

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Julia Mayerle

**Die Caerulein-induzierte akute Pankreatitis am Mausmodell:  
Auswirkung auf die Inflammation nach Hemmung  
der SAPK/JNK MAP-Kinase in nicht-transgenen und MK-2 <sup>-/-</sup> Mäusen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Florian Fries

aus

Schwäbisch Gmünd

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Claus Schäfer

Mitberichterstatter: PD Dr. Constanze Waggershauser

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2018

# Eidesstattliche Versicherung

FRIES, Florian Stefan

---

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die Caerulein-induzierte akute Pankreatitis am Mausmodell:**

**Auswirkung auf die Inflammation nach Hemmung**

**der SAPK/JNK MAP-Kinase in nicht-transgenen und MK-2 <sup>-/-</sup> Mäusen**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.08.2018

---

Ort, Datum

Florian Fries

---

Florian Fries

Meinen geliebten Eltern...

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1	Die akute Pankreatitis im historischen Kontext .....	1
1.2	Anatomie und Physiologie.....	2
1.2.1	CCK-Rezeptor.....	4
1.3	Die experimentelle Pankreatitis am Mausmodell .....	5
1.3.1	Cholecystokinin und Caerulein.....	5
1.3.2	Sekretion, Autodigestion und protektive Mechanismen .....	7
1.4	Epidemiologie und Klinik der akuten Pankreatitis .....	9
1.4.1	Pathophysiologische Aspekte.....	11
1.4.2	Schwere der Pankreatitis anhand von Laborparametern und Ödemisierung ....	12
1.4.3	Aktuelle Behandlungsmethoden.....	13
1.5	Die Mitogen aktivierten Kinasen (MAPK).....	13
1.5.1	Die SAPK/JNK Kinase .....	17
1.5.2	Die p38 Kaskade .....	19
1.5.3	Der ERK-Kinase Weg (p44\42).....	20
1.6	MK-2 (-/-) Knock-out Tiere .....	22
1.6.1	MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAP-2-Kinase, MK-2).....	22
1.6.2	Hitze Schock Proteine (Hsp) .....	23
1.7	Die Fragestellung zu dieser Arbeit .....	24
2.	Materialien und Methoden.....	25
2.1	Gerätschaften.....	25
2.2	Chemikalien und Materialien .....	26
2.3	Die verwendeten Puffer .....	27
2.4	Methoden.....	28
2.4.1	Herstellung des Standards zur Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
2.4.2	Messung der Amylase .....	29
2.4.3	Messung der Myeloperoxidase (MPO).....	30
2.4.4	Messung der Trypsin-Aktivität .....	32
2.4.5	ELISA für IL-6 Bestimmung .....	34
2.4.6	SP 600125: ein selektiver SAPK/JNK Kinase-Inhibitor .....	35
2.5	Induktion der Pankreatitis mit Caerulein .....	36

2.6	Das Pankreasödem .....	37
2.6.1	Pankreas-/Körpergewicht-Ratio des Pankreas (Ödemisierungsgrad) .....	37
2.6.2	Die Trocken-Feuchtgewicht-Ratio .....	37
2.7	Western-Blot .....	38
2.7.1	Pankreaslysat Herstellung .....	38
2.7.2	Durchführung Western-Blot .....	39
2.8	Tiermodell und Versuchsaufbau .....	42
2.8.1	Versuchstiere .....	43
2.8.2	Versuchsaufbau mit Fragestellung und Hypothese .....	45
2.8.3	Asservation von Blut, Pankreas- und Lungenpräparation .....	45
3.	Ergebnisse und statistische Auswertung .....	47
3.1	Ergebnisse der Stimulation innerhalb der Kontrollen .....	50
3.1.1	Ergebnisse des Ödemisierungsgrad der nicht-transgenen Tiere .....	52
3.1.2	Ergebnisse der laborchemischen Parameter für die nicht-transgenen Tiere .....	53
3.1.3	Ergebnisse der Serum Amylase Aktivität (nicht-transgene Tiere) .....	53
3.1.4	Ergebnisse der Trypsin Aktivität aus Pankreasgewebe (nicht-transgene Tiere) .....	54
3.1.5	Ergebnisse der MPO Aktivität aus Lungengewebe (nicht-transgene Tiere) .....	55
3.1.6	Ergebnisse der Interleukin 6 Aktivität aus Serum (nicht-transgene Tiere) .....	56
3.2	Ergebnisse der Stimulation für MK-2 -/- Tiere .....	57
3.2.1	Ergebnisse Ödemisierungsgrad der MK-2 -/- Tiere .....	58
3.2.2	Ergebnisse der klinischen Parameter für MK-2 -/- Tiere .....	58
3.2.3	Ergebnisse der Amylase Aktivität aus dem Serum (MK-2 -/- Tiere) .....	59
3.2.4	Ergebnisse der Trypsin Aktivität aus dem Pankreasgewebe (MK-2 -/- Tiere) .....	60
3.2.5	Ergebnisse der MPO Aktivität aus dem Lungengewebe (MK-2 -/- Tiere) .....	61
3.2.6	Ergebnisse der Interleukin 6 Aktivität aus dem Serum (MK-2 -/- Tiere) .....	61
3.3	Ergebnisvergleich zwischen nicht-transgenen und MK-2 -/- Tieren .....	63
3.3.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse für die Serum-Amylase .....	65
3.3.2	Gegenüberstellung der Ergebnisse für Trypsin .....	66
3.3.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse für MPO: .....	67
3.3.4	Gegenüberstellung der Ergebnisse für Interleukin 6: .....	68
3.4	Western-Blot .....	69
3.5	Pixelanalyse und Darstellung der Beispiel Western-Blots .....	70
3.5.1	Gesamt und phospho SAPK/JNK Antikörper der nicht-transgenen Tiere .....	70

3.5.2	Gesamt und phospho p38 Antikörper der nicht-transgene Tiere.....	72
3.5.3	Gesamt und phospho p44\42 Antikörper der nicht-transgenen Tiere .....	73
3.6	Western-Blot MK-2 -/-.....	74
3.6.1	Gesamt und phospho SAPK/JNK Antikörper der MK-2 -/- Tiere .....	74
3.6.2	Gesamt und phospho p38 Antikörper der MK-2 -/- Tiere.....	76
3.6.3	MK-2 Knock-out p44\42 .....	77
4.	Diskussion .....	78
4.1	Diskussion der Ergebnisse .....	79
4.1.1	Kritische Bewertung der Experimente und Methoden .....	89
4.2	Zusammenfassung und abschließende Beurteilung .....	91
5.	Abstract.....	94
6.	Inhaltsverzeichnis.....	96
	Abkürzungsverzeichnis:.....	114
	Tabellenverzeichnis:.....	116
	Abbildungsverzeichnis:.....	117
	Danksagung .....	119

## 1. Einleitung

Das Pankreas spielt in der Wahrnehmung der meisten Menschen im täglichen Leben eine untergeordnete Rolle. Ein bewusstes Empfinden, wie beispielsweise das Schlagen des Herzens oder eine willkürliche Steuerung der Atmung, ist nicht möglich. Jedoch ist dieses unscheinbare Organ für unser Wohlbefinden von entscheidender Bedeutung. Im Allgemeinen wird heutzutage bei Erkrankungen des Pankreas der weitverbreitete Diabetes Mellitus Typ II assoziiert. Das klinische Bild einer akuten Pankreatitis, sowie die glücklicherweise nur in wenigen Fällen fulminant und dann leider oftmals letal verlaufende Form dieser Erkrankung, sind außerhalb der medizinischen Fachwelt hingegen kaum bekannt.

In der sich anschließenden Arbeit soll die Physiologie sowie die Pathophysiologie des Pankreas und der akuten Pankreatitis näher erläutert werden. Nach einer allgemeinen Einführung werden im speziellen die beteiligten inflammatorischen Signalwege beschrieben. Es schließt sich der tierexperimentelle Teil mit den notwendigen Methoden und den verwendeten Materialien an. Darauf folgt die Präsentation der Forschungsergebnisse. Den Abschluss bildet eine kritische Diskussion der erhobenen Daten unter Berücksichtigung des aktuellen Wissensstandes.

### 1.1 Die akute Pankreatitis im historischen Kontext

Die Aufgabe und Funktionsweise des Pankreas beschäftigt Anatomen und Physiologen nicht erst seit dem letzten Jahrhundert. Es existieren historische Aufzeichnungen in denen Symptome beschrieben werden, die auf eine akute Pankreatitis hinweisen könnten. Die Überlieferungen lassen zwar keinen eindeutigen Schluss zu. Aber neben der klassischen Vergiftungstheorie kann der Verdacht geäußert werden, dass Alexander der Große im Alter von 32 Jahren im Jahr 323 vor Christus, möglicherweise an einer akuten Pankreatitis erkrankte und letztlich daran verstarb (1). In der Epoche der Aufklärung werden die Aufzeichnungen und Beschreibungen des Anatomen Giovanni



Morgagni (1682-1771) bereits etwas konkreter. Er beschrieb 1761 möglicherweise das Bild einer akuten Pankreatitis mit Kollaps, Schweißausbruch, Sialorrhoe, Oberbauchschmerzen und galligem Erbrechen. Die Funktion des Pankreas lag aber für lange Zeit im Dunkeln. Die vorherrschende Theorie der mechanischen Schutzfunktion des Pankreas war über viele Jahrhunderte anerkannt. Erst mit der Entdeckung des Ductus pancreaticus durch Johann Wirsung (1589-1643) entwickelte sich ein neuer Gedanke zur Funktion des Organs. Wirsung, der seine Entdeckung weder den Arterien noch zu den Venen rechnen wollte, konnte aber keine für ihn logische Funktion des Ganges erschließen. Thomas Bartholin (1616-1680) brachte erstmals den Gedanken ein, dass die „*trübe Flüssigkeit*“, die von Wirsung beschrieben wurde, möglicherweise zur „*fermentatio*“ dient. Erst Mitte des 19. Jahrhunderts gelang es, die Funktionen des Bauchspeichels besser zu charakterisieren. Im Jahr 1867 konnte der Arzt Willi Kühne (1837-1900) (2) ein sogenanntes „Pankreasferment“ isolieren. Dieses Ferment erhält zu einem späteren Zeitpunkt den Namen Trypsin. Der Arzt W. Balser berichtet 1882 erstmalig über eine „Fettgewebsnekrose“ am Pankreas und beschreibt die klinischen Symptome einer schweren Pankreatitis. Nur wenige Jahre später begründet der Pathologe Hans Chiari (1851-1916) die Lehre der „tryptischen Selbstverdauung“ des Pankreas. Bayliss (1860-1927) und Starling (1866-1927) konnten im Jahr 1902 nachweisen, dass die Abgabe von Sekretin in das Blut wiederum essenziell für die Trypsinsekretion ist (3). Aufgrund dieser Entdeckung wurde in den folgenden Jahren die Theorie der „chemical Messengers“ entwickelt – uns besser bekannt unter dem Begriff – Hormon (4). Diese bescheidenen Anfänge führten in den folgenden Jahrzehnten zur Identifizierung hochkomplexer zellulärer Vorgänge, die unser heutiges Verständnis dieser molekularen Reaktionen prägen (5).

### **1.2 Anatomie und Physiologie**

Das Pankreas hat sowohl eine endokrine als auch eine exokrine Funktion. Die endokrinen Aufgaben des Organs sollen hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Der wichtigste und bekannteste Mechanismus ist die Regulation des Blutglukosespiegels durch Sekretion der Hormone Insulin und Glukagon aus den Langerhans'schen

Zellen (6). Die endokrinen Zellen sind überwiegend in Corpus und vor allem in der Cauda lokalisiert. Bekannt als die Langerhans-Inseln geben die endokrinen Epithelzellen die produzierten Hormone direkt ins Blut ab. Im Einzelnen sind zu erwähnen:

- $\alpha$ -Zellen (ca. 40%, produzieren Glukagon)
- $\beta$ -Zellen (ca. 50%, produzieren Insulin)
- $\delta$ -Zellen (ca. 10%, produzieren Somatostatin)
- PP-Zellen (produzieren pankreatisches Polypeptid)
- $\epsilon$ -Zellen (produzieren Ghrelin)

Das humane Pankreas ist in etwa 15 – 20cm lang und das Gewicht beträgt zwischen 70 g und 120 g. Etwa 98 Prozent der Gesamtmasse des Organs bilden den exokrinen Teil. Man unterscheidet drei Abschnitte – Caput, Corpus und Cauda. Das Caput Pancreatis wird vom „C“ des Duodenums umschlossen. Die Sekretion des Pankreassaftes erfolgt über den circa 3 - 5 mm im Durchmesser messenden Ductus pancreaticus, dessen Ende die Vatersche Papille mit der Mündung in das Duodenum darstellt. In vielen Fällen mündet der Ductus Choledochus in einer gemeinsamen Endstrecke. Je nach anatomischer Varianz, kann beim Menschen auch mehr als nur ein Ausführungsgang vorkommen (7). Die arterielle Versorgung wird in aller Regel durch drei große Gefäße gewährleistet. Die Arteria hepatica communis, Arteria splenica und die Arteria mesenterica superior. Der venöse Abfluss erfolgt über die Vena splenica, Vena pancreaticoduodenalis und die Vena mesenterica in die Vena portae (8). Innerviert wird die Bauchspeicheldrüse über sympathische sowie parasympathische Fasern. Letztere haben ihren Ursprung aus dem Nervus Vagus. Die sympathische Versorgung erfolgt über den Nervus splanchnicus major und das Ganglion Coeliacum (9), (10). Im Rahmen der exokrinen Funktion sezerniert das Pankreas bis zu 30 unterschiedliche Verdauungsenzyme, die Zucker, Eiweiße und Fette spalten. Diese Enzyme sind überwiegend noch inaktiv und werden als sogenannte Zymogene bezeichnet. Durch die Speicherung als Proenzyme innerhalb des Organs wird eine Selbstverdauung des Organes verhindert. Erst nach Sezernierung in das Duodenum kommt es zur Aktivierung (10), (11), (12). Die läppchenförmig angeordneten Acinus-Zellen werden zu den merokrinen Drüsen ge-

zählt. Ein Acinus besteht aus circa 70 Drüsenzellen. Ein Acinus-Komplex wiederum aus 2 bis 4 Acini. Mehrere Acini enden dabei immer in einen gemeinsamen Gang (13). Die Acinus-Zellen sind pyramidenförmig angeordnet und zwischen 10 bis 20 µm hoch. Apikal sind die Drüsen schmal und ragen mit ihren Mikrovilli in das Drüsenlumen. Im apikalen Drittel liegen die bis zu 1 µm großen Zymogengranulae (14), (15). Pro Tag bildet der exokrine Anteil des Pankreas in etwa 1,5 bis 2 Liter Sekret. Die reine Enzymmenge macht davon nur circa 20 Gramm aus. Durch Sezernierung von Bikarbonat wird ein pH-Wert von circa 8 erreicht (7), (13), (16), (17), (18). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts gelang Bayliss und Starling aus Pankreassekret die Isolation einer Verbindung, der sie den Namen Sekretin gaben (3). Erst 1928 bestätigten Ivy und Oldberg die Ergebnisse und isolierten Cholecystokinin (CCK) erstmals erfolgreich (19). Cholecystokinin (20) und Gastrin (21) sind strukturell eng miteinander verwandt. Bei beiden Molekülen ist die Aminosäuresequenz der C-Termini identisch. Kommt es nun zur Stimulation, so unterliegt die exokrine Funktion des Pankreas durch Sekretin zum einen einer hormonellen Kontrolle. Auf der anderen Seite werden durch cholinerge neurale Stimulation und Cholecystokinin die Acinus-Zellen zur Sekretion von Verdauungsenzymen veranlasst (22). Cholecystokinin hat im Rahmen der Nahrungsaufnahme somit eine regulatorische Funktion der pankreatischen Enzymproduktion (23), (24).

### **1.2.1 CCK-Rezeptor**

Man unterscheidet zwischen den G-Protein gekoppelten CCK-1 (CCK-A) und CCK-2 (CCK-B) Rezeptoren (25). Während CCK-1 (26) hauptsächlich im Verdauungsapparat vorkommt, wird der CCK-2 Rezeptor auch in neuronalen Gewebe exprimiert (27). Hier übernimmt Cholecystokinin die Rolle als Neurotransmitter (28). In den vergangenen Jahren konnte nachgewiesen werden, dass Gastrin mit gleicher Affinität an CCK-2R-Rezeptor (neue Nomenklatur) bindet wie Cholecystokinin (29). CCK-1R (neue Nomenklatur) scheint dagegen spezifisch für Cholecystokinin zu sein (30).

### 1.3 Die experimentelle Pankreatitis am Mausmodell

Die hier durchgeführten Experimente verfolgten das Ziel, eine wissenschaftliche Hypothese zu klären und entsprachen im Ansatz keiner klinischen Studie. Zur Erforschung dieser Grundlagen wurden Substanzen verwendet, für die keine Zulassung beim Menschen vorliegt, beziehungsweise deren Verabreichung den Tatbestand einer Körperverletzung erfüllen würde. Die ausschließliche Verwendung von Zellkulturen war nicht praktikabel, da sich die Fragestellung auf einen Gesamtorganismus und damit verbunden auf andere Organsysteme bezog. Das gewählte Tiermodell ist eine seit Jahren etablierte Methode zur Induktion einer Pankreatitis mit Caerulein. Die dem Cholecystokinin sehr ähnliche Struktur löst in unphysiologisch hoher Konzentration eine interstitielle Entzündung im Pankreas aus (31). Willemer et al. passten das vorhandene Tiermodell auf Mäuse an. Durch repetitive Gaben supramaximaler Caerulein-Dosen intraperitoneal (i.p.) kann bei Mäusen im Einzelfall nicht nur eine ödematöse, sondern auch nekrotisierende Pankreatitis induziert werden (32).

Ein in-vivo Tiermodell ist für die Fragestellung eines Experimentes immer eine Herausforderung. Unabhängig von allen Fortschritten in der Wissenschaft, durch Standardisierung der Umweltbedingungen und der Versuch die Zahl der unbekannten Faktoren so gering wie möglich zu halten, können Versuche am Tier immer nur eine Annäherung an die Gegebenheiten beim Menschen sein und stellen keine absolute Abbildung der realen Verhältnisse dar. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen ist somit eine Herausforderung und in den seltensten Fällen 1:1 möglich.

#### 1.3.1 Cholecystokinin und Caerulein

Cholecystokinin wird zur Gruppe der Peptidhormone gezählt. Stimuliert durch Fett- und Aminosäuren, wird das Prohormon des Cholecystokinin in den enteroendokrinen Zellen (I-Zellen) der gastrointestinalen Mucosa produziert. In seiner aktiven Form – beispielsweise als CCK 58, wirkt es auf die Pankreassekretion ebenso positiv wie auf

die Kontraktion der glatten Muskulatur und damit auf die Motilität des gesamten Verdauungstraktes (33).

Caerulein (Ceruletide, Cerulein) ist ein Cholecystokininanalogon, welches ursprünglich von der Haut des Frosches „*Litoria caerulea*“ gewonnen wurde (34), (35). Dieses Dekapeptid unterscheidet sich von Cholecystokinin nur durch 2 zusätzliche Aminosäuren, die sich im Anschluss an das für die biologische Aktivität zwingend notwendige Heptapeptid befinden (20). Die Wirkung von Caerulein und Cholecystokinin an den CCK-Rezeptoren sind aber identisch.

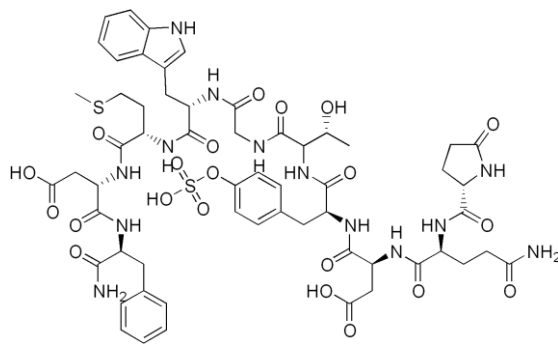


Abbildung 1: Strukturformel von Caerulein (Quelle: en.wikipedia.org : Ceruletide)

Wenn Cholecystokinin oder Caerulein in supraphysiologischen Konzentrationen verabreicht werden, kommt es zu einer Blockierung der zellulären Enzymsekretion (36). Zudem lässt sich ein deutliches Pankreasödem, eine höhere Serumamylase-Aktivität gegenüber unbehandelten Tieren, sowie eine intrazelluläre Zymogenaktivierung und verstärkte lysosomale Aktivität nachweisen (37). Otte und Forell konnten in ihren Versuchen ebenfalls eine Steigerung der Sekretion von Amylase, Chymotrypsin, Trypsin und Lipase sowie von Wasser und Bikarbonat im Pankreassekret zeigen (38). Ein entscheidender entzündungsauslösender Faktor ist in der Folge schließlich die intrazelluläre Aktivierung von Trypsinogen (39).

## 1.3.2 Sekretion, Autodigestion und protektive Mechanismen

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts stellte Hans Chiari die These der Selbstverdauung des Pankreas auf (40). Das grundlegende Verständnis für den Sekretionsmechanismus der Pankreaszelle konnte 1975 schließlich von Palade in seiner Arbeit gezeigt werden (41). Die Synthese lysosomaler Hydrolasen und Verdauungsenzyme erfolgt durch die Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums. In Vakuolen verpackt, verlassen die neuen Proteine getrennt voneinander den Golgi-Apparat. Die Zymogene sind in dieser Speicherform inaktiv. Proteasen liegen in diesem Stadium noch als Proenzyme vor (42). Die nun hoch konzentrierten Zymogengranulae sammeln sich normalerweise auf der apikalen Zellseite (14). Sie sind nun bereit zur Exozytose in das Acinuslumen. Bei dem gesamten Vorgang kommt dem Aktin-Zytoskelett der Zelle eine wichtige Rolle zu. Es wird so eine mechanische Barriere aufgebaut, die es ermöglicht die Zymogengranulae in der Nähe der Zellmembran zu halten. Dort bilden diese Filamente das „terminal web“. Nach intrazellulärer Stimulation (Stimulus-Sekretionskopplung) (43) sind die Aktin-Filamente aktiv am Sekretionsvorgang mit beteiligt (44). Die Zymogengranulae verbinden sich mit der Zellmembran und geben ihre Inhaltsstoffe nach außen ab (24). Die Konformationsänderung des Aktin-Netzwerkes ist möglicherweise ein wichtiger Aspekt für die später folgende Hemmung der Sekretion (45).

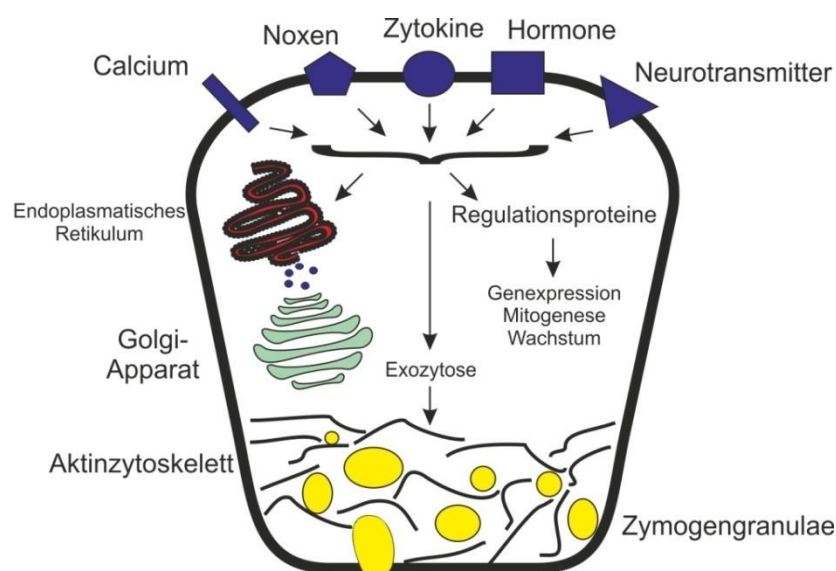


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Sekretionsvorgangs in der Acinus-Zelle

Die Autodigestion ist ein komplexes multifaktorielles Ereignis. Untersuchungen legen nahe, dass die zentrale Rolle am Anfang der Pathophysiologie die intrazelluläre Zymogen- und insbesondere die Trypsinaktivierung ist (46). Parallel dazu kann man eine deutliche Zunahme des intrazellulären Calciumspiegels feststellen. In der Stimulus-Sekretionskopplung ist Calcium als Messenger unerlässlich (43). Inwiefern erhöhte intrazelluläre Calciumwerte eine Pankreatitis auslösen, begünstigen oder unterhalten ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass bereits 15 Minuten nach Induktion mit Caerulein deutlich erhöhte Trypsinwerte im Pankreasgewebe messbar waren. Eine Ödem- und Vakuolenbildung, oder erhöhte Blutserumwerte waren frühestens nach 30 Minuten zu erkennen (47). Somit stellt die akute Pankreatitis eine Reaktion auf ein zuvor induziertes inflammatorisches Ereignis dar.

Im Allgemeinen wird von dem Modell der Co-Lokalisation ausgegangen. Darunter ist zu verstehen, dass es durch einen Stimulus der Acini-Zelle zu einem gestörten Transport der neu synthetisierten Enzyme kommt. Die nun stattfindende Co-Lokalisation (Verschmelzung) von lysomalen Enzymen und Verdauungsenzymen in den Organellen des Zytoplasmas ist eine der ersten Reaktionen (31). Die zuvor noch inaktive lysosomale Hydrolase Cathepsin-B wird bei diesem Vorgang aktiviert und initiiert ihrerseits wiederum Zymogene – also auch Trypsin. Diese neuen Vakuolen lösen sich im Verlauf auf. Die dann freigesetzten Verdauungsenzyme schädigen die Zelle weiter. Bereits 1959 zeigten Greenbaum et al, dass Cathepsin-B ein Teil der Aktivierungskaskade ist (48). Dass Cathepsin-B tatsächlich diese Wirkung hat, konnte Saluja et al nachweisen, in dem bei einem in vitro Experiment isolierte Ratten Acini-Zellen einem spezifischen Cathepsin-B Inhibitor exponiert wurden und sich hier eine deutlich geringere Trypsinaktivierung zeigte (49). Die Genese der frühen akuten Pankreatitis ist somit in drei Stadien einteilbar, bevor sie klinisch manifest wird (50). Zu Beginn steht die zelluläre sekretorische Blockade (51). Als Folge der Co-Lokalisation kommt es dann zur intrazellulären Aktivierung der Verdauungsenzyme (49). Das Resultat aus diesem Vorgang ist die Bildung entzündlicher Mediatoren (52), (53). Man kann davon ausgehen dass auch unter physiologischen Umständen gelegentlich eine intrazelluläre Zymogenaktivierung

vorkommt. Die Zelle produziert zu diesem Zweck selbst einen Trypsin-Inhibitor (54) und eine Protease um Trypsin abzubauen (42). Bei der Caerulein-induzierten Pankreatitis lässt sich zudem nachweisen, dass die Expression von Hitze-Schock-Proteinen (HSP) in Verbindung mit dem Zytoskelett eine Zellprotektion ermöglichen (55). Siehe auch 1.6.2.

### **1.4 Epidemiologie und Klinik der akuten Pankreatitis**

Das Erstereignis einer akuten Pankreatitis, bezogen auf ein Jahr, liegt in Deutschland bei einer Inzidenz von weniger als 20 Patienten in einem Kollektiv von 100.000 Menschen (56). Im Allgemeinen ist zwischen den leichten Formen einer akuten Pankreatitis, die in der Regel nach wenigen Tagen abgeklungen ist und einer schweren, beziehungsweise nekrotisierenden Pankreatitis zu unterscheiden. Laborchemisch lassen sich neben den allgemeinen Entzündungsparametern erhöhte Werte für Amylase und Lipase im Serum nachweisen. Je nach Genese sind möglicherweise auch die Cholestase-Werte erhöht. Statistisch ist der typische Pankreatitis-Patient männlich und zwischen 50 und 60 Jahren alt (57). Klinisch zeigen sich stärkste abdominale Schmerzen, teils gürtelförmig in den Rücken ausstrahlend, begleitet von Übelkeit, Erbrechen, Meteorismus, paralytischen Ileus, Fieber und Kreislaufinstabilität. Bei manchen Verläufen sind weitere physische Zeichen wie beispielsweise das Cullen-Zeichen – eine hämorrhagische Verfärbung (Ekchymosen) in der Subcutis im periumbilikalen Bereich zu beobachten. Typisch ist zudem ein prall-elastisches Abdomen bei der Palpation, gerne auch als „Gummibauch“ bezeichnet (58). Die akute Pankreatitis tritt in allen Teilen der Welt auf. Für annähernd achtzig Prozent aller akuten Pankreatitiden gelten zwei Faktoren als Hauptauslöser. Zum einen die Cholelithiasis und zum anderen der permanente, übermäßige Alkoholkonsum (59). In Deutschland ist die Verteilung der akuten Pankreatitis bedingt durch Gallensteine und Alkohol in etwa gleich (60). Ganz allgemein scheinen Patienten mit kleinen Gallensteinen (< 5 mm) ein erhöhtes Risiko zu haben (61). Bei einer Verlegung des Ductus Pankreaticus durch ein oder auch mehrere Konkremente aus der Gallenblase sind kolikartige Oberbauchschmerzen ein häufiges



Symptom. Bei übermäßigem Alkoholkonsum erleiden Frauen und Männer in ungefähr gleichen Maße eine Pankreatitis (62). Mit zunehmenden Alter (> 65 Lebensjahre) steigt aber bei beiden Geschlechtern das Risiko für eine gallensteininduzierte Pankreatitis an (63). Die an dritter Stelle noch zu nennende relevante Größe ist die idiopathische Form der akuten Pankreatitis. Sie ist in weniger als zehn Prozent der Fälle für eine akute Exazerbation verantwortlich. Hierzu werden Ereignisse gezählt, denen kein eindeutiger ätiologischer Faktor zugeordnet werden kann. In den letzten Jahren wurde durch neue Erkenntnisse und Methoden die Zahl der Patienten größer, deren Leid beispielsweise aufgrund eines Gendefektes ausgelöst wurde und sich aus einem akuten in einen chronischen Verlauf entwickelte (64). Sonstige Ursachen für eine akute Pankreatitis haben nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtzahl aller Fälle. Im Einzelnen noch zu erwähnen sind die Hyperlipidämie (65), Medikamente (66) und iatrogene Ursachen (67). Inwiefern Fehlbildungen der Ausführungsgänge (68) oder ein Pankreas divisum (69) das Risiko für eine akute Pankreatitis wesentlich erhöhen, wird noch diskutiert. Betrachtet man je nach Studie die Gesamtmortalität der akuten Pankreatitis, so liegt die Sterblichkeitsrate im Durchschnitt in etwa zwischen fünf und zehn Prozent (70). Über achtzig Prozent der Fälle sind jedoch als milde, interstitielle, ödematöse Pankreatitis zu bewerten. Die Letalität liegt hier unter fünf Prozent (71). Nur circa 15 bis 20 Prozent aller akuten Pankreasentzündungen sind als schwere Verläufe einzustufen. Entwickelt sich hieraus jedoch die nekrotisierende Variante, so ist mit einer deutlich erhöhten Mortalität in 20 bis 25 Prozent der Fälle zu rechnen (57), (72). Liegt zusätzlich eine Superinfektion des nekrotisierten Gewebes vor, steigen die Zahlen weiter auf über 30 bis 40 Prozent (73). Kommt es zu diesem fatalen Verlauf, ist die Hälfte der Todesfälle bereits in den ersten ein bis zwei Wochen zu beklagen und in aller Regel mit einem Multiorganversagen (MOV) assoziiert (74). Die Wahrscheinlichkeit ein Organversagen zu entwickeln, steigt mit dem Erwerb einer Infektion. In Verbindung mit einem Multiorganversagen (MOV) erhöht sich die Mortalitätsrate dann auf bis zu 50 Prozent (63). Im Rahmen des SIRS/Sepsis Geschehens beziehungsweise des MOV sind letztlich dann Begleitkomplikation, wie Kreislaufversagen, eine Verbrauchskoagulopathie, ein akutes Nierenversagen oder das ARDS die Hauptursache für die Mortalität der akuten Pankre-

atitis (75), (76). Generell gilt: Patienten, die während eines Krankenhausaufenthaltes eine Pankreatitis entwickeln, haben eine ungünstigere Prognose.

### 1.4.1 Pathophysiologische Aspekte

Wie bereits beschrieben, liegen die inaktiven Proenzyme und Zymogene in der Acinus-Zelle vor und verhindern so eine Selbstverdauung der Zelle. Normalerweise findet eine Aktivierung erst nach dem Transport aus der Zelle in das Duodenum statt. Naheliegend und allgemein anerkannt ist, dass eine intrazelluläre Aktivierung der Zymogene die grundlegende Ursache einer akuten Pankreatitis ist. Die Acinus-Zelle antwortet darauf mit einer Inflamationsreaktion. Dass diese Annahme korrekt ist, lässt sich mit dem Nachweis aktivierter Enzyme in Pankreaszellen und histologisch erkennbaren Nekrosen in Pankreasgewebe führen (77).

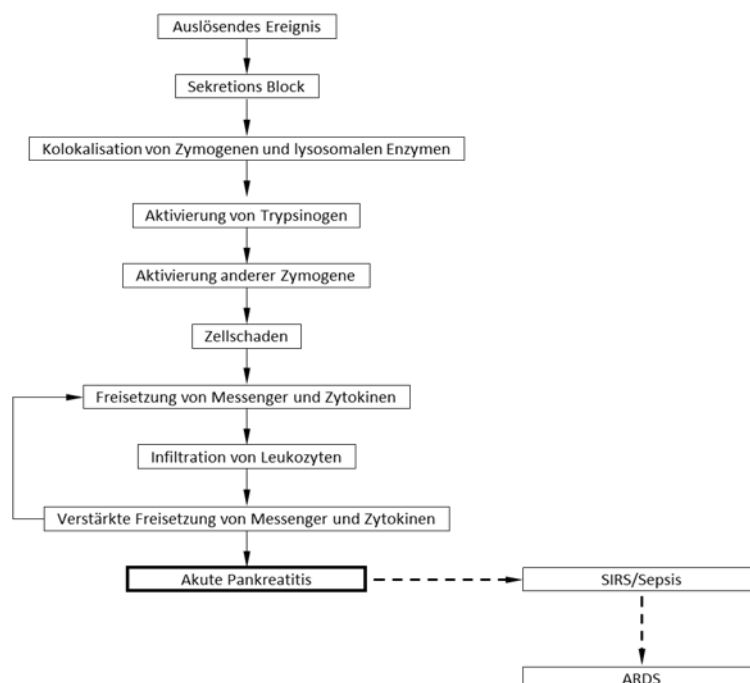


Abbildung 3: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Abläufe bei der akuten Pankreatitis (Quelle: nach Saluja und Steer)

### 1.4.2 Schwere der Pankreatitis anhand von Laborparametern und Ödemisierung

Zur Diagnose der akuten Pankreatitis gehören im Verbund der täglichen Praxis auch die Bestimmung von Laborparametern wie der Serum-Amylase und Lipase sowie der Cholestaseparameter. Zudem wird gerade Interleukin-6 bei der akuten Pankreatitis eine gute Korrelation zum Schweregrad und Krankheitsverlauf in der frühen Phase nachgesagt (78). Zusätzlich steht zur Diskussion, dass Interleukin-6 nicht nur Marker, sondern auch selbst als proinflammatorischer Faktor ein akutes Lungenversagen zumindest begünstigt (79). Keim et al. geben an, dass ein mindestens um den Faktor drei erhöhter Amylase-Wert im Serum gegenüber der Referenz gut geeignet sein soll, die Verdachtsdiagnose einer akuten Pankreatitis zu bestätigen (80). Die Serumbestimmung der  $\alpha$ -Amylase des Pankreas ist in Bezug auf Spezifität und Sensitivität bei einer Pankreatitis allerdings nur sehr schlecht geeignet und als alleiniges Diagnosekriterium unzureichend, da auch extrapankreatische Erkrankungen eine Erhöhung der Amylase nach sich ziehen können (81). Anhand der Amylase lässt sich jedoch im Tierversuch gut bestimmen, ob die Induktion mit Caerulein erfolgreich war. Die frühzeitige intrazelluläre Trypsinogenaktivierung ist wesentlich an der Pankreatitisauslösung beteiligt. Trypsin, beziehungsweise die physiologischer Weise in den Acini-Zellen vorliegende Vorstufe Trypsinogen, scheinen dabei relativ gut mit dem Schweregrad vor allem in der Frühphase der akuten Pankreatitis zu korrelieren (82). Einschränkend gilt dies zumindest für die alkoholassoziierte Pankreatitis und ist somit nur begrenzt auf andere Fälle übertragbar (83). Interleukin-6 gehört zur Gruppe der Zytokine und ist in der Regulierung von Inflamationsreaktion in einem Organismus beteiligt. Dabei scheint Interleukin-6 im Speziellen besser wie andere Entzündungsparameter bei der Pankreatitis eng mit der Schwere der Erkrankung zu korrelieren und ist möglicherweise auch ein geeigneter Faktor zur Prognoseabschätzung (84). Systemische Komplikation wie ein ARDS, SIRS oder MOF sind bei niedrigen Interleukin-6 Werten seltener zu erwarten. Die Myeloperoxidase ist ein lysosomales Enzym und wird unter anderem in neutrophilen Granulozyten gebildet. Die in das Lungengewebe eingewanderten Granulozyten lassen über die Aktivität der Myeloperoxidase Rückschlüsse auf eine systemische Inflammation zu.

onsreaktion (85) auch im Rahmen einer akuten Pankreatitis zu (86). Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten korreliert dabei gut mit dem Gewebeschaden (87). Zusätzlich zu den biochemischen Parametern, ist eine Beurteilung des Ödemisierungsgrades mit der Messung des Nass-/Trocken-Gewichtes als Marker für die Schwere einer Pankreatitis möglich. Gewebe das eine Inflammation durchläuft, lagert als Reaktion daraufhin Flüssigkeit in die Zellen ein und bildet eine ödematöse Veränderung. Eine derartige Veränderung ist bei physiologischen Vorgängen in der Pankreaszelle nicht zu beobachten.

### **1.4.3 Aktuelle Behandlungsmethoden**

Auch in der modernen Medizin ist die Behandlung der akuten Pankreatitis kausal nicht möglich und beschränkt sich im Wesentlichen auf supportive Maßnahmen. An oberster Stelle im Behandlungskonzept steht, wenn möglich, die Beseitigung und Vermeidung auslösender Faktoren. Wird bei gesicherter Pankreatitis eine biliäre Ursache mit Cholestase und Choledocholithiasis identifiziert, ist die zeitnahe ERC mit Sphinkterotomie und Steinentfernung die Methode der Wahl (88). Das Konzept der strikten Nahrungskarenz wurde zugunsten der früh-enteralen Ernährung aufgeben (89), da die Erhaltung der Darmmukosa sich günstig auf den Krankheitsverlauf auswirkt (90), (91). Vorteile bezüglich einer enteralen Ernährung über eine Magen- oder Jejunalsonde sind mit der aktuellen Studienlage nicht korrekt zu beantworten. Ebenso ist eine ausreichende Flüssigkeitssubstitution (92) und eine suffiziente Analgesie wichtig (93). Eine radiologische Bildgebung sollte bei progredienten Verläufen frühzeitig angestrebt werden. Eine kalkulierte antibiotische Therapie wird aktuell als nicht sinnvoll betrachtet und sollte nur bei Keimnachweis erfolgen (94).

### **1.5 Die Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK)**

Die MAP-Kinase Signalwege (engl.: Mitogen-Activated Protein Kinases → „MAPK“) haben im Rahmen dieser Arbeit eine bedeutende Rolle und bedürfen zum besseren Verständnis der pathologischen Prozesse der akuten Pankreatitis einer näheren Betrachtung.

tung. Der Begriff Mitogen leitet sich von dem Wort Mitose, - sprich der Zellteilung ab - und verrät uns dabei eine wichtige Aufgabe der Kinasen. Es ist davon auszugehen, dass MAP-Kinasen ubiquitär in eukaryoten Zellen zu finden sind (95). Parasekevas et al. konnten in in-vitro Kulturen isolierter pankreatischer Langerhans-Zellen von Kaninchen, Schweinen und Menschen sowohl die Existenz als auch eine vergleichbare Aktivität der MAP-Kinasen nachweisen (96). Zu Beginn der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die erste MAP-Kinase entdeckt und beschrieben. Bei den drei wichtigsten Vertretern der MAP-Kinasen Familie handelt es sich im Einzelnen um:

- SAPK/JNK
- p38
- ERK1/2

MAP-Kinasen gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die nach heutigen Erkenntnisstand eine zentrale Aufgabe bei der Zellteilung, Apoptose, Embryogenese, Differenzierung und Regulation inflammatorischer Ereignisse haben (97), (98). Gleichzeitig sind MAP-Kinasen Teil der physiologischen Zellfunktion, ohne die eine geregelte zelluläre Antwort auf bestimmte Stimuli vermutlich nicht möglich wäre (99), (100). Hierzu gehört auch der Aspekt der Zellprotektion (97). Die Großfamilie der MAP-Kinasen wird der Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen zugeordnet. Die über 100 bisher bekannten Proteine stehen dabei in einer hochkomplexen Verbindung zueinander und beeinflussen sich vermutlich gegenseitig (101). Die Basis dieser Arbeit beruht auf früheren Erkenntnissen, dass nachweislich eine Aktivierung aller hier beschriebenen MAP-Kinasen in Pankreasacinuszellen durch CCK beziehungsweise Caerulein stattfindet (102), (103), (104), (105), (106). Durch die zentrale Position in der Vermittlung von zellulären Entzündungsprozessen bei der akuten Pankreatitis und der Verfügbarkeit von pharmakologischen Hemmstoffen, stellen MAP-Kinasen einen möglichen medikamentösen Ansatzpunkt dar. So ist es möglich, durch die Inhibition von SAPK/JNK, p38 und ERK die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Interleukinen zu beeinflussen (107). Wie zuvor bereits angedeutet, ist die Funktion der MAP-Kinasen vielschichtiger als man zuerst angenommen hat. Während durch eine andauernde SAPK/JNK Aktivierung

die Pankreatitis weiter unterhalten wird (108), ist die Funktion von p38 nicht eindeutig festzulegen. Während eine Untersuchung die bisherigen Vermutung unterstützt, dass durch Inhibition von p38 vor allem die systemischen Entzündungsfaktoren verringert werden kann, zeigt eine andere Studie, dass die Inhibierung von p38 bei der Caerulein-induzierten Pankreatitis zu Organschäden führen kann (109).

Für gewöhnlich findet die Aktivierung der MAP-Kinasen über membranständige Rezeptoren statt. Das Besondere ist die Vielzahl der unterschiedlichsten Rezeptorfamilien und die Fülle der Stimuli, die in der Lage sind, Signale in das Zytosol zu vermitteln (110). Hierzu zählen Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder schlicht „zellulärer Stress“ (111) in Form von UV-Licht, Strahlung, Hitze, Noxen, osmotischen Druck (112). Zielstrukturen sind unter anderen beispielsweise die Gruppe der Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, RTK's (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) (113), Integrine und Rezeptoren der Superfamilie der G-Proteine. Diese sind nun unterteilbar in: EGF (Epidermal Growth Factor), der PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), TNF (Tumor Necrosis Factor) und weitere Zytokin- sowie Hormon-Rezeptoren, um eine Auswahl zu nennen (114), (115). Die intrazelluläre Domäne vieler Rezeptoren ist oftmals mit den „kleinen GTPasen“ (Small Guanosin Triphosphat (GTP) Binding Proteins) der RAS-Superfamilie eng assoziiert (116). Dies gilt besonders für die SAPK/JNK (99), (117), (118). Kommt es nun zu einer Aktivierung des Rezeptors, wirken diese als Schaltproteine und stehen somit am Beginn der MAP-Kaskaden Aktivierung (119), (120), (121). Zudem ist die direkte Aktivierung der SAPK/JNK möglich (122). Im Gegensatz dazu konnte bisher für ERK-1/2 ausschließlich eine rezeptorvermittelte Aktivierung durch Hormone und Wachstumsfaktoren bewiesen werden. Aktivierung von Proteinen durch Phosphorylierung ist bei zellulären Vorgängen weit verbreitet. MAP-Kinasen sind in ihrer inaktiven Form dephosphoryliert. Wird eine Phosphatgruppe mithilfe einer Proteinkinase an ein Zielmolekül kovalent gebunden, findet eine Konformationsänderung statt. Die dafür benötigte Energie wird für gewöhnlich durch ATP zur Verfügung gestellt. Diese Kinase ist nun ihrerseits in der Lage das für sie spezifische Substrat zu aktivieren (99). In aller Regel ist dieser Vorgang durch eine Protein-Phosphatase auch wieder umkehrbar (123). Da die Dephosphorylierung zur Inaktivierung der Kinase führt, ist

sie Teil des Regulationsmechanismus (124), (125), (126). Die katalytischen Regionen bei den für uns relevanten MAP-Kinasen bestehen jeweils aus einem spezifischen 3-Peptid-Sequenzmotiv. Bei ERK, SAPK/JNK und p38 ist die mittlere Aminosäure spezifisch für die Kinase, wird aber immer fix von Threonin und Tyrosin umschlossen (Thr – Aminosäure X – Tyr) (127), (128). Findet nun eine Aktivierung der Kinasen über die endständigen Threonin/Tyrosin Reste statt, spricht man bei MAP-Kinasen von einer dualen Phosphorylierung (129). Eine vollständige Aktivierung findet dabei immer über beide Andockstellen statt (99), (130), (131). Ein Merkmal aller MAP-Kinasen ist die sequenzielle Kinase-Kaskade, dargestellt in (Abbildung 4). Die Signalkaskade mündet darauf in eine 3-Stufige Kinase Kette ein. Am Ende stehen die eigentliche Ziel-MAP-Kinasen – SAPK/JNK, ERK oder p38 (132). Diese Kinasen sind nun in der Lage in den Zellkern zu translozieren, um dort wiederum selbst einen Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung zu aktivieren (133). Wie aus den Schaubildern ersichtlich, sind vor allem in der frühen Aktivierungsphase und ebenso bei den Ziel-Transkriptionsfaktoren Überschneidungen möglich (126), (134).

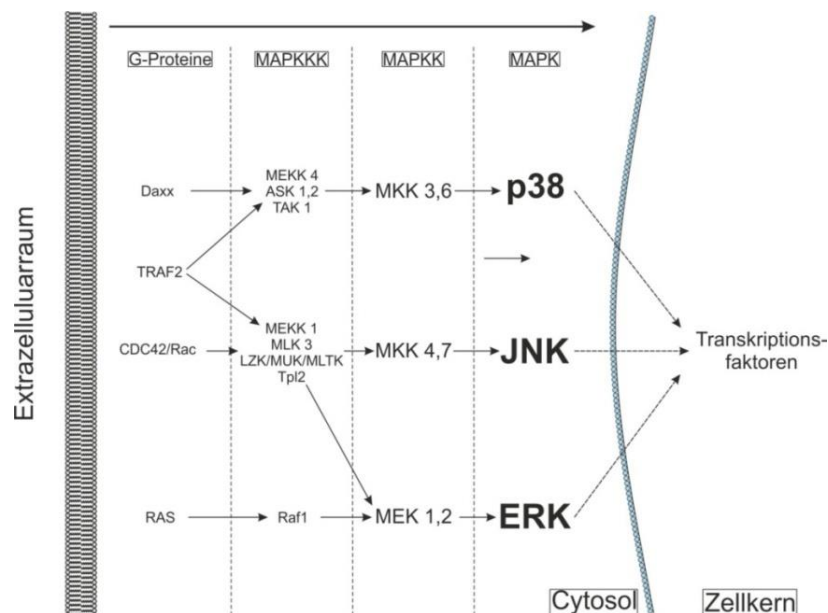


Abbildung 4: Signalkaskade der MAP-Kinasen (Quelle: von Cellsignal.com)

### 1.5.1 Die SAPK/JNK Kinase

Die SAPK (Stress Activated Protein Kinase) verdankte ursprünglich ihren Namen der extrazellulären Aktivierung durch sogenannten „Zellstress“ (135), beziehungsweise JNK für c-Jun N-terminale Kinase -sprich die Fähigkeit den Transkriptionsfaktor c-Jun an dessen N-terminalen Domänen mit den Serinresten 63 und 73 zu phosphorylieren und zu aktivieren (125), (136), (137), (138). Über Oberflächenrezeptoren oder direkt im Zytosol kommt es zur Initiierung der SAPK/JNK - Signalkaskade (122). Im Rahmen der Genexpression werden zwei unterschiedlich große Proteine hergestellt. Funktionelle Unterschiede zwischen der 46 kDa und der 54 kDa großen Variante konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden. Durch alternatives „Splicen“ können bis zu zehn weitere Isoformen entstehen (100), (125), (139). JNK1 und JNK2 scheinen in allen Zellen vorzukommen. Beide Isoformen haben eine hohe Übereinstimmung in Struktur und Regulation. Deutliche Unterschiede sind allerdings in ihrer katalytischen Wirkung zu erkennen. JNK2 bindet deutlich effektiver an den Transkriptionsfaktor c-Jun als JNK1 (140), (141). Wie bereits erwähnt, hat die SAPK/JNK eine zentrale Rolle bei der zellulären Inflamationsreaktion und ist in den Azinuszellen des Pankreas nachweisbar. Wird im Tierexperiment eine Caerulein-induzierte akute Pankreatitis ausgelöst, so ist die Phosphorylierung der SAPK/JNK eines der am frühesten zu beobachtenden Ereignisse. Bereits wenige Minuten nach Applikation ist eine deutliche Aktivitätssteigerung der SAPK/JNK messbar (142). Die Signalkette stützt sich dabei überwiegend auf G-Protein gekoppelte Kinasen. Dies sind meist bekannte Vertreter aus den Superfamilien der kleinen GTPasen (143), (144). Über zwischengeschaltete Kinasen wird dann die SAPK/JNK schließlich phosphoryliert und damit aktiviert (145), (146), (147), (148), (149). Die SAPK/JNK kann durch Dephosphorylierung jederzeit wieder in ihren inaktiven Zustand überführt werden. Die aktivierte SAPK/JNK ist nun ihrerseits in der Lage im Zellkern Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren und deren Transkription zu starten. Ziele der SAPK/JNK sind im Zellkern liegende Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, c-fos, AP-1 (SAP-1), Elk-1 oder auch ATF-2 (97), (125), aber auch das Zellzyklus kontrollierende p53 (150). Bei c-Jun handelt es sich um ein Leucin-Zipper-Protein und ist als



Glied innerhalb des Activator proteins-1 (AP-1/SAP-1) Komplexes beschrieben. AP-1 wiederum hat als Hauptzielgen c-Jun, was so zu einer positiven Rückkopplung führt (110), (151), (152). Zu der ohnehin bereits komplexen Kinasensteuerung kommt noch eine zusätzliche Regulierungsmöglichkeit über sogenannte „Scaffold-Proteine“ hinzu. Diese Träger- oder Vermittlerproteine können Proteinkomplexe bilden (153). Die SAPK/JNK interagiert in diesem Fall mit den Mitgliedern der JIP-Familie (c-jun-amino-terminal kinase-interacting proteins) (154), (155). Ist der Zelltod unausweichlich, so ist die Aktivierung des mitochondrialen Cytochrom C durch die SAPK/JNK ein wichtiger Baustein des pro-apoptotischen Weges (156).

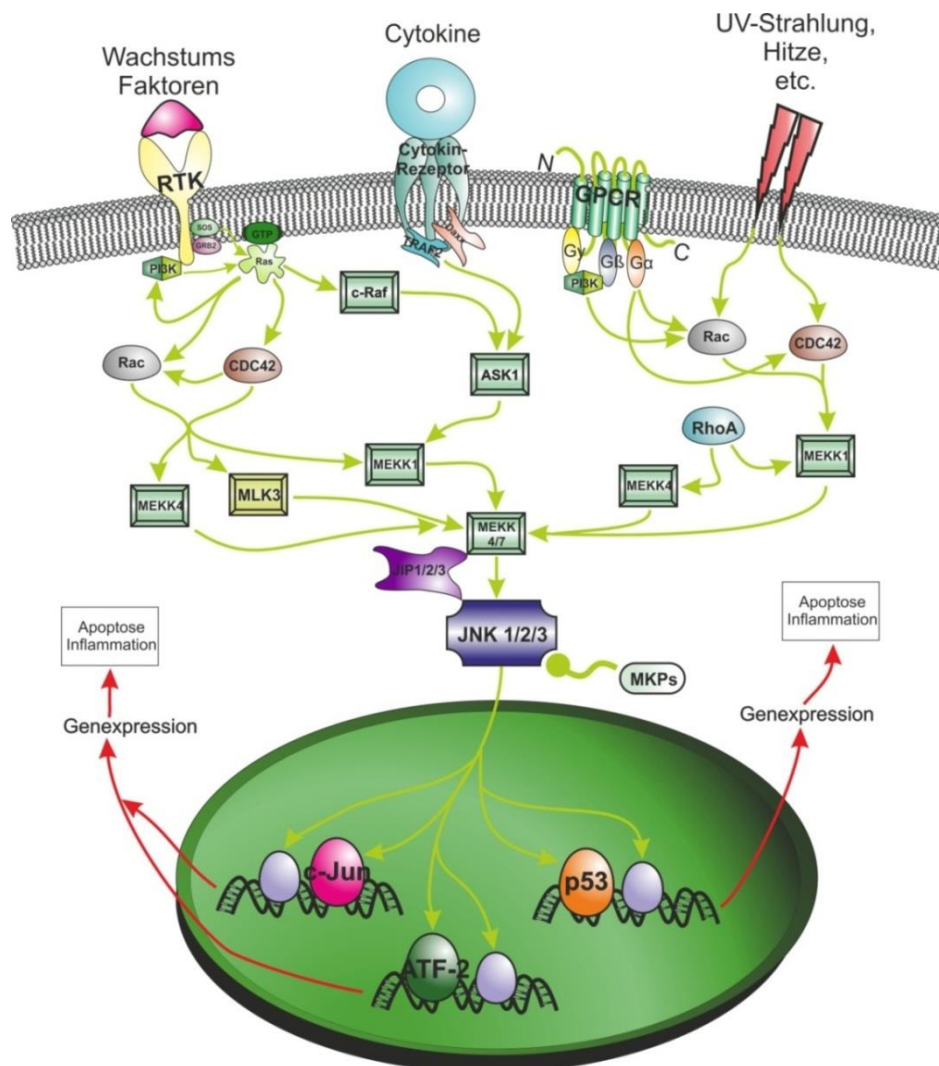


Abbildung 5: Vereinfachte Übersicht über den SAPK/JNK-Signalweg (Quelle: sabiosciences.com)

Im Zusammenhang mit der SAPK/JNK wird hauptsächlich über dessen Rolle als inflammatorisches Protein berichtet. Die SAPK/JNK hat aber auch physiologische Aufgaben (157), (158).

### 1.5.2 Die p38 Kaskade

Die zweite große Kinase-Familie ist nach dem Protein p38 benannt (159), (160). Die Namensgebung lässt sich durch das Molekulargewicht von 38 kDa ableiten (161). Bisher wurden vier Varianten (Alpha bis Delta) von p38 identifiziert (162). Nach Stimulation der membranständigen Rezeptoren läuft eine der zentralen Aktivierungskaskaden über das G-Protein gekoppelte Cdc42 (163).

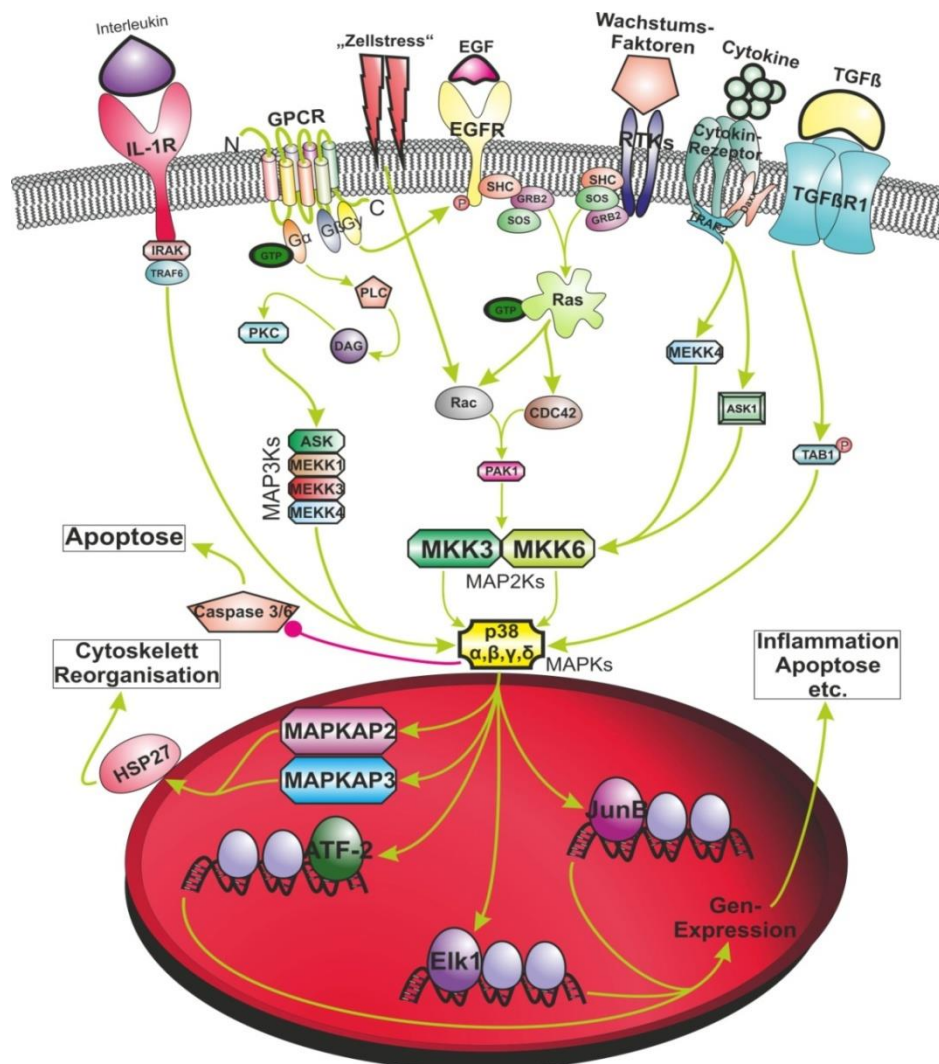


Abbildung 6: Vereinfachte Übersicht über den p38 Signalweg (Quelle: sabiosciences.com)

Durch vorgeschaltete Kinasen kommt es schließlich zur p38-Aktivierung (148). p38 aktiviert nun im Zellkern Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel ATF-1/2 oder CHOP (164). Aber auch Kinasen wie MAPKAP-2/3, die in dieser Arbeit von Bedeutung sind (97), (165) werden aktiviert. Wagner et al. konnten nachweisen, dass es nach Caerulein Gabe zu einer deutlichen Steigerung der p38-Expression in Pankreaszellen kommt (105). Die direkte Folge ist eine Zunahme nachweisbarer proinflammatorischer Zytokine und eine T-Zell-Proliferation (161), (166). Neuere Erkenntnisse zeigen das p38 eine Kinase mit zwei Gesichtern ist. Durch das Vorhandensein unterschiedlicher Isoformen ist es denkbar, dass p38 auch eine protektive Funktion ausüben kann (167). So vermittelt p38 über MAPKAP-2 eine Aktivierung von Hitzeschockproteinen wie zum Beispiel HSP-27 (168). Diese sind in die Regulierung des Aktincytoskeletts involviert und sind Teil der pathologischen Vorgänge bei der Pankreatitis (55), (104) siehe Punkt 1.6.2. In den letzten Jahren waren p38-Inhibitoren öfter Gegenstand medizinischer Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die pharmakologische Hemmung von p38 günstig auf die Behandlung der COPD auswirken kann (169), (170).

### **1.5.3 Der ERK-Kinase Weg (p44\42)**

Die „Extracellular Signal Regulated Kinase“ wurde 1990 als erster Vertreter der MAPK entdeckt. Der Name bezieht sich auf die Entdeckung, dass eine extrazelluläre Rezeptorstimulation zu einer intrazellulären Phosphorylierungs-Kaskade führte (171), (172). Die Abkürzung ERK-1 und ERK-2 oder die Bezeichnung p44\42 nach der Molekülmasse in Dalton sind üblich. Die Isoformen von ERK 1 und ERK 2 stimmen zu circa 85 % miteinander überein, wobei die Bindungsdomänen die größte Ähnlichkeit besitzen (171). ERK wird vermutlich ausschließlich über Oberflächenrezeptoren aktiviert (172). Diese Kinase nimmt ihren Platz wahrscheinlich nur in der regulatorischen Funktionen des Zellzyklus als Vermittler für Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation ein (173). Die ERK-Signal-Kaskade kann von einer Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren aktiviert werden. Darunter sind GPCR's (G-Protein Coupled Receptors), RTK's (Receptor Tyrosine Kinases) und Ionenkanäle. In gerichteter Abfolge kommt es intrazellulär zur Signalweitergabe (174). Exemplarisch hierfür ist die Stimulation von RTK's über Wachs-

tumsfaktoren. Kleine GTP bindende Proteine spielen dabei eine wichtige Rolle. Das Signal wird nun über den GRB2/SOS-Komplex an Ras weitergeleitet. Ras ist als Mitglied der Ras-Superfamily eine GTPase, die als Zielpunkt für viele zelluläre Aktivierungsvorgänge fungiert und somit eine zentrale Funktion bei der Signalweitergabe hat (175). Ras seinerseits stimuliert c-Raf (176), (177). Weiter über MEK1/2 kommt es schließlich zu einer Phosphorylierung von ERK 1/2 (178), (179). Als Zielfaktoren von ERK gelten Elk-1 und c-Myc, sowie MAPKAPK-1 und Mnk1/2 (97).

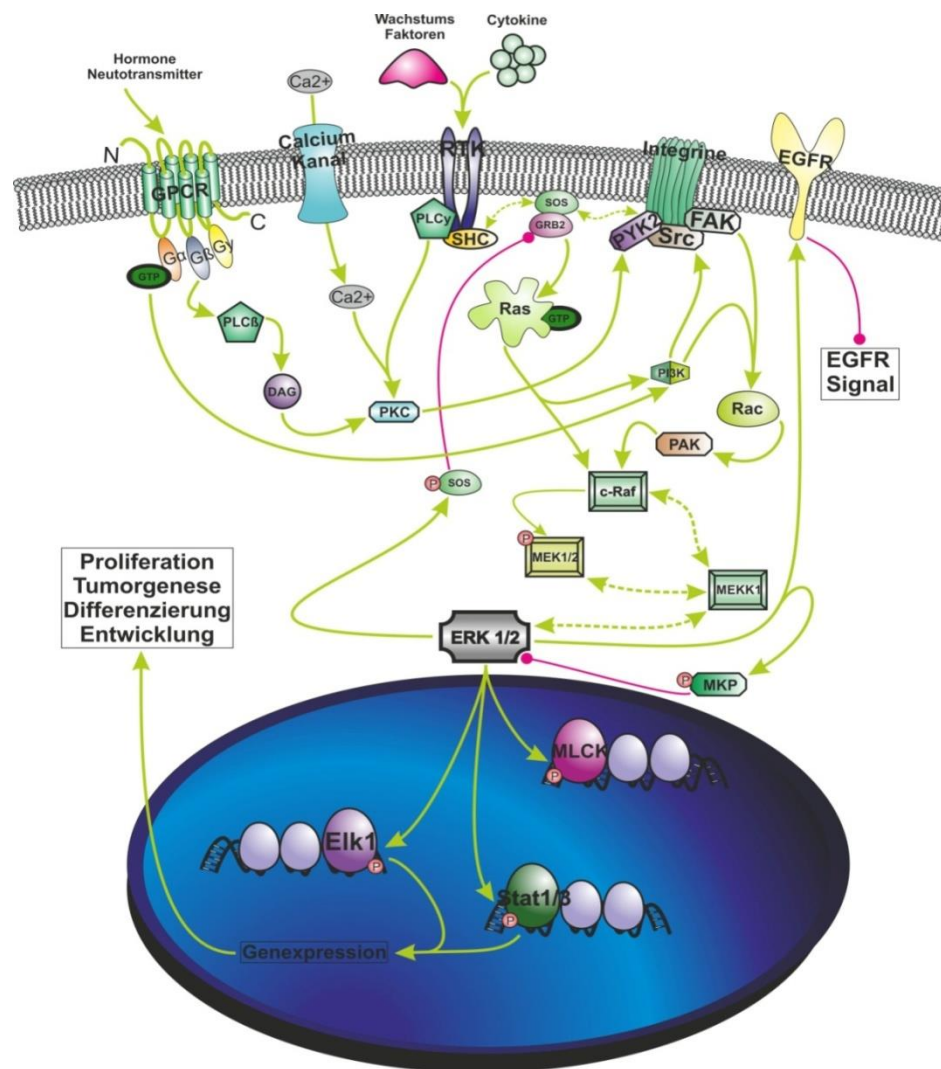


Abbildung 7: Vereinfachte Übersicht über den ERK-Signalweg (Quelle: sabiosciences.com)

Das nun aktivierte ERK-Dimer transloziert in den Zellkern und aktiviert durch Phosphorylierung seine Ziel-Transkriptionsfaktoren (98), (180). Durch die Rolle von ERK inner-

halb des Zellzyklus wird auch eine mögliche Beteiligung der Kinase im Rahmen der Tumorgenese diskutiert (181), (182).

### **1.6 MK-2 (-/-) Knock-out Tiere**

Unter Knock-out (-/-) versteht man das gezielte deaktivieren bestimmter Gene. Dadurch ist es möglich, bestimmte Fragestellungen zum Beispiel zur Funktion eines Genes zu beantworten. Ein wichtiger Baustein dieser Arbeit ist die Verfügbarkeit von MK-2/- Knock-out Tieren. Diese Linie wurden erstmalig aus C57BL (Wild-Typ) Mäusen generiert (183). Eine entsprechende Mauspopulation konnte im Rahmen einer früheren Arbeit aus Tieren der genetischen Reihe C57BL/6J erfolgreich in der Forschungsgruppe etabliert werden (184). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte somit auf ein bereits bestehendes Tierkontingent zurückgegriffen werden.

#### **1.6.1 MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAP-2-Kinase, MK-2)**

Die MAPKAP-2-Kinase gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und wurde von Stokoe et al. zuerst beschrieben (185). Es wurden bisher zwei Transkriptionsvarianten mit einer Masse von 60 kDa bzw. 53 kDa isoliert, die sich in ihrer Spezifität und Aktivität sehr ähnlich sind und wahrscheinlich durch alternatives „Splicen“ einer gemeinsamen mRNA entstehen (185), (186), (187). Die Kinase ist dabei in verschiedenste zelluläre Prozesse eingebunden. Sie ist Teil der Regulation bei der Genexpression. MK-2 bildet zusätzliche eine Kontrollstelle innerhalb des Zellzyklus bei der Zellproliferation beziehungsweise der Apoptose (188) und ist an der Vermittlung der zellulären Antwort auf Zellstress und Inflammation beteiligt. MK-2 ist bisher in allen untersuchten Zellarten nachgewiesen worden und ist ein Hauptsubstrat für die Kinase p38 (185). Wie bereits unter Punkt 1.5.2 erläutert hat p38 teilweise sich widersprechende Eigenschaften. Dies spiegelt sich an ihrem Substrat der MK-2 wieder. Auch hier gibt es eine teils pro-, teils anti-inflammatorische Komponente. Die aktivierte MK-2 führt zur Expression von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und TNF- $\alpha$  (183), (189), die beide maßgebliche Entzündungsmediatoren sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass MK-2-defiziente

Mäuse eine deutlich geringer ausgeprägte Caerulein-induzierte Pankreatitis erleiden als eine Vergleichsgruppe, die aus nicht-transgenen Mäusen besteht (184). Andererseits werden durch phosphoryliertes MK-2 außerhalb des Nucleolus Hitze-Schock-Proteine -im speziellen HSP 27- aktiviert (190), welches in diesem Zusammenhang einen zellprotektiven Effekt hat (160). Siehe unter Punkt 1.6.2. Gleichzeitig sind MK-2 Knock-out-Mäuse nicht oder nur in sehr geringem Maß in der Lage HSP 27 zu phosphorylieren (184). Im inaktiven Zustand ist MK-2 hauptsächlich im Nucleolus zu finden. Bindet phosphoryliertes p38 an den C-Terminus von MK-2, gehen beide Kinasen einen stabilen Komplex miteinander ein. Diese wird aus dem Kern in das umgebende Zytoplasma ausgeschleust und kann seiner Funktion nachkommen (191), (192). Im Gegenzug wird dabei phosphoryliertes p38 in den Zellkern transportiert (193).

### **1.6.2 Hitze Schock Proteine (HSP)**

Bereits 1962 wurde das erste Hitze-Schock-Protein (Heat-shock-protein, HSP) beschrieben (194) und 1974 wurde gezeigt, dass die Synthese dieser Proteine unter Zellstress zunimmt (195). Hitze-Schock-Proteine werden vermutlich ubiquitär in allen Zellen exprimiert und sind Teil der zelleigenen Schutzfunktion. Bei entsprechender Stimulation der Zelle kommt es zur Phosphorylierung der Hitze-Schock-Proteine, die dann ihrer Funktion als „Chaperone“ nachkommen und einen stabilen Komplex mit anderen Proteinen eingehen, um diese vor einer Denaturierung zu schützen (196), (197), (198). Auf diese Weise kann eine Zelle - bis zu einem gewissen Punkt - vor den negativen Auswirkungen einer Inflammationsreaktion geschützt werden (199). Dieses Ereignis ist auch bei der Caerulein-induzierten Pankreatitis zu beobachten (59). Vermittelt durch MK-2, kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Konzentrationen von Hitze-Schock-Proteinen in den Pankreasacinuszellen (168). Die aktivierten HSP 27-, 60 und 70 mildern die Entzündungsreaktion ab (55), (200), (201), (202), (203), (204). Bei HSP 27 kommt ein weiterer wichtiger Faktor in der Aktinfilamentformung und Polymerisation des Zytoskelettes hinzu. Dies geschieht durch Anlagerung von HSP 27-Oligo- und Monomeren an das Zytoskelett. Wie an anderer Stelle beschrieben, ist die Aufrechterhaltung der Aktinfilamente für die Entwicklung der Pankreatitis von Bedeutung (205),

(206), (207). Die Integrität des Zytoskelettes hinreichend zu stabilisieren scheint eine zentrale Aufgabe zu sein, um das Überleben der Zelle im Ganzen zu sichern (208), (209).

### **1.7 Die Fragestellung zu dieser Arbeit**

Im Rahmen dieser tierexperimentellen Arbeit sollten folgende Fragestellungen erarbeitet werden:

- Verringert die pharmakologische Hemmung der SAPK/JNK-Kinase mittels SP 600125 die Inflamationsreaktion der Caerulein-induzierten Pankreatitis im in-vivo Experiment?
- Hat die zusätzliche pharmakologische Hemmung der SAPK/JNK bei MK-2 Knock-out-Mäusen mittels SP 600125 einen zusätzlichen anti-inflammatorischen Effekt?

## 2. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und Methoden näher beschrieben. Sämtliche Analysemethoden und biochemische Verfahren wurden über einen Zeitraum von mehreren Wochen unter der Aufsicht einer erfahrenen MTA und Biologin erlernt. Die Datenerfassung erfolgte mit Microsoft „Excel®“. Diese Arbeit wurde mit Microsoft „Word®“ erstellt. Die am Ende aufgeführte Publikationsliste wurde mit der programminternen Funktion von MS Word® generiert und verwaltet. Zur statistischen Datenaufbereitung wurde die Software „R“ in der Version 3.1.2 benutzt. Die vorliegende Arbeit wurde auf einem Notebook der Firma Fujitsu-Siemens geschrieben.

### 2.1 Gerätschaften

Firma	Technisches Gerät
Agfa-Gevaert AG, Mortsel, BE	Agfa Curix 60
Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK	Power Supply Ultrospec 3100 pro
Bandelin Electronic, Berlin, Dtl	Sonoplus Bandelin HD 2070
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl	Kanülen, 27G
BioRad, München, Dtl	Blot Kammer, Kämme, Glasplatten
B. Braun, Melsungen, Dtl	Wasserbad Thermomix 1441
Corning, NY, USA	Stripette (2ml – 25ml)
Drägerwerk, Lübeck, Dtl	Isofluran Verdampfer
Eppendorf AG, Hamburg, Dtl	MiniSpin Zentrifuge, Pipetten, Zentrifuge 541712
Fröbel Labortechnik, Lindau, Dtl	Kreisrüttler Rocky 3D
GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK	Ultrospec 3100pro Spektrophotometer
GFL, Burgwedel, Dtl	Wasserbad GFL 1083
Hettich, Dtl.	Zentrifuge EBA 12R
Hybraid	Mini Oven Trockenofen
IKA Werke, Staufen, Dtl.	Magnetrührer RTCbasic



## Materialien und Methoden

Kinematika, Luzern, Ch	Polytron Homogenisator PT 2100
Liebherr, Bulle, CH	KT 1840 (4 °C.) Kühlschrank
Millipore, Billerica, USA	MilliQ A10TOC Entsalzungsanlage
NeoLab, Heidelberg, Dtl	Vortex Mixer 2020
PerkinElmer, Waltham, USA	Luminescence Spectrometer LS 50B
Sarstedt, Nümbrecht, Dtl	Einmal-Küvetten, 10x4x45mm Ref. 67.742
Satorius, Göttingen, Dtl	Analysenwaage
Scaltec, Heiligenstadt, Dtl	Waage
Schleicher & Schüll, Dassel, Dtl	Gel-Blotting Papier, Nitrocellulosemembran „Protran“
Schütt Biotech, Göttingen, Dtl	HomogenPlus, Teflon-Pistille, Glaskolben konisch 40ml
Techne, Jahnsdorf, Dtl	DriBlock DB 2A Heizblock
VWR-Jencons, West Sussex, UK	Folienschweißgerät
WTW, Weilheim, Dtl.	pH Meter InoLab pH Level 1

Tabelle 1: Liste der Gerätschaften

## 2.2 Chemikalien und Materialien

Firma/Hersteller	Präparat/Artikel	Artikelnummer, Vollnamen	Verwendungszweck
Abbott GmbH & Co. KG Wiesbaden, Dtl	Forene	Isofluran (1-Chloro-2,2,2,-trifluorethyl-difluoromethylether)	Narkosegas
Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, Dtl	Adefo GV60	Fixierkonzentrat	Röntgenfilmentwicklung
AMERSHAM BIOSCIENCE Freiburg, Dtl	Anti-mouse IgG	peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) NA 931	Zweit-Antikörper für Western-Blot
	Anti-rabbit IgG	peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey) NA 934	
Bachem, Bubendorf, CH	Trypsin Substrat	Bachem I-1550	Substrat zur Trypsinbestimmung
BIO RAD, München, Dtl.	Blotting Grade	Blocking Non Fat Dry Milk	Blocksubstanz für Western-Blot
	Protein Dye	Protein Assay Dye reagent concentrate	Proteinbestimmung nach Bradford
	TEMED	Tetramethylethyldiamin	Quervernetzung des SDS-Gel Pages
Carl Roth GmbH+Co. KG Karlsruhe, Dtl	Tween 20	Polyoxethylene-Sorbitan-Monolaurate	Blocking-Lösung
Cell Signaling Technology Frankfurt/Main, Dtl	phospho p38	Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody #9211	Erst-Antikörper für Western-Blot
	phospho SAPK/JNK	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody #9251	

	phospho p44\42	Phospho-p44\42 MAPK (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb #9106	
	SAPK/JNK	SAPK/JNK Antibody #9252	
	p44\42	p44\42 MAP Kinase Antibody #9102	
FLUKA Biochemika Seelze, Dtl.	BSA	Bovines Serum Albumin	Blocking-Lösung
	SDS	Sodium dodecyl sulfat $C_{12}H_{25}NaO_4S$	
Merck Chemicals, Darmstadt, Dtl	TRIS	Tris(hydroxy-methyl)- aminomethan	Puffer
	Proteaseinhibitor-Set	Cat# 539131	Proteaseinhibition
Pharmacia&Upjohn Uppsala, S	Glycin	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Amylase-Bestimmung
	Phadebas®	Phadebas®Amylase-Test	Amylasemessung
R&D Systems. Inc., Minneapolis, USA	ELISA IL6 Kit	Quantikine® Mouse IL-6 Kit	IL-6 Bestimmung
Röntgen Bender GmbH & Co. KG, Baden-Baden, Dtl	Vision GV 60	Entwicklerkonzentrat	Röntgenfilmentwicklung
Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA	p38 (C-20)	sc-535	Erst-Antikörper für Wes- tern-Blot
Sigma-Aldrich Seelze, Dtl.	Wasserstoffperoxid	$H_2O_2$ 30%	
	MOPS	(3-N-Morpholino) propanesulfo- nic acid	Pufferlösung
	o-Dianisidine	Dimethoxybenzidin	Redoxindikator
	Caerulein	pGlu-Gln-Asp-Tyr-[SO <sub>3</sub> H]-Thr-Gly- Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	CCK-Analogon zur Pankrea- titis Induktion
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Komplexbilder
	APS	Ammoniumpersulfat $(NH_4)_2S_2O_8$	Polymerisationsreaktion im SDS-Gel
	Trypsin	T-4665	Kalibrier-Kontrolle
	SBTI	Trypsin inhibitor, Type I-S From Soybean T9003	MPO Bestimmung
	PMSF	Phenylmethylsulfatflourid	Proteaseinhibitor
	Natrium orthovandate	$Na_3VO_4$	Proteaseinhibitor
TocrisCooksonInc., Ellisville, USA	SP 600125	Cat. No. 1496	JNK-Inhibitor

Tabelle 2: Liste der Materialien

### 2.3 Die verwendeten Puffer

Die in den Versuchen verwendeten Puffer wurden frisch angefertigt oder in einem kurzen Zeitraum zuvor angesetzt und entsprechend kühl gelagert. Die Mengenangaben der verwendeten Chemikalien für die Herstellung der Pufferlösungen sind in Gramm oder Milligramm und jeweils auf die Menge von 1000 ml angegeben. Abweichende Mengen sind vermerkt. Der pH-Wert wurde je nach Notwendigkeit mit HCl oder KOH korrigiert.

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Herstellung des Standards zur Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Methode nach Bradford beruht darauf, dass die enthaltene Proteinmenge einer Probe sich bei einer photometrischen Messung gegenüber dem Nullwert proportional verhält. Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau G-250 hat ein Absorptionsmaximum von 465 nm. Geht der Farbstoff mit den Proteinen einen Komplex ein, ändert sich das Absorptionsmaximum, welcher im Photometer gemessen werden kann (210), (211). Die Proteinbestimmung erfolgt mithilfe eines Photometers, BSA-Lösung und Protein-Dye. Aus einer Stammlösung von 1mg/ml wird eine Standardkurve (siehe Tabelle 3: Standard nach Bradford) hergestellt. Anschließend wird eine 1:5-Verdünnung aus Protein-Dye und destilliertem Wasser als Arbeitslösung hergestellt. In 1 ml Arbeitslösung wird nun 20 µl BSA-Lösung in aufsteigender Konzentration in vier Küvetten pipettiert und geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit fünf Minuten wird nun photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm zuerst ein Nullabgleich mit der Arbeitslösung, dann die vier folgenden Werte in aufsteigender Konzentration bestimmt. Der Standard sollte nun eine lineare Progression zeigen.

Tabelle 3: Standard nach Bradford

BSA-Stock	Aqua dest.	Konzentration BSA
20µl	80µl	0,2mg/ml
40µl	60µl	0,4mg/ml
60µl	40µl	0,6mg/ml
80µl	20µl	0,8mg/ml

Die nun zu messenden Proben wurden zuvor in einer Verdünnungsreihe 1:10 bzw. 1:20 mit Aqua destillata vermischt. Als Startmenge wird aus diesen Verdünnung mit 10 oder 20 µl begonnen. Die Messung wird wie bei der Standardbestimmung durchgeführt. Im Fall dass die Konzentration die Standardkurve über- bzw. unterschreitet, wird die Menge der eingebrachten Probenmenge korrigiert. Dies wird in der anschließenden Berechnung berücksichtigt. Der erfolgte Farbumschlag des Protein-Dye wird vom Photometer in einen logarithmischen Zahlenwert ausgegeben und direkt in eine Excel Ta-

belle übertragen. Anhand dieses Wertes und der eingebrachten Menge wird nun die Protein Menge des Lysates errechnet. Diese Methode der Proteinbestimmung erfolgte sowohl bei der Herstellung von Western-Blot Proben als auch bei der Trypsinbestimmung.

### 2.4.2 Messung der Amylase

Zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase im Blutserum wurde ein Amylase-Reagenz (Phadebas®) der Firma Pharmacia & Upjohn, Schweden verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Dieser Test beruht auf dem Prinzip der Fällungsreaktion. Wird die Phadebas®-Tablette in die Pufferreagenz gegeben, fällt der an Stärke gebundene wasserunlösliche Farbstoff aus. Durch Zugabe von Amylase wird die Stärke gespalten und der Farbstoff kann sich im Medium lösen. Der Farbumschlag kann nun photometrisch bestimmt werden.

Tabelle 4: Amylase-Puffer

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>1000 ml</b>
<b>NaCl</b>	2,92 g
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	2,4 g
<b>NaN<sub>3</sub></b>	0,2 g
<b>pH 7,4</b>	

Tabelle 5: Stop Lösung für Amylase Reaktion

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>1000 ml</b>
<b>NaOH</b>	20 g

Das Testreagenz wurde unter permanentem Rühren angesetzt. Zu 28 ml Amylase-Puffer wurden 2 Phadebas-Tabletten® gegeben. Jede Probe bestand aus 10 µl Serum, in die jeweils 1020 µl Testreagenz gegeben wurden. Für den Nullabgleich und als Negativprobe wurde ein Reagenz mit Aqua destillata vermischt. Nach Vortex-Mischung der Reagenzgläser folgte unter ständigem Schütteln eine fünf-minütige Inkubation im Wasserbad bei 37° Celsius. Die Fällungsreaktion wurde durch die Zugabe von je 300 µl einer 0,5-molaren NaOH-Lösung zum Stoppen gebracht. Zu jeder Probe wurden nun 4 ml H<sub>2</sub>O zugefügt und im folgenden Schritt bei 4° Celsius und 4000 rpm abzentrifugiert.

Aus dem Überstand wurde 1ml entnommen und in Messküvetten gegeben. In Relation zum Nullwert wurden die Proben im Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die aus den Proben resultierenden Absorptionen wurden mit dem Verdünnungsfaktor 725 multipliziert, woraus sich die Aktivität der Amylase in U/l berechnen lässt.

### 2.4.3 Messung der Myeloperoxidase (MPO)

Eine Möglichkeit die systemische Entzündungsreaktion zu messen, ist die Bestimmung der Myeloperoxidase in den neutrophilen Granulozyten, die in das Lungengewebe eingewandert sind. Die ursprüngliche Messmethode geht auf Mullane et. al. zurück (87). Die nach Bhatia et al. beschriebene Methode zur Bestimmung der MPO-Aktivität aus Lungengewebe, wurde zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe angepasst und war bereits etabliert (55), (212).

Tabelle 6: MPO Homogenisationspuffer

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>1000 ml</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>40 mM = 2,72 g</b>
<b>pH 7,4</b>	
<b>4° C.</b>	

Tabelle 7: MPO Extraktionspuffer Gebrauchslösung

<b>SBTI</b>	<b>1 ml = 200 µM</b>
<b>PMSF</b>	<b>2 ml = 2 mM</b>
<b>Hexadecyltrimethylammoniumbromid 5%</b>	<b>5 g in 100 ml Messpuffer</b>
<b>Extraktionspuffer Stock</b>	<b>5 ml ad 100 ml Aqua</b>

Tabelle 8: MPO Messpuffer

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>1000 ml</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>100 mM = 6,8 g</b>
<b>pH 6,0</b>	
<b>Raumtemperatur</b>	

Tabelle 9: MPO Extraktionspuffer Stock Lösung

<b>5mM EDTA</b>	<b>= 186mg/100 ml Messpuffer</b>
<b>ph 6,0</b>	
<b>bei 4° C.</b>	

Tabelle 10: Soy Bean Trypsin Inhibitor (SBTI) in Hepes-Ringer Puffer

<b>SBTI</b>	<b>100 µM in Hepes-Ringer Puffer</b>
<b>Hepes-Ringer Puffer ph 7,4</b>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (Sigma) gelagert bei -20° C.

Tabelle 11: Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

<b>PMSF</b>	<b>1 mM 1:1 gelöst in Methanol/Isopropanol</b>
<b>-20° C.</b>	

Tabelle 12: Sonstiges

<b>Wasserstoffperoxid</b>	<b>7 µl / ml Messpuffer auf Eis</b>
<b>Hexadecyltrimethyl- ammoniumbromid 5%</b>	Gelagert bei Raumtemperatur

Das entnommene Gewebe wurde am Präparationstag gewogen, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C verwahrt. Bei der Herstellung der Proben wurden zwischen 50 und 100 mg Lungengewebe verwendet. Die Homogenisation des Gewebes erfolgte in einem entsprechend für diesen Zweck hergestellten MPO-Homogenisationspuffer im Verhältnis 1:10 (Gewebegewicht x 9 = Menge Homogenisationspuffer). Mit einem Polytron-Homogenisator wurde das Gewebe mit dem Douncer bei 2400 rpm in einem mit Eis gekühlten Glaskolben homogenisiert. Nach Überführung des Lysates in Plastik Tubes erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 10000 G und einer Temperatur von 4° Celsius, der Überstand wurde verworfen. Das zurückbleibende Gewebepellet wurde im Folgenden mit Extraktionspuffer vermischt (500 µl oder 300 µl bei Ausgangsgewicht < 50 mg) und mit Hilfe eines Spatels wieder resuspendiert. Zur weiteren Auflösung der Zellstrukturen wurden die Gewebepellets nun im Wechsel je vier Mal zuerst in flüssigen Stickstoff schockgefroren und im Anschluss für je fünf Minuten im Wasserbad bei 37° Celsius wieder aufgetaut. Abschließend erfolgte die Ultraschallsonifizierung der Proben. Alle Lysate wurden jeweils zwei Mal mit einer Leistungsabgabe von 75% bei einer Wiederholungsrate von 7 x 10 Zyklen/min über einen Zeitraum von zehn Sekunden bearbeitet. Nach erneuter Zentrifugation bei 4° Celsius, 10000 G für fünf Minuten, konnte der Überstand abpipettiert werden. Bei nicht sofort erfolgter Messung wurden die Proben schockgefroren und bei – 80° Celsius verwahrt. Nach Vorbereitung der Proben wurde mit dem Photometer bei 460 nm die Absorption

gemessen. Hierzu wurde aus 880 µl MPO-Messpuffer, 10 µl o-Dianisidin-Lösung und 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein Reaktionsgemisch hergestellt. Zuerst erfolgte die Bestimmung des Leerwertes über 60 Sekunden. Im Anschluss wurden in die Küvetten je 100 µl der zu messenden Probe pipettiert. Die nun ablaufende Reaktion wurde über 240 Sekunden photometrisch gemessen. Die Aktivität der Myeloperoxidase ist nun mit dem Feuchtwicht des Lungengewebes und der gemessenen Absorption der Steigung berechenbar.

### 2.4.4 Messung der Trypsin-Aktivität

Die Messung der Trypsin-Aktivität wurde nach der Methode von Kawabata et. al. durchgeführt (213) und geringfügig an die Bedürfnisse innerhalb der Arbeitsgruppe adaptiert (55). Die Bestimmung der Aktivität wurde fluorometrisch mit einem Lumineszenz Spektrometer durchgeführt. Dabei wird eine bestimmte Menge Standard-Substrat (Boc-Glu-Ala-Arg-MCA•HCl) der Probe beigemischt und einer Anregungswellenlänge von 380 nm ausgesetzt. Aktiviertes Trypsin kann dieses Substrat nun in einer fluoreszierenden Reaktion spalten. Die Messung erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 440 nm. Die Trypsin-Aktivität ist proportional der zeitlichen Zunahme der Emission. Anhand einer Standardkurve kann die Aktivität berechnet werden.

Tabelle 13: TAB-Puffer (Trypsin-Assay-Buffer)

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>100 ml</b>
<b>TRIS Base</b>	50 mM = 0,605 g
<b>NaCl</b>	150 mM = 0,876 g
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1 mM = 0,0147 g
<b>BSA</b>	0,01 g
<b>pH 8,1</b>	
<b>Verwahrung bei 4° C.</b>	
<b>Gebrauch bei Raumtemperatur</b>	

Tabelle 14: MOPS-Puffer

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>100ml</b>
<b>Sucrose</b>	8,55g
<b>MOPS</b>	0,104g
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,024g
<b>pH 6,5</b>	
<b>Verwahrung und Gebrauch bei 4° C.</b>	

Tabelle 15: Sonstiges

Substrat	Boc-Glu-Ala-Arg-MCA•HCl Bachem I-1550
Stammlösung	10 mM Substrat in DMSO verwahrt bei 4° C.
Arbeitslösung	1:50 verdünnt in H <sub>2</sub> O
Trypsin Standard	Sigma T-4665 10 mg/ml verwahrt bei 4° C.

Vor Beginn jeder Messung wurde eine Trypsinverdünnungsreihe (Tabelle 16: Trypsinverdünnungsreihe) zur Bestimmung der Standard Eichgeraden erstellt und die Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit gemessen.

Tabelle 16: Trypsinverdünnungsreihe

V1	100 µl/ml	10 µl Aliquot + 990 µl TAB
V2	1 µl/ml	10 µl V1 + 990 µl TAB
V3	100 ng/ml	100 µl V2 + 900 µl TAB
V4	10 ng/ml	100 µl V3 + 900 µl TAB

Zur Herstellung der Substratarbeitslösung wurden 20 µl Substrat-Stock in 980 µl H<sub>2</sub>O gegeben, mit Alufolie vor Licht geschützt und auf Eis gestellt. Zur Bestimmung der Trypsin-Aktivität der Proben wurde ein Pankreasstück mit einem Gewicht zwischen 50 mg und 100 mg zunächst in 1000 µl MOPS-Puffer mit einem Douncer bei 2400 Umdrehungen pro Minute lysiert. Die Abzentrifugation des Lysates erfolgte mit der auf vier Grad Celsius abgekühlten Zentrifuge bei 3000 Umdrehungen für fünf Minuten. Der Überstand wurde daraufhin separiert, das Pellet verworfen. Die Proteinmenge des Überstandes wird mit der bereits beschriebenen Methode nach Bradford (siehe 2.4.1) bestimmt. Die so hergestellten Lysate wurden entweder sofort zur Messung verwendet oder andernfalls bei -80°C. gelagert. Im Doppelansatz wurden nun die Proben gemessen. Dabei wurden in die Küvetten je 900 µl TAB-Puffer, 50 µl Probe und 100 µl Substratarbeitslösung gegeben. Anhand der Messgeraden der Proben, im Vergleich zur Steigung der Standardgeraden, ist es mit der zuvor ermittelten Proteinmenge möglich, die Trypsin-Aktivität in mU/mg Protein zu berechnen.



### 2.4.5 ELISA für IL-6 Bestimmung

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches von T-Zellen und Makrophagen beispielsweise im Rahmen einer Infektion die Immunantwort stimuliert (214). IL-6 ist auch bei der Pankreatitis erhöht (184) und ist möglicherweise bei schweren und nekrotisierenden Pankreatitiden ein geeigneter Prädiktor für den Verlauf der Infektion (84).

Tabelle 17: ELISA Kit

Waschpuffer	25-fach konzentrierte Surfactant
Color-Reagent	Reagent A:
	12,5 ml Hydrogenperoxid
	Reagent B:
	12,5 ml Tetramethylbenzidin
Stopp-Lösung	HCl

Zur Bestimmung von IL-6 wurde ein ELISA Kit der Firma R&D verwendet (Quantikine® Mouse IL-6, Immunoassay, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Die Messung erfolgte gemäß der beiliegenden Anleitung. Zunächst wurden die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht, um im Anschluss aus dem mitgelieferten Calibrator Diluent eine Standardverdünnungsreihe herzustellen. Beginnend mit einer Konzentration von 500 pg/ml (1:1), wurde diese Reihe in absteigender Konzentration fortgesetzt, bis eine Verdünnung von 7,8 pg/ml (1:64) erreicht wurde. Die zu benutzenden „Wells“ auf der Platte wurden nun mit 25 µl Assay Diluent befüllt. Nun wurden je 50 µl der Standardverdünnungsreihe in aufsteigender Konzentration in die „Wells“ pipettiert. Im folgenden Schritt wurden die restlichen „Wells“ dann mit je 50 µl der vorbereiteten Serumprobe befüllt. Zur Kontrolle diente ein nur mit Calibrator Diluent gefülltes „Well“. Die nun fertig beladene ELISA-Platte wird für eine Minute mit der Hand geschüttelt, mit einer Klebefolie verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation der Platte wurde der Inhalt der „Wells“ verworfen. Es folgen insgesamt fünf Waschgänge, bei dem die „Wells“ in jedem Durchgang mit 300 bis 400 µl der Waschlösung (25 ml Konzentrat und 600 ml H<sub>2</sub>O) gespült wurden. Im Anschluss an den letzten Waschgang wurde die Platte mehrmals ausgeklopft, um eventuell noch

vorhandene Reste vollständig zu entfernen. Nun wurde das Konjugat vorbereitet. 100µl der zuvor hergestellten Lösung wurden mit der Multipipette in jedes „Well“ eingebracht. Die anschließende Inkubationsphase bei Raumtemperatur dauerte wiederum zwei Stunden. Der zweite Waschgang wurde wie bereits im vorherigen Absatz beschrieben durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde eine Färbelösung aus den mitgelieferten Color-Reagentien A+B im Verhältnis 1:1 angesetzt. In jedes „Well“ wurden 100 µl pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubationszeit im Dunkel und bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Zeit wurden in die „Wells“ je 100 µl Stopplösung gegeben. Die Absorption der Proben konnte nun im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden. Die Datenausgabe erfolgte in eine Excel-Tabelle.

### **2.4.6 SP 600125: ein selektiver SAPK/JNK Kinase-Inhibitor**

Der verwendete pharmakologische Hemmstoff SP 600125 ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Anthrone. Anthrone gehören zur Hauptgruppe der trizyklischen aromatischen Ketone. Anthrapyrazolone beziehungsweise deren Strukturverwandten Substanzen sind ursprünglich Stoffe, die in der Onkologie Anwendung finden (215). Ein bekannter Vertreter ist Doxorubicin. Pharmazeutika dieser Art greifen im Rahmen der mitotischen Teilung in den Zellzyklus ein und verhindern die Ausbildung des Spindelapparates und stoppen die weitere Zellteilung. SP 600125 (1,9-Pyrazoloanthrone) als synthetisiertes Derivat dieser Wirkstoffklasse ist als biochemischer Inhibitor in der Lage an die SAPK/JNK (c-Jun-terminale Kinase) zu binden und somit dessen katalytische Funktion zu blockieren. SP 600125 steht dabei in kompetitiver Konkurrenz mit ATP zur ATP-Bindungsstelle. Dadurch ist die Wirkung von SP 600125 dosisabhängig und reversibel. Wie bereits von anderen Kinaseinhibitoren bekannt, ist die Wirkungsweise auch in diesem Fall eng an das Vorhandensein einer freien NH-Gruppe innerhalb des Moleküls gekoppelt (216). Als Folge, dass SP 600125 eine Aktivierung von JNK durch Phosphorylierung erfolgreich verhindert, sind die Substrate von JNK – die Transkriptionsfaktor c-Jun, ATF-2, etc. ebenfalls inhibiert. Dadurch

kann theoretisch die Expression weiterer proinflammatorischer Verbindungen wie beispielsweise Interleukine verhindert werden (217), (218).

In der Literatur wird SP 600125 als hochselektiver Inhibitor beschrieben. In Messungen gegenüber den nahen Verwandten MAP-Kinasen bestätigt sich dies. Allerdings scheint bei höherer Konzentration von SP 600125 zumindest teilweise eine Blockierung von p38 und ERK-2 möglich (219).

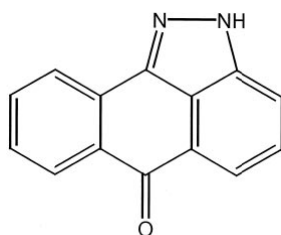


Abbildung 8: Struktur SP 600125 (Quelle: chemicalbook.com)

50 mg der Chemikalie wurde von der Firma Tocris (Tocris Cookson, USA) bezogen. In seiner Ausgangsform hat SP 600125 eine gelbe, kristalline Struktur. Aufgelöst wurde es gemäß Vorgabe der Herstellerfirma in Dimethylsulfoxid (DMSO). Die 10-fach Stock Lösung wurde mit 3,3 ml DMSO angesetzt und bei Bedarf Gebrauchsfertig auf eine Konzentration von 1,5 mg/ml (1:10) mit NaCl 0,9 % verdünnt. Gewichtsadaptiert wurde eine 6,7 % DMSO/NaCl-Lösung 15 µg/kg KG den Tieren i.p. gespritzt.

### 2.5 Induktion der Pankreatitis mit Caerulein

Gemäß Versuchsschema wurden den Tieren eine supramaximale Caerulein-Dosis in einer gewichtsadaptierten Menge von 50 µg/g Körpergewicht injiziert (siehe 1.3.). Als Kontrollsubstanz wurde entsprechend dem Versuchsschema zur Negativkontrolle den Mäusen 0,9 % NaCl injiziert.

### 2.6 Das Pankreasödem

Durch die Inflammation im Organ kommt es zu einer interstitiellen Ödembildung. Das Ödem korreliert dabei mit der Schwere der Entzündung. Dies ist nicht nur mikroskopisch erkennbar, sondern auch makroskopisch und geht mit einer Zunahme des Organgewichts einher. Zur Erfassung wurden in der Arbeitsgruppe zwei Methoden etabliert.

#### 2.6.1 Pankreas-/Körpergewicht-Ratio des Pankreas (Ödemisierungsgrad)

Um die Stärke der Ödembildung zu erfassen, wurde unmittelbar nach der Präparation des Pankreas und Organentnahme eine Gewichtsbestimmung durchgeführt. Der sogenannte „Ödemisierungsgrad“ wurde dann im Verhältnis von Organgewicht zu Körpergewicht berechnet. Der „Ödemisierungsgrad“ errechnet sich wie folgt:

$$\text{Ödemisierungsgrad} = \frac{\text{Pankreasgewicht} \times 1000}{\text{Mausgewicht}}$$

Erreicht der Ödemisierungsgrad einen hohen Wert, geht man von einer hohen Wassereinlagerung und damit stärkeren Entzündung aus.

#### 2.6.2 Die Trocken-Feuchtgewicht-Ratio

Zusätzlich zur Bestimmung der Stärke des Ödems im Pankreasgewebe wurde eine Feucht-/Trockengewicht Bestimmung durchgeführt. In die zuvor mit einer Präzisionswaage gewogenen Tubes wurde ein von sonstigem Gewebe gereinigtes und auf Zellstoff getrocknetes Pankreasstück gegeben. Es folgte erneut eine Gewichtsbestimmung. Das Tube wurde nun für 48h in einem Inkubator bei 80° C. belassen. Nach erneutem Wiegen und Berechnung der Differenz lässt sich der Anteil des Wassers im Gewebe bestimmen. Die Ratio gibt den Anteil des Wassers in der Gesamtmenge des Pankreasstückes in Prozent an. Liegt eine entsprechende Ödembildung im Pankreasgewebe vor,

so ist ein erhöhter Wert zu erwarten. Der Anteil des Wassers in der Gesamtmasse errechnet sich wie folgt:

$$\text{Wasseranteil der Gesamtmasse} = \frac{\text{Feuchtgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Feuchtgewicht}}$$

### 2.7 Western-Blot

Das nach dem Prinzip von Renart et al. beschriebene Verfahren beruht auf den molekularen Eigenschaften, dass sich Proteine in einem elektrischen Spannungsfeld elektrophoretisch der Größe nach auftrennen lassen. Je größer ein Molekül, desto langsamer ist die vertikale Wanderung in dem Trenngel. Im Anschluss findet der sogenannte Transfer, statt bei dem durch Anlage einer horizontalen Spannung Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Darauf folgt die Markierung mit dem für das gesuchte Protein spezifischen Erstantikörper. Im letzten Schritt wird ein Zweitantikörper aufgetragen, welcher an den Erstantikörper bindet. An den Zweitantikörper kann eine Verbindung gekoppelt werden, die ein Substrat spalten kann. Dabei kommt es zu einer Lichtreaktion, die unter Zuhilfenahme eines Röntgenfilms nun detektierbar ist (220), (221), (222). In dieser Arbeit wurde die Methode angewendet, um die Existenz der Stresskinasen und deren Aktivierung zu belegen.

#### 2.7.1 Pankreaslysate-Herstellung

Um Proteine in einem Gel aufzutrennen, musste das Pankreasgewebe zuerst Western-Blot fähig gemacht werden. Zur Lysatherstellung wurden Pankreasgewebestücke mit einem Gewicht zwischen 50 und 100 µg verwendet und in einem Reagenzgefäß mit 1000 µl Homogenisations-Puffer (Mixturen siehe Tabelle) homogenisiert. Das so vorbereitete Gewebe wurde nun in der Zentrifuge bei 4°C und 14.000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Tube überführt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert um die Zelllyse abzuwarten. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm, dieses Mal für 30 Minuten. Der so wiederum gewonnene Überstand bildete die Basis für die Western-Blot Proben. Die Proteinkonzentration

on wurde nun mit der Methode nach Bradford (siehe 2.4.1) bestimmt. Im letzten Schritt wurden die Proteinkonzentration der Lysate mit SDS Puffer,  $\beta$ -Mercapto-Ethanol und Homopuffer auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt (Standard: 25 Volumen-Prozent SDS, 0,025 Volumen-Prozent  $\beta$ -Mercapto-Ethanol). Zum Schluss wurden die Proben für fünf Minuten bei 95°C gekocht. Wurden die Lysate nicht sofort verwendet, so wurden Sie umgehend bis zum Gebrauch bei -80° C. eingefroren.

Tabelle 18: Homogenisations-Puffer

Tris / HCl	7,88 g	
KCl	14,9 g	
$\beta$ -Glycerolphosphat	10,8 g	
DTT	0,16 g	
NaF	0,84 g	
EGTA	100 mM	10,0 ml
EDTA	100 mM	1,0 ml
Benzamidin	200 mM	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml	
pH 7,4		

Gebrauchsfertig machen auf 10ml abfüllen, eine Spatelspitze Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und 100  $\mu$ l Proteaseinhibitor dazugeben.

### 2.7.2 Durchführung Western-Blot

Zur Auftrennung der Proteine wurden zehnpromzentige Acrylamid-Trenngele mit je zehn Taschen angefertigt. Die Gele wurden in die Elektrophorese-Kammer gestellt und dann komplett mit Laufpuffer überdeckt. Erst dann wurden die Taschen beladen. Bei allen durchgeführten Blots wurde in die linke erste Tasche 5 $\mu$ l Proteinstandards (Precision Plus All Blue Standards, Bio-Rad Lab., Inc. Hercules, USA) pipettiert. Nach einbringen der restlichen Proben wurde für fünfzehn Minuten das Proteingemisch lediglich mit einer Spannung von 100 Volt langsam in das Trenngel einlaufen gelassen. Nun wurde die Spannung auf 150 Volt angehoben. Ein Gel-Lauf dauert bei diesem Aufbau circa 90 Minuten. Es folgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran®, Whatman Int. Ltd., Kent, UK). Die Kammer wurde mit Transferpuffer vollständig aufgefüllt. Nach Anlage einer Stromstärke von 300mA über circa 90 Minuten war es nun möglich, die im Gel aufgetrennten Proteine auf die Membran zu übertragen. Der Puffer wurde mit

Eis und ständigem Rühren während des Transfervorgangs gekühlt. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer fünf prozentigen Mischung aus TBS-T-Trockenmilch (Bio-Rad Lab., Inc., Hercules, USA) für 60 Minuten geschwenkt. So wurden die Proteine auf der Membran geblockt, was die unspezifische Bindung der Antikörperspäter verringert oder auch ganz verhindert. In frische TBS-T-Milch 5% (5 ml) wurde nun der Erstantikörper eingebracht, in Folie verschweißt (Jencons-PLS, VWR-Jencons, West-Sussex, UK) und über Nacht bei 4°C. unter ständigem Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran in TBS-T drei Mal à fünf Minuten gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurde in 5% TBS-T-Milch (15 ml) der entsprechende Zweitantikörper gegeben und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur ebenfalls unter ständigem Schütteln inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschgänge in TBS-T. Mithilfe einer Chemolumineszenz-Reaktion war nun die Belichtung von Röntgenfilmen möglich. Die Detektionslösungen ECL 1 und ECL 2 (ECL Detection Fluid, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) wurden 1:1 vermischt und die Membran darin für 60 Sekunden geschwenkt. In der Dunkelkammer wurde nun Röntgenfilm (CL-XPosure Film, Thermo Fisher Scientific, Rockville, USA) auf die Membranen zur Belichtung aufgelegt. Die Belichtungszeit variierte je nach Antikörper zwischen Sekunden und einer Stunde. Nach Entwicklung (Agfa-Curix 60, Agfa-Gevaert, Morsel, Belgien) des Films konnten nun die Protein-Banden identifiziert werden. Die Membranen wurden zuerst mit dem Antikörper für phosphorylierte Kinasen inkubiert. Hier war anschließend die Belichtungszeit auf dem Röntgenfilm zwischen 30 und 60 Minuten durchweg deutlich länger als für den Gesamtantikörper. Nach einem Waschvorgang wurde dann in einem Re-Inkubationsverfahren der Gesamtantikörper getestet. Durch die kurze Belichtungszeit von meist weniger als einer Minute konnte das schwache Signal des Phospho-Antikörpers vernachlässigt werden. Der Vorteil dieser Variante ist, dass die zu vergleichenden Proteinmengen identisch sind und somit verglichen werden können.

Tabelle 19: Trenn-Gel (10% Acrylamid)

<b>Trenn-Gel-Puffer</b>	<b>4 ml</b>
<b>Aqua destillata</b>	<b>6,7 ml</b>
<b>Acrylamid/Bis-Lösung 30 %</b>	<b>5,3 ml</b>
<b>Ammonium Persulfat 10 %</b>	<b>50 µl</b>
<b>TEMED</b>	<b>25 µl</b>

Tabelle 20: Sammel-Gel

<b>Sammel-Gel-Puffer</b>	<b>2,5 ml</b>
<b>Aqua destillata</b>	<b>5,8 ml</b>
<b>Acrylamid/Bis-Lösung 30 %</b>	<b>1,6 ml</b>
<b>Ammonium Persulfat 10 %</b>	<b>60 µl</b>
<b>TEMED</b>	<b>20 µl</b>

Tabelle 21: Trenn-Gel-Puffer

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000 ml</b>
<b>TRIS Base</b>	<b>181,6 g (1492,52 mmol/l)</b>
<b>SDS</b>	<b>4 g (13,87 mmol/l)</b>
<b>pH 8,8</b>	

Tabelle 22: Sammel-Gel-Puffer

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000 ml</b>
<b>Tris Base</b>	<b>60,56 g (500 mmol/l)</b>
<b>SDS</b>	<b>4 g (13,87 mmol/l)</b>
<b>pH 6,8</b>	

Tabelle 23: Waschmedium TBS 10-fach Stock-Lösung

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000 ml</b>
<b>Tris Base</b>	<b>24,1 g</b>
<b>NaCl</b>	<b>80 g</b>
<b>pH 7,6</b>	

### TBS-T 1-fach Gebrauchs-Lösung

Vor Gebrauch wurde die Stammlösung auf 1-fach verdünnt:

100 ml TBS – Stock Lösung + TWEEN 20 1,5ml + Aqua destillata ad 1000 ml.

Tabelle 24: Blocking Lösung

<b>Waschmedium</b>	
<b>+ Trockenmilch (entfettet)</b>	<b>50 g/l</b>

Tabelle 25: Gel-Elektrophorese Lauf-Puffer 10-fach Stock-Lösung

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000 ml</b>
<b>Tris Base</b>	<b>30,3 g</b>
<b>Glycin</b>	<b>144 g</b>
<b>SDS</b>	<b>10 g</b>

Vor Gebrauch der 10-fach Stock-Lösung, wurde der Laufpuffer auf 1-fach verdünnt:

100 ml Stock-Lösung+ a.d. ad 1000 ml.



Tabelle 26: Protein-Transfer-Puffer 10-fach Stock-Lösung

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000 ml</b>
<b>Tris Base</b>	30 g
<b>Glycin</b>	144,1 g
<b>SDS</b>	30 g

Vor Gebrauch der 10-fach Stock-Lösung, wurde der Transfer-Puffer auf 1-fach verdünnt: 100 ml Stammlösung + 200 ml MeOH (Methanol) + a.d. ad 1000 ml

Tabelle 27: Erstantikörper

<b>Kinase</b>	<b>Konzentration</b>
<b>p-38</b>	1:1000
<b>phospho p-38</b>	1:500
<b>JNK</b>	1:1000
<b>phospho-JNK</b>	1:500
<b>P-44/42</b>	1:1000
<b>Phospho p-44/22</b>	1:500

Tabelle 28: Zweitantikörper (NA 934)

<b>Antikörper</b>	<b>Zu detektierender Erstantikörper</b>	<b>Konzentration</b>
<b>peroxidase-linked-species-specific whole antibody (from donkey) NA 934 Anti-Rabbit-IgG</b>	p-38; phospho p-38; JNK, phospho-JNK; p-44/42	1:5000

Tabelle 29: Zweitantikörper (NA 931)

<b>Antikörper</b>	<b>Zu detektierender Erstantikörper</b>	<b>Konzentration</b>
<b>peroxidase-linked-species-specific whole antibody (from sheep) NA 931 Anti-Mouse-IgG</b>	phospho p-44/42	1:5000

## 2.8 Tiermodell und Versuchsaufbau

Um die Auswirkung von SP 600125 untersuchen zu können, wurde als Grundlage des Experimentes ein bereits gut etabliertes Tiermodell für die Caerulein-induzierte akute Pankreatitis gewählt (31). Durch Willemer et al. wurde das Modell bereits an Mäuse angepasst (32) (siehe 1.3). Für die vorliegende Experimentierreihe wurden C57/Black

und MK-2 -/-Mäuse als Versuchstiere gewählt. Als zusätzlicher Leitfaden diente die Arbeit von Minutolia et al. (223). Die durchgeführte Applikationsabfolge wird in Tabelle 32: Injektionsplan - exemplarisch erläutert. Die Versuchstiere wurden am Morgen vor Beginn des Experiments gewogen, um eine gewichtsadaptierte Menge von Caerulein applizieren zu können. Während des Experimentes wurden die Käfige in einem speziellen Arbeitsraum deponiert. Das Versuchsvorhaben wurde vorher bei der zuständigen Tierversuchsbehörde der Regierung von Oberbayern beantragt und genehmigt.

### **2.8.1 Versuchstiere**

Insgesamt wurden sechs IVP's (In-vivo-Pankreatitis) mit einem gemischten Pool aus Männchen und Weibchen von insgesamt 39 nicht-transgenen Tiere und 18 MK-2 -/-Tieren durchgeführt. Die Gruppe der nicht-transgenen Tiere war zwischen 6 und 16 Wochen, die Knock-out Gruppe (MK-2 -/-) zwischen 12 und 30 Wochen alt. Den Stamm für die Gruppe der nicht-transgenen Tiere bildete die Linie C57/Black, der Firma CharlesRiver (Wiga, Sulzfeld, Deutschland). Die MK-2 -/-Tiere wurden ursprünglich ebenfalls aus der C57/Black Linie generiert (183). In diesem Fall konnte auf einen bereits bestehenden Pool mit einer limitierten Anzahl von Mäusen zurückgegriffen werden. Sämtliche Tiere wurden gemäß dem Tierschutzgesetz in Käfigen gehalten. Im Tierstall herrschte ein konstanter 12 h Licht-Dunkel-Zyklus. Der Transport entfiel, da die Tiere bereits seit mehreren Wochen im hauseigenen Stall untergebracht waren. Am Vorabend des Versuchs wurde den Tieren lediglich die Nahrung entzogen. Zugang zu Wasser und Futter war am Tag während des Experiments jederzeit ungehindert möglich (Sniff®, Soest, Dtl.). Die Mäuse verblieben während des gesamten Versuches in Gruppen zu drei oder vier Tieren in ihren Käfigen und wurden nur zur Behandlung herausgenommen. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass die wiederholte Verabreichung von Caerulein und Inhibitor mittels einer 27-G-Kanüle immer intraperitoneal, nahe des rechten Hinterlaufs in einem flachen Winkel und nach kranial gerichtet, injiziert wurden. Die verabreichte Menge sämtlicher Stoffe erfolgte gewichtsadaptiert.

Tabelle 30: Übersicht nicht-transgene Mäuse

Versuch # NTG C57/B6	Anzahl Tiere	♂	♀	Ø Gewicht in Gramm	Ø Alter in Wochen
IVP 1	8	4	4	22,7	7
IVP 2	8	8	0	25,9	9
IVP 3	9	9	0	29,6	13
IVP 4	6	6	0	28,5	11
IVP 5	4	1	3	25,6	14
IVP 6	4	0	4	23,4	7
Gesamt	39	28	11	26	10

Tabelle 31: Übersicht MK-2 -/- Mäuse

Versuch # MK 2 -/-	Anzahl Tiere	♂	♀	Ø Gewicht in Gramm	Ø Alter in Wochen
MK 1	6	6	0	31,5	13
MK 2	6	2	4	39,8	28
MK 3	6	2	4	36,1	32
Gesamt	18	10	8	35,8	24

Es erfolgte die Gabe von Inhibitor, Caerulein sowie NaCl nach einem festgeschriebenen Schema (s.u.). Vor jedem Versuch wurden die Reagenzien frisch angesetzt. Die NaCl-Kontrolltiere erhielt insgesamt vier Injektionen. Die Kontrolltiere mit ausschließlich SP 600125 lediglich zwei Injektionen. Tiere, die ausschließlich für Caerulein vorgesehen waren, erhielten ebenfalls vier Injektionen. Die letzte Gruppe mit Caerulein und Inhibitor bekam insgesamt sechs Injektionen. Begonnen wurde jeder Versuch mit der Induktion der Tiere durch Verabreichung des Inhibitors SP 600125. Bei Versuchsminute 120' wurde außer den Kontrolltieren, allen Caerulein intraperitoneal injiziert. Weitere 30' Minuten später bekamen alle für den Inhibitor vorgesehen Tiere eine Injektion mit SP 600125. Bei Versuchs-Minuten 180', 240' und 300' je eine erneute Gabe von Caerulein. Das Versuchsende lag 360' Minuten nach der ersten Injektion. Alle Tiere überlebten bis zu diesem Zeitpunkt.

Tabelle 32: Injektionsplan am Beispiel IVP 1

	S e x	Genotyp	Gewicht	Cerulein Menge	Inhi- bitor	SP600125	Cerulein	SP600125	Cerulein	Cerulein	Cerulein	Getötet	Alter
			Gramm	µl	µl	min.	min.	min.	min.	min.	min.	min.	Wochen
Kontrolle NaCl	w	C57/Black	24	nur NaCl 240			NaCl		NaCl	NaCl	NaCl	360	6-8
Kontrolle SP	w	C57/Black	20,5		205	0		150				360	6-8
Cer+SP	w	C57/Black	20,8	208	208	0	120	150	180	240	300	360	6-8
Cer	w	C57/Black	21	210			120		180	240	300	360	6-8
Cer	m	C57/Black	23,5	235			120		180	240	300	360	6-8
Cer+SP	m	C57/Black	24,5	245	245	0	120	150	180	240	300	360	6-8

## 2.8.2 Versuchsaufbau mit Fragestellung und Hypothese

Nach der unter 1.7 formulierten Fragestellung ergeben sich nun folgende zu untersuchende Versuchsanordnungen und Auswertungen.

Tabelle 33: Fragestellung zum Versuchsaufbau

Fragestellung und Hypothese	Versuch und Auswertung	Aussage
Ist mit Caerulein bei allen Versuchstieren eine akute Pankreatitis ausgelöst worden?	Vergleich der Amylase Werte bei der Gruppe der Kontrolltiere mit den Tieren aus der Caerulein Gruppe für Wildtyp und Knock-out	Ja/Nein
Ist bei den Tieren mit Agonist und Antagonist gegenüber den Tieren nur mit Agonist ein besserer? vergleichbarer? oder schwerer Verlauf der Pankreatitis zu sehen?	Vergleich der Gruppen Caerulein + SP 600125 und nur Caerulein für die Ergebnisse aus Trypsin, MPO und IL-6. Getrennt nach Wildtyp und Knock-out Tieren	Bestätigung der Wirksamkeit des Antagonisten und ein möglicher Therapieansatz?
Ist im Vergleich zwischen der Wildtyp- und Knock-out Tieren ein zusätzlicher Effekt durch die pharmakologische Hemmung der SAPK/JNK Kinase bei der MK-2 Gruppe zu sehen?	Vergleich der Ergebnisse zwischen der NTG-Gruppe die mit Caerulein + SP 600125 und der MK-2 Gruppe mit demselben Spritzschema	Durch Kombination eine effektivere Therapiemöglichkeit?

## 2.8.3 Asservation von Blut, Pankreas- und Lungenpräparation

Am Ende des Applikationsregimes wurde wie folgt vorgegangen: Sämtliche Tubes wurden mit der Nummer der Maus und dem Organ beschriftet. Zur Präparation standen unterschiedliche Pinzetten, Scheren und weiteres chirurgisches Material zur Verfügung. Das Vorgehen bei der Präparation ist bereits aus früheren Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe standardisiert und diente als Qualitätssicherung. Die Versuchstiere

wurden zuerst mit Isofluran in einem Exsikkator narkotisiert und nach Wirkungseintritt dekapitiert. Es folgte sogleich die Asservierung von Vollblut. Durch sofortige Zentrifugation für zehn Minuten bei 14000 rpm und 4° Celsius wurde das Blut von seinen zellulären Bestandteilen separiert. Das überstehende Serum wurde mit einer Pipette entnommen und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die weitere Verwahrung erfolgte anschließend bei – 80° Celsius. Zur Pankreasexstirpation wurde das Peritoneum großflächig eröffnet und als Leitstruktur die Milz aufgesucht. Das Pankreas wurde unter Schonung von Magen und Duodenum präpariert, um eine mögliche Kontamination mit denaturierenden Enzymen zu vermeiden. Das herausgelöste Pankreaspräparat wurde nun sofort in 0,9% NaCl-Lösung gelegt und von verbliebenen Geweberesten gesäubert. Im Anschluss daran erfolgte die Feuchtgewichtsbestimmung mit einer Feinwaage. In weitere Teile separiert, wurde je ein Gewebeteil für eine histologische Aufarbeitung in PBS 3,7% eingelegt, ein weiteres zur Trockengewichtsbestimmung und insgesamt vier weitere Organstücke zur späteren Verwendung auf vier Tubes verteilt. Es folgte die Entnahme der Lunge. Nach einem Schnitt durch das Brustbein konnten beide Lungen nah am Hilus entfernt werden. Die entnommenen Organe wurden in 0,9% NaCl gesäubert und gewogen. Es folgte nun das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und eine sofortige Verwahrung bei -80°Celsius.

### 3. Ergebnisse und statistische Auswertung

Die präsentierten Ergebnisse wurden wie beschrieben in Kapitel 2 erfasst und bearbeitet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird die Gesamtheit der Rohdaten nicht gezeigt. Die präsentierten Werte sind eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Den nicht-transgenen Versuchstieren wurde je eine Nummer von 1 – 39, und den Knock-out Tieren (-/-) mit dem Attribut MK sowie je eine Zahl von 1 – 18 zugeordnet. Zusätzlich wird die Art der Behandlung angegeben. Kontrolltiere die nur physiologische NaCl-Lösung erhielten, sind mit dem Zusatz „NaCl“ (Behandlung 0) versehen. Mäuse, die lediglich mit dem Inhibitor SP 600125 behandelt wurden, haben die Abkürzung „SP“ (Behandlung 1) erhalten. Tiere, denen ausschließlich Caerulein injiziert wurde, sind mit „Cer“ (Behandlung 2) gekennzeichnet. Mäuse, denen beide Stoffe - Caerulein und SP 600125 - injiziert wurden, haben die Abkürzung „Cer+SP“ (Behandlung 3). Analog zu diesem Schema, wurde die Gruppe der MK-2 -/- Tiere behandelt.

Für die Gesamtanzahl (n) der nicht-transgenen Tiere gilt:

Tabelle 34: Anzahl der Wildtyp Tiere

Kontrolle NaCl	Kontrolle SP 600125	Caerulein	Caerulein + SP 600125	Gesamtzahl
6	6	10	17	39

Für die Gesamtanzahl (n) der MK-2 -/- Tiere gilt:

Tabelle 35: Anzahl der Knock-out Tiere

Kontrolle NaCl	Kontrolle SP 600125	Caerulein	Caerulein + SP 600125	Gesamtzahl
3	3	6	6	18

Zur Fehlerminimierung wurden die Analysen bei allen Proben im Doppelansatz bestimmt und der daraus resultierende Mittelwert als Ergebnis verwendet. Für die Berechnung wurden keine Tiere ausgeschlossen. Eine Subgruppen-Analyse beispielsweise nach Geschlecht oder Gewicht ist aufgrund der geringen Zahl an Versuchstieren als kritisch zu beurteilen und wurde nicht durchgeführt. Bei der Grundbetrachtung der

Datenanalyse wird von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen, welche mathematisch die Anwendung eines linearen Modells ermöglicht. Zur statistischen Auswertung (p-Wert) wurde ein Zweistichproben-T-Test mit den Mittelwerten der zu bestimmenden Behandlung einer Signifikanzanalyse für unabhängige Stichproben und ungleicher Standardabweichung nach Welch unterzogen. Als Signifikant wurde eine Abweichung von  $p \leq 0,05$  gewertet. Ausreiser wurden nicht als größte Beobachtung angegeben, flossen aber in die Berechnung mit ein. Eine Auswertung erfolgte für nachstehende Parameter:

- Amylase (Serum)
- Trypsin (Pankreas)
- MPO (Lunge)
- Interleukin-6 (Serum)

Zur Veranschaulichung der Interaktion zwischen den Gruppen erfolgte die grafische Darstellung mittels Boxplot (Abbildung 9: Beispiel für Boxplot). Auf Signifikanz wurden die unterschiedlichen Behandlungen innerhalb der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppen, sowie im Vergleich beide Gruppen gegeneinander getestet. Zunächst wurden in beiden Kohorten die Kontrolltiere „NaCl“ (Behandlung0) und SP600125 (Behandlung1) auf Signifikanz gegeneinander getestet. Da keine signifikanten Unterschiede in den Laborparametern zu erwarten waren, wurden zur Vergrößerung der Population die Kontrollen „NaCl“ und Kontrollen „SP600125“ (Behandlung 0 und 1) für die weitere statistische Auswertung zusammengefasst und die Nullhypothese formuliert. Es folgt der Vergleich der Kontrollen (Behandlung 0 und 1) mit Caerulein (Behandlung 2) und die Testung der Kontrollen (Behandlung 0 und 1) mit Caerulein + SP600125 (Behandlung 3). Die letzte Signifikanzprüfung innerhalb der Gruppen erfolgt zwischen der Caerulein (Behandlung 2) und Caerulein + SP600125 (Behandlung 3). Zur Überprüfung der unter 2.8.2 formulierten Hypothese wurden in einem weiteren Auswertungsschritt dann nicht-transgene und MK 2 -/- Tiere verglichen. Hier wurden aus beiden Kohorten die mit Caerulein behandelten Tiere, sowie die Caerulein + SP 600125 Gruppen gegeneinander verglichen. Zur Überprüfung der Annahme, dass die Kombina-

tion der deletierten MK-2 mit dem JNK-Inhibitor SP 600125 einen zusätzlichen Effekt hat, wurde die Caerulein Gruppe der nicht-transgenen Tiere mit der Caerulein + SP600125 Gruppe der MK-2  $-/-$  miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die Abweichungen in Prozent angegeben. Diese beziehen sich auf den Median der ermittelten Wert in den Kontrollgruppen. Zusätzlich wurde als nicht-laborchemischer Parameter zur Bestimmung der Inflammation die Menge der Wassereinlagerung des Pankreasgewebes erfasst. Für das Nass-Trocken-Gewicht wurde ebenso eine statistische Analyse durchgeführt. Die Visualisierung erfolgt über ein separates Balkendiagramm.

- Ödemisierungsgrad (Pankreas)

Bei allen Tieren - auch den Kontrollen - ist zu erwarten, dass eine Grundaktivität der untersuchten Parameter vorliegt. Mäuse, die nur mit Caerulein behandelt wurden, sollten bei allen untersuchten Werten eine signifikant höhere Aktivität gegenüber den Kontrollen aufweisen. Bei den Tieren, die zusätzlich mit dem JNK-Inhibitor SP 600125 behandelt wurden, ist in der Theorie eine geringe Aktivität der Inflammation gegenüber den ausschließlich mit Caerulein behandelten Mäusen zu erwarten. SP 600125 hätte demnach einen positiven Effekt auf die akute Pankreatitis. Bei den Knock-out Tieren ist davon auszugehen, dass die Entzündungsparameter insgesamt niedriger sind als bei den nicht-transgenen Tieren. Zur Bestätigung der zweiten Arbeitshypothese sollte in Verbindung mit dem Inhibitor SP 600125 ein zusätzlicher positiver Effekt in der Inflammationsreaktion nachweisbar sein.

Die im Diagramm dargestellten Daten sollen die Lage und den Bereich der ermittelten Daten anzeigen. Dargestellt werden der Median, die Quartilen, die Extremwerte und gegebenenfalls Ausreißer.

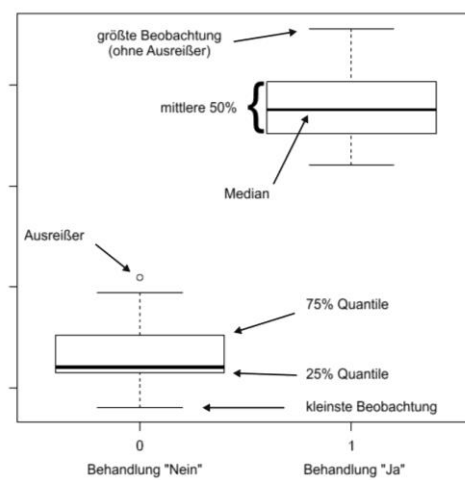


Abbildung 9: Beispiel für Boxplot



## 3.1 Ergebnisse der Stimulation innerhalb der Kontrollen

Zur Verifizierung der angenommenen Nullhypothese wurde in einem ersten Auswertungsschritt der Vergleich auf signifikante Unterschiede in den Kontrollgruppen, zwischen NaCl (Behandlung 0) und SP 600125 (Behandlung 1) durchgeführt.

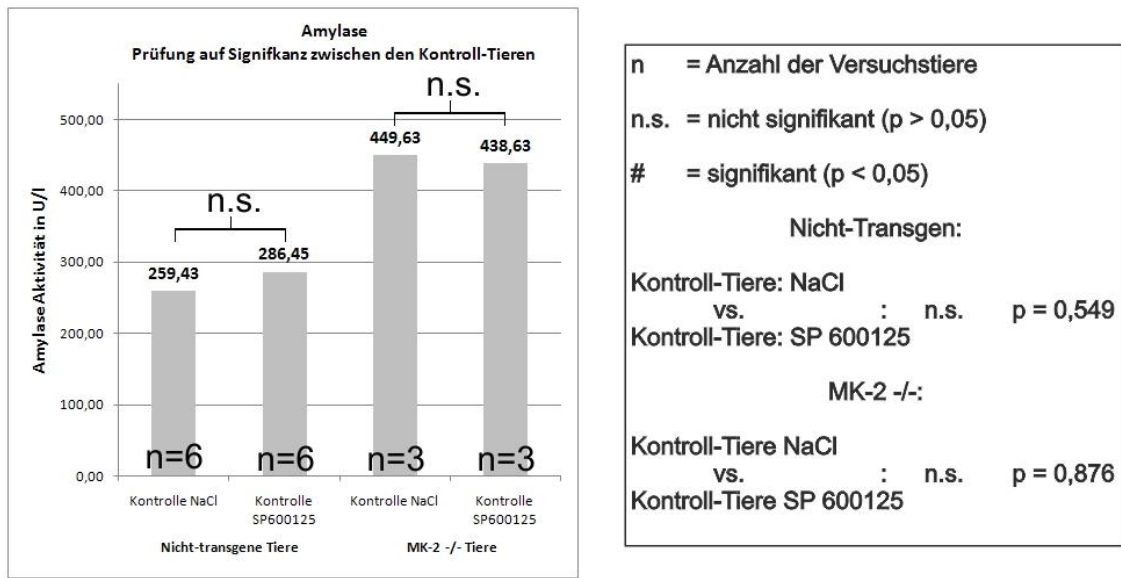


Abbildung 10: Amylase Aktivität Kontrollen

Für die Amylase Aktivität (Abbildung 10: Amylase Aktivität Kontrollen) konnte weder bei den nicht-transgenen Tieren ( $p = 0,549$ ), noch bei den MK-2 -/- Tieren ( $p = 0,876$ ) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei der Trypsin-Aktivität (Abbildung 11) der nicht-transgenen Kontroll-Tiere ist auf den ersten Blick zwar mit einer Signifikanz zu rechnen, nach der statistischen Analyse bestätigt sich der optische Eindruck jedoch nicht ( $p = 0,206$ ). Die Trypsin-Aktivität der MK-2 -/- Tiere ist erwartungsgemäß ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,784$ ).

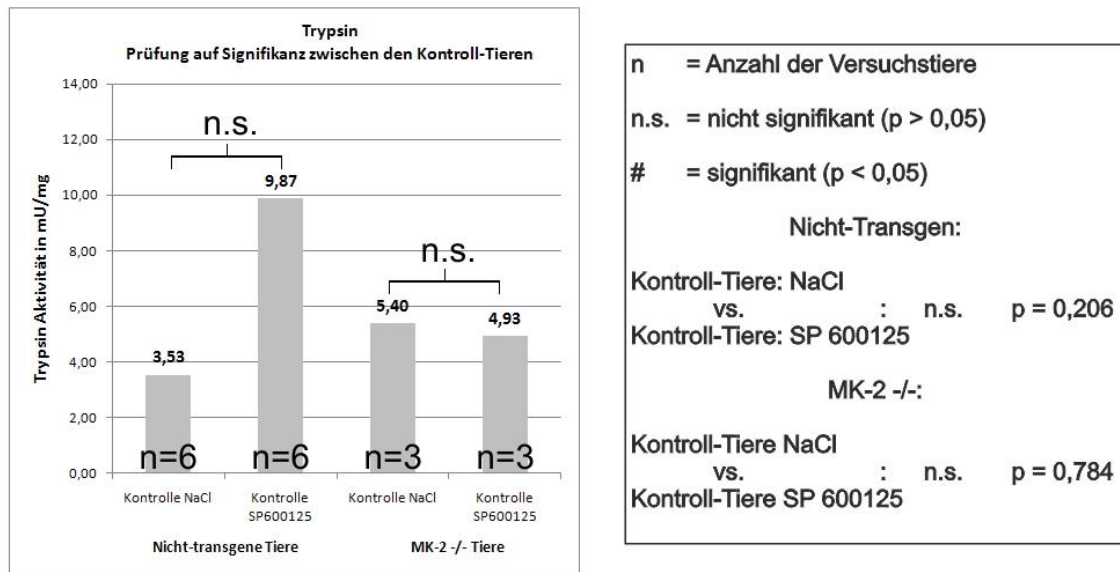


Abbildung 11: Trypsin Aktivität Kontrollen

Auch in der Aktivitätsbestimmung der MPO (Abbildung 12) lassen sich in beiden Kontrollgruppen keine statistischen Unterschiede nachweisen. Der p-Wert, für die nicht-transgenen Tiere liegt bei  $p = 0,837$  und die MK-2 -/- Tiere bei  $p = 0,771$ .

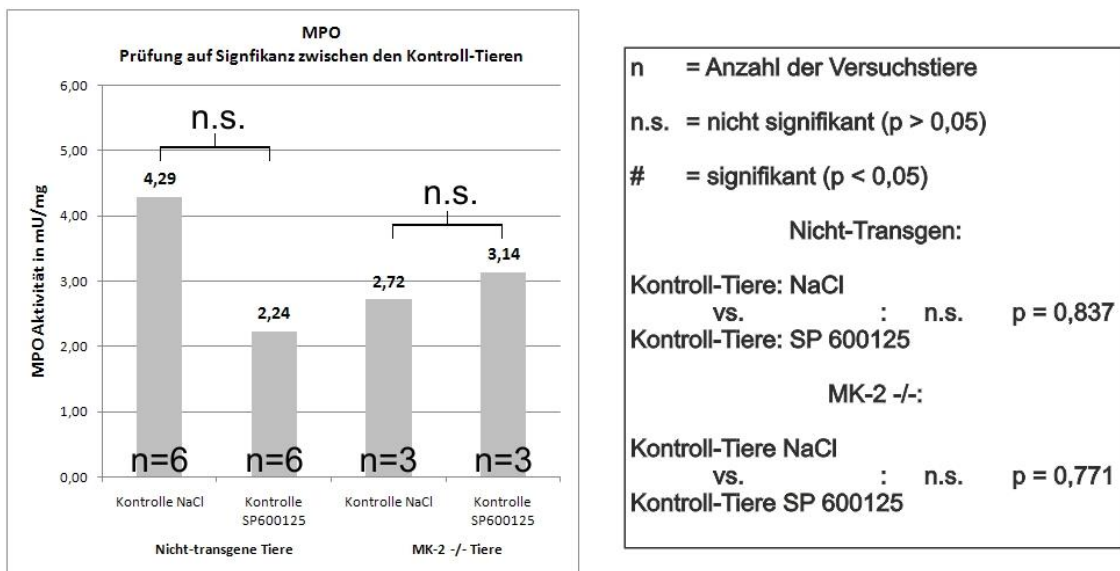


Abbildung 12: MPO Aktivität Kontrollen

Zuletzt noch die Testung der Interleukin-6 Aktivität (Abbildung 13). Zwischen den Kontrollen der nicht-transgenen Tiere besteht nach NaCl und SP600125 Gabe eine deutliche Signifikanz mit einem  $p = 0,002$ . Auch für die MK-2 -/- Gruppe erscheint optisch ein

deutlicher Unterschied. In der Analyse wird jedoch kein signifikanter Wert mit  $p = 0,236$  erreicht.

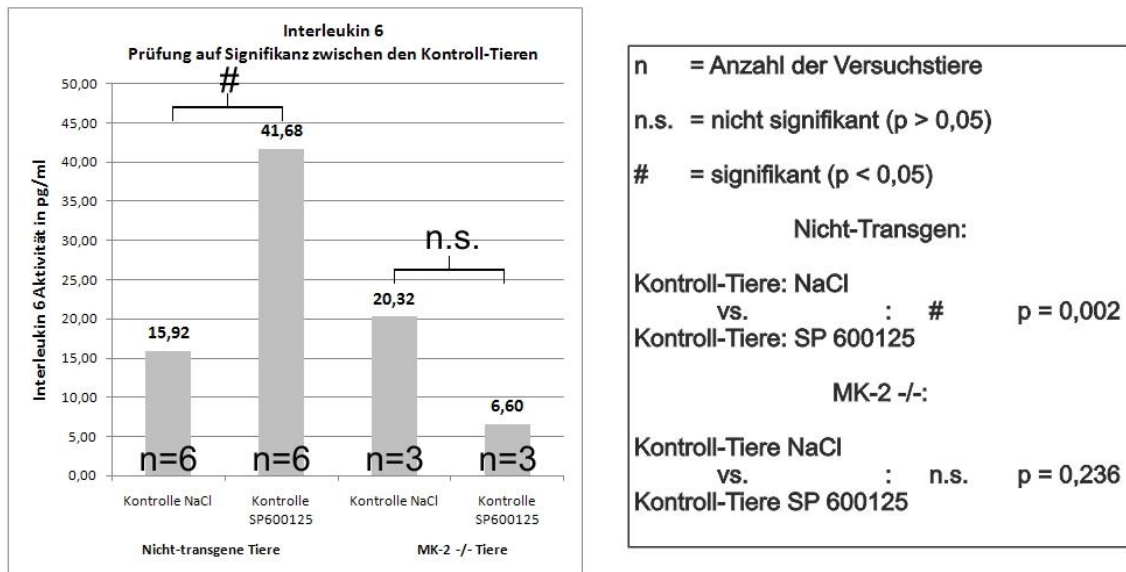


Abbildung 13: Interleukin 6 Aktivität Kontrollen

## 3.1.1 Ergebnisse des Ödemisierungsgrades der nicht-transgenen Tiere

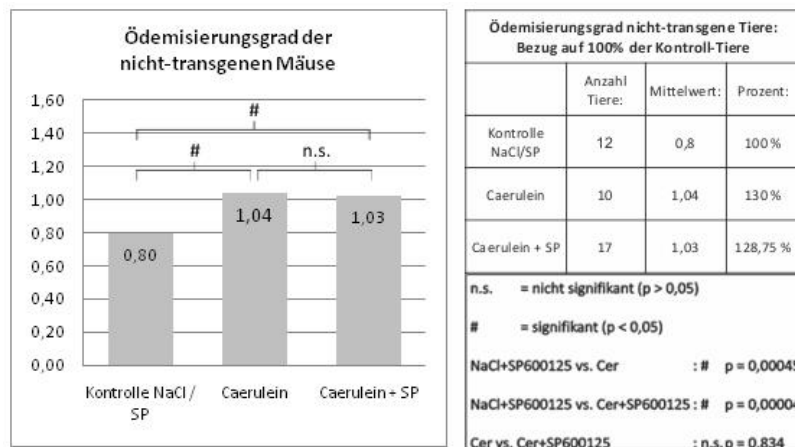


Abbildung 14: Ödemisierungsgrad nicht-transgene Mäuse

Alle entnommenen Pankreata wurden vor und nach Trocknung gewogen. Hierbei ergaben sich Gewichtsunterschiede in den untersuchten Gruppen. Durch die Gabe von Caerulein kommt es als Ausdruck eines entzündlichen Vorganges zu einer verstärkten Wassereinlagerung in das Pankreasgewebe. Der zuvor berechnete Mittelwert des

Ödemisierungsgrades für die Caerulein Tiere von 1,04 liegt 30 % über den Kontrollen (0,8). Im Zweistichproben T-Test wird mit diesem Unterschied ein Signifikanzniveau mit einem p-Wert von 0,00045 zwischen den Gruppen erreicht. Die Tiere, die zusätzlich noch SP 600125 erhalten haben, sind mit einem Ödemisierungsgrad von 1,03 mit 28,75 % über den Kontrollen fast identisch mit den Caerulein-Tieren. Ein p-Wert von 0,834 zeigt hier keine Signifikanz an. Somit ergibt sich ein statistisch signifikanter Wert zwischen den Kontrollen und den Tieren mit Caerulein und SP600125. Der p-Wert liegt bei 0,00004 (Abbildung 14).

### 3.1.2 Ergebnisse der laborchemischen Parameter für die nicht-transgenen Tiere

Es folgt die Vorstellung der Daten für die Tiere mit Caerulein und SP 600125 Stimulation.

### 3.1.3 Ergebnisse der Serum Amylase-Aktivität (nicht-transgene Tiere)

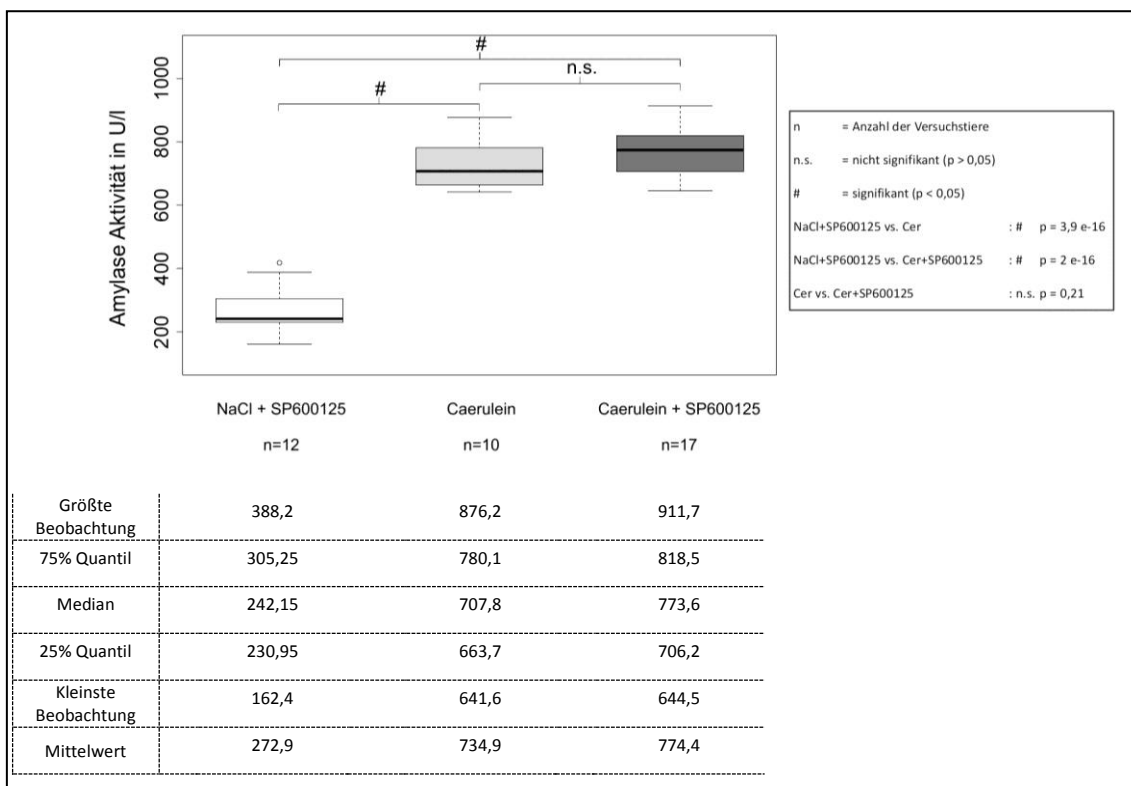


Abbildung 15: Amylase Bestimmung bei nicht-transgenen Tieren im Serum

Die ermittelten Werte der Amylase-Aktivität zeigt in allen drei Gruppen eine relativ gleichmäßige Verteilung ohne nennenswerte Ausreißer. Ausgehend von der Kontrollgruppe (Behandlung 0 und 1) ist die Amylase-Aktivität deutlich geringer gegenüber Caerulein (Behandlung 2) und Caerulein + SP600125 (Behandlung 3). Die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase im Serum ist für die Caerulein-Tiere mit +192 % deutlich über den unbehandelten Tieren und erreicht eine deutliche Signifikanz mit  $p = 3,9e^{-16}$ . Für die Caerulein + SP 600125 Gruppe besteht sogar eine +219 % höhere Aktivität gegenüber der Kontrolle, was einem deutlichen Signifikanzniveau mit  $p = 2e^{-16}$  entspricht. In der Testung zwischen Caerulein und Caerulein + SP600125 wird dagegen keine statistische Signifikanz mit einem  $p = 0,21$  erreicht.

### 3.1.4 Ergebnisse der Trypsin-Aktivität aus Pankreasgewebe (nicht-transgene Tiere)

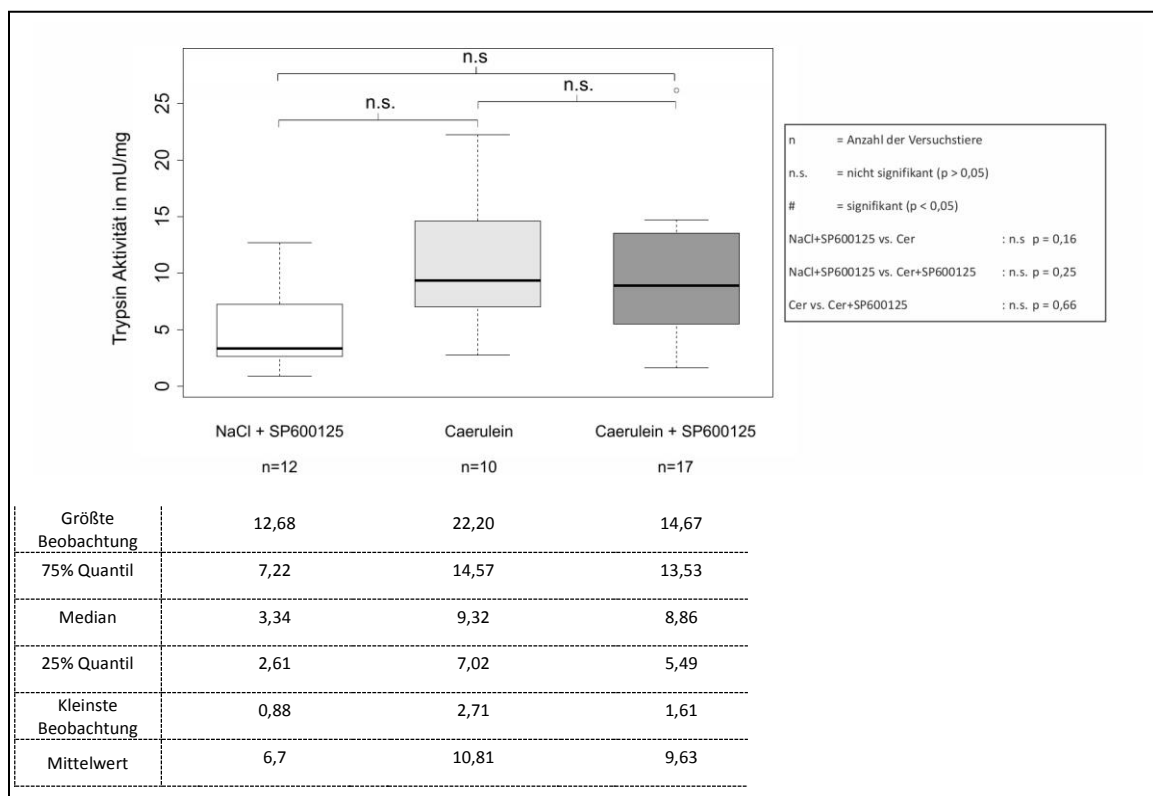


Abbildung 16: Trypsin Bestimmung bei nicht-transgenen Tieren im Pankreasgewebe

Bei Betrachtung des Boxplots ist die Breite der erhobenen Werte mit deutlichen Abweichungen um den Median auffällig. Die ausschließlich mit Caerulein behandelten Tiere haben erwartungsgemäß die größte Aktivität im Pankreasgewebe. Bei den Cer + SP 600125 Tieren ist bis auf einen Ausreißer die höchste gemessene Aktivität in etwa auf dem Niveau der 75 % Quantile der Caerulein-Tiere. Im Median beider Gruppen ist jedoch kaum ein Unterschied. Ausgehend vom Median ist die prozentuale Steigerung der Trypsin-Aktivität von den mit Caerulein stimulierten Tiere mit +179 % gegenüber den Kontrollen zwar eindrucksvoll und man kann von einer aktiven Pankreatitis ausgehen, eine statistische Signifikanz wurde jedoch bei keiner der drei Testungen gefunden. Die Trypsin-Aktivität der Caerulein + SP 600125-Tiere verglichen mit den Kontrollen ist mit + 165 %, nur unerheblich unter der Caerulein-Gruppe. Behandlung 0 und 1 verglichen mit Behandlung 2 ergab ein  $p = 0,16$ . Behandlung 0 und 1 verglichen mit Behandlung 3 ergab ein  $p = 0,25$  und Behandlung 2 verglichen mit Behandlung 3 ein  $p = 0,66$ .

### 3.1.5 Ergebnisse der MPO-Aktivität aus Lungengewebe (nicht-transgene Tiere)

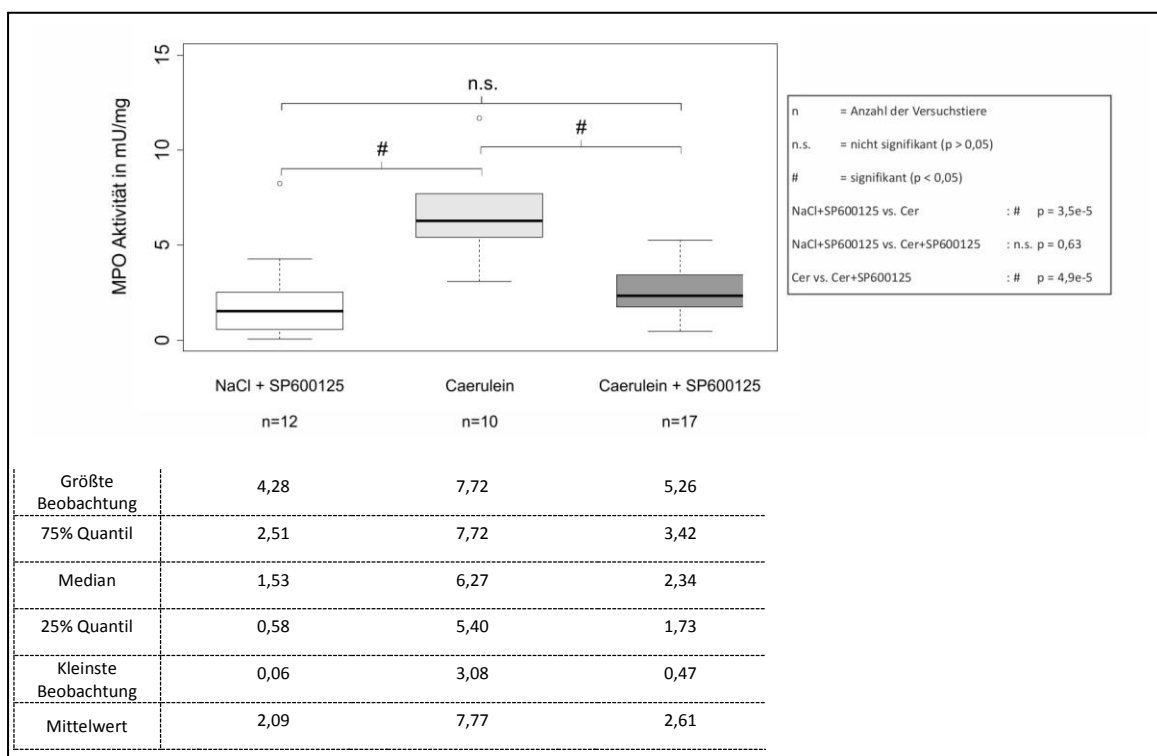


Abbildung 17: MPO Bestimmung bei nicht-transgenen Tieren im Lungengewebe

In der Aktivitätsbestimmung der MPO im Lungengewebe sind zwischen den Gruppen teilweise signifikante Unterschiede festzustellen. Bis auf wenige Ausreiserwerte nach oben bei den Kontroll- und Caerulein-Tieren, die statistisch keine Relevanz haben, sind die Werte relativ homogen verteilt. Mit einem p-Wert von  $3,5e^{-5}$  ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Caerulein Gruppe festzustellen, dies entspricht einer prozentualen Zunahme um knapp 310 %. Der ebenfalls signifikante p-Wert von  $4,9e^{-5}$  zwischen den Caerulein-Tieren (Behandlung 2) und den Caerulein + SP 600125 Tieren (Behandlung 3) zeigt, dass die Inhibitor-Gabe auf die Aktivität der Entzündung im Lungengewebe einen Einfluss hat. Hier ist die Steigerung der Aktivität nur um 52 % angestiegen. Letztlich ist der Unterschied zwischen den Kontrollen (Behandlung 0 und 1) und Caerulein + SP 600125-Tieren (Behandlung 3) mit einem p-Wert von 0,63 nicht mehr Signifikant.

### 3.1.6 Ergebnisse der Interleukin-6 Aktivität aus Serum (nicht-transgene Tiere)

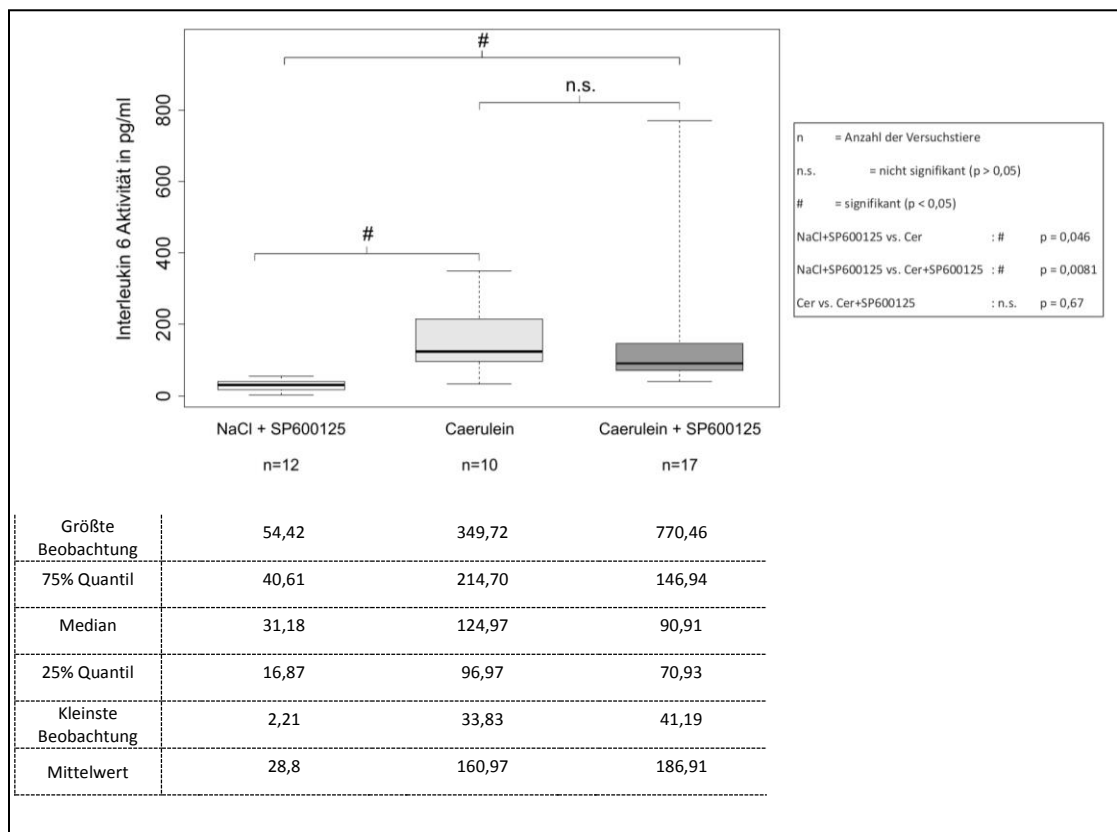


Abbildung 18: Interleukin-6 Bestimmung bei nicht-transgenen Tieren im Serum

Die erhobenen Werte für Interleukin-6 sind bei den Kontroll-Tieren in einem niedrigen und eng umschriebenen Bereich. Die Aktivität für die mit Caerulein stimulierten Tiere sind gegenüber den Kontrollen höher und erreichen mit einem p-Wert von 0,046 eine statistische Signifikanz mit + 301 %. Der Streubereich der einzelnen Werte ist dabei jedoch sehr breit. Für die mit Caerulein + SP 600125 behandelten Tiere ergibt sich aus den Zahlen eine Besonderheit. Hier liegen Median- und Mittelwert sehr weit auseinander und zudem ist der Mittelwert (186,91 pg/ml) höher wie in der Caerulein-Gruppe (160,97 pg/ml). Dies lässt sich damit erklären das zwei Messwerte bei den Caerulein + SP 600125 Tieren massiv nach oben abweichen. Im Boxplot werden diese Ausreiser nicht dargestellt, aber in der t-Testung berücksichtigt. Behandlung 0 und 1 haben im Vergleich mit Behandlung3 deswegen eine höhere Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0081 gegenüber Behandlung2. Aufgrund dessen fallen die Werte zwischen Caerulein und Caerulein + SP600125 Gruppe unerwartet aus. Tiere, die mit Behandlung 3 behandelt wurden, wie im Boxplot (Abbildung 18) anhand des geringen Konfidenzintervalls zwischen 61,78 und 120,04 erkennbar ist, haben vermutlich grundsätzlich eine geringere Interleukin-6 Aktivität gegenüber den Tieren, die nur Caerulein erhalten haben. Statistisch kommt es durch die hohen Ausreiser allerdings zu einem verzerrten Bild. Ein Signifikanzniveau wird mit einem p-Wert von 0,67 zwischen Behandlung 2 und 3 zwar nicht erreicht, der höhere Mittelwert von Caerulein SP 600125 suggeriert jedoch das die mit Inhibitor behandelten Tiere ungünstiger auf die Behandlung reagieren.

### **3.2 Ergebnisse der Stimulation für MK-2 -/- Tiere**

Die Auswertung der Ergebnisse für die MK-2 -/- Tiere erfolgte analog zu den nicht-transgenen Tieren. Zu erwarten ist auch hier in der Kontrollgruppe eine Grundaktivität der laborchemischen Parameter. Insgesamt sollten die stimulierten Versuchstiere jedoch eine geringer ausgeprägte Pankreatitis haben und in Verbindung mit dem Inhibitor SP 600125 einen zusätzlichen Benefit gegenüber den nicht-transgenen Tieren, die ebenfalls mit SP 600125 behandelt wurden, aufweisen. Begonnen wurde auch hier mit



der Signifikanzprüfung zwischen den Kontrolltieren NaCl und SP 600125. Eine graphische Darstellung und Beschreibung ist zuvor unter Kapitel 3.1 erfolgt.

### 3.2.1 Ergebnisse Ödemisierungsgrades MK-2 -/- Tiere

Analog zur Kontrollgruppe der nicht-transgenen-Tiere haben die Knock-out Tiere eine geringere Ödembildung. Die mit Caerulein behandelten Tiere haben gegenüber der Kontrolle dabei eine 29,49 % höher Ödemisierung erreicht. Das entspricht im Zweistichproben T-Test einem p-Wert von 0,0042 und ist signifikant. Die Tiere, die zusätzlich SP 600125 erhalten haben, zeigen im Vergleich mit der Kontrolle eine Zunahme um rund 19 %, was einem p-Wert von  $p = 0,0967$  entspricht und kein Signifikanzniveau aufweist. Zu den reinen Caerulein-Tieren errechnet sich ein p-Wert von  $p = 0,2733$  was ebenfalls nicht signifikant ist.

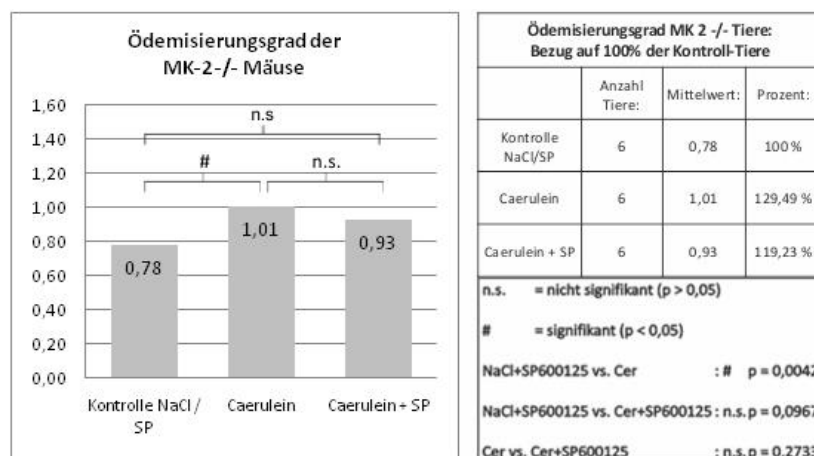


Abbildung 19: Ödemisierungsgrad MK-2 -/- Mäuse

### 3.2.2 Ergebnisse der klinischen Parameter für MK-2 -/- Tiere

Auch bei den MK-2 Tieren sind durch die Caerulein-Gaben laborchemisch nachweisbare Reaktionen auslösbar. Die Testung erfolgte analog zu den nicht-transgenen Tieren.

## 3.2.3 Ergebnisse der Amylase Aktivität aus dem Serum (MK-2-/- Tiere)

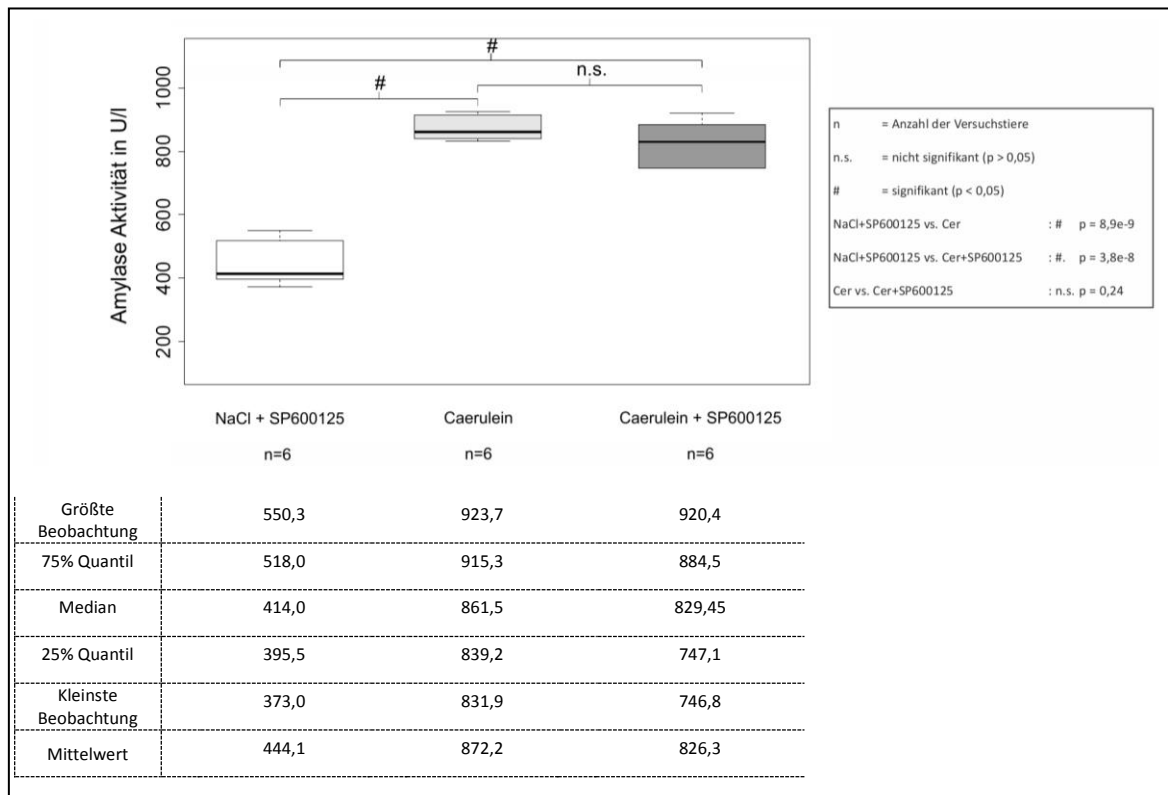


Abbildung 20: Amylase Bestimmung bei MK-2-/- Tieren im Serum

Die Werteverteilung liegt bei allen Gruppen und Behandlungen in einem relativ eng umschriebenen Bereich ohne Ausreiser. Die Kontrolle unterscheiden sich zu den Caerulein-Tieren mit einem p-Wert von  $8,9e^{-9}$  statistisch signifikant und weist eine 108 % Aktivität auf. Auch die Caerulein + SP600125-Tier sind gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant mit einem p-Wert von  $3,8e^{-8}$ , was in etwa einer 100 % höheren Aktivität entspricht. Kein Signifikanzniveau wurde zwischen der Caerulein und Caerulein + SP600125 Gruppe mit einem p-Wert von 0,24 erreicht.

## 3.2.4 Ergebnisse der Trypsin Aktivität aus dem Pankreasgewebe (MK-2 -/- Tiere)

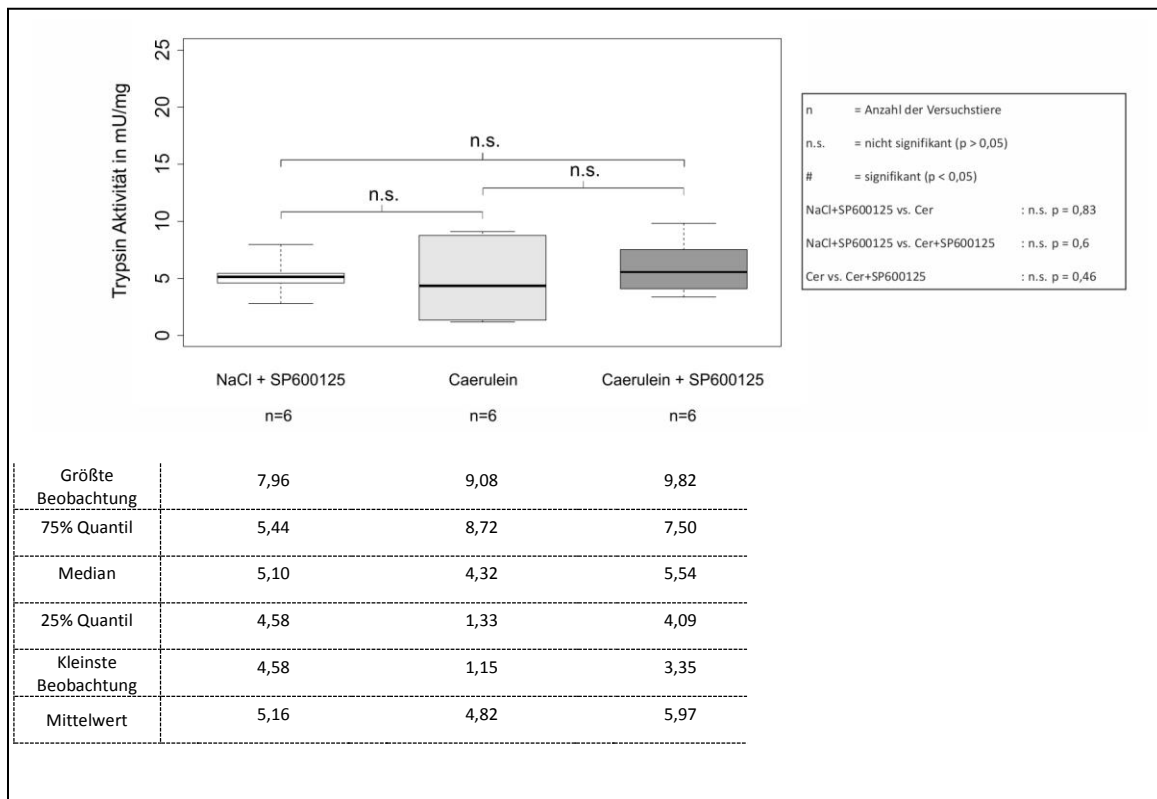


Abbildung 21: Trypsin Bestimmung bei MK-2-/- Tieren im Pankreasgewebe

Bei Betrachtung der Trypsin-Aktivität ist ein sehr enges Konfidenzintervall im Blot zu erkennen, was für homogene Werte innerhalb der Kontrollgruppe mit nur wenigen Ausreißern um den Median spricht. In der Caerulein-Gruppe ist die Streuung dagegen deutlich größer. Prozentual ist Aktivität der Caerulein-Tiere gegenüber den Kontrollen um knapp über 15 % geringer. Insgesamt liegt aber kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Caerulein-Gruppe mit einem p-Wert von 0,83 vor. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Gruppe, die mit Caerulein und SP600125 behandelt wurde. Die Aktivität dieser Gruppe liegt mit 8,6 % etwas oberhalb der Kontrolle und ist ebenfalls nicht signifikant mit einem p-Wert von 0,6. Im Vergleich von Behandlung 2 und 3 ergibt sich mit einem p-Wert von 0,46 auch keine Signifikanz.

## 3.2.5 Ergebnisse der MPO Aktivität aus dem Lungengewebe (MK-2 -/- Tiere)

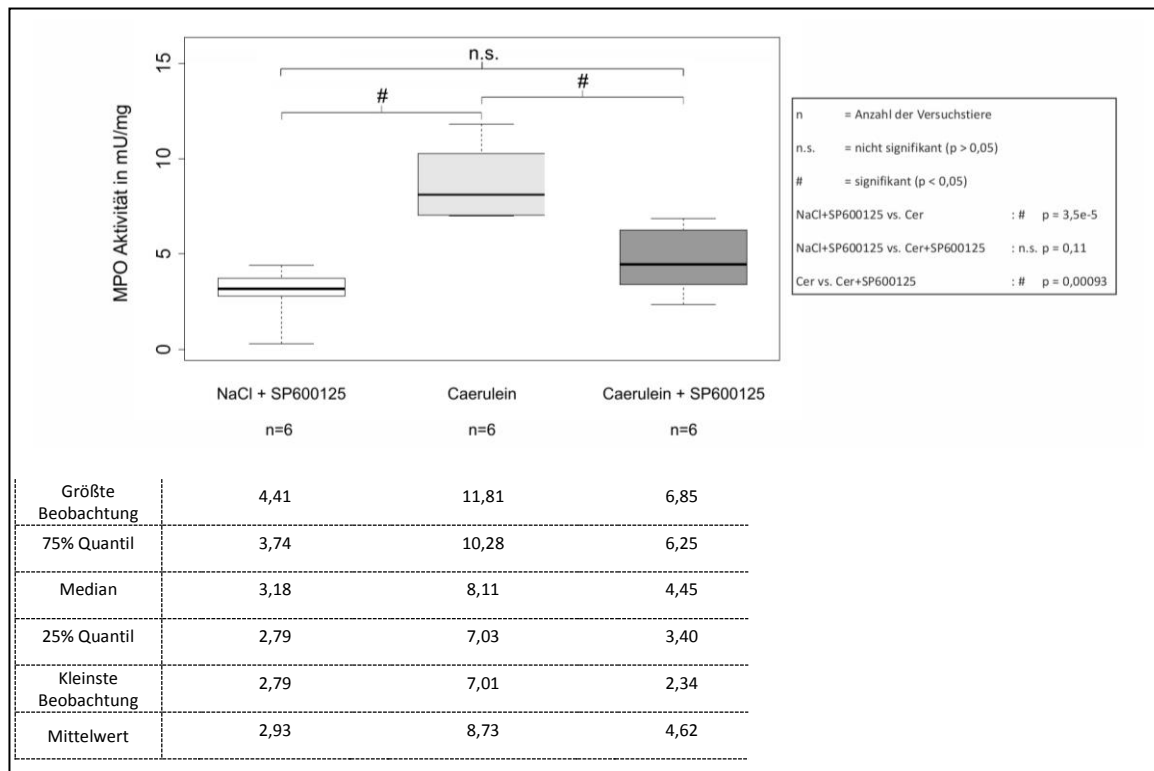


Abbildung 22: MPO Bestimmung bei MK-2-/- Tieren im Lungengewebe

Bei der Aktivitäts-Messung der Myeloperoxidase zeichnet sich in der Knock-out Gruppe ein ähnliches Bild wie bei den nicht-transgenen-Tieren ab. Behandlung 2 ist im Vergleich zu Behandlung 0 und 1 um +155 % erhöht und somit auch signifikant ( $p = 3,5e^{-5}$ ). Behandlung 0 und 1 unterscheidet sich zu Behandlung 3 nur um eine 40 % Aktivitäts-erhöhung und ist statistisch nicht signifikant ( $p = 0,11$ ). Der Vergleich von Behandlung 2 mit Behandlung 3 zeigt schließlich nochmals eine signifikante Abnahme der Aktivität bei den mit Inhibitor behandelten Tieren ( $p = 0,00093$ ).

## 3.2.6 Ergebnisse der Interleukin-6-Aktivität aus dem Serum (MK-2 -/- Tiere)

Betrachtet man die Boxplots für die Interleukin Messung, so ist bei allen 3 Gruppen eine relativ homogene Gruppierung um den Median zu erkennen. Lediglich ein Wert bei TBehandlung2 ist als Ausreiser zu verzeichnen. Die gemessenen Interleukin-6 Wer-

te der Tiere, die nur NaCl oder SP 600125 bekommen haben, sind erwartungsgemäß gegenüber den Caerulein-Tieren niedriger. Die Serumaktivität von Interleukin-6 ist bei den Caerulein Mäusen um +750 % bezogen auf die Kontrolle höher. Das entspricht einer signifikanten Steigerung mit einem p-Wert von 0,0062. In der weiteren Auswertung der Tiere, die Caerulein und SP 600125 bekommen haben, ist im Vergleich zur Kontrolle eine Steigerung der Aktivität von +486 %. Trotz dieser hohen Aktivitätssteigerung lässt sich keine Signifikanz messen. Der errechnete p-Wert im T-Test liegt bei  $p = 0,093$ . Gegenüber den Caerulein-Tieren ist zwar eine Abnahme zu verzeichnen, allerdings ist diese nicht signifikant ( $p = 0,185$ ).

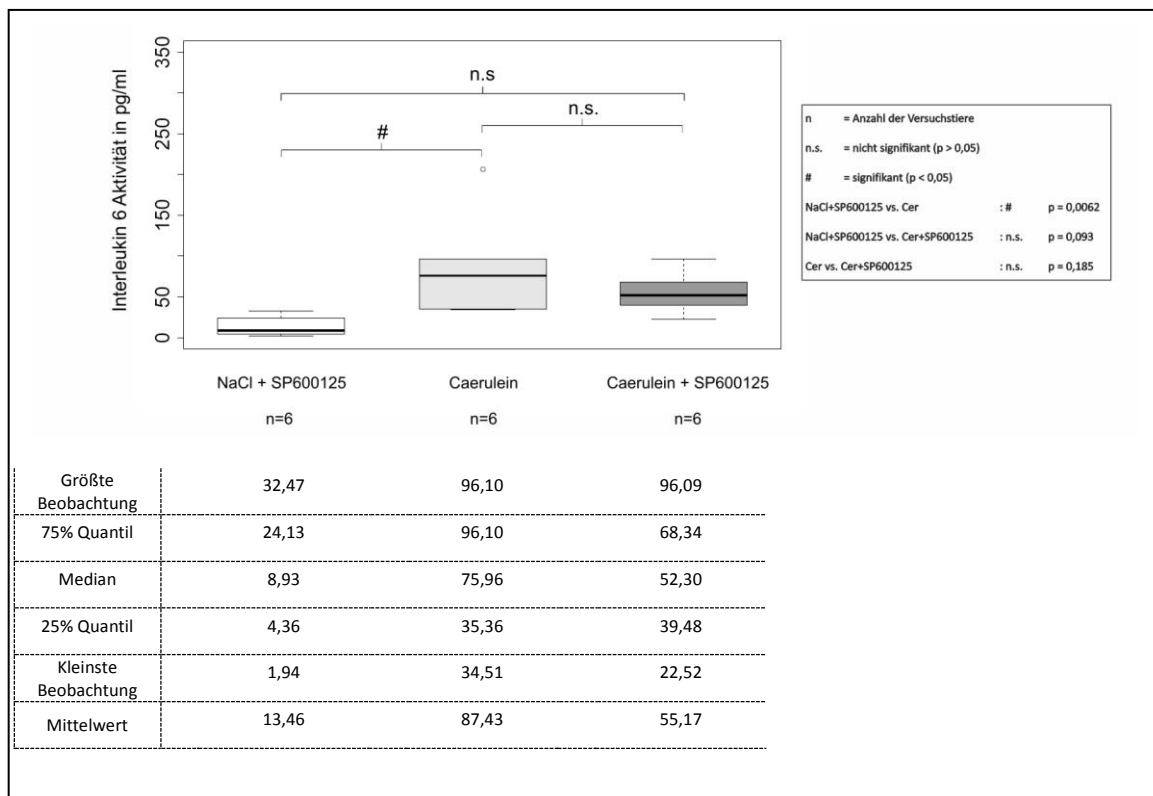


Abbildung 23: Interleukin 6 Bestimmung bei MK-2/- Tieren im Serum

### 3.3 Ergebnisvergleich zwischen nicht-transgenen und MK-2 $-/-$ Tieren

Die noch verbliebene These aus der Hauptfragestellung zu dieser Arbeit soll eine Antwort darauf geben, ob die Kombination aus MK-2  $-/-$  und der Hemmung der SAPK/JNK Kinase zu einer Verbesserung der akuten Pankreatitis führen kann.

Im ersten Auswertungsschritt betrachten wir die Unterschiede zwischen Kontrollen der nicht-transgenen-Mäuse und den MK 2  $-/-$  -Tieren, die nur NaCl (Behandlung 0) beziehungsweise SP 600125 (Behandlung 1) erhalten haben.

Zunächst ist auffällig, dass die Basisaktivität gerade der MK-2  $-/-$  Kontrollen im direkten Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollen zumindest im Median bei allen untersuchten Werten erhöht ist. Insgesamt scheint die Streuung der Werte bei den nicht-transgenen Tieren deutlich größer zu sein.

Für die Amylase (Abbildung 24) tritt dieser Unterschied besonders deutlich hervor. In der Signifikanztestung errechnet sich ein p-Wert von  $p = 0,00078$ .

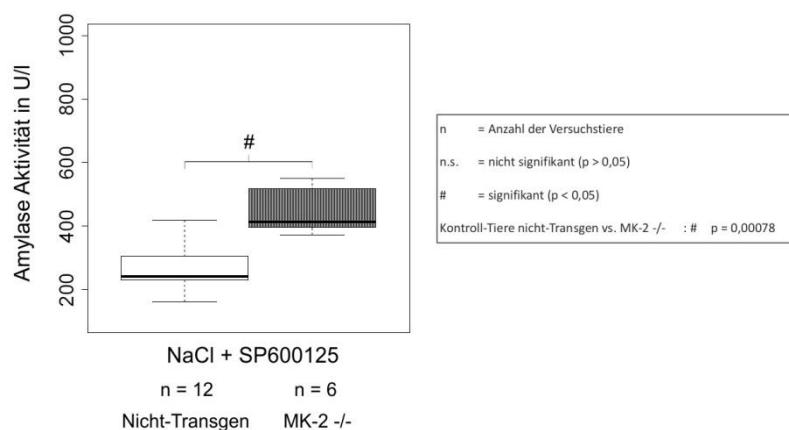


Abbildung 24: Vergleich der Amylase Aktivität bei den Kontroll-Tieren zwischen der nicht-transgenen und MK-2  $-/-$  Gruppe

Bei Trypsin (Abbildung 25) liegen die MK-2  $-/-$  Mäuse im Median oberhalb der nicht-transgenen Tiere. Letztere zeigen zudem eine sehr starke Streuung der einzelnen Werte an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen liegt aber nicht vor ( $p = 0,5348$ ).

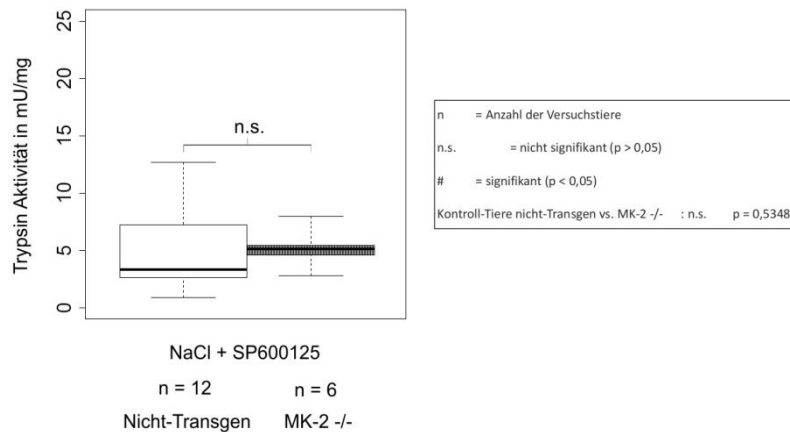


Abbildung 25: Vergleich der Trypsin Aktivität bei den Kontroll-Tieren zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe

Für die Kontrollen in der MPO Bestimmung (Abbildung 26) ergeben sich statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen ( $p = 0,351$ ).

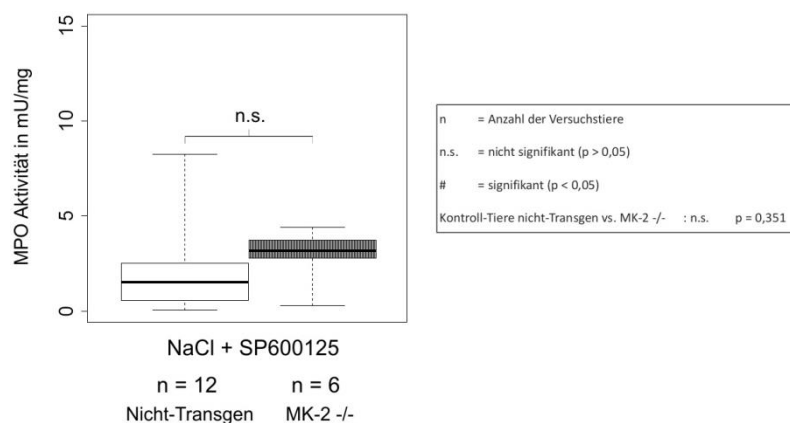


Abbildung 26: Vergleich der MPO Aktivität bei den Kontroll-Tieren zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe

Im Vergleich der Kontrollen für Interleukin-6 (Abbildung 27) ist schließlich knapp ein signifikanter Unterschied messbar. Der errechnete p-Wert im T-Test beträgt  $p = 0,046$ .

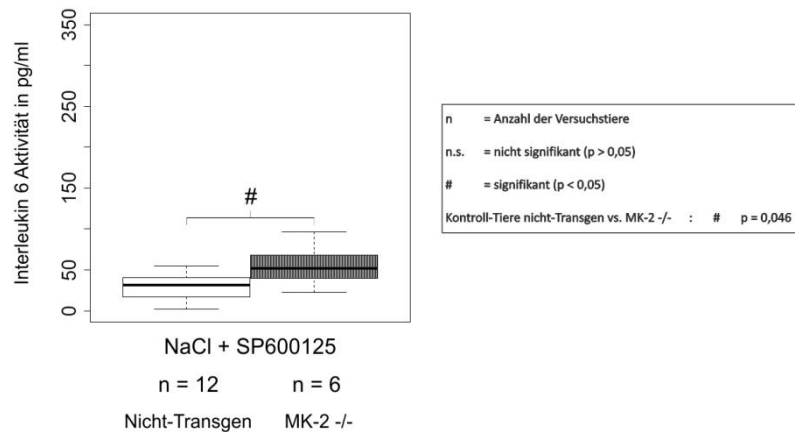


Abbildung 27: Vergleich der Interleukin-6-Aktivität bei den Kontroll-Tieren zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe

### 3.3.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse für die Serum-Amylase

In den noch zu verbleibenden Auswertungsschritten der laborchemischen Parameter werden folgende Behandlungen und Gruppen miteinander verglichen: die Caerulein-Tiere (Behandlung 2) und die Caerulein + SP 600125-Tiere (Behandlung 3). Der Vergleich Caerulein (Behandlung 2) und Caerulein + SP 600125 (Behandlung 3) aus der nicht-transgenen Mäuse-Population, sowie der entsprechende Vergleich in der MK-2 -/- Gruppe. Schließlich als letzter und entscheidender Vergleich zur Beantwortung einer Hauptfragestellung: Caerulein-Tiere (Behandlung 2) der nicht-transgenen Gruppe mit den Tieren der MK-2 -/- Gruppe, welche Caerulein + SP 600125 (Behandlung 3) erhalten haben.

Die Aktivität der Amylase (Abbildung 28) ist bei den Caerulein-Tieren im Vergleich zwischen den nicht-transgenen und Mk-2 -/- -Tieren mit einem  $p = 0,0004$  signifikant, was eine Steigerung um rund 19 % bei den Knock-out Tieren bedeutet. Ebenfalls signifikant, wenn auch nur knapp, mit einem p-Wert von 0,0438, ist der Vergleich der nicht-transgenen Caerulein-Mäuse (Behandlung 2) mit der MK-2 -/- Gruppe, die zusätzlich noch inhibiert wurden (Behandlung 3). Die MK-2 -/- Tiere haben eine 12 % höhere Aktivität gegenüber den nicht-transgenen Tieren. Für die restlichen Testungen bestehen keine signifikanten Unterschiede.



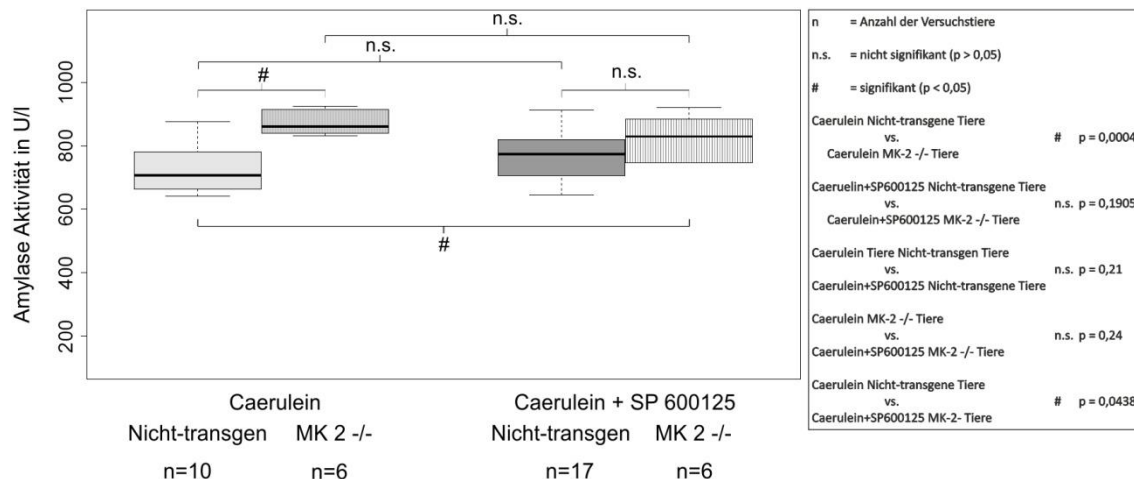


Abbildung 28: Vergleich Amylase Aktivität der Caerulein und Caerulein + SP600125 Tiere zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe

### 3.3.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse für Trypsin

Der Aussagekräftigste Parameter in dieser Untersuchungsreihe über die schwere einer akuten Pankreatitis ist die Trypsin-Aktivität im Pankreasgewebe. Für die ermittelten Ergebnisse der Trypsin-Aktivität (Abbildung 29) gelten im Vergleich der untersuchten Tiere folgende Werte: In der Caerulein-Gruppe (Behandlung 2) wurde im Vergleich zwischen den nicht-transgenen und MK-2 -/- Tieren eine statistisch signifikante Abnahme der Trypsin-Aktivität zugunsten der Knock-out Tiere um etwa -55% gemessen ( $p = 0,027$ ). Ebenso existiert bei den Caerulein + SP 600125 Tieren (Behandlung 3) zwischen den beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,046$ ). Auch hier fällt das Ergebnis zugunsten der MK-2 -/- mit -38 % geringerer Aktivität aus. Vergleicht man die Aktivitäten zwischen den Caerulein und Caerulein + SP 600125 Tieren (Behandlung 2 und 3) innerhalb der jeweiligen Gruppen, so findet man keine signifikanten Unterschiede. Der Vergleich Caerulein (Behandlung 2) nicht-transgene Tiere mit Caerulein + SP 600125 der MK-2 -/- Tiere zeigt wiederum einen signifikanten Unterschied zugunsten der Knock-out Tiere ( $p = 0,046$ ), was einer geringeren Aktivität von -45 % entspricht.

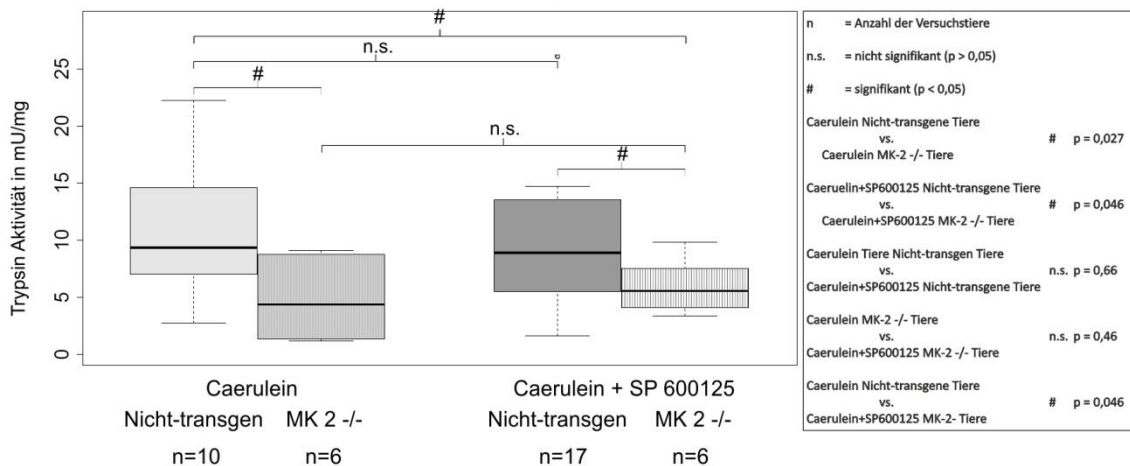


Abbildung 29: Vergleich Trypsin Aktivität der Caerulein und Caerulein + SP600125 Tiere zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe

Betrachtet man die Werte für die Tiere, die mit dem Inhibitor behandelt wurden (Behandlung 3) gegenüber den Tieren, die Caerulein erhalten haben (Behandlung 2), so ergibt sich in der nicht-transgenen Gruppe für die inhibierten Tiere zwar eine Abnahme der Trypsin-Aktivität, diese ist jedoch nicht signifikant. Die MK-2 -/- Gruppe weist bei gleicher Testung in absoluten Zahlen sogar geringfügig höhere Werte gegenüber den Caerulein-Tieren aus. Eine Signifikanzniveau wird aber auch hier nicht erreicht.

### 3.3.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse für MPO:

Für die aus Lungengewebe bestimmte Myeloperoxidase (MPO) (Abbildung 30) ist optisch klar zu erkennen, dass die zusätzliche Gabe von SP 600125 in beiden Gruppen die Aktivität der MPO gegenüber den Caerulein-Tieren verringert. Vergleicht man die beiden Gruppen, die nur mit Caerulein behandelt wurden (Behandlung 2), so ist eine etwas höhere Aktivität bei den MK-2 -/-Tieren messbar. Diese ist jedoch nicht signifikant ( $p = 0,573$ ). Führt man die Testung für die beiden Gruppen aus, die zusätzlich noch SP 600125 (Behandlung 3) erhalten haben, so sind die erhobenen Werte bei den nicht-transgenen Tieren überraschend gegenüber den MK-2 -/-Tieren mit 77 % signifikant geringer ( $p = 0,0395$ ). Der Unterschied zwischen Behandlung 2 und 3 ist sowohl bei den nicht-transgenen ( $p = 4,9e-5$ ) (ca. -66 Prozent) als auch bei den Knock-out-Tieren ( $p =$

0,00093) (ca. – 47 Prozent) jeweils zugunsten der Inhibierten Versuchstiere signifikant. Der letzte Vergleich, Caerulein (Behandlung 2) der nicht-transgenen Tiere mit MK-2 -/- Tieren Caerulein + SP600125 (Behandlung 3) ist mit einem p-Wert von 0,077 noch nicht signifikant.

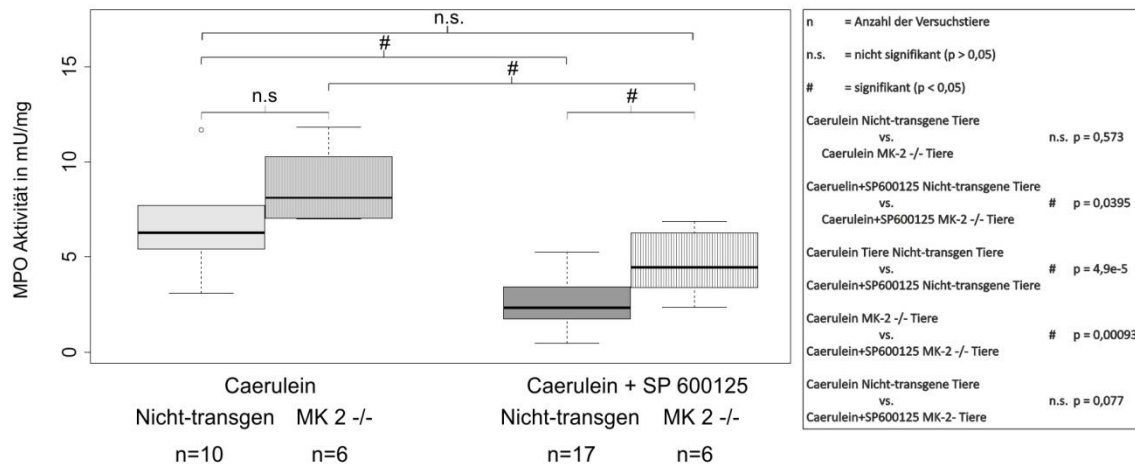


Abbildung 30: Vergleich MPO Aktivität der Caerulein und Caerulein + SP600125 Tiere zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe

### 3.3.4 Gegenüberstellung der Ergebnisse für Interleukin-6:

Analog zu den vorangegangenen Messwerten wurde auch die Interleukin-6 Aktivität bei der Tierpopulationen miteinander verglichen (Abbildung 31). Wie bereits zuvor beschrieben, fällt auch hier die nicht-transgene Caerulein-Gruppe auf. Im Vergleich der Caerulein-Tiere (Behandlung 2) in beiden Gruppen zeigt sich kein statistisch messbares Signifikanzniveau. Für Caerulein + SP600125 (Behandlung 3) wird zwischen den Kohorten eine Signifikanz erreicht ( $p = 0,02$ ). Im Mittel werden für den Vergleich von Behandlung 2 und 3 innerhalb der Gruppen bei den Tieren mit Inhibitor geringere Werte ermittelt, diese sind jedoch nicht signifikant. Der abschließende Vergleich zwischen den nicht-transgenen Tieren mit Caerulein-Behandlung (Behandlung 2) und MK-2 -/- Tieren mit Caerulein + SP600125-Behandlung (Behandlung 3) zeigt jedoch einen statistisch signifikanten Vorteil für die Knock-out Tiere mit einem p-Wert von 0,015 für die Interleukin-6 Aktivität im Serum.

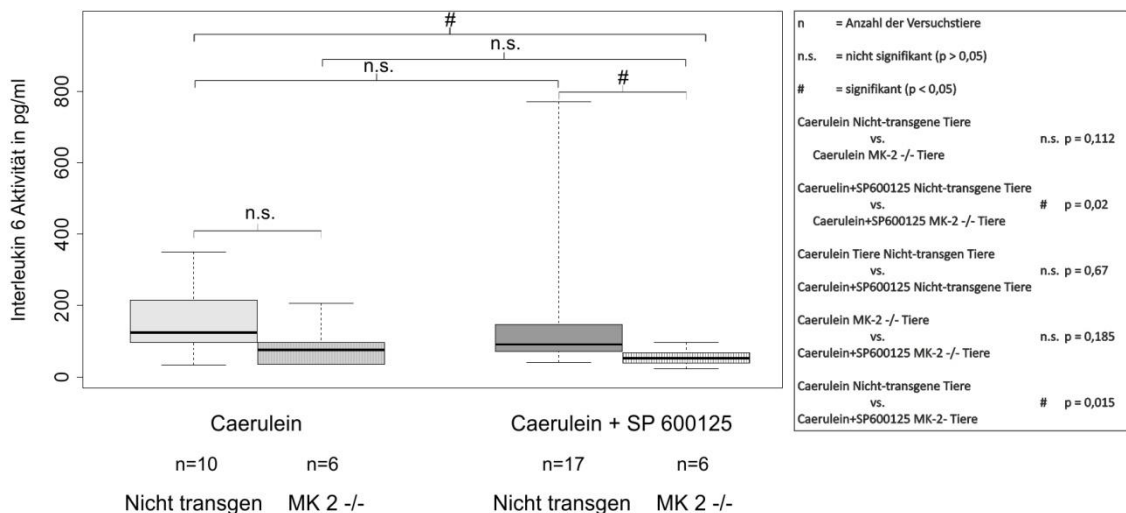


Abbildung 31: Vergleich Interleukin-6 Aktivität der Caerulein und Caerulein + SP600125 Tiere zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe

### 3.4 Western-Blot

Die Western-Blots wurden nach der Methode von Renart (220) beschrieben in Kapitel 2.7 durchgeführt. Analysiert wurden p38, JNK/SAPK und p44\42 je als Gesamtprotein und in der phosphorylierten Form. Bei dem zusätzlich gewählten und am Ende der Kaskade stehenden Protein ATF-2, welches als Transkriptionsfaktor fungiert, konnte trotz Verwendung verschiedener Antikörper, Konzentrationen, Inkubations- und Belichtungszeiten, keine stabile Phosphorylierung nachgewiesen werden. Auch die vom Hersteller bereitgestellten Positiv-Kontrollen zeigten keine Reaktion. Aus diesem Grund muss im Rahmen dieser Arbeit auf die verfügbare Literatur zur Funktion von ATF-2 und dessen Transkriptionsprodukte verwiesen werden. Aufgrund der niemals gleichen Bedingungen bei der Durchführung eines Western-Blots ist eine klare Aussage sehr schwierig und allenfalls als Trend anzusehen. In dieser Arbeit wird mit Hilfe der Software ImageJ (National Institutes of Health, USA) eine Hell/Dunkel Analyse der einzelnen Banden in einem vor der Messung zu bestimmenden Bildausschnitt durchgeführt. So kann jedem einzelnen Pixel ein Zahlenwert zugeordnet werden. Die genaue Durchführung ist im Folgenden beschrieben. Ein als Viereck gewählter Ausschnitt wird auf jede zu analysierende Bande des Western-Blots dupliziert. Das Ergebnis der Grau-

stufenmessung wird in einer Kurve ausgegeben. Dabei hat ein rein weißer Punkt den Wert „null“ und tiefes schwarz „eins“ auf der y-Achse. Graustufenwerte liegen dazwischen. Um den Fehler durch den Hintergrund zu reduzieren, wird parallel zur X-Achse eine gerade an den tiefsten Punkten der Kurve angelegt. Anhand dieses nun festgelegten Areals lässt sich die Fläche unter der Kurve berechnen. Die dabei ermittelten Zahlenwerte sind dimensionslos. Je dunkler der Blot umso größer die Kurve und somit die Proteinkonzentration. Eine weitere statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Qualität einiger Western-Blots für eine genauere Analyse nicht ausreichend war. Ebenso ist die Gesamtanzahl zu gering und die manuelle Begrenzung der „Area under the curve“ (AUC) mit einer hohen Toleranz verbunden. Die erhobenen Zahlen wurden aus allen zur Verfügung stehenden Western-Blots errechnet. Die Unterschiede sind in Prozent angegeben und zeigen somit lediglich einen Trend an.

### 3.5 Pixelanalyse und Darstellung der Beispiel Western-Blots

Die hier gezeigten Western-Blots und deren Ergebnisse sind lediglich eine Auswahl. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur die relevanten Ausschnitte gezeigt. In den nachfolgenden Balkendiagrammen wird aus den zur Verfügung stehenden Western-Blots die durchgeführte Pixelanalyse Graphisch dargestellt.

#### 3.5.1 Gesamt und phospho SAPK/JNK Antikörper der nicht-transgenen Tiere

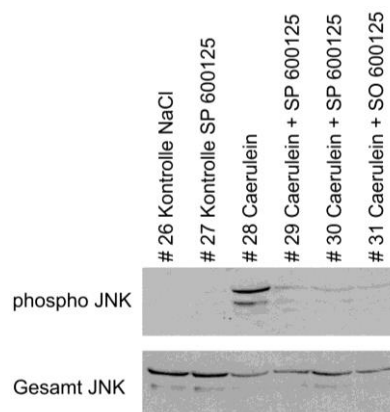


Abbildung 32: phospho JNK und Gesamt JNK aus IVP 4

Die Funktion von SP 600125 besteht in der Hemmung der Stresskinase SAPK/JNK. Diese Hemmung betrifft allerdings nicht die Expression des Proteins an sich. Der Inhibitor verhindert nur die Phosphorylierung von JNK zu phospho-JNK und damit die Überführung in die aktive Form. In denen als Beispiele gezeigten Blots ist gut zu erkennen, dass die Kontrolltiere ein deutliches Signal, eine für diese Kinase typische Doppelbande, im Gesamtantikörper für SAPK/JNK liefern. Wie zu erwarten sind nur sehr schwache Banden bei der Detektion nach phosphorylierten JNK/SAPK Antikörper zu erkennen. Dies ist in der (Abbildung 32) und den korrespondierenden Zahlenwerten gut zu erkennen (Abbildung 33). Die phosphorylierte Variante ist deutlich geringer in der Zelle exprimiert worden. Die ausschließlich mit Caerulein behandelten Tiere hingegen haben ein deutliches Signal bei phospho-JNK was für eine Aktivierung der Kinase spricht. Das abgeschwächte Signal im Gesamtantikörper lässt folgern dass es zu einem Verbrauch der unphosphorylierten Kinase zugunsten der phosphorylierten Form gekommen ist. Auch das lässt sich an den Zahlen im Balkendiagramm gut erkennen. Die mit Caerulein und Inhibitor behandelten Tiere dagegen haben ein abgeschwächtes Signal bei dem phosphorylierten Antikörper, was eine erfolgreiche Inhibierung nahe legt.

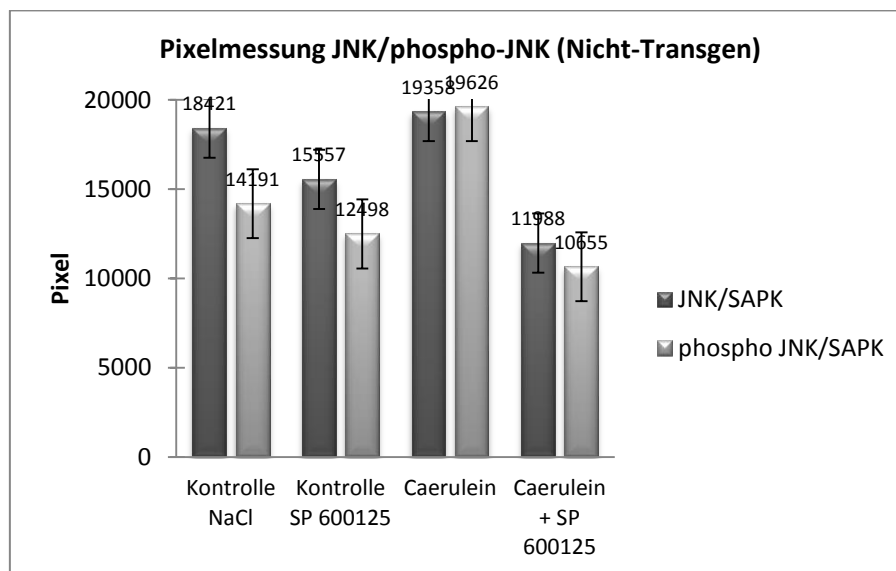


Abbildung 33: Pixelmessung NTG JNK/phospho JNK

Für die zusätzlich mit Inhibitor behandelten Tiere sieht man eine geringere Zahl bei beiden Proteinvarianten. Das phosphorylierte Protein wird dabei gegenüber dem inaktiven Protein weniger exprimiert.

### 3.5.2 Gesamt und phospho p38 Antikörper der nicht-transgene Tiere

Der Nachweis von p38 war nahezu in allen Western-Blots möglich. Eine Phosphorylierung war jedoch nicht durchgehend nachzuweisen. Dabei konnte bei den Kontroll-Tieren überwiegend ein stabiles Signal detektiert werden. Für Mäuse mit Caerulein und Caerulein mit SP 600125 war dies nicht immer möglich (Abbildung 34).

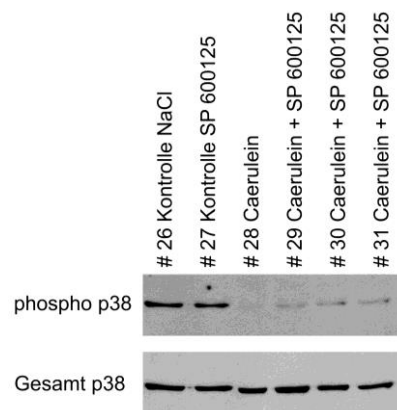


Abbildung 34: phospho p38 und Gesamt p38 aus IVP 4

Betrachtet man die Pixelanalyse von allen Western-Blots, so ist im Gegensatz zu dem hier exemplarisch aufgezeigten Western Blot erkennbar, dass bei Caerulein-Tieren sowohl bei dem Gesamtantikörper als auch in der phosphorylierten Form wenig Unterschiede bestehen. Im Balkendiagramm (Abbildung 35) ist abzulesen, dass der Grad der Phosphorylierung geringfügig bei den NaCl Kontrollen abfällt. Kommt ein Agens in Form von Caerulein oder SP 600125 hinzu, ist die Phosphorylierung etwas stärker ausgeprägt. In absoluten Zahlen sind aber kaum Änderungen zu erkennen.

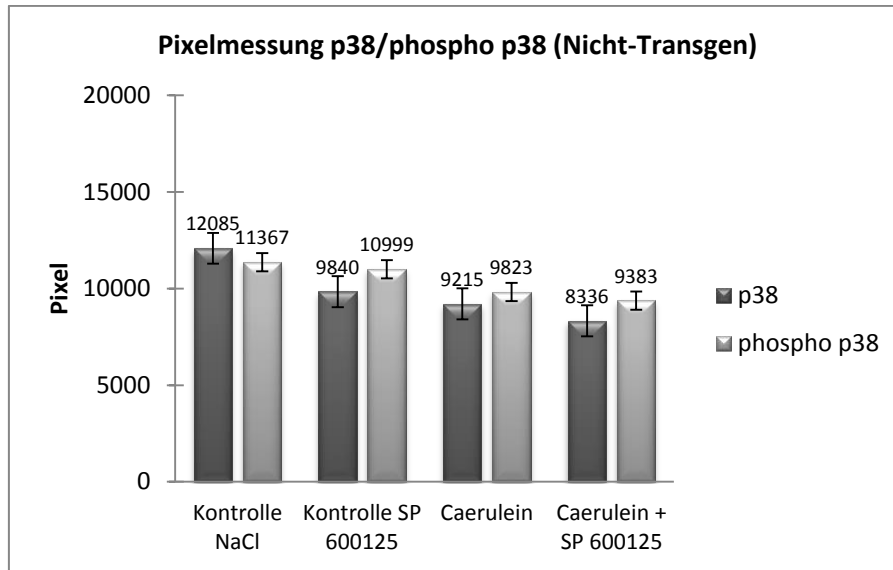


Abbildung 35: Pixelmessung NTG p38/phospho p38

### 3.5.3 Gesamt und phospho p44\42 Antikörper der nicht-transgenen Tiere

In den angefertigten Western-Blots ist im Balkendiagramm zu erkennen, dass die Kontrolltiere eine überwiegend stabile Phosphorylierung von p44\42 bei den mit Caerulein behandelten Tieren nachweisbar. Auch für die restlichen Versuchstiere, die mit Caerulein beziehungsweise SP 600125 behandelt wurden, ist eine stärkere Phosphorylierung gegenüber dem Gesamtantikörper erkennbar (Abbildung 36).

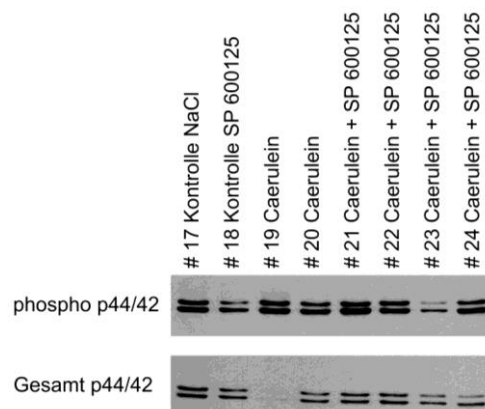


Abbildung 36: phospho p44\42 und Gesamt p44\42 aus IVP 3



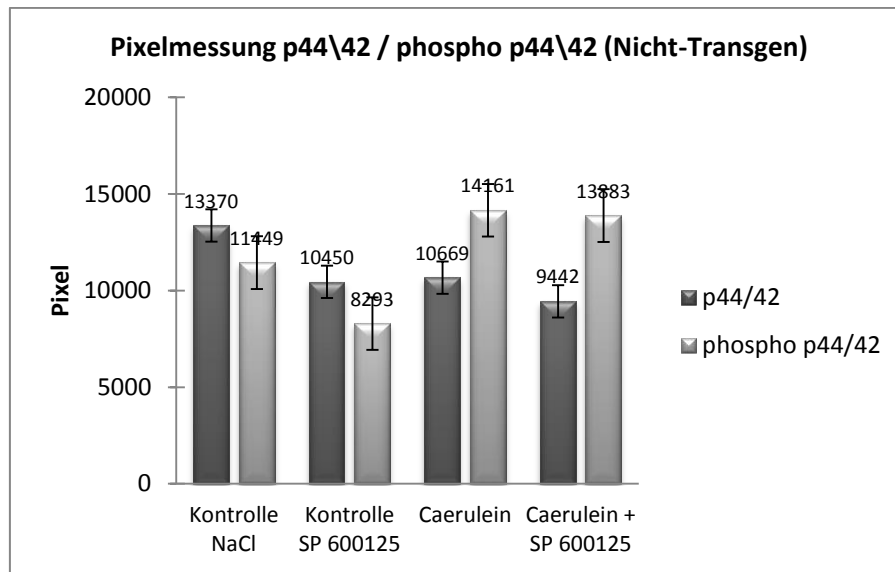


Abbildung 37: Pixelmessung NTG p44\42 / phospho p44\42

Die Zusammenfassung der Pixelmessung für p44\42 zeigt bei den Kontrolltieren für die phosphorylierte Form gegenüber dem Gesamtantikörper eine etwas geringere Aktivierung. Der optische Eindruck für die Caerulein und Caerulein + SP 600125 Tiere bestätigt sich auch in den Zahlen der Pixelmessung (Abbildung 37).

### 3.6 Western-Blot MK-2 -/-

Analog zu den nicht-transgenen Mäusen, wurde eine Auswertung der Western-Blots auch für die MK-2 -/- Tiere durchgeführt

#### 3.6.1 Gesamt und phospho SAPK/JNK Antikörper der MK-2 -/- Tiere

Die Deaktivierung der Mapkap-Kinsase-2 (MK-2) sollte sich in der Expression von SAPK/JNK nicht auswirken. In dem gezeigten Beispiel Blot (Abbildung 38) ist dies gut zu erkennen. Die mit Caerulein stimulierten Tiere zeigen gegenüber den Kontrollen und den mit Inhibitor behandelten Tieren deutlich kräftigere Banden und damit für eine erfolgreiche Phosphorylierung.

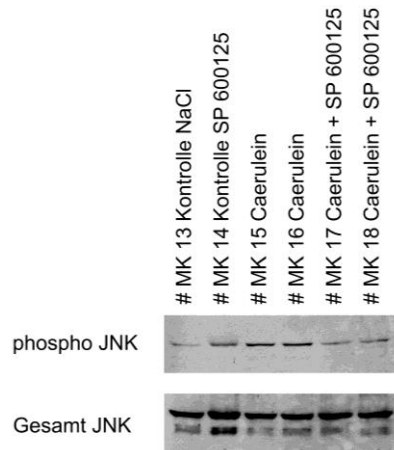


Abbildung 38:phospho SAPK/JNK und Gesamt SAPK/JNK aus IVP 6

Dies spiegelt sich auch in den Zahlen nach der Pixelanalyse wieder (Abbildung 39). Bei den Kontrollen ist der Gesamtantikörper stärker exprimiert. Dies kehrt sich bei den Caerulein Tiere und inhibierten Tieren um. Hier ist die phosphorylierte Form der SAPK/JNK dominierend.

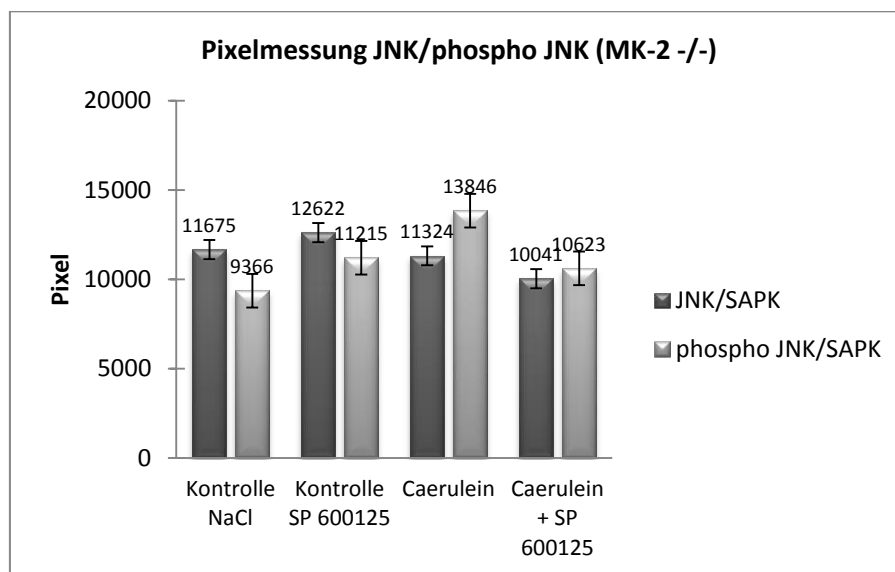


Abbildung 39: Pixelmessung MK2 JNK/phospho JNK

## 3.6.2 Gesamt und phospho p38 Antikörper der MK-2 <sup>-/-</sup>-Tiere

Auch für die MK-2 <sup>-/-</sup> Gruppe wurden Western-Blots mit der MAPK p38 angefertigt. In der Gesamtanalyse der Pixel fallen vor allem die deutlich geringeren Zahlen gegenüber den nicht-transgenen Tieren auf (Abbildung 41). Zudem ist das Signal bei phosphorylierten p38 bei den Tieren die den Inhibitor SP 600125 erhielten deutlich niedriger gegenüber dem Gesamtantikörper. Ein Effekt der bei den nicht-transgenen Tieren nicht ersichtlich war (Abbildung 40).

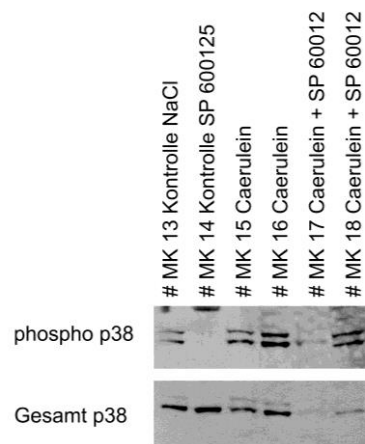


Abbildung 40:phospho p38 und Gesamt p38 aus IVP 6

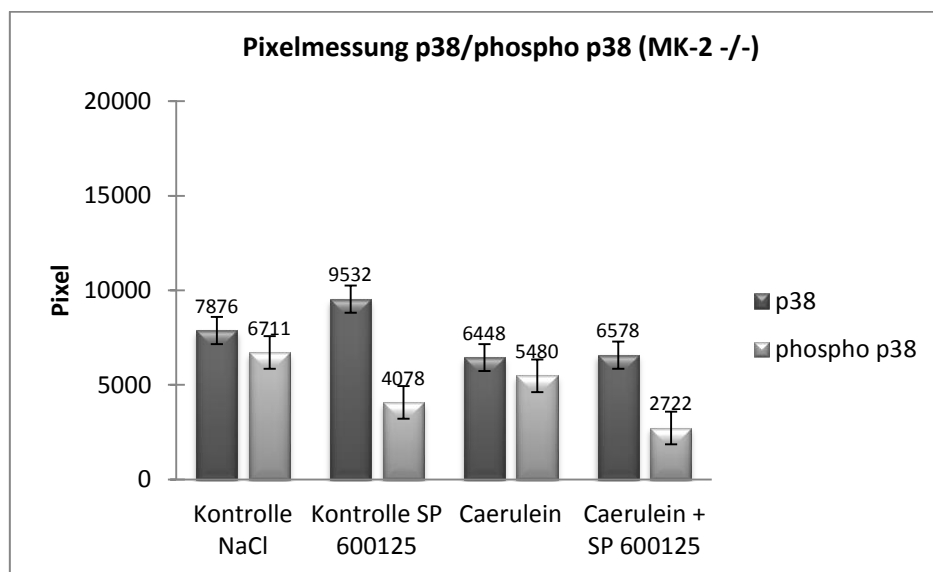


Abbildung 41: Pixelmessung MK-2 p38/phospho p38

## 3.6.3 Gesamt- und phosphorylierte p44/42-Aktivität in MK-2-/- Tieren

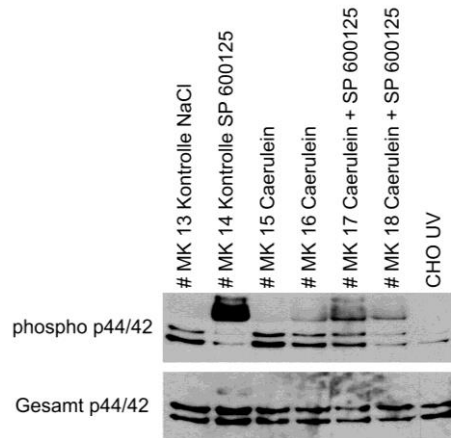


Abbildung 42: phospho p44\42 und Gesamt p44\42 aus IVP 6

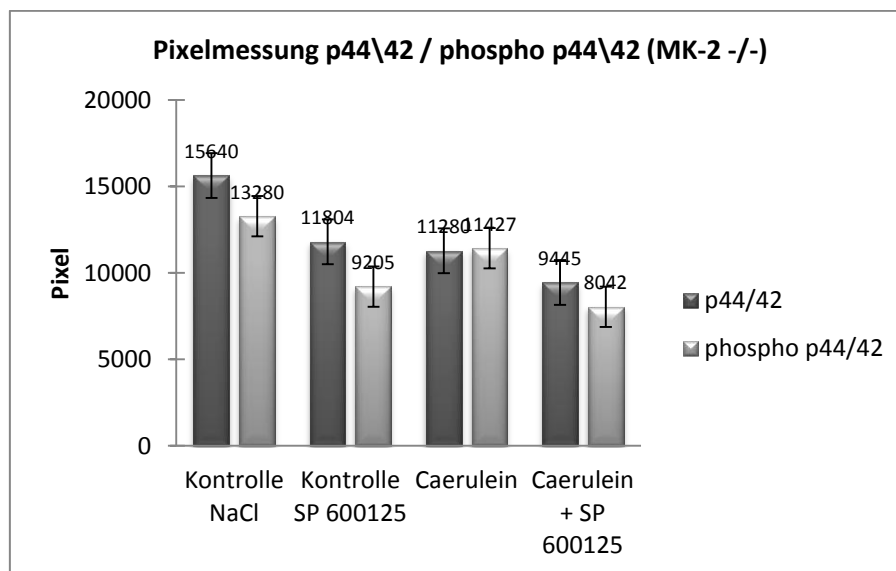


Abbildung 43: Pixelmessung MK2 p44\42 / phospho p44\42

Entsprechend den nicht transgenen Tieren ist im Western-Blot auch bei den MK-2 -/- Tieren die typische Doppelbande für p44\42 zu sehen (Abbildung 42). In der Pixelanalyse der Gesamten Western-Blots erkennt man, dass die Kontrolltiere im Vergleich zu dem Gesamtantikörper eine geringere Phosphorylierung aufweisen. Bei den Caerulein-Tieren halten sich beide Formen in etwa die Waage. Erst durch die Zugabe des Inhibitors wird die Expression der phosphorylierten Variante gegenüber dem Gesamtantikörper verringert (Abbildung 43).

### 4. Diskussion

Obwohl in den letzten Jahrzehnten deutliche Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis und in der intensivmedizinischen Behandlung gemacht wurden, sinkt die Zahl der Todesfälle gerade bei schweren oder schwersten Verläufen kaum (224). Die Notwendigkeit eine kausale Therapie anbieten zu können besteht aus mehreren Gründen. Nicht nur für die Behandlung exazerbierter Pankreatitiden, die aufgrund von Alkohol oder Gallensteinleiden entstehen. Sondern auch für chronische Pankreatitiden, deren Auslöser in der autoimmunen oder hereditären Genese zu suchen sind und schließlich die iatrogen verursachte akute Pankreatitis, die nach medizinischen Eingriffen wie etwa der endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) vorkommen kann. Im günstigsten Fall könnte mit einer medikamentösen Prophylaxe gerade die sogenannte post-ERCP Pankreatitis (225) vermieden werden. Betrachtet man die Zahlen der post-ERCP Pankreatitiden, dann sind diese über Jahre relativ stabil. In einem nicht selektionierten Patientenkollektiv und je nach Studie, liegt die Inzidenz bei bis zu 10 % und die Mortalität aufgrund des iatrogenen Eingreifens in Folge bei knapp unter einem Prozent (226), (227). Diverse Untersuchungen zeigen zwar, dass die prophylaktische Gabe von unterschiedlichen Medikamenten hilfreich sein kann. Die Wirksamkeit ist in der aktuellen Studienlage nicht hinreichend bewiesen aber aktuell Gegenstand der Diskussion. In jüngster Zeit wird die Gabe von Indometacin zur Hemmung der Prostaglandinfreisetzung bei Hochrisikopatienten propagiert (228). Dieses Vorgehen scheint vor allem in Kombination bei frustrierten Stenteinlagen sich als günstig zu beweisen (229). Konnten Döbrönte et al. für die breite Masse der Patienten noch keine signifikante Verbesserung in der Prävention der post-ERCP Pankreatitis nachweisen (230), so haben Luo et al in einer Multi-Center Studie zeigen können, dass die rektale Gabe von Indometacin das Auftreten einer post-ERCP Pankreatitis deutlich reduzieren kann (231). Ausgehend von neuen Erkenntnissen ist die langfristige Zielsetzung eine wirksame Therapie zu etablieren. Durch die weiter voranschreitende Identifizierung der beteiligten Signalkaskaden und die Verfügbarkeit

von effektiven pharmakologischen Hemmstoffen, stehen Ansätze bereit, neue Wege in der Behandlung der akuten als auch der chronischen Pankreatitis aufzuzeigen. Die Inhibierung der Stresskinasen gilt hier als ein möglicher pharmakologischer Ansatzpunkt in der Therapie einer akuten Pankreatitis.

Das Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung von zwei Fragestellungen: Ist durch die selektive Inhibierung der SAPK/JNK mit SP 600125 eine Behandlung der akuten Pankreatitis möglich? Und im speziellen: Hat die zusätzliche Hemmung von SAPK/JNK bei MK-2 <sup>-/-</sup> Mäusen einen zusätzlichen positiven Effekt bei der akuten Pankreatitis?

### **4.1 Diskussion der Ergebnisse**

Mit den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit einer intraperitonealen Injektionen von Caerulein eine akute Pankreatitis bei beiden Genotypen auslösbar ist und die beschriebenen Stresskinasen in dieses geschehen involviert sind. Aus den Ergebnissen der Inhibierung von SAPK/JNK lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion der Kinasen und deren pathophysiologischen Rolle bei der akuten Pankreatitis ableiten, die im Folgenden näher erläutert werden.

Vergleicht man die Ergebnisse für die Amylase, liegen unerwartet die Werte der nicht-transgenen Tiere, die zusätzlich zu Caerulein den Inhibitor SP 600125 erhalten haben, mit der Amylase-Aktivität über denen, die ausschließlich mit Caerulein behandelt wurden (Abbildung 15). Diese Werte sind zwar nur gering und nicht signifikant erhöht, eine einfache Erklärung für die Zunahme der Aktivität ist jedoch nicht möglich. Bekannt und bewiesen ist, dass ausgeschaltete MK-2-Kinasen einen protektiven Effekt bei der Caerulein-induzierten Pankreatitis haben. Bei den MK-2 <sup>-/-</sup> Tieren ist zu erkennen, dass die Aktivität der Amylase bereits bei den Kontrollen erhöht ist (Abbildung 10 + Abbildung 20). Dementsprechend fällt der Unterschied zu den Caerulein-Tieren geringer aus. Hier ist ein Ansatz zur Erklärung dieses Phänomens die deletierte MK-2-Kinase. Es könnte sein, dass das im Normalfall von MK-2 mitaktivierte HSP hierfür verantwortlich ist. Belegbar ist diese Aussage aber an den vorhandenen Ergebnissen nicht. Laborchemisch zeigt sich in beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen in der Amylase-

Aktivität bei den Tieren mit Caerulein und SP 600125. Die Fragestellung, ob die Kombination von SAPK/JNK Inhibitor zusammen mit MK-2 (-/-) (Behandlung 3) eine signifikante Veränderung gegenüber nicht-transgenen Caerulein-Mäusen (Behandlung 2) bringt, kann mit Ja beantwortet werden. Der p-Wert liegt hier bei 0,0438. Allerdings liegt die Signifikanz in diesem Fall zugunsten Caerulein-Tiere. Die Knock-out Tiere, die zusätzlich noch SP 600125 erhalten haben, weisen eine um 12 Prozent höhere Aktivität aus (Abbildung 28). Die etwas geringeren Aktivitätswerte von Behandlung 3 gegenüber Behandlung 2 in der MK-2 (-/-) sind mit einem p-Wert von 0,24 nicht signifikant (Abbildung 20). Es kann somit festgestellt werden, dass in dieser Untersuchung die Hemmung der SAPK/JNK mit SP 600125 innerhalb des Beobachtungszeitraums keinen positiven Einfluss in beiden Gruppen auf die Aktivität der Serum-Amylase hat. Die Bestimmung der Amylase ist eine gängige laborchemische Untersuchung und geht in vielen Fällen mit einer Erhöhung der Serum-Amylase einher. Sie ist aber nicht beweisend für eine Pankreatitis und ist keinesfalls ein Marker für die Schwere der akuten Pankreatitis. Ebenso ist die Amylase kein pankreasspezifisches Enzym. Zu vermuten ist, dass durch die anfängliche Induktion mit Caerulein bereits sehr früh eine erhöhte Serum-Amylase unabhängig von einer späteren erfolgreichen Inhibierung der Inflammationskaskade vorliegt. Innerhalb des in dieser Untersuchung gewählten Beobachtungszeitraums ist demnach bei einer Halbwertszeit der Amylase von 9-18 Stunden nicht von einer Abnahme der Amylase-Werte auszugehen (232).

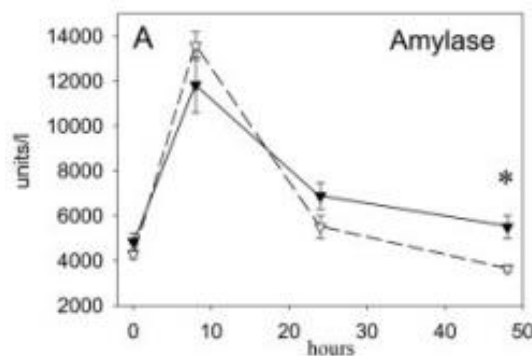


Abbildung 44: Halbwertszeit Amylase (Quelle: Selig et. al)

Der zweite analysierte Pankreatitis Parameter ist das Trypsin aus lysierten Pankreasgewebe. Trypsin korreliert bereits erheblich besser mit der Schwere der Pankreatitis und ist deutlich spezifischer. Anhand der Grafiken ist zu erkennen, dass die nicht-transgenen Mäuse eine deutlich höhere Aktivität des Trypsins gegenüber den MK-2 Tieren aufweisen. Dieses Ergebnis wurde bereits in der Arbeit von Tietz beschrieben (184). Interessanterweise ist zu beobachten, dass nicht-transgene Tiere, die nur mit Inhibitor behandelt, wurden einen Anstieg in den Trypsinwerten gegenüber den reinen NaCl-Kontroll Tieren aufweisen. Die MK-2  $-/-$  Kontrollen bewegen sich auf vergleichbaren Aktivitätsniveau (Abbildung 11). In beiden Fällen wird aber kein Signifikanzniveau erreicht. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist schwierig. Man kann mutmaßen, dass SP 600125 neben seiner Inhibitorfunktion auch als Noxe gegenüber den Pankreaszellen fungiert und selbst eine Translokation in die Azinus-Zelle auslösen könnte. Nicht-transgene Tiere die Caerulein und SP 600125 erhielten, zeigen im Vergleich zur ausschließlichen Caerulein-Stimulation eine nur gering erniedrigte Aktivität (Abbildung 16). In der MK-2  $-/-$  -Gruppe ist, wie bereits erwähnt, eine geringere Gesamtaktivität des Trypsins zu sehen. Überraschend ist, dass sowohl Kontrollen, Caerulein und Caerulein + SP 600125-Tiere sich im Aktivitätsniveau des Trypsins kaum unterscheiden (Abbildung 21). Dies kann als Beleg für eine wirksame Protektion durch Deletion von MK-2 interpretiert werden. Als letzter Baustein zur Klärung der zweiten Hauptfragestellung wird schließlich, wenn auch nur knapp, ein signifikanter p-Wert von 0,046 im Vergleich der nicht-transgenen Caerulein- mit den MK-2  $-/-$  -Tieren mit Caerulein und SP 600125 erreicht (Abbildung 25). Das entspricht einer um 44 Prozent geringeren Aktivität. Dieses Ergebnis lässt in der Tat Spielraum für die Aussage, dass die duale Hemmung von zwei potenziell Pankreatitis-begünstigenden Faktoren einen positiven Effekt auf die Caerulein-induzierten Pankreatitis haben könnte.

Das im Blutserum bestimmte und in der Humanmedizin als systemischer Entzündungsparameter verwendete Interleukin-6 zeigt wie bei den anderen Parametern Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Sowohl bei den nicht-transgenen (Abbildung 18) als auch bei den MK-2  $-/-$  -Mäusen (Abbildung 23) ist die Aktivität der Kontroll-Tiere signifikant geringer als bei den Tieren, die mit Caerulein



stimuliert wurden, so dass von einer systemischen Entzündungsreaktion gesprochen werden kann. In der Theorie sollten die ausschließlich mit Caerulein behandelten Tiere bei der Interleukin-6 Messung in der MK-2  $-/-$  Gruppe erwartungsgemäß durch eine schwächer ausgeprägte Pankreatitis gegenüber den nicht-transgenen Tieren auffallen. In den dargestellten Diagrammen ist in absoluten Zahlen die niedrigere Interleukin-6 Aktivität im Vergleich zu den nicht-transgene Mäusen gegenüber den MK-2  $-/-$  Tieren tatsächlich zu erkennen. In beiden Gruppen, die zusätzlich mit Inhibitor behandelten wurden (Behandlung 3), nimmt die Aktivität von Interleukin-6 gegenüber den Caerulein-Tieren ab (Behandlung 2), diese bewegt sich aber jeweils in einem nicht signifikanten Bereich. In der nicht-transgenen Gruppe muss jedoch bedacht werden, dass durch einige extrem hohe Werte eine statistische Verzerrung möglich ist. Diesem Umstand ist möglicherweise zu verdanken, dass im Vergleich die MK-2  $-/-$  Tiere mit Inhibitor und Caerulein (Behandlung 3) gegenüber den nicht-transgenen Mäusen eine signifikante Abnahme der Aktivität von Interleukin-6 aufweisen. Es überrascht nicht, dass die inhibierten MK-2  $-/-$  Tiere gegenüber den nicht-transgenen Caerulein Tieren ebenfalls eine signifikante Aktivitätsabnahme verzeichnen (Abbildung 31). Ähnlich wie bei Trypsin ist auch bei Interleukin-6 zu vermuten, dass die protektive Wirkung bei den MK-2  $-/-$  Tieren eine systemische Inflammationsreaktion abschwächen kann und somit die Gabe von SP 600125 nur unwesentlich zu einer Verbesserung beiträgt.

In den aus Lungengewebe ermittelten Ergebnissen für die Myeloperoxidase (MPO), lässt sich eine extrapankreatische Organbeteiligung bei der akuten Pankreatitis ableiten. Dass eine pulmonale Affektion erfolgt, ist in der signifikant erhöhten MPO Aktivität bei den Caerulein-Tieren in beiden Gruppen gegenüber den Kontrollen erkennbar. Wichtigstes Ergebnis ist jedoch die signifikante Reduzierung der MPO-Werte bei den SP 600125 Tieren (Behandlung 3) gegenüber den Caerulein-Tieren (Behandlung 2) sowohl in der nicht-transgenen als auch in der MK-2  $-/-$  Gruppe. Vergleicht man nun noch die Wirkung von SP 600125 (Behandlung 3) in der MK-2  $-/-$  Gruppe mit den Caerulein-Tieren (Behandlung 2) der nicht-transgenen Tiere, so kommt es zwar zu einer Aktivitätsabnahme, diese ist jedoch nicht signifikant (Abbildung 30). Die Inhibierung der SAPK/JNK ist demnach in beiden Gruppenerfolgreich. Allerdings ist die Kombination

von JNK-Kinaseninhibierung und MK-2 Gendeletion zumindest in dieser Untersuchung nur bedingt erfolgreich und erbringt keinen zusätzlichen Vorteil im Sinne einer milderen Pankreatitisverlaufsform.

Auch die Flüssigkeitseinlagerung in das Pankreasgewebe, die sog. Ödemisierung, ist Ausdruck eines entzündlichen Prozesses. In beiden Gruppen liegen die Werte der Kontrolltieren unter denen der Caerulein-Tiere. Letztere haben als Ausdruck einer akuten Pankreatitis eine signifikante Zunahme des Ödems (Abbildung 14). Bei den mit Caerulein stimulierten MK-2  $-/-$  Tieren ist die Ödemisierung etwas geringer (Abbildung 19). Hierfür ist möglicherweise der protektive Effekt durch die Deletion von MK-2  $-/-$  erkennbar. Der Unterschied zu den nicht-transgenen Tieren ist aber nicht signifikant. Durch die zusätzliche Gabe von SP 600125 ist in der MK-2  $-/-$  -Gruppe sogar ein deutlicher Rückgang des Ödems zu sehen. Ein Effekt der durchaus in das Bild der sonst erhobenen Daten für die Knock-out Tiere passt. Auch im Ödemisierungsgrad der nicht-transgenen Gruppe spiegeln sich die restlichen Laborwerte eher wider. Dort bewegen sich Caerulein und die zusätzlich inhibierten Tieren auf fast gleichem Niveau. SP 600125 hat in der nicht-transgenen Gruppe somit keinen nennenswerten Effekt auf den Ödemisierungsgrad. In der Knock-out Gruppe ist ein kleiner unwesentlicher Vorteil erkennbar.

In Anbetracht der Ergebnisse kann die Annahme unterstützt werden, dass die SAPK/JNK Aktivierung eine Folge der durch Caerulein ausgelösten sekretorischen Blockade und einer sich darauf anschließenden intrazellulären Zymogenaktivierung sein muss. Allerdings darf bei der akuten Pankreatitis angenommen werden, dass die SAPK/JNK eine Doppelrolle innehat. Einerseits wird die Kinase durch Entzündungsmediatoren aktiviert, andererseits ist die SAPK/JNK selbst in der Lage pro-inflammatorisch zu wirken. Nimmt man beispielsweise als Ausgangspunkt die Trypsinaktivierung, dann führt diese zwar zu einem großen Zellschaden im Pankreas, für das Voranschreiten der lokalen und systemischen Entzündung scheint das aktivierte Trypsin jedoch nicht weiter benötigt zu werden (233). Wird jedoch Cathepsin B gehemmt, ist zwar die Trypsinaktivierung geringer, die Aktivierung von SAPK/JNK bleibt davon unbeeindruckt (234).

Zudem scheint es nur wenige Kinasen zu benötigen um den Prozess in vollem Umfang anzustoßen. Die Gruppe der Versuchstiere, die mit dem SAPK/JNK Inhibitor SP 600125 behandelt und dann wiederholt mit Caerulein stimuliert wurden, zeigen im Western-Blot zwar eine geringere Phosphorylierung und damit eine Hemmung der SAPK/JNK. Dies hat offenbar auf die bereits einsetzende Inflammation in der Akutphase nur einen sehr geringen Effekt und ist wohl alleine nicht in der Lage das Voranschreiten der akuten Pankreatitis entscheidend zu beeinflussen. Zudem ist denkbar, dass die aktivierte SAPK/JNK eine Pankreatitis weiter begünstigt und das zusätzliche Faktoren und Mechanismen die Caerulein-induzierte akute Pankreatitis beeinflussen. Die Zymogenaktivierung ist vermutlich im Pankreasgewebe demnach nur ein Faktor neben der Aktivierung durch pro-inflammatorische Zytokine bei der SAPK/JNK-Induktion. Die nicht pankreasspezifischen Marker scheinen diese Theorie zu stützen. Die mit SP 600125 behandelten Tiere haben bei den systemischen Entzündungsparameter Interleukin-6 und MPO geringere Werte gegenüber den Caerulein Tieren. Dies ist bei beiden Phänotypen zu beobachten. Ein Umstand der sich durch das ubiquitäre Vorkommen von SAPK/JNK erklären lassen könnte. Wie bereits erläutert, wird nach Resorption von SP 600125 die SAPK/JNK auch in anderen Zellen gehemmt. In diesem Kontext ist erklärbar, warum die systemischen Inflamationsparameter sehr gut auf die Inhibierung durch die SAPK/JNK reagieren, während die dem Pankreas zuordenbaren Parameter überwiegend fast unverändert bleiben.

Wie an anderer Stelle bereits erläutert, wurden zur weiteren Analyse der zellulären Signalkaskaden eine Reihe von Western Blots angefertigt. Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit und damit fehlender semiquantitativer Analyse diverser Western Blots war eine statistische Auswertung nicht möglich. Die abgebildeten exemplarischen Western Blots und korrespondierender Balkendiagramme zeigen nur einen Trend.

Die SAPK/JNK MAP-Kinase nimmt eine zentrale Rolle innerhalb der Inflamationsreaktion, nicht nur bei der Pankreatitis, sondern vermutlich in allen Zellen des Organismus ein. Mit SP 600125 steht pharmakologisch ein potenter Inhibitor speziell für diese Kinase zur Verfügung. Dass die Phosphorylierung der SAPK/JNK in gewissen Grenzen

erfolgreich bei beiden Genotypen gehemmt wurde, lässt sich durch die angefertigten Western Blots gut zeigen. Allerdings sind Unterschiede erkennbar und es entsteht optisch und anhand der Zahlen der Eindruck, dass die Hemmung der Phosphorylierung bei den nicht-transgenen Mäusen stärker gegenüber den Knock-out Mäusen ausgeprägt ist (Abbildung 32 + Abbildung 33). Besonders ausgeprägt ist diese Beobachtung bei den SP 600125 Kontrollen. Ebenso ist die erfolgreiche Hemmung der nicht-transgenen Tiere die mit Caerulein und SP 600125 behandelt wurden zu sehen. Für dieselbe Behandlung bei den MK-2  $-/-$  Mäusen gilt dies jedoch nicht. Hier halten sich die inaktive und aktive Kinase in etwa auf gleichen Niveau (Abbildung 38 + Abbildung 39). Schlussendlich lassen sich die Unterschiede somit durch die deletierte MK-2-Kinase erklären. Ausgehend von der Tatsache, dass MK-2  $-/-$  Tiere einen gewissen Schutz gegenüber der Caerulein-induzierten Pankreatitis haben, sind mehrere Erklärungsansätze denkbar. Da die Zelle vermutlich versucht ihr originäres Reaktionsmuster auf einen Stimulus aufrechtzuerhalten, könnten durch die Deletion von MK-2 unter Umständen über Seitenwege andere Enzyme hochreguliert werden, die eine Phosphorylierung der SAPK/JNK anstoßen. Möglich ist aber auch, dass durch den protektiven Effekt des abgeschalteten MK-2-Gens die SAPK/JNK, die zuvor in geringerer Menge exprimiert wurde, nun schließlich eine unveränderte Menge an Inhibitor auf wenige inaktive Kinasen trifft. Eine eindeutige Erklärung für diese Beobachtung ist jedoch nicht möglich.

Die Funktion von p38 ist dagegen weniger eindeutig zu charakterisieren. Diese Kinase hat in Bezug auf die akute Pankreatitis ein ambivalentes Verhalten. Einerseits ist die MAPK p38 mit einer pro-inflammatorischen Komponente über die Aktivierung von Zytokinen wie Interleukin-6 und TNF- $\alpha$  versehen. Andererseits hat nach aktuellem Wissensstand p38 auch eine protektive Funktion. Die schwache Phosphorylierung der Caerulein Tiere in der nicht-transgenen Gruppe spricht zumindest für eine Interaktion bei der Pankreatitis (Abbildung 34 + Abbildung 35). Denkbar ist eine negative Rückkopplung bei parallel ablaufender SAPK/JNK-Phosphorylierung. Wie in früheren Arbeiten bereits nachgewiesen (184), haben auch die in dieser Untersuchung verwendeten MK-2  $-/-$  Tiere eine höhere Toleranz gegenüber der Caerulein-induzierten Pankreatitis

(Abbildung 40 + Abbildung 41). Wenn man den Bogen anhand der geringen Steigerung der Trypsinwerte bei den MK-2  $-/-$  -Tieren mit Caerulein-Behandlung im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren schließt, ist dies erkennbar. Aber auch HSP 27, welches übergeordnet von p38 und dann über die Mapkap-Kinase-2 stimuliert wird, besitzt eine protektive Wirkung bei der akuten Pankreatitis (97), (104), (205). Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich möglicherweise an den Trypsin-Werten der MK-2  $-/-$  Kontroll-Tiere erklären. Die Basisaktivität von Trypsin liegt hier über den Werten der nicht-transgenen Tiere. Demnach könnte die fehlende Mapkap-Kinase-2 zu einer geringen HSP 27 Stimulation führen und so zu einer basalen Erhöhung der Trypsinaktivität bei den Kontrolltieren. Allerdings ist die Mapkap-Kinase-2 nicht die einzige Kinase, die HSP 27 aktivieren kann. Aktivierungsvorgänge und Zielsubstrate der Mapkap-Kinase-3 decken sich in hohem Maße mit Mapkap-Kinase-2 (235). Es ist demnach denkbar, dass nach Induktion mit Caerulein über Mapkap-Kinase-3 eine HSP27-Aktivierung erfolgt und sich der schützende Effekt von p38 so erklären lässt (201).

Die p44\42 (ERK) ist wie auch schon bei früheren Untersuchungen erwartungsgemäß nachweisbar. Diese MAP-Kinase wird sehr früh im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens aktiviert. In der Pixelanalyse der Western-Blots überrascht die nicht-transgene Gruppe diesbezüglich nicht. Es ist zu erkennen, dass die mit Caerulein behandelten Tiere eine verstärkte Expression von phosphorylierten p44\42 gegenüber den Kontrollen haben. Als Ausdruck der Inflammationsreaktion kommt es schnell zur Hochregulierung der phosphorylierten p44\42. SP 600125 beeinflusst diesen Vorgang offensichtlich nicht. Die Tiere die zusätzlich noch SP 600125 bekommen, liegen in etwa auf dem gleichen Niveau zu den Caerulein-Tieren (Abbildung 36 + Abbildung 37). Wie an anderer Stelle schon erwähnt, spricht diese Beobachtung dafür, dass bereits ein kleiner Stimulus zu einer alles oder nichts Reaktion führen kann. In der MK-2-Gruppe sind jedoch Unterschiede erkennbar. Zwar liegen die Kontrolltiere beider Genotypen in der Pixelanalyse noch auf einem vergleichbaren Niveau - auf die Stimulation mit Caerulein reagieren die Knock-out Tiere jedoch unerwartet. Der Analyse nach, nimmt die Konzentration der Kinase ab. Es findet keine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung statt. In Verbindung von MK-2  $-/-$  mit SP 600125 ist zu beobachten, dass

die Phosphorylierung gegenüber dem Gesamtantikörper nochmals abfällt (Abbildung 42 + Abbildung 43). Interessant ist nun, dass die Kombination aus pharmakologischer Inhibierung und MK-2  $-/-$  gegenüber der ausschließlichen Gabe von SP 600125 einen derartigen Unterschied bei einer Kinase zeigt, die eher mit der Zellzyklus Regulierung in Verbindung gebracht wird. Dass MK-2  $-/-$  Tiere mit einer abgeschwächten akuten Pankreatitis auf Caerulein reagieren ist bereits beschrieben. Überraschend ist allerdings, dass in Verbindung mit dem Inhibitor SP 600125 die Phosphorylierung von p44\42 nach unten reguliert wird. Eine simple Erklärung hierfür erscheint nicht möglich. Zwar beschreiben Doan et al. eine verstärkte Aktivität von p44\42 nach Hemmung von p38, was auf eine Rückkopplung der Kinasen schließen lässt (236). Jedoch wurde diese Beobachtung bei Knochenmarkstammzellen gemacht und es betrifft nicht die MK-2 direkt. Eine Übertragung auf Pankreazellen und das Ergebnis dieser Arbeit ist demnach kritisch zu bewerten. Da p44\42 hauptsächlich als MAP-Kinase bei der Zellzyklusregulation in Erscheinung tritt, kommt ein protektiver Effekt gegenüber Apoptose möglicherweise in Frage. Inwieweit sich diese Beobachtung auf den Verlauf der akuten Pankreatitis auswirkt bleibt zunächst unbeantwortet. Zur Klärung dieser speziellen Fragestellungen bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Schließlich sind auch Kinasen in Betracht zu ziehen, die bisher noch nicht als entzündungsauslösend in Erscheinung getreten sind, oder bislang nicht identifiziert wurden.

Wie bereits in zahlreichen früheren Untersuchungen, konnte auch in dieser Arbeit erneut gezeigt werden, dass SP 600125 in der Lage ist, die Phosphorylierung von SAPK/JNK erfolgreich zu beeinflussen. Durch die geringere Phosphorylierung des Proteins im Western-Blot ist also von einem korrekten Wirkmechanismus des Inhibitors und im Folgenden von einem Effekt auszugehen. In Bezug auf die akute Pankreatitis lässt sich nach Auswertung der laborchemischen Daten jedoch feststellen, dass SP 600125 eine anti-inflammatorische Komponente hat. Für die akute Pankreatitis hat die isolierte Gabe des SAPK/JNK Inhibitors in dieser Untersuchung allerdings nur eine geringe positive Auswirkung. Eine mögliche Erklärung für den geringen Erfolg in der Unterdrückung der akuten Pankreatitis kann nicht eindeutig gegeben werden. Naheliegender ist die Vermutung, dass die initiale Stimulation mit Caerulein bereits ausreichend

war, einen Prozess in den Acinus-Zellen in Gang zu setzen, der durch die späteren Gaben von SP 600125 nicht mehr ausreichend zu beeinflussen war. Die alleinige Hemmung von SAPK/JNK könnte demnach die akute Pankreatitis nicht mehr stoppen, da die eingeleitete Therapie einen Schritt zu spät ansetzt. Es müsste bereits die Ko-Lokalisation und Zymogenaktivierung verhindert werden. Eine bereits angelaufene Zymogenaktivierung ist möglicherweise in der Lage den Prozess der Inflammation in den Pankreaszellen auf unterschiedlichste Wege anzuschieben und zu unterhalten. In dieses Bild passt die Tatsache, dass die Gabe von SP 600125 bei den MK-2  $-/-$  Tieren eine durchaus signifikante Reduzierung der Trypsinaktivität erbrachte und damit eine Abschwächung der Pankreatitis. In diesem speziellen Fall bestand aber bereits schon die schützende Komponente durch die fehlende Mapkap-Kinase-2 und die damit schwächere Zymogenaktivierung. In dieser Kombination lässt sich durchaus von einer erfolgreichen Behandlung der akuten Caerulein-induzierten Pankreatitis sprechen. Insgesamt scheint somit jedoch – ausgenommen MK-2  $-/-$  Tiere – die nachträgliche Hemmung der Stresskinasen in der Akutsituation kein geeigneter Ansatzpunkt zu sein, die Inflammation wirksam in den Acinus-Zellen zu unterbrechen. Allerdings hat SP 600125 durch die Hemmung von SAPK/JNK in anderen Organen sehr wohl eine messbare Wirkung gezeigt. Geht man von der Annahme aus, dass SP 600125 nach i.p.-Gabe in einer gewissen Menge vom Organismus resorbiert wird, dann hat ein primär nicht von Caerulein betroffenes Organsystem durch die zeitliche Verzögerung der systemischen Immunantwort die Chance durch Inhibierung der SAPK/JNK die Inflamationsreaktion abzumildern. Dazu passt die Überlegung, dass sich die Interleukin-6 Werte im Serum unter SP 600125 und ebenso die Werte für die Myeloperoxidase aus dem Lungengewebe günstig verändert haben. Geht man wie beim Menschen davon aus, dass ein ARDS mit zu den gefürchtetsten Komplikationen bei den schwersten Verläufen der akuten Pankreatitis gehört, so ist die Infiltration von Lungengewebe im vorliegenden Mausmodell eine mögliche klinische Parallele und Teil der Organbeteiligung im Rahmen eines SIRS/ARDS/MOV. Inwiefern eine Hemmung der SAPK/JNK die klinische Situation positiv beeinflusst, lässt sich in diesem Rahmen nicht beantworten. Die Übertragung der Erkenntnisse auf den Menschen sind schwierig. Sollten sich die Ergebnisse

beim Menschen allerdings bestätigen und eine Inflammation an sekundär beteiligten Organen gehemmt werden können, würde sich das auf die Mortalität der akuten Pankreatitis sicher positiv auswirken.

### **4.1.1 Kritische Bewertung der Experimente und Methoden**

In den vergangenen Jahren gab es einige Veröffentlichungen zur akuten Pankreatitis und SP 600125. Dabei kommen sowohl ältere und neuere Untersuchungen wiederholt zu dem Ergebnis, dass MAP-Kinasen ein essenzieller Bestandteil in der pathophysiologischen Kaskade bei der Entwicklung einer akuten Pankreatitis sind (107), (237), (238), (239). Die ermittelten Ergebnisse der früheren Arbeiten sind aufgrund der unterschiedlichen Ansätze jedoch nicht einheitlich. Grundlage der vorliegenden Arbeit sind die Versuche von Minutolia et al. (223). In einem vergleichbaren Versuchsaufbau konnte durch die Inhibierung von SAPK/JNK mit SP 600125 eine Abnahme der Inflammation nachgewiesen werden und damit vermeintlich deutliche Abschwächung der akuten Pankreatitis. Eine Beobachtung die für alle laborchemischen Parameter gemacht wurde. Dem gegenüber stehen die Arbeiten von Wagner et al. und Clemons et al. Deren Untersuchungen lassen lediglich auf eine geringfügige Besserung der akuten Pankreatitis schließen (108), (240). Darüber hinaus wurden Studien mit SP 600125 an unterschiedlichsten Geweben und Spezies mit Erfolg durchgeführt. Ein Teil der verfügbaren Literatur beschreibt SP 600125 dabei als selektiven SAPK/JNK-Kinaseinhibitor. Diese Aussage ist so jedoch nicht haltbar. SP 600125 ist in der Lage beispielsweise CREB (cAMP response element binding protein) zu aktivieren (241). Zudem ist die Hemmung einer ganzen Reihe weiterer Enzyme nachgewiesen (242). In höheren Konzentrationen ist auch die Hemmung von p38 möglich (219). Zudem gibt es Hinweise, wonach eines der Zielproteine von SAPK/JNK, der Transkriptionsfaktor c-Jun, unabhängig von SAPK/JNK aktiviert werden kann (243). Um Fehlerquellen möglichst zu minimieren, wurde der Versuchsaufbau sowie der Ablauf standardisiert. Die Methoden wurden im Vorfeld erlernt und konnten somit sicher angewendet werden. Die gewählte Variante der Caerulein-induzierten Pankreatitis ist eine bewährte experimentelle Methode, die in vielen Forschungseinrichtungen angewendet und im eigenen Labor bereits etabliert



war. Probenmessungen wurden zusätzlich in einem Doppelansatz durchgeführt. Unabhängig davon waren teilweise viele einzelne Arbeitsschritte notwendig, bei denen sich Fehler addieren können. Auch die Anfertigung von Western-Blots zur Identifizierung der intrazellulären Signalkaskaden ist eine gängige und standardisierte Methode. Überwiegend war die Detektion erfolgreich und auch nach kurzer Belichtungszeit des Röntgenfilms möglich. Erschwerend war bei der Auswertung teilweise ein starkes Hintergrundrauschen, was die genaue Abgrenzung der Banden auch mit der Auswertungssoftware erschwerte und die Quantifizierung nur zum Teil ermöglichte. Eine mögliche Ursache bestand in der Qualität der Antikörper zum damaligen Zeitpunkt, welche zur quantitativen Analyse teilweise unzureichend war. Wie bereits beschrieben, ist durch Caerulein in supramaximaler Dosierung mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb von 30 Minuten eine Pankreatitis auslösbar. Die wiederholte Applikation verringert zusätzlich die Chance dass Tiere nicht adäquat stimuliert werden. Es ist allerdings nicht vollständig auszuschließen, dass auch bei wiederholten Applikation es zu einer insuffizienten intraperitonealen Gabe von Caerulein gekommen sein kann. Demnach ist denkbar, dass sich bei der Euthanasierung der Versuchstiere die Entzündung in unterschiedlich starken Stadien befand. Im Umkehrschluss gilt dies selbstverständlich auch für den SAPK/JNK Inhibitor SP 600125. Ebenso muss das Applikationsregime berücksichtigt werden. Die zeitliche Veränderung der Versuchsanordnung, andere Konzentrationen des Inhibitors oder die Art der Applikation können zu anderen Ergebnissen führen. Die Verlängerung der Wirkphase von SP 600125 oder die Euthanasierung der Tiere zu einem späteren Zeitpunkt sind denkbare Modifikation, um Änderungen der pankreas-spezifischen Parameter besser zu erfassen. Die zeitliche Verlängerung des Versuchsaufbaus könnte somit interessante Möglichkeiten bieten und dementsprechend wäre eine Messung nach 24 Stunden oder noch später vermutlich mit anderen Ergebnissen verbunden. Letztlich ist es nicht auszuschließen, dass eine verlängerte Gabe von SP 600125, beispielsweise über Tage, einen möglichen positiven Effekt haben könnte. Ein zusätzlicher Kritikpunkt ist die geringe Gesamtzahl der verfügbaren Tiere. Die statistische Aussagekraft ist somit eher als schwach einzuordnen und bezeugt allenfalls einen Trend. In einem weiteren Schritt ließen sich auch noch weitere Faktoren wie Alter, Ge-

schlecht und Gewicht homogenisieren. Aus welchem Grund vereinzelte Tiere sehr hohe Inflammationswerte aufweisen, auch wenn diese ausschließlich mit NaCl-Lösung behandelt wurden, ist nicht eindeutig zu klären. Denkbar ist die Kombination mehrerer Ursachen. Es ist davon ausgehen, dass auch einzelne Kochsalz Injektionen bei den Versuchstieren zu einer allgemeinen Stressantwort führen. Da der Amylase-Wert bei diesen Tieren deutlich geringer ist als bei den Tieren die mit Caerulein behandelt wurden, kann man von einer nicht-pankreasspezifischen Aktivierung ausgehen. Alle Tiere sind während des Versuchstages einem hohen Stressniveau ausgesetzt. Der Umgebungswechsel, beginnend mit dem Transport aus dem Tierstall in das Labor, die wiederholten Injektionen und das Risiko einer nicht erkannten Verletzung innerer Organe bei jeder intraperitonealen Applikation, begünstigen die Aktivierung zahlreicher Botenstoffe. Sämtliche Faktoren sind in der Lage eine oder mehrere MAP-Kinasen zu aktivieren. Gerade Interleukin-6 ist sehr sensibel und reagiert bereits auf geringste Stimuli unterschiedlichster Art mit einer Erhöhung (244). Dieser Umstand erklärt möglicherweise auch die vereinzelt ungewöhnlich hohen Aktivitätswerte von Interleukin-6. Eine nicht erkannte Infektion des Versuchstieres oder die unbeabsichtigte Verletzung von Organen bei der intraperitonealen Applikation zählen hierzu. Eine zusätzliche Induktion der Pankreatitis, beziehungsweise von pro-inflammatorischen Faktoren durch das verwendete Isofluran sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Die Exposition der Versuchstiere mit dem Narkosegas vor Dekapitation dauert in etwa nur circa dreißig Sekunden und die Gewebeprobeen wurden unmittelbar anschließend entnommen. Doch gerade die Gewebeentnahme als letzten Punkt darf nicht unterschätzt werden. Wie von Blinman et al. bereits beschrieben, wirkt durch die Präparation der Organe eine nicht unerhebliche mechanischer Belastung auf das Gewebe. Eine Beeinflussung der Ergebnisse ist somit möglich (245).

### **4.2 Zusammenfassung und abschließende Beurteilung**

Die auslösenden Faktoren für eine akute Pankreatitis sind im Wesentlichen in der Aktivierung pankreatischer Proteasen zu finden. Die naheliegende Theorie war nun in die-

ser Arbeit, den Fokus auf die Hemmung einer der zentralen Schaltstellen der Inflammation der intrazellulären Signalkaskade SAPK/JNK zu legen. Das zweite wichtige Theorem dieser Arbeit bestand darin, dass mit Hilfe einer weiteren Gruppe, den MK 2 -/- Mäusen und dem gleichzeitigen Ausschalten von zwei Schlüsselpositionen, einen noch deutlicher positiven Effekt von SP 600125 auf die akute Pankreatitis nachweisen zu können.

In den angefertigten Western-Blots ist die Wirkung von SP 600125 direkt durch die verringerte Phosphorylierung von SAPK/JNK in Pankreasgewebe belegbar. Diese verringerte Aktivität zeigt sich jedoch kaum in den pankreasspezifischen Messwerten. Dies lässt vermuten, dass bereits wenige aktivierte SAPK/JNK-Kinasen die Inflammationsmaschinerie in Gang setzen können, oder dass es noch weitere, bisher nicht beachtete inflammatorische Faktoren gibt, die zeitgleich aktiviert werden beziehungsweise eine Redundanz in den Aktivierungsmechanismen der Kinasekaskaden vorliegt.

Bezogen auf die Anfangs formulierten Fragestellungen konnte zumindest innerhalb des Beobachtungszeitraums und bei ausschließlicher Betrachtung der Pankreatitisparameter in beiden untersuchten Gruppen durch die Hemmung der SAPK/JNK mit SP 600125 keine, beziehungsweise nur eine unwesentliche Verbesserung der akuten Pankreatitis laborchemisch nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß und bezogen auf die nicht-transgenen Mäuse waren in der Vergleichsgruppe bei den MK-2 -/- Tieren im Durchschnitt laborchemisch geringere Entzündungswerte zu sehen. Vergleicht man die gemessenen Werte beider Kontingente, dann ist durch die Gabe von SP 600125 in der MK-2 -/- Gruppe gegenüber der nicht-transgenen Gruppe jedoch kein signifikanter Unterschied erkennbar. Ein erhoffter positiver Effekt durch MK-2 -/- in Kombination mit SAPK/JNK Hemmung zeigte somit keine wesentliche Verbesserung der akuten Pankreatitis. Für die systemischen Entzündungsparameter, Myeloperoxidase und Interleukin-6, gilt jedoch eine etwas andere Beobachtung. Die gemessenen Aktivitätswerte sind nach Gabe von SP600125 in beiden untersuchten Gruppen gefallen. Jedoch gilt auch für die systemischen Werte, dass in der Kombination von SP 600125 und MK-2 -/- kein zusätzlicher Benefit entsteht. In der Annahme, dass die Hemmung der SAPK/JNK

aber für die systemische Inflamationsreaktion von Vorteil wäre, könnte die Gabe eines Inhibitors eine sinnvolle Ergänzung der medikamentösen Therapie bei schwersten Verläufen, beispielsweise bei einem begleitenden ARDS, darstellen. Dieser Ansatz ist grundsätzlich auch auf weitere septische Krankheitsverläufe bei anderen Grundleiden übertragbar. Inwiefern eine solche Reduzierung der systemischen Entzündung die klinische Situation positiv beeinflusst, lässt sich in diesem Rahmen nicht beantworten. Der Transfer auf höhere Säugetiere ist schwer, wenn nicht gar unmöglich und so ist in allen anzunehmenden Fällen der Bedarf an weiteren Untersuchungen und Studien notwendig.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse erscheint es zum jetzigen Zeitpunkt als sehr unwahrscheinlich, dass im speziellen SP 600125 oder ein vergleichbarer Kinasen Inhibitor als therapeutisches Mittel zum Einsatz kommt, welches pharmakologisch die SAPK/JNK Signalkaskade hemmt und bei der Behandlung einer akuten Pankreatitis erfolgversprechend sein könnte.

### 5. Abstract

Bis heute existiert keine kausale Therapie zur Behandlung einer akuten Pankreatitis. Hauptsache ist der akute Verschluss des Ductus pancreaticus durch Gallensteine oder der chronische Alkoholabusus. Mit zunehmendem Verständnis der Pathophysiologie auf zellulärer Ebene, rücken molekularbiologische Ursachen in das Blickfeld des Interesses. Anerkannt ist, dass eine frühzeitige intrazelluläre Aktivierung der von den Acinus-Zellen produzierten Zymogene einen wesentlichen Trigger der gesamten Inflamationsreaktion darstellen. Die Familie der Mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) besitzt in diesem Kontext eine zentrale Rolle. Bestehend aus den drei bisher beschriebenen großen Signalkaskaden (SAPK/JNK, p38, ERK), sind diese für Differenzierung, Entzündung und Apoptose der Zellen verantwortlich. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, ob die selektive Inhibition des SAPK/JNK Signalweges mit SP600125 bei nicht-transgenen Mäusen einen positiven Effekt auf die Pankreatitis hat und inwieweit eine zusätzliche pharmakologische Hemmung des SAPK/JNK Signalweges bei MK-2 <sup>-/-</sup> Mäusen einen additiven Effekt zeigt. Bei den Knock-out Tieren ist bekannt, dass eine Caerulein stimulierte akute Pankreatitis einen schwächeren Verlauf nimmt. Es wurde in beiden Kohorten Kontrollgruppen mit Kochsalz oder Inhibitor SP600125 (NaCl, SP), Caerulein (Cer) und Caerulein + SP600125 (Cer+SP) gebildet und miteinander verglichen. Mittels intraperitonealer Gabe wurde in supramaximaler Dosierung Gewichtsadaptiert nach einem vorgegeben Injektionsplan, beginnend mit Caerulein, eine akute Pankreatitis ausgelöst. Sämtliche Tiere wurden am Ende des Versuchstages dekapitiert. Laborchemisch wurden Werte für Amylase und Interleukin-6 im Serum, sowie Trypsin im Pankreas- und die Myeloperoxidase im Lungengewebe und der Grad der Ödemisierung des Pankreas per Gewicht, analysiert. Begleitend wurden Western Blots aus lysierten Pankreasgewebe der oben genannten MAP-Kinasen zum Phosphorylierungsstatus angefertigt. Die signifikante Erhöhung der Amylase-Aktivität im Serum gegenüber den Kontrollen wurde als gesicherte Pankreatitis gewertet. Sämtliche untersuchten Proben waren nach diesem Kriterium positiv. In der nicht-transgenen Gruppe waren im Vergleich von Caerulein (Cer) mit Caerulein + SP600125 (Cer+SP), bei Amylase ( $p=0,21$ ), Trypsin ( $p=0,66$ ), Interleukin-6 ( $p=0,67$ ) und Ödemisierungsgrad ( $p=0,834$ ) besteht keine Signifikanz. Für die MPO ( $p=4,9 \cdot 10^{-5}$ ) ist ein signifikanter Unterschied messbar. In der MK-2 <sup>-/-</sup> Gruppe waren für Amylase ( $p=0,24$ ), Trypsin ( $p=0,46$ ), Interleukin-6 ( $p=0,185$ ), MPO ( $p=0,00093$ ) und dem Ödemisierungsgrad ( $p=0,2733$ ) keine signifikanten Unterschied zu finden. In einem zweiten Schritt wurden die Cae-

Caerulein-Tiere beider Kohorten miteinander verglichen. Unerwartet lag die absolute Amylase-Aktivität der MK-2  $-/-$  -Tiere signifikant über den nicht-transgenen Tieren ( $p=0,0004$ ) und ebenfalls die Werte für die MPO-Aktivität ( $p=0,573$ ), jedoch in einem nicht signifikanten Bereich. Die Trypsin-Aktivität war wieder signifikant unter den Werten der nicht-transgenen Tiere ( $p=0,027$ ). Dies galt auch für Interleukin-6 ( $p=0,112$ ), erreichte aber keine Signifikanz. Abschließend erfolgte der Vergleich zur Fragestellung ob nicht-transgene Caerulein-Tiere von einer pharmakologischen Hemmung in Verbindung mit einer gezielten Gendeletion (Caerulein + SP600125) profitieren. Auch in diesem Vergleich waren die absoluten Amylase Werte der MK-2  $-/-$  -Tiere über der Aktivität der nicht-transgenen Tiere ( $p=0,0438$ ). Für Trypsin war in der MK-2  $-/-$  Gruppe ein leichter Vorteil erkennbar ( $p=0,046$ ), ebenso bei Interleukin-6 ( $p=0,015$ ). Für die MPO-Aktivität ( $p=0,077$ ) wurden zwar geringere Werte gemessen, diese waren aber noch nicht signifikant. In den zusätzlich angefertigten Western Blots war für die MAPK p38 und ERK (p44\42) in beiden Kohorten durch die Gabe von SP600125 keine wesentliche Änderung in der Phosphorylierung erkennbar. Bei SAPK/JNK war in beiden Gruppen das Signal der Caerulein-Tiere deutlich erkennbar, wohingegen die Signale der inhibierten Tiere eine schwächere Phosphorylierung zeigten. Die Hemmung der SAPK/JNK MAP-Kinase hat in dieser Arbeit sowohl innerhalb, als auch im Vergleich beider Kohorten miteinander keine signifikante Reduzierung der akuten Pankreatitis bewirkt. Bei den systemischen Inflamationsparametern Interleukin-6 und der Myeloperoxidaseaktivität waren tendenziell positive Effekte, teilweise auch signifikant, der mit SP600125 behandelten Tiere erkennbar. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass eine bereits ablaufende Pankreatitis durch eine nachträgliche Hemmung der SAPK/JNK nicht mehr zu unterbrechen, jedoch aber die systemische Organbeteiligung und Inflamationsreaktion durch die zeitliche Latenz günstig beeinflussbar ist. Hierfür wäre ein längerer Beobachtungszeitraum notwendig. Zudem lässt die nach wie vor vorhandene Restaktivität der MK-2  $-/-$  Mäusen darauf schließen, dass weitere pro-inflammatorische Faktoren eine Rolle spielen. Die Gabe von SP600125 verbesserte die Caerulein-induzierte Pankreatitis allenfalls in punktuellen Parameter. Da schwere Pankreatitiden in vielen Fällen mit erheblichen Einschränkungen weiterer Organsysteme einhergehen, bietet sich Möglicherweise die Hemmung der SAPK/JNK als supportive Medikation an. Hierfür sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Abschließend lässt sich sagen, dass ein selektiver SAPK/JNK Kinase Hemmer zur kausalen Therapie als Medikament für die akute Pankreatitis wahrscheinlich nicht geeignet ist.

### 6. Inhaltsverzeichnis

1. **Battersby, C.** What killed Alexander the Great? *ANZ J Surg.* Jan-Feb 2007, 77(1-2):85-7.
2. **Kühne, W.** Über das Trypsin (Enzym des Pankreas). *Verhandlungen des naturhistorischen-medizinischen Vereins zu Heidelberg.* 1877, Vol.1, No.3, S. 194-198.
3. **Bayliss, W.M. und Starling, E.H.** The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol.* 12. September 1902b, 28(5), S. 325-353.
4. **Starling, E.H.** The Croonian Lectures 1. On the chemical correlation of the functions of the body. *Lancet.* 1905, 166, S. 339-341.
5. **Schadewaldt, Hans.** *Das Pankreas in der Geschichte der Medizin: Pathogenese, Diagnostik, Klinik u. Therapie d. Erkrankungen d. exokrinen Pankreas.* [Hrsg.] Heinkel u. Schön. Stuttgart : s.n., 1964. Bd. 7sq.
6. **Klinke, Rainer, Pape, Hans-Christian und Silbernagl, Stefan.** Physiologie. [Buchverf.] K. Voigt. *Endokrines System.* Stuttgart - New York : Thieme, 2005, Bd. 5. überarbeitete Auflage, 16.6, S. 551-559.
7. **Gray, H., et al.** *Gray's Anatomie 38th. Edition.* New York : Churchill Livingstone, 1995.
8. **Lippert, H.** *Lehrbuch Anatomie.* 5. s.l. : Urban & Fischer, 2000. S. 313-318.
9. **Go, Vay Liang W.** *The Pancreas - Biology, Pathophysiology and Disease.* Second Edition. s.l. : Lippincott Williams and Wilkins, 1993.
10. **Junqueira, L.C., Carneiro, J. und Kelley, R.O.** Bauchspeicheldrüse. [Hrsg.] M. Gratz. [Übers.] M. Gratzl. *Histologie.* München : s.n., 2002, Bd. 5. Auflage, 15,2, S. 276-277.
11. **Schauf, C.L., Moffett, D.F. und Moffett, S.B.** Gastrointestinale Physiologie - Verdauung und Absorption. [Hrsg.] E. Schubert. *Medizinische Physiologie.* s.l. : de Gruyter Lehrbuch, 1992, Bd. 1. Auflage, VII, 2.3 - 2.7.5, S. 508-526.
12. **Murer, H. und Berger, E.G.** Physiologie des Magen-Darm-Trakts. [Buchverf.] P. Deetjen und E-J. Speckmann. *Physiologie.* s.l. : Urban&Fischer, 1999, Bd. 3. Auflage, 12.2 - 12.5, S. 436-463.
13. **Benninghoff und Drenckhahn, Detlev.** *Benninghoff, Drenckhahn 16. Auflage.* s.l. : Urban & Fischer, 2003.
14. **Welsch, U.** *Lehrbuch Histologie.* [Hrsg.] Urban & Fischer. 2003.
15. **Kern, H.F. und Ferner, H.** Die Feinstruktur des exokrinen Pankreasgewebes vom Menschen. *Z. Zellforschung.* 1971, S. 322-343.

16. **Johnson, L.R.** *Gastrointestinal Physiologie 5.th edition*. St. Louis : Mosby-Year Book, Inc., 1997.
17. **Loeweneck, H. und Feifel, G.** *Praktische Anatomie*. Berlin-Heidelberg : Springer,, 1993. Bd. 2 Teil 6.
18. **Logsdon, C.D.** Signal transduction in pancreatic acinar cell physiology and pathophysiology. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2000, 16, S. 404-409.
19. **Ivy, A.C. und Oldberg, E.** A hormone mechanism for gall-Bladder contraction and evacuation. *Am J Physiol.* 1928, 86, S. 599-613.
20. **Mutt, V. und Jorpes, J.E.** Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin.1. Cleavage with thrombin and with trypsin. *Eur J Biochem.* 17. October 1968, 6(1), S. 156-62.
21. **Gregory, H., et al.** The antral Hormon Gastrin: Structure of Gastrin. *Nature.* 5. December 1964, 204, S. 931-933.
22. **Böcker, W., Denk, H. und Heitz, Ph.U.** *Pathologie*. s.l. : Urban & Fischer, April 2004. S. 807-815. Bd. 3.
23. **Niederau, C., Lüthen, R. und Heintges, T.** Effects of CCK on pancreatic function and morphology. *Ann N Y Acad Sci.* 23. March 1994, 713, S. 180-98.
24. **Williams, John A., et al.** Stimulus-Secretion Coupling of Pancreatic Digestive Enzyme Secretion. *Digestion.* 1997, 58(suppl 1), S. 42-45.
25. **Noble, F., et al.** International Union Pharmacology. XXI. Structure, Distribution, and Functions of Cholecystokinin Receptors. *Pharmacological Reviews.* 1.. December 1999, Vol. 51 no. 4, S. 745-781.
26. **Wank, S.A., et al.** Purification, molecular cloning, and funktional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* April 1992, Vol. 89, S. 3125-3129.
27. **Wank, S.A., Pisegna, J.R. und De Weerth, A.** Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 15. September 1992, 89(18), S. 8691-5.
28. **Saito, A, et al.** Cholecystokinin receptors in the brain, charactrization and distribution. *Science.* 1980, S. 1150-1156.
29. **Dufresne, M., Seva, C. und Fourmy, D.** Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol Rev.* 2006, 86, S. 805-847.
30. **Gigoux, V., et al.** Met-195 of the cholecystokinin-A receptor interacts with the sulfated tyrosine of cholecystokinin and is crucial for receptor transition to high affinity state. *J Biol Chem.* 5. June 1998, 273(23), S. 14380-6.



31. **Lampel, M. und Kern, H.F.** Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 11. March 1977, 373(2), S. 97-117.
32. **Willemer, S., Elsässer, H.P. und Adler, G.** Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res.* 1992, 24 Suppl 1, S. 29-39.
33. **Reeve, J.R. Jr, et al.** Evidence that CCK-58 has structure that influences its biological activity. *Am J Physiol.* May 1996, 270(5 Pt 1), S. G860-8.
34. **Anastasi, A., Erspamer, V. und Endean, R.** Isolation and structure of caerulein, an active decapeptide from the skin of *Hyla caerulea*. *Experientia.* 1967, 23(9), S. 699-700.
35. **De Caro, G., et al.** Occurrence of caerulein in extracts of the skin of *Hyla caerulea* and other Australian hylids. *Br J of Pharmac Chemother.* 1968, 33(1), S. 48-58.
36. **Renner, Ian, Wisner, JR und Rinderknecht, H.** Protective effects of exogenous secretin on ceruletide-induced acute pancreatitis in the rat. *J. Clin. Invest.* September 1983, Vol. 72, S. 1081-92.
37. **Adler, G., et al.** Effects of in vivo cholinergic stimulation of rat exocrine pancreas. *Am J Physiol.* June 1983, Vol. 244(6), S. G623-9.
38. **Otte, M und Forell, M.** Effect of Caerulein on the exocrine pancreas funktion in man; examination of dose effects and comparisons with the effect of cholecystokinin/pankreozymin. *Klinische Wochenschrift.* 1. August 1979, 57(15), S. 789-92.
39. **Yamaguchi, Hiroya, et al.** Activation of Proteases in Cerulein-induced Pancreatitis. *Pancreas.* Oktober 1989, Vol.4 No.5, S. 565-571.
40. **Chiari, H.** Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Z Heilkunde.* 1896, 17, S. 69-96.
41. **Palade, G.** Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science.* August 1975, Vol. 189, S. 347-358.
42. **Gorelick, F.S. und Thrower, E.** The acinar Cell and Early Pancreatitis Responses. *Clin Gastroenterol Hepatol.* November 2009, 7(11 Suppl), S. 10-14.
43. **Williams, J.A.** Receptor-mediated signal transduction pathways and the regulation of pancreatic acinar cell function. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008, Vol. 24(5), S. 573-9.
44. **Bendayan, M., et al.** Immunocytochemical localization of actin in the pancreatic exocrine cell. *J Histochem Cytochem.* October 1982, 30(10), S. 1075-8.
45. **Singh, V.P., et al.** Serine protease inhibitor causes F-actin redistribution and inhibition of calcium-mediated secretion in pancreatic acini. *Gastroenterology.* June 2001, 120(7), S. 1818-27.

46. **Leach, S.D., et al.** Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest.* January 1991, 87(1), S. 362-6.
47. **Mithöfer, K., et al.** Subcellular kinetics of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis. *Am J Physiol.* January 1998, 274(1 Pt 1), S. G71-9.
48. **Greenbaum, L.M., Hirshkowitz, A. und Shoichet, I.** The activation of trypsinogen by cathepsin B. *J Biol Chem.* November 1959, 234, S. 2885-90.
49. **Saluja, A.K., et al.** Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology.* July 1997, 113(1), S. 304-10.
50. **Steer, M.L.** Pathogenesis of acute pancreatitis. *Digestion.* 1997, 58 Suppl 1, S. 46-9.
51. **Saluja, A.K., et al.** Experimental pancreatitis is mediated by low affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* November 1989, 86(22), S. 8968-71.
52. **Brady, M., et al.** Cytokines and acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* July 1999, 13(2), S. 265-89.
53. **Saluja, A.K. und Steer, M.L.** Pathophysiology of Pancreatitis: Role of Cytokines and Other Mediators of Inflammation. *Digestion.* 1999, 60, S. 27-33.
54. **Teich, N., et al.** Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology.* August 2000, 119(2), S. 461-5.
55. **Kubisch, C., et al.** Overexpression of Heat Shock Protein HSP 27 Protects Against Cerulein-Induced Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2004, 127, S. 275-286.
56. **Lankisch, P.G., et al.** Epidemiology of pancreatic diseases in Lüneburg country: A study in a defined German population. *Pancreatology.* 2002, 2(5), S. 469-77.
57. **Gullo, L., et al.** Acute Pancreatitis in Five European Countries: Etiology and Mortality. *Pancreas.* 2002, Vol. 24, No. 3, S. 223-227.
58. **Huber, W. und Schmidt, R.M.** Akute Pankreatitis: Evidenzbasierte Diagnostik und Therapie. *Deutsche Ärzteblatt.* 22.. Juni 2007, Jg. 104 Nr. 25, S. A-1832-A-1841.
59. **Pandol, S.J., et al.** Acute Pancreatitis: Bench to the Bedside. *Gastroenterology.* Reviews in basic and clinical Gastroenterology, 2007, 132, S. 1127-1151.
60. **Lankisch, Paul Georg, et al.** Temporal Trends in Incidence and Severity of acute Pancreatitis in Lüneburg County, Germany. A population -based study. *Pancreatology.* 9 2009, S. 420-426.

61. **Venneman, N.G., et al.** Small gallstones are associated with increased risk of acute pancreatitis: potential benefits of prophylactic cholecystectomy? *Am J Gastroenterol.* November 2005, 100(11), S. 2540-50.
62. **Lankisch, P.G., Lowenfels, A.B. und Maisonneuve, P.** What is the Risk of Alcoholic Pancreatitis in Heavy Drinkers? *Pancreas.* November 2002, Vol. 25 Issue 4, S. 411-412.
63. **Yadav, D. und Lowenfels, A.B.** Trends in Epidemiology of the first Attack of Acute Pancreatitis: A Systematic Review. *Pancreas.* November 2006, Vol.33 No. 4, S. 323-330.
64. **Rosendahl, Jonas, et al.** Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genetics.* 2008, 40, S. 78-82.
65. **Dickson, A.P., O'Neill, J. und Imrie, C.W.** Hyperlipidaemia, alcohol abuse and acute pancreatitis. *Br J Surg.* September 1984, 71(9), S. 685-8.
66. **Rünzi, M. und Layer, P.** Drug-Associated Pancreatitis: Facts and Fiction. *Pancreas.* July 1996, Vol. 13 Issue 1, S. 100-9.
67. **Freeman, M.L., et al.** Complications of endoscopic biliary sphincterotomy. *N Engl J Med.* 26. September 1996, 335(13), S. 909-18.
68. **Kelly, T.R.** Gallstone pancreatitis. Local predisposing factors. *Ann Surg.* October 1984, 200(4), S. 479-85.
69. **Cotton, P.B.** Congenital anomaly of pancreas divisum as cause of obstructive pain and pancreatitis. *Gut.* February 1980, 21(2), S. 105-14.
70. **McKay, C.J., et al.** High early mortality rate from acute pancreatitis in Scotland, 1984-1995. *Br J Surg.* October 1999, 86(10), S. 1302-05.
71. **Banks, P.A., et al.** CT-guided aspiration of suspected pancreatic infection: bacteriology and clinical outcome. *Int J Pancreatol.* December 1995, 18(3), S. 265-70.
72. **Bradley, E.L. 3rd und Allen, K.** A prospective longitudinal study of observation versus surgical intervention in the management of necrotizing pancreatitis. *Am J Surg.* January 1991, 161(1), S. 19-24 discussion 24-5.
73. **Perez, A., et al.** Is severity of necrotizing pancreatitis increased in extended necrosis and infected necrosis? *Pancreas.* October 2002, 25(3), S. 229-33.
74. **Mutinga, M., et al.** Does mortality occur early or late in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol.* October 2000, 28(2).
75. **Bhatia, M. und Moochhala, S.** Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrom. *J Pathol.* February 2004, 202(2), S. 145-56.

76. **Bhatia, M., Neoptolemos, J.P. und Slavin, J.** Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Invest Drugs*. April 2001, 2(4), S. 496-501.
77. **Steer, ML., et al.** *Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis; in Go VLW.* New York : Raven Press, 1993. S. 581-592.
78. **Inagaki, T, et al.** Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of the acute pancreatitis. *Pancreas*. January 1997, Volume 14 - Issue 1, S. 1-8.
79. **Zhang, H, et al.** IL-6 ist nicht nur ein Marker, sondern ein pathophysiologisch relevanter Faktor für die schwere akute Pankreatitis: eine genetische und pharmakologische Analyse. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2011, 49 - V91.
80. **Keim, V., et al.** A comparison of lipase and amylase in the diagnosis of acute pancreatitis in patients with abdominal pain. *Pancreas*. January 1998, 16(1), S. 45-9.
81. **Chase, C.W., et al.** Serum amylase and lipase in the evaluation of acute abdominal pain. *Am Surg*. December 1996, 62(12), S. 1028-33.
82. **Hedström, J., et al.** A comparison of serum trypsinogen-2 and trypsin-2-alpha1-antitrypsin complex with lipase and amylase in the diagnosis and assessment of severity in the early phase of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. February 2001, 96(2), S. 424-30.
83. **Le Moine, O, et al.** Trypsin activity. A new marker of acute alcoholic pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. December 1994, 39(12), S. 2634-8.
84. **Dambrauskas, Z., et al.** Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 21. April 2010, Vol. 16(15), S. 1845-53.
85. **Andelid, K, et al.** Myeloperoxidase as a marker of increasing systemic inflammation in smokers without severe airway symptoms. *Respiratory medicine*. May 2007, 101(5), S. 888-95.
86. **Liu, Mingdong, et al.** Effects of c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathway on Severe Acute Pancreatitis-Associated Lung Injury. *Pancreas*. April 2012, Volume 41, Issue 3, S. 358-366.
87. **Mullane, K., Kraemer, R. und Smith, B.** Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration. *Journal of Pharmacological Methods*. 1985, Volume 14, S. 157-167.
88. **Tse, F und Yuan, Y.** Early routine endoscopic retrograde cholangiopancreatography strategy versus early conservative strategy in acute gallstone pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 16. May 2012, (5):CD009779.
89. **Al-Omran, M, et al.** Enteral versus parenteral nutrition for acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 20. January 2010, (1):CD002837.

90. **Ockenga, J, Löser, C und Kraft, M.** Klinische Ernährung in der Gastroenterologie (Teil 2). *S3-Guideline of the German Society for Nutritional Medicine (DGEM) in Cooperation with the GESKES, the AKE and the DGVS.* Aktuelle Ernährungsmed 2014, 2014, 39(01), S. e43-e56.
91. **Marik, P.E. und Zaloga, G.P.** Meta-analysis of parenteral nutrition versus enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *BMJ.* 2004, 328, S. 1407.
92. **IAP/APA, Working Group.** Acute Pancreatitis Guidelines IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 2013, 13 (4 Suppl 2), S. e1-e15.
93. **Basurto, Ona X, Rigau, Comas D und Urrútia, G.** Opioids for acute pancreatitis pain. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013, 7:CD009179.
94. **Tuennemann, J., Mössner, J. und Beer, S.** Akute Pankreatitis - Leitlinienbasierte Diagnostik und Therapie. *Der Internist.* August 2014, 9, S. 55:1045-1056.
95. **Cano, E. und Mahadevan, L.C.** Parallel signal processing among mammalian MAPKs. [Hrsg.] Elsevier Science Ltd. *TIBS.* March 1995, 0963-0004/95, S. 117-122.
96. **Parasekevas, S, et al.** Activation and expression of ERK, JNK, and p38 MAP-Kinases in isolated islet of Langerhans: implications for cultured islet survival. *FEBS Letters.* 1999, 455, S. 203-208.
97. **Schäfer, C. und Williams, J.A.** Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: possible roles in normal function and disease. *Journal of Gastroenterology.* 24. September 2000, 35, S. 1-9.
98. **Wada, T. und Penninger, J.** Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* April 2004, 23, S. 2838-49.
99. **Pearson, G., et al.** Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews.* 2001, 22(2), S. 153-183.
100. **Waetzig, V. und Herdegen, T.** Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* September 2005, Vol. 26 No. 9, S. 455-461.
101. **Boutros, T., Chevet, E. und Metrakos, P.** Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/MAP Kinase Phosphatase Regulation: Roles in Cell Growth, Death and Cancer. *Pharmacological Reviews.* 3, 2008, 60, S. 261-310.
102. **Duan, R.D. und Williams, J.A.** Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini. *American Journal of Physiology.* Gastrointestinal and Liver Physiology, 1. September 1994, Vol. 267 no. 3, S. G401-G408.
103. **Dabrowski, A., et al.** Jun Kinases Are rapidly activated by Cholecystokinin in Rat Pancreas both in Vitro and Vivo. *The Journal of Biological Chemistry.* 8. March 1996, 271(10), S. 5686-90.

104. **Schäfer, C., et al.** A Role for the p38 Mitogen-activated Protein Kinase/HSP27 Pathway in Cholecystokinin-induced Changes in the Actin Cytoskeleton in Rat Pancreatic Acini. *The Journal of Biological Chemistry*. 11. September 1998, Vol. 273, No. 37, S. 24173-24180.
105. **Wagner, Andreas C.C., et al.** p38 Map Kinase is Expressed in the Pancreas and is immediately activated following Cerulein Hyperstimulation. *Digestion*. 4.. June 1999, 60, S. 41-47.
106. **Williams, John A., et al.** Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells. *Pharmacology&Toxicology*. 2002, 91, S. 297-303.
107. **Samuel, I., Zaheer, A. und Fisher, R.A.** In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production. *J. Gastrointest. Surg.* December 2006, 10(10), S. 1376-83.
108. **Wagner, A.C.C., et al.** CEP-1347 inhibits caerulein-induced rat pancreatic JNK activation and ameliorates caerulein pancreatitis. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol*. 2000, 278, S. 165-172.
109. **Fleischer, F., et al.** Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 2001, Vol. 7 (2), S. 259-265.
110. **Tibbles, L.A. und Woodgett, J.R.** The stress-activated protein kinase pathway. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*. 18.. February 1999, 55, S. 1230-1254.
111. **Xia, Z., et al.** Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 24.. November 1994, 270(5240), S. 1326-31.
112. **Cuenda, A., et al.** Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *The EMBO Journal*. 1997, Vol.16 No.2, S. 295-305.
113. **Marshall, C.J.** Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 27. January 1995, 80(2), S. 179-85.
114. **Hannink, M. und Donoghue, D.J.** Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochim Biophys Acta*. 28. July 1989, 989(1), S. 1-10.
115. **Dempsey, P.W., et al.** The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. June-August 2003, 14(3-4), S. 193-209.
116. **Wan, Y., Kurosaki, T. und Huang, X-Y.** Tyrosine kinase in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *nature*. 11. April 1996, 380, S. 541-544.
117. **Coso, O.A., et al.** The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*. 30. June 1995, 81(7), S. 1137-46.

118. **Thomson, S., Mahadevan, L.C. und Clayton, A.L.** MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin Cell Dev Biol.* April 1999, 10(2), S. 205-14.
119. **Minden, A. und Karin, M.** Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta.* 24. October 1997, 1333(2), S. F85-104.
120. **Herbst, R.S.** Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004, 59(2 Suppl), S. 21-6.
121. **Hubbard, S.R. und Till, J.H.** Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* July 2000, Vol. 69, S. 373-98.
122. **Nishina, H., Wada, T. und Katada, T.** Physiological Roles of SAPK/JNK Signaling Pathway. *J. Biochem.* 6.. May 2004, Vol. 136, No.2, S. 123-126.
123. **Hunter, T.** Protein Kinases and Phosphatases. *Cell.* 27. January 1995, Vol. 80, S. 225-236.
124. **Hirsch, D.D. und Stork, P.J.** Mitogen-activated protein kinase phosphatases inactivate stress activated protein kinase pathways in vivo. *J. Bio. Chem.* 1997, 272, S. 4568-4575.
125. **Gupta, S, et al.** Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 3. July 1996, Vol. 15, No. 11, S. 2760-70.
126. **Hommes, D.W., Peppelenbosch, M.P. und van Deventer, S.J.** Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut.* Jan 2003, 52(1), S. 144-151.
127. **Yang, S.H., et al.** Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor ELK-1. *EMBO J.* 16. Mar 1998, 17(6), S. 1740-1749.
128. **Hoeflich, K.P. und Woodgett, J.R.** Signal transduction and gene expression in the regulation of natural freezing survival. [Buchverf.] K.B. Storey und J.M. Storey. *Cell and Molecular Responses to Stress.* Amsterdam : Elsevier Press, 2001, Bd. Vol. 2, S. 175-193.
129. **Raingeaud, J., et al.** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J.Biol.Chem.* 31. March 1995, 270(13), S. 7420-6.
130. **Anderson, N.G., et al.** Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature.* 15. February 1990, 343, S. 651-653.
131. **Kosako, H., et al.** Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *The EMBO Journal.* 1992, Vol. 11 No. 8, S. 2903-2908.
132. **Ellinger-Ziegelbauer, H., et al.** Direct activation of the stress-activated protein kinase (SAPK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathways by an inducible

mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase kinase 3 (MEKK) derivative. *J Biol Chem.* 31. January 1997, Vol. 272 (5), S. 2668-74.

133. **Karin, M.** The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* 14. July 1995, 270(28), S. 16483-6.

134. **Schaeffer, H.J. und Weber, M.J.** Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19, S. 2435-2444.

135. **Kyriakis, J.M, et al.** The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 12. May 1994, 369(6476), S. 156-60.

136. **Pulverer, B.J., et al.** Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature.* 1991, 353, S. 670-674.

137. **Dérjard, B., et al.** JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 25. March 1994, 76(6), S. 1025-37.

138. **Hibi, M., et al.** Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* November 1993, 7(11), S. 2135-48.

139. **Ip, Y.T. und Davis, R.J.** Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology.* April 1998, Volume 10, Issue 2, S. 205-219.

140. **Kallunki, T., et al.** JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Development.* 15.. December 1994, 8(24), S. 2996-3007.

141. **Weston, C.R. und Davis, R.J.** The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Genetics & Development.* February 2002, 12, S. 14-21.

142. **Grady, T., et al.** Stress-Activated Protein Kinase Activation is the Earliest Direct Correlate to the Induction of Secretagogue-induced Pancreatitis in Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 3.. October 1996, Vol. 227, Issue 1, S. 1-7.

143. **Minden, A., et al.** Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell.* 30. June 1995, Vol. 81 (7), S. 1147-57.

144. **Jaffe, A.B. und Hall, A.** Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Dev Biol.* November 2005, Vol. 21, S. 247-269.

145. **Tournier, C., et al.** Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* Cell Biology, 8. July 1997, 94(14), S. 7337-7342.



146. **Yan, M., et al.** Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature*. 22.29. December 1994, 372(6508), S. 798-800.
147. **Fanger, G.R., et al.** MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, Taks, and Tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Current Opinion in Genetics & Development*. February 1997, Vol. 7, Issue 1, S. 67-74.
148. **Dérjard, B., et al.** Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*. 3.. February 1995, 267(5198), S. 682-5.
149. **Widmann, C., et al.** Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiological Reviews*. January 1999, Vol. 79(1), S. 143-80.
150. **Wu, G.S.** The Functional Interactions Between the p53 and MAPK Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*. February 2004, 3:2, S. 156-161.
151. **Dai, T., et al.** Stress activated protein kinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells. Implications for repression of c-Jun function. *Oncogene*. 2. March 1995, Vol. 10 (5), S. 849-55.
152. **Chang, L. und Karin, M.** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 1. March 2001, Vol. 410, S. 37-40.
153. **Pawson, T. und Scott, J.D.** Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. *Science*. December 1997, Vol. 278, S. 2075-80.
154. **Yasuda, J., et al.** The JIP Group of Mitogen-Activated Protein Kinase Scaffold Proteins. *Molecular and Cellular Biology*. October 1999, 19(10), S. 7245-7254.
155. **Mooney, L.M. und Whitmarsh, A.J.** Docking Interactions in the c-Jun N-terminal Kinase Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 19.. March 2004, Vol. 279, No. 12, S. 11843-11852.
156. **Tournier, C., et al.** Requirement of JNK for Stress-Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway. *Science*. 5. May 2000, Vol.288 No.5467, S. 870-874.
157. **Kuan, C.Y., et al.** The JNK 1 and JNK 2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*. 1999, 22, S. 667-676.
158. **Sabapathy, K., et al.** Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK 1 and JNK 2. *Neuron*. 1999, Mech. Dev. 89, S. 115-124.
159. **Han, J., et al.** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 5. August 1994, 265(5173), S. 808-11.
160. **Rouse, J., et al.** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 23. September 1994, Vol. 78(6), S. 1027-37.

161. **Lee, J.C., et al.** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 29. December 1994, 372(6508), S. 739-746.
162. **Jiang, Y., et al.** Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38d. *J.Biol.Chem.* 1997, 272, S. 30122-30128.
163. **Ichijo, H., et al.** Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 3. January 1997, 275(5296), S. 90-4.
164. **Raingeaud, J., et al.** MKK3- and MKK6-Regulated Gene Expression Is Mediated by the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *Molecular and Cellular Biology*. March 1996, Vol. 16, No.3, S. 1247-1255.
165. **Tan, Yi, et al.** FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO Journal*. 1996, Vol. 15 No. 17, S. 4629-4642.
166. **Crawley, James B., et al.** T-Cell Proliferation in Response to Interleukins 2 and 7 Requires p38MAP Kinase Activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 6. June 1997, Vol. 272, No. 23, S. 15023-15027.
167. **Shin, J.H., et al.** p38 $\beta$  MAPK affords cytoprotection against oxidative stress-induced astrocyte apoptosis via induction of  $\alpha$ B-crystallin and its anti-apoptotic function. *Neuroscience Letters*. 1.. September 2011, Vol. 501, Issue 3, S. 132-137.
168. **Groblewski, G.E., et al.** Cholecystokinin stimulates heat shock protein 27 phosphorylation in rat pancreas both in vivo and in vitro. *Gastroenterology*. April 1997, 112(4), S. 1354-61.
169. **Barnes, Peter J.** New treatments for COPD. *Nature Reviews Drug Discovery*. June 2002, 1 | doi:10.1038/nrd820, S. 437-446.
170. **MacNee, W., et al.** Efficacy and safety of the oral p38 inhibitor PH-797804 in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised clinical trial. *Thorax*. 28. March 2013, 68, S. 738-745.
171. **Boulton, T.G., et al.** An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*. 6. July 1990, 249(4964), S. 64-67.
172. **Boulton, T.G., et al.** ERK's: a family of protein serine/threonine kinase that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991, 65, S. 663-675.
173. **Kyriakis, J.M. und Avruch, J.** Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays*. July 1996, 18(7), S. 567-77.
174. **Lewis, T.S., Shapiro, P.S. und Ahn, N.G.** Signal transduction through MAP Kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 1998, 74, S. 49-139.
175. **Wennerberg, K., Rossman, K.L. und Der, C.J.** The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 1.. March 2005, 118(Pt 5), S. 843-6.

176. **Morrison, Deborah K. und Cutler Jr, Richard E.** The complexity of Raf-1 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*. April 1997, Volume 9, Issue 2, S. 174-179.
177. **Hagemann, Carsten und Rapp, Ulf R.** Isotype-Specific Funktionen of Raf Kinases. *Experimental Cell Research*. 25. November 1999, Volume 253, Issue 1, S. 34-46.
178. **Seger, Rony, et al.** Purification and Characterization of Mitogen-activated Protein Kinase Activator(s) from Epidermal Growth Factor stimulated A431 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 15.. July 1992, Vol. 267, No. 20, S. 14373-14381.
179. **Zheng, Chao-Feng und Guan, Kun-Liang.** Cloning and Characterization of Two Distinct Human Extracellular Signal-regulated Kinase Activator Kinases, MEK1 and MEK2. *The Journal of Biological Chemistry*. 25. May 1993, Vol. 268, No. 15, S. 11435-11439.
180. **Subramaniam, S. und Unsicker, K.** Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience*. 2006, 138(4), S. 1055-65.
181. **Mercer, K.E. und Pritchard, C.A.** Raf proteins and cancer: B-Raf ist identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta*. 5. June 2003, 1653(1), S. 25-40.
182. **English, J, et al.** New Insights into the Control of MAP Kinase Pathways. *Experimental Cell Research*. 25. November 1999, Vol.253(1), S. 255-270.
183. **Kotlyarov, A., et al.** MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nature Cell Biology*. 1. June 1999, Vol 1(2), S. 94-7.
184. **Tietz, A.B., et al.** Gene deletion of MK2 inhibits TNF-alpha and IL-6 and protects against cerulein-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 19. January 2006, Vol. 290 (6), S. G1298-G1306.
185. **Stokoe, D., et al.** MAPKAP kinase-2: a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *The EMBO J*. 1992, Vol. 11 No. 11, S. 3985-3994.
186. **Stokoe, D., et al.** The substrate specificity and structure of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J*. 15. December 1993, Vol. 296 (Pt 3), S. 843-9.
187. **Zu, Y.L., et al.** The primary structure of a human MAP kinase activated protein kinase 2. *Biochem Biophys Res Commun*. April 1994, 200(2), S. 1118-24.
188. **Manke, I.A., et al.** MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell*. 7. January 2005, 17 (1), S. 37-48.
189. **Beyaert, R., et al.** The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J*. April 1996, Vol. 15 (8), S. 1914-23.

190. **Stokoe, D., et al.** Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Letters*. 30. November 1992, Vol. 313, Issue 3, S. 307-313.
191. **Ben-Levy, R., et al.** Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*. 24. September 1998, Vol. 8 (19), S. 1049-57.
192. **Engel, K., Kotlyarov, A. und Gaestel, M.** Leptomycin b-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *The EMBO Journal*. 1998, Vol. 17 No. 12, S. pp3363-3371.
193. **Kotlyarov, A., et al.** Distinct Cellular Functions of MK2. *Molecular and Cellular Biology*. July 2002, 22(13), S. 4827-35.
194. **Ritossa, F.** A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*. 15. December 1962, Vol. 18, Issue 12, S. 571-573.
195. **Tissi res, A., Mitchel, H.K. und Tacy, U.M.** Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puff. *J Mol Biol*. 15. April 1974, Vol. 84(3), S. 389-98.
196. **Ellis, J.** Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 30. July 1987, Vol. 37(6129), S. 378-379.
197. **Jakob, U., et al.** Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*. 25. January 1993, Vol. 268 No. 3, S. 1517-20.
198. **De Maio, A.** Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*. January 1999, Vol. 11(1), S. 1-12.
199. **Schlesinger, M.J.** Heat Shock Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 25. July 1990, Vol. 265, No. 21, S. 12111-12114.
200. **Jacquier-Sarlin, M.R., et al.** Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia*. 30. November 1994, Vol. 50(11-12), S. 1031-8.
201. **Rogalla, T., et al.** Regulation of Hsp27 Oligomerization, Chaperone Function, and Protective Activity against Oxidative Stress/Tumor Necrosis Factor alpha by Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2. July 1999, Vol. 274, No. 27, S. 18947-18956.
202. **Wagner, A.C.C., et al.** Hyperthermia induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. November 1996, Vol. 111, Issue5, S. 1333-42.
203. **Otaka, M., et al.** Differential induction of HSP60 and HSP70 by different stress situations in rats. Correlation with cerulein-induced pancreatitis. *Dig Dis Sci*. July 1997, 42(7), S. 1473-9.
204. **Weber, H., et al.** Heat shock response is associated with protection against acute interstitial pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci*. November 2000, Vol. 45 (11), S. 2252-64.

205. **Schäfer, C., et al.** HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells. *Am J Physiol.* December 1999, Vol. 277 (6 Pt 1), S. C1032-43.
206. **Lavoie, J.N., et al.** Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem.* 15. November 1993, Vol. 268 (32), S. 24210-4.
207. **Welsh, M.J. und Gaestel, M.** Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 30. June 1998, Vol. 851, S. 28-35.
208. **Lavoie, J.N., et al.** Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.* 15. January 1995, Vol. 15 (1), S. 505-16.
209. **Garrett, J.L., et al.** A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO Journal.* 1997, Vol. 16 No. 3, S. 659-671.
210. **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7. May 1976, Vol. 72, S. 248-54.
211. **Compton, S.J. und Jones, C.G.** Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* December 1985, Vol. 151(2), S. 369-74.
212. **Bhatia, M., et al.** Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci. USA.* April 1998, Vol. 95 (8), S. 4760-5.
213. **Kawabata, S., et al.** Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *Eur J Biochem.* 15. February 1988, Vol. 172(1), S. 17-25.
214. **Hibi, M., Nakajima, K. und Hirano, T.** IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med (Berl).* January 1996, Vol. 74(1), S. 1-12.
215. **Showalter, H.D., et al.** 5-[(Aminoalkyl)amino]-substituted anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-ones as novel anticancer agents. Synthesis and biological evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry.* April 1984, 27(3), S. 253-5.
216. **McMahon, G., et al.** Protein kinase inhibitors: structural determinants for target specificity. *Current Opin Drug Discovery Dev.* 1998, 1(2), S. 131-146.
217. **Chen, C.Y., et al.** Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science.* 19. June 1998, 280(5371), S. 1945-9.
218. **Han, Z., et al.** c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* July 2001, 108(1), S. 73-81.

219. **Bennett, Brydon, et al.** SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *PNAS*. 20. November 2001, Vol.98 No.24, S. 13681-13686.
220. **Renart, J., Reiser, J. und Stark, G.R.** Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. July 1979, Vol. 76(7), S. 3116-20.
221. **Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. September 1979, Vol. 76(9), S. 4350-4.
222. **Burnette, W.N.** "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*. April 1981, Vol. 112(2), S. 195-203.
223. **Minutolia, Letteria, et al.** Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis. *Life Sciences*. 2004, Bd. 2864, 75, S. 2853-2866.
224. **McKay, C.J. und Imrie, C.W.** The continuing challenge of early mortality in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2004, 91, S. 1243-1244.
225. **Thaker, A.M., Mosko, J.D. und Berzin, T.M.** Post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis. *Gastroenterology Report*. 17. November 2014, Vol.2 Issue 4, S. 1-9.
226. **Wilcox, C.M., Varadarajulu, S. und Eloubeidi, M.** Role of endoscopic evaluation in idiopathic pancreatitis: a systematic review. *Gastrointestinal Endoscopy*. June 2006, Volume 63, Issue 7, S. 1037-1045.
227. **Kochar, B., et al.** Incidence, severity, and mortality of post-ERCP pancreatitis: a systematic review by using randomized, controlled trials. *Gastrointest Endosc*. January 2015, Vol.81(1), S. 143-149.
228. **Elmunzer, B.J., et al.** A randomized trial of rectal indomethacin to prevent post-ERCP pancreatitis. *N Engl J Med*. 12. April 2012, Vol. 366 (15), S. 1414-22.
229. **Choksi, N.S., et al.** The risk of post-ERCP pancreatitis and the protective effect of rectal indomethacin in cases of attempted but unsuccessful prophylactic pancreatic stent placement. *Gastrointest Endosc*. January 2015, Vol.81(1), S. 150-5.
230. **Döbrönte, Z., et al.** Is rectal indomethacin effective in preventing of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis? *World J Gastorenterol*. 7. August 2014, Vol. 20 (29), S. 10151-7.
231. **Luo, Hui, et al.** Routine pre-procedural rectal indometacin versus selective post-procedural rectal indometacin to prevent pancreatitis in patients undergoing endoscopic

retrograde cholangiopancreatography: a multicentre, single-blinded, randomised controlled trial. *The Lancet*. 4. June 2016, Volume 387, No. 10035, S. p2293-2301.

232. **Selig, Lena, et al.** Characterisation of a transgenic mouse expressing R122H human cationic trypsinogen. *BMC Gastroenterology*. 27. October 2006, Bde. doi:10.1186/1471-230X-6-30, 6:30.

233. **Dawra, Rajinder, et al.** Intra-acinar Trypsinogen Activation Mediates Early Stages of Pancreatic injury but not in mice with acute Pankreatitis. *Gastroenterology*. December 2011, Volume 141, Issue 6, S. 2210-2217.e2.

234. **Van Acker, G.J., et al.** Cause-effect relationships between zymogen activation and other early events in secretagogue-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. June 2007, 292(6), S. G1738-46.

235. **Clifton, Andrew D., Young, Peter R. und Cohen, Philip.** A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Letters*. 11. July 1996, 392, S. 209-214.

236. **Doan, Thi Kim Phuong, et al.** Inhibition of JNK and ERK pathways by SP600125- and U0126-Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 26. September 2012, Vol. 9, No.6, S. 283-294.

237. **Irrera, N., et al.** Evidence for a role of mitogen-activated protein kinases in the treatment of experimental acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 28. November 2014, Volume 20(44), S. 16535-16543.

238. **Zyromski, N. und Murr, M.M.** Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Surgery*. 2003, Volume 133, S. 235-237.

239. **Blinman, T.A., et al.** Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine up regulation via p38 MAP Kinase. *American Journal of Physiology Cellular Physiology*. 2000, Volume 279 C, S. 1993-2003.

240. **Clemons, A.P., et al.** Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 Inhibitors U0126 and PD98059. *Pancreas*. 2002, Volume 25, S. 251–259.

241. **Vaishnav, Dhara, et al.** SP600125, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase, activates CREB by a p38 MAPK-mediated pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, 307, S. 855-860.

242. **Cohen, Philip, et al.** The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem.J.* 2003, 371, S. 199-204.

243. **Wisdom, R, Johnson, R S und Moore, C.** c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *The EMBO Journal*. 4. January 1999, 18(1), S. 188-197.

244. **Pedersen, B K, Steensberg, A und Schjerling, P.** Exercise and interleukin-6. *Current Opinion in Hematology*. May 2001, Vol. 8 Issue 3, S. pp 137-141.

245. **Blinman, TA, et al.** Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1. Dec 2000, Bd. No. 6, Vol. 279, S. C1993-2003.



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
0,9 % NaCl	0,9 % Natrium Chlorid - Lösung
A	Ampère
AC	Adenylatzyklase
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute respiratory distress syndrom
ATF	AMP-dependent transcription factor
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholezystokinin
Cer	Caerulein, Cerulein
DAB	Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	Extracellular regulated kinase
et al.	et alia
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb	Growth-factor receptor-bound protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hsp	Hitze-Schock-Protein
IgG	Immunglobulin G
IL-1/ IL-6	Interleukin-1 / Interleukin-6
i.p.	Intra-peritoneal
IVP	In-vivo-Pankreatitis
JNK	c-jun n-terminale Kinase
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Mol / Liter
mmol	milimol
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MAPKAP-Kinase 2/3, MK-2/3	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2/3
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase

MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	(3-N-Morpholino) propanesulfonic acid
MOV	Multi Organ Versagen
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
n.s.	Nicht Signifikant
NTG	Nicht-Trans-Gen, Wildtyp
p	p-Wert
p38	p38-Map-Kinase
PEA	Palmitylethanolamid
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP-1	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
SP	Inhibitor SP 600125
TAB	Trypsin assay buffer
TBS-T	Tris-buffered saline Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TRIS base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate
UV	Ultraviolett
V	Volt
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Gerätschaften.....	26
Tabelle 2: Liste der Materialien.....	27
Tabelle 3: Standard nach Bradford.....	28
Tabelle 4: Amylase-Puffer .....	29
Tabelle 5: Stop Lösung für Amylase Reaktion .....	29
Tabelle 6: MPO Homogenisationspuffer .....	30
Tabelle 7: MPO Extraktionspuffer Gebrauchslösung .....	30
Tabelle 8: MPO Messpuffer .....	30
Tabelle 9: MPO Extraktionspuffer Stock Lösung .....	30
Tabelle 10: Soy Bean Trypsin Inhibitor (SBTI) in Hepes-Ringer Puffer.....	31
Tabelle 11: Phenylmethylsulfonfluorid (PMSF) .....	31
Tabelle 12: Sonstiges .....	31
Tabelle 13: TAB-Puffer (Trypsin-Assay-Buffer) .....	32
Tabelle 14: MOPS-Puffer .....	32
Tabelle 15: Sonstiges .....	33
Tabelle 16: Trypsinverdünnungsreihe .....	33
Tabelle 17: ELISA Kit .....	34
Tabelle 18: Homogenisations-Puffer .....	39
Tabelle 19: Trenn-Gel (10% Acrylamid).....	40
Tabelle 20: Sammel-Gel.....	41
Tabelle 21: Trenn-Gel-Puffer .....	41
Tabelle 22: Sammel-Gel-Puffer.....	41
Tabelle 23: Waschmedium TBS 10-fach Stock-Lösung .....	41
Tabelle 24: Blocking Lösung .....	41
Tabelle 25: Gel-Elektrophorese Lauf-Puffer 10-fach Stock-Lösung .....	41
Tabelle 26: Protein-Transfer-Puffer 10-fach Stock-Lösung .....	42
Tabelle 27: Erstantikörper .....	42
Tabelle 28: Zweitantikörper (NA 934) .....	42
Tabelle 29: Zweitantikörper (NA 931) .....	42
Tabelle 30: Übersicht Wildtyp Mäuse .....	44
Tabelle 31: Übersicht MK-2 Knock-out Mäuse .....	44
Tabelle 32: Fragestellung zum Versuchsaufbau .....	45
Tabelle 33: Injektionsplan am Beispiel IVP 1 .....	45
Tabelle 34: Anzahl der Wildtyp Tiere .....	47
Tabelle 35: Anzahl der Knock-out Tiere.....	47

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Caerulein (Quelle: en.wikipedia.org : Ceruletide).....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Sekretionsvorgangs in der Acinus-Zelle .....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Abläufe bei der akuten Pankreatitis (Quelle: nach Saluja und Steer) .....	11
Abbildung 4: Signalkaskade der MAP-Kinasen (Quelle: von Cellsignal.com) .....	16
Abbildung 5: Vereinfachte Übersicht über den SAPK/JNK-Signalweg (Quelle: sabiosciences.com) .....	18
Abbildung 6: Vereinfachte Übersicht über den p38 Signalweg (Quelle: sabiosciences.com) ....	19
Abbildung 7: Vereinfachte Übersicht über den ERK-Signalweg (Quelle: sabiosciences.com) ....	21
Abbildung 8: Struktur SP 600125 (Quelle: chemicalbook.com) .....	36
Abbildung 9: Beispiel für Boxplot .....	49
Abbildung 10: Amylase Aktivität Kontrollen .....	50
Abbildung 11: Trypsin Aktivität Kontrollen .....	51
Abbildung 12: MPO Aktivität Kontrollen .....	51
Abbildung 13: Interleukin 6 Aktivität Kontrollen .....	52
Abbildung 14: Ödemisierungsgrad nicht-transgene Mäuse .....	52
Abbildung 15: Amylase Bestimmung bei nicht-transgenen Tieren im Serum .....	53
Abbildung 16: Trypsin Bestimmung bei nicht-transgenen Tieren im Pankreasgewebe .....	54
Abbildung 17: MPO Bestimmung bei nicht-transgenen Tieren im Lungengewebe .....	55
Abbildung 18: Interleukin 6 Bestimmung bei nicht-transgenen Tieren im Serum .....	56
Abbildung 19: Ödemisierungsgrad MK-2 -/- Mäuse .....	58
Abbildung 20: Amylase Bestimmung bei MK-2 -/- Tieren im Serum .....	59
Abbildung 21: Trypsin Bestimmung bei MK-2 -/- Tieren im Pankreasgewebe .....	60
Abbildung 22: MPO Bestimmung bei MK-2 -/- Tieren im Lungengewebe .....	61
Abbildung 23: Interleukin 6 Bestimmung bei MK-2 -/- Tieren im Serum .....	62
Abbildung 24: Vergleich der Amylase Aktivität bei den Kontroll Tieren zwischen der nicht- transgenen und MK-2 -/- Gruppe.....	63
Abbildung 25: Vergleich der Trypsin Aktivität bei den Kontroll Tieren zwischen der nicht- transgenen und MK-2 -/- Gruppe.....	64
Abbildung 26: Vergleich der MPO Aktivität bei den Kontroll Tieren zwischen der nicht- transgenen und MK-2 -/- Gruppe.....	64
Abbildung 27: Vergleich der Interleukin 6 Aktivität bei den Kontroll Tieren zwischen der nicht- transgenen und MK-2 -/- Gruppe.....	65
Abbildung 28: Vergleich Amylase Aktivität der Caerulein und Caerulein + SP600125 Tiere zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe .....	66
Abbildung 29: Vergleich Trypsin Aktivität der Caerulein und Caerulein + SP600125 Tiere zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe .....	67
Abbildung 30: Vergleich MPO Aktivität der Caerulein und Caerulein + SP600125 Tiere zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe .....	68

Abbildung 31: Vergleich Interleukin 6 Aktivität der Caerulein und Caerulein + SP600125 Tiere zwischen der nicht-transgenen und MK-2 -/- Gruppe .....	69
Abbildung 32: phospho JNK und Gesamt JNK aus IVP 4 .....	70
Abbildung 33: Pixelmessung NTG JNK/phospho JNK .....	71
Abbildung 34: phospho p38 und Gesamt p38 aus IVP 4 .....	72
Abbildung 35: Pixelmessung NTG p38/phospho p38.....	73
Abbildung 36: phospho p44\42 und Gesamt p44\42 aus IVP 3.....	73
Abbildung 37: Pixelmessung NTG p44\42 / phosphp p44\42.....	74
Abbildung 38: phospho SAPK/JNK und Gesamt SAPK/JNK aus IVP 6.....	75
Abbildung 39: Pixelmessung MK2 JNK/phospho JNK.....	75
Abbildung 40: phospho p38 und Gesamt p38 aus IVP 6.....	76
Abbildung 41: Pixelmessung MK-2 p38/phospho p38.....	76
Abbildung 42: phospho p44\42 und Gesamt p44\42 aus IVP 6.....	77
Abbildung 43: Pixelmessung MK2 p44\42 / phospho p44\42 .....	77
Abbildung 44: Halbwertszeit Amylase (Quelle: Selig et. al) .....	80

## **Danksagung**

Mit diesen letzten Zeilen möchte ich ein herzliches Dankeschön an die Menschen richten, die mich in den letzten Jahren bei dieser Arbeit begleitet haben.

An erster Stelle geht ein besonderer Dank an meinen Doktorvater Professor Schäfer. Für die Überlassung des Themas zu dieser Dissertation, die jederzeit gewährte Unterstützung in allen fachlichen Belangen und für die konstruktive Kritik. Aber auch für die Geduld über die vielen Jahren, die es gebraucht hat um diese Arbeit fertigzustellen.

Für eine spannende und lehrreiche Zeit geht ein weiterer Dank an die Mitarbeiter der ehemaligen Arbeitsgruppe Professor Schäfer der Medizinischen Klinik 2 in Grosshadern, sowie an die frühere Arbeitsgruppe Professor Kolligs. Die erlernten Fertigkeiten und mein gesamtes Wissen über die Arbeit im Labor habe ich in erster Linie Frau Dipl. Biologin Antje Malo, Frau Bettina Ziehe und Frau Stefanie Ochs zu verdanken. Vielen Dank für alles.

Ebenso möchte ich meinen Mitdoktoranden Thomas Michler und Johannes Kramer für den fortwährenden Austausch von Gedanken und Inspirationen danken. Ihr alle ward Quelle meiner wissenschaftlichen Arbeit. Nicht zu vergessen die lustigen Stunden auch außerhalb des Labors.

Und schließlich möchte ich meiner Familie danken. Meine Eltern Gudrun und Jürgen Fries. Ihr habt mir die Möglichkeit gegeben mich frei entfalten zu dürfen, mir ein Studium ermöglicht und mich stets motiviert. Danke für die Unterstützung, und dass ihr immer an mich geglaubt habt. Meine Frau Stephanie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und dafür, dass Du Teil meines Lebens bist.

Abschließend geht noch ein Dankeschön an alle meine Verwandten, Freunde und Bekannte, die mein Jammern und Klagen jahrelang tapfer ertragen und nie daran gezweifelt haben, dass diese Arbeit tatsächlich einmal fertig werden wird.