.2 Quantitative Analyse der Blots.....	42
2.6 Sonstige Verfahren	42
2.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	42
2.6.2 PCR	43
2.6.3 Immunopräzipitation	45
2.6.4 Immunhistochemie	45
2.6.5 Statistische Auswertung	46
2.6.6 Literaturverwaltung	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Nachweis des CB1-Rezeptors in humanen und tierischen Geweben	48
3.1.1 RT-PCR	49
3.1.2 Western-Blotting	49
3.1.3 Immunpräzipitation	50
3.1.4 Immunhistochemie	50
3.1.4.1 Immunhistochemie bei Wildtyptieren.....	50
3.1.4.2 Immunhistochemie bei CB1-/- Tieren	52
3.2 Ergebnisse der laborchemischen Untersuchungen	53
3.2.1 Amylase im Blutserum	53
3.2.2 Myeloperoxidase im Lungenhomogenisat	54
3.2.3 Trypsinaktivität im Pankreashomogenisat.....	56
3.2.4 Interleukin-6 im Blutserum	58
3.3 Histopathologische Untersuchungen	60
3.3.1 Ödemisierungsgrad des Pankreasgewebes	60
3.3.2 Histologie	61
3.4 Ergebnisse der intrazellulären Signalweg-Forschung.....	63
3.4.1 Phosphorylierung von p38.....	64
3.4.1.1 Phosphorylierung von p38 bei Wildtyptieren	64
3.4.1.2 Phosphorylierung von p38 bei CB1-/- Tieren.....	65
3.4.2 Phosphorylierung von JNK	66
3.4.2.1 Phosphorylierung von JNK bei Wildtyptieren	67
3.4.2.2 Phosphorylierung von JNK bei CB1-/- Tieren.....	69

3.4.3 Phosphorylierung von p44/42	70
3.4.3.1 Phosphorylierung von p44/42 bei Wildtyptieren	70
3.4.3.2 Phosphorylierung von p44/42 bei CB1-/- Tieren.....	72
4. Diskussion	73
4.1 Der CB1-Rezeptor-Nachweis	73
4.2 Die protektive Wirkung von Cannabinoiden auf die Pankreatitis	73
4.3 Die intrazellulären Signalwege bei der Cannabinoid-Protektion	78
4.3.1 Auswirkungen auf p38	79
4.3.2 Auswirkungen auf JNK	80
4.3.3 Auswirkungen auf p44/42	80
4.4 Allgemeine Methodenkritik.....	81
5. Zusammenfassung, Schlussfolgerung und Ausblick	84
6. Literaturverzeichnis.....	88
7. Publikationen.....	98
8. Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AC	Adenylatzyklase
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	AMP-dependent transcription factor
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB1-/-	Cannabinoid-1-Rezeptor knock-out
CB1- / CB2- / CB3-Rezeptor	Cannabinoid-1-Rezeptor / Cannabinoid-2 - Rezeptor / Cannabinoid-3-Rezeptor
CCK	Cholezystokinin
DAB	Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DOX	Doxorubicin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	Extracellular regulated kinase
et al.	et alia
g	Gramm
g	Beschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPR	G-protein-coupled receptor
Grb	Growth-factor receptor-bound protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hsp	Hitze-Schock-Protein
HU	Hebrew University
Ig G	Immunglobulin G
IL-1/ IL-6	Interleukin-1 / Interleukin-6
JNK	c-jun n-terminale Kinase
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
k.s.	Keine Signifikanz
l	Liter
M	Mol / Liter
MAGL	Monoacylglycerollipase
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase

MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MAPKAP-Kinase 2/3	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2/3
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	(3-N-Morpholino) propanesulfonic acid
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
p	p-Wert
p38	p38-Map-Kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Privatdozent
PEA	Palmitylethanolamid
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ER	endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP1	Serum response factor accessory protein 1
SAPK	Stress activated protein kinase
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	Tetramethylethylendiamin
THC	Tetrahydrocannabinol
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TRIS base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate
UV	Ultraviolett
V	Volt
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
μ l	Mikroliter
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
0,9 % NaCl	0,9 % Natrium Chlorid - Lösung

1. Einleitung

Das Pankreas ist in seiner Funktion durch zwei charakteristische Hauptaufgaben gekennzeichnet: die Sekretion von Stoffen auf exokrinem sowie endokrinem Weg. Die Physiologie und Pathophysiologie der endokrinen Sekretion ist vor allem auf Grund der Volkskrankheit Diabetes Mellitus Gegenstand intensiver Forschungen. Die von der Insulinsekretion unabhängige weitere wichtige Aufgabe dieses Organs ist die Bereitstellung von Verdauungsenzymen.

Eine gravierende Erkrankung des Pankreas ist die akute Pankreatitis. Obwohl viele Risikofaktoren und direkte Auslöser der Erkrankung bekannt sind, ist das Spektrum an Therapiemöglichkeiten schmal: es existiert bis heute keine kausale Therapie, es stehen lediglich supportive Maßnahmen zur Verfügung.

Obwohl medizinische Erfahrungen mit Cannabis als Medikament bereits fünftausend Jahre alt sind, sind Cannabinoide Substanzen noch immer oder gerade erst jetzt wieder Gegenstand aktueller Forschung. Es wurden bereits in vielen modernen Studien systemische Wirkungen der Cannabinoiden Substanzen auf die unterschiedlichsten Organsystem nachgewiesen (Richardson, Kilo et al. 1998; Fox, Kesingland et al. 2001; Germano, D'Angelo et al. 2001; Storr, Gaffal et al. 2002; Ugdyzhekova, Krylatov et al. 2002; Bermudez-Siva, Serrano et al. 2006; De Gottardi, Spahr et al. 2010; Storr, Bashashati et al. 2010).

Die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Cannabinoidwirkung auf die Pankreatitis sind allerdings zum einen überhaupt rar und zum anderen dazu noch widersprüchlich. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, diese mögliche neue, moderne und kausale Therapieform der akuten Pankreatitis im Tiermodell erstens auf ihre Wirksamkeit und zweitens auf ihren Wirkmechanismus hin zu untersuchen.

Im Folgenden werden zunächst die bekannten Grundlagen für diese Arbeit kurz erläutert: die Physiologie des Pankreas, die akute Pankreatitis, das Tiermodell, das System der Cannabinoide und ihren Rezeptoren sowie die betroffenen Signalwege. Anschließend werden die verwendeten Methoden und die zugehörigen Materialien erläutert. Hiernach werden die Forschungsergebnisse präsentiert. Dem folgt eine Diskussion der Ergebnisse im Kontext des aktuellen Wissens. Eine Zusammenfassung sowie die Auflistung der aktuellen Literatur schließen diese Arbeit.

1.1 Die Physiologie des exokrinen Pankreas

Der exokrine Teil des Pankreas besteht aus den Verdauungsenzym-bildenden Azinuszellen sowie einem drainierenden Gangsystem. Dieses Gangsystem sezerniert außerdem – durch Hormone wie Sekretin stimuliert – Flüssigkeit und Elektrolyte. Die Pankreasgänge vereinigen sich zum Ductus pancreaticus und drainieren das Sekret über die Papilla duodeni in das gastrointestinale Hohlraum. Die Azinuszellen sind beerenförmig um Endstücke der Pankreasgänge angelegt. In den Azinuszellen erfolgt die Produktion von Verdauungsenzymen zusammen mit der Produktion von lysosomalen Hydrolasen über die ribosomale Proteinsynthese am rauen endoplasmatischen Retikulum. Die Enzyme werden danach im Golgi-Apparat in Vakuolen verpackt. Die Vakuolen werden in intrazellulär apikal gelagerten Zymogengranula hochkonzentriert gespeichert (Lüllmann-Rauch 2003).

Auf muskarinartige cholinerge Reize (Steer and Meldolesi 1987) beziehungsweise auf Grund von Stimulation durch das Hormon Cholezystokinin (CCK) werden die Granula exozytotisch in die Pankreasgänge entleert (Palade 1975).

Die Verdauungsenzyme sind aggressive Substanzen: das Pankreas wird durch eine Reihe von Maßnahmen gegen eine mögliche Autodigestion geschützt. Erstens werden die aggressiven proteolytischen Enzyme als inaktive Vorstufen hergestellt, die erst im Duodenum durch eine Enterokinase aktiviert werden. Zweitens werden die Proteasen intrazellulär in speziellen Granula getrennt von Zytoplasma und Zellorganellen gelagert. Innerhalb der Speichergranula herrscht überdies ein für die Wirkung der Proteasen ungünstiger pH-Wert. Drittens werden im Pankreas auch Proteaseinhibitoren hergestellt. Diese inaktivieren zu früh aktivierte Enzyme (Lerch and Gorelick 2000).

1.2 Die akute Pankreatitis

1.2.1 Epidemiologie, Verlauf und Therapie der akuten Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist mit einer Inzidenz von 10-46 Fällen pro 100.000 Einwohner je nach Ort der Erhebung eine relativ häufige Erkrankung des Gastrointestinaltrakts (Secknus and Mossner 2000). Es sind viele Ursachen für eine akute Pankreatitis bekannt. Die Hauptursachen - zusammen zirka 80% - sind Gallenwegserkrankungen wie Cholelithiasis oder Gallengangs-, sowie Papillenstenosen und Alkoholabusus (Gullo, Migliori et al. 2002). Weitere Ursachen sind hereditäre Pankreatitiden im

Rahmen autosomal-dominanter Erbgänge. Die früher „idiopathisch“ genannte Pankreatitis wird heute seltener als Ursache angeführt, da in den letzten Jahren mehrere neue Gene als Ursache einer Pankreatitis identifiziert werden konnten (Joergensen, Brusgaard et al. 2010). Weitere Ursachen sind primärer Hyperparathyreoidismus, medikamentös induzierte Pankreatitiden sowie Pankreatitiden als Reaktionen auf Bauchtraumata oder auf iatrogene endoskopisch retrograde Cholangio-pankreatikographien (ERCP). Auch Virusinfekte und Autoimmunerkrankungen im Sinne einer Autoimmunpankreatitis können Ursachen dieser Erkrankung sein.

Die akute Pankreatitis kann klinisch und morphologisch grundsätzlich in zwei Formen unterteilt werden: in die häufigere (80-85%) interstitiell-ödematöse Pankreatitis mit geringer Letalität und in die akute nekrotisierende Pankreatitis (Häufigkeit 15-20%) mit einer Letalität – abhängig vom Größenanteil der Organnekrose – von bis zu über 50% (Herold 2007).

Die akute Pankreatitis weist eine Reihe potentiell schwerwiegender Komplikationen auf. Die Erkrankung kann systemische Probleme ähnlich dem Severe Inflammation Response Syndrome (SIRS) über die Grenzen des Organs hinaus zur Folge haben: es finden sich am häufigsten Kreislaufschock, disseminierte intravasale Gerinnung oder Nieren-, und Lungenversagen (Bhatia 2009).

Es gibt keine spezifische medikamentöse Therapie der akuten Pankreatitis – die heute bekannten Therapieformen sind rein symptomatisch.

1.2.2 Pathophysiologie der akuten Pankreatitis

Charakteristisch für die Pankreatitis ist die frühzeitige intrapankreatische Aktivierung von Verdauungsenzymen mit resultierendem Selbstverdau des Organs. Bereits sehr früh war bekannt, dass Abflusshindernisse des Pankreassaftes und somit ein Enzymstau im Organ eine Pankreatitis auslösen können (Opie 1901). Damals waren die Pathomechanismen der Autodigestion allerdings unbekannt. In neuerer Zeit konnte gezeigt werden, dass eine morphologische Änderung der Azinuszellen einer Autodigestion des Organs vorangeht (Lerch, Saluja et al. 1992). Dennoch war zu diesem Zeitpunkt der Mechanismus der vorzeitigen Aktivierung der als inaktiven Vorstufen produzierten Enzyme noch nicht klar.

Heute jedoch sind einige Mechanismen die zum Selbstverdau des Pankreas führen geklärt: vor allem die Frühphase der Pankreatitis ist ausschlaggebend. Während dieser ist eine Trias an Phänomenen zu nennen, die letztlich zur Auslösung der Pankreatitis führen (Steer 1997):

Erstens die Blockade der apikalen Exozytose der Verdauungsenzyme (Saluja, Saluja et al. 1989): während der Frühphase der Pankreatitis kommt es zu einer Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Zellen, welches zum intrazellulären Transport von Verdauungsenzymen nötig ist (Lampel and Kern 1977). Da die Proteinbiosynthese intrazellulär weiter aktiv bleibt kommt es zu einer intrazellulären Anreicherung von Verdauungsenzymen.

Zweitens die verfrühte, noch intrapankreatische Aktivierung von Verdauungsenzymen (Saluja, Donovan et al. 1997; Hofbauer, Saluja et al. 1998). Durch die bereits beschriebene Sekretionsblockade mit konsekutivem Sekretstau kann eine zu frühe Aktivierung der Enzyme erfolgen, denn die Enzymvorstufen sind zusammen mit ihren aktivierenden lysosomalen Hydrolasen in Vakuolen gespeichert (Saluja, Hashimoto et al. 1987).

Drittens die Bildung systemischer pro-inflammatorischer Stoffe wie Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). Es konnte gezeigt werden, dass diese Zytokine in exokrinen Azini exprimiert werden und somit das Entzündungsgeschehen unterhalten (Tietz, Malo et al. 2006). Durch den Organselbstverdau werden pro-inflammatorische Mediatoren freigesetzt. Die Höhe dieser Zytokin-Freisetzung korreliert mit der Höhe der laborchemisch bestimmbaren inflammatorischen Serumparameter (Gross, Leser et al. 1993). Die immunologische Antwort des Organismus auf die Entzündung des Pankreas bestimmt die Entwicklung der erwähnten Organkomplikationen. Durch eine systemische Aktivierung von Leukozyten kann ein generalisiertes SIRS ausgelöst werden. (Bhatia, Wong et al. 2005; Liu, Xu et al. 2005; Bhatia 2009; Chooklin, Pereyaslov et al. 2009).

1.3 Die Rolle von Cholezystokinin bei der experimentellen Pankreatitis

Das Peptidhormon Cholezystokinin (CCK) stimuliert die Produktion von Verdauungsenzymen in den Azinuszellen des Pankreas. Es wird von enterokrinen Zellen des Duodenums nach Stimulation durch die postprandiale Speisebreipassage sezerniert. In physiologischen Konzentrationen reguliert CCK die postprandiale pankreatische Enzymproduktion und gewährleistet eine korrekte Verdauung (Niederau, Luthen et al. 1994).

Synonym zum Begriff Cholezystokinin wird der Begriff Pankreozymin gebraucht.

Lampel et al. und Adler et al. zeigten 1977 und 1983 bei Ratten, dass durch die Gabe unphysiologisch hoher Dosen eines CCK-Analogons (Cerulein) eine interstitielle Pankreatitis ausgelöst werden kann. Dies wurde sichtbar in einer interstitiellen

Ödemisierung des Organs, einem Anstieg der Serumamylase-Werte, einer erhöhten lysosomalen Aktivität der Azinuszellen sowie in einem Verschmelzen von intrazellulären Zymogengranula (Lampel and Kern 1977; Adler, Gerhards et al. 1983). Gemäß dieser Theorie wurde in der vorliegenden Arbeit ein entsprechendes Tierversuchsmodell verwendet. Die Induktion einer Überstimulations-Pankreatitis erfolgte durch intraperitoneale Injektionen von Cerulein. Diese Methode wurde 1992 bei Mäusen etabliert (Willemer, Elsasser et al. 1992).

Das CCK-Analogen Cerulein wurde erstmals 1968 in der Haut des in Australien vorkommenden Froschs „*Hyla caerulea*“ entdeckt (De Caro, Edean et al. 1968).

Die Stimulation mit CCK aktiviert zusätzlich Mitogen-activated-Protein-Kinase-Kaskaden (MAPK). Diese übertragen extrazelluläre Reize nach intrazellulär und vermitteln eine intranukleäre Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (siehe 1.5).

1.4 Das Cannabinoid-System

Hanf (*Cannabis*) gehört zu der Gattung der Hanfgewächse. Während einige Autoren Hanf eine monotypische Gattung nennen (*Cannabis sativa*), sprechen andere von zwei weiteren Arten innerhalb der Gattung. Die Hanfpflanzen wurden nach geografischem Vorkommen – *Cannabis indica*, oder nach Wuchstyp – *Cannabis ruderalis* benannt. Erst in jüngerer Zeit wurde durch umfangreiche genetische Analysen und durch Untersuchungen der Chemotaxonomie der Hanfpflanzen festgestellt, dass eine Einteilung in zwei Gattungen wissenschaftlich korrekt ist: *Cannabis sativa* und *Cannabis indica* (Hillig Karl W. 2005). Als medizinisch wirksamer Hanf gilt *Cannabis sativa*.

Die Menschheit hat seit Langem Erfahrung mit der Nutzung von *Cannabis* als Medikament: seit zirka 5000 Jahren wird *Cannabis* therapeutisch genutzt. Chinesische Überlieferungen beweisen, dass *Cannabis* bereits 2700 vor Christus als Antirheumatikum und als Laxans eingesetzt wurde (Zuardi 2006).

Die Wirkung von *Cannabis*, vor allem der psychotrop-berauschende Effekt, wird hauptsächlich durch den Stoff Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) vermittelt (Deniker, Ginestet et al. 1975). Diese Substanz kommt in den Kelchblättern weiblicher Pflanzen vor.

Es existiert jedoch nicht nur dieser eine Wirkstoff. Zirka 60 bis 70 Inhaltsstoffe der Hanfpflanzen – sogenannte Terpenphenole – werden zu den Cannabinoiden gezählt

(Pertwee 2004). Sie zeichnen sich alle durch einen ähnlichen chemischen Aufbau aus: eine trizyklische Struktur bestehend aus einem Phenolring, einem zentralen Pyranring und einem Cyclohexylring (Mechoulam 1970). Neben Delta-9-THC sind auch andere natürliche cannabinoide Wirkstoffe erforscht: Cannabinol, Cannabidiol und Delta-8-THC (s. Abb. 1).

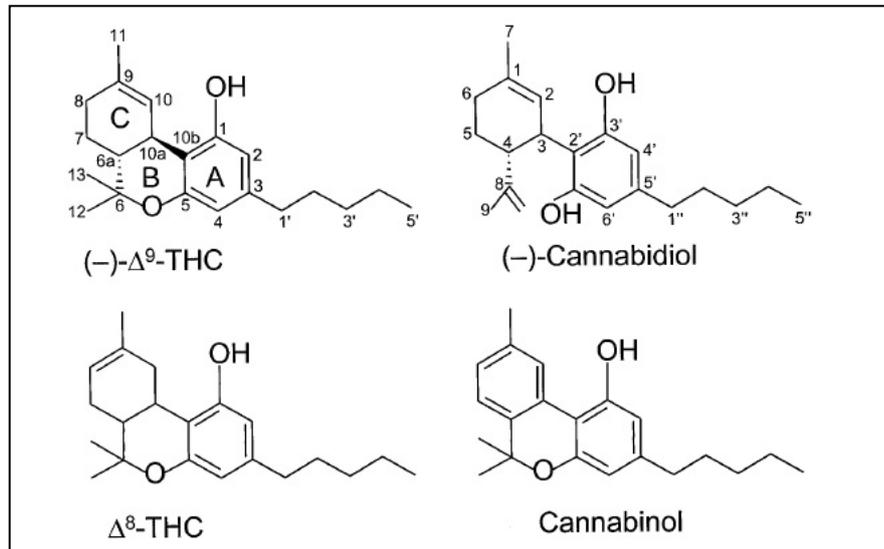


Abb. 1: Aufbau der natürlichen Cannabinoide Delta-9-THC, Cannabidiol, Delta-8-THC und Cannabinol (Howlett, Barth et al. 2002)

In den sechziger Jahren wurden die cannabinoide Wirkstoffe aus den Cannabispflanzen extrahiert. 1963 wurde die Strukturformel von Cannabidiol identifiziert (Mechoulam and Hanus 2002). Kurz darauf wurde die Struktur von Delta-9-THC – dem psychotropen Hauptwirkstoff von Cannabis – aufgeklärt (Mechoulam and Gaoni 1967).

Die damals bekannten Substanzen werden als natürliche Cannabinoide bezeichnet. Neben den aus Hanfpflanzen extrahierbaren natürlichen Cannabinoiden wurden im Laufe der Jahre auch synthetische Cannabinoide entwickelt: beispielsweise das 1,1-Dimethylheptyl-11-hydroxytetrahydrocannabinol (HU210) und das (+)-Enantiomer HU211, sowie Desacetyl-L-nantradol (Howlett, Barth et al. 2002) (s. Abb 2). HU steht für „Hebrew University“, dem Entdeckungsort der Stoffe.

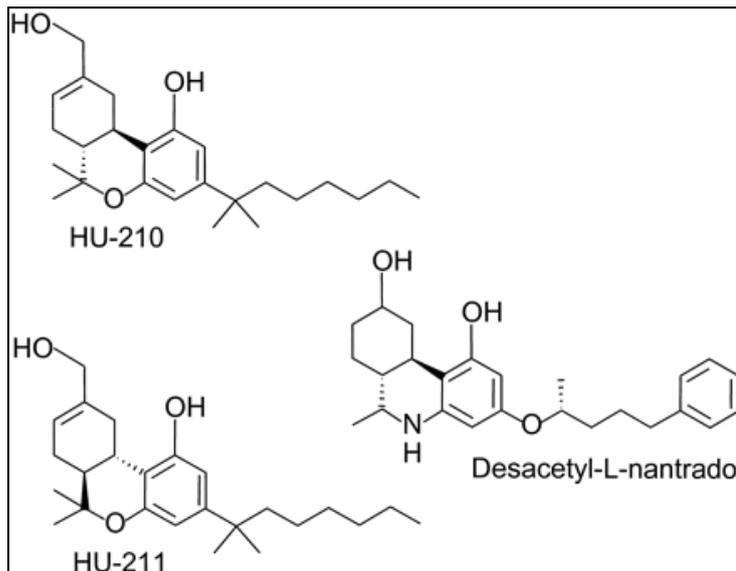


Abb. 2:
Aufbau einiger beispielhafter
synthetischer Cannabinoide:
HU210, HU211 und
Desacetyl-L-nantradol
(Howlett, Barth et al. 2002)

Während natürliche Cannabinoide unselektiv an beiden Cannabis-Rezeptoren wirken (s. 1.4.1), wurden die synthetischen Cannabinoide dahingehend weiterentwickelt, dass jetzt spezifische Agonisten und Antagonisten sowohl am CB1-, als auch am CB2-Rezeptor zur Verfügung stehen.

CB1-Rezeptoren-selektive Agonisten sind die körpereigenen Endocannabinoide. Selektive CB2-Rezeptoren-Agonisten sind die Stoffe JWH-015, WIN-55,212-2 und 5'-F-Delta-8-THC. An beiden Rezeptoren gemischt-agonistisch wirken natürliche Cannabinoide aus Cannabis und einige synthetische Cannabinoide wie der in dieser Arbeit verwendete Stoff HU210 (Showalter, Compton et al. 1996). Auf die für diese Arbeit relevanten Stoffe wird an späterer Stelle noch detaillierter eingegangen (s. 1.4.2 und 1.4.3).

1.4.1 Cannabinoid-Rezeptoren

Auf Basis des Jahrtausende alten Wissens über die Wirksamkeit von Cannabis wurde im Zuge der Weiterentwicklung von synthetischen Cannabinoiden der mögliche Einsatz von Cannabinoiden als Medikamente fokussiert.

Pharmazeutische Forscher arbeiteten an einem Analgetikum auf Cannabis-Basis mit der Wirkstärke von Opiaten – ohne dass dieses allerdings an Opioid-Rezeptoren band (Johnson, Melvin et al. 1981). Die hierbei hergestellten synthetischen Cannabinoide hatten auf Grund der chemischen Modifikationen eine geringe Lipophilie und eine höhere Affinität zu den Rezeptoren. Diese Grundvoraussetzungen und die Bestrebungen der pharmazeutischen Industrie, die Rezeptoren zu finden, die die Cannabinoid-Wirkung vermitteln, führte zu der Entdeckung einer Cannabinoid-Bindungsstelle im

Hirngewebe von Ratten (Devane, Dysarz et al. 1988). Kurz darauf wurde ein G-Protein-gekoppelter Cannabinoid-Rezeptor in der zerebralen mRNA einer Ratte entdeckt. Hiernach wurde das CB1-Rezeptor-Transkript geklont (Matsuda, Lolait et al. 1990). Auch in anderen Geweben (z.B. Darm, Urogenitaltrakt) konnte der Rezeptor später nachgewiesen werden (Pertwee and Fernando 1996; Pertwee, Fernando et al. 1996; Pertwee, Joe-Adigwe et al. 1996).

In humanem Gewebe konnte der CB1-Rezeptor ebenfalls nachgewiesen werden. Zunächst im Gehirn, sowie in geringem Maße auch im Hoden (Gerard, Mollereau et al. 1990; Gerard, Mollereau et al. 1991). Später konnte der CB1-Rezeptor auf Spermien und auf Endothelzellen nachgewiesen werden (Schuel, Chang et al. 1991; Sugiura, Kondo et al. 1996). 2008 wurde der CB1-Rezeptor in humanem endokrinen Pankreasgewebe nachgewiesen (Bermudez-Silva, Suarez et al. 2008).

1995 wurde erstmalig der Nachweis erbracht, dass der CB1-Rezeptor in Mäusen exprimiert wird. Er konnte aus Hirngewebe sequenziert werden (Chakrabarti, Onaivi et al. 1995). Außerdem wurde er in Geweben des Magen-/Darmtraktes von Mäusen nachgewiesen (Casu, Porcella et al. 2003). 2006 gelang der Nachweis des CB1-Rezeptors in endokrinen β -Zellen des Pankreas von Mäusen (Juan-Pico, Fuentes et al. 2006).

1993 wurde ein weiterer, in der Peripherie auf immunkompetenten Zellen vorhandener CB-Rezeptor – der CB2-Rezeptor – nachgewiesen (Munro, Thomas et al. 1993). Dieser erklärt die bekannten immunmodulatorischen Wirkungen der Cannabinoide. Antiinflammatorische Eigenschaften einer CB2-Rezeptoraktivierung wurden bereits im Rahmen der Kolitisforschung im Tierversuch nachgewiesen (Storr, Keenan et al. 2009).

Darüber hinaus gibt es neuere Studien, die die Existenz weiterer CB-Rezeptoren nahelegen. 1999 wurde ein „G-protein-coupled receptor 55“ (GPR 55) identifiziert (Pertwee 2002; Johns, Behm et al. 2007; Ryberg, Larsson et al. 2007). Auf Grund der Bindungsfähigkeit sowohl von Endocannabinoiden als auch von synthetischen Cannabinoiden an diesen Rezeptor liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen weiteren, „neuen“ Cannabis-Rezeptor („CB3-Rezeptor“) handelt (Overton, Babbs et al. 2006; Pertwee 2007). Allerdings wurden noch weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren entdeckt, an welche Cannabinoide binden – beispielsweise GPR 35 (Fredriksson, Hoglund et al. 2003). Es scheint also noch mehr als zwei oder drei Cannabis-Rezeptoren zu geben. Weitere Forschungen hierzu scheinen nötig.

Die Cannabis-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Transmembran-Rezeptoren mit sieben Helices. Durch die Bindung von Liganden an den Rezeptor kommt es zu einer Konfigurationsänderung unter Abspaltung eines G-Proteins. Dies aktiviert Enzyme verschiedener Signalwege sowie einige Ionenkanäle (Mackie and Hille 1992; Deadwyler, Hampson et al. 1995; Nie and Lewis 2001). Howlett et al. hatten bereits 1984 herausgefunden, dass Cannabinoide die Adenylatzyklase und damit die Produktion von intrazellulärem cAMP hemmen (Howlett and Fleming 1984). Dies wurde in späteren Studien bestätigt (Bidaut-Russell, Devane et al. 1990; Childers, Sexton et al. 1994; Howlett 1995).

Einige Autoren berichteten im Gegensatz hierzu von steigenden cAMP-Konzentrationen nach CB1-Rezeptor-Liganden-Bindung (Glass and Felder 1997; Felder, Joyce et al. 1998).

Von der durch den CB1-Rezeptor beeinflussten Adenylatzyklase (AC) existieren allerdings neun Isoformen, die wiederum in sechs verschiedene Klassen eingruppiert werden können (Patel, Du et al. 2001). Rhee et al. zeigten, dass nach Stimulation mit HU210 einige AC-Klassen inhibiert, andere hingegen aktiviert werden und somit die cAMP-Konzentrationen folglich sowohl steigen als auch sinken können (Rhee, Bayewitch et al. 1998).

1.4.2 Der CB-Rezeptor Agonist HU210

1988 entwickelten Wissenschaftler der Hebrew University in Jerusalem ein hochpotentes synthetisches Cannabinoid mit geringer Cannabis-Rezeptoren-Selektivität – 11-OH-8-Delta-THC, genannt HU210 (Mechoulam, Feigenbaum et al. 1988). Die Summenformel lautet $C_{25}H_{38}O_3$. Die pharmakologischen Besonderheiten sind eine starke Affinität zu den Rezeptoren sowie eine lange Rezeptor-Bindungszeit. Diese Eigenschaften wurden durch einen chemischen Austausch der ursprünglichen Pentyl-Seitenkette durch eine Dimethylheptyl-Gruppe an dem Ausgangsstoff – dem natürlichen Cannabinoid Delta-8-TCH – erreicht (Howlett, Champion et al. 1990; Howlett, Barth et al. 2002). HU210 ist vielfach potenter als natürliches, aus Pflanzen extrahierbares THC (Devane, Breuer et al. 1992; Burkey, Quock et al. 1997).

1.4.3 Der CB1-Rezeptor-selektive Antagonist AM281

Es gibt mehrere am CB1-Rezeptor selektiv antagonistisch wirkende Stoffe. Der erste war der von Sanofi Recherche entwickelte und heute als Medikament (Rimonabant[®]) vertriebene Stoff SR141716A (Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1994; Landsman, Burkey

et al. 1997). Auf Basis von SR141716A wurden zwei Analoga entwickelt: AM251 und das in dieser Arbeit benutzte AM281 (Gifford, Tang et al. 1997; Gatley, Lan et al. 1998; Cosenza, Gifford et al. 2000). Der chemische Name dieses Stoffes lautet „1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-4-morpholinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide“, die Summenformel $C_{21}H_{19}Cl_2IN_4O_2$.

1.4.4 Auswirkung der CB1-Rezeptor-Bindung

Auf Grund der Verteilung des CB1-Rezeptors sowohl im Zentralnervensystem als auch in peripheren Geweben hat eine Ligandenbindung vielfältige Wirkungen. Dies wurde in zahlreichen Studien untersucht.

Als die Cannabis-Rezeptoren noch unbekannt waren, konzentrierten sich Forschungen zunächst auf den Bereich Schmerzwahrnehmung und -behandlung. Viele Arbeitsgruppen registrierten simultan eine analgetische Wirkung von natürlichem Cannabis (Milstein, MacCannell et al. 1975; Noyes, Brunk et al. 1975; Formukong, Evans et al. 1988; Holdcroft, Smith et al. 1997). Ähnliche Effekte konnten schließlich auch für synthetische Cannabinoide gezeigt werden (Zeltser, Seltzer et al. 1991).

Nach der Entdeckung der CB-Rezeptoren wurden spezifischere Forschungen durchgeführt. Richardson et al. und andere zeigten eine CB1-vermittelte Schmerzminderung durch Cannabinoide (Richardson, Kilo et al. 1998; Fox, Kesingland et al. 2001; Clayton, Marshall et al. 2002; Kelly, Jhaveri et al. 2003; Elmes, Winyard et al. 2005; Michalski, Laukert et al. 2007). Guhring et al. bewiesen für HU210 eine höhere analgetische Potenz als für Morphin (Guhring, Schuster et al. 2001).

Doch nicht nur in der Schmerzforschung, sondern auch auf anderen Gebieten wurden die Auswirkungen einer CB1-Rezeptor-Bindung erforscht. Wichtige Ergebnisse im Bereich Gastroenterologie sind der Nachweis einer Protektion vor gastralen Ulcera durch eine CB1-Agonisten-Bindung (Germano, D'Angelo et al. 2001), eine Beeinflussung des hepatischen Lipidmetabolismus (De Gottardi, Spahr et al. 2010), Auswirkungen auf die Glucosetoleranz (Bermudez-Siva, Serrano et al. 2006) und eine Beeinflussung gastrointestinaler Motilität durch CB1-Rezeptor-Agonisten (Storr, Gaffal et al. 2002; Storr, Bashashati et al. 2010).

Andere Arbeitsgruppen fanden Cannabinoid-vermittelte antinekrotische Eigenschaften auf Myokardgewebe (Ugdyzhekova, Krylatov et al. 2002), oder eine Beteiligung an der Blutdruckregulation (del Carmen Garcia, Adler-Graschinsky et al. 2003).

Aus dem Bereich Neurologie/Psychiatrie gibt es Nachweise CB1-Rezeptor-vermittelter Wirkungen auf neuronales Remodelling (Zhou and Song 2001), auf kognitive Leistungen (Baek, Zheng et al. 2009) und auf die Toleranzentwicklung bei Substanzmissbrauch (Trang, Sutak et al. 2007). Außerdem scheint der Ausstoß von Neurotransmittern durch CB1-Rezeptor-Aktivierung beeinflusst zu werden (Balazsa, Biro et al. 2008). Vor allem die vielfältigen neuropsychischen Wirkungen sind logisch, wurde der CB1-Rezeptor doch zunächst vor allem im Nervensystem vermutet und entdeckt. Die psychotropen Wirkungen von Cannabinoiden Substanzen werden über diesen Rezeptor vermittelt (Herkenham, Lynn et al. 1990; Herkenham, Groen et al. 1991; Herkenham, Lynn et al. 1991).

1.5 Mitogen-activated-Protein-Kinasen (MAPK) und deren Regulation

Die MAP-Kinasen sind Serin-/Threonin-Kinasen. Sie vermitteln Signale von Stressfaktoren, die von außen auf Zellen einwirken, nach intrazellulär. Deswegen wird auch von Stress-activated-Protein-Kinases gesprochen (SAPK). Die MAPK-Kaskade vermittelt Signale vom extrazellulären Stimulus herab bis auf die genetische Ebene (Karin 1995; Demuth and Molleman 2006). Der MAPK-Signalweg ist ein komplexer und zentraler intrazellulärer Signalweg, der an der Regulation wichtiger Zellfunktionen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt ist (Xia, Dickens et al. 1995). Lange galt die Ansicht, die Kinasen würden lediglich durch Mitogene – die Zellteilung aktivierende Proteine – aktiviert. Daher rührt der Name „Mitogen-activated-Protein-Kinases“ (MAPK).

Mittlerweile ist bekannt, dass die Kinasen auch durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder Hormone aktiviert werden (Pages, Lenormand et al. 1993; Schafer and Williams 2000). Auch allgemeiner Zellstress wie UV-Strahlung, Röntgenstrahlung oder osmotischer Stress kann die Aktivierung auslösen (Ip and Davis 1998). Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt eher durch Hormone und Wachstumsfaktoren, die Aktivierung von p38 und JNK eher durch Zellstress und Zytokine (Raingeaud, Gupta et al. 1995). Passend hierzu ist insbesondere p38 und JNK nachgewiesen worden, dass sie in Zusammenhang mit Stressregulation und Inflammation stehen, während ERK1/2 eher Auswirkungen auf die Zellzyklusregulation hat (Kyriakis and Avruch 1996; Ip and Davis 1998; Herlaar and Brown 1999). Die Signalkaskaden bewirken eine intranukleäre Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Karin 1995; Demuth and Molleman 2006).

Heute sind fünf von einander unabhängige MAPK-Kaskaden bekannt: MAPK^{erk1/2}, MAPK^{p38}, MAPK^{jnk}, MAPK^{erk3/4}, MAPK^{erk5,9} (Schafer and Williams 2000).

In dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf drei der am besten erforschten MAPK gelegt: MAPK^{erk1/2}, MAPK^{p38} und MAPK^{jnk}.

Generell verläuft die Übertragung der Signale bei allen MAPK-Signalwegen nach dem selben Muster. Initial wird eine MAPK aktiviert durch eine MAPK-Kinase (MAPKK), welche wiederum von einer MAPK-Kinase-Kinase aktiviert wird (MAPKKK) (Karin 1998). Die Aktivierung der MAPKKK erfolgt G-Protein-vermittelt durch ein monomeres, GTP-bindendes Protein Ras (Guanosin-Triphosphat-bindendes Protein) nach extrazellulären Stimuli. Ras ist ein Protoonkogen namens „Rat sarcoma“ (Weinberg 1984; Schafer and Williams 2000). Als Unterfamilie von Ras findet sich die Familie der „kleinen GTPasen“: Rho, Rac und Cdc42, welche den Zellzyklus, die Apoptose, die Genexpression und das Aktinzytoskelett regulieren (Minden, Lin et al. 1995; Jaffe and Hall 2005).

Beendet wird die Aktivierung wiederum durch Guanosintriphosphatasen, die GTP zu Guanosin-Diphosphat (GDP) hydrolysieren (Lamarche and Hall 1994).

1.5.1 p44/42 (ERK1/2)

ERK1 und ERK2 waren die ersten Mitogen-activated-Protein-Kinasen, die bekannt wurden. Boulton et al. beschrieben 1990 eine durch Insulin stimulierte intrazelluläre Phosphorylierungs-Kaskade als Reaktion auf den extrazellulären Reiz – daher der Name „Extracellular Regulated Kinase“ (ERK). Die Bezeichnung p44/42 bezieht sich auf die Molekülmasse der Kinasen von 44kD, beziehungsweise 42kD (Boulton, Yancopoulos et al. 1990). Aktiviert werden die Kinasen im ersten Schritt durch Autophosphorylierung eines Wachstumshormon-Rezeptors. Dieser bietet Bindungsstellen für intrazelluläre Proteine wie beispielsweise Grb (Growth-factor receptor-bound protein). Diese Proteine wiederum aktivieren Ras durch Phosphorylierung. Ras aktiviert in der Kaskade die MAPKKK namens Raf. Aktiviertes Raf phosphoryliert MAPKK MEK1 und MEK2. MEK 1 und 2 katalysieren eine doppelte Phosphorylierung – von ERK1 und ERK2. Diese MAP-Kinasen haben nach ihrer Translokation in den Zellkern aktivierenden Einfluß auf Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 und c-Myc. Außerdem können sie weitere Kinasen aktivieren – MAPKAPK-1 und Mnk1/2, die wiederum Transkriptionsfaktoren oder Histone aktivieren (Schafer and Williams 2000). Dieser Signalweg spielt für die Regulation des Zellzyklus, der Proliferation und Zellteilung eine wichtige Rolle.

1.5.2 p38

Die MAP-Kinase p38 ist benannt nach ihrem Molekulargewicht von 38 Kilodalton (kD). Sie wurde 1994 erstmals in Zusammenhang mit der intrazellulären Signalkaskade gebracht (Lee, Laydon et al. 1994; Rouse, Cohen et al. 1994). Vier verschiedene Isoformen (alpha bis delta) von p38 sind mittlerweile bekannt (Widmann, Gibson et al. 1999). P38 wird auf G-Protein-Ebene aktiviert über die GTPase Cdc42. Cdc42 aktiviert die MAPKKK MEKK1, ASK-1, MLK-2 und TAK (Ichijo, Nishida et al. 1997). Diese Kinasen aktivieren die MAPKK MKK3, MKK4, MKK, 6 (Derijard, Raingeaud et al. 1995). Diese Kinasen wiederum aktivieren schließlich die MAPK p38, welche selbst weitere Kinasen aktiviert – MAPKAP2 und MAPKAP3 (Murga, Fukuhara et al. 1999). P38 aktiviert auch Transkriptionsfaktoren wie CHOP, ATF1 und ATF2 (Raingeaud, Whitmarsh et al. 1996; Tan, Rouse et al. 1996; Wang and Ron 1996; Schafer and Williams 2000). Letzten Endes wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine und eine T-Zell-Proliferation induziert (Lee, Laydon et al. 1994; Beyaert, Cuenda et al. 1996; Crawley, Rawlinson et al. 1997).

P38 aktiviert Hitze-Schock-Proteine wie p27 oder alphaB-crystallin. Über diesen Weg kann eine Apoptose-Protektion durch Inhibierung einer Kaspasen-Aktivierung erfolgen (Shin, Jeong et al. 2011).

Zudem spielt p38 über die Phosphorylierung von p27 über MAPKAP2 eine wichtige Rolle bei der Regulation des Aktinzytoskeletts. Dieser Signalweg ist durch CCK direkt aktivierbar und spielt bei der Pathogenese der Pankreatitis eine wichtige Rolle (Groblewski, Grady et al. 1997; Schafer, Ross et al. 1998; Schafer, Clapp et al. 1999; Kubisch, Schafer et al. 2004).

Auf Grund des Vorliegens mehrerer p38-Isoformen sind in Bezug auf Inflammation, Zelltod und Zellregulation mehrere konträre, Isoform-spezifische p38-Wirkungen – protektive wie auch destruktive – vorstellbar (Shin, Jeong et al. 2011)

1.5.3 c-Jun-N-terminal Kinase (JNK)

1993 identifizierten Hibi et al. eine Serin/Threonin-Kinase, die an c-jun von Serin 63 und 73 bindet und die amino-terminalen Enden phosphoryliert (Hibi, Lin et al. 1993). Auf G-Protein-Ebene phosphorylieren die Kinasen Rac, PAK und Cdc42 die MAPKKK MEKK1-5, ASK-1, MLK-2 und MLK-3 sowie TAK (Yan, Dai et al. 1994; Liu, Gorospe et al. 1995; Fanger, Gerwins et al. 1997; Gerwins, Blank et al. 1997). Diese

Kinasen wiederum aktivieren MKK4 und MKK 7 (Tournier, Whitmarsh et al. 1997; Wu, Wu et al. 1997). MKK4 und MKK7 aktivieren die JNK, welche Einfluß auf die Transkriptionsfaktoren c-jun, c-fos und SAP-1 („serum response factor accessory protein-1“) nimmt (Schafer and Williams 2000). Es existieren 3 Isoformen der JNK (JNK1-3).

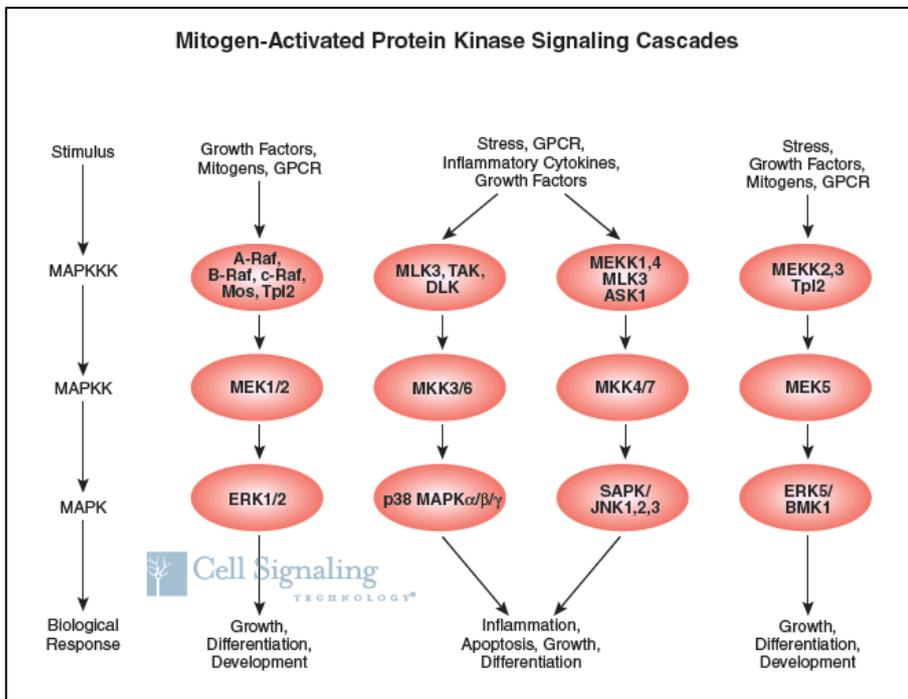


Abb. 3: Signalkaskaden der relevanten Kinasen.

„Pathway diagram reproduced courtesy of CellSignaling Technology Inc“.

1.5.4 Die Aktivierung der Kinasen-Kaskaden

Die Kinasen werden durch Mitogene, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder Hormone aktiviert. Die Beteiligung dieser Kinase-Kaskaden an der Übertragung inflammatorischer Signale ist klar. Für diese Arbeit ist der Nachweis der Phosphorylierung dieser Kinasen bei akuter Pankreatitis und speziell bei Cerulein-induzierter akuter Pankreatitis im Modell wichtig. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Inflammation und Kinasen-Phosphorylierung in dieser Arbeit bezieht sich auf bekannte Ergebnisse.

Duan et al. beschrieben 1994 eine Aktivierung der p44/42-MAPK bei CCK-induzierter Inflammation von Azinuszellen (Duan and Williams 1994). Dabrowski et al. zeigten 1996 eine schnelle Aktivierung der JNK bei Cerulein-induzierter Pankreatitis (Dabrowski, Grady et al. 1996). Schäfer et al. zeigten 1998 den Zusammenhang

zwischen Cerulein-induzierter Pankreatitis und p38-Aktivierung (Schafer, Ross et al. 1998). Wagner et al. bestätigten 1999 eine rasche Aktivierung von sowohl p38 als auch ERK bei Cerulein-induzierter Pankreatitis in Ratten (Wagner, Metzler et al. 1999). Williams et al. konnten 2002 schließlich eine Pankreatitis-getriggerte Phosphorylierung gleich aller drei Kinasen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, nachweisen (Williams, Sans et al. 2002).

Es ist also klar, dass die Kinasen-Aktivierung bei Pankreatitis erfolgt. Fleischer et al. veröffentlichten 2001 eine Arbeit, die zeigte, dass die Aktivierung von JNK bei akuter Pankreatitis zur Aufrechterhaltung der Entzündung beiträgt. In dieser Arbeit milderte die Phosphorylierung von p38 jedoch entgegen der bis dahin bekannten Ergebnisse Organschäden. Es zeigte sich eine Protektion durch p38. Die Inhibierung von p38 führte zu Organnekrosen (Fleischer, Dabew et al. 2001).

Interessante klinische Ergebnisse lieferten Denham et al. im Jahre 2000. Sie zeigten, dass die gefürchteten systemischen Auswirkungen (SIRS, ARDS o.ä.) der akuten Pankreatitis durch p38-Inhibitoren abgemildert werden können (Denham, Yang et al. 2000). P38 agierte hier als pro-inflammatorischer Faktor im Gegensatz zu den Ergebnissen von Fleischer et al.

Samuel et al. zeigten 2006, dass Inhibitoren von p38, JNK und ERK die Aktivierung der Kinasen bei Cerulein-induzierter Pankreatitis verhindern. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine stieg durch die Inhibition der Kinasen weniger stark an (Samuel, Zaheer et al. 2006). Es wurde nachgewiesen, dass die proinflammatorischen Signale tatsächlich nur oder zumindest hauptsächlich über diese Signalwege vermittelt werden.

Wichtig ist aber neben der Tatsache, dass die genannten Kinasen an Übermittlung und Aufrechterhaltung von inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, auch der Umstand, dass diese Kinasen zweitens auch in Zusammenhang mit dem Cannabinoid-System stehen und durch die Bindung von Cannabinoiden an den CB-Rezeptoren aktiviert werden.

Mehrere Arbeitsgruppen erbrachten den Nachweis, dass die p44/42 MAP-Kinase durch CB1-Rezeptor-Liganden über eine Änderung des intrazellulären cAMP-Spiegels aktiviert wird (Bouaboula, Poinot-Chazel et al. 1995; Derkinderen, Valjent et al. 2003). Zu diesen Stoffen zählt auch HU210. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass ERK1/2 durch CB-Rezeptor-bindende Endocannabinoide beeinflusst wird und so

Auswirkungen auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung vermittelt werden (Lipina, Stretton et al. 2010).

Neben p44/42 hat eine CB1-Rezeptor-Bindung aber auch Einfluss auf JNK und p38. Eine Arbeit von Rueda et al. zeigte bei Zellkulturen eine p38- und JNK-Phosphorylierung nach Stimulation mit THC und HU210 (Rueda, Galve-Roperh et al. 2000). Desweiteren bewiesen Derkinderen et al. und Rubino et al., dass Cannabinoide die p38-MAP-Kinase aktivieren (Derkinderen, Ledent et al. 2001; Rubino, Forlani et al. 2004)

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Auf der Basis des bereits vorhandenen Wissens sollen folgende Fragen in dieser Arbeit gestellt und geklärt werden:

1. Haben cannabinoide Substanzen einen positiven Einfluss auf die Ausprägung der Cerulein-induzierten Pankreatitis im Tiermodell?
2. Falls ja, kann zwischen CB1- und CB2-Rezeptoraktivierung differenziert werden?
3. Sind diese Einflüsse durch spezifische Cannabis-Antagonisten antagonisierbar?
4. Können die pharmakologisch induzierten Effekte in einem in-vivo transgenen Tiermodell reproduziert werden?
5. Über welche intrazellulären Signalwege werden die möglichen protektiven Eigenschaften der Cannabinoide vermittelt?

2. Material und Methoden

Die in dieser Arbeit benutzten Materialien und Arbeitsmethoden werden in dem folgenden Abschnitt erklärt.

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

2.1.1 Verwendete Materialien

Die folgende Tabelle zeigt alle verwendeten Materialien in aufsteigender alphabetischer Reihenfolge sortiert nach Herstellernamen:

Hersteller	Artikel	Artikeldetails	Zweck
Abbott AG, Chicago, USA.	Forene	Isofluran	Inhalationsnarkotikum
Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, D	Adefo GV60	Fixierkonzentrat	Röntgenfilm- Entwicklung
Bachem, Bubendorf, Schweiz	Trypsin	Bachem I-1550	Substrat zur Trypsin- Bestimmung
Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	Kanülen, 27G		Injektion von Substanzen
Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	Blotting Grade	Blocking Non Fat Dry Milk	Blocksubstanz Western-Blot
	Protein Dye	Protein Assay Dye reagent concentrate	Protein-Bestimmung nach Bradford
	TEMED		Quervernetzung des SDS-Gel Pages
Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D	Tween 20	Polyoxyethylene- Sorbitan-Monolaurate	Blocking-Lösung
Cayman Chemical, Ann Arbor, USA	CB1-Rezeptor (C- Term) Polyclonal Antibody	#10006590	CB1-Rezeptor- Antikörper
Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA	Phospho-p38	Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody #9211	Western-Blot Erstantikörper
	Phospho- SAPK/JNK	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody #9251	Western-Blot Erstantikörper
	SAPK/JNK	SAPK/JNK-Antibody #9252	Western-Blot Erstantikörper
	p44/42	p44/42 MAP Kinase Antibody #9102	Western-Blot Erstantikörper
Cell Signaling Technology, Inc.,	Phospho-p44/42	Phospho-p44/42 MAPK	Western-Blot Erstantikörper

Beverly, USA		(Thr202/Tyr204) Mouse mAb Antibody #9106	
Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz	BSA	Bovines Serum Albumin	Blocking Lösung
	SDS	Sodium dodecyl sulfat $C_{12}H_{25}NaO_4S$	
GE-Healthcare, Chalfont St Giles, UK	Anti-mouse-IgG	peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) NA 931	Western-Blot- Zweitantikörper
	Anti-rabbit-IgG	peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey) NA 934	Western-Blot- Zweitantikörper
Magle Life Sciences, Lund, Schweden	Phadebas- Amylase-Test		Amylase-messung
Merck Chemicals, Darmstadt, D	TRIS	Tris(hydroxy-methyl)- aminomethan $C_4H_{11}NO_3$	Puffer
Merck Chemicals, (Calbiochem), Darmstadt, D	Protease Inhibitor Set		Protease-Inhibitor
Pharmacia&Upjohn Uppsala, Schweden	Glycin	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Amylase-Bestimmung
Qiagen AG, Hilden, D	HotStarTaq DNA Polymerase-Kit		PCR
R&D Systems, Minneapolis, USA	Quantikine Mouse- IL-6-Immunoassay		IL-6-Bestimmung
Röntgen Bender GmbH & Co. KG, Baden-Baden, D.	Vision GV 60	Entwicklerkonzentrat	Röntgenfilm- entwicklung
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	p38 (C-20): sc-535		Antikörper
Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	Wasserstoffperoxid	H_2O_2 30%	
	MOPS	(3-N-Morpholino-) propansulfonsäure	Pufferlösung
	o-Dianisidine	Dimethoxybenzidin	Redoxindikator
	Cerulein	pGlu-Gln-Asp-Tyr [SO ₃ H]-Thr-Gly-Trp- Met-Asp-Phe-NH ₂	Induktion der Pankreatitis
	EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure	Komplexbildner
Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	APS	Ammoniumpersulfat	Auslösung der Polymerisations- reaktion im SDS-Gel
	Trypsin	T-4665	Kalibrier-Kontrolle
	SBTI	Soybean Trypsin inhibitor, Type I-S	MPO-Bestimmung
	PMSF	Phenylmethylsulfonyl- flourid	Protease-Inhibitor

	Natrium orthovanadat	Na ₃ VO ₄	Protease-Inhibitor
Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA	Protein-G-Beads		Immunopräzipitation
	CL-XPosure Film		Röntgenfilm für Western-Blot
Tocris Bioscience, USA	HU210, #0966	(6aR)-trans-3-(1,1-Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-9-methanol	CB-Rezeptor-Agonist
	AM281, #1115	1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-4-morpholinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide	CB1-Rezeptor-spezifischer-Antagonist
Whatman International Ltd., Kent, UK	Protran		Nitrocellulose-Membran für Western-Blot

2.1.2 Verwendete Geräte

Die folgende Tabelle zeigt alle verwendeten Geräte in aufsteigender alphabetischer Reihenfolge sortiert nach Herstellernamen:

Hersteller	Gerät
Agfa-Gevaert AG, Mortsel, BE	Agfa Curix 60
Bandelin electronic, Berlin, D	Sonoplus Bandelin HD 2070
Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	Blot-Kammer, Gel-Kämme, Glasplatten, PCR-Systeme
B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D	Wasserbad Thermomix 1441
Corning Inc., Corning, USA	Stripette (2ml – 25ml)
Drägerwerk AG & Co, Lübeck, D	Isofluran-Verdampfer
Eppendorf AG, Hamburg, D	MiniSpin Zentrifuge, Pipetten, Zentrifuge 541712
Fröbel Labortechnik, Lindau, D	Kreisrüttler Rocky 3D
GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK	Ultrospec 3100pro Spektrophotometer
GFL, Burgwedel, D	Wasserbad GFL 1083
Heraeus, Hanau, D	HERAfreeze HFU 586 Top (-80°C Schrank)
Hettich Lab Technology, Tuttlingen, D	Zentrifuge EBA 12R
IKA Werke, Staufen, D	Magnetrührer RTCbasic
Kinematika, Luzern, CH	Polytron Homogenisator PT 2100
Liebherr, Bulle, CH	KT 1840 (4°C Kühlschranks)
Miele & Cie. KG, München, D	M 621 S, Mikrowellengerät
Millipore, Billerica, USA	MilliQ A10TOC Entsalzungsanlage
NeoLab, Heidelberg, D	Vortex Mixer 2020

Olympus, Tokio, J	BX41 Mikroskop
PerkinElmer, Waltham, USA	Luminescence Spectrometer LS 50B
Sarstedt AG&CO, Nümbrecht, D	Einmal-Küvetten, 10x4x45mm
Sartorius AG, Göttingen, D.	Analysenwaage
Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, D	Waage
Schuett Biotech GmbH, Göttingen, D	HomgenPlus, Teflon-Pistille, Glaskolben
Techne AG, Jahnsdorf, D	DriBlock DB 2A Heizblock
VWR-Jencons, West Sussex, UK	Jencons-PLS Folienschweißgerät
WTW GmbH, Weilheim, D	pH-Meter InoLab pH Level 1

2.2 Tiermodell

Um die Auswirkungen Cannabinoider Substanzen auf die Pankreatitis im Modell zu untersuchen, wurde ein gut etabliertes Tiermodell gewählt: das von Lampel et al. 1977 erstbeschriebene und von Willemer et al. modifizierte Modell der Cerulein-induzierten Pankreatitis (1.3). Lampel et al. wählten Ratten als Modellorganismus, während Willemer et al. das Modell auf Mäuse adaptierten (Lampel and Kern 1977; Willemer, Elsasser et al. 1992).

Für diese Arbeit wurden ebenfalls Mäuse gewählt. Wie bereits geschildert, führt die intraperitoneale Gabe supramaximaler Cerulein-Dosen zu einer Überstimulations-Pankreatitis bei Mäusen (1.3). Entsprechende Änderungen der Histologie im Pankreas sowie Änderungen der inflammatorischen Messparameter werden registriert.

Die Behandlung der Tiere erfolgte durch sechs Gaben Cerulein i.p. im Stundenabstand (50µg/kg KG). Die Kontrolltiere erhielten zu den Zeitpunkten der Cerulein-Gaben NaCl i.p. Die Vorbehandlungen mit AM281 (1mg/kg KG) oder HU210 (50ng/g KG) erfolgte durch die Gabe i.p. 30min. vor der ersten Cerulein Applikation.

2.2.1 Versuchstiere und Versuchsaufbau

Es wurden Versuchstiere genetischer Wildtypen sowie genetisch modifizierte CB1-Rezeptor-knock-out-Mäuse verwendet (CB1^{-/-}). Für die Versuche mit Wildtypen wurden 4-6 Wochen alte C57/black-Mäuse der Firma Charles River (Charles River Wiga Deutschland GmbH, Sulzfeld) verwendet. Die CB1^{-/-} Tiere wurden bereits früher charakterisiert und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. M. Storr freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Tiere wurden artgerecht in klimatisierten Tierställen gehalten. Sie waren einem künstlichen 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus ausgesetzt und hatten freien Zugang zu Nahrung (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser.

Zwischen Lieferung der Tiere und Tierversuchsreihe wurden mindestens zwei Tage abgewartet um eine Akklimationierung an die neue Umgebung zu gewährleisten.

Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Insgesamt wurden in den Versuchsreihen 155 Mäuse getestet – 117 Wildtyp-Mäuse und 38 CB1^{-/-} Mäuse. Es waren 101 männliche Mäuse und 54 weibliche Mäuse. Die Tiere hatten ein Gewicht von 20g bis 30g.

Genotyp	Geschlecht	Anzahl	Gesamtzahl
Wildtyp	männlich	88	117
	weiblich	29	
CB1 ^{-/-}	männlich	13	38
	weiblich	25	
			155

Tab. 1: Darstellung der verwendeten Tiere, spezifiziert nach Geschlecht und Genotyp

2.2.1.1 Versuchssetting

Setting	Genotyp	Behandlung	Fragestellung
1	Wildtyp	HU210 + Cerulein	Auswirkung von HU210 auf Pankreatitis?
2	Wildtyp	AM281 + HU210 + Cerulein	Blockade der HU210-Wirkung durch AM281?
3	Wildtyp	AM281 + Cerulein	Auswirkung von AM281 auf Pankreatitis?
4	CB1 ^{-/-}	Cerulein	Ausprägung der Pankreatitis wie bei den Wildtyp-Tieren?
5	CB1 ^{-/-}	HU210 + Cerulein	HU210 zeigt keine Auswirkung auf CB1 ^{-/-} ?

Tab. 2: Kurzübersicht über alle durchgeführten Versuchssettings

Die Tiere wurden in fünf verschiedenen Versuchssettings zu in der Regel je 8-9 Tieren pro Versuch untersucht. Zur Gewinnung aussagekräftiger Daten wurden bei Versuchssetting 1-4 drei voneinander unabhängige Einzelversuche durchgeführt. In Setting 5 wurden zwei voneinander unabhängige Einzelversuche durchgeführt.

In Setting 1 wurde die Auswirkung von HU210 auf die Pankreatitis untersucht. Es wurden Wildtypmäuse verwendet. 4 Tiere wurden mit dem CB-Rezeptor-Agonisten

HU210 vorbehandelt und danach mit Cerulein stimuliert. Zur Kontrolle wurden 3 Tiere mit Cerulein stimuliert, je 1 Tier wurde mit HU210 bzw. NaCl behandelt.

In Setting 2 wurden Wildtypmäuse vor der Behandlung mit HU210 und Cerulein mit dem CB1-Rezeptor-spezifischen Antagonisten AM281 vorbehandelt. Der Antagonist – appliziert vor dem Agonist blockiert theoriegemäß die Wirkung des Agonisten. Es wurden 4 Tiere mit der Kombination aus AM281, HU210 und Cerulein behandelt. Als Kontrolle erhielten 2 Tiere nur Cerulein, 1 Tier nur AM281, 1 Tier nur HU210 und 1 Tier NaCl.

In Setting 3 wurde die Wirkung von AM281 alleine und in Kombination mit Cerulein untersucht. 4 Tiere erhielten AM281 und Cerulein. Als Kontrolle erhielten 3 Tiere Cerulein und je 1 Tier AM281 oder NaCl alleine.

Die Settings 4 und 5 wurden mit CB1^{-/-} Tieren durchgeführt. Setting 4 sollte beweisen, dass sich CB1^{-/-} Tiere in Bezug auf die Ausprägung der Cerulein-induzierten Pankreatitis wie die Wildtypen verhalten. Hier wurden je 3 Wildtypiere mit 5 CB1^{-/-} Tieren verglichen: 2 Wildtypiere und 3 CB1^{-/-} Tiere wurden mit Cerulein stimuliert. 1 Wildtypier und 2 CB1^{-/-} Tiere wurden mit NaCl behandelt.

Setting 5 schließlich sollte zum Beweis dienen, dass die HU210-Wirkung über den CB1-Rezeptor vermittelt wird und HU210 in CB1^{-/-} Mäusen keine Wirkung zeigt. Hierzu wurden 2 Versuche durchgeführt: erstens 3 Tiere mit HU210 vorbehandelt und mit Cerulein stimuliert. Als Kontrolle wurde 1 Tier mit Cerulein stimuliert, 2 Tiere mit HU210 behandelt und 1 Tier mit NaCl behandelt. In einem zweiten Versuch wurden 4 Tiere mit HU210 und Cerulein, 3 Tiere mit HU210, 1 Tier mit Cerulein und 1 Tier mit NaCl behandelt.

Bei Setting 1 wurden neben den Daten der drei Versuchsreihen zusätzlich die in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen Daten aus drei gleich aufgebauten, zuvor durchgeführten Versuchen verwendet.

2.2.1.1 Verabreichte Substanzen

Der nicht-selektive CB-Rezeptor-Agonist HU210, der CB1-Rezeptor-selektive Antagonist AM281, sowie das CCK-Analogon Cerulein wurden bereits beschrieben (1.4.2, 1.4.3 und 1.3). Deshalb erfolgt an dieser Stelle lediglich eine kurze technische Charakterisierung:

Stoff	Details
HU210	Tocris Cookson Inc., USA. In DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.
AM281	Tocris Cookson Inc., USA In DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Schutz vor Licht mit Alufolie nötig auf Grund Lichtsensibilität von AM281
Cerulein	#C-9026 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Eine Stock-Lösung wurde bei -20°C aliquotiert aufbewahrt
NaCl	0,9%, selbst hergestellt

2.2.1.2 Versuchsdurchführung

An Versuchstagen wurden die Tiere (drei pro Käfig) in einem speziellen Arbeitsraum deponiert. Gelegentlich wurden aggressive Tiere in Einzelkäfigen separiert.

Alle zu verabreichenden Stoffe wurden den Mäusen intraperitoneal in den linken Unterbauch injiziert (Microlance[®], 27G, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Die Konzentrationen der verabreichten Stoffe wurden wie in der Literatur veröffentlicht gewählt (Willemer, Elsasser et al. 1992). Es wurde darauf geachtet, jeder Maus gleich viel Volumen zu injizieren um Effekte durch unterschiedliche Volumenbelastungen zu minimieren. Die Grundkonzentrationen der Stoffe wurden in DMSO so verdünnt, dass immer 1ml je 10g Mausgewicht an Flüssigkeit intraperitoneal gespritzt wurde.

In der Arbeitsgruppe wurde bereits zuvor bewiesen, dass DMSO in dieser Konzentration selbst keine Auswirkungen auf die Pankreatitis hat.

Behandlung	Konzentration Stoff
Cerulein	50µg/kg Maus/h
HU210	50ng/g Maus 1x
AM281	1mg/kg Maus 1x
NaCl	0,9%, 1ml/10g Maus/h

Tab. 3: Angabe der Konzentrationen der injizierten Substanzen

Je nach Versuchssetting wurden die einzelnen Stoffe nach folgenden Schemata appliziert:

Setting 1: HU210 + Cerulein bei Wildtypen

Die mit HU210 vorzubehandelnden Tiere erhielten HU210 einmalig 30min. vor der ersten Cerulein-Gabe. Dann wurde zum Zeitpunkt 0 Cerulein injiziert und die Gaben im

Abstand von einer Stunde 6 Mal wiederholt. Die NaCl-Kontrolltiere erhielten zu den Zeitpunkten der Cerulein-Injektionen 0,9% NaCl i.p.

Setting 2: AM 281, HU210 und Cerulein bei Wildtypen

Die Tiere, die sowohl mit AM281 als auch mit HU210 vorbehandelt wurden, erhielten AM281 30min. vor HU210. 30min. danach erfolgte die erste Cerulein-Gabe, welche stündlich 6 Mal wiederholt wurde. Die mit NaCl behandelten Kontrolltiere erhielten zu den Zeitpunkten der Cerulein-Gaben 0,9% NaCl i.p.

Setting 3: AM 281 und Cerulein bei Wildtypen

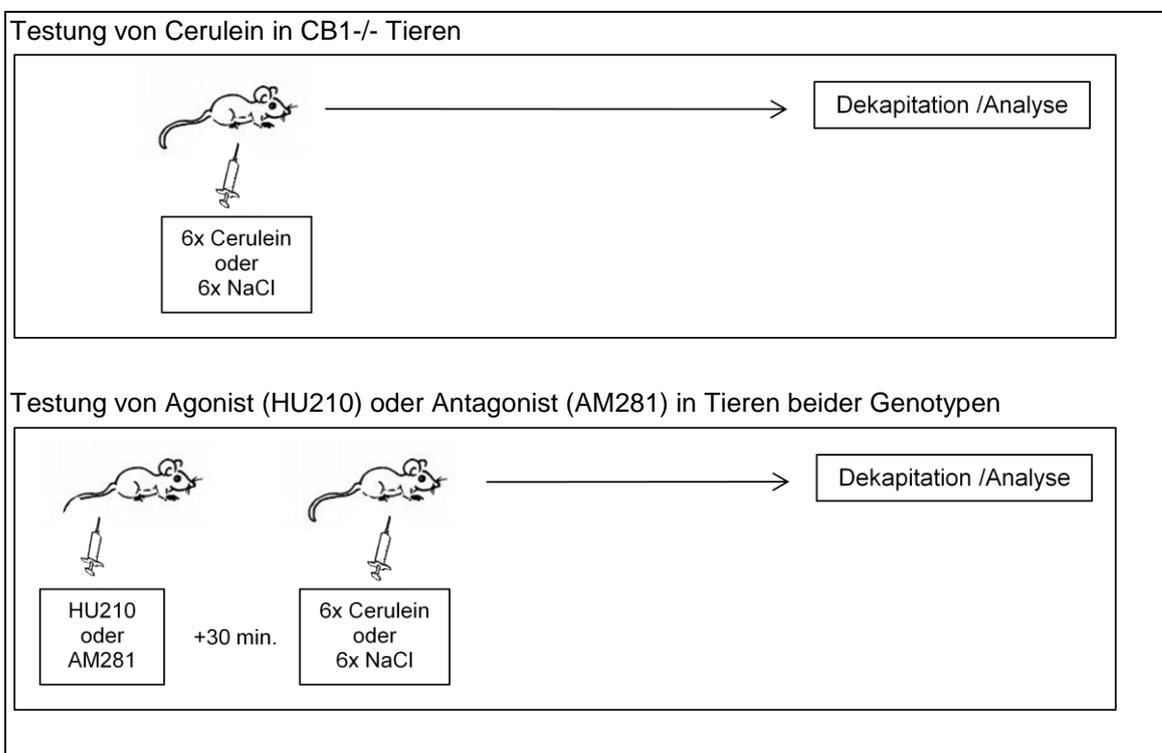
Bei diesen Tieren wurde wie bei Setting 1 verfahren. Statt HU210 wurde AM281 gegeben.

Setting 4: Cerulein bei CB1^{-/-}

Diese Tiere erhielten 6 Cerulein-Gaben im Stundenabstand. Die Kontrolltiere erhielten 0,9% NaCl i.p.

Setting 5: HU210 + Cerulein bei CB1^{-/-}

Die Behandlung erfolgte analog Setting 1.



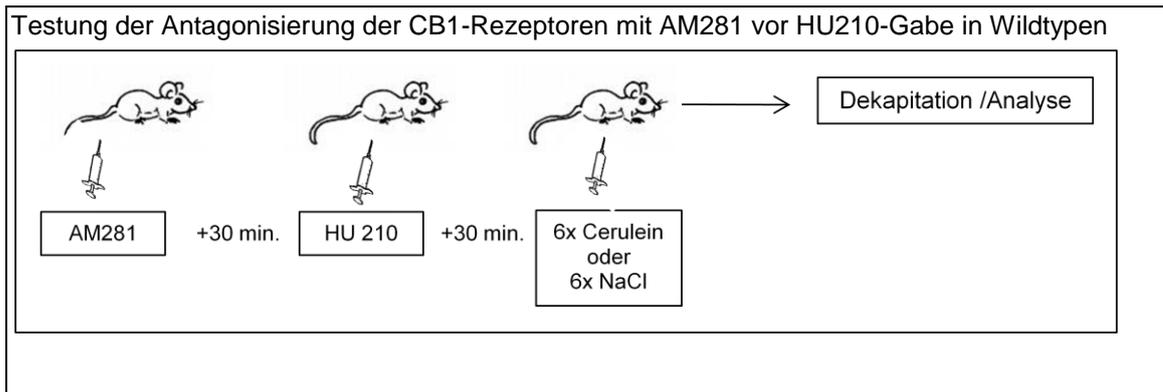


Abb. 4: Behandlungsplan in den einzelnen Versuchsanordnungen

Um die Versuchsbedingungen und die Anzahl der Injektionen pro Tier für alle Tiere gleich zu halten, wurde den NaCl-Kontrolltieren zu den Cerulein-Injektions-Zeiten NaCl verabreicht.

2.2.1.3 Beendigung der Versuchsreihen und Materialgewinnung

Eine Stunde nach den jeweils letzten Injektionen wurden die Tiere mit einem Gemisch aus 4% Isofluran (Forene[®], Abbott AG, Chicago, USA) und Sauerstoff inhalativ anästhetisiert. Danach wurden die Tiere dekapitiert. Das austretende Blut wurde in einem Gefäß gesammelt. Das Vollblut wurde zentrifugiert (4°C, 14.000rpm, 10min) und das Blutserum in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Serum wurde bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Zu der Präparation der Tierkadaver wurde das Abdomen mit der Schere kreuzförmig eröffnet. Danach erfolgte die Präparation des Pankreas anhand der Leitstrukturen Milz, Magen und Darm. Es wurde darauf geachtet, den Magen-Darm-Trakt nicht zu eröffnen, um eine Kontamination mit Verdauungsenzymen zu vermeiden.

Das Pankreas wurde im Ganzen entfernt und in einer physiologischen NaCl-Lösung gespült, sowie mit einer feinen Schere von übrigem Fett-, und Lymphgewebe gesäubert. Anschließend wurde das Organ mit Tüchern trockengetupft und gewogen. Danach erfolgte die Asservation der Gewebestücke: ein Stück des caput pancreatis wurde in Formaldehyd zu der histopathologischen Untersuchung gegeben. Ein weiteres Stück des caput wurde zu der Bestimmung des Ödemisierungsgrades zur Seite gelegt. Das übrige Pankreasgewebe wurde viergeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu den weiteren Analysen bei -80°C gelagert.

Im Anschluss an die Präparation des Pankreas wurden eine Thorakotomie durchgeführt und beide Lungen hilusnah entfernt. Die Organe wurden in physiologischer Kochsalzlösung gespült, für die spätere Verarbeitung gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Die verbleibenden Tierkadaver wurden in den Einrichtungen der Universität fachgerecht entsorgt.

2.3 Laborchemische Messwerte

2.3.1 α -Amylase im Serum

Bei der Präparation der Versuchstiere wurde Blutserum gewonnen (2.1.1.4). Dieses Serum wurde mittels Phadebas-Amylase-Test[®] nach Herstellerangaben (Magle Life Sciences, Lund, Schweden) auf die Höhe der α -Amylase untersucht.

Dies erfolgte durch die Messung eines von der Amylase verursachten Farbumschlags in einer Standardlösung. Diese Standardlösung besteht aus dem Phadebas[®]-Reagenz gelöst in Amylase-Puffer. Die Phadebas[®]-Reagenz-Test-Tablette enthält Stärke, welche an einen blauen, wasserunlöslichen Farbstoff gebunden ist und bei Lösung in dem Puffermedium ausfällt. Durch die vorhandene Amylase aus dem Blutserum wird diese Verbindung gespalten, wird wieder wasserlöslich und verursacht einen Farbumschlag. Die Stärke des Farbumschlags kann photometrisch gemessen werden.

Zu der Herstellung des Testreagenz wurden 2 Phadebas[®]-Tabletten mit 28ml Amylase-Puffer in einem Rührgefäß gemischt. Zu 10 μl Blutserum wurden 1020 μl Testreagenz hinzugegeben und im Vortex-Mischer gemischt. Zu der Bestimmung des Nullwerts wurden einmalig 10 μl Wasser mit 1020 μl Testreagenz gemischt. Die Proben wurden inkubiert (Schüttelbad, 37°C , 5min). Danach wurde die Farbumschlagsreaktion durch Alkalisierung gestoppt (300 μl 0,5M NaOH/Probe). Anschließend wurde H_2O hinzugefügt (4ml/Probe). Jedes Probengefäß wurde gemischt und zentrifugiert (4°C , 4.000rpm, 5min). 1ml Zentrifugationsüberstand wurde in eine Messküvette gegeben und photometrisch bei 620nm Wellenlänge gegen den Nullwert gemessen (Ultraspec 3100pro Spectrophotometer, GE Health Sciences, Chalfont St Giles, UK). Von jeder Probe wurden 2 Messungen durchgeführt und ein Mittelwert gebildet.

verwendeter Amylase-Puffer
0,5 M NaCl (1,46g)
0,02 M NaH ₂ PO ₄ (1,2g)
0,02 % NaN ₃ (0,01g)
H ₂ O ad 500ml
pH 7,4

2.3.2 Myeloperoxidase im Lungenhomogenisat

Zur Messung der durch die Pankreatitis ausgelösten systemischen Reaktion wurde die Höhe der Myeloperoxidase (MPO) in neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe bestimmt. Wie bereits beschrieben, ist die Beteiligung der Lunge bei einer Pankreatitis eine gefürchtete klinische Komplikation (Kaye 1968; Bhatia, Wong et al. 2005; Liu, Xu et al. 2005; Chooklin, Pereyaslov et al. 2009).

Ein bereits von Bhatia et al. etabliertes und von anderen Gruppen modifiziert angewendetes Verfahren wurde für die Messungen in dieser Arbeit gewählt (Bhatia, Saluja et al. 1998; Halangk, Lerch et al. 2000; Kubisch, Schafer et al. 2004).

Es wurde eine bereits am Präparationstag gewogene Lunge (linker oder rechter Flügel) im Verhältnis 1:10 mit Homogenisations-Puffer gemischt (Gewebegewicht in mg x 9 = Menge an Puffer in µl).

Das Gemisch wurde in einem eisgekühlten Glaskolben mit dem Douncer bei 2.400rpm homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (4°C, 10.000g, 5min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde insgesamt viermal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Wasserbad wieder aufgetaut (37°C, 5min). Danach wurden die Proben zweimal mit einer Ultraschallsonde behandelt (75% Leistung, 7x10 Zyklen/min, je 10s). Die Lysate wurden abschließend abermals zentrifugiert (4°C, 10.000g, 10min). Gemessen wurde der Überstand.

Zu der Messung wurde erst ein Messreagenz hergestellt (880µl Messpuffer, 10µl o-Dianisidin-Lösung, 10µl H₂O₂). Photometrisch wurde in diesem Reagenz nach einer Minute ein Leerwert bestimmt. Anschließend wurden je 100µl Probe hinzugefügt und die Absorptionen der Mischungen über 4min photometrisch gemessen. Aus der Steigung der Absorption wurde die Aktivität der MPO errechnet. Die Aktivität wurde in Bezug gesetzt zum Ausgangsgewicht des Organs.

Homogenisations-Puffer	Extraktions-Puffer	Mess-Puffer
20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 4° C	0,5ml SBTI 100µM 1ml PMSF 1mM 1ml Hexadecyltrimethyl- ammoniumbromid 5% Extraktionspuffer-Stock	50 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0 Raumtemperatur

Extraktionspuffer-Stock	SBTI	PMSF
	Soy Bean Trypsin Inhibitor	Phenylmethylsulfonylfluorid
5 mM EDTA in Messpuffer pH 6,0 4° C	100 µM SBTI in Hepes- Ringer-Puffer	1 mM PMSF gelöst in Methanol/Isopropanol 1:1 gefroren bei -20° C
	Hepes-Ringer-Puffer 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl]- ethansulfonsäure pH 7,4 gefroren bei -20° C	

2.3.3 aktiviertes Trypsin im Pankreashomogenisat

Die Trypsin-Aktivität wurde nach der von Kawabata et al. beschriebenen und in der Arbeitsgruppe leicht modifizierten Methode gemessen (Kawabata, Miura et al. 1988; Kubisch, Schafer et al. 2004).

Aktiviertes Trypsin spaltet ein Standard-Substrat in einen fluoreszierenden Stoff. Diese Fluoreszenz kann in einem Lumineszenz-Spektrometer gemessen werden. Die Zunahme der Fluoreszenz-Emission ist proportional zu der Menge des aktivierten Trypsins.

Zunächst wurde ein Gewebestück mit 1ml MOPS-Puffer gemischt. Das Gemisch wurde in einem eisgekühlten Glaskolben mit dem Douncer homogenisiert (2.400rpm). Das Homogenisat wurde zentrifugiert (3.000rpm, 4°C, 5min). Der Überstand wurde gemessen, beziehungsweise für die spätere Bradford-Protein-Bestimmung herangezogen. Vor jeder Probenmessung wurde eine Verdünnungsreihe mit Trypsin (Trypsin T-4665, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) erstellt um eine Standard-Eichgerade zu erstellen. Aus dem Trypsin-Stock (10mg/ml) wurde mit Trypsin-Assay-Buffer eine Verdünnungsreihe (100µl/ml, 1µl/ml, 100nl/ml und 10nl/ml) erstellt. Die Trypsin-Lösung wurde mit der Substratarbeitslösung – Boc-Gln-Ala-Arg-AMC-HCl (Bachem, Bubendorf, Schweiz) gemischt und die Fluoreszenz-Zunahme pro Zeit gemessen (Luminescence Spectrometer LS 50 B, PerkinElmer, Waltham, USA). Aus der Zunahme der Fluoreszenz pro Zeit und der Trypsin-Konzentration wurde die Standardgerade erstellt.

Die Fluoreszenz der Proben wurde in einem Gemisch aus 900µl TAB, 50µl Probe und 100µl Substratarbeitslösung wie oben beschrieben gemessen. Die Steigung der Messgeraden der Proben wurde verglichen mit der Steigung der Standardgeraden. Zusätzlich wurde das Ergebnis in Relation zu dem Proteingehalt in der Probe gesetzt (Endergebnis = Trypsinaktivität in mU/mg Protein). Hierzu wurde zusätzlich eine Proteinbestimmung der Proben nach Bradford durchgeführt (2.6.1). Alle Messungen wurden zweifach durchgeführt und ein Mittelwert gebildet.

MOPS-Puffer	Trypsin-Assay-Buffer (TAB)
250 mM Sucrose 5 mM MOPS 1 mM MgSO ₄ pH 6,5 4°C	50 mM TRIS Base 150 nM NaCl 1 mM CaCl ₂ 0,01 % BSA pH 8,1 Lagerung bei 4°C vor Benutzung Raumtemperatur

Substrat	Standard-Trypsin für Eichgrade
Boc-Gln-Ala-Arg-AMC•HCl <u>Stammlösung:</u> 10 mM Lösung in DMSO 4°C <u>Arbeitslösung:</u> 1:50 verdünnt mit H ₂ O	10 mg/ml 4°C

2.3.4 Interleukin-6 im Serum

Interleukin-6 (IL-6) ist ein an der Übertragung von Signalen der Inflammation, Infektabwehr und Immunantwort beteiligtes Zytokin (Hibi, Nakajima et al. 1996) und ist bei experimenteller Pankreatitis in Mäusen erhöht (Tietz, Malo et al. 2006).

Die IL-6-Konzentration im Blutserum der Versuchstiere wurde mit einem kommerziellen ELISA-Kit gemessen (Quantikine[®] Mouse IL-6 Immunoassay, R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA).

Die IL-6-Messungen wurden gemäß den dem Kit beiliegenden Anweisungen durchgeführt.

Zu Beginn wurde die IL-6-Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde der IL-6-Standard mit 5ml Calibrator Diluent RD5T gemischt um eine IL6-Konzentration von 500pg/ml zu erzeugen. Hieraus wurde die Verdünnungsreihe hergestellt (500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,5pg/ml und 7,8pg/ml). Danach wurden alle Wells der Platte mit 50µl Assay Diluent RD1-14 gefüllt. Danach wurden 50µl der

Standardreihe und je 50µl der Proben in aufsteigenden Konzentrationen in die Wells gefüllt. Pro Probe wurden zwei Wells befüllt.

Die Platte wurde geschüttelt (1min) und inkubiert (Raumtemperatur, 2h). Danach wurden die Wells geleert und gewaschen (5 Waschungen mit je 400µl Waschlösung). Nun wurde in jedes Well 100µl Maus-IL-6-Konjugat gegeben und die Platte nochmals inkubiert (2h). Danach wurden wieder 5 Waschungen durchgeführt. Anschließend wurden 100µl Color-Reagent pro Well hinzugefügt. Lichtgeschützt wurde die Platte abermals inkubiert (30min). Die Reaktion wurde abschließend gestoppt (100µl Stopp-Lösung pro Well), dann die Absorptionen photometrisch im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm abgelesen. Die IL-6-Konzentrationen wurden aus dem Vergleich mit der Absorption des Standards errechnet.

Waschlösung	Color-Reagent	Stopp-Lösung
25-fach konzentriertes Surfactant, Konservierungsstoff	<u>Reagent A:</u> 12,5ml Hydrogenperoxid <u>Reagent B:</u> 12,5ml Tetramethylbenzidin	HCl

2.4 Histopathologische Untersuchungen

2.4.1 Ödemisierungsgrad des Pankreas

Bei der akuten Pankreatitis kommt es durch die Entzündungsreaktion zu einer interstitiellen Flüssigkeitseinlagerung. Diese ist nicht nur mikroskopisch durch eine Auflockerung der Zellverbände sichtbar, sondern auch makroskopisch durch eine Zunahme des Organgewichts gekennzeichnet.

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde diese Zunahme des Organgewichts als der „Ödemisierungsgrad“ des Organs bezeichnet. Dieser wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Ödemisierungsgrad} = \frac{\text{Pankreasgewicht in mg}}{\text{Mausgewicht in g}}$$

Je höher der Wert, desto mehr Wasser wurde eingelagert, also desto mehr Entzündung findet sich folglich.

2.4.2 Histologie

Bei der Präparation der Versuchstiere wurde Pankreasgewebe für die histopathologische Untersuchung gewonnen. Die Proben wurden in Formaldehyd eingelegt und bei 4°C gekühlt gelagert bis zur Fixierung in Paraffinblöcken. Zur Begutachtung wurden Schnitte mit 5µm Dicke angefertigt, mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und anhand von definierten Kriterien – Ödembildung, Vakuolisierung, Nekrose und Infiltration von Granulozyten – klassifiziert. Exemplarische Bilder werden gezeigt.

2.5 Intrazelluläre Signalwege

2.5.1 Western-Blot

Sowohl durch die Stimulation mit Cerulein als auch durch die Stimulation mit Cannabinoiden am CB1-Rezeptor werden intrazelluläre Signalkaskaden der MAP-Kinase-Familie aktiviert (1.5).

Zur Messung des Aktivierungsgrades wurde die Stärke der Blots der phosphorylierten Kinasen mit den Blots der nicht-phosphorylierten Kinasen mittels Western-Blotting verglichen.

Dieses Verfahren wurde 1979 erstmals von Renart et al. beschrieben. Zuerst werden Proteine elektrophoretisch vertikal der Größe nach in einem Gel aufgetrennt. Anschließend werden sie aus dem Gel durch Anlegen einer horizontalen Spannung auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membranproteine werden mit einem spezifischen Erstantikörper markiert. Mit einem Zweitantikörper wird dann der gebundene Erstantikörper detektiert: der Zweitantikörper ist an ein Enzym gekoppelt und kann dadurch Substrate spalten. Dies erzeugt eine Lichtemission, welche einen Film schwärzt. Das auf einer Membran vorhandene Protein wird also verbildlicht (Renart, Reiser et al. 1979; Towbin, Staehelin et al. 1979; Burnette 1981).

Die zum Western-Blotting verwendeten Lysate wurden aus Pankreasgewebe hergestellt. Die Gewebestücke (je ca. 50-100µg) wurden in einem Pufferreagenz homogenisiert (1ml Homogenisationspuffer, eine Spatelspitze Na_3VO_4 /10ml, 100µl Protease-Inhibitor/10ml Puffer (Merck-Chemicals, Calbiochem® Protease Inhibitor Cocktail Set, Darmstadt, Deutschland)). Das Homogenisat wurde zentrifugiert (4°C, 14.000rpm, 5 min). Der Überstand wurde auf Eis inkubiert (30min) und die Zell-Lyse abgewartet. Danach wurden die Proben wieder zentrifugiert (4°C, 14.000rpm, 30min). Der Überstand wurde zu der Herstellung von Western-Blot-Proben und zu der Proteinbestimmung nach dem Bradford-Verfahren (2.6.1) verwendet.

Die Proben wurden zum Herstellen von Western-Blot-fähigen Lysaten mit 4-fach-konzentriertem SDS-Puffer, β -mercapto-Ethanol, und Homopuffer so eingestellt, dass sie einer Proteinkonzentration von 2mg/ml entsprachen (Standardmischung: Proteinkonzentration = 2mg/ml; 25 Volumen% SDS; 0,025 Volumen% β -mercapto-Ethanol). Zum Abschluss wurden die Proben gekocht (5min bei 95°C) und bis zu der Messung bei -80°C gelagert.

Homogenisations-Puffer	SDS-Puffer
50 mM Tris / HCl 100 mM KCl 50 mM β -Glycerophosphat 1 mM DTT 20 mM NaF 2 mM EGTA 0,2 mM EDTA 1 mM Benzamidin pH 7,4	253,81 mmol/L Tris-HCl, 20 Spatelspitzen/L Bromphenolblau, 400 mmol/L Glycerol 600 ml/L VE-Wasser 277,41 mmol/L SDS pH 6,8

Zu der Detektion der intrazellulären Proteine wurden alle Tierproben einer Versuchsreihe in ein Gel mit zehn Taschen geladen um eine direkte Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Das Gel bestand aus einem 10%igen Acrylamid-Trenngel mit aufgebrachtem Sammelgel. Die Gele wurden in der Elektrophorese-Kammer in Laufpuffer schwimmend beladen (1 Tasche mit 5 μ l Protein-Standard (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, USA).

Die Proteine wurden mittels Anlegen einer vertikalen Spannung (150V, 90min) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch Anlegen einer horizontalen Spannung (300mA, 1,5h) in einem Transferpufferbad auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran[®], Whatman International Ltd., Kent, UK) übertragen. Anschließend erfolgte die Waschung und Blockung der Membran (1h in 5%iger TBST-Milch (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, USA)) um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden.

Anschließend wurde der spezifische Erstantikörper in 5% TBST-Trockenmilch (5ml) aufgebracht, die Membran in Folie eingeschweißt (Jencons-PLS, VWR-Jencons, West Sussex, UK) und über Nacht inkubiert (4°C, Rotation). Tags darauf wurden die Membranen dreimal mit TBST gewaschen. Danach wurde der Detektor-Antikörper aufgebracht (in 15ml 5% TBST-Milch) und inkubiert (1h, bei Raumtemperatur). Wieder wurde die Membran dreimal gewaschen. Schließlich wurden die zwei Detektionslösungen (ECL1 und ECL2: ECL Detection Fluid, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) 1:1 gemischt und die Membran für 60s eingelegt. Auf die Membranen wurde dann ein Röntgenfilm (CL-XPosure Film, Thermo Fisher Scientific, Rockville, USA) aufgelegt und belichtet (Belichtungsdauer je nach Kinase zwischen 5s und

60min). Nach maschineller Entwicklung des Films (Agfa-Curix 60, Agfa-Gevaert, Morsel, Belgien) zeigten sich die Protein-Banden in Abhängigkeit von ihrer Proteingröße auf dem Film.

Die Antikörper zu der Detektion der Phospho-Kinasen brauchten im Allgemeinen eine Belichtungszeit von 30-60min bis ein Ergebnis deutlich wurde. Die Antikörper zur Detektion der unphosphorylierten Gesamt-Proteine brauchten in der Regel nur wenige Sekunden bis zu einer Schwärzung des Films. Dieser Umstand machte es möglich, die Membranen im „Reprobe-Verfahren“ zu entwickeln: zuerst wurde die Membran mit dem Erstantikörper gegen die Phospho-Kinase inkubiert (z.B. P-p38) und entwickelt. Anschließend wurde sie gewaschen und erneut inkubiert – allerdings nun mit dem Gesamtprotein-Antikörper (z.B. p38). Wenn sich bei der Entwicklung bereits nach kürzester Zeit ein deutliches Signal zeigte, war klar, dass auf dem Film tatsächlich das Ergebnis des Gesamtprotein-Antikörpers sichtbar ist.

Diese Re-Inkubation derselben Membran hat den Vorteil, dass Phospho-Antikörper und Gesamtprotein-Antikörper unter identischen Bedingungen – sprich mit der exakt gleichen Proteinmenge auf der Membran – miteinander verglichen werden können.

Sammelgel	Trenngel (10%iges Acrylamid-Gel)
2,5 ml Sammelgelpuffer 5,9 ml VE-Wasser 1,6 ml 30% Acrylamid/Bis-Lösung 60 µl 10% Ammoniumpersulfat 20 µl TEMED	4 ml Trenngelpuffer 6,7 ml VE-Wasser 5,3 ml 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 50 µl 10% Ammoniumpersulfat 25 µl TEMED

Sammelgel-Puffer	Trenngel-Puffer
500 mmol/l TRIS 13,87 mmol/l SDS pH 6,8	1492,54 mmol/l TRIS 13,87 mmol/l SDS pH 8,8

Lauf-Puffer (Gel-Elektrophorese)	Protein-Transfer-Puffer
25,02 mmol/l TRIS 192,3 mmol/l Glycin 3,47 mmol/l SDS	25,02 mmol/l TRIS 192,3 mmol/l Glycin 3,47 mmol/l SDS

Waschmedium:

19,9 mmol/l TRIS Base 136,89 mmol/l NaCl 1,5 ml/l TWEEN 20 pH 7,6
--

Blockmedium:

s.o. plus zusätzlich 50 g/l entfettete Trockenmilch

Erstantikörper:

untersuchte Kinase	Antikörper	eingesetzte Konzentration
p38	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA: p38 (C-20): sc-535	1:1000
Phospho-p38	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody #9211	1:500
JNK	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA SAPK/JNK-Antibody #9252	1:1000
Phospho-JNK	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody #9251	1:500
p44/42	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA p44/42 MAP Kinase Antibody #9102	1:1000
Phospho-p44/42	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Mouse mAb Antibody #9106	1:500

Tab. 4: verwendete Erstantikörper und deren eingesetzte Konzentration (in TBST)

Zweitantikörper:

Antikörper	detektierter Erstantikörper	Eingesetzte Konzentration
GE-Healthcare, Chalfort St Giles, UK peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey) NA 934 Anti-Rabbit-IgG	p38; Phospho-p38; JNK; Phospho-JNK; p44/42	1:5000

GE-Healthcare, Chalfort St Giles, UK peroxidase-linked species- specific whole antibody (from sheep) NA 931 Anti-Mouse-IgG	Phospho-p44/42	1:5000
--	----------------	--------

Tab. 5: verwendete Zweitantikörper und deren eingesetzte Konzentration (in TBST)

Das in diesem Kapitel erläuterte Western-Blot-Verfahren wurde in derselben Weise auch verwendet um den CB1-Rezeptor in Geweben nachzuweisen (3.1), beziehungsweise um immunopräzipitierte Proben (2.6.3) mittels Western-Blotting weiter zu behandeln.

Erstantikörper (1:250)	Zweitantikörper (Anti-Rabbit-IgG; 1:10.000)
Cayman Chemical, Ann Arbor, USA CB1-Rezeptor (C-Term) Polyclonal Antibody	GE-Healthcare, Chalfort St Giles, UK, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey) NA 934

2.5.2 Quantitative Analyse der Blots

Zu der standardisierten Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse wurden die Pixelzahlen der einzelnen Blots bestimmt und miteinander verglichen. Die entwickelten Filme wurden eingescannt und mit dem Programm ImageJ 1.38x analysiert (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Die errechneten Pixelzahlen der Phospho-Antikörper-Blots wurden in Relation zu den Pixelzahlen der korrespondierenden Gesamt-Protein-Antikörper-Blots gesetzt. Anschließend wurden Daten gepoolt und Mittelwerte in Prozent errechnet.

2.6 Sonstige Verfahren

2.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Konzentration von Proteinen in einer bestimmten Lösung zu bestimmen, wurde die von Bradford 1976 beschriebene Methode angewandt (Bradford 1976). Bei dieser Methode werden die Absorptionen einer Lösung gegenüber einem Nullwert photometrisch gemessen. Diese Absorptionen sind proportional zu der enthaltenen Proteinmenge in einer Probe.

Hierzu werden Proteine an einen Farbstoff gebunden: die Seitenketten der Proteine (kationisch, hydrophob) bilden einen Komplex mit dem Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250. Der Farbstoff alleine hat sein Absorptionsmaximum bei 465nm. Im Komplex mit Proteinen ändert sich dieses Absorptionsmaximum und kann im Photometer gemessen werden (Compton and Jones 1985).

Mit einer standardisierten BSA-Protein-Probe (Bovine Serum Albumin) wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und photometrisch eine Eichgerade gemessen (Ultrospec 3100pro Spectrophotometer, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). Anschließend wurde der Farbstoff-Dye 1:5 mit H₂O verdünnt und je 1ml in Küvetten vorgelegt. Eine Küvette diente zur Nullwert-Bestimmung des Farbstoffs. In die anderen Küvetten wurden die Proben als Gemisch aus 5µl Probe und 45µl H₂O hinzugegeben. Danach erfolgte eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 595nm. Die Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration einer Probe wurde abschließend aus der Standardgeraden, dem photometrischen Messwert und dem Verdünnungsfaktor der Proben errechnet.

Es ist bewiesen, dass das vorherige Erstellen einer Eichgeraden die Genauigkeit der Proteinbestimmung erhöht (Zor and Selinger 1996).

2.6.2 PCR

Die PCR (Polymerase chain reaction) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von Erbmateriale (Mullis, Faloona et al. 1986). Hierzu wird ein Stück DNA oder RNA in mehreren Zyklen gespalten (Denaturation), kopiert (Annealing, Elongation) und wieder zusammgefügt (Polymerisation). Die Vervielfältigung erfolgt exponentiell (Verdopplung nach jedem Zyklus). Zu Beginn der Reaktion werden bestimmte sogenannte Primer zugegeben, die die Startstellen anzeigen.

Die einzelnen Schritte der PCR erfolgen bei unterschiedlichen Temperatur-Niveaus. Für diese Arbeit wurde ein Sonderverfahren der PCR gewählt, bei dem die Temperaturen von der Regel abweichen: die Reaktion startet erst nach Erhitzen des Gemischs auf 95°C (sogenannte „hot-start-PCR“). Bei der hot-start-PCR wird eine unspezifische Amplifikation verhindert (Chou, Russell et al. 1992).

Es wurde ein kommerzielles PCR-Kit verwendet (HotStarTaq DNA Polymerase Kit[®], Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Arbeitsschritte wurden wie in der Arbeitsanleitung beschrieben ausgeführt:

Zuerst wurden die Stoffe aufgetaut (PCR-Puffer, Desoxy-Nukleotid-Gemisch („dNTP“), Primer und MgCl₂). Nach dem Umschreiben der RNA in DNA mittels Reverser Transkriptase wurden die Stoffe gemäß Protokoll gemischt und in Gefäße verteilt. Dann wurde die Template-cDNA hinzugegeben. Als Positiv-, beziehungsweise Negativkontrolle wurden genomische DNA und H₂O benutzt. Die Gefäße wurden in den Thermocycler gegeben und das entsprechende Programm gestartet.

Folgende Temperaturstufen und Zeiten wurden erreicht:

Schritt	Temperatur in °C	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95	5min
2. Denaturierung	95	30s
3. Annealing	58	50s
4. Polymerisation	72	1min
5. Abschließende Polymerisation	72	3min

Von Schritt 2-4 wurden 35 Zyklen durchgeführt.

Im Anschluss an die Amplifikation wurden die Moleküle der Größe nach durch eine Gel-Elektrophorese in Agarose-Gel aufgetrennt (3g Agarose wurden in 100ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gegeben und die Mischung in der Mikrowelle für 1min aufgeköcht. Anschließend wurden 10µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Gel wurde gegossen und mit TAE Puffer bedeckt. Die Proben wurden durch die Zugabe von je 1µl Bromphenolblau fertig gestellt und in die Geltaschen geladen. In die erste Tasche wurde 10µl eines Basenpaarleiters gegeben. Das Gel wurde anschließend zur elektrophoretischen Trennung der Proteine 10min lang einer Spannung von 120V bei 300mA ausgesetzt). Abschließend wurde das Gel fotografiert.

PCR-„Rezeptur“ für 1 Probe	TAE-Puffer
9,5µl H ₂ O 2µl Puffer 0,75mg MgCl ₂ 0,5µl dNTP 1µl Primer 4µl Q-Solution 0,25µl Taq-Polymerase = 18µl Gesamtvolumen	242,3g/l 18,6g/l EDTA-Na ₂ *2 H ₂ O 60,05g/l Acetat

Primer:

	muriner CB1-Rezeptor	murines β-actin
	<u>CB1-forward:</u> 5' – GTA CCA TCA CCA CAG ACC TCC TC – 3'	<u>β-actin mouse forward:</u> 5' – CAT TGC TGA CAG GAT GCA GAA – 3'
	<u>CB1-backward :</u> 5' – GGA TTC AGA ATC ATG AAG CAC TCC A – 3'	<u>β-actin mouse backward:</u> 5' – GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA – 3'
Konzentration	10pmol/ μ l	4pmol/ μ l

2.6.3 Immunopräzipitation

Für den Nachweis des CB1-Rezeptors in tierischem Gewebe wurde eine Immunopräzipitation mit anschließendem Western-Blotting durchgeführt.

Ein Pankreas-Gewebestück wurde in Puffer homogenisiert (2.5.1). Das Homogenisat wurde zentrifugiert (4°C, 14.000rpm, 5min) und der Überstand inkubiert (auf Eis, 30min). Abermals wurde zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde einerseits für die Weiterverarbeitung verwendet, andererseits für die Bradford-Proteinbestimmung (2.6.1). Mit Kenntnis der Proteinkonzentration wurde die zu messende Probe auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml eingestellt. Bei 4°C wurde über Nacht die Inkubation mit dem CB1-Antikörper (CB1 Receptor (C-Term) Polyclonal Antibody, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) durchgeführt. Danach wurden 30 μ l Protein-G-Beads (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockville, USA) pro Probe hinzugefügt und das Gemisch inkubiert (4°C, 2h). Dann wurden die Proben abermals zentrifugiert (4°C, 12.000rpm, 5min). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet resuspendiert (mit 500 μ l Homopuffer) und danach erneut zentrifugiert (4°C, 14.000rpm, 5min). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Proben durch Hinzufügen von 13 μ l Homopuffer, 5 μ l 4xSDS inklusive β -mercapto-Ethanol und fünfminütigem Kochen bei 95° Western-Blot-fähig gemacht.

Nach dieser Vorbereitung wurde eine Proteinanalyse mittels Western-Blotting durchgeführt (2.5.1).

2.6.4 Immunhistochemie

Die zu untersuchenden Gewebeproben wurden nach der Präparation der Versuchstiere in Formaldehyd eingelegt und später in Paraffinblöcken fixiert. Für die Verwendung zu der immunhistochemischen Untersuchung wurden ca. 3 μ m dicke Schnitte hiervon

zunächst mit Xylol, dann mit einer absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol, 96%, 70%, 50%) und letztlich mit Aqua entparaffiniert und hydriert (Spülung je 5min). Anschließend wurden die Proben in TBS (2x5min.) gewaschen und zur Blockung der Peroxidasen in ein Wasserstoffperoxid/Methanol-Gemisch gegeben (0,3% H₂O₂ in Methanol, 10min., Raumtemperatur). Danach erfolgte ein erneuter Waschvorgang (3x5min. in TBST = 0,1% Tween 20). Hiernach wurden die Proben in Milch geblockt (Blotto = 1% BSA und 1% Milch in TBST, 45min., Raumtemperatur). Dann erfolgte die Exposition der Proben mit dem CB1-spezifischen Erstantikörper (CB1-Rezeptor (C-Term) Polyclonal Antibody, #10006590, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) in einer Verdünnung von 1:50 in Blotto (1h, Raumtemperatur). Eine Negativkontrolle wurde nicht inkubiert, ansonsten aber gleich behandelt. Anschließend wurde abermals mit TBST gewaschen (3x5min.). Die weitere Behandlung erfolgte mit einem käuflichen Kit und nach Maßgabe der Empfehlungen des Herstellers (Polymer-HRP ICH-Kit, DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg). Zunächst wurde ein Super-Enhancer hinzugegeben (Inkubation 20min., Raumtemperatur). Danach wurde gewaschen (3x5min. mit TBST). Nun erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettich-gebundenen Detektor-Zweitantikörper (aus dem Kit, 30min., Raumtemperatur). Danach erfolgte eine abermalige Waschung (3x5min., mit TBST). Zu der Detektion des Zweitantikörpers wurden die Proben in Diaminobenzidine (DAB-Chromogen) eingelegt (3min., Raumtemperatur). Anschließend wurden die Proben mit Aqua gewaschen (2-3x pro 5min.). Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse wurden die Proben nun noch mit Hämalun gegengefärbt (1:10 in H₂O, 5min, Raumtemperatur). Zuletzt wurden die Proben wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% Ethanol, 70%, 96%, 100%) und schließlich mit Xylol behandelt (Spülung je 5min., Xylol 10min.). Die Auswertung erfolgte durch die Mikroskopie der Proben durch zwei Personen (BX41, Olympus, Tokio, Japan; Software Cell^A, Olympus, Tokio, Japan).

2.6.5 Statistische Auswertung

Die Diagramme zeigen Mittelwerte sowie den einfachen Standardfehler (S.E.M.). Die Berechnung der Mittelwerte sowie der Standardfehler wurde mit Excel 2007 (Microsoft Office, Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt. Die Signifikanzniveaus (p-Werte) wurden mittels Student-T-Test für unabhängige Stichproben mit SPSS berechnet (SPSS Inc., Chicago, USA). Als signifikant wurden p=0,05 oder kleiner angesehen.

2.6.6 Literaturverwaltung

Alle genannten Publikationen wurden bei PubMed (www.pubmed.gov, U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health, Bethesda, USA) recherchiert und mit Endnote (EndNote X3, Thomson Reuters, New York, USA) verwaltet.

3. Ergebnisse

Zum Ausschluss von Pipettierfehlern, systematischen Fehlern und zum Beweis der Reproduzierbarkeit wurden pro Versuchssetting drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Es wurden jeweils vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die gezeigten Diagrammergebnisse der laborchemischen Versuchsmessungen und der Western-Blot-Pixelmessungen entstammen gepoolten Daten. Die Diagramme der laborchemischen Messwerte zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler. Die Ergebnisse der Western Blots sind exemplarisch wiedergegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur relevante Ausschnitte gezeigt.

3.1 Nachweis des CB1-Rezeptors in humanen und tierischen Geweben

In humanen und tierischen Pankreas-Gewebeproben konnte ein Nachweis des CB1-Rezeptors erbracht werden. Außerdem wurde der CB1-Rezeptor außer im Pankreas in weiteren Organen nachgewiesen. Die Gewebeproben wurden bei der Präparation der Tiere nach den Versuchsreihen gewonnen.

Die humanen Pankreasproben wurden durch die Chirurgische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität Campus Großhadern im Rahmen einer Kooperation mit Frau Prof. Dr. med. C. Bruns postoperativ zur Verfügung gestellt. Die Einverständniserklärung der Patienten sowie ein positives Ethikvotum lagen vor. Die erforderlichen datenschutzrechtlichen Vorgaben wurden berücksichtigt.

Zu dem Nachweis des CB1-Rezeptors wurden vier Verfahren angewandt:

3.1.1 PCR (2.6.2) zu dem Nachweis des CB1-Rezeptors in verschiedenen tierischen Gewebeproben und zum Nachweis des Fehlens des CB1-Rezeptors in CB1^{-/-} Mäusen.

3.1.2 Western-Blotting (2.5.1) von humanen und tierischen Pankreaslysaten mit CB1-Rezeptor-spezifischen Antikörpern.

3.1.3 Immunpräzipitation (2.6.3) von tierischem Hirn-, und Azinuszellhomogenisat mit CB1-Rezeptor-spezifischen Antikörpern.

3.1.4 Immunhistochemie (2.6.4) von Pankreasgeweben der Versuchstiere.

3.1.1 RT-PCR

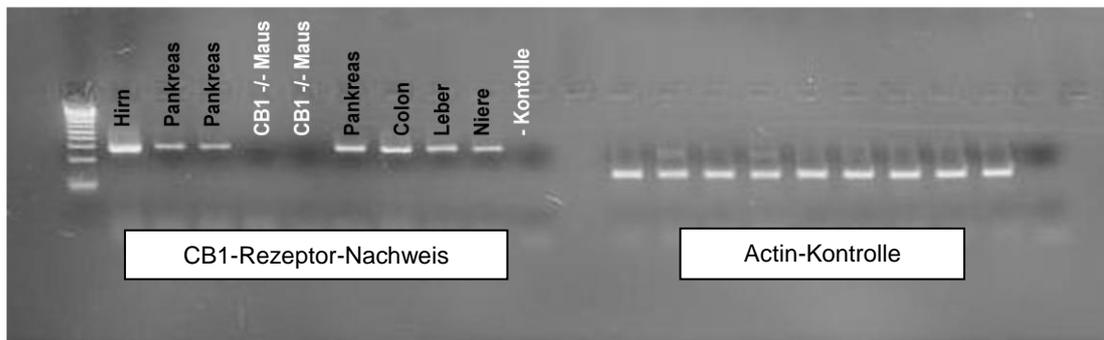


Abb. 5: RT-PCR mit cDNA zum CB1-Rezeptor-Nachweis: Gewebe der Maus (Hirn, Pankreas, Colon, Leber, Niere) mit unterschiedlich starken Signalen sowie Actin-Kontrolle.

Durch die RT-PCR zeigt sich der CB1-Rezeptor in allen untersuchten Geweben der Wildtyp-Mäuse. Bei gleicher Proteinladung in allen Geltaschen zeigt sich in Hirngewebe eine stärkere Signalintensität. Die CB1-/- Tiere zeigen kein CB1-Rezeptor-Signal.

3.1.2 Western-Blotting

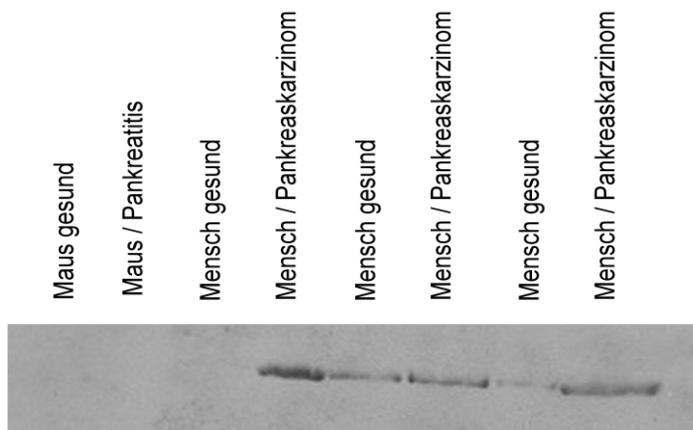


Abb. 6: Western-Blot von humanen und tierischen Pankreasproben mit CB1-Rezeptor-Antikörpern.

Eine CB1-Rezeptor-Expression konnte mittels spezifischen CB1-Rezeptor-Antikörpern und Western-Blotting in exokrinen Azini der Maus nicht nachgewiesen werden. Die Proben menschlicher Pankreata zeigen in 5 von 6 Fällen eine Expression des CB1-Rezeptors. Gewebeproben aus Pankreaskarzinom-Arealen weisen subjektiv eine höhere Signalstärke auf als Proben aus physiologischem Pankreasgewebe.

3.1.3 Immunpräzipitation

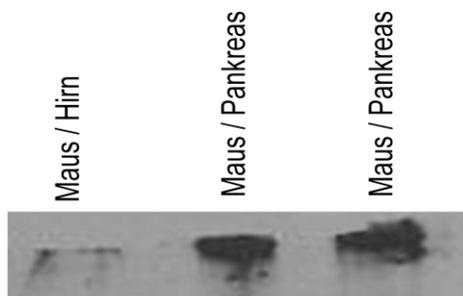


Abb.7: Immunpräzipitation von Mäusepankreatata mit CB1-Rezeptor-Antikörper

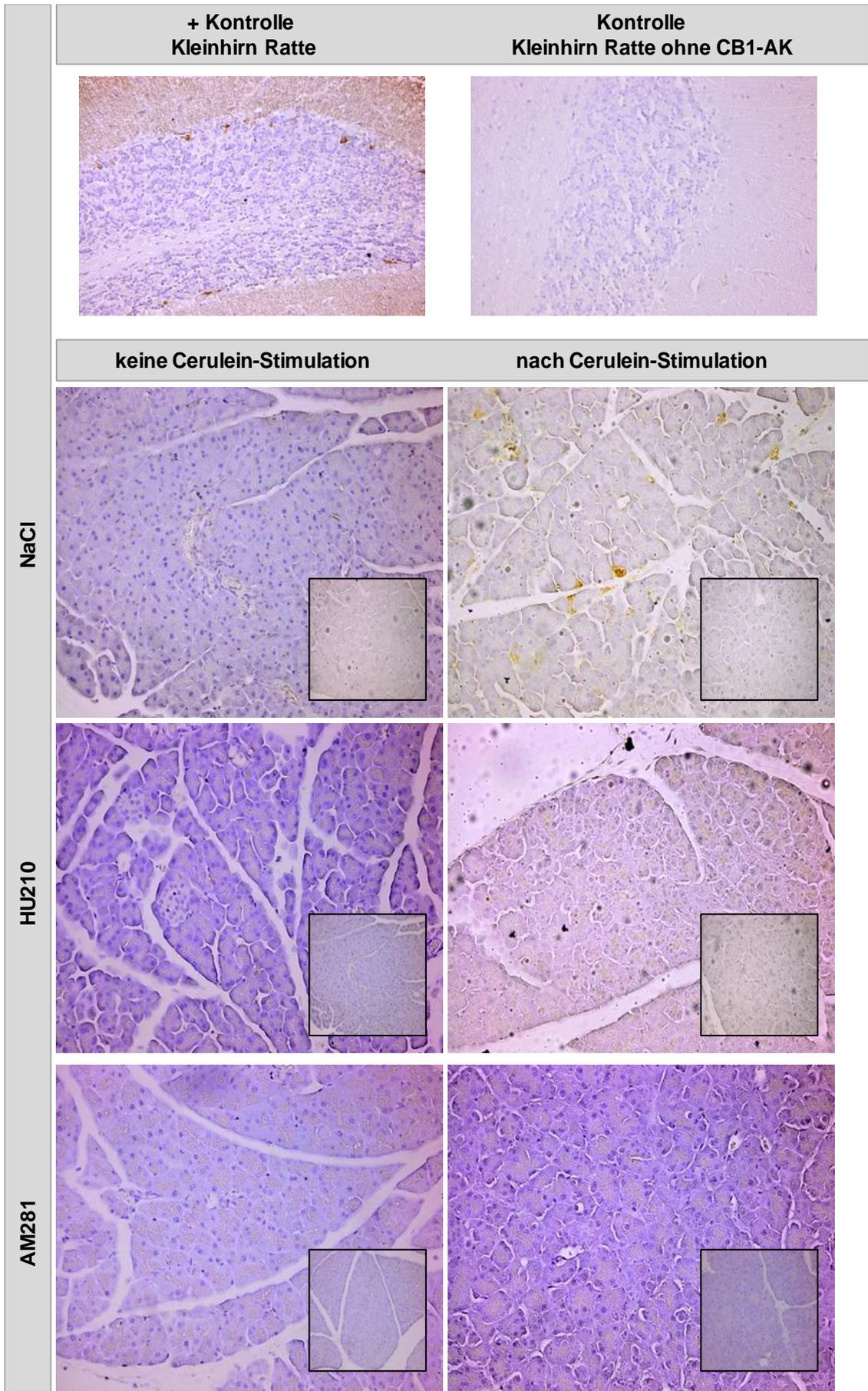
Mittels Immunpräzipitation mit CB1-Antikörpern und nachfolgendem Western-Blotting mit CB1-Antikörpern konnte eine Expression des CB1-Rezeptors sowohl im Hirngewebe der Maus als auch in exokrinen Azinuszellen des Pankreas der Maus nachgewiesen werden.

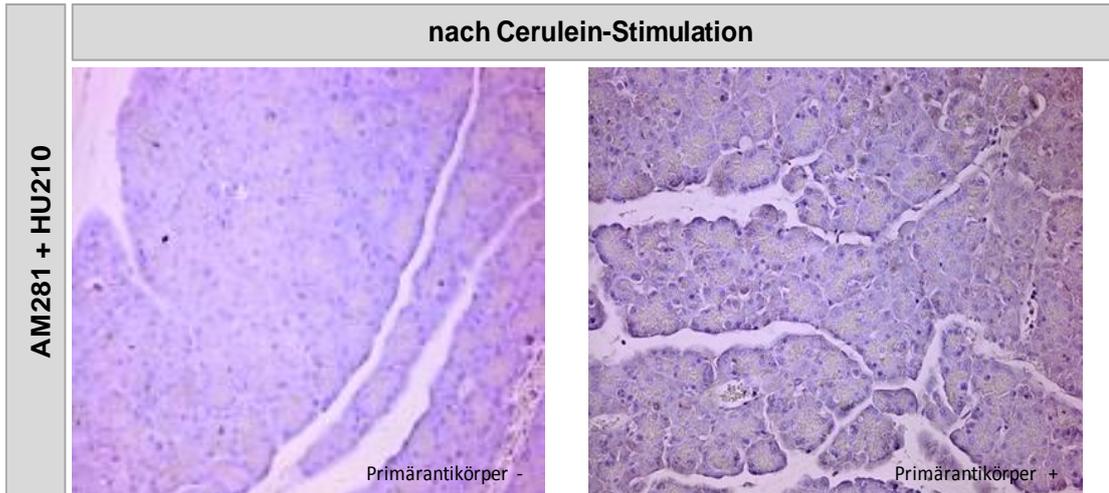
3.1.4 Immunhistochemie

Immunhistochemisch wurde das Vorkommen des CB1-Rezeptors und die Stärke der Expression in Pankreasgewebe der Wildtyp-Versuchstiere in Abhängigkeit der unterschiedlichen Behandlungsformen untersucht. Außerdem wurde Gewebe von CB1-/- Tieren auf den CB1-Rezeptor untersucht. Als Positivkontrolle diente Gewebe vom Kleinhirn einer Ratte.

3.1.4.1 Immunhistochemie bei Wildtyptieren

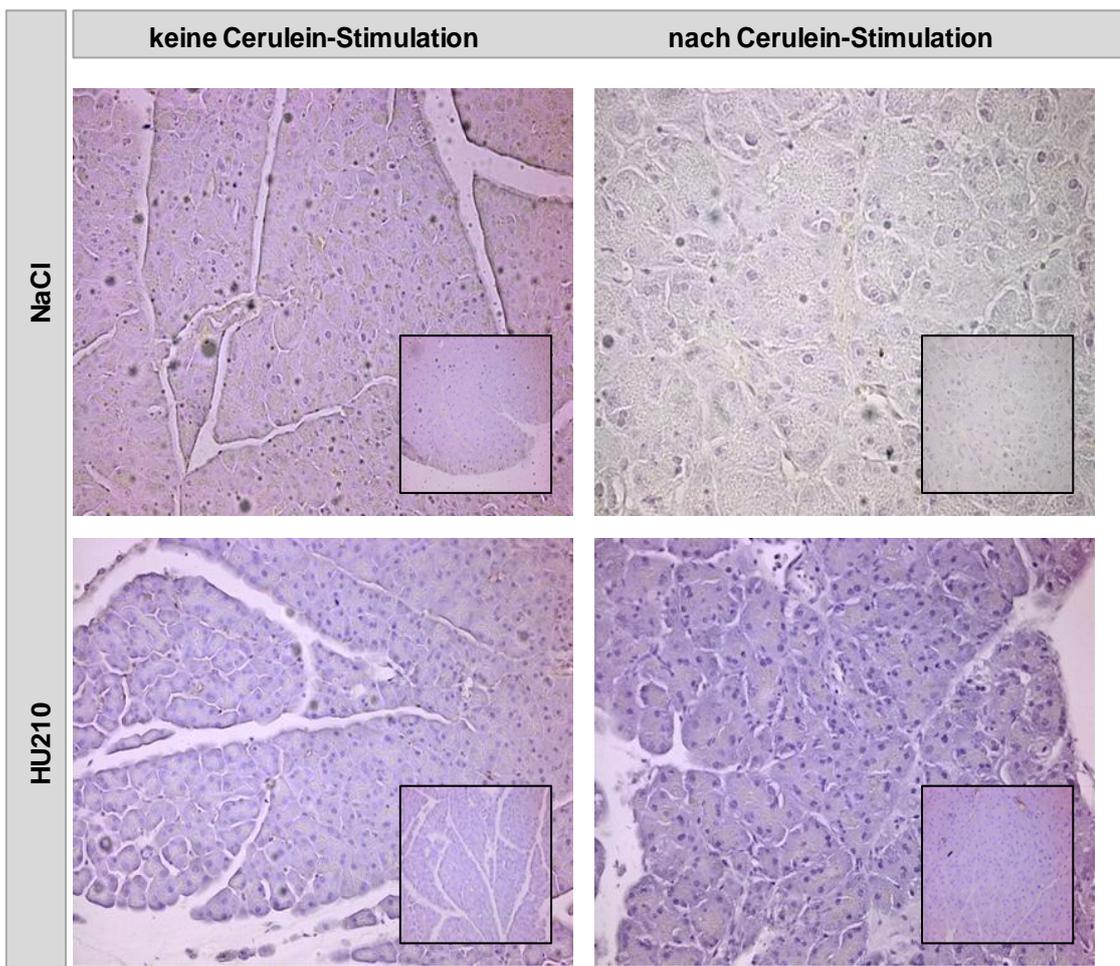
Bei allen Wildtyptieren zeigte sich der CB1-Rezeptor in Pankreasgewebe. Die Signale sind jeweils sehr schwach, jedoch eindeutig im Vergleich zu den Negativkontrollen. Eine Signalanhebung zeigt sich tendenziell bei den nur mit Cerulein behandelten Tieren sowie bei den mit AM281 behandelten Tieren. Exemplarisch werden einige Fotos gezeigt.





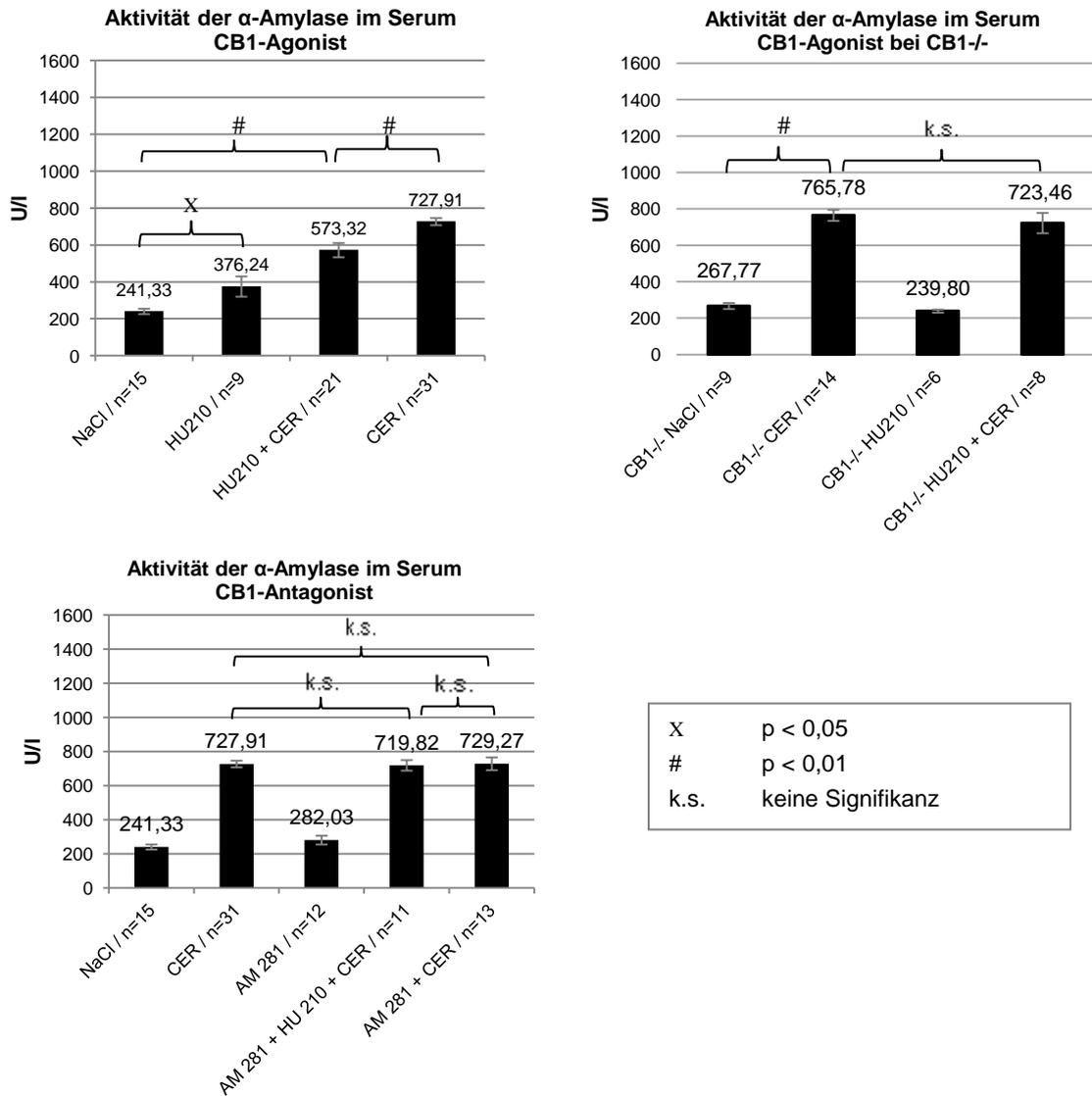
3.1.4.2 Immunhistochemie bei CB1^{-/-} Tieren

Bei den CB1^{-/-} Tieren zeigt sich kein CB1-Rezeptor in der Immunhistochemie.



3.2 Ergebnisse der laborchemischen Untersuchungen

3.2.1 Amylase im Blutserum



Alle mit Cerulein behandelten Tiere beider Genotypen zeigen signifikant höhere Amylasewerte als die jeweiligen NaCl-Kontrolltiere.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (U/l)	N=	Signifikanz
WT	CER	727,91	31	$p < 0,001$
	NaCl	241,33	15	
CB1-/-	CER	765,78	14	$p < 0,001$
	NaCl	257,77	9	

Durch HU210-Gabe vor Cerulein-Applikation kann eine signifikante Senkung der Serumamylase im Vergleich zur alleinigen Cerulein-Applikation bei den Wildtypen erreicht werden.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (U/l)	N=	Signifikanz
WT	HU210+CER	573,32	21	p=0,002
	CER	727,91	31	

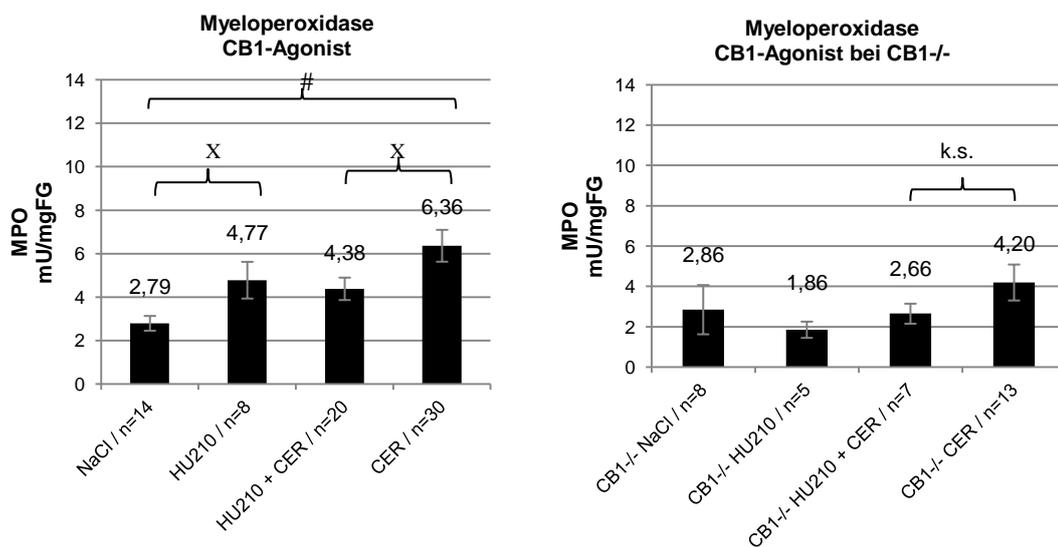
Die alleinige Behandlung mit HU210 führt zu einer signifikanten Erhöhung der Werte im Vergleich zu der NaCl-Kontrolle.

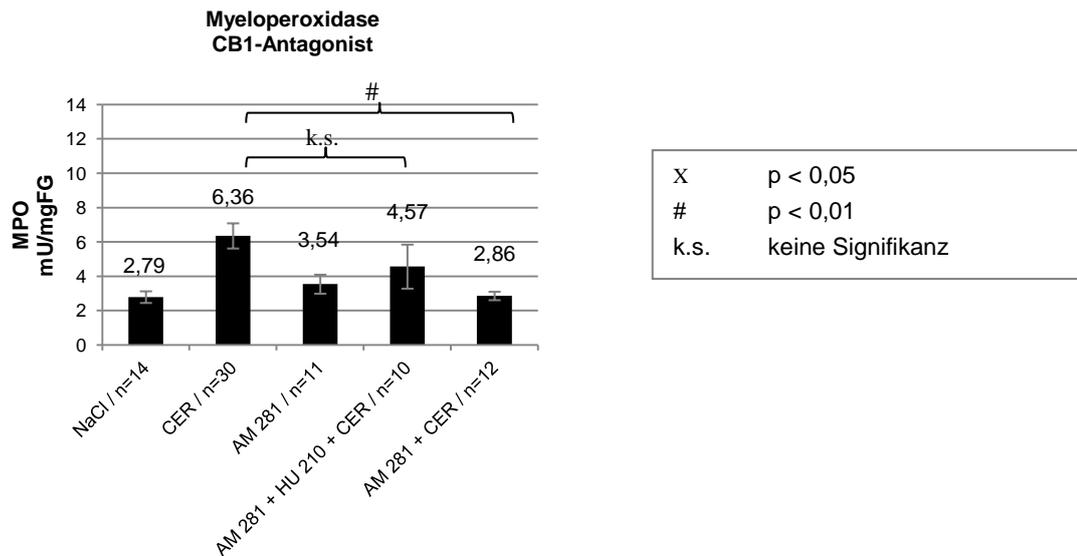
Genotyp	Behandlung	Mittelwert (U/l)	N=	Signifikanz
WT	HU210	376,24	9	p=0,042
	NaCl	241,33	15	

Tiere die mit AM281, HU210 und Cerulein behandelt wurden und Tiere, die nur mit AM281 und Cerulein behandelt wurden, zeigen fast identische Werte.

Bei den CB1^{-/-} Tieren zeigen sich ähnliche Amylasewerte für die NaCl-Kontrolltiere wie für die HU210-Gruppe. Ebenso finden sich ähnlich hohe Werte bei den mit Cerulein und den mit HU210 und Cerulein kombiniert behandelten Tieren.

3.2.2 Myeloperoxidase im Lungenhomogenisat





Bei der Messung der Höhe der Myeloperoxidase im Lungengewebe zeigen die mit Cerulein behandelten Kontrolltiere der Wildtypgruppe signifikant höhere MPO-Messwerte, die Cerulein-Kontrolltiere der CB1-/- Gruppe tendenziell höhere MPO-Messwerte gegenüber den NaCl-Kontrolltieren

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (mU/mgFG)	N=	Signifikanz
WT	CER	6,36	30	p<0,001
	NaCl	2,79	14	
CB1-/-	CER	4,2	13	p=0,177
	NaCl	2,86	8	

Die Gabe von HU210 vor Cerulein-Applikation kann bei Wildtypen den MPO-Wert im Vergleich zu der Cerulein-Kontrolle signifikant senken.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (mU/mgFG)	N=	Signifikanz
WT	HU210+CER	4,38	20	p=0,032
	CER	6,36	30	

Der MPO-Wert wird auch durch die Kombinationsbehandlung aus AM281 und Cerulein signifikant gesenkt im Vergleich zu der Cerulein-Kontrollgruppe

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (mU/mgFG)	N=	Signifikanz
WT	AM281+CER	2,86	12	p<0,001
	CER	6,36	30	

Auch nach Blockade der CB1-Rezeptoren mit AM281 und anschließender Behandlung mit HU210 und Cerulein bei den Wildtyptieren verringert sich der MPO-Wert leicht und ohne Signifikanz im Vergleich zu der Cerulein-Kontrolle.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (mU/mgFG)	N=	Signifikanz
WT	AM281+HU210+CER	4,57	10	p=0,232
	CER	6,36	30	

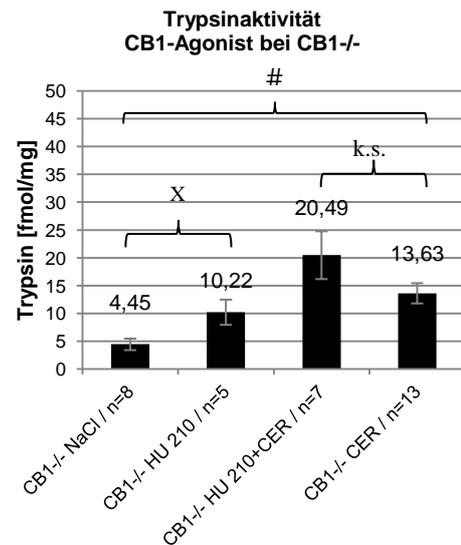
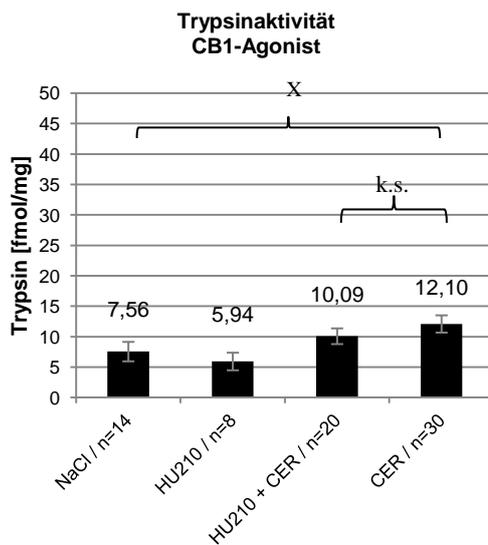
Die MPO-Messwerte bei alleiniger HU210-Gabe sind bei den Wildtypen signifikant höher als die Werte der NaCl-Kontrolltiere

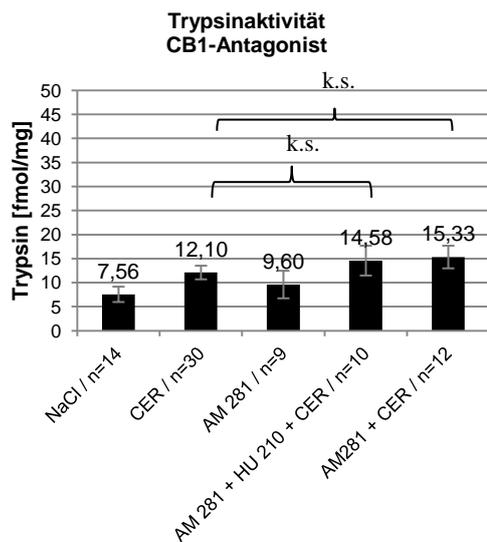
Genotyp	Behandlung	Mittelwert (mU/mgFG)	N=	Signifikanz
WT	HU210	4,77	8	p=0,019
	NaCl	2,79	14	

In der CB1-/- Gruppe sind die MPO-Messwerte durch Gabe von HU210 vor Cerulein-Gabe gesenkt. Es besteht keine Signifikanz.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (mU/mgFG)	N=	Signifikanz
CB1-/-	HU210+CER	2,66	7	p=0,243
	CER	4,2	13	

3.2.3 Trypsinaktivität im Pankreashomogenisat





X	p < 0,05
#	p < 0,01
k.s.	keine Signifikanz

Die Messung der Trypsinaktivität im Pankreashomogenisat ergibt signifikant höhere Werte für alle mit Cerulein stimulierten Tiere beider Genotypen im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (fmol/mg)	N=	Signifikanz
WT	CER	12,1	30	p=0,041
	NaCl	7,56	14	
CB1 ^{-/-}	CER	13,63	13	p=0,001
	NaCl	4,45	8	

Im Vergleich zu den mit Cerulein stimulierten Wildtyptieren führt die vorherige Gabe von HU210 vor Cerulein-Applikation zu einer nicht signifikanten Verringerung der Trypsinaktivität.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (fmol/mg)	N=	Signifikanz
WT	HU210+CER	9,61	20	p=0,33
	CER	12,1	30	

Die höchsten Trypsinwerte zeigen die mit HU210 und Cerulein behandelten Tiere der CB1^{-/-} Gruppe. Diese Werte sind allerdings weder gegenüber der CB1^{-/-} Cerulein-Kontrolle signifikant erhöht noch gegenüber der Wildtypgruppe selber Behandlung:

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (fmol/mg)	N=	Signifikanz
CB1 ^{-/-}	HU210+CER	20,49	7	p=0,189
	CER	13,63	13	
WT	HU210+CER	10,09	20	p=0,058
CB1 ^{-/-}		20,49	7	

Die Behandlung mit HU210 alleine führt in der CB1-/- Gruppe zu einer signifikanten Steigerung der Trypsinwerte gegenüber der NaCl-Kontrolle.

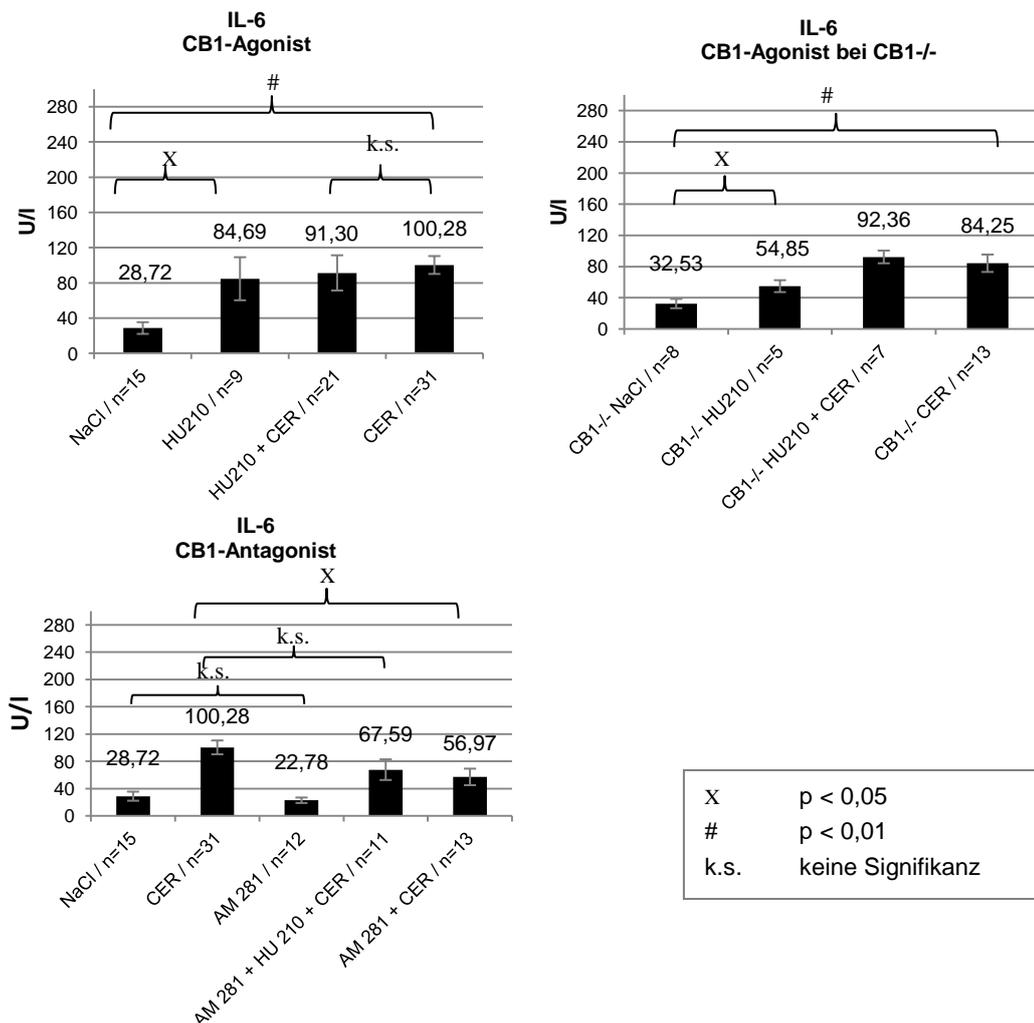
Genotyp	Behandlung	Mittelwert (fmol/mg)	N=	Signifikanz
CB1-/-	HU210	10,22	5	p=0,022
	NaCl	4,45	13	

Die Werte der Cerulein-Kontrolle der CB1-/- Gruppe sind lediglich tendenziell höher als in der Wildtyp-Kontrollgruppe. Eine Signifikanz lässt sich nicht nachweisen.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (fmol/mg)	N=	Signifikanz
WT	CER	12,1	30	p=0,539
CB1-/-		13,63	13	

In der Gruppe der mit AM281 behandelten Tiere finden sich ähnliche Werte für alle mit Cerulein oder Kombinationen aus AM281, HU210 und Cerulein behandelten Tiere.

3.2.4 Interleukin-6 im Blutserum



Alle mit Cerulein stimulierten Tiere beider Genotypen zeigen signifikant höhere IL-6-Werte als die Kontrolltiere.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (U/l)	N=	Signifikanz
WT	CER	100,28	31	p<0,001
	NaCl	28,72	15	
CB1-/-	CER	84,25	13	p=0,003
	NaCl	32,53	8	

Auch alle nur mit HU210 behandelten Tiere beider Genotypen zeigen signifikant höhere Messwerte für IL-6 als die mit NaCl behandelten Kontrolltiere.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (U/l)	N=	Signifikanz
WT	HU210	84,69	9	p=0,012
	NaCl	28,72	15	
CB1-/-	HU210	54,85	5	p=0,019
	NaCl	32,53	8	

Die Gabe von HU210 vor Cerulein-Applikation senkt in der Gruppe der Wildtyp-Mäuse die Höhe der IL-6-Konzentration im Vergleich zu der mit Cerulein stimulierten Kontrollgruppe. Signifikanz besteht nicht.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (U/l)	N=	Signifikanz
WT	HU210+CER	91,30	21	p=0,647
	CER	100,28	31	

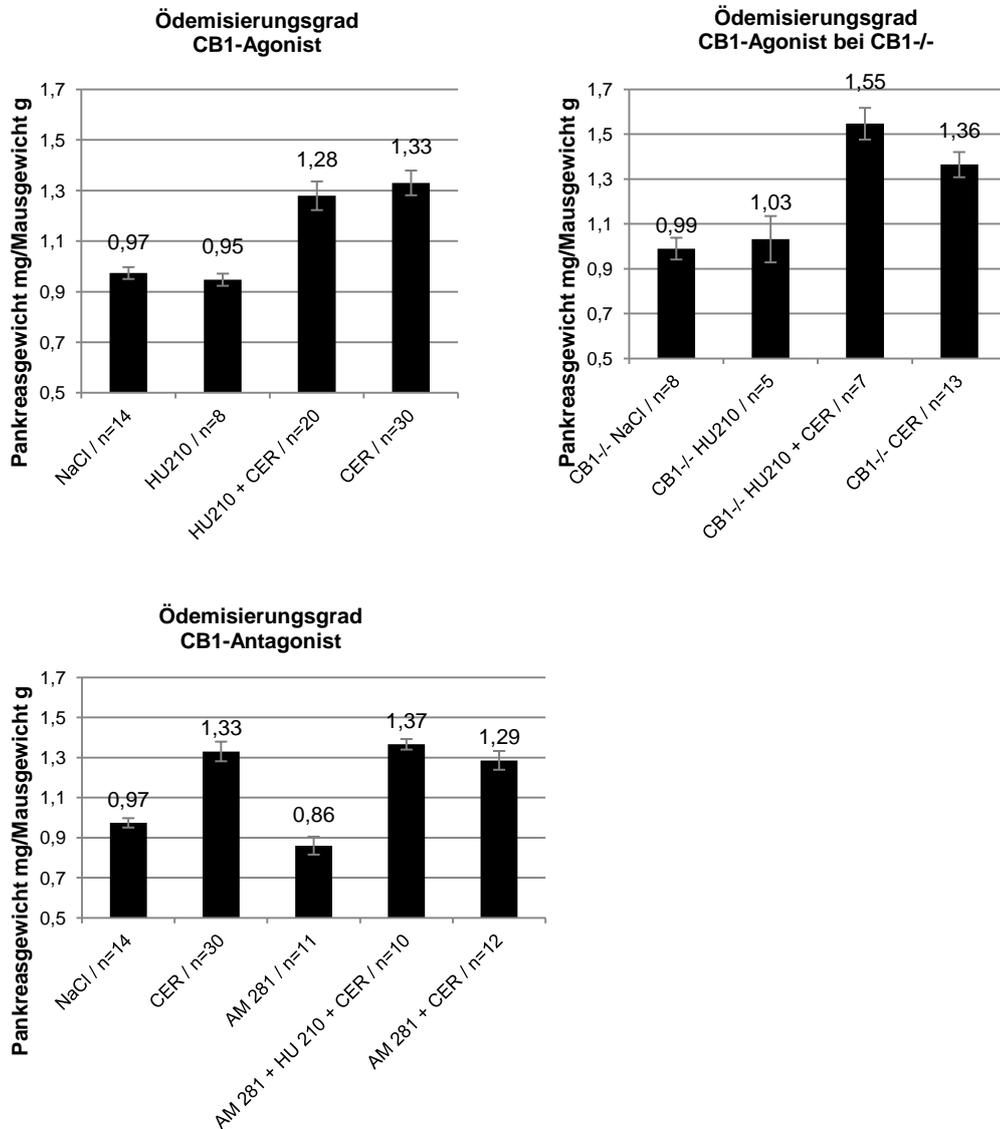
Die mit AM281 und Cerulein behandelten Tiere weisen signifikant niedrigere Messwerte für IL-6 auf als die Cerulein-Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung aus AM281, HU210 und Cerulein senkt die Messwerte leicht ohne Signifikanz im Vergleich zu der Cerulein-Kontrolle.

Genotyp	Behandlung	Mittelwert (U/l)	N=	Signifikanz
WT	AM281+CER	56,97	13	p=0,024
	CER	100,28	31	
	AM281+HU210+CER	67,59	11	p=0,112
	CER	100,28	31	

Eine alleinige Behandlung mit AM281 führt zu keiner signifikanten Änderung der IL-6-Werte gegenüber der NaCl-Kontrolle (p=0,4).

3.3 Histopathologische Untersuchungen

3.3.1 Ödemisierungsgrad des Pankreasgewebes



Generell zeigt sich, dass Pankreata aller mit Cerulein behandelten Tiere einen höheren Ödemisierungsgrad aufweisen als die Kontrolltiere, unabhängig von dem Genotyp der Tiere.

Alle Vergleiche der Messwerte erbrachten nicht signifikante Messwertunterschiede. Eine Gabe von HU210 vor Cerulein-Applikation führt zu einer sehr milden Senkung des Ödemisierungsgrades bei Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den nur mit Cerulein stimulierten Tieren. Ebenso wird eine geringfügige Senkung des Ödemisierungsgrades

durch die Behandlung mit AM281 und Cerulein im Vergleich zu der alleinigen Cerulein-Stimulation beobachtet.

In der Gruppe der CB1^{-/-} Tiere zeigt sich keine Verringerung des Ödemisierungsgrades durch Gabe von HU210 vor Cerulein-Exposition im Vergleich zu der Kontrollgruppe: hier ist eine Erhöhung des Ödemisierungsgrades bei den mit HU210 und Cerulein behandelten Tieren im Vergleich zu der Cerulein-Kontrollgruppe sichtbar – ohne Signifikanz.

3.3.2 Histologie

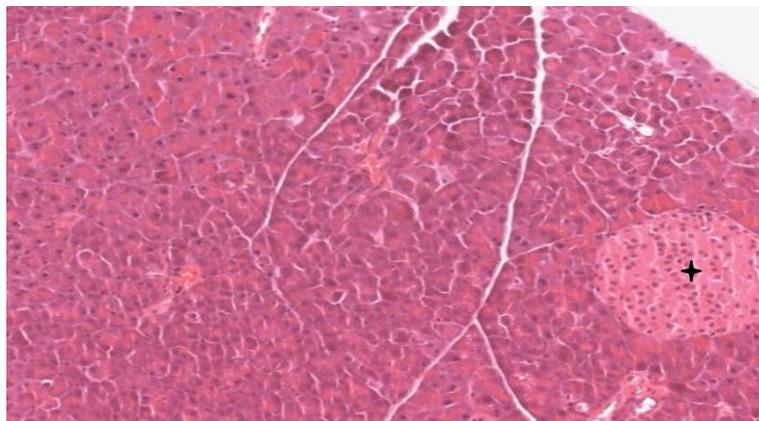


Foto 1: Pankreas einer mit NaCl behandelten Tiers. 1:200; + Langerhans'sche Insel

Der H/E-Schnitt eines mit 0,9% NaCl behandelten Kontrolltiers zeigt polare Azinuszellen mit apikalen azidophilen Sekretgranula. Weiter finden sich Fibrozyten sowie eingebettete Gefäß-/Nervenstraßen. Insgesamt zeigen sich intakte Zellverbände, keine Ödemisierung des Gewebes und keine Invasion von Granulozyten. Nekrosen sind nicht sichtbar.

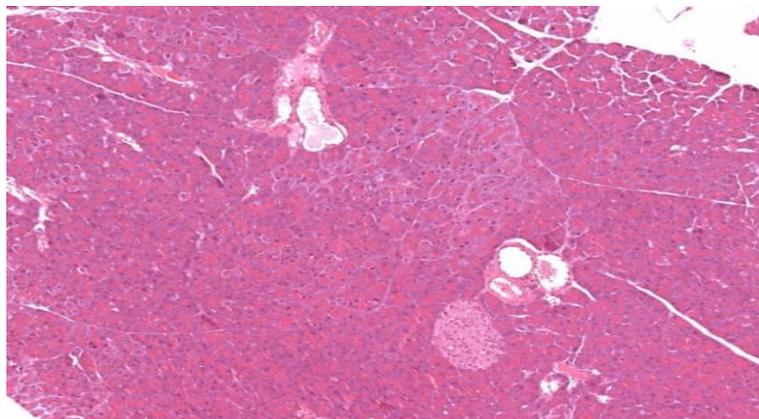


Foto 2: Pankreas eines mit HU210 behandelten Tiers. 1:200

Foto 2 zeigt ein histologisches Präparat eines mit HU210 behandelten Tiers. Hier finden sich ebenso physiologische Gewebeverhältnisse ohne Ödemisierung des Gewebes, ohne Invasion von Granulozyten, ohne Nekrosen.

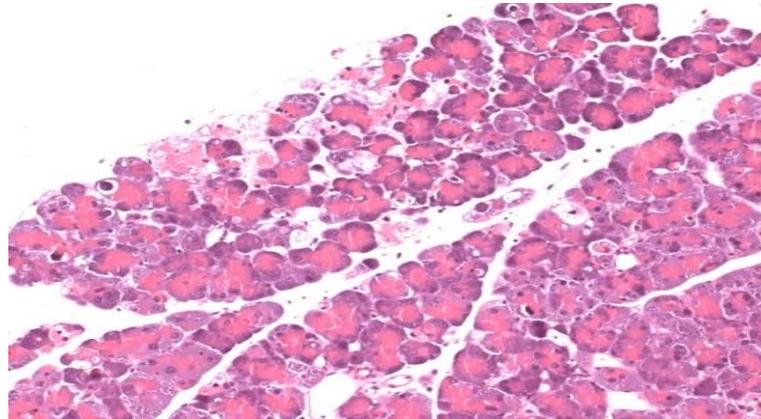


Foto 3: Pankreas eines mit Cerulein behandelten Tieres. 1:200

Foto 3 zeigt ein Gewebeschnitt eines mit Cerulein stimulierten Tieres. Hier findet sich das Bild einer akuten Pankreatitis. Neben einer aufgelockerten Gewebestruktur – Ödemisierung – sind vereinzelt Nekrosen sichtbar. Außerdem kommt es zu einer Auftreibung der Azini durch intraazinäre Vakuolisierung sowie zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten.

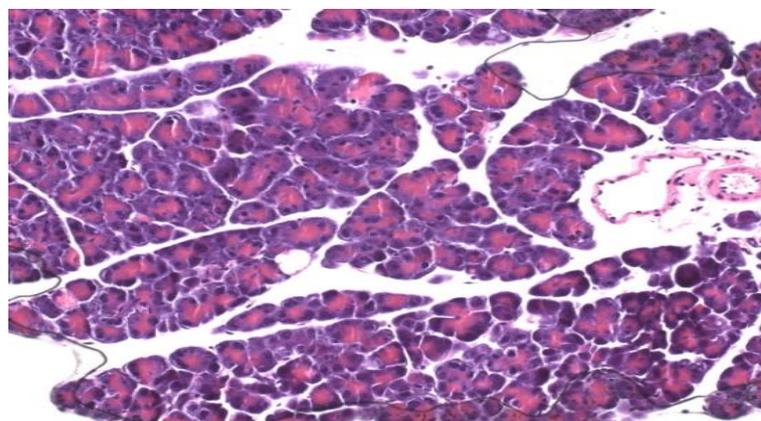


Foto 4: Pankreas eines mit HU210 und Cerulein behandelten Tieres. 1:200

Foto 4 zeigt ein Gewebeschnitt eines mit HU210 und Cerulein kombiniert behandelten Tieres. Hier finden sich Zeichen einer akuten Entzündungsreaktion. Allerdings finden sich weniger Gewebeödem, eine abgeschwächte azinäre Vakuolisierung, weniger Einwanderung von Granulozyten und insbesondere kaum Nekrosen im Vergleich zu mit Cerulein stimulierten Tieren ohne Cannabinoid-Protektion.

3.4 Ergebnisse der intrazellulären Signalweg-Forschung

In dieser Arbeit wurde auch untersucht, über welche intrazellulären Signalwege die Transduktion einer möglichen Protektion durch HU210 stattfindet.

Die intrazellulären Untersuchungen wurden fokussiert auf Kinasen und Signalwege, von denen bereits bekannt ist, dass sie entweder generell an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Inflammation beteiligt sind, oder von denen bekannt ist, dass sie die Wirkung von Stoffen am CB1-Rezeptor intrazellulär vermitteln (1.5). Daher wurde Pankreasgewebe auf die MAPK p38, p44/42 und JNK, sowie deren aktivierte – phosphorylierte – Formen P-p38, P-p44/42 und P-JNK untersucht (1.5).

Pankreaslysate wurden hergestellt, die Proteine elektrophoretisch getrennt und mittels Western-Blotting untersucht (2.5.1). Die Gele wurden mit Proben von Tieren beladen, die mit NaCl, HU210 oder AM281 alleine behandelt wurden oder mit Cerulein stimuliert wurden. Außerdem wurden Proben von Tieren verwendet, die Kombinationen aus CB1-Rezeptor-Liganden und Cerulein erhielten.

Um die der Blots nach Entwicklung der Membranen zu objektivieren, wurde die Pixelzahl der einzelnen Blots computeranalytisch gemessen (2.5.2) und die Werte gepoolt.

3.4.1 Phosphorylierung von p38

Die Untersuchungen von Phospho-p38 und p38 erfolgten in 10%igen Acrylamid-Gelen. Es wurden jeweils 20µg Protein pro Tasche aufgetragen. Die Antikörperkonzentrationen betragen bei dem Erstantikörper 1:500 und bei dem Zweitantikörper 1:5000 (Anti-Rabbit-IgG).

3.4.1.1 Phosphorylierung von p38 bei Wildtyptieren

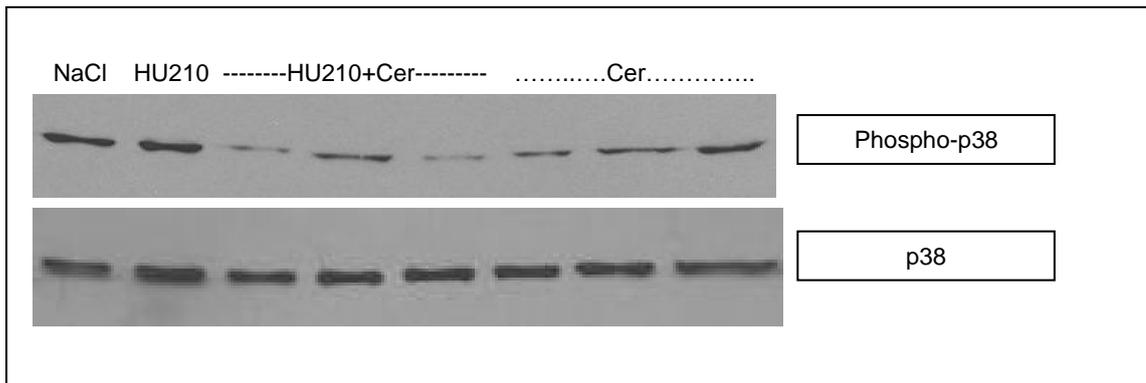


Abb. 8: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der MAPK p38 nach Behandlung mit NaCl, HU210, Cerulein (Cer) oder der Kombination aus HU210 und Cerulein bei Wildtyptieren. Antikörperkonzentration: Pp38=1:500; p38=1:1.000

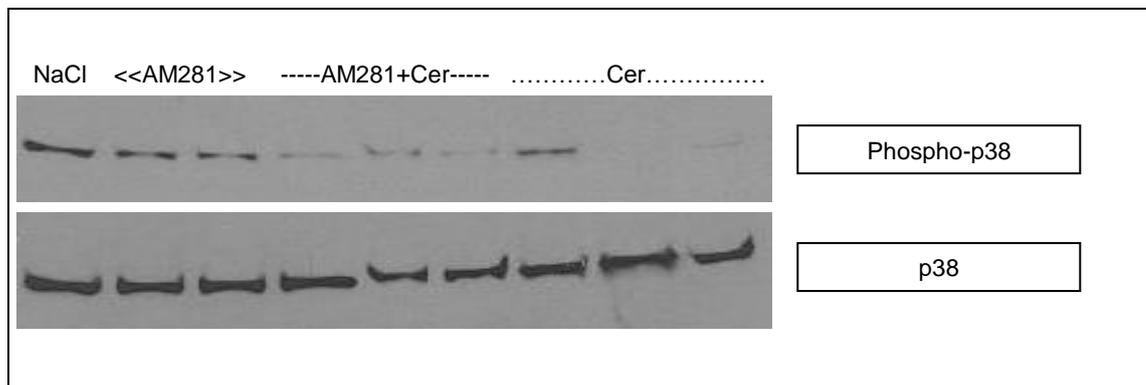


Abb. 9: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der MAPK p38 nach Behandlung mit NaCl, AM281, Cerulein (Cer) oder der Kombination aus AM281 und Cerulein bei Wildtyptieren. Antikörperkonzentration: Pp38=1:500; p38=1:1.000

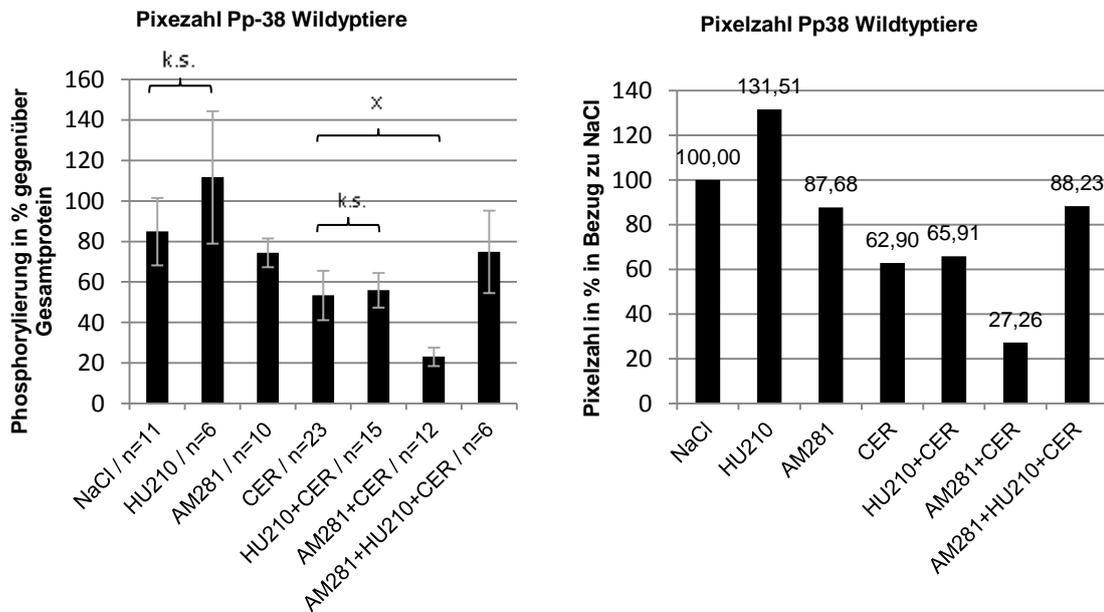


Abb. 10: Pixelzahl (Pooldaten) von Western-Blots mit Phospho-p38-Antikörper in Relation zu Blots mit p38-Antikörper und bezogen auf die Pixelzahlen der NaCl-Behandlungsgruppe (NaCl=100%). k.s.=keine Signifikanz, x= $p < 0,05$

Die exemplarisch dargestellten Abbildungen der Blots, sowie die Messungen der Pixelzahlen zeigen, dass die MAPK p38 bei Wildtyptieren tendenziell stärker phosphoryliert wird nach alleiniger Gabe von HU210 im Vergleich zu der NaCl-Kontrolle (HU210=131,5% des Wertes der mit NaCl behandelten Tiere, $p=0,427$). Die Vorbehandlung mit HU210 führt gegenüber der alleinigen Stimulation mit CER zu einer nicht signifikanten, milden Erhöhung der Phosphorylierung (HU210+CER = 65,9% vs. CER = 62,9% gegenüber der NaCl-Kontrolle, $p=0,864$).

Alle anderen Behandlungen der Versuchstiere führen zu einem Absinken der Phosphorylierung gegenüber der Referenzbehandlung mit Kochsalz (NaCl=100%). Die Behandlung der Tiere mit AM281 und Cerulein führt zu signifikant niedrigeren Phosphorylierungsraten (27,3% des Wertes der mit NaCl behandelten Tiere, $p=0,025$).

3.4.1.2 Phosphorylierung von p38 bei CB1^{-/-} Tieren

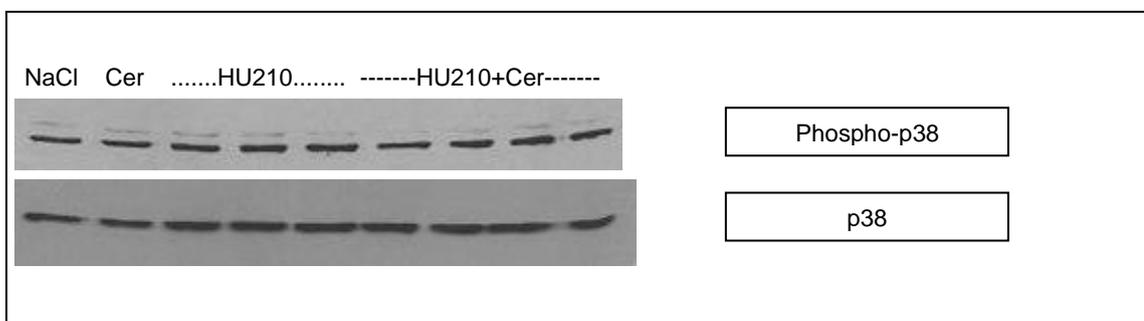


Abb. 11: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der MAPK p38 nach Behandlung mit NaCl, HU210, Cerulein (Cer) oder der Kombination aus HU210 und Cerulein bei CB1^{-/-} Tieren. Antikörperkonzentration: Pp38=1:500; p38=1:1.000

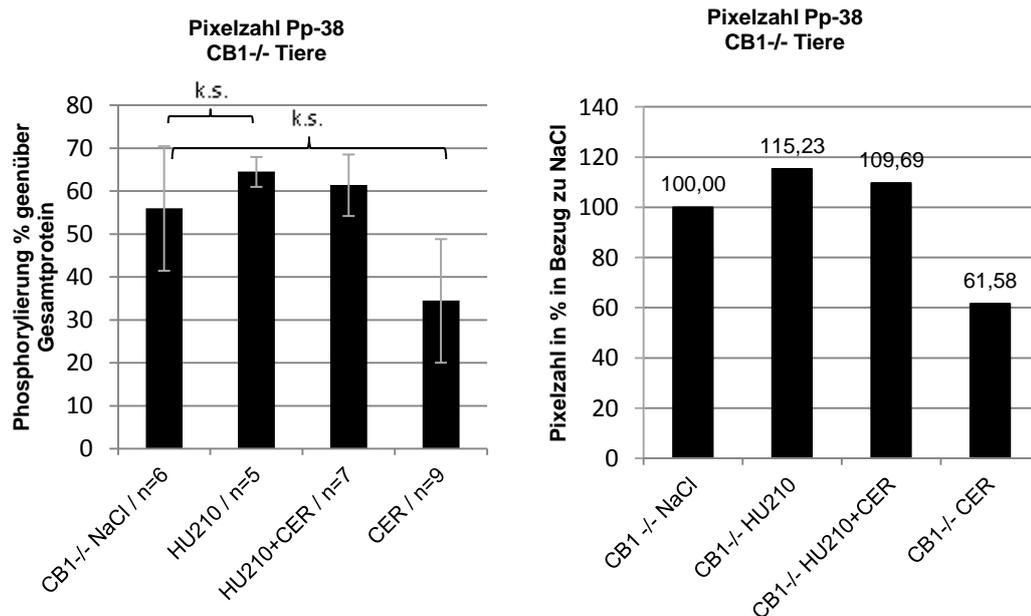


Abb. 12: Pixelzahl (Pooldaten) von Western-Blots mit Phospho-p38-Antikörper in Relation zu Blots mit p38-Antikörper und bezogen auf die Pixelzahlen der NaCl-Behandlungsgruppe (NaCl=100%). k.s.=keine Signifikanz.

Die Messungen der Pixelzahlen zeigen, dass p38 bei CB1-/- Tieren tendenziell vermehrt phosphoryliert wird bei alleiniger Gabe von HU210 (Pixelzahl der Blots 115,2% des Wertes der mit NaCl behandelten Tiere). Eine Signifikanz besteht nicht ($p=0,59$).

Auch bei Kombinationsbehandlung mit HU210 und Cerulein zeigt sich eine leicht gesteigerte Phosphorylierung im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (109,7%). Die alleinige Stimulation mit Cerulein führt zu einer Minderphosphorylierung von fast 40% gegenüber der NaCl-Kontrolle (CER: 61,6% vs. NaCl=100%). Eine Signifikanz besteht nicht ($p=0,331$).

3.4.2 Phosphorylierung von JNK

Die Untersuchungen von Phospho-JNK und JNK erfolgten in 10%igen Acrylamid-Gelen. Es wurden jeweils 20 μg Protein pro Tasche aufgetragen. Die Antikörperkonzentrationen betragen bei dem Erstantikörper 1:500 und bei dem Zweitantikörper 1:5000 (Anti-Rabbit-IgG).

3.4.2.1 Phosphorylierung von JNK bei Wildtyptieren

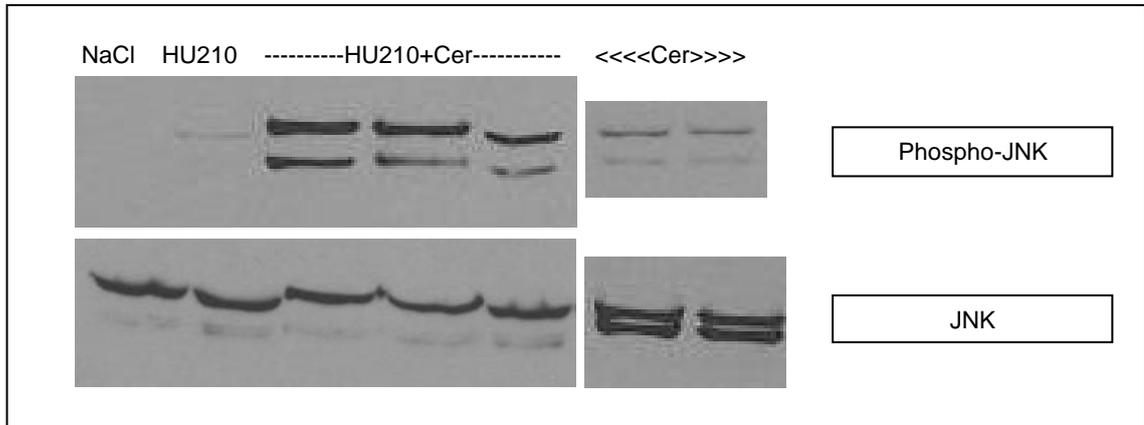


Abb. 13: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der SAPK JNK nach Behandlung mit NaCl, HU210, oder der Kombination aus HU210 und Cerulein bei Wildtyptieren. Antikörperkonzentration: PJNK=1:500; JNK=1:1.000

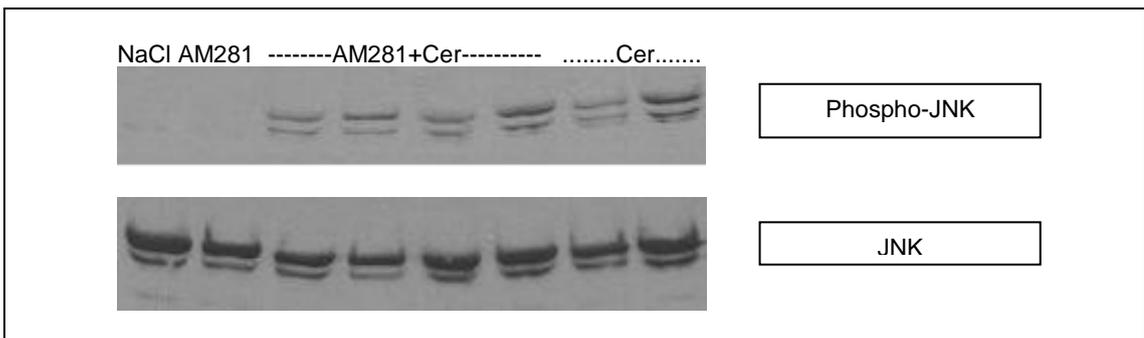


Abb. 14: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der SAPK JNK nach Behandlung mit NaCl, AM281, Cerulein (Cer) oder der Kombination aus AM281 und Cerulein bei Wildtyptieren. Antikörperkonzentration: PJNK=1:500; JNK=1:1.000

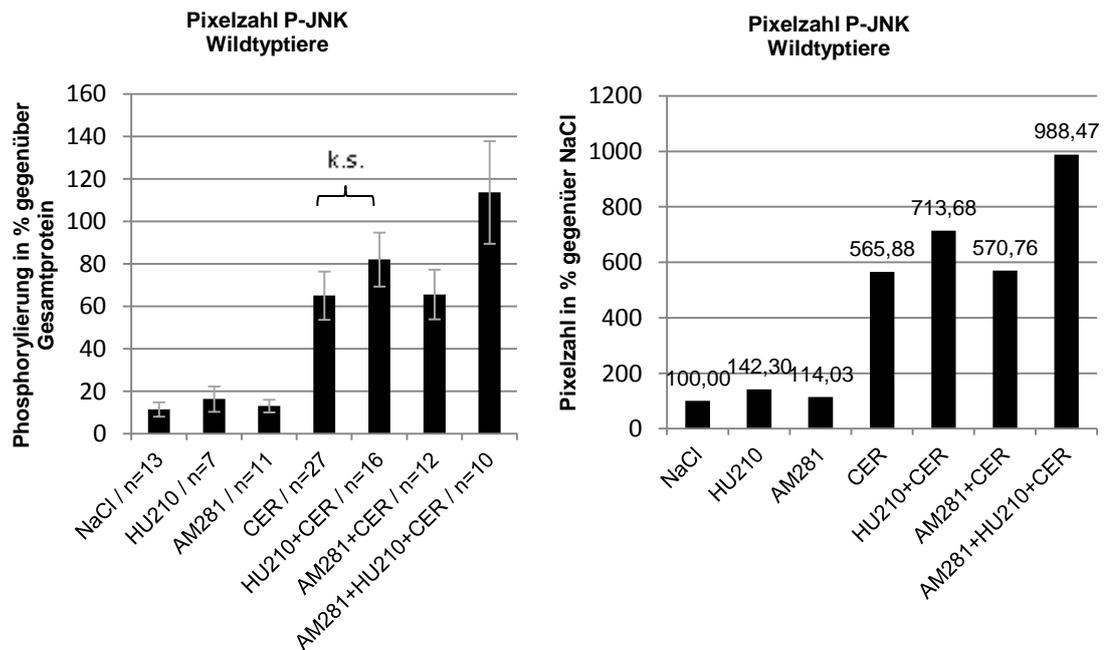


Abb. 15: Pixelzahl (Pooldaten) von Western-Blots mit Phospho-JNK-Antikörper in Relation zu Blots mit JNK-Antikörper und bezogen auf die Pixelzahlen der NaCl-Behandlungsgruppe (NaCl=100%). k.s.=keine Signifikanz

Die exemplarisch dargestellten Blots sowie die Messungen der Pixelzahlen zeigen, dass die alleinige Behandlung von Tieren mit NaCl, HU210 oder AM281 zu ähnlichen Phosphorylierungswerten führt (AM281=114% der Referenz, $p=0,728$. HU210=142,3% der Referenz, $p=0,451$).

Die Stimulation mit Cerulein führt zu einer verstärkten Phosphorylierung. Es zeigt sich kaum ein Unterschied im Ergebnis bei den mit Cerulein alleine stimulierten Tieren und den mit AM281 und Cerulein behandelten Tieren (565,9% bzw. 570,% der Referenz). Die Behandlung mit AM281, HU210 und Cerulein führt zu der höchsten Phosphorylierungsrate (988,47% im Vergleich zu der Kochsalz-Kontrolle).

Eine nicht signifikante Steigerung des Phosphorylierungsgrades gegenüber des Wertes der mit Cerulein alleine behandelten Tiere ist durch die Vorbehandlung mit HU210 vor Cerulein-Stimulation zu verzeichnen (HU210+CER=713,7% vs. CER=565,88% gegenüber der NaCl-Referenz, $p=0,34$).

3.4.2.2 Phosphorylierung von JNK bei CB1^{-/-} Tieren

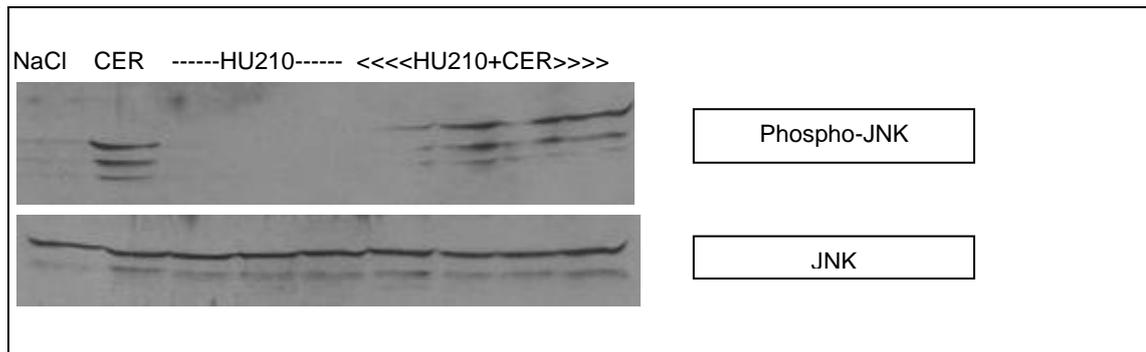


Abb. 16: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der SAPK JNK nach Behandlung mit NaCl, HU210, oder der Kombination aus HU210 und Cerulein bei CB1^{-/-} Tieren. Antikörperkonzentration: P-JNK=1:500; JNK=1:1.000

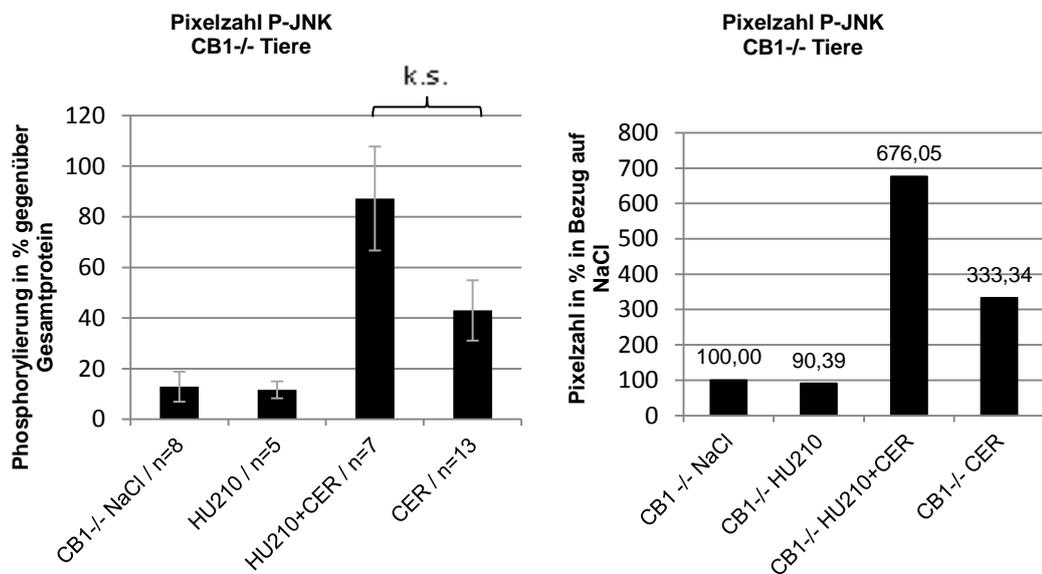


Abb. 17: Pixelzahl (Pooldaten) von Western-Blots mit Phospho-JNK-Antikörper in Relation zu Blots mit JNK-Antikörper und bezogen auf die Pixelzahlen der NaCl-Behandlungsgruppe (NaCl=100%). k.s.=keine Signifikanz.

Bei Messungen der Pixelzahlen der CB1^{-/-} Tiere zeigen sich ähnliche Werte für die mit HU210 und mit NaCl behandelten Tiere (HU210=90% vs. NaCl=100%).

Eine Steigerung des Aktivitätsgrades der JNK ist nach Behandlung mit Cerulein alleine und vor allem nach Kombinationsbehandlung mit HU210 und Cerulein zu beobachten (CER=333%, HU210+CER=676% des Aktivitätsgrades der NaCl-Kontrolle). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist knapp nicht signifikant ($p=0,06$).

3.4.3 Phosphorylierung von p44/42

Die Untersuchungen von Phospho-p44/42 und p44/42 erfolgten in 10%igen Acrylamid-Gelen. Es wurden jeweils 20 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Die Antikörper-Konzentrationen betragen bei dem Erstantikörper 1:1000 und bei dem Zweitantikörper 1:5000 (Anti-Mouse-IgG).

3.4.3.1 Phosphorylierung von p44/42 bei Wildtyptieren

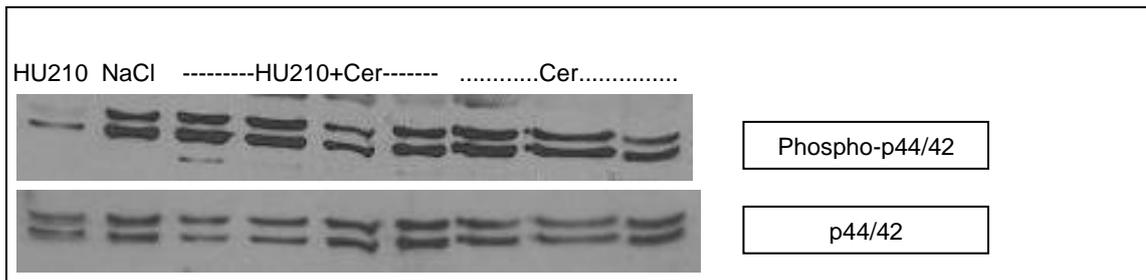


Abb. 18: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der MAPK p44/42 nach Behandlung mit NaCl, HU210 und Cerulein (Cer), oder der Kombination aus HU210 und Cerulein bei Wildtyptieren. Antikörperkonzentration: Pp44/42=1:500; p44/42=1:1.000

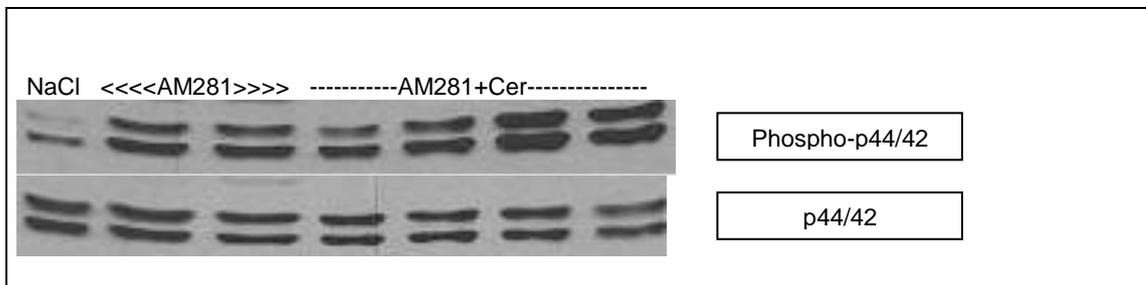


Abb. 19: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der MAPK p44/42 nach Behandlung mit NaCl, AM281 und Cerulein (Cer), oder der Kombination aus AM281 und Cerulein bei Wildtyptieren. Antikörperkonzentration: Pp44/42=1:500; p44/42=1:1.000

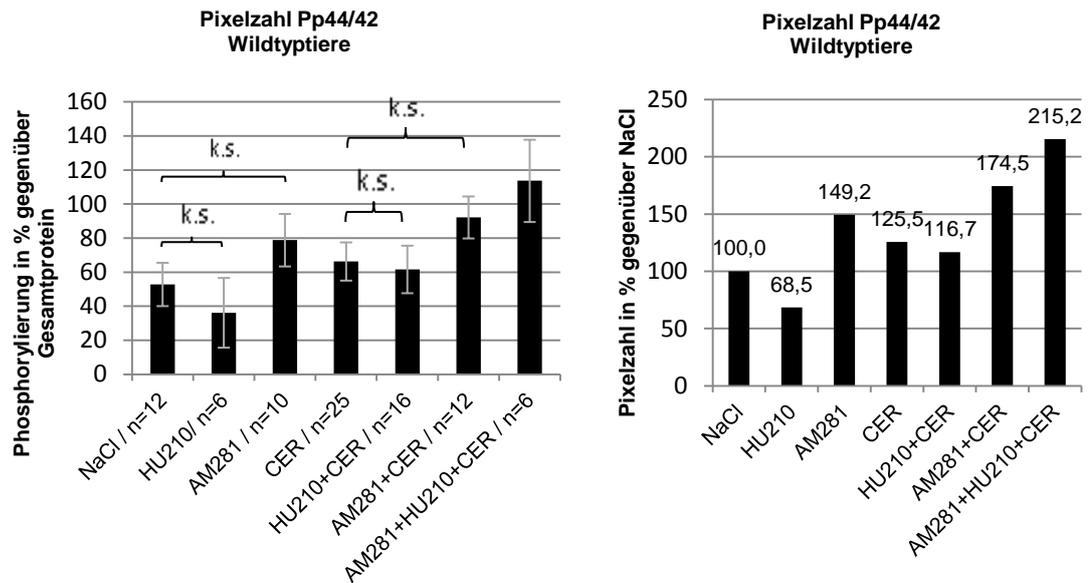


Abb. 20: Pixelzahl (Pooldaten) von Western-Blots mit Phospho-p44/42-Antikörper in Relation zu Blots mit p44/42-Antikörper und bezogen auf die Pixelzahlen der NaCl-Behandlungsgruppe (NaCl=100%). k.s.= keine Signifikanz

Die exemplarisch dargestellten Blots sowie die Messungen der Pixelstärke zeigen bei allen mit Cerulein behandelten Tieren eine verstärkte Phosphorylierung (HU210+CER=116,7% der Referenz, CER=125,5% der Referenz, AM281+CER=175,5% der Referenz, AM281+HU210+CER=215,2% der Referenz).

Die alleinige Gabe von HU210 löst eine tendenziell verminderte Phosphorylierung aus (68,5% des Referenzwertes, $p=0,48$).

Die alleinige Gabe von AM281 verursacht eine tendenziell stärkere Phosphorylierung (149,2% des Referenzwertes, $p=0,204$).

Die Gruppe der mit HU210 und Cerulein stimulierten Tiere zeigt eine nicht signifikante Senkung des Phosphorylierungsgrades im Vergleich zu der Cerulein-Gruppe (HU210+CER=116,7%, CER=125,5%, $p=0,794$).

Die stärkste Phosphorylierung findet sich mit 174,5% des Referenzwertes bei der Gruppe der mit AM281 und Cerulein behandelten Tiere. Diese Steigerung gegenüber der Cerulein-Gruppe (=125,5%) ist nicht signifikant ($p=0,166$).

3.4.3.2 Phosphorylierung von p44/42 bei CB1^{-/-} Tieren

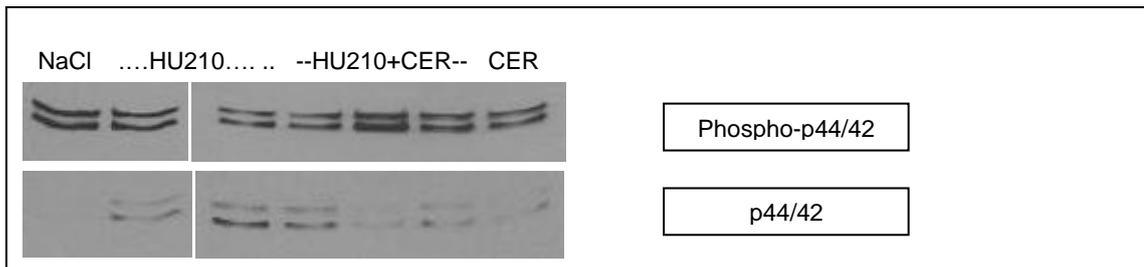


Abb. 21: Darstellung des Phosphorylierungs-Grades der MAPK p44/42 nach Behandlung mit NaCl, HU210 und Cerulein (Cer), oder der Kombination aus HU210 und Cerulein bei CB1^{-/-} Tieren. Antikörperkonzentration: Pp44/42=1:500; p44/42=1:1.000

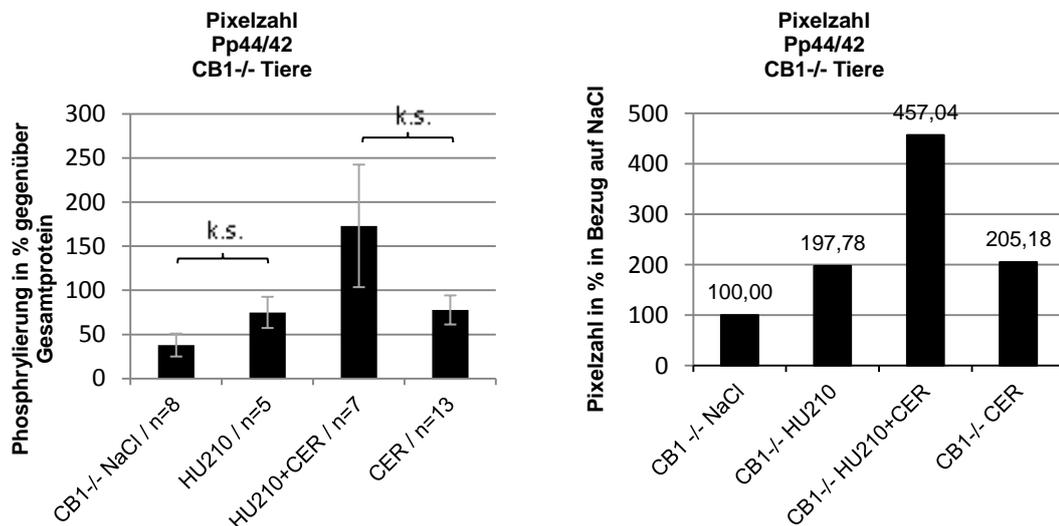


Abb. 22: Pixelzahl (Pooldaten) von Western-Blots mit Phospho-p44/42-Antikörper in Relation zu Blots mit p44/42-Antikörper und bezogen auf die Pixelzahlen der NaCl-Behandlungsgruppe (NaCl=100%). k.s.=keine Signifikanz.

Jede Behandlung steigert die Aktivitätsgrade von p44/42 im Vergleich zu der NaCl-Kontrolle (=100%). Die Behandlung mit HU210 alleine und Cerulein alleine aktiviert p44/42 auf ein ähnliche hohes Niveau (HU210=198% vs. CER=205%). Diese Anstiege gegenüber der Kontrolle sind nicht signifikant ($p=0,114$ vs. $p=0,073$). Die Kombinationsbehandlung aus HU210 und Cerulein steigert die Phosphorylierung von p44/42 um 457% im Vergleich zu der NaCl-Kontrollgruppe ($p=0,1$). Die Steigerung gegenüber der Cerulein-Gruppe ist nicht signifikant ($p=0,226$).

4. Diskussion

4.1 Der CB1-Rezeptor-Nachweis

Der CB1-Rezeptor konnte bereits sowohl beim Menschen als auch beim Tier in verschiedenen Organgeweben nachgewiesen werden: nachgenannte Gruppen bewiesen den CB1-Rezeptor in humanen Gewebeproben verschiedenen Ursprungs (Gerard, Mollereau et al. 1990; Gerard, Mollereau et al. 1991; Schuel, Chang et al. 1991; Sugiura, Kondo et al. 1996; Bermudez-Silva, Suarez et al. 2008).

In tierischen Gewebeproben wurde der CB1-Rezeptor durch Chakrabarti et al., Casu et al. und Juan-Pico et al. nachgewiesen (Chakrabarti, Onaivi et al. 1995; Casu, Porcella et al. 2003; Juan-Pico, Fuentes et al. 2006).

In dieser Arbeit werden verschiedene Gewebe mittels PCR, Western Blotting, Immunpräzipitation und Immunhistochemie auf das Vorhandensein des CB1-Rezeptors untersucht.

Das Vorhandensein des CB1-Rezeptors kann erstmals sowohl in exokrinen Azinuszellen der Maus als auch des Menschen gezeigt werden. Außerdem kann der CB1-Rezeptor in dieser Arbeit in humanem Pankreasgewebe nachgewiesen werden, und zwar in Pankreasproben physiologischer Art, sowie in Pankreaskarzinomgewebe (Abb. 5, 3.1).

Die Expression des CB1-Rezeptors kann in verschiedenen Geweben der Versuchstiere gezeigt werden: Hirn, Pankreas, Colon, Leber und Niere. Eine starke Expression findet sich in der PCR-Bande von Hirngewebe (Abb. 4, 3.1). Dies deckt sich mit der Literatur, wo beschrieben ist, dass der CB1-Rezeptor vermehrt in neuronalem Gewebe vorhanden ist und hier die neurotrope Wirkung von Cannabinoiden vermittelt (Howlett, Blume et al. 2010).

4.2 Die protektive Wirkung von Cannabinoiden auf die Pankreatitis

Können Cannabinoide Substanzen die Ausprägung einer Pankreatitis mildern? Aus Jahrtausende alter klinischer Praxis ist bekannt, dass Cannabinoide antiinflammatorisch und analgetisch wirken (Zuardi 2006). Diese Stoffe sind jedoch

auch in jüngerer Zeit intensiv mit modernen Mitteln erforscht worden um der alten klinischen Erfahrung ein wissenschaftliches Korrelat zu geben.

Es wurde nachgewiesen, dass Cannabinoide positive Wirkungen auf die Nozizeption haben, dass sie Allodynie und Hyperalgesie mindern (Richardson, Kilo et al. 1998), gastrale Ulcera verhindern können (Germano, D'Angelo et al. 2001) und antinekrotisch auf Myokardgewebe wirken (Ugdyzhekova, Krylatov et al. 2002). Des Weiteren wurde eine positive Wirkung auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen nachgewiesen (Massa, Marsicano et al. 2004).

Die protektive Wirkung von Cannabinoiden auf die Pankreatitis im Speziellen ist weniger gut erforscht und die erzielten Ergebnisse sind widersprüchlich.

Dembinski et al. zeigten in einer Studie eine positive Wirkung von CB1-Rezeptor-Agonisten auf Magenläsionen und auf IL-1-Konzentrationen im Serum, fanden aber gleichzeitig heraus, dass sich die Wirkung von Cannabinoiden auf die Pankreatitis genau umgekehrt verhielt – es zeigte sich eine Aggravierung der Befunde.

Die Behandlung mit dem CB1-Rezeptor-Antagonisten AM251 führte hingegen zu einer Reduktion der histologischen Organschäden. Die Behandlung mit CB1-Rezeptor-Agonisten bewirkte eine Verstärkung des intrapankreatischen Zellödems und der Einwanderung von immunkompetenten Zellen (Dembinski, Warzecha et al. 2006).

Auch Matsuda et al. fanden bei ihren Untersuchungen heraus, dass die Behandlung mit dem CB1-Rezeptor-Antagonisten AM251 die Schwere der Cerulein-induzierten Pankreatitis milderte (Matsuda, Mikami et al. 2005). Dieses Ergebnis wurde 2008 von Dembinski et al. einerseits erneut bestätigt und andererseits gleichzeitig eingeschränkt: Cannabinoide, die vor Induktion der Pankreatitis gegeben wurden wirkten in dieser Studie nicht protektiv – Cannabinoide, die nach Induktion der Pankreatitis gegeben wurden hingegen schon (Dembinski, Warzecha et al. 2008).

Ergänzend zu diesen Ergebnissen gibt es klinische Einzelfallberichte, die vermuten lassen, dass der Konsum von Cannabis Pankreatitiden auslösen kann (Grant and Gandhi 2004; Wargo, Geveden et al. 2007).

Mukhopadhyay et al. bewiesen in einer Studie, dass die Behandlung mit dem Cannabonoid HU210 bei Mäusen, die bereits eine Doxorubicin (DOX)-induzierte Kardiomyopathie hatten, zu einer Aktivierung der MAPK-Signalwege (p38 und JNK) führte und dadurch pro-apoptotisch wirkte. Die Vorbehandlung mit dem CB1-Rezeptor-Antagonisten AM281 oder mit MAPK-Inhibitoren reduzierte die DOX-

induzierte Apoptose deutlich. In CB1-/- Tieren konnte zur Bestätigung dieser Ergebnisse eine geringere Ausprägung der Kardiomyopathie nach Stimulation mit HU210 festgestellt werden. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Kombinationsbehandlung aus DOX und HU210 zu der stärksten Kinasen-Induktion und zu der höchsten Apoptoserate führte (Mukhopadhyay, Rajesh et al. 2009).

Auch in dieser Studie wird kein protektiver Effekt durch die Cannabinoide am CB1-Rezeptor nachgewiesen.

Fraglich ist, inwieweit die Modelle der DOX-induzierten Kardiomyopathie und der Cerulein-induzierten Pankreatitis vergleichbar sind.

Andere Gruppen konnten hingegen eine deutlich protektive Wirkung der Cannabinoide nachweisen.

Michalski et al. bewiesen 2007 eine protektive Wirkung von HU210 auf die Cerulein-induzierte Pankreatitis (Michalski, Laukert et al. 2007). Inflammatorische Parameter wie Serumlipase, IL-6-Konzentration und die Morphologie des Pankreas bei der histopathologischen Begutachtung konnten durch die Präkonditionierung mit Cannabinoiden verbessert werden. Die protektiven Wirkungen von HU210 ließen sich durch die vorherige Antagonisierung des CB1-Rezeptors mit AM251 aufheben.

In der vorliegenden Arbeit wird zur Simulation der akuten Pankreatitis ein etabliertes, zuverlässiges Tiermodell gewählt (2.2). Die Pankreatitis wird mittels Überstimulation durch CCK ausgelöst (1.3). Als Cannabis-Rezeptor-Agonist wird HU210 verwendet, ein synthetisches Cannabinoid, welches eine geringe Rezeptorenspezifität hat und sowohl CB1-, als auch CB2-Rezeptoren, sowie mögliche weitere unbekannte Cannabinoid-Rezeptoren stimuliert (1.4.2).

Dabei werden Ergebnisse erhoben, die die oben genannten Resultate von Michalski et al. widerspiegeln.

Znächst zeigt sich, dass die Cerulein-induzierte Modell-Pankreatitis tatsächlich mit einer signifikanten Erhöhung fast aller Entzündungsparameter bei beiden Genotypen einhergeht.

In Bezug auf die protektive Wirkung von HU210 finden sich bei mit HU210 vorbehandelten Wildtypieren geringere Anstiege der Serumamylase, MPO, der Trypsinaktivität und der IL-6-Konzentration im Vergleich zu den mit Cerulein

stimulierten Kontrolltieren. Diese Absenkungen der Messwerte sind bei Serumamylase und MPO signifikant.

Eine alleinige HU210-Behandlung der Wildtypiere verursacht jedoch bei Serumamylase-, MPO-, und IL-6-Werten eine signifikante Erhöhung gegenüber der NaCl-Kontrolle. Die Werte sind generell niedriger als die der mit Cerulein stimulierten Kontrolltiere.

Zum Beweis der Wirkung von HU210 über den CB1-Rezeptor wurden zusätzlich CB1^{-/-} Tiere mit HU210 und Cerulein jeweils alleine sowie in Kombination behandelt. Die Cannabinoide dürften bei dieser Tiergruppe nach der Theorie keine Wirkung haben.

Die CB1^{-/-} Tiere zeigen – wie erwartet – keine Cannabinoid-Protektion in Bezug auf die Serumamylase, die Trypsinaktivität und die IL-6-Konzentration. Die Werte sind ähnlich hoch wie die der Cerulein-Kontrollgruppe.

Lediglich die MPO-Messwerte sind verringert bei HU210 und Cerulein-behandelten CB1^{-/-} Tieren im Vergleich zu der Cerulein-Kontrolle. Eine Signifikanz besteht nicht.

Nebenbei zeigt sich auch bei den CB1^{-/-} Tieren eine signifikante Steigerung der Trypsin-, und IL-6-Werte durch alleinige HU210-Behandlung gegenüber den NaCl-Kontrollen.

Die beobachteten Steigerungen der Messwerte durch alleinige HU210-Behandlung bei beiden Genotypen sowie die Verminderung der MPO-Werte bei unter Cannabinoid-Protektion stimulierten CB1^{-/-} Tieren ist erklärbar. HU210 ist ein unspezifischer Rezeptor-Agonist und könnte sowohl über den CB1-Rezeptor wie auch über den CB2-Rezeptor oder weitere Rezeptoren Einfluß auf die Messwerte nehmen. Diese Theorie wurde bereits in der Literatur beschrieben. In einer Arbeit von Munro et al. bewirkte HU210 eine Veränderung von Messwerten über die Bindung an den CB2-Rezeptor immunkompetenter Zellen (Munro, Thomas et al. 1993; Storr, Keenan et al. 2009).

Außerdem ist die Anzahl der behandelten CB1^{-/-}-Tiere in den einzelnen Behandlungsgruppen in der vorliegenden Arbeit gering (2.2.1). Einzelne abweichende Messwerte schlagen sich stärker bei der Poolung der Daten nieder.

Zum Beweis der Wirkung von HU210 am CB1-Rezeptor werden die CB1-Rezeptoren bei einigen Tieren vor Gabe von HU210 mit dem CB1-Rezeptor-selektiven

Antagonisten AM281 blockiert. Die CB1-Rezeptoren-Selektivität von AM281 ist konzeptionell bedingt und nachgewiesen (Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1994; Gifford, Tang et al. 1997; Landsman, Burkey et al. 1997; Gatley, Lan et al. 1998; Cosenza, Gifford et al. 2000).

Erwartet wird also, dass HU210 bei den antagonisierten Tieren keine Wirkung zeigt. Die Blockade der Cannabinoid-Wirkung durch Behandlung mit AM281 gelingt in Bezug auf die Serumamylase und auf die Trypsinaktivität. Diese Werte werden nicht abgesenkt durch eine Gabe von AM281, HU210 und Cerulein im Vergleich zur Cerulein-Kontrolle. Bei den IL-6-, und MPO-Werten kann eine leichte Absenkung der Werte gegenüber der Cerulein-Kontrolle gemessen werden (nicht signifikant).

Diese Ergebnisse sind erklärbar: durch eine unspezifische Wirkung von HU210 an CB1-, und CB2- (und/oder weiteren) Rezeptoren. Die CB2-Rezeptoren-Aktivierung durch HU210 ist bekannt (Munro, Thomas et al. 1993; Storr, Keenan et al. 2009).

Die Kombinationsbehandlung aus AM281 und Cerulein stellt theoriegemäß den größten Zellstress dar. Diese Behandlung führt jedoch teilweise zu einer Absenkung der Messwerte. Die Werte der MPO- und IL-6-Konzentrationen sinken im Vergleich zu der Cerulein-Kontrolle signifikant. Hier wirkt AM281 protektiv.

Dies entspricht in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen. Es wurden bereits Studien genannt, welche eine Protektion durch einen CB1-spezifischen Antagonisten zeigten (Matsuda, Mikami et al. 2005; Dembinski, Warzecha et al. 2006; Mukhopadhyay, Rajesh et al. 2009).

Die Gruppe der nur mit AM281 behandelten Tiere besteht lediglich aus 13 Tieren, während es 30 mit Cerulein stimulierte Kontrolltiere gibt. Einzelne Messwerte haben einen größeren Einfluß auf die Höhe der gepoolten Werte.

Für alle Messwerte gilt, dass sie bei in vivo-Versuchen Schwankungen unterliegen. Obwohl die Grundvoraussetzungen für eine gleiche Behandlung aller Tiere geschaffen wurden, sind die Messwerte abhängig von der individuellen Konstitution der Tiere. Schon kleinste Einflussgrößen (ein unerkannter Infekt eines Tieres oder ein erhöhtes Stressniveau) können Messwerte verfälschen. Diese Variablen sind im Tierversuch nicht vollständig kontrollierbar.

Es wird klar, dass die Betrachtung der eigenen Ergebnisse nicht vollständig klären kann, ob die Cannabinoide nun protektiv auf die Pankreatitis beziehungsweise auf Inflammation allgemein wirken oder nicht. Für die wichtigen Parameter Zellmorphologie, Amylase und MPO-Aktivität konnte allerdings ein protektiver Effekt gezeigt werden.

Betrachtet man den aktuellen Forschungsstand in Bezug auf die Wirkung der Cannabinoide generell, stellt man Uneinigkeit fest. Ein Blick in die Literatur der jüngsten Krebsforschung zeigt, dass völlig konträre Ergebnisse bezüglich der Cannabinoid-Wirkung publiziert werden. Einerseits wird gesagt, Cannabinoide hemmen die Tumorzellinvasion (Ramer and Hinz 2008; Qamri, Preet et al. 2009). Andere Gruppen publizieren zeitgleich, dass Rimonabant[®] – ein CB1-Rezeptor-Antagonist – antitumoröse Eigenschaften habe (Santoro, Pisanti et al. 2009).

4.3 Die intrazellulären Signalwege bei der Cannabinoid-Protektion

Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Inflammation und der Aktivierung von intrazellulären Signalwegen wurden ausgiebig angestellt. Auch der Zusammenhang zwischen Pankreatitis und der Aktivierung der drei in dieser Arbeit untersuchten Kinasen – p38, p44/42 und Erk1/Erk2 – wurde nachgewiesen (1.5).

Viel weniger ist bekannt, inwiefern diese Kinase-Kaskaden bei Inflammation unter vorheriger Cannabinoid-Protektion (beispielsweise mit HU210) aktiviert oder inaktiviert werden. Untersuchungen der intrazellulären Signaltransduktion im Zusammenhang mit akuter Pankreatitis unter Cannabinoid-Protektion gab es bisher nicht.

Bekannt ist, dass die in dieser Arbeit untersuchten Kinasen nicht nur durch Inflammation aktiviert, sondern auch durch die Bindung von Cannabinoiden an den jeweiligen Rezeptoren vermehrt phosphoryliert werden. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten dies, wie bereits geschildert (1.5.4), nachweisen (Bouaboula, Poinot-Chazel et al. 1995; Rueda, Galve-Roperh et al. 2000; Derkinderen, Ledent et al. 2001; Derkinderen, Valjent et al. 2003; Rubino, Forlani et al. 2004).

Allerdings existieren die bereits zuvor genannten Ergebnisse der Forschungsgruppe um Mukhopadhyay, die den Zusammenhang von intrazellulärer Signaltransduktion unter Cannabinoid-Protektion mit HU210 im Rahmen der Doxorubicin (DOX)-induzierten Kardiomyopathie untersucht hat. Die Gruppe fand heraus, dass die

Präkonditionierung mit HU210 von Mäusen, bei denen zuvor mittels DOX-Behandlung eine Kardiomyopathie ausgelöst wurde, zu einer Aktivierung der MAPK-Signalwege (speziell p38 und JNK) führte und so letzten Endes pro-apoptotisch wirkte. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Kombinationsbehandlung aus DOX und HU210 zu der stärksten Kinasen-Induktion und zu der höchsten Apoptoserate führte (Mukhopadhyay, Rajesh et al. 2009).

Eine protektive p38-vermittelte Wirkung von Cannabidiol wird in einer Studie über die Lipopolysaccharid-induzierte Uveitis beschrieben. Cannabidiol konnte die Aktivierung von p38 verhindern und so die durch p38 aktivierte Produktion von TNF- α vermindern (El-Remessy, Tang et al. 2008).

In der Literatur finden sich also widersprüchliche Aussagen über die protektiven Wirkungen von Cannabinoiden in Bezug auf intrazelluläre Signalwege. Außerdem sind die Studien in verschiedenen Settings in verschiedenen Organsystemen durchgeführt worden und es bleibt fraglich, inwiefern sie vergleichbar sind.

Die widersprüchlichen Literaturaussagen werden durch die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse teilweise wiedergespiegelt.

4.3.1 Auswirkungen auf p38

Auffallend ist die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 bei Wildtypen nach alleiniger Behandlung mit HU210. Bei allen anderen Behandlungsformen der Wildtypen sind im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe geringere Aktivitätsgrade von p38 festzustellen.

Ginge man davon aus, p38 würde bei Inflammation vermehrt phosphoryliert, sind die gewonnenen Ergebnisse unverständlich: die Behandlung mit HU210 führt zu den höchsten p38-Aktivierungsraten. Die Behandlung, die mutmaßlich am wenigsten protektiv, oder sogar am zelltoxischsten sein müsste, nämlich die Behandlung mit AM281 und Cerulein in Kombination, führt zu einer signifikant verringerten Phosphorylierung von p38 gegenüber der Cerulein-Kontrolle.

Bei den CB1^{-/-} Tieren führt die alleinige Behandlung mit HU210 zu einer Steigerung der Phosphorylierung von p38, die geringsten Werte finden sich bei der Cerulein-Kontrollgruppe. Signifikanzen liegen nicht vor. Am Ehesten kommt es hier zu einer Cannabinoid-induzierten Aktivierung von p38 über andere Signalwege. Auf Grund des

Vorliegens verschiedener p38-Isoformen mag in Bezug auf beide Genotypen eine potektive nicht von einer destruktiven p38-Wirkung unterschieden werden.

4.3.2 Auswirkungen auf JNK

Bei der Aktivierung der JNK zeigt sich eine nicht signifikant stärkere Phosphorylierung durch die Behandlung mit HU210 und Cerulein gegenüber der Cerulein-Kontrolle. Außerdem zeigt sich eine starke Phosphorylierung der JNK durch alleinige Stimulation mit Cerulein gegenüber der NaCl-Kontrolle sowie durch die Kombinationsbehandlung aus AM281 und Cerulein. Eine verstärkte Phosphorylierung der mit Cerulein stimulierten Tieren beruht auf der Aktivierung der Kinasen im Rahmen der Entzündungsreaktion. Die Vorbehandlung mit AM281 ändert an dieser Aktivierung nichts.

Ginge man davon aus, die Vorbehandlung mit HU210 senke den Aktivierungsgrad der JNK gemäß der Annahme Cannabinoide wirkten protektiv, dann ist unklar, warum die Phosphorylierung durch die Präkonditionierung mit HU210 vor Stimulation mit Cerulein ansteigt.

Es wurde allerdings beschrieben, dass die JNK durch Cannabinoide aktiviert werden kann (1.5). Es ist hier nicht differenzierbar, wer die starke Phosphorylierung der Kinase veranlasst hat: HU210 oder die Entzündungsreaktion im Rahmen der Pankreatitis.

Bei den CB1^{-/-} Tieren wird die stärkste Aktivierung der JNK durch die Behandlung mit HU210 und Cerulein beobachtet. Auch hier ist denkbar, dass eine HU210-Wirkung nicht über die CB1-Rezeptoren, sondern über CB2-Rezeptoren oder weitere bekannte oder unbekannte Signalwege vermittelt wird, allerdings ist die Steigerung gegenüber der Cerulein-Kontrolle nicht signifikant.

4.3.3 Auswirkungen auf p44/42

Die Ergebnisse der Aktivierung der ERK1/2 sind eindeutig: eine Vorbehandlung mit HU210 reduziert die Aktivierung der Kinase bei Cerulein-Stimulation, eine Antagonisierung der CB1-Rezeptoren mit AM281 führt zu einer vermehrten Aktivierung der Kinase.

Die Gabe von HU210 und Cerulein führt zu einer leichten Reduktion der Aktivierung verglichen mit den Cerulein-Kontrolltieren.

Die Gabe von AM281 alleine und die Gabe der Kombination aus AM281 und Cerulein führt im Vergleich zu der NaCl-Kontrollgruppe zu einer Steigerung der Aktivierung.

Die Behandlung mit HU210 alleine führt zu einer Reduktion der Aktivierung um über 30% im Vergleich zu der NaCl-Kontrollgruppe. Diese verminderte Aktivierung gegenüber der Kontrolle widerspricht allerdings der Theorie, HU210 aktivierte p44/42 (Bouaboula, Poinot-Chazel et al. 1995; Derkinderen, Valjent et al. 2004). Alle gemessenen Werte sind jedoch nicht signifikant.

Bei den CB1^{-/-} Tieren findet sich die stärkste p44/42-Aktivierung bei den mit HU210 und Cerulein behandelten Tieren.

Die Behandlung mit HU210 alleine oder Cerulein alleine ergibt vergleichbar hohe Phosphorylierungswerte. Die Aktivitäten sind gesteigert gegenüber der NaCl-Kontrolle.

Wahrscheinlich werden die HU210-Wirkungen auch hier über den CB2-Rezeptor oder über andere bekannte oder unbekannte Signalwege vermittelt. Die Kinasen-Induktion durch HU210 wird durch die zusätzliche Behandlung mit Cerulein noch weiter gesteigert.

In der Signalweg-Forschung gilt wie bei laborchemischen Parametern dass die Ergebnisse bei in-vivo-Versuchen Schwankungen unterliegen. Obwohl weitgehend gleiche Bedingungen bei allen Tieren geschaffen wurden, sind die Messwerte auch hier von der individuellen Konstitution des einzelnen Tieres abhängig. Ein unerkannter Infekt oder ein erhöhtes Stressniveau eines Tieres kann Messwerte beeinflussen, vor allem bei ungleich großen Tiergruppen.

4.4 Allgemeine Methodenkritik

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche basieren auf fundiertem Grundlagenwissen: das Modell der Cerulein-induzierten Pankreatitis im Tierversuch ist ein gängiges Verfahren zur Simulation der akuten Pankreatitis und wird von vielen Arbeitsgruppen verwendet.

Auch die Messung des Schweregrades der Pankreatitis mit den Parametern Serumamylase, Trypsinaktivität im Pankreas, MPO im Lungengewebe und IL-6 sind allgemein etabliert und liefern aussagekräftige Ergebnisse.

Die Bestimmung der Serumamylase erfolgte nicht, wie bei anderen Gruppen, in professionellen klinischen Laboren. Die Werte wurden in einem einfachen Testverfahren selbst bestimmt. Die erhobenen Daten sind valide, da das Verfahren einfach durchzuführen ist und Messungen im Doppelansatz bestimmt wurden.

Als Fehlerquelle bei den Amylasemessungen wurde in der Arbeitsgruppe die Tatsache diskutiert, dass bei der Blutkollektion nach Dekapitation der Versuchstiere nicht nur Blut, sondern möglicherweise auch austretender Verdauungs-, und Magensaft gesammelt wurde. Allerdings wurde bei allen Tieren gleich verfahren, so dass mögliche Verunreinigungen ein ähnliches Maß bei allen Tieren erreicht haben dürften.

Die Ergebnisse der Messung der Konzentration an IL-6 im Serum sind zuverlässig, da die Bestimmung der Werte mit Hilfe eines kommerziellen IL-6-Kits durchgeführt wurde und alle Werte im Doppelansatz bestimmt wurden.

Die Messung der Höhe der MPO- und Trypsin-Werte gestaltete sich komplizierter, da beide Verfahren aufwändig sind, viele Arbeitsschritte enthalten und Routine benötigen. Die Methode war aber im Labor bereits etabliert und validiert und wurde nach entsprechender Einarbeitung sicher beherrscht.

Zum Ausschluss von Ungenauigkeiten wurde nach bewährten Protokollen sorgfältig gearbeitet. Außerdem stellte sich nach einer anfänglichen Übungsphase Erfahrung mit Methodik und Gerät ein, so dass die Messungen schließlich routiniert durchgeführt wurden.

Die Anfertigung histologischer Schnitte zur Identifikation einer Pankreatitis ist ein sehr direktes Verfahren zur Abschätzung des Schweregrades. Hier wird optisch bewiesen, ob Entzündungszeichen wie Ödeme oder Nekrosen vorliegen.

Anders als die histologische Begutachtung ist die Bestimmung des Ödemisierungsgrades des Gewebes ein ungenauer Marker. Allerdings ist er einfach zu erheben und erlaubt noch am Versuchstag eine schnelle erste Einschätzung des Schweregrades der Pankreatitis ohne apparative Diagnostik.

Die Untersuchungen der intrazellulären Signaltransduktion wurde mittels Western-Blotting durchgeführt. Dieses Verfahren ist in Forschung und klinischem Alltag breit etabliert. Nach einer gewissen Einarbeitungszeit gelang das Verfahren gut.

Die Exposition der Membranen mit verschiedenen Antikörpern und die Entwicklung der Röntgenfilme gelang im Allgemeinen problemlos. Insbesondere die Antikörperbindung und Detektion der unphosphorylierten Gesamt-Proteine gelang problemlos mit deutlichen Ergebnissen bei kurzer Belichtungszeit.

Die Antikörperbindung an die Phospho-Kinasen war etwas schwieriger nachzuweisen. Gelegentlich konnten keine aussagekräftigen Werte erhoben werden und einzelne Western-Blots mussten wiederholt werden.

Eine Charge der MAPK p38 musste bei dem Hersteller ausgetauscht werden, da bei mehreren Blots mit Material aus dieser Charge kein Ergebnis sichtbar wurde und die Antikörperlösung unbrauchbar gewesen sein dürfte.

Da alle angewandte Methoden bereits etabliert waren, waren die technischen Schwierigkeiten überschaubar.

Im Hinblick auf das Versuchsdesign ist kritisierbar, dass im Rahmen der Untersuchung der intrazellulären Signalwege Kinasen betrachtet wurde, die sowohl von pro-inflammatorischen Signalen, als auch von der Cannabinoid-Bindung am Rezeptor selbst aktiviert werden (1.5).

Bei einer festgestellten Aktivierung einer Kinase kann also nicht sicher differenziert werden, welcher Stimulus nun die Phosphorylierung ausgelöst hat: Inflammation durch Cerulein oder Protektion durch HU210?

Um diese Unsicherheit zu beheben, wurden CB1^{-/-} Tiere getestet, bei denen man ausschließen kann, dass eine Kinasen-Aktivierung über den CB1-Rezeptor vermittelt wird. Allerdings waren die Fallzahlen der untersuchten CB1^{-/-} Tiere auf Grund der geringeren Verfügbarkeit dieser speziellen Tiere niedriger als die der Wildtyp-Tiere. Eine höhere Versuchszahl zur Angleichung der Fallzahlen wäre optimal gewesen.

5. Zusammenfassung, Schlussfolgerung und Ausblick

Die akute Pankreatitis ist eine schwere Erkrankung mit potentiell tödlichem Ausgang. Es gibt keine ursächliche Therapie. Durch die mediatorsbedingte Entzündungsreaktion im Rahmen dieser Erkrankung werden interzelluläre Signalwege durch Kinasen wie p38, JNK und Erk1/2 aktiviert. Diese vermitteln pro-inflammatorische Signale. Die beim Menschen auftretende Erkrankung kann mit dem Modell der Cerulein-induzierten Pankreatitis bei Mäusen zuverlässig zu Forschungszwecken simuliert werden.

Es ist seit langem aus klinischer Erfahrung und Forschung bekannt, dass cannabinoide Substanzen analgetisch und antiinflammatorisch wirken. Die Frage, ob Cannabinoide auch die Pankreatitis in Ausprägung oder Verlauf positiv beeinflussen oder diese gar heilen können, wurde von einigen wenigen Arbeitsgruppen mit widersprüchlichem Ergebnis untersucht.

Es gibt kaum Daten darüber, welche Rolle die intrazellulären Kinasen p38, JNK und p44/42 bei der Vermittlung der möglichen protektiven Signale der Cannabinoide bei der Cerulein-induzierten Pankreatitis spielen.

Diese Arbeit soll einerseits klären, ob Cannabinoide Substanzen protektiv auf die Ausprägung einer Pankreatitis wirken und andererseits soll sie den Signalweg identifizieren, über den diese Wirkung vermittelt wird. Als Cannabinoider Stimulus wird der synthetische Stoff HU210 benutzt, welcher in der Cannabis-Forschung etabliert ist.

Zu der Messung des Schweregrades der Pankreatitis werden zuverlässige Parameter wie Serumamylase im Blutserum, aktiviertes Trypsin im Pankreashomogenisat und die Konzentration von Interleukin 6 (IL-6) im Blutserum bestimmt, sowie zu der Abschätzung der systemischen Inflammation die Myeloperoxidase aus Granulozyten im Lungengewebe (MPO).

Zu der Identifizierung der beteiligten Signalwege werden in Pankreaslysaten die intrazelluläre MAP-Kinasen p38, JNK und p44/42 sowie deren aktivierte Phospho-Formen per Western Blot nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Cannabinoide tatsächlich einige inflammatorische Serumparameter zu senken vermögen. So finden sich signifikant

geringere Messwerte für Serumamylase und MPO, sowie immerhin tendenziell geringere Werte für aktiviertes Trypsin und für IL-6 bei Tieren, die vor der Cerulein-Stimulation mit HU210 vorbehandelt wurden im Vergleich zu der Cerulein-Kontrolle.

Der Beweis, dass die Wirkung von HU210 über den CB1-Rezeptor vermittelt wird, wird durch zwei Gegenproben erbracht:

einerseits durch die vorherige Blockade der CB1-Rezeptoren durch den CB1-Rezeptor spezifischen Antagonisten AM281. So wird eine Wirkung von HU210 am CB1-Rezeptor ausgeschlossen.

Andererseits durch die Testung von HU210 in CB1-/- Tieren, bei denen HU210 am CB1-Rezeptor per se keine Wirkung zeigen kann.

Die Ergebnisse aus den Versuchen der CB1-Rezeptor-Blockade durch AM281 vor HU210-Applikation beziehungsweise vor Stimulation mit Cerulein sind konträr: einige Messwerte – Amylase, MPO und IL-6 – werden durch die Vorbehandlung mit AM281 vor HU210-Gabe und Cerulein-Stimulation gesenkt. Signifikanzen lassen sich allerdings nicht nachweisen. MPO und IL-6 werden durch die Kombinationsbehandlung aus AM281 und Cerulein signifikant gesenkt. Die alleinige Gabe von HU210 führte bei Amylase, MPO und IL-6 zu einer signifikanten Erhöhung der Messwerte gegenüber der NaCl-Kontrolle. Die Werte lagen unterhalb der Levels der Cerulein-Kontrollen.

Die CB1-/- Tiere verhalten sich in Bezug auf die Protektion durch HU210 bei Cerulein-Stimulation ambivalent: einerseits findet sich wie erwartet keine signifikante protektive Wirkung von HU210 in Bezug auf Serumamylase, aktiviertem Trypsin, IL-6 und MPO im Vergleich zu der Cerulein-Kontrolle.

Andererseits führt eine alleinige Gabe von HU210 bei aktiviertem Trypsin und IL-6 zu einer signifikanten Erhöhung der Werte der CB1-/- Tiere.

Es wird hiermit klar, dass die Wirkung von HU210 bezüglich Inflammation nicht strikt auf nur einen Cannabis-Rezeptor festgelegt werden kann. Es müssen auch andere bekannte oder unbekannte Faktoren und Signalwege eine Rolle spielen. In erster Linie kommt der CB2-Rezeptor in Frage, der an der Übermittlung immunmodulatorischer Signale beteiligt ist und auch an der Weitergabe inflammatorischer Signale mitwirken könnte. Insbesondere die Beeinflussung der Messwerte MPO und IL-6, welche beide in Zusammenhang mit dem Immunsystem stehen erscheint über diesen Weg logisch.

Um die an Inflammation beteiligten intrazellulären Signalwege näher zu untersuchen, wird in dieser Arbeit der Phosphorylierungsgrad – also der Aktivitätsgrad – von drei intrazellulären Kinasen untersucht: p38, JNK und Erk1/2. Alle drei Kinasen stehen mit Zellregulation, Apoptose, Zelltod und Inflammation im Zusammenhang und dienen als Identifikatoren für Zellstress.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nicht eindeutig: die p38-MAPK wird unter Zellstreß durch Inflammation vermindert phosphoryliert, verstärkt hingegen aktiviert durch die Cannabinoid-Rezeptor-Bindung. Eine signifikante Protektion ergibt sich durch die Behandlung mit dem CB1-Rezeptor-Antagonisten AM281. Dies spiegelt das in der Literatur veröffentlichte widersprüchliche Wissen wieder. Möglicherweise kommt es durch die vier p38-Isoformen gleichzeitig zu protektiven wie destruktiven Effekten.

Die JNK wird verstärkt phosphoryliert bei der Vorbehandlung mit HU210 vor Cerulein-Applikation. Außerdem wird sie verstärkt aktiviert bei der Vorbehandlung mit AM281 vor Cerulein-Applikation sowie bei der alleinigen Stimulation mit Cerulein. Die Aktivitätssteigerungen sind allerdings nicht signifikant.

Die p44/42-MAPK entspricht den Erwartungen hinsichtlich der Aktivierung bei inflammatorischen Signalen: eine verstärkte Aktivierung findet sich bei jeder Cerulein-Applikation, ob allein oder in Kombination mit anderen Stoffen. Eine tendenzielle Verringerung der Aktivität findet sich bei der Kombinationsbehandlung aus HU210 und Cerulein gegenüber der Cerulein-Kontrolle.

HU210 alleine führt zu einer nicht signifikanten Aktivitätsverringerng der Kinase gegenüber der NaCl-Kontrolle.

Es gibt einige Ergebnisse, die für eine Protektion durch HU210 bei der Cerulein-induzierten Pankreatitis sprechen. Andererseits bleiben einige Zusammenhänge noch unklar. Es bietet sich für künftige Forschungen noch genügend Stoff. Insbesondere Untersuchungen zu neuen unbekanntem Signaltransduktionswegen sind wünschenswert.

Erschwerend für die Signalwegforschung ist die Tatsache, dass intrazelluläre Signalkaskaden sowohl durch HU210 wie auch durch Zellstressoren aktiviert werden. Eine Differenzierung der Ursache der Phosphorylierung wird so erschwert.

Über diese Arbeit hinaus bleibt fraglich, inwieweit Cannabinoide Substanzen überhaupt eine klinische Relevanz haben (werden). HU210 ist potent und hat vielfältige Wirkungen durch die Bindung an den CB1-, CB2-, und vielleicht weitere Rezeptoren. Es ist unklar, ob ein Medikament mit selektiven Eigenschaften wie es für eine nebenwirkungsarme Therapie der Pankreatitis nötig wäre, auf dieser Basis möglich ist. Gegebenenfalls würde ein „dirty drug“ entstehen, dessen gewünschte Wirkung mit limitierenden Nebenwirkungen erkaufte werden müsste. Möglicherweise käme es zu zentralnervösen und neuropsychischen (CB1-Rezeptor) oder immunologischen Nebenwirkungen (CB2-Rezeptor).

Es ist nicht zuletzt überhaupt fraglich, in wie weit Patienten Vorbehalte gegenüber Medikamenten haben mögen, die letztlich Verwandtschaft mit Rauschmitteln besitzen.

Denkbar ist die Entwicklung von speziellen, selektiven Cannabis-Rezeptor-Agonisten oder -Antagonisten, möglicherweise an bisher nicht identifizierten CB-Rezeptoren, welche gute antiinflammatorischen Eigenschaften ohne limitierende Nebenwirkungen haben. Weitere Arbeiten hierzu sind notwendig und wünschenswert.

6. Literaturverzeichnis

- Adler, G., G. Gerhards, et al. (1983). "Effects of in vivo cholinergic stimulation of rat exocrine pancreas." Am J Physiol **244**(6): G623-629.
- Baek, J., Y. Zheng, et al. (2009). "The CB1 receptor agonist, WIN 55,212-2, dose-dependently disrupts object recognition memory in adult rats." Neurosci Lett **464**(1): 71-73.
- Balazsa, T., J. Biro, et al. (2008). "CB1-cannabinoid receptors are involved in the modulation of non-synaptic [3H]serotonin release from the rat hippocampus." Neurochem Int **52**(1-2): 95-102.
- Bermudez-Silva, F. J., J. Suarez, et al. (2008). "Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas." Diabetologia **51**(3): 476-487.
- Bermudez-Silva, F. J., A. Serrano, et al. (2006). "Activation of cannabinoid CB1 receptors induces glucose intolerance in rats." Eur J Pharmacol **531**(1-3): 282-284.
- 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): 1914-1923.
- Bhatia, M. (2009). "Acute pancreatitis as a model of SIRS." Front Biosci **14**: 2042-2050.
- Bhatia, M., A. K. Saluja, et al. (1998). "Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4760-4765.
- Bhatia, M., F. L. Wong, et al. (2005). "Pathophysiology of acute pancreatitis." Pancreatology **5**(2-3): 132-144.
- Bidaut-Russell, M., W. A. Devane, et al. (1990). "Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain." J Neurochem **55**(1): 21-26.
- 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): 637-641.
- 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): 64-67.
- 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**: 248-254.
- Burkey, T. H., R. M. Quock, et al. (1997). "Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain." Eur J Pharmacol **336**(2-3): 295-298.
- 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.
- Casu, M. A., A. Porcella, et al. (2003). "Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract." Eur J Pharmacol **459**(1): 97-105.

- Chakrabarti, A., E. S. Onaivi, et al. (1995). "Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein." DNA Seq **5**(6): 385-388.
- Childers, S. R., T. Sexton, et al. (1994). "Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes." Biochem Pharmacol **47**(4): 711-715.
- Chooklin, S., A. Pereyaslov, et al. (2009). "Pathogenic role of myeloperoxidase in acute pancreatitis." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **8**(6): 627-631.
- Chou, Q., M. Russell, et al. (1992). "Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications." Nucleic Acids Res **20**(7): 1717-1723.
- Clayton, N., F. H. Marshall, et al. (2002). "CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain." Pain **96**(3): 253-260.
- Compton, S. J. and C. G. Jones (1985). "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay." Anal Biochem **151**(2): 369-374.
- Cosenza, M., A. N. Gifford, et al. (2000). "Locomotor activity and occupancy of brain cannabinoid CB1 receptors by the antagonist/inverse agonist AM281." Synapse **38**(4): 477-482.
- 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): 15023-15027.
- 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): 5686-5690.
- 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 Gottardi, A., L. Spahr, et al. (2010). "Cannabinoid receptor 1 and 2 agonists increase lipid accumulation in hepatocytes." Liver Int.
- Deadwyler, S. A., R. E. Hampson, et al. (1995). "Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process." J Pharmacol Exp Ther **273**(2): 734-743.
- del Carmen Garcia, M., E. Adler-Graschinsky, et al. (2003). "Hypotensive effect of anandamide through the activation of CB1 and VR1 spinal receptors in urethane-anesthetized rats." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **368**(4): 270-276.
- Dembinski, A., Z. Warzecha, et al. (2006). "Cannabinoids in acute gastric damage and pancreatitis." J Physiol Pharmacol **57 Suppl 5**: 137-154.
- 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): 284-292.
- Demuth, D. G. and A. Molleman (2006). "Cannabinoid signalling." Life Sci **78**(6): 549-563.
- Denham, W., J. Yang, et al. (2000). "Inhibition of p38 mitogen activate kinase attenuates the severity of pancreatitis-induced adult respiratory distress syndrome." Crit Care Med **28**(7): 2567-2572.
- Deniker, P., D. Ginestet, et al. (1975). "[Comparison of clinical effects of delta-9-tetrahydrocannabinol with the classic effects of hashish]." Encephale **1**(1): 33-41.

- Derijard, B., J. Raingeaud, et al. (1995). "Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms." Science **267**(5198): 682-685.
- Derkinderen, P., C. Ledent, et al. (2001). "Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus." J Neurochem **77**(3): 957-960.
- Derkinderen, P., E. Valjent, et al. (2004). "[Cannabis and cannabinoid receptors: from pathophysiology to therapeutic options]." Rev Neurol (Paris) **160**(6-7): 639-649.
- Derkinderen, P., E. Valjent, et al. (2003). "Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus." J Neurosci **23**(6): 2371-2382.
- Devane, W. A., A. Breuer, et al. (1992). "A novel probe for the cannabinoid receptor." J Med Chem **35**(11): 2065-2069.
- Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, et al. (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." Mol Pharmacol **34**(5): 605-613.
- 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): G401-408.
- El-Remessy, A. B., Y. Tang, et al. (2008). "Neuroprotective effects of cannabidiol in endotoxin-induced uveitis: critical role of p38 MAPK activation." Mol Vis **14**: 2190-2203.
- Elmes, S. J., L. A. Winyard, et al. (2005). "Activation of CB1 and CB2 receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat." Pain **118**(3): 327-335.
- 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.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, et al. (1998). "LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation." J Pharmacol Exp Ther **284**(1): 291-297.
- Fleischer, F., R. Dabew, et al. (2001). "Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis." World J Gastroenterol **7**(2): 259-265.
- Formukong, E. A., A. T. Evans, et al. (1988). "Analgesic and antiinflammatory activity of constituents of Cannabis sativa L." Inflammation **12**(4): 361-371.
- Fox, A., A. Kesingland, et al. (2001). "The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain." Pain **92**(1-2): 91-100.
- Fredriksson, R., P. J. Hoglund, et al. (2003). "Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives." FEBS Lett **554**(3): 381-388.
- Gatley, S. J., R. Lan, et al. (1998). "Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo." J Neurochem **70**(1): 417-423.
- Gerard, C., C. Mollereau, et al. (1990). "Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA." Nucleic Acids Res **18**(23): 7142.
- 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): 129-134.

- Germano, M. P., V. D'Angelo, et al. (2001). "Cannabinoid CB1-mediated inhibition of stress-induced gastric ulcers in rats." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **363**(2): 241-244.
- 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): 8288-8295.
- Gifford, A. N., Y. Tang, et al. (1997). "Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices." Neurosci Lett **238**(1-2): 84-86.
- Glass, M. and C. C. Felder (1997). "Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor." J Neurosci **17**(14): 5327-5333.
- Grant, P. and P. Gandhi (2004). "A case of cannabis-induced pancreatitis." JOP **5**(1): 41-43.
- 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): 1354-1361.
- Gross, V., H. G. Leser, et al. (1993). "Inflammatory mediators and cytokines--new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis?" Hepatogastroenterology **40**(6): 522-530.
- Guhring, H., J. Schuster, et al. (2001). "HU-210 shows higher efficacy and potency than morphine after intrathecal administration in the mouse formalin test." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 127-134.
- Gullo, L., M. Migliori, et al. (2002). "Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality." Pancreas **24**(3): 223-227.
- Halangk, W., M. M. Lerch, et al. (2000). "Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis." J Clin Invest **106**(6): 773-781.
- Herkenham, M., B. G. Groen, et al. (1991). "Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum." Brain Res **552**(2): 301-310.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, et al. (1991). "Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat." Brain Res **547**(2): 267-274.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, et al. (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1932-1936.
- Herlaar, E. and Z. Brown (1999). "p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease." Mol Med Today **5**(10): 439-447.
- Herold, G. (2007). "Innere Medizin." Herold, Köln.
- 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): 2135-2148.
- Hibi, M., K. Nakajima, et al. (1996). "IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system." J Mol Med **74**(1): 1-12.
- Hillig Karl W., M. P. G. (2005). "A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae)." Am. J. Botany **2004 91**: 966-975.
- Hofbauer, B., A. K. Saluja, et al. (1998). "Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats." Am J Physiol **275**(2 Pt 1): G352-362.

- Holdcroft, A., M. Smith, et al. (1997). "Pain relief with oral cannabinoids in familial Mediterranean fever." Anaesthesia **52**(5): 483-486.
- Howlett, A. C. (1995). "Pharmacology of cannabinoid receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 607-634.
- Howlett, A. C., F. Barth, et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.
- Howlett, A. C., L. C. Blume, et al. (2010). "CB1 Cannabinoid Receptors and their Associated Proteins." Curr Med Chem.
- Howlett, A. C., T. M. Champion, et al. (1990). "Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor." Neuropharmacology **29**(2): 161-165.
- Howlett, A. C. and R. M. Fleming (1984). "Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes." Mol Pharmacol **26**(3): 532-538.
- 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): 90-94.
- 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): 205-219.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-269.
- Joergensen, M., K. Brusgaard, et al. (2010). "Incidence, etiology and prognosis of first-time acute pancreatitis in young patients: a population-based cohort study." Pancreatology **10**(4): 453-461.
- 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): 825-831.
- Johnson, M. R., L. S. Melvin, et al. (1981). "Selective and potent analgetics derived from cannabinoids." J Clin Pharmacol **21**(8-9 Suppl): 271S-282S.
- Juan-Pico, P., E. Fuentes, et al. (2006). "Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell." Cell Calcium **39**(2): 155-162.
- Karin, M. (1995). "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **270**(28): 16483-16486.
- Karin, M. (1998). "Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses." Ann N Y Acad Sci **851**: 139-146.
- 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.
- Kaye, M. D. (1968). "Pleuropulmonary complications of pancreatitis." Thorax **23**(3): 297-306.
- Kelly, S., M. D. Jhaveri, et al. (2003). "Activation of peripheral cannabinoid CB1 receptors inhibits mechanically evoked responses of spinal neurons in noninflamed rats and rats with hindpaw inflammation." Eur J Neurosci **18**(8): 2239-2243.
- Kubisch, C., C. Schafer, et al. (2004). "Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced pancreatitis." Gastroenterology **127**(1): 275-286.

- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (1996). "Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines." Bioessays **18**(7): 567-577.
- Lamarche, N. and A. Hall (1994). "GAPs for rho-related GTPases." Trends Genet **10**(12): 436-440.
- 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 Histo **373**(2): 97-117.
- Landsman, R. S., T. H. Burkey, et al. (1997). "SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor." Eur J Pharmacol **334**(1): R1-2.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature **372**(6508): 739-746.
- Lerch, M. M. and F. S. Gorelick (2000). "Early trypsinogen activation in acute pancreatitis." Med Clin North Am **84**(3): 549-563, viii.
- Lerch, M. M., A. K. Saluja, et al. (1992). "Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells." Gastroenterology **103**(1): 205-213.
- Lipina, C., C. Stretton, et al. (2010). "Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells." Diabetes **59**(2): 375-385.
- Liu, X. M., J. Xu, et al. (2005). "Pathogenesis of acute lung injury in rats with severe acute pancreatitis." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **4**(4): 614-617.
- 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): 8377-8380.
- Lüllmann-Rauch, R. (2003). "Histologie." Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Mackie, K. and B. Hille (1992). "Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 3825-3829.
- Massa, F., G. Marsicano, et al. (2004). "The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation." J Clin Invest **113**(8): 1202-1209.
- 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): 561-564.
- Mechoulam, R. (1970). "Marihuana chemistry." Science **168**(936): 1159-1166.
- Mechoulam, R., J. J. Feigenbaum, et al. (1988). "Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity." Experientia **44**(9): 762-764.
- Mechoulam, R. and Y. Gaoni (1967). "The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish." Tetrahedron Lett **12**: 1109-1111.
- Mechoulam, R. and L. Hanus (2002). "Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects." Chem Phys Lipids **121**(1-2): 35-43.
- Michalski, C. W., T. Laukert, et al. (2007). "Cannabinoids ameliorate pain and reduce disease pathology in cerulein-induced acute pancreatitis." Gastroenterology **132**(5): 1968-1978.
- Milstein, S. L., K. MacCannell, et al. (1975). "Marijuana-produced changes in pain tolerance. Experienced and non-experienced subjects." Int Pharmacopsychiatry **10**(3): 177-182.

- Minden, A., A. Lin, et al. (1995). "Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs." Cell **81**(7): 1147-1157.
- Mukhopadhyay, P., M. Rajesh, et al. (2009). "CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes." Cardiovasc Res.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Munro, S., K. L. Thomas, et al. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." Nature **365**(6441): 61-65.
- Murga, C., S. Fukuhara, et al. (1999). "Novel Molecular Mediators in the Pathway Connecting G-protein-coupled Receptors to MAP Kinase Cascades." Trends Endocrinol Metab **10**(4): 122-127.
- Nie, J. and D. L. Lewis (2001). "The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate G protein coupling." Neuroscience **107**(1): 161-167.
- Niederau, C., R. Luthen, et al. (1994). "Effects of CCK on pancreatic function and morphology." Ann N Y Acad Sci **713**: 180-198.
- Noyes, R., Jr., S. F. Brunk, et al. (1975). "Analgesic effect of delta-9-tetrahydrocannabinol." J Clin Pharmacol **15**(2-3): 139-143.
- Opie, F. (1901). "Etiology of acute hemorrhagic pancreatitis." Bull Johns Hopkins Hospital **12**.
- Overton, H. A., A. J. Babbs, et al. (2006). "Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents." Cell Metab **3**(3): 167-175.
- Pages, G., P. Lenormand, et al. (1993). "Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8319-8323.
- Palade, G. (1975). "Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis." Science **189**(4206): 867.
- Patel, T. B., Z. Du, et al. (2001). "Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function." Gene **269**(1-2): 13-25.
- Pertwee, R. G. (2002). "Cannabinoids and multiple sclerosis." Pharmacol Ther **95**(2): 165-174.
- Pertwee, R. G. (2004). "Pharmacological and therapeutic targets for Δ^9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol." Euphytica **140**: 73-82.
- Pertwee, R. G. (2007). "GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan?" Br J Pharmacol **152**(7): 984-986.
- Pertwee, R. G. and S. R. Fernando (1996). "Evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse urinary bladder." Br J Pharmacol **118**(8): 2053-2058.
- 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): 2199-2205.
- Pertwee, R. G., G. Joe-Adigwe, et al. (1996). "Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse vas deferens." Eur J Pharmacol **296**(2): 169-172.
- Qamri, Z., A. Preet, et al. (2009). "Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer." Mol Cancer Ther **8**(11): 3117-3129.

- 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): 7420-7426.
- 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): 1247-1255.
- Ramer, R. and B. Hinz (2008). "Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1." J Natl Cancer Inst **100**(1): 59-69.
- 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): 3116-3120.
- Rhee, M. H., M. Bayewitch, et al. (1998). "Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes." J Neurochem **71**(4): 1525-1534.
- Richardson, J. D., S. Kilo, et al. (1998). "Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors." Pain **75**(1): 111-119.
- Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, et al. (1994). "SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor." FEBS Lett **350**(2-3): 240-244.
- 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): 1027-1037.
- Rubino, T., G. Forlani, et al. (2004). "Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment." Mol Cell Neurosci **25**(3): 355-362.
- Rueda, D., I. Galve-Roperh, et al. (2000). "The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase." Mol Pharmacol **58**(4): 814-820.
- Ryberg, E., N. Larsson, et al. (2007). "The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor." Br J Pharmacol **152**(7): 1092-1101.
- Saluja, A., S. Hashimoto, et al. (1987). "Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis." Am J Physiol **253**(4 Pt 1): G508-516.
- 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): 304-310.
- Saluja, A. K., M. Saluja, et al. (1989). "Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8968-8971.
- Samuel, I., A. Zaheer, et al. (2006). "In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production." J Gastrointest Surg **10**(10): 1376-1383.
- Santoro, A., S. Pisanti, et al. (2009). "Rimonabant inhibits human colon cancer cell growth and reduces the formation of precancerous lesions in the mouse colon." Int J Cancer **125**(5): 996-1003.

- 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): C1032-1043.
- 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): 24173-24180.
- 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.
- 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): 609-615.
- Secknus, R. and J. Mossner (2000). "[Changes in incidence and prevalence of acute and chronic pancreatitis in Germany]." Chirurg **71**(3): 249-252.
- Shin, J. H., J. Y. Jeong, et al. (2011). "p38beta MAPK affords cytoprotection against oxidative stress-induced astrocyte apoptosis via induction of alphaB-crystallin and its anti-apoptotic function." Neurosci Lett **501**(3): 132-137.
- Showalter, V. M., D. R. Compton, et al. (1996). "Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands." J Pharmacol Exp Ther **278**(3): 989-999.
- Steer, M. L. (1997). "Pathogenesis of acute pancreatitis." Digestion **58 Suppl 1**: 46-49.
- Steer, M. L. and J. Meldolesi (1987). "The cell biology of experimental pancreatitis." N Engl J Med **316**(3): 144-150.
- 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., M. Bashashati, et al. (2010). "Differential effects of CB(1) neutral antagonists and inverse agonists on gastrointestinal motility in mice." Neurogastroenterol Motil **22**(7): 787-796, e223.
- 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): 1678-1685.
- Sugiura, T., S. Kondo, et al. (1996). "Enzymatic synthesis of oleamide (cis-9, 10-octadecenoamide), an endogenous sleep-inducing lipid, by rat brain microsomes." Biochem Mol Biol Int **40**(5): 931-938.
- Sugiura, T., S. Kondo, et al. (1996). "Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities." Biochem Biophys Res Commun **218**(1): 113-117.
- 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): 4629-4642.
- 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): G1298-1306.
- 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): 7337-7342.

- 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): 4350-4354.
- Trang, T., M. Sutak, et al. (2007). "Involvement of cannabinoid (CB1)-receptors in the development and maintenance of opioid tolerance." Neuroscience **146**(3): 1275-1288.
- Ugdyzhekova, D. S., A. V. Krylatov, et al. (2002). "Activation of cannabinoid receptors decreases the area of ischemic myocardial necrosis." Bull Exp Biol Med **133**(2): 125-126.
- 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): 41-47.
- 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): 1347-1349.
- Wargo, K. A., B. N. Geveden, et al. (2007). "Cannabinoid-induced pancreatitis: a case series." JOP **8**(5): 579-583.
- Weinberg, R. A. (1984). "ras Oncogenes and the molecular mechanisms of carcinogenesis." Blood **64**(6): 1143-1145.
- 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): 143-180.
- Willemer, S., H. P. Elsasser, et al. (1992). "Hormone-induced pancreatitis." Eur Surg Res **24 Suppl 1**: 29-39.
- Williams, J. A., M. D. Sans, et al. (2002). "Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells." Pharmacol Toxicol **91**(6): 297-303.
- 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): 7407-7416.
- Xia, Z., M. Dickens, et al. (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-1331.
- 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.
- Zeltser, R., Z. Seltzer, et al. (1991). "Suppression of neuropathic pain behavior in rats by a non-psychotropic synthetic cannabinoid with NMDA receptor-blocking properties." Pain **47**(1): 95-103.
- Zhou, D. and Z. H. Song (2001). "CB1 cannabinoid receptor-mediated neurite remodeling in mouse neuroblastoma N1E-115 cells." J Neurosci Res **65**(4): 346-353.
- Zor, T. and Z. Selinger (1996). "Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies." Anal Biochem **236**(2): 302-308.
- Zuardi, A. W. (2006). "History of cannabis as a medicine: a review." Rev Bras Psiquiatr **28**(2): 153-157.

7. Publikationen

Abstracts

Schäfer, C.; Kramer, J.; Malo, A.; Michler, T.; Göke, B.; Storr, M. Flush or New Therapeutic Options: the Role of Cb1-Receptors in Acute Experimental Pancreatitis. *Pancreas* 35 (4), 425: 2007

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.; Kramer, J.; Michler, T.; Malo, A.; Göke, B.; Schaefer, C. Acute Experimental Pancreatitis Is Ameliorated By Activation of Cannabinoid-1 (CB1) Receptors. *Gastroenterology* 134 (4), A-430, 2008

Poster

10/2007 Posterpräsentation auf der 35. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V. in Nürnberg

11/2007 Posterpräsentation auf der 28. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub in Dresden

8. Danksagung

Zunächst gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. med. Claus Schäfer. In erster Linie für die Überlassung des Themas, aber insbesondere auch für die freundliche, unkomplizierte und stets zuverlässige Betreuung während der ganzen Zeit.

Ohne die kompetente Einführung in die Laborarbeit, den Unterricht in der Methodik und die fachlichen Ratschläge wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke hierfür speziell an Dipl. biol. Antje Malo und die MTAs Bettina Ziehe und Steffi Ochs. Danke für das nette Miteinander.

Weiterhin möchte ich meinen Mitdoktoranden Florian Fries und Dr. med. Thomas Michler danken für die gute Zusammenarbeit und den reichen Gedankenaustausch.

Großer Dank gilt meiner Familie. Meine Eltern Klaus und Ursula Kramer, meine Geschwister Tobias Kramer und Cordula Schütz jeweils mit Familie, meine Patentante Dr. med. Antje Schühle und vor allem meine Verlobte Cornelia Gärtner haben mir das Studium und die Doktorarbeit durch ihre große Unterstützung ermöglicht.