



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

## **Expression und Regulation von JAK/STAT - Proteinen im Pankreas**

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

vorgelegt von:  
Patricia Moubarak

aus:  
Rostock

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Wagner
Mitberichterstatter:	PD Dr. M. Schnurr Prof. Dr. J. Diebold
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	Dr. E. Gallmeier
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	22.06.2006

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Akute Pankreatitis</b>	<b>1</b>
1.1.1. <i>Epidemiologie, Ätiologie, Verlauf und Therapie der akuten Pankreatitis</i>	1
1.1.2. <i>Physiologie des exokrinen Pankreas</i>	1
1.1.3. <i>Pathophysiologische Konzepte der akuten Pankreatitis</i>	2
<b>1.2. Zytokine, Chemokine und ihre Rolle bei der akuten Pankreatitis</b>	<b>6</b>
1.2.1. <i>Zytokine</i>	6
1.2.2. <i>Chemokine</i>	7
1.2.3. <i>Rolle der Zyto- und Chemokine bei der akuten Pankreatitis</i>	7
<b>1.3. Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg</b>	<b>8</b>
1.3.1. <i>Die Familie der Janus Kinasen</i>	9
1.3.2. <i>Die Familie der "Signal transducers and activators of transcription" (STATs)</i>	11
1.3.3. <i>Funktionsweise des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges</i>	12
<b>1.4. Fragestellung</b>	<b>15</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Verwendete Materialien und Tiere</b>	<b>16</b>
2.1.1. <i>Allgemeine Chemikalien</i>	16
2.1.2. <i>Allgemeine Puffer und Lösungen</i>	17
2.1.3. <i>Allgemeine technische Geräte und sonstige Materialien</i>	18
2.1.4. <i>Spezielle Chemikalien, Puffer, Lösungen und Geräte</i>	19
2.1.5. <i>Tiere</i>	23

<b>2.2. Methoden</b>	<b>24</b>
2.2.1. Läppchen- und Azinuszellpreparation	24
2.2.2. Behandlung der Läppchen und Azini mit IFN- $\gamma$ , IL-6, EGF, TNF- $\alpha$ und CCK	25
2.2.3. Vorbehandlung der Läppchen und Azini mit AG-490	25
2.2.4. Immunpräzipitation	25
2.2.5. SDS-PAGE und Western-Blotting	26
2.2.6. Immunhistochemie	28
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1. Expression von JAK- und STAT-Proteinen in Pankreasazinuszellen	30
3.2. Zellpreparationsstress induziert die STAT1-Phosphorylierung	31
3.3. Behandlung mit IFN- $\gamma$ induziert die STAT1-Phosphorylierung	34
3.4. AG-490 inhibiert die IFN- $\gamma$ -induzierte STAT1-Phosphorylierung	36
3.5. Nach IFN- $\gamma$ -Behandlung wird STAT1 in den Zellkern verlagert	38
3.6. Durch Behandlung mit TNF- $\alpha$ , EGF oder IL-6 wird die STAT1-Phosphorylierung nicht induziert	40
3.7. Pankreasentnahme führt zu lang anhaltender STAT3-Phosphorylierung	41
3.8. Durch Behandlung mit IFN- $\gamma$ , EGF, IL-6 oder TNF- $\alpha$ wird keine zusätzliche STAT3-Phosphorylierung induziert	42
3.9. Durch Behandlung mit Cholezystokinin wird die STAT1- oder STAT3- Phosphorylierung nicht induziert	42

<b>4. Diskussion</b>	<b>46</b>
<b>4.1. Zusammenfassung und kritische Bewertung der Experimente</b>	<b>46</b>
4.1.1. <i>Expression von JAK- und STAT-Proteinen                   in Pankreasazinuszellen</i>	46
4.1.2. <i>Aktivierung von STAT1 und STAT3 im Pankreas</i>	47
<b>4.2. Mögliche Bedeutung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges         im Pankreas</b>	<b>51</b>
<b>4.3. Mögliche Bedeutung der Interaktion von Immun- und         Pankreasazinuszellen für die akute Pankreatitis</b>	<b>53</b>
<b>4.4. Ausblick und weiterführende Experimente</b>	<b>54</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>75</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>77</b>
<b>9. Eigene Veröffentlichungen zum Thema</b>	<b>78</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>79</b>

## 1. Einleitung

Das Pankreas reagiert recht einförmig auf eine ganze Reihe unterschiedlicher schädlicher Einflüsse und Noxen. Klinisches Korrelat dieser Reaktion ist die Pankreatitis. Im Folgenden soll kurz das aktuelle gedankliche Rahmenkonzept zur Pathogenese der akuten Pankreatitis dargelegt werden (1.1). Anschließend erfolgt ein kurzer Überblick über die Rolle der Chemo- und Zytokine bei der akuten Pankreatitis (1.2) sowie eine Vorstellung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges (1.3). Abschließend wird auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit eingegangen (1.4).

### 1.1. Akute Pankreatitis

#### *1.1.1. Epidemiologie, Ätiologie, Verlauf und Therapie der akuten Pankreatitis*

Die akute Pankreatitis ist in den Industrieländern eine relativ häufig vorkommende Erkrankung mit einer Inzidenz von 20-100 Fällen pro 100.000 Menschen jährlich. Die zwei Hauptursachen für ca. 80-90% der Fälle der akuten Pankreatitis sind in den westlichen Ländern ein biliärer Aufstau im Rahmen von Gallenwegserkrankungen (Gallensteine, Gallengangsstenosen) und Alkoholabusus (Steer und Meldolesi 1987). Seltener Ursachen sind Medikamente, hereditäre Formen, iatrogene Formen nach ERCP oder Traumata. Die akute Pankreatitis kann einen milden (interstitiell-ödematösen) oder einen schweren (hämorrhagisch-nekrotisierenden) Verlauf mit bis zu 20% Mortalität haben. Die Therapie ist bislang rein symptomatisch, eine kausale Therapie gibt es nicht.

#### *1.1.2. Physiologie des exokrinen Pankreas*

Zum Verständnis und für eine kausale Therapie der akuten Pankreatitis ist die Physiologie des exokrinen Pankreas unerlässlich. Das exokrine Pankreas hat zwei Bestandteile: das duktales System, das Flüssigkeiten und Elektrolyte nach Sekretinstimulation freisetzt, und die Azinuszellen, die durch Cholezystokinin

(CCK) oder cholinerge Stimulation Verdauungsenzyme sezernieren (Steer und Meldolesi 1987). Beim Menschen werden die CCK-Effekte über neuronale Einflüsse vermittelt, wobei die CCK-Rezeptoren auf präsynaptischen cholinergen Neuronen lokalisiert sind (Owyang und Logsdon 2004). Die Schutzmechanismen des Pankreas, die bewirken, dass es nicht durch seine eigenen Produkte geschädigt wird, umfassen im Einzelnen Folgendes: zum einen werden die potenziell schädlichen Verdauungsenzyme als inaktive Vorstufen oder Zymogene sezerniert und erst im Duodenum aktiviert. Weiterhin werden die Enzyme von der Synthese bis zu ihrer Sekretion durch membrangebundene Organellen, den sogenannten Zymogengranula, vom Zytoplasma der Azinuszellen getrennt. Zymogengranula besitzen zusätzliche Schutzmechanismen: sie beinhalten Trypsininhibitoren, die Spuren vorzeitig aktivierten Trypsins inaktivieren können. Außerdem liegt der pH-Wert der Zymogengranula im sauren Bereich weit unterhalb des pH-Optimums der meisten proteolytischen Enzyme. Schließlich sorgen Proteasen dafür, dass schon vorhandene aktive Enzyme degradiert werden (Lerch und Gorelick 2000).

### *1.1.3. Pathophysiologische Konzepte der akuten Pankreatitis*

Die akute Pankreatitis ist eine plötzlich auftretende, primär nicht-infektiöse Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Sie unterscheidet sich von der chronischen Pankreatitis dadurch, dass es in aller Regel zu einer vollständigen Restitution ohne nachweisbare morphologische Veränderungen (z.B. Verkalkungen, Gangveränderungen, Pankreassteine) kommt. Die Pathophysiologie der akuten Pankreatitis konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. In der klassischen Hypothese von Opie (Opie 1901a; Opie 1901b) wird Gallereflux in den Ductus wirsungianus als Ursache angesehen, wobei die Pankreatitis durch direkte toxische Effekte der Galle auf Pankreasgang und -azinuszellen erklärt wird. Diese Theorie basierte auf dem bei zwei an Pankreatitis verstorbenen Patienten erhobenen, autoptischen Nachweis von Gallensteinen, welche die Papilla major verschlossen. Allerdings findet sich ein gemeinsamer Ausführungsgang von Pankreas- und Gallenwegen, der lang genug wäre, um

einen Gallereflux im Falle einer steinbedingten Okklusion der Papille zu erlauben, nur bei weniger als 20% der Bevölkerung.

In den letzten Jahren hat sich ein Konzept der Pathophysiologie etabliert, das erlaubt, drei wichtige Phänomene in der Frühphase der akuten Pankreatitis zu definieren (James H. Grendell 1997; Steer 1997): die sekretorische Blockade (Saluja, Saluja et al. 1989; JD Gardner 1993), die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung (Saluja, Donovan et al. 1997; Hofbauer, Saluja et al. 1998; Saluja, Bhagat et al. 1999), und schließlich die Bildung entzündlich aktiver Mediatoren wie z.B. TNF- $\alpha$  (Gukovskaya, Gukovsky et al. 1997), aber auch anderer Zytokine (Brady, Christmas et al. 1999) einschließlich der Chemokine (Grady, Liang et al. 1997; Han und Logsdon 1999; Han und Logsdon 2000). Diese Phänomene sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

- Sekretorische Blockade

Allgemein wird die akute Pankreatitis als autodigestives Geschehen betrachtet (Saluja, Donovan et al. 1997). Das heißt, dass das Pankreas durch die Verdauungsenzyme, die es normalerweise produziert und sezerniert, geschädigt wird (Steer 1997).

In der Frühphase der akuten Pankreatitis kommt es zu einer Zerstörung des Aktinzytoskeletts an der basolateralen Membran der Azinuszelle. Hierdurch wird der Transport der Verdauungsenzyme aus der Zelle heraus unterbrochen. Da trotz der Blockade weiterhin Verdauungsenzyme synthetisiert werden, kommt es zum Anstau der Enzyme in der Drüse.

- Frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung

Eine Pankreatitis entsteht, wenn inaktive pankreatische proteolytische Enzyme wie z.B. Trypsinogen im Organ selbst aktiviert werden. Normalerweise liegt Trypsinogen im Pankreassaft bis zum Erreichen des Duodenums in einem inaktivierten Zustand vor (s.o.).



Die initialen Triggermechanismen zur Aktivierung von Trypsinogen sind noch weitgehend unbekannt. Derzeit existieren zwei Theorien. Demnach wird die Aktivierung der Verdauungsenzyme durch eine lysosomale Hydrolase, welche Trypsin nach Fusion der Zymogengranula und Lysosomen aktiviert, initiiert. Alternativ hierzu könnte die Aktivierung innerhalb des normalen intrazellulären Sekretionsweges als Folge einer Blockade entstehen (sekretorische Blockade). Gemeinsam ist beiden Theorien die Kolokalisation von Verdauungsenzymen mit lysosomaler Hydrolase und anschließender Aktivierung der Zymogene. Durch die sekretorische Blockade kommt es zu einer Umverteilung der Enzyme, die normalerweise in Lysosomen im Pankreas transportiert würden. Lysosomale Enzyme werden folglich in intrazytoplasmatischen Organellen mit Verdauungsenzymen kolokalisiert (siehe Abbildung 1). Durch diese Kolokalisation kommt es zu einer vorzeitigen Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin, wobei besonders das lysosomale Enzym Cathepsin B eine wichtige Rolle spielt (Hofbauer, Saluja et al. 1998; Halangk, Lerch et al. 2000), wobei im Cathepsin B-knock-out-Mausmodell die vorzeitige Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin allerdings nicht hundertprozentig gehemmt wurde. Die vorzeitige Aktivierung verursacht ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen (Dugernier, Laterre et al. 2005). Einige Daten werfen allerdings noch Zweifel an der Bedeutsamkeit der Kolokalisationshypothese bei der vorzeitigen Trypsinaktivierung auf. So wurde zum einen eine Kolokalisation lysosomaler und sekretorischer Verdauungsenzyme auch nach Stimulation mit Bombesin beschrieben, welches keine Pankreatitis auslöst (Grady, Dabrowski et al. 1996). Außerdem konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass Cathepsin B und Verdauungsenzyme auch in gesundem Pankreasgewebe bereits teilweise in den gleichen Organellen vorkommen (Willemer, Bialek et al. 1990). Insgesamt lässt sich festhalten, dass der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung eine wichtige Rolle für die Entstehung der Pankreatitis zukommt, wobei die Rolle der Kolokalisation hierbei noch nicht abschließend geklärt ist.

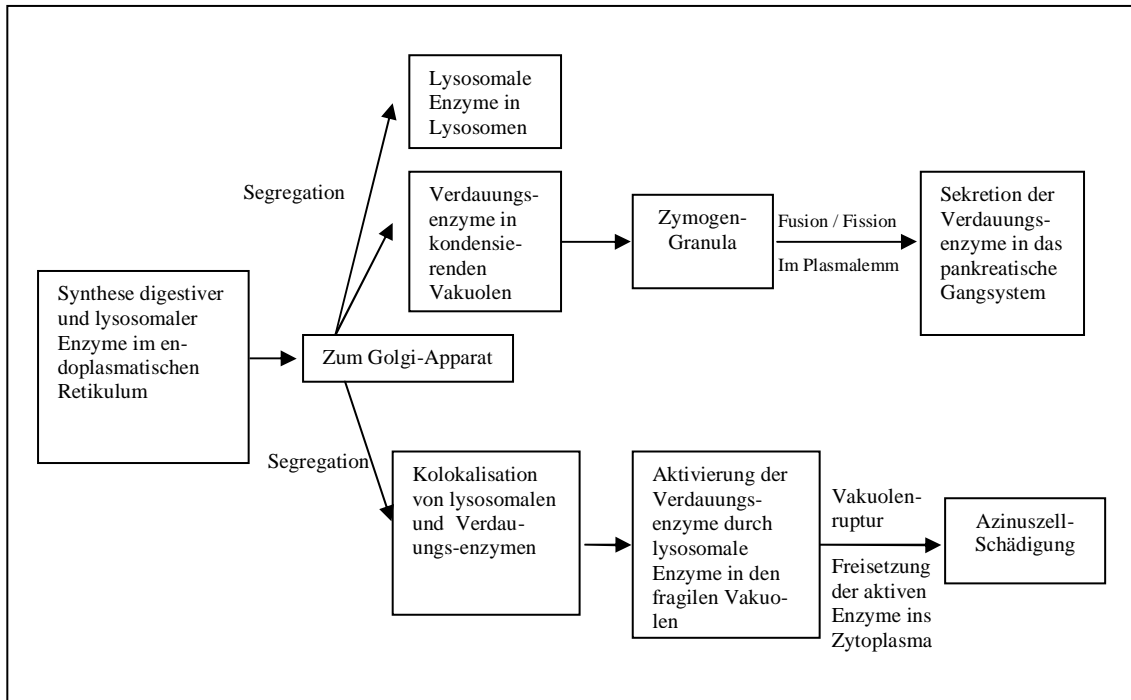


Abbildung 1: Zelluläre Geschehnisse, die zur akuten Pankreatitis führen können. Reproduziert nach Steer (1997).

- Bildung entzündlich aktiver Mediatoren

Im Rahmen der frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung kommt es gleichzeitig zu einer zunehmenden Fragilität der Zellorganellen, so dass nach deren Ruptur die aktivierten Verdauungsenzyme den freien intrazytoplasmatischen Raum erreichen und dort eine Zellschädigung verursachen können (Lerch, Hallang et al. 2000). Hierdurch beeinflussen nach Initialisierung der Autodigestion vornehmlich außerazinäre Faktoren den Schweregrad einer Attacke (James H. Grendell 1997). Die Aktivierung von Leukozyten und die Freisetzung von Zytokinen als biochemische Mediatoren der Immunreaktion spielt eine besondere Rolle (Gross, Leser et al. 1993).

Aus den beschriebenen pathophysiologischen Zusammenhängen lassen sich folgende Schlussfolgerungen für eine potentielle kausale Therapie ziehen. Die Trypsinaktivierung ist ein sehr frühzeitiges Geschehen im Ablauf der akuten

Pankreatitis. Das Zeitfenster zur Antagonisierung dieser Trypsinaktivierung ist daher relativ klein. Die immunologische Reaktion hingegen setzt verhältnismäßig spät ein, ist lang anhaltend und beeinflusst den Schweregrad der akuten Pankreatitis nachhaltig. Daher ist sie ein besonders viel versprechender Ansatzpunkt zur Beeinflussung des Schweregrades der akuten Pankreatitis. Da die immunologische Reaktion durch die Zytokinwirkung vermittelt wird, stellt deren Modifizierung einen potentiell kausaltherapeutischen Ansatz großer Relevanz dar. Beispielsweise wird von verschiedenen Zytokinen angenommen, dass sie zur Apoptoseinduktion fähig sind (Chin, Kitagawa et al. 1997; Gukovskaya, Gukovsky et al. 1997; Barber 2000; Gukovskaya, Gukovsky et al. 2002; Alam 2003). Da der Schweregrad der akuten Pankreatitis zum Ausmaß der Apoptose umgekehrt proportional ist (Bhatia 2004b), stellt die Apoptoseinduktion mittels Zytokinen in der akuten Pankreatitis einen potentiell protektiven Mechanismus dar (Alam 2003).

## **1.2. Zytokine, Chemokine und ihre Rolle bei der akuten Pankreatitis**

### *1.2.1. Zytokine*

Zytokine sind eine Gruppe körpereigener Peptide, die im Rahmen der immunologischen Reaktion in verschiedenen Zelltypen der meisten Organe gefunden werden. Manche Zytokine werden nur von einer sehr begrenzten Anzahl verschiedener Zelltypen produziert, während andere von fast dem kompletten Spektrum aller bekannten Zelltypen produziert werden. Durch einen entsprechenden Stimulus sind somit fast alle Zelltypen zur Sekretion von Zytokinen fähig. Einige Zytokine werden konstitutiv exprimiert, andere sind induzierbar. Sie haben vielfältige, vor allem proinflammatorische und immunregulatorische Funktionen. Zu den Zytokinen gehören unter anderem die Gruppen der Interleukine (IL), Interferone (IFN), Wachstumsfaktoren und chemotaktische Zytokine (Chemokine).

Zytokine unterscheiden sich von Hormonen in mehreren Hinsichten. Sie wirken üblicherweise auf ein größeres Spektrum von Zielzellen, als dies bei Hormonen

der Fall ist. Außerdem werden Hormone nur von bestimmten spezialisierten, in Drüsen organisierten Zellen produziert, während der Ursprung der Zytokine sehr viel variabler ist.

### *1.2.2. Chemokine*

Chemokine (chemotaktische Zytokine) stellen eine Untergruppe der Zytokine dar. Sie sind eine wachsende Familie von interzellulären Mediatoren, die in ihren Zielzellen viele wichtige biologische Antworten auslösen können (Leonard 2003). Zur Zeit sind über 40 Chemokine bekannt. Ihnen eigen sind einige strukturelle Gemeinsamkeiten sowie die Fähigkeit, Leukozyten anzulocken.

Chemokine sind 8-10 kD schwere Proteine und weisen 20-70% Homologie in ihren Aminosäuresequenzen auf (Luster 1998). Sie induzieren die Zellmigration und –aktivierung, indem sie an spezifische G-Protein-gekoppelte Zelloberflächenrezeptoren auf den Zielzellen binden. Es sind verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt, wobei einige nur auf bestimmten hämatopoietischen Zellen vorkommen, während andere weiter verbreitet sind. Einige Chemokine werden konstitutiv exprimiert, andere sind induzierbar. Die Hauptstimuli zur Chemokinproduktion sind frühe proinflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), bakterielle Produkte wie z.B. Lipopolysaccharide und virale Infektionen. Die Chemokine spielen neben der Leukozytenattraktion eine wichtige Rolle bei der immunologischen Reaktion.

### *1.2.3. Rolle der Zyto- und Chemokine bei der akuten Pankreatitis*

Sobald die akute Pankreatitis durch die lokale Schädigung des Pankreas mit sekretorischer Blockade und frühzeitiger intrazellulärer Aktivierung von Verdauungsenzymen initiiert wurde, haben diese Faktoren wahrscheinlich keinen nennenswerten Einfluss mehr auf den Schweregrad der Krankheit. stattdessen wird dieser hauptsächlich von der gleichzeitig ablaufenden immunologischen Reaktion bestimmt. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung von Makrophagen und

Lymphozyten, die sowohl lokal (im Pankreas) als auch systemisch (insbesondere in der Lunge) eine Entzündung in Gang setzen und so zu schweren Schäden führen (Gross, Leser et al. 1993; Norman, Fink et al. 1995). Im Rahmen der immunologischen Reaktion werden diverse pro- und auch antiinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, wie z.B. Monozyten-chemotaktisches-Protein-1 (mcp-1), mob-1 (Grady, Liang et al. 1997; Gukovskaya, Gukovsky et al. 1997), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Fink und Norman 1997), Interleukin-6 (IL-6) (Leser, Gross et al. 1991; Viedma, Perez-Mateo et al. 1992; Gross, Leser et al. 1993; Heath, Cruickshank et al. 1993), Platelet activating factor (PAF) (Kald, Kald et al. 1993; Zhou, Levine et al. 1993) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Hughes, Gaber et al. 1995; Hughes, Henry et al. 1995). Diese Zytokine werden nicht nur von einwandernden Immunzellen produziert, sondern auch von den Azinuszellen selbst (Gukovskaya, Gukovsky et al. 1997). Die Bauchspeicheldrüse beeinflusst folglich aktiv die immunologische Reaktion im Rahmen der Pankreatitis durch Chemokin-vermittelte Anreicherung des Pankreasgewebes mit weißen Blutzellen sowie deren Aktivierung durch Zytokine. Nicht bekannt ist bisher allerdings, ob bzw. über welche Signaltransduktionswege die Azinuszellen selbst auf Zytokine reagieren können. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen könnte zu neuen Therapieansätzen zur Beeinflussung des Schweregrads der akuten Pankreatitis führen.

### **1.3. Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg**

Interzelluläre Signalübertragung ist eine wichtige Voraussetzung für die Regulation der Entwicklung, des Wachstums und der Homöostase in vielzelligen Organismen. Eine Möglichkeit für Zellen, miteinander zu kommunizieren, stellt der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg dar.

Die grundsätzlichen Bestandteile sowie die Funktionsweise dieses Signaltransduktionsweges sind mittlerweile gut erforscht (Darnell, Kerr et al. 1994; Ihle, Witthuhn et al. 1995; Darnell 1996; Leonard 1996; Horvath und Darnell 1997). Insbesondere ist für viele Zyto- und Chemokine sowie Interferone bekannt, dass sie ihre Wirkung über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg entfalten. Dieser

Signalweg stellt ein sehr schnelles und direktes System der Signalübertragung von der Zellmembran zum Zellkern dar. Die Anzahl der unterschiedlichen beteiligten Proteinkomponenten ist die Grundlage für die Spezifität der durch verschiedene Zytokine induzierten Signale (Leonard und O'Shea 1998).

### 1.3.1. Die Familie der Janus Kinasen

Bislang sind vier verschiedene Mitglieder der JAK-Familie bekannt: JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2. JAKs sind relativ große Kinasen mit einem Molekulargewicht von 120 – 130 kD. Während JAK1, JAK2 und TYK2 quasi ubiquitär vorkommen, wird JAK3 nur in spezifischen Geweben exprimiert. In Natürlichen Killerzellen (NK) wird JAK3 in großen Mengen konstitutiv exprimiert, wohingegen es in T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen induzierbar ist (Kawamura, McVicar et al. 1994; Musso, Johnston et al. 1995; Tortolani, Lal et al. 1995; Gurniak und Berg 1996; Sharfe, Dadi et al. 1997). Neben dem Vorkommen in hämatopoietischen Zellen wird JAK3 auch in glatter Gefäßmuskulatur und Endothel exprimiert (Verbsky, Bach et al. 1996).

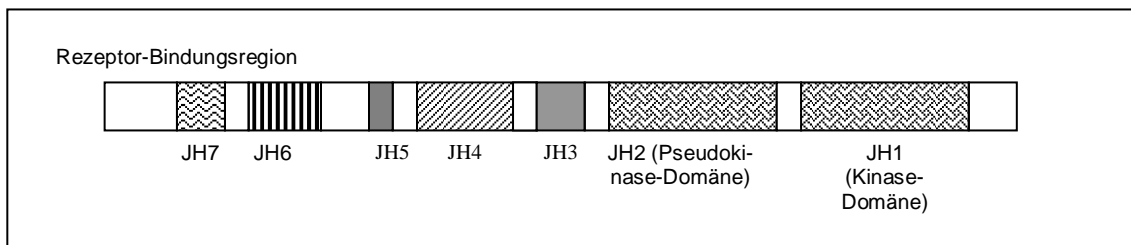


Abbildung 2: Struktur der Janus Kinasen.

Allen Mitgliedern der JAK-Familie ist gemein, dass sie sowohl eine Kinase- als auch eine Pseudokinase-Domäne beinhalten, was auch zur Namensgebung als „Janus Kinasen“ geführt hat (nach dem doppelgesichtigen römischen Gott der Pforten). Zusätzlich wurden zwischen den verschiedenen JAKs mehrere sogenannte JAK-Homologien gefunden (JHs 1-7, siehe Abbildung 2), deren Funktion bislang unklar ist (Yamaoka, Saharinen et al. 2004). Die N-Termini der JAKs sind relativ unterschiedlich. Sie ermöglichen die Bindung an Zytokinrezeptoren (Frank, Gilliland et al. 1994; Frank, Yi et al. 1995; Zhao, Wagner et al. 1995;

Chen, Cheng et al. 1997; Kohlhuber, Rogers et al. 1997). Für viele Zytokine ist bekannt, welche JAKs und STATs sie aktivieren. Der durch IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  vermittelte Signalweg benötigt JAK1 und TYK2, IFN- $\gamma$  dahingegen JAK1 und JAK2 (Velazquez, Fellous et al. 1992; Muller, Briscoe et al. 1993; Silvennoinen, Ihle et al. 1993; Watling, Guschin et al. 1993). Einen kurzen Überblick über die jeweils am JAK/STAT-Signaltransduktionsweg beteiligten Proteine gibt Tabelle 1.

*Tabelle 1: JAKs und STATs, die von Zytokinen aktiviert werden (modifiziert nach Leonard und O'Shea 1998).*

<u>Typ I Zytokine</u>	<u>JAKs</u>	<u>STATs</u>
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	JAK1, JAK3	STAT5a, STAT5b, STAT3
IL-4	JAK1, JAK3	STAT6
IL-3, IL-5, GM-CSF	JAK2	STAT5a, STAT5b
IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1	JAK1, JAK2, TYK2	STAT3
Wachstumshormon	JAK2	STAT5a, STAT5b, STAT3
Prolaktin, Erythropoietin, Thrombopoietin	JAK2	STAT5a, STAT5b
IL-13	JAK1, JAK2, TYK2	STAT6
IL-12	JAK2, TYK2	STAT4
Leptin		STAT3
<u>Typ II Zytokine</u>		
<i>Interferone</i>		
IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$	JAK1, TYK2	STAT1, STAT2
IFN- $\gamma$	JAK1, JAK2	STAT1
IL-10 (kein Interferon)	JAK1, TYK2	STAT3

### 1.3.2. Die Familie der "Signal transducers and activators of transcription" (STATs)

Bislang sind sieben Mitglieder der STAT-Familie bekannt: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Aaronson und Horvath 2002). STATs müssen sechs essenzielle Funktionen erfüllen: (1) die Funktion, an phosphorylierte Tyrosine zu binden, (2) selbst tyrosin-phosphoryliert zu werden, (3) zu dimerisieren, (4) in den Zellkern zu translozieren, (5) an DNA zu binden und (6) die Genexpression zu modulieren. Die strukturelle Basis für einige dieser Funktionen ist eindeutig: so kommt die Fähigkeit zur Bindung an phosphorylierte Tyrosine durch eine SH2-Domäne zu Stande, wobei die Variabilität dieser Domäne zur Spezifität der Signaltransduktion beiträgt. Außerdem ist eine spezifische Domäne bekannt, die selbst Tyrosinkinaseaktivität aufweist und die Dimerisation bewirkt. Weiterhin existieren eine Sequenz-spezifische DNA-Bindungsdomäne (Ehret, Reichenbach et al. 2001), die an ein bestimmtes Motiv (TTCNNNGAA) der DNA der Zielzelle bindet („Konsens-Bindungsstelle“, siehe Abbildung 3 und 4). Desweiteren gibt es eine C-terminale Domäne für die Aktivierung der Transkription (TAD= transcriptional activation domain) und verschiedene Regionen, die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind (Horvath 2000).

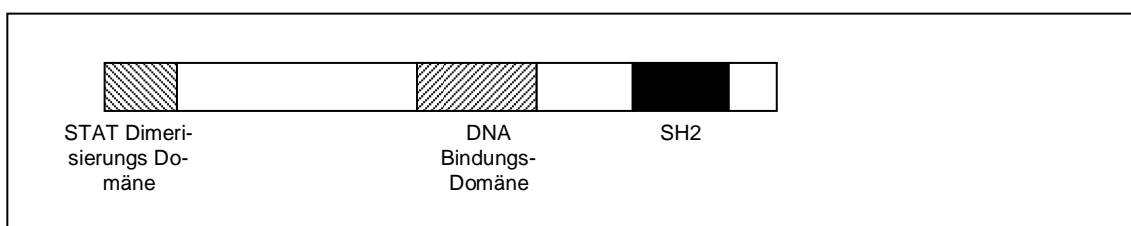


Abbildung 3: Struktur der STATs.

STAT Proteine sind als Transkriptionsfaktoren in inaktivem Zustand als Teil von Protein-Komplexen mit hohem Molekulargewicht im Zytoplasma der unstimulierten Zielzellen lokalisiert. Nach ihrer Aktivierung formen die meisten STAT Proteine (außer STAT2) Homodimere, manchmal auch Heterodimere (z.B. STAT1 und STAT2 nach Aktivierung durch IFN- $\alpha$ ). Die jeweilige Art der Dimerisierung



hängt von der Spezifität der SH2-Domäne und von der Mikroumgebung des phosphorylierten Tyrosins ab.

### *1.3.3. Funktionsweise des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges*

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg stellt eine Möglichkeit dar, extrazelluläre Signale zum Zellkern zu übertragen und dort eine Veränderung der Genexpression zu bewirken (siehe Abbildung 4).

Nach Bindung des Liganden bilden Zytokinrezeptoren Homo- oder Heterodimere, wobei auch schon die Dimerisierung von Zytokinrezeptor-Untereinheiten ausreicht, die Signalübertragung in Gang zu setzen (de Vos, Ultsch et al. 1992; Nakamura, Russell et al. 1994; Walter, Windsor et al. 1995). Die anschließende Dimerisierung der Rezeptor-assoziierten Janus Kinasen bewirkt die Tyrosinphosphorylierung des Zytokin-Rezeptors (Leonard und O'Shea 1998).

Die durch die JAKs phosphorylierten Tyrosinreste stellen Bindungsstellen für STATs dar. Nach Aktivierung von Oberflächenrezeptoren werden diese aus dem Zytosol mobilisiert und binden an die Rezeptoren, wo sie tyrosinphosphoryliert werden. Dies bedingt die Ablösung vom Rezeptor, Homo- oder Heterodimerisierung und Translokation in den Nukleus.

Nur die dimerisierte Form der STATs ist in der Lage, in den Zellkern zu translozieren, wo die Expression von Zielgenen moduliert wird. Wahrscheinlich wird diese Translokation bewirkt, indem durch die Dimerisierung der STATs ein „Kern Lokalisations Signal“ (=nuclear localization signal, NLS) freigelegt wird, das noch nicht näher bekannt ist. Im Kern können die Dimere in den meisten Fällen direkt an die DNA binden, wobei semipalindromische Motive (TTCNNGAA, sogenannte Konsens-Bindungsstelle, siehe Abbildung 4) erkannt werden, die „IFN- $\gamma$ -aktivierte Sequenzen“ (GAS, siehe Abbildung 4) heißen, da sie ursprünglich als die durch STAT1-Homodimere erkannten Sequenzen nach IFN- $\gamma$  Stimulation entdeckt wurden. Typ I Interferone bilden hierbei eine Ausnahme: sie benötigen zur DNA- Bindung p48 (Horvath und Darnell 1997) und erkennen ein nonpalindromisches Motiv.

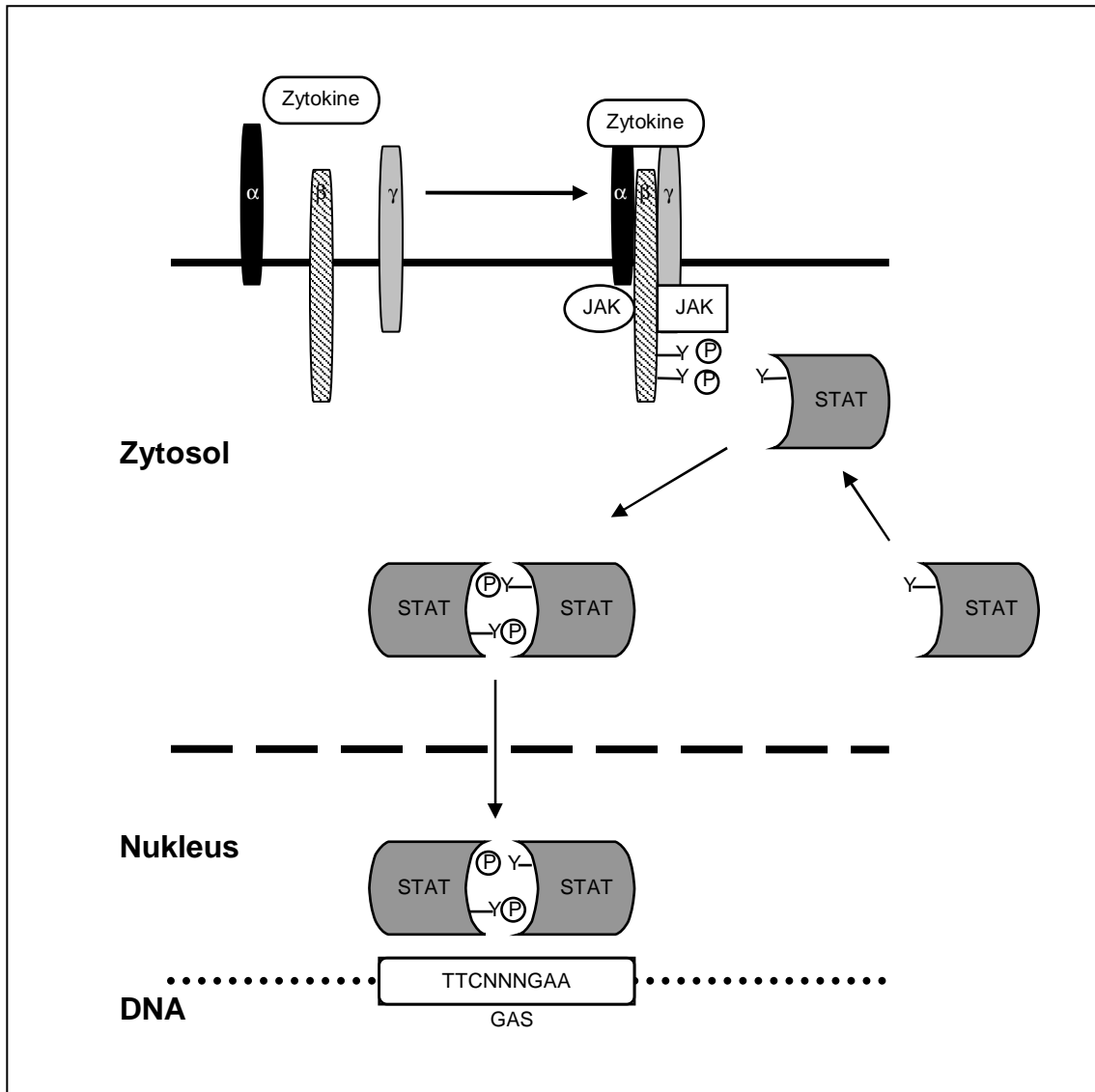


Abbildung 4: Modell der Zytokin-Signaltransduktion via JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (modifiziert nach Leonard und O'Shea 1998).

Generell können durch Transkriptionsfaktoren Zielgene entweder aktiviert oder reprimiert werden. Im Fall der STATs konnte bisher überwiegend eine Genaktivierung und vermehrte Transkription nachgewiesen werden, nur selten wurde eine Transkriptionsrepression beschrieben (Gil, Bohn et al. 2001; Ivanov, Bhoumik et al. 2001; Ramana, Gil et al. 2001). Zusätzlich zu ihrer intrinsischen transkriptionsaktivierenden Aktivität können manche STATs physisch und funktionell mit Koaktivatoren assoziieren. Dabei kann dasselbe STAT Protein mit mehreren verschiedenen Koaktivatoren assoziieren, was dazu führt, dass in unterschiedlichen Zelltypen oder Aktivierungszuständen verschiedene Gene in

ihrer Expression beeinflusst werden können, je nachdem, welcher Koaktivator exprimiert ist.

Wird die STAT-Aktivität nicht mehr benötigt, so stehen verschiedene Mechanismen zur Deaktivierung zur Verfügung. So kann durch Dephosphorylierung die Dimerisierung rückgängig gemacht und die DNA-Bindung gelöst werden (Haspel, Salditt-Georgieff et al. 1996). Weiterhin wird zumindest STAT1 durch eine Ubiquitin/ Proteasom- vermittelte Degradation abgebaut (Kim und Maniatis 1996). Ebenso existieren für STAT1 zwei alternative Splicing-Formen, von denen nur die längere aktiv ist (Horvath und Darnell 1996). Wird die STAT1-Aktivität nicht mehr benötigt, so wird vermehrt die kürzere und damit inaktive Variante produziert. Ausserdem kann die durch Zytokin-Stimulation ausgelöste katalytische Aktivität der JAK Proteine durch verschiedene Proteine inhibiert werden. Hierzu zählen „suppressors of cytokine signal-1“ (SOCSs-1), „JAK-binding protein“ (JABs) und „STAT-induced STAT inhibitor-1“ (SSIs-1) (Endo, Masuhara et al. 1997; Naka, Narazaki et al. 1997; Starr, Willson et al. 1997). Durch sie können STAT-abhängige Signale sowohl direkt inhibiert, als auch im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert werden. Zusätzlich können sogenannte „protein inhibitors of activated STATs“ (PIAs) an aktive STAT-Dimere binden, wodurch eine DNA-Erkennung verhindert wird (Shuai 2000).

Die Funktion des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges im menschlichen Organismus ist vielfältig, eine Vielzahl verschiedener Gene wird durch STAT Proteine reguliert (Ouchi, Lee et al. 2000; Zhang und Darnell 2001). Allgemein dient der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg der Zellkommunikation bei Proliferation, Differenzierung sowie der immunologischen Abwehr von Pathogenen.

Da viele bei der akuten Pankreatitis eine Rolle spielende Zyto- und Chemokine sowie viele Akutphaseproteine in vielen Zelltypen über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg ihre Wirkung ausüben, ist es Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob die an der immunologischen Reaktion beteiligten Zytokine mittels dieses Signaltransduktionsweges auch eine direkte Wirkung auf Pankreasazinuszellen ausüben können.

#### 1.4. Fragestellung

Die Bedeutung der immunologischen Reaktion für den Schweregrad der Organschädigung sowie die systemischen Auswirkungen im Rahmen der akuten Pankreatitis ist inzwischen gut belegt (Gross, Leser et al. 1993; James H. Grendell 1997; Norman 1998; Bhatia, Brady et al. 2000; Mayer, Rau et al. 2000; Gomez-Cambronero, Sabater et al. 2002). Intrapankreatische Zytokine können zum einen von einwandernden Immunzellen sezerniert werden, zum anderen sind aber auch die Azinuszellen selbst fähig, Chemo- und andere Zytokine zu exprimieren. Nicht geklärt ist hingegen bis jetzt, ob Azinuszellen auch direkt auf Zytokine reagieren können. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, um hierdurch den Einfluss der immunologischen Reaktion direkt auf die Azinuszellen besser zu verstehen.

In orientierenden Vorversuchen wurde die Expression verschiedener JAK- und STAT-Proteine in Azinuszellen im Rattenmodell untersucht. Hierbei ergaben sich Hinweise auf das Vorkommen dieser Proteine, so dass folgende Aufgabenstellung zu bearbeiten war:

1. Welche Proteine aus der Familie der JAKs bzw. STATs werden in Pankreasazinuszellen konstitutiv exprimiert?
2. Sind die STAT-Proteine im Pankreas aktivierbar (i.e. phosphorylierbar)? Falls ja, wie?
  - a) Durch physiologische Stimuli (z.B. Sekretagoga)?
  - b) Durch Stress?
3. Ist der Stimulationsmechanismus vergleichbar mit dem anderer Organe (sind also JAKs an der Signaltransduktionskette beteiligt)?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Materialien und Tiere

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die verwendeten Materialien dem Text in Materiallisten vorangestellt, wobei eine Unterteilung in allgemein benutzte und speziell für die jeweiligen Methoden benötigte Materialien erfolgt.

#### 2.1.1. Allgemeine Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Benzamidin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Brij® 30% w/v	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim, Deutschland
CaCl	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Collagenase P	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim, Deutschland
EGTA	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glucose	Sigma, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerolphosphat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma, Steinheim, Deutschland
Isofluran „Forene®“	Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen, Deutschland
KCl	Sigma, Steinheim, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Sigma, Steinheim, Deutschland
NaCl	Sigma, Steinheim, Deutschland
NaF	Sigma, Steinheim, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma, Steinheim, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma, Steinheim, Deutschland

NaOH	Sigma, Steinheim, Deutschland
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma, Steinheim, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail-Set I	Calbiochem, La Jolla, Californien
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
TrisBase	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin-Inhibitor	Sigma, Steinheim, Deutschland

### 2.1.2. Allgemeine Puffer und Lösungen

<i>HEPES-Ringer-Puffer (HRB):</i>	<p>400 mg Glucose  4 ml nicht essentielle Aminosäuren  4 ml Glutamin  10,8 ml NaCl  0,5 ml MgCl<sub>2</sub>  1,0 ml KCl  1,0 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  20 ml HEPES  0,5 ml CaCl<sub>2</sub>  Aqua dest. ad 200 ml  pH-Titration auf pH 7,45 – 7,48</p>
<i>Inkubationslösung:</i>	<p>150 ml HRB  150 mg BSA  15 mg Trypsin-Inhibitor  430mg Glycerolphosphat</p>
<i>Lysispuffer mit Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren:</i>	<p>8mg Benzamidin  50 µl Brij 35, 30% Lsg.  2,5 ml Glycerol  0,5 ml EGTA (100 mM)  0,5 ml Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (200 mM)  0,5 ml NaF (100 mM)  50 µl DTT (1 M)  50 µl β-Mercaptoethanol  500 µl Protease-Inhibitor-Cocktail  PBS pH 7,4 ad 50 ml</p>

<i>Lysispuffer mit Phosphatase- und ohne Protease-Inhibitor-Cocktail</i>	s.o., außer 500 µl Protease-Inhibitor-Cocktail
<i>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):</i>	8 g NaCl 0,2 g KCl 2,68 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 240 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Aqua dest. ad 1000 ml pH-Titration auf pH 7,4
<i>Sodiumdodecylsulfat-Puffer (SDS-Puffer):</i>	3,03 g TRIS Base 14,4 g Glycin 1 g SDS 100 ml β-Mercaptoethanol Aqua dest. ad 1000 ml

### 2.1.3. Allgemeine technische Geräte und sonstige Materialien

Analysenwaage	Satorius, Göttingen, Deutschland
Blot Kammer	BioRad, München, Deutschland
Einmal-Küvetten, UV	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Kreisrüttler Rocky 3D	Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland
Hyperfilm™ ECL™	Amersham Phamacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Isofluran Vaporator	Dräger, Lübeck, Deutschland
Kanülen, 27G	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
MiniSpin Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer RCTbasic	IKA Werke, Staufen, Deutschland
Minigelapparatur	BioRad, München, Deutschland
Nitrocellulosemembran „Protran“	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
pH Meter InoLab pH Level 1	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Supply	Amersham Phamacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Sonoplus Bandelin HD 2070	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Überkoprotator	Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland

Ultrospec 3100 pro	Amersham Phamacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Vortex Mixer 2020	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 541712	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### 2.1.4. Spezielle Chemikalien, Puffer, Lösungen und Geräte

- *Materialien für die Läppchen- und Azinuszellpräparation*

<i>Krebs-Ringer-Puffer (KRB):</i>	400 mg Glucose 2 ml nicht essentielle Aminosäuren 2 ml Glutamin 4,65 ml NaCl 0,5 ml MgCl <sub>2</sub> 0,5 ml KCl 0,5 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6,5 ml NaHCO <sub>3</sub> 0,1 ml CaCl <sub>2</sub> Aqua dest. ad 100 ml pH-Titration auf pH 7,35 – 7,4
<i>Kollagenase-Lösung:</i>	10 ml KRB 25 mg BSA 3000 U Kollagenase
<i>Wasch-Lösung:</i>	10 ml KRB 100 mg BSA 1 mg Trypsin-Inhibitor
<i>Sedimentationslösung:</i>	50 ml KRB 2g BSA 5 mg Trypsin-Inhibitor



- *Materialien für die Behandlung der Lämpchen und Azini mit IFN- $\gamma$ , IL-6, EGF, TNF- $\alpha$ , CCK und AG-490*

Tyrphostin AG-490	Calbiochem, La Jolla, Californien
CCK	Research Plus, Manasquan, New Jersey
EGF	Pepro Tech EC, Ltd., London, UK
IFN- $\gamma$	Pepro Tech EC, Ltd., London, UK
IL-6	Pepro Tech EC, Ltd., London, UK
TNF- $\alpha$	Pepro Tech EC, Ltd., London, UK

- *Materialien für die Immunpräzipitation*

Anti-JAK1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-JAK2-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Protein A Agarose Beads	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

- *Materialien für Sodiumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blotting*

Anti-JAK1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-JAK2-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-TYK2-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-STAT1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-STAT2-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-STAT3-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-STAT4-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-STAT5-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien

Anti-STAT6-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-phospho-STAT1-(pTyr701)-Antikörper	Upstate Biotechnology, Waltham, Massachusetts
Anti-phospho-STAT3-(pTyr705)-Antikörper	Upstate Biotechnology, Waltham, Massachusetts
Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper vom Schaf	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper vom Schaf	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
PAA-Lösung (Acr-Bis)	BioRad, München, Deutschland
Protein Standard broad range	BioRad, München, Deutschland
Protein Standard low range	BioRad, München, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, München, Deutschland
Top Block	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Trockenmilchpulver	BioRad, München, Deutschland
TrisHCl	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tween®20	Sigma, Steinheim, Deutschland
<i>Laemmli-Puffer:</i>	0,2 M Tris HCl (pH 6,8) 8% SDS 10% $\beta$ -Mercaptoethanol 0,2% Bromphenolblau 40% Glycerol
<i>Trenngelpuffer:</i>	45,4 g TRIS Base 1 g SDS Aqua dest. ad 250 ml pH-Titration auf pH 8,8
<i>Sammelgelpuffer:</i>	15,14 g TRIS Base 1g SDS Aqua dest. ad 250 ml pH-Titration auf pH 6,8

<i>Laufpuffer:</i>	3,03 g TRIS Base 14,4 g Glycin 1 g SDS Aqua dest. ad 1000 ml
<i>Transfer-Puffer:</i>	3 g TRIS Base 14,41 g Glycin 3 g SDS 200 ml Methanol Aqua dest. ad 1000 ml
<i>Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween®20 (TBS-T):</i>	2,41 g TRIS Base 8,0 g NaCl Aqua dest. ad 1000 ml pH-Titration auf pH 7,6 1,5 ml Tween®20
<i>Blocking-Lösung:</i>	TBS-T 5% Top Block / Non-Fat Dry Milk
<i>Waschlösung:</i>	TBS-T 2% Top Block / Non-Fat Dry Milk
<i>Trenngel 10%:</i>	4 ml Trenngelpuffer 6,7 ml Aqua dest. 5,3 ml PAA-Lösung (30%) 75 µl APS (10%) 37,5 µl TEMED
<i>Sammelgel:</i>	1,25 ml Sammelgelpuffer 2,95 ml Aqua dest. 0,8 ml PAA-Lösung (30%) 30 µl APS (10%) 10 µl TEMED
<i>Stripping-Puffer:</i>	100 ml TrisHCl (62,5 mM, pH 6,7) 2 g SDS 704 µl β-Mercaptoethanol

▪ *Materialien für die Immunhistochemie*

IFN- $\gamma$	Pepro Tech EC, Ltd., London, UK
Formaldehyd	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Paraffin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Xylen	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Target Retrieval Solution	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Anti-STAT1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Anti-phospho-STAT1- (pTyr701-) Antikörper	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
PicTure-Anti-Maus-Sekundärantikörper	Zymed Laboratories, South San Francisco, Californien
AEC-Lösung	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.5. *Tiere*

Für die Präparation von Lämpchen und isolierten Azinuszellen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 150 – 220 g verwendet. Die Tiere wurden in vollklimatisierten Ställen mit einem konstanten 12 h Licht-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter und entsprechend den Bedingungen des Tierschutzgesetzes gehalten. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (AZ: 211-2531-34/2001) und entsprechend den Bedingungen des Tierschutzgesetzes (BGB1 S. 1105 vom 25.05.1998) durchgeführt.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Läppchen- und Azinuszellpreparation

Nach Dekapitation unter Isofluran-Narkose wurde das Ratten-Pankreas unter Entfernung anhangenden Fettgewebes entnommen und während der weiteren Verarbeitung in isotonischer Kochsalzlösung auf Eis gelagert.

Zur Gewinnung von Läppchen wurde das Organ sofort in ca. 2 x 2 mm große Fragmente geteilt. Die Fragmente wurden anschließend ohne weitere Verzögerung in Inkubationslösung inkubiert, wobei pro Probe ca. 5 Fragmente verwendet wurden, um eine ausreichende Menge Protein zu erhalten.

Die Gewinnung von Azinuszellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von J.A. Williams (Williams, Korc et al. 1978) und unter Verwendung von Plastikmaterial aus Polycarbonat (PC), da Vorversuche ergeben hatten, dass Kontakt mit Glas die Azinuszellen stark beschädigt.

Zum Verdau wurde hierbei mit einer 27 G Kanüle Kollagenase-Lösung in das Organ injiziert, bis sich die einzelnen Pankreas-Läppchen klar voneinander separierten. Anschließend wurde das Gewebe in einem 25 ml Erlenmeyer-PC-Kolben für 30-40 min bei 37°C im Wasserbad gerüttelt (120/min), wobei nach 10 min das Medium einmalig gewechselt wurde. Das so verdaute Gewebe wurde mit Hilfe von Pipetten mit absteigend großen Ansaugöffnungen ( $\varnothing$  3 mm- 0,9 mm) mechanisch zu einer Gewebe-Zell-Suspension homogenisiert, die durch ein angefeuchtetes Nylonnetz mit einer Maschengröße von 150  $\mu$ m filtriert und mit Waschlösung nachgespült wurde. Im Anschluss wurden die Azinuszellen über einen Albumingradienten dreimal gewaschen, wobei der Sedimentations-Überstand jeweils verworfen wurde, und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei 37°C in Inkubationslösung inkubiert.

### *2.2.2. Behandlung der Läppchen und Azini mit IFN- $\gamma$ , IL-6, EGF, TNF- $\alpha$ und CCK*

Die Präparation der Pankreasläppchen allein führte zu keiner signifikanten STAT1-Phosphorylierung, so dass die Stimulation mit den verschiedenen Substanzen direkt im Anschluss an die Präparation durchgeführt werden konnte. STAT3 hingegen war nach der Pankreasexplantation spontan phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung auch nach 8 h nicht reversibel war.

Vor der Stimulation der Pankreas-Azinuszellen wurden diese für 8 h in Inkubationslösung bei 37°C unter stündlicher Begasung mit O<sub>2</sub> inkubiert, um die durch die Isolationsprozedur hervorgerufene reversible STAT1-Phosphorylierung rückgängig zu machen.

Für die Stimulationsversuche wurden die Läppchen bzw. Azinuszellen bei 37°C in Inkubationslösung mit den jeweils im Text angegebenen Konzentrationen CCK, EGF, IFN- $\gamma$ , IL-6 oder TNF- $\alpha$  für die angegebenen Zeitspannen inkubiert.

### *2.2.3. Vorbehandlung der Läppchen und Azini mit AG-490*

Die Pankreasläppchen wurden für 1 h in Inkubationslösung mit verschiedenen Konzentrationen AG-490 präinkubiert. AG-490 wurde in DMSO aufgelöst, wobei die höchste DMSO-Konzentration in den Proben 0,6% betrug. Zur Abschätzung potentiell toxischer Effekte im Rahmen dieser DMSO-Konzentration wurde eine Kontrollprobe mit 0,6% DMSO ohne AG-490 inkubiert. Nach der Präinkubation wurden die Läppchen mit 300 U/ml IFN- $\gamma$  für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben für SDS-PAGE und Western-Blotting vorbereitet.

### *2.2.4. Immunpräzipitation*

Zuerst wurden Protein A Agarose Beads in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit Lysispuffer ohne Protease-Inhibitoren gewaschen, um Ethanolruckstande zu entfernen. Nach der Gewinnung von Pankreasläppchen bzw. Azinuszellen (Ab-

schnitt 2.2.1) wurde das Material in eiskaltem Lysispuffer sonifiziert. Die Protein-Konzentration wurde bestimmt und auf 1 mg/ml verdünnt. Pro Probe wurden 500-1000 µl Homogenat mit 40 µl vorgewaschenen Protein A Agarose Beads vermischt und für 60 min bei 4°C im inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu vermindern. Alle Inkubationsschritte erfolgten im Überkoprotator unter ständiger Durchmischung. Die Beads wurden 1 min bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit den entsprechenden Antikörpern in einer Konzentration von 1:100 – 1:1000 für 2 h bei 4° inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit 20 µl gewaschenen Protein A Agarose Beads für 2 h bei 4°C inkubiert und daraufhin abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit Lysispuffer inklusive Protease-Inhibitoren gewaschen, in je 20 µl SDS-Puffer resuspendiert und 5 min bei 95°C gekocht. Die Immunpräzipitate wurden bis zur Weiterverarbeitung (SDS-PAGE und Western-Blotting) bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.5. SDS-PAGE und Western-Blotting

- *SDS-PAGE*

Pankreasläppchen oder Azinuszellen wurden in 500 µl bzw. 250 µl eiskaltem Lysispuffer überführt und sonifiziert. Die im Lysispuffer enthaltenen Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren sowie die konsequente Kühlung diente der Antagonisierung der aus den Pankreaslysaten freigesetzten Phosphatasen und Proteinasen. Die Sonifikate wurden im Anschluss für jeweils 15 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen. Die im klaren Überstand enthaltenen Proteine wurden nach Proteinquantifizierung in der Proteinelektrophorese aufgetrennt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode. Die Kalibriergerade wurde mit definierten BSA-Standards (0,2 – 0,8 mg/ml) angefertigt. Die Verdünnung des Reagenz und die Durchführung erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

Nach Verdünnung auf je 1 mg/ml Protein wurden die Proben in Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht, wobei durch das im Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie die hohe Temperatur Disulfidbrücken gespalten und Proteine denaturiert wurden.

Von jeder Probe wurde eine Proteinmenge von 25  $\mu$ g aufgetragen. Die Proben wurden im elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandards wurden Prestained SDS-PAGE Standards verwendet. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte für 10 min bei 100 V, dann für 50 min bei 200 V in 10%-igen SDS-Trenngelen (7,3 x 8,0 x 0,1 cm), die mit Sammelgelen überschichtet wurden.

- *Western-Blotting (Transfer)*

Unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des Mini Trans-Blot Elektroblotsystems auf eine Nitrocellulosemembran (NC) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 300 mA für 1 h.

- *Detektion*

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die NC-Membran nach erfolgtem Transfer 1 h lang bei Raumtemperatur in Blocking-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper in Waschlösung (1:1000) bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für 10 min gewaschen, bevor der gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper in Waschlösung (1:10000) zugegeben und die Membran nochmals für 1 h inkubiert wurde. Nach einem erneuten Waschzyklus wurden die jeweils nachzuweisenden Proteine durch verstärkte Chemilumineszenz nach Angabe des Herstellers detektiert. Die Filme wurden exponiert, bis die gewünschte Signalintensität erreicht war (30 sec - 10 min). Die Grösse der detektierten Proteine wurde mit Hilfe eines Protein-Standard-Markers abgeschätzt. Zusätzlich wurden Positivkontrollen für die entsprechenden Antikörper verwendet. Als Positivkontrollen kamen zur Anwendung:



Tabelle 2: verwendete Antikörper und entsprechende Positivkontrollen

<i>Antikörper</i>	<i>Positivkontrolle</i>
JAK1	Jurkat-Zelllysate
TYK2	Humanes Endothelzelllysate
STAT1	A431-Zelllysate
STAT2	K-562-Zelllysate
STAT3	A431-Zelllysate
STAT4	Zelllysate aus Rattenhoden
STAT5	Humanes Endothelzelllysate
STAT6	Jurkat-Zelllysate

▪ *Oberflächenreinigung („Stripping“) und Neutestung der Membran*

Nach der Detektion phosphorylierter STATs mit Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern wurden die Primär- und Sekundärantikörper selektiv mittels Stripping von der Membran entfernt und diese anschließend mit den korrespondierenden gesamt-STAT-Antikörpern getestet, um sicherzustellen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Hierzu wurde die Membran genau 30 min lang bei 50°C in Stripping-Puffer unter leichtem Rütteln inkubiert, da längere Inkubationsperioden auch die Proteine von der Membran gewaschen hätten. Es folgten zwei zehnmütige Waschgänge in TBS-T und eine 30 minütige Inkubation in Blocking-Lösung. Danach wurden die entsprechenden Primärantikörper und Sekundärantikörper analog obigem Protokoll verwendet.

2.2.6. *Immunhistochemie*

Pankreasgewebe wurde mit oder ohne 1000 U/ml IFN- $\gamma$  in Inkubationslösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe Formaldehyd fixiert, nach einem standardisierten Verfahren im Histomaten in Paraffin eingebettet und in dünne Schichten geschnitten. Die Immunhistochemie wurde nach

der modifizierten Methode von Krupinski (Krupinski, Slevin et al. 2003) durchgeführt. Die Paraffinschnitte des Formalin-fixierten Gewebes wurden in Xylen für 30 min entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe dehydriert. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, wurden die Schnitte für 10 min bei Raumtemperatur in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Es schloss sich ein 30 minütiges Erhitzen auf 98°C der in „Target Retrieval Solution“ schwimmenden Schnitte an. Bei Raumtemperatur wurden sie über 20 min abgekühlt und anschliessend in Tris-Puffer gewaschen. Jeder Schnitt wurde für 10 min mit 100 µl Protein-Blocking-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, bevor er für 20 h bei 4°C mit Gesamt-STAT1- bzw. Phosphotyrosin-spezifischen STAT1-Antikörpern inkubiert wurde. Bevor der Sekundärantikörper für 30 min zugefügt wurde, wurden die Schnitte mehrfach in Tris-Puffer gewaschen. Einige Kontrollschnitte wurden nur mit Sekundärantikörper markiert. Die Ergebnisse wurden visualisiert, indem die Schnitte mit AEC-Lösung bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert wurden. Zuletzt wurden die Schnitte gewaschen und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expression von JAK- und STAT-Proteinen in Pankreasazinuszellen

Zum Nachweis der Expression der einzelnen JAK- und STAT-Proteine in Pankreasazinuszellen wurden sowohl Homogenate frischer Pankreasläppchen als auch isolierte Azinuszellen mittels Western-Blot untersucht.

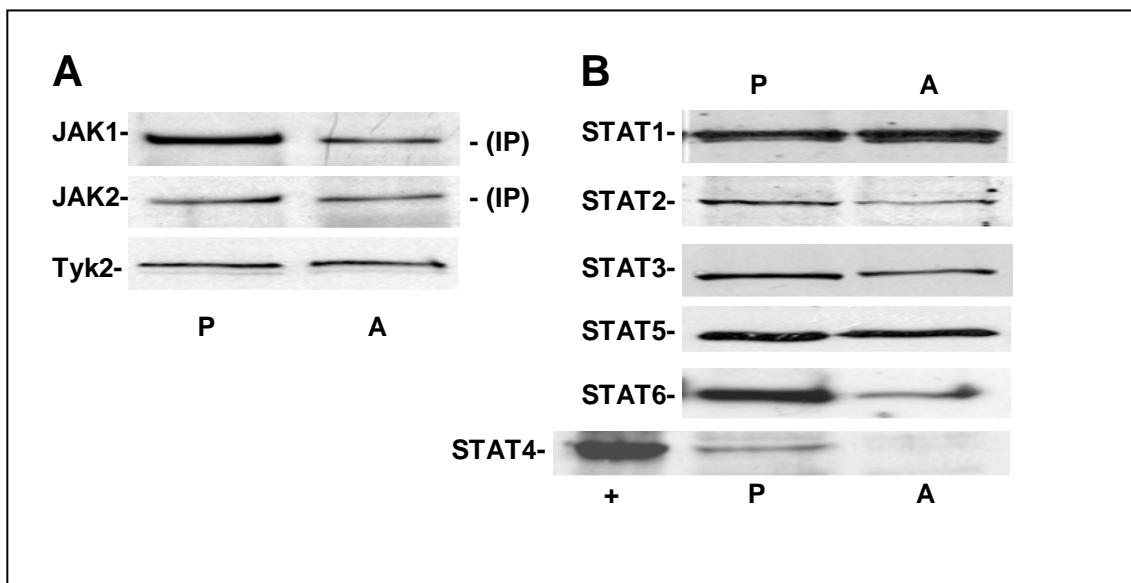


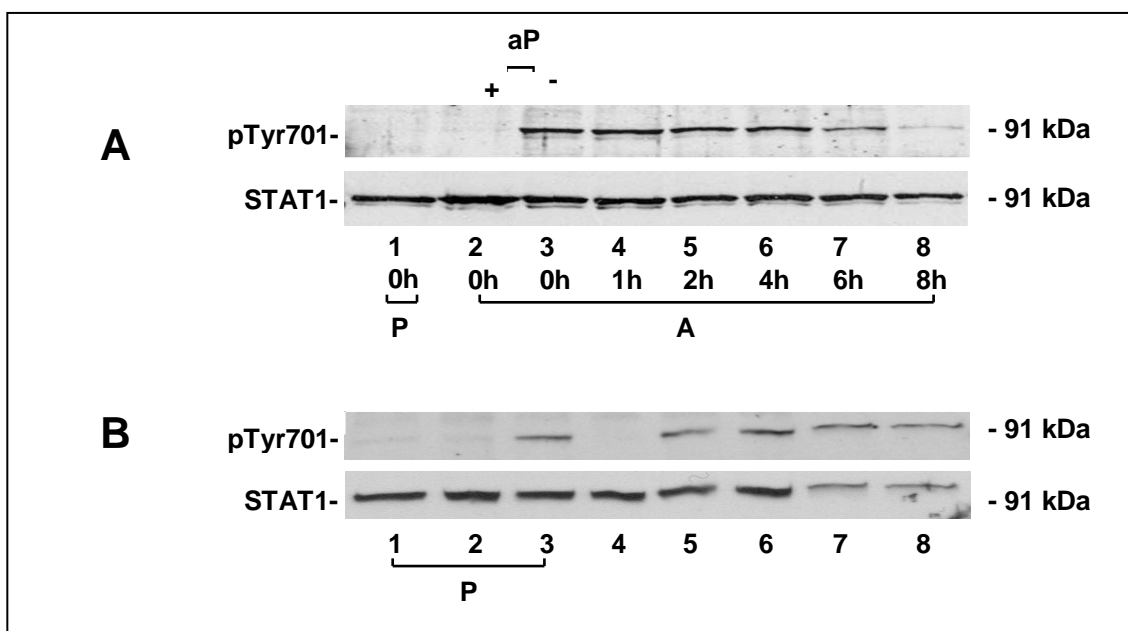
Abbildung 5: Expression von JAK- und STAT-Proteinen im Pankreas. Es wurden jeweils Proben aus Pankreasläppchen (P) sowie Azini (A) gewonnen. TYK2 und die STAT-Proteine konnten direkt nachgewiesen werden, während JAK1 und JAK2 zuvor durch Immunopräzipitation (IP) angereichert werden mussten. Für STAT4 wurde ein Lysat aus Rattenhoden als Positivkontrolle (+) benutzt.

Im Falle eines Vorliegens der entsprechenden Proteine in Pankreasläppchen sollte mit der nachfolgenden Testung isolierter Pankreasazinuszellen sichergestellt werden, dass diese die Hauptlokalisierung darstellen. JAK3 wurde aufgrund der bekannten restriktiven Expression in myeloepoetischen und lymphatischen Vorläuferzellen (Gurniak und Berg 1996) sowie negativen Ergebnissen in eigenen, orientierenden Vorversuchen nicht näher untersucht. STAT1, STAT2, STAT3, STAT5, STAT6 und TYK2 konnten direkt aus Pankreasgewebe- bzw. Azinuszellproben nachgewiesen werden, während JAK1 und JAK2 erst durch Immunpräzipitation angereichert werden mussten.

Auf jede Probestasche wurden gleiche Mengen Protein (25µg) der jeweiligen Probe aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Blotting aus dem Gel auf eine Membran transferiert und anschließend die Membranen mit einem gegen das entsprechende JAK- bzw. STAT-Protein gerichteten Antikörper gefärbt (siehe Abbildung 5). Die Signalintensität für STAT1, STAT2, STAT3 und STAT5 war sowohl in Gewebe- als auch in Azinuszellproben ähnlich stark. Das STAT6-Signal dagegen war in Azinuszell-Proben deutlich schwächer als in Proben aus Pankreashomogenat. STAT4 konnte nur schwach in Pankreasgewebe nachgewiesen werden, gar nicht hingegen in isolierten Azinuszellen. Proteinlysate aus Rattenhoden dienten als Positivkontrolle für den STAT4-Antikörper. Um Pipettierfehler auszuschließen, wurden alle Experimente mindestens drei Mal durchgeführt, wobei jeweils vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden.

### **3.2. Zellpräparationsstress induziert die STAT1-Phosphorylierung**

Zum Nachweis einer STAT1-Aktivierung im Pankreas wurden Antikörper verwendet, welche spezifisch tyrosinphosphoryliertes STAT1 erkennen (pTyr 701). Direkt nach Organexplantation gewonnene Pankreasgewebeproben zeigten keine STAT1-Phosphorylierung (siehe Abbildung 6A, Bahn 1), wohingegen isolierte Azinuszellen direkt nach der Präparationsprozedur schon deutlich phosphoryliert (siehe Abbildung 6A, Bahn 3) waren. Zum Nachweis der Spezifität des pTyr701-Antikörpers wurde eine Probe ohne Phosphatase-Inhibitoren lysiert und mit alkalischer Phosphatase (1U/1,5 µg Protein) für 30 min bei 37°C inkubiert. Hierdurch wurde das tyrosinphosphorylierte STAT1-Signal entfernt, nicht aber das gesamt-STAT1-Signal (siehe Abbildung 6A, Bahn 2). Wurde den Zellen anschließend Gelegenheit zur Regeneration gegeben, indem sie bei 37°C in HEPES Puffer inkubiert wurden, so bildete sich die STAT1-Phosphorylierung innerhalb von 8 h auf ein Niveau zurück, das an der Grenze der Nachweisbarkeit lag (siehe Abbildung 6A, 4-8). Somit ist der Effekt der Präparationsstress-bedingten STAT1-Phosphorylierung reversibel.



**Abbildung 6:** Der Zellpräparationsstress induziert die reversible Phosphorylierung von STAT1. **A:** Die gezeigten Proben entsprechen: direkt nach Explantation des Organs gewonnenes Pankreashomogenat (1), isolierte Azinuszellen nach Inkubation für die jeweils vermerkten Zeitperioden (0-8 h). Eine Azinuszellprobe wurde direkt nach ihrer Präparation (0 h) für 30 min bei 37°C mit alkalischer Phosphatase verdaut (aP) (2).

**B:** Nach jedem Schritt der Azinuspräparationsprozedur wurde eine Probe abgenommen und weiterverarbeitet. Die folgenden Proben wurden entnommen: direkt nach Pankreasentnahme (1), auf Eis mitgeführtes Pankreasläppchen (2), bei Zimmertemperatur mitgeführtes Pankreasläppchen (3), nach Kollagenaseeinspritzung (4), nach Inkubation bei 37°C unter Rütteln im Wasserbad (5), nach mechanischer Zerkleinerung (6), nach Filtration durch ein Nylon-Netz (7), nach Zentrifugation über einen Albumingradienten (8).

Im nächsten Schritt wurde bestimmt, welcher Teil der Präparationsprozedur hauptsächlich zur Phosphorylierung von STAT1 beiträgt. Hierzu wurden nach jedem einzelnen Präparationsschritt Proben abgenommen und sofort weiterverarbeitet (siehe Abbildung 6B und Tabelle 3).

Tabelle 3: Schritte der Azinuszell-Isolationsprozedur

Nr:	Vorgang:
1	Pankreasexplantation (s. Abb. 6A und B, Bahn 1)
2	Kollagenase-Injektion (s. Abb. 6B, Bahn 4)
3	Inkubation unter Rütteln im 37°C warmen Wasserbad für 20 min (s. Abb. 6B, Bahn 5)
4	mechanische Zerkleinerung des Organs (s. Abb. 6B, Bahn 6)
5	Filtration des Homogenats durch ein Nylon-Netz (s. Abb. 6B, Bahn 7)
6	Zentrifugation der Azinuszellen über einen Albumingradienten (s. Abb. 6B, Bahn 8)

Die Pankreasexplantation hatte noch keinen Effekt auf die STAT1-Phosphorylierung (siehe Abbildung 6B, Bahn 1). Eine direkt nach Pankreasentnahme während der Präparationsprozedur auf Eis mitgeführte Probe zeigte ebenso wenig eine STAT1-Phosphorylierung (siehe Abbildung 6B, Bahn 2), während ein Mitführen der Probe bei jeweils in der Azinuszellisolationsprozedur erforderlicher Temperatur bereits zu einer deutlichen STAT1-Phosphorylierung führte (siehe Abbildung 6B, Bahn 3). Während Schritt 2 der Azinuszell-Isolationsprozedur noch keine STAT1-Phosphorylierung bewirkte (siehe Abbildung 6B, Bahn 4), zeigte sich ab Schritt 3 eine zunehmende STAT1-Phosphorylierung (siehe Abbildung 6B, Bahn 5), die während der folgenden Präparationsschritte (siehe Abbildung 6B, Bahnen 6-8) kontinuierlich zunahm. Zum Nachweis, dass in allen Proben vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Oberflächen aller Membranen gereinigt und mit einem pan-STAT1-Antikörper erneut gefärbt (siehe Abbildung 5B, unterer Teil).

Beruhend auf diesen Ergebnissen wurden die folgenden Experimente z.T. in Pankreasläppchen durchgeführt, da bereits gezeigt worden ist, dass die jeweiligen STATs in den Azinuszellen lokalisiert sind. Zusätzlich erforderte die Präparation der Pankreasläppchen weniger Aufwand als die der Azinuszellen und rief keine Phosphorylierung der STATs hervor. Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche beschränken sich im Folgenden auf STAT1 und STAT3, da diese

beiden STAT-Proteine in zwei der Haupt-Stresssignalübertragungswege involviert sind. So aktiviert IFN- $\gamma$  STAT1, während IL-6 STAT3 phosphoryliert (Ahmed und Ivashkiv 2000; Bhatia, Brady et al. 2000; Ortmann, Cheng et al. 2000; El-Hashemite und Kwiatkowski 2005).

### **3.3. Behandlung mit IFN- $\gamma$ induziert die STAT1-Phosphorylierung**

Zur Untersuchung der STAT1-Phosphorylierung nach physiologischer Stimulation im Pankreas wurden Stimulationsreihen mit IFN- $\gamma$  durchgeführt, da IFN- $\gamma$  in vielen Zellarten ein klassischer Aktivator von STAT1 ist und einen gut beschriebenen JAK/STAT-Signaltransduktionsweg initiiert, der über JAK1 und JAK2 zu STAT1 führt (Darnell, Kerr et al. 1994). Um auszuschließen, dass die Stimulationsergebnisse in Pankreasläppchen auf extraazinäre STAT Expression zurückzuführen sind, wurden zusätzlich ähnliche Experimente in isolierten Azinuszellen durchgeführt.

Pankreasläppchen wurden direkt nach ihrer Präparation bei 37°C in HEPES Puffer mit verschiedenen Konzentrationen IFN- $\gamma$  für verschiedene Zeitintervalle inkubiert (siehe Abbildung 7A), da Vorversuche gezeigt hatten, dass es durch die Präparation zu keiner nennenswerten STAT1-Phosphorylierung kommt. Zum Nachweis, dass in allen Proben vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Oberflächen aller Membranen gereinigt und mit einem pan-STAT1-Antikörper erneut gefärbt. (siehe Abbildung 7A, unterer Teil).

Es konnte gezeigt werden, dass alleinige Inkubation der Pankreasläppchen bei 37°C ohne IFN- $\gamma$  zu keiner STAT1-Phosphorylierung führte (Abbildung 7A, Bahnen 2 und 6), während nach einer Inkubationszeit von 30 min bei jeder der verwendeten Interferonkonzentrationen eine deutliche STAT1-Phosphorylierung zu beobachten war (Abbildung 7A, Bahnen 3-5 und 7-9).

Für die Stimulation frisch präparierter Azinuszellen wurden diese für 8 h bei 37°C unter stündlicher Sauerstoffbegasung in HEPES Puffer präinkubiert, um die stressinduzierte STAT1-Phosphorylierung zu minimieren (siehe Abbildung 7B, Bahn 2 oben und unten). Anschließend wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert.

Zum Nachweis, dass in allen Proben vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Oberflächen aller Membranen gereinigt und mit einem pan-STAT1-Antikörper erneut gefärbt (siehe Abbildung 7B, jeweils unterer Teil).

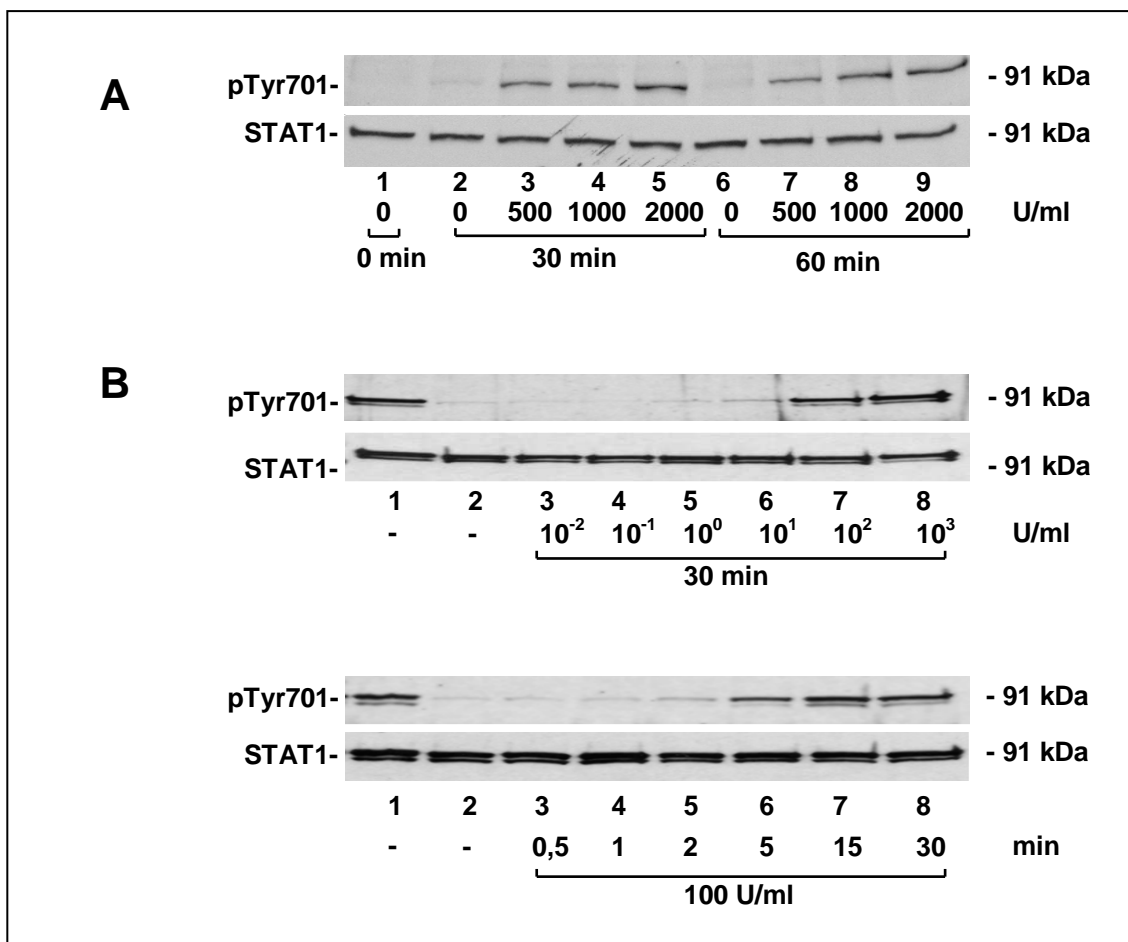


Abbildung 7: IFN- $\gamma$  induziert zeit- und konzentrationsabhängig die STAT1-Phosphorylierung. A: Abgebildet sind: unstimulierte Pankreasläppchen sofort nach Lläppchenpräparation (1) und nach Inkubation bei 37°C mit IFN- $\gamma$  in den angegebenen Konzentrationen für die angegebenen Zeitintervalle (2-9).

B: Pankreasazinuszellen wurden präpariert und für 8 h unter stündlicher O<sub>2</sub>-Begasung in HEPES Puffer bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  entweder für eine Zeitspanne von 30 min (oben) mit den vermerkten Konzentration IFN- $\gamma$  (oben, 3-8), oder mit IFN- $\gamma$  in einer Konzentration von 100 U/ml (unten) für die vermerkten Zeitspannen (unten, 3-8) inkubiert. Kontrollproben ohne Behandlung mit IFN- $\gamma$  dienten zum Nachweise eines Rückgangs der stressinduzierten STAT1-Phosphorylierung und wurden direkt nach der Präparation (oben und unten, 1) sowie nach achtstündiger Inkubation bei 37°C (oben und unten, 2) gewonnen.

Phosphorylierung von STAT1 war bei einer Inkubationsperiode von 30 min ab IFN- $\gamma$ -Konzentrationen von 10 U/ml erkennbar und zeigte eine dosisabhängige Steigerung (siehe Abbildung 7B, Bahnen 6-8 oben). Nach Inkubation mit Interferon-Konzentrationen von 100 U/ml konnte eine deutliche STAT1-



Phosphorylierung beobachtet werden, die bereits nach 5 min einsetzte, nach 15 min zunahm und auch nach 30 min nicht zurückging (siehe Abbildung 7B, Bahnen 6-8 unten).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die STAT1-Phosphorylierung nach ihrem Auftreten durch Präparationsstress innerhalb von 8 h praktisch vollständig zurückgebildet und durch konsekutive Stimulation mit IFN- $\gamma$  reinduzierbar ist. Außerdem wurde gezeigt, dass die Reaktion von Pankreasazinuszellen auf IFN- $\gamma$  prompt, bereits durch physiologische Konzentrationen induzierbar (Muller, Briscoe et al. 1993; Watling, Guschin et al. 1993) und zeit- sowie konzentrationsabhängig ist.

### **3.4. AG-490 inhibiert die IFN- $\gamma$ -induzierte STAT1-Phosphorylierung**

In vielen Zellen und Geweben existiert ein gut beschriebener JAK/STAT-Signaltransduktionsweg, der über JAK1 und JAK2 zur Phosphorylierung von STAT1 führt (Darnell, Kerr et al. 1994). Wir präinkubierten Pankreasgewebe vor Stimulation mit IFN- $\gamma$  mit dem JAK2-Inhibitor Tyrphostin AG-490, um zu untersuchen, ob der in Pankreasazinuszellen durch IFN- $\gamma$  aktivierte JAK/STAT-Signaltransduktionsweg JAK2-abhängig ist, was auf einen analogen Mechanismus in diesem Gewebetyp schließen liesse. Tyrphostin AG-490 ist ein selektiver JAK2-Inhibitor (Meydan, Grunberger et al. 1996), folglich lässt sich hierdurch ermitteln, ob JAK2 an der Signaltransduktion beteiligt ist.

Da AG-490 in DMSO aufgelöst wurde und höhere DMSO-Konzentrationen abhängig vom Zelltyp toxisch sind, wurde in einer Reihe von Vorversuchen die Toxizität von DMSO auf Azinuszellen überprüft. Trypanblau-Färbung von Azini und Läppchen, vorbehandelt mit den in unseren Experimenten verwendeten Höchstkonzentrationen von 0,6% DMSO, zeigten einen nachweisbaren Einfluss auf die Zellviabilität isolierter Azinuszellen, jedoch keinen Einfluss auf die Viabilität frisch gewonnener Gewebeläppchen. Daher wurden die weiteren Versuche an Pankreasläppchen durchgeführt.

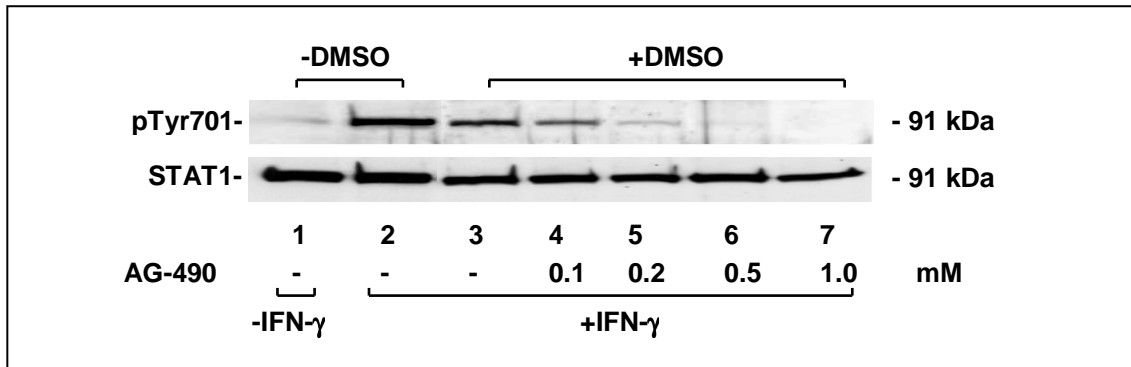


Abbildung 8: Die IFN- $\gamma$ -induzierte STAT1-Phosphorylierung wird durch AG-490 inhibiert. Pankreasläppchen wurden präpariert und für 1 h bei 37°C mit AG-490 (in DMSO gelöst) in den gezeigten Konzentrationen präinkubiert (4-7). Anschließend wurden die Lämpchen für 30 min mit 300 U/ml IFN- $\gamma$  inkubiert (2-7). Eine Kontrollprobe wurde für 1,5 h ohne IFN- $\gamma$  inkubiert, um zu zeigen, dass die Präparation und Inkubation der Lämpchen nur eine minimale STAT1-Phosphorylierung bewirkte (1). Eine weitere Kontrollprobe wurde mit 0,6% DMSO ohne AG-490 inkubiert, um die potentielle Toxizität des Lösungsmittels beurteilen zu können (3).

Die Lämpchen wurden für 1 h mit AG-490 in Konzentrationen von 100  $\mu$ M bis 1 mM präinkubiert und anschließend mit 300 U/ml IFN- $\gamma$  behandelt. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne AG-490 oder IFN- $\gamma$  für 1,5 h inkubiert, was erwartungsgemäss zu keiner STAT1-Phosphorylierung führte (siehe Abbildung 8, Bahn 1). Die durch IFN- $\gamma$  hervorgerufene STAT1-Phosphorylierung konnte durch AG-490 komplett inhibiert werden, wobei die Inhibition konzentrationsabhängig war (siehe Abbildung 8, Bahnen 4-7). Sie setzte bei einer Konzentration von 0,1 mM AG-490 ein und steigerte sich bis zu einer Konzentration von 1,0 mM. Diese Höchstdosierung AG-490 führte zu einem völligen Verschwinden des STAT1-Phosphotyrosin-Signals (siehe Abbildung 8, Bahn 7). Behandlung einer Probe mit DMSO in einer Konzentration von 0,6% ohne AG-490 (siehe Abbildung 8, Bahn 3) diente zum Ausschluss potentieller unspezifischer DMSO Effekte. Vergleicht man Bahn 2 und 3 in Abbildung 8, so könnte man meinen, dass DMSO einen geringfügigen Effekt auf die Phosphorylierung von STAT1 hat. Zwar wurde keine Densitometrie durchgeführt, um diese Vermutung endgültig zu widerlegen. Allerdings lässt sich auch ohne Densitometrie schon erkennen, dass auf Bahn 2 mehr Gesamtprotein aufgetragen wurde. Zum Nachweis, dass in allen Proben vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Oberflächen aller Membranen gereinigt und mit einem pan-STAT1-Antikörper erneut gefärbt (siehe Abbildung 8, unten).

### 3.5. Nach IFN- $\gamma$ -Behandlung wird STAT1 in den Zellkern verlagert

Die STAT-Proteine wandern nach ihrer Phosphorylierung vom Zytosol in den Zellkern, binden dort spezifische DNA-Sequenzen und regulieren dadurch die Expression von Zielgenen (Darnell 1996). Zum Nachweis der phosphorylierungs- und damit aktivierungsabhängigen nukleären Translokation von STAT1 in Pankreasazinuszellen wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen gesamt-STAT1 sowie spezifisch gegen phosphoryliertes STAT1 vorgenommen. Dadurch konnte sowohl die intrapancreatische als auch intrazelluläre Verteilung von STAT1 vor und nach Behandlung mit IFN- $\gamma$  bestimmt werden.

Schnitte unbehandelten Pankreasgewebes zeigten eine diffuse STAT1-Verteilung im Zytoplasma der Azinuszellen (siehe Abbildung 9A) (Briscoe, Guschin et al. 1996). Nach Stimulation des Pankreasgewebes mit IFN- $\gamma$  konnte STAT1 zusätzlich und akzentuiert im Zellkern nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9B). Im Gegensatz dazu zeigten die mit dem spezifischen Phosphotyrosinantikörper gefärbten Schnitte kein phosphoryliertes STAT1 in unstimuliertem Pankreasgewebe (siehe Abbildung 9C). Behandlung von Pankreasgewebe mit IFN- $\gamma$  führte zur nukleären Anreicherung (siehe Abbildung 9D). Zum Ausschluss unspezifischer Antikörper-Bindung wurden Kontrollschnitte nur mit sekundärem Antikörper gefärbt. Diese Schnitte zeigten kein Signal (in der Abbildung nicht gezeigt).

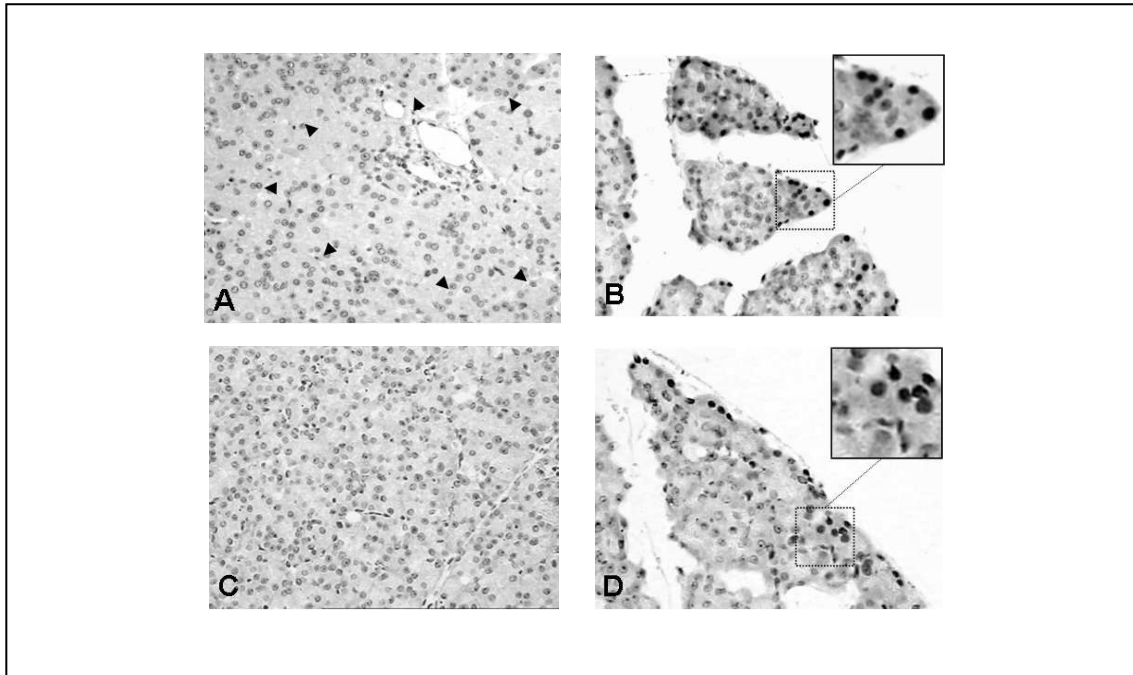


Abbildung 9: Nach Behandlung mit IFN- $\gamma$  wird STAT1 vom Zytosol in den Zellkern verlagert. Pankreasgewebeproben wurden in HEPES Puffer für 30 min mit bzw. ohne 1000 U/ml IFN- $\gamma$  inkubiert und für die Immunhistochemie präpariert. Die Gewebeschnitte wurden entweder mit einem Antikörper gegen gesamt-STAT1 (STAT1) oder spezifisch gegen tyrosinphosphoryliertes STAT1 (pTyr701) gefärbt. Abgebildet sind repräsentative Schnitte für gesamt-STAT1 vor (A) und nach (B) Behandlung mit IFN- $\gamma$  und für phosphoryliertes STAT1 vor (C) und nach (D) Behandlung mit IFN- $\gamma$ . Die Pfeile in (A) zeigen eine diffuse zytoplasmatische Färbung. Die eingefügten Bilder in (B) und (D) zeigen eine Vergrößerung des jeweils markierten Ausschnitts, um die Expression im Zellkern zu veranschaulichen.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu beachten, dass die IFN- $\gamma$ -induzierte, größtenteils randständige Färbung das erwartete Resultat dieses Experimentes darstellt und nicht als methodologisches Artefakt gewertet werden sollte: Läppcheninkubation mit IFN- $\gamma$  betrifft nur die äußeren Anteile der Läppchen, da IFN- $\gamma$  unter diesen in-vitro Bedingungen nicht tiefer in das Pankreasgewebe eindringt.

### **3.6. Durch Behandlung mit TNF- $\alpha$ , EGF oder IL-6 wird die STAT1-Phosphorylierung nicht induziert**

Die folgenden Experimente dienten dazu, den Phosphorylierungsstatus von STAT1 nach Stimulation mit einer Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu bestimmen, von denen bekannt ist, dass sie in der akuten Pankreatitis eine Rolle spielen.

Zur Vereinfachung der Experimente wurden daher die zur Dosisbestimmung und Orientierung dienenden Vorversuche in Pankreasläppchen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dann in isolierten Pankreasazinuszellen bestätigt.

Untersucht wurde die STAT1-Phosphorylierung nach Stimulation mit Epidermal Growth Factor (EGF), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Von diesen ist sowohl bekannt, dass sie bei der Entwicklung der akuten Pankreatitis eine Rolle spielen, als auch dass sie in anderen Zellarten STAT1 aktivieren können (Darnell, Kerr et al. 1994; Hemmann, Gerhartz et al. 1996; Gukovskaya, Gukovsky et al. 1997; Inagaki, Hoshino et al. 1997; Guo, Dunbar et al. 1998; Dembinski, Warzecha et al. 2000). Die Lämpchen konnten ohne signifikante Induktion von STAT1 gewonnen werden und benötigten somit keine achtstündige Präinkubation vor der eigentlichen Stimulation (siehe Abbildung 6, Bahn 1). Obwohl eine große Anzahl verschiedener Konzentrationen und Zeitintervalle zur Anwendung kamen, konnte keine STAT1-Phosphorylierung festgestellt werden (Abbildungen nicht gezeigt).

### 3.7. Pankreasentnahme führt zu lang anhaltender STAT3-Phosphorylierung

Der Aktivierungsstatus von STAT3 im Pankreasgewebe wurde mittels eines spezifischen Phosphotyrosin-Antikörpers (pTyr705) im Western-Blot getestet. Direkt nach der Organexplantation gewonnene Homogenate aus Pankreasgewebe zeigten keine konstitutive STAT3-Phosphorylierung (siehe Abbildung 10A, Bahn 1). Wurden die Proben allerdings nach der Läppchenpräparation gewonnen (siehe Abbildung 10A, Bahnen 2-6), zeigte sich eine STAT3-Phosphorylierung, die sich auch nach einer Inkubationszeit von 8 h nicht zurückbildete (das schwächere phospho-STAT3-Signal nach einer Inkubationszeit von 8 h ist auf die geringere Gesamtproteinmenge zurückzuführen).

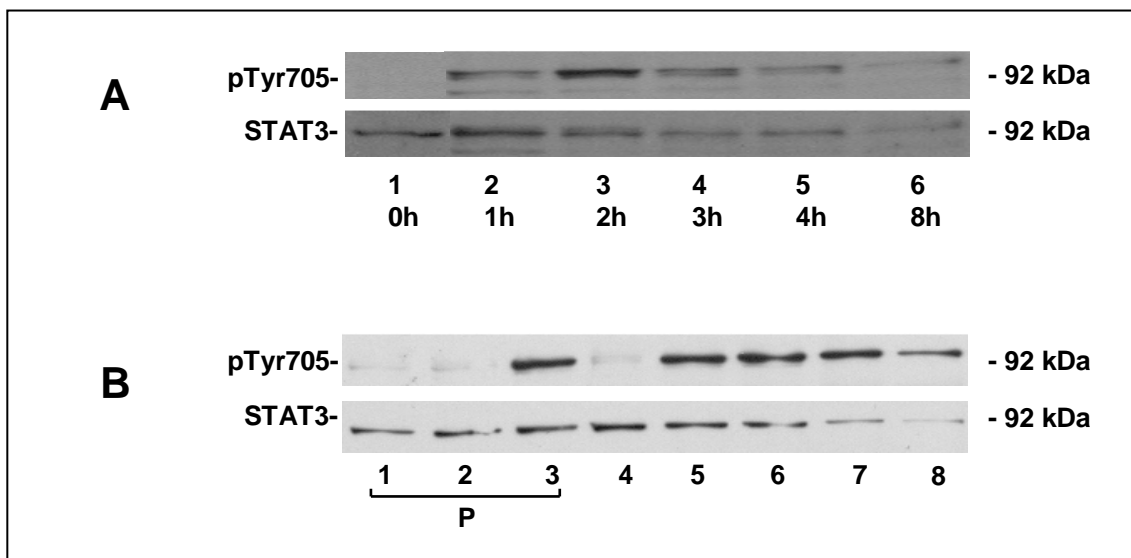


Abbildung 10: Der Läppchen- sowie Azinuspräparationsstress induziert die irreversible STAT3-Phosphorylierung.

A: Direkt nach Organexplantation wurden Läppchen präpariert. Die Proben wurden direkt nach der Läppchenpräparation (1) sowie nach 1-8 h Inkubation bei 37°C in HEPES Puffer abgenommen (2-7).

B: Nach jedem Schritt der Azinuspräparationsprozedur wurde eine Probe abgenommen und weiterverarbeitet, siehe Legende Abbildung 6B und Tabelle 2.

Ebenso wiesen isolierte Azinuszellen direkt nach der Präparationsprozedur (siehe Abbildung 10B) eine deutliche STAT3-Phosphorylierung auf, die sich auch nach einer Präinkubationszeit von 8 h bei 37°C in HEPES Puffer nicht vollständig zurückbildete (Abbildungen nicht gezeigt). Eine potentielle, später

auftretende Rückbildung konnte nicht untersucht werden, da längere Präinkubationsintervalle der isolierten Azinuszellen (>8 h) zum Absterben eines großen Teils der Zellen führte.

### **3.8. Durch Behandlung mit IFN- $\gamma$ , EGF, IL-6 oder TNF- $\alpha$ wird keine zusätzliche STAT3-Phosphorylierung induziert**

Die Stimulation der Pankreasläppchen direkt nach Gewinnung bzw. der Azinuszellen nach einer achtstündigen Präinkubationszeit mit IFN- $\gamma$ , EGF, IL-6 bzw. TNF- $\alpha$  wurde für eine Reihe verschiedener Konzentrationen über mehrere Zeitintervalle durchgeführt (Abbildungen nicht gezeigt). Behandlung mit keinem der genannten Faktoren führte zu einer nachweisbaren Verstärkung der vorhandenen, präparationsbedingten STAT3-Phosphorylierung in Pankreasläppchen bzw. in isolierten Azinuszellen nach achtstündiger Präinkubation.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass anhand der durchgeführten Experimente die Regulierung der STAT3-Aktivität im Pankreas nicht eindeutig beurteilt werden kann, da bereits sowohl die Präparation der Pankreasläppchen als auch der Azini zu einer schnellen und lang anhaltenden STAT3-Phosphorylierung führte und keines der genannten Zytokine zu einer klaren zusätzlichen Induktion der STAT3-Phosphorylierung führte.

### **3.9. Durch Behandlung mit Cholezystokinin wird die STAT1- oder STAT3- Phosphorylierung nicht induziert**

Cholezystokinin (CCK) führt in physiologischen und insbesondere in supraphysiologischen Konzentrationen zur Aktivierung verschiedener Stress-Signaltransduktionswege in Pankreasazinuszellen (Grolewski, Grady et al. 1997; Gukovsky, Gukovskaya et al. 1998; Schafer, Ross et al. 1998; Wagner, Metzler et al. 1999; Wagner, Mazzucchelli et al. 2000; Bi und Williams 2004; Gukovsky, Cheng et al. 2004). Da der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg in mehrererlei Hinsicht ebenfalls einen Stress-Signaltransduktionsweg darstellt (Gatsios, Terstegen et al. 1998; Carballo, Conde et al. 1999; Pan, Fukuda et al.

1999), sollte in einer Versuchsreihe der Aktivitätsstatus der am stärksten in Pankreasazinuszellen exprimierten STAT Proteine (STAT1 und STAT3) nach Stimulation mit CCK untersucht werden.

Die Versuche wurden sowohl in Pankreasläppchen als auch in isolierten Azinuszellen durchgeführt, wobei in Stimulationsreihen Konzentrationen im physiologischen Bereich (10, 100 pM) sowie im supraphysiologischen Bereich (1, 10, 100 nM) für 5 bzw. 30 min verwendet wurden (siehe Abbildung 11). Mit IFN- $\gamma$  behandelte Proben dienten als Positivkontrolle für STAT1 (siehe Abbildung 11A, Bahn 2, Abbildung 11B Bahn 3 und 10). Im Gegensatz zur Phosphorylierung von STAT1 durch Präparationsstress oder durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  bewirkte CCK in keiner der verwendeten Konzentrationen eine Phosphorylierung von STAT1. Ebenso wenig liess sich, soweit beurteilbar, eine Verstärkung der Hintergrundphosphorylierung von STAT3 durch CCK in Pankreasläppchen bzw. isolierten Azinuszellen nachweisen.



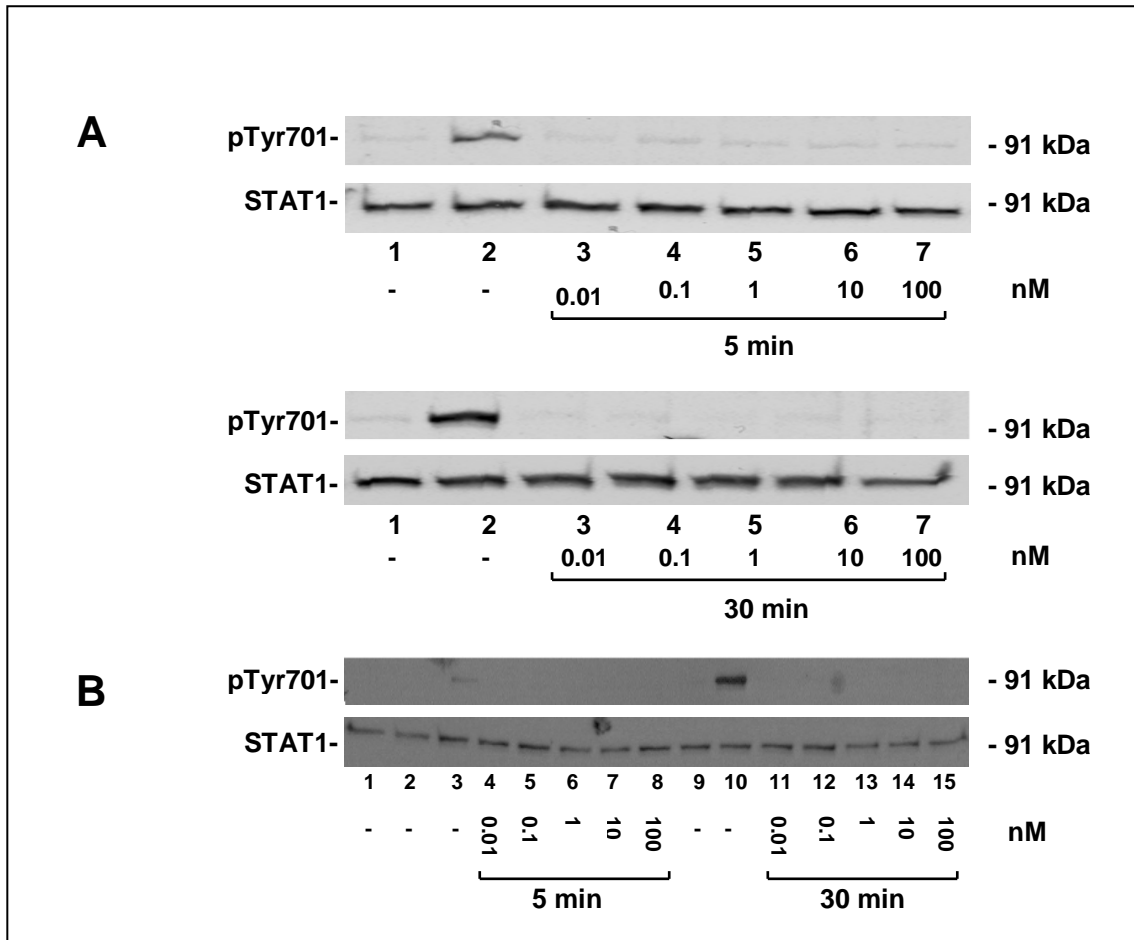


Abbildung 11: CCK induziert nicht die STAT1-Phosphorylierung. Pankreasläppchen (A) und isolierte Azinuszellen (B) wurden mit CCK in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert (A: 3-7, B: 4-8 und 11-15). Eine Probe wurde jeweils direkt nach der Organexplantation weiterverarbeitet (A 1), als Positivkontrolle dienten mit 1000 U/ml IFN- $\gamma$  stimulierte Lläppchen (A 2). Die Proben der Azinuszellstimulationsreihe entsprechen Azinuszellen nach achtstündiger Präinkubation (B 1), sowie nach fünfminütiger (B 2) bzw. 30 minütiger (B 9) Inkubation ohne CCK. Als Positivkontrollen dienten mit IFN- $\gamma$  für fünf (B 3) bzw. 30 min (B 10) stimulierte Azini.

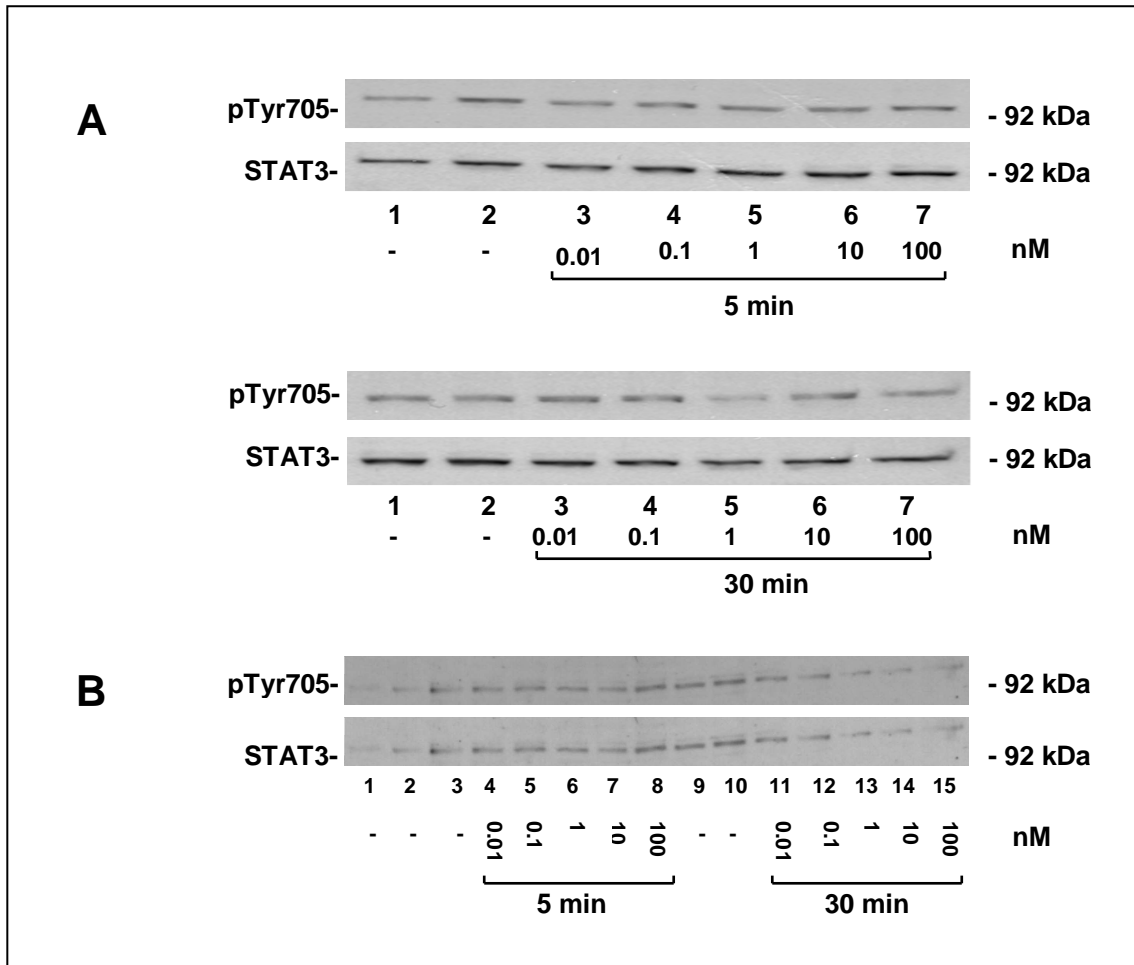


Abbildung 12: CCK verändert nicht den Phosphorylierungszustand von STAT3. Pankreasläppchen (A) und isolierte Azinuszellen (B) wurden mit CCK in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert (A: 3-7, B: 4-8 und 11-15). Eine Probe wurde jeweils direkt nach der Organexplantation weiterverarbeitet (A 1). Ebenfalls aufgetragen wurden mit 1000 U/ml IFN- $\gamma$  stimulierte Lämpchen (A 2). In der Azinuszellstimulationsreihe wurden Azini nach achtstündiger Präinkubation aufgetragen (B 1), sowie nach fünfminütiger (B 2) bzw. 30 minütiger (B 9) Inkubation ohne CCK ebenfalls aufgetragen wurden mit IFN- $\gamma$  für fünf (B 3) bzw. 30 min (B 10) stimulierte Azini.

## 4. Diskussion

### 4.1. Zusammenfassung und kritische Bewertung der Experimente

#### 4.1.1. *Expression von JAK- und STAT-Proteinen in Pankreasazinuszellen*

Zusammenfassend wurde in den durchgeführten Experimenten gezeigt, ob und welche JAK- bzw. STAT-Proteine in Pankreasazinuszellen exprimiert werden, und dass ein aus anderen Zellarten bekannter JAK/STAT-Signaltransduktionsweg analog auch in Pankreasazinuszellen existiert. Weiterhin wurde die Regulation dieses Signaltransduktionsweges durch verschiedene, den Schweregrad einer akuten Pankreatitis beeinflussenden Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren untersucht, um das Zusammenspiel von immunologischer Reaktion einerseits und Pankreasazinuszellen andererseits zu beleuchten.

Mittels Western-Blot wurde untersucht, welche JAK- und STAT-Proteine in Pankreasazinuszellen exprimiert werden. Die meisten STAT Proteine waren stark genug exprimiert, um sie ohne vorangehende Anreicherung durch Immunpräzipitation nachweisen zu können. JAK1 und JAK2 allerdings war erst nach Immunpräzipitation nachweisbar. Dies weist auf eine im Vergleich zu den STAT-Proteinen relativ niedrige Expression der JAK-Proteine in Pankreasazinuszellen hin.

Die Tatsache, dass Pankreashomogenate und isolierte Pankreasazinuszellen bei gleichen Proteinmengen vergleichbare Signalintensitäten für STAT1, STAT2, STAT3 und STAT5 aufwiesen, lässt darauf schließen, dass diese STAT Proteine im Pankreas ihren Ursprung hauptsächlich in den Azinuszellen haben und nicht, wie ebenfalls vorstellbar gewesen wäre, in dukталen Epithelzellen, endokrinen, vaskulären oder Blutzellen. Die immunhistochemischen Untersuchungen von Pankreasgewebeschnitten bestätigten diese Schlussfolgerung für STAT1, welches vornehmlich in den Pankreasazinuszellen lokalisiert war. Analog lässt der Nachweis von STAT6 überwiegend in Pankreashomogenaten und nur in geringem Ausmaß in Azini auf ein hauptsächliches Vorkommen dieses Proteins in non-azinären Zellen des Pankreas schließen. Die Erkenntnis, dass

alle STAT-Proteine bis auf STAT4 in Pankreasazinuszellen nachweisbar waren, stimmt mit den bislang publizierten Expressionsmustern der STATs gut überein. Die Expression von STAT1, STAT2, STAT3, STAT5 und STAT6 wurde in vielen Geweben beschrieben, während STAT4 hauptsächlich in Thymus-, Milz-, Hoden- und myeloiden Zellen sowie Monozyten vorkommt (Yamamoto, Quelle et al. 1994; Zhong, Wen et al. 1994; Frucht, Aringer et al. 2000). Der schwache Nachweis von STAT4 in Pankreashomogenat bei gleichzeitig völligem Fehlen von STAT4 in isolierten Pankreasazinuszellen kann somit am wahrscheinlichsten als Kontamination unserer Proben mit geringen Mengen nicht azinärer Zelltypen (z.B. Blutzellen) in Pankreasläppchen interpretiert werden.

#### *4.1.2. Aktivierung von STAT1 und STAT3 im Pankreas*

Da die meisten JAK- und STAT-Proteine in Pankreasazinuszellen exprimiert wurden, lag es nahe, dass auch ein funktioneller JAK/STAT-Signaltransduktionsweges in diesen Zellen existieren könnte. Die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade beinhaltet unter anderem die Aktivierung der STAT-Proteine durch Phosphorylierung, sowie ihre konsekutive Translokation in den Zellkern. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl der Phosphorylierungsstatus von STAT1 und STAT3 untersucht als auch die intrazelluläre Verteilung von STAT1.

Direkt nach der Organexplantation gewonnene Pankreashomogenate zeigten keine konstitutive STAT1-Phosphorylierung. Der Stress der Azinuszellisolationsprozedur hingegen stellte einen adäquaten Reiz dar, um eine starke, langanhaltende und reversible STAT1-Phosphorylierung hervorzurufen. Dies kann durch verschiedene Stressesstimuli verursacht worden sein, die während der Isolationsprozedur auftreten, wie z.B. Hypoxie, metabolischen Stress, sowie den durch die Unterbrechung der Zell-Zell-Kontakte ausgelöste Stress. Die STAT1-Phosphorylierung trat relativ früh während der Azinusisolationsprozedur auf. Erstmals konnte sie nach Inkubation des Organs für 30 min bei 37°C unter Rütteln im Wasserbad nachgewiesen werden, also nach dem Kollagenaseverdau. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine STAT1-Phosphorylierung nach 90

minütiger Inkubation bei 37°C von Pankreasläppchen, die ohne Kollagenase präpariert wurden (siehe Abbildung 8, Bahn 1). Dies deutet darauf hin, dass die STAT1-Phosphorylierung hauptsächlich durch den Kollagenaseverdau und die damit verbundene Lösung der Zell-Zell-Kontakte initiiert wird (Luster 1998; Blinman, Gukovsky et al. 2000). Da die STAT1-Phosphorylierung während der folgenden Isolationsschritte noch weiter zunahm, könnten die auf den Kollagenaseverdau folgenden mechanischen, metabolischen und hypoxischen Stressstimuli zusätzlich beigetragen haben.

Im Gegensatz zur STAT1-Phosphorylierung, die erst durch Azinuszell-isolationsstress und die damit einhergehende Lösung von Zell-Zell-Kontakten ausgelöst wurde, wurde die STAT3-Phosphorylierung bereits durch Präparation der Pankreasläppchen direkt nach der Organexplantation induziert, ohne dass ein Kollagenaseverdau stattgefunden hatte. Außerdem war die STAT3-Phosphorylierung im Gegensatz zur Phosphorylierung von STAT1 nicht innerhalb von 8 h reversibel. Dies lässt auf eine unterschiedliche Regulation der stressinduzierten Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 im Pankreas schließen. Für STAT3 ist bekannt, dass es durch oxidativen Stress sowie durch die Dehnung von Muskelfasern phosphoryliert wird, während dies für STAT1 nicht zutrifft (Carballo, Conde et al. 1999; Pan, Fukuda et al. 1999; Xuan, Guo et al. 2001). Dies könnte die schnelle und irreversible Phosphorylierung von STAT3 durch den Präparationsstress erklären.

Als nächstes wurde die Aktivierbarkeit von STAT1 in Pankreasazinuszellen durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  untersucht, da in vielen anderen Zelltypen ein durch IFN- $\gamma$  aktivierbarer JAK/STAT-Signaltransduktionsweg beschrieben wurde. Dieser involviert außer STAT1 auch JAK1 und JAK2. Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges durch IFN- $\gamma$  führt zur Assoziation des IFN- $\gamma$ -Rezeptor-Komplexes, wodurch wiederum die rezeptorassoziierten JAK1 und JAK2 transaktiviert werden. Dies führt zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT1 aus dem Zytosol, woraufhin STAT1-Homodimere geformt und in den Nukleus transloziert werden, wo sie an spezifische DNA-Sequenzen binden und dadurch die Transkription von Zielgenen bewirken (Darnell, Kerr et al. 1994). Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass ein analoger Signaltransduk-

tionsweg im Pankreas existiert: IFN- $\gamma$  bewirkt in Pankreasazinuszellen schnell und bereits in physiologischen Konzentrationen eine STAT1-Phosphorylierung. Die konzentrationsabhängige Inhibierbarkeit der STAT1-Phosphorylierung durch den JAK2-Inhibitor AG-490 wies hierbei darauf hin, dass auch in Pankreasazinuszellen JAK2 Voraussetzung für diesen Mechanismus ist. Denkbar ist allerdings auch, dass die stressinduzierte STAT1-Phosphorylierung über p38 vermittelt wird (Bode, Gatsios et al. 1999) Die immunhistochemischen Untersuchungen konnten zusätzlich zeigen, dass in unstimulierten Pankreasgewebeschnitten nur unphosphoryliertes STAT1 diffus im Zytoplasma verteilt ist. Schnitte hingegen, die nach Behandlung des Gewebes mit IFN- $\gamma$  angefertigt wurden, zeigten eindeutig eine nukleäre Translokation des phosphorylierten STAT1.

Um eine potentielle STAT-Aktivierung durch andere physiologische Stimuli im Pankreas zu untersuchen, wurde zusätzlich die STAT1- Phosphorylierung nach Stimulation mit EGF, TNF- $\alpha$  und IL-6 untersucht. Diese Zytokine aktivieren einerseits STAT1 in verschiedenen Zelltypen, andererseits spielen sie während der akuten Pankreatitis eine Rolle (Darnell, Kerr et al. 1994; Hemmann, Gerhartz et al. 1996; Gukovskaya, Gukovsky et al. 1997; Inagaki, Hoshino et al. 1997; Guo, Dunbar et al. 1998; Dembinski, Warzecha et al. 2000). Unerwarteterweise konnte weder in Pankreasläppchen noch in isolierten Azinuszellen durch Stimulation mit den genannten Zytokinen eine STAT1-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass in Pankreasazinuszellen IFN- $\gamma$ , aber nicht EGF, TNF- $\alpha$  oder IL-6, in der Lage ist, eine Phosphorylierung von STAT1 auszulösen, lässt darauf schließen, dass die STAT1-Signaltransduktion in diesem Zelltyp auf wenige Zytokine beschränkt ist. Allerdings sind weiterführende Untersuchungen in anderen experimentellen Modellen, insbesondere in-vivo Studien, zur Bestätigung einer Generalisierbarkeit dieser Ergebnisse nötig.

Zwar spielen STAT2 und STAT5 im Rahmen der inflammatorischen Reaktion ebenfalls eine gewisse Rolle. Auf Ihre nähere Untersuchung musste in Erman-

gelung der entsprechenden phosphotyrosinspezifischen Antikörper allerdings an dieser Stelle verzichtet werden.

Die Signalübertragung, die durch CCK in Pankreasazinuszellen ausgelöst wird, beinhaltet viele verschiedene intrazelluläre Mechanismen (Williams 2001). Physiologische Stimulation und insbesondere Hyperstimulation des CCK-Rezeptors führt zur Aktivierung verschiedener Stress-Signaltransduktionswege, zur Induktion von Hitzeschockproteinen und zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. nukleärem Faktor-  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Duan und Williams 1994; Duan, Zheng et al. 1995; Weber, Gress et al. 1995; Dabrowski, Grady et al. 1996; Grady, Liang et al. 1997; Groblewski, Grady et al. 1997; Gukovsky, Gukovskaya et al. 1998; Schafer, Ross et al. 1998; Wagner, Metzler et al. 1999; Wagner, Mazzucchelli et al. 2000; Williams, Sans et al. 2002; Gukovsky, Cheng et al. 2004). Weiterhin verstärkt CCK die Tyrosinphosphorylierung vieler Proteine in Pankreasazinuszellen sowie die gesamte Tyrosinkinaseaktivität (Williams 2001). Allgemein ist bekannt, dass Hormone auch den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg aktivieren können (Schindler und Strehlow 2000). Allerdings ist bislang wenig über seine Beteiligung an der durch CCK ausgelösten Signalübertragung bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen untersucht, ob CCK in hohen Konzentrationen eine STAT-Phosphorylierung bewirkt (analog zu Präparationsstress-induzierter STAT-Phosphorylierung), und zum anderen, ob Pankreasazinuszellen auf physiologische Dosierungen CCK mittels Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges reagieren. Überraschenderweise konnte keinerlei Einfluss von CCK, weder in physiologischer noch in supraphysiologischer Dosierung, auf den Phosphorylierungsstatus von STAT1 oder STAT3 gezeigt werden. Dementsprechend ergaben sich keine Hinweise auf eine Beteiligung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges an der durch CCK ausgelösten Signalübertragung im Pankreas. Im Hinblick auf STAT1 zeigen diese Daten weiterhin, dass CCK- bzw. präparationsinduzierter Stress in Pankreasazinuszellen über unterschiedliche Signaltransduktionswege vermittelt werden.

Als nächstes wurde untersucht, wie STAT3 auf Stimulation mit verschiedenen Zytokinen reagiert, da es bekanntermaßen bei der Signalübertragung vieler Zytokine (insbesondere IL-6) eine Rolle spielt. STAT3 zeigte hierbei eine deutliche konstitutive STAT3-Phosphorylierung, die auch innerhalb von 8 h nicht vollständig reversibel war. Längere Präinkubationsperioden konnten aufgrund eines nach 8 h zunehmenden Absterbens der Zellen nicht betrachtet werden. Aufgrund dessen war die STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ , CCK, EGF, TNF- $\alpha$  und IL-6 nur eingeschränkt beurteilbar, da lediglich Vergleiche mit der immer vorhandenen Hintergrundphosphorylierung von STAT3 angestellt werden konnten. Diese Vergleiche erbrachten keinen Hinweis auf einen zusätzlichen Einfluss dieser Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone auf die vorhandene STAT3-Phosphorylierung. Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass das benutzte System zur Beurteilung der STAT3-Aktivierung offensichtlich nicht optimal ist, so dass die hier vorgestellten Ergebnisse nicht als endgültig zu betrachten sind.

#### **4.2. Mögliche Bedeutung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges im Pankreas**

Der Vorgang der Zellpräparation wird allgemein als Stressstimulus für Pankreasazinuszellen angesehen (Blinman, Gukovsky et al. 2000). Allerdings wurde eine Beteiligung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges im Rahmen dieser Stressreaktion bislang nicht beschrieben, obwohl Stress den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg in vielen anderen Zellarten aktivieren kann (Gatsios, Terstegen et al. 1998; Bode, Gatsios et al. 1999; Carballo, Conde et al. 1999; Peterson, Wang et al. 2000; Xuan, Guo et al. 2001). Wir zeigten in dieser Arbeit erstmals, dass Präparationsstress in Pankreasazinuszellen zur Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges führt. Da die präparationsinduzierte JAK/STAT-Signalübertragung in Pankreasazinuszellen zu veränderten Reaktionen auf verschiedene Behandlungen führen kann, besonders wenn die Messung direkt nach der Präparationsprozedur durchgeführt wird, sollte dies in



Studien, die die Effekte insbesondere von Stressstimuli auf Pankreasazinuszellen untersuchen, unbedingt beachtet werden.

Eine wichtige Aussage dieser Arbeit ist, dass in Pankreasazinuszellen ein funktioneller JAK/STAT-Signaltransduktionsweg existiert, der unter anderem durch IFN- $\gamma$  reguliert werden kann. IFN- $\gamma$  scheint eine wichtige Rolle für die Entwicklung der akuten Pankreatitis zu spielen, wobei allerdings noch nicht geklärt ist, ob die Effekte von IFN- $\gamma$  für den Verlauf der akuten Pankreatitis vorwiegend protektiv oder im Gegenteil sogar schädlich sind (Demols, Le Moine et al. 2000; Demols, Le Moine et al. 2002; Uehara, Gothoh et al. 2003; Bhatia 2004a). In einer Studie wurde die Entwicklung der akuten experimentellen Pankreatitis in Mäusen mit defekter IFN- $\gamma$ -abhängiger Signalübertragung untersucht. Defektive IFN- $\gamma$ -abhängige Signalübertragung wurde dabei sowohl durch einen IFN- $\gamma$ -Rezeptor Knockout als auch durch die Gabe von IFN- $\gamma$ -Antikörpern erreicht (Demols, Le Moine et al. 2002). Da die Pankreatitis bei den betroffenen Mäusen einen schwereren Verlauf zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass IFN- $\gamma$  im Verlauf der Erkrankung vornehmlich protektive Effekte ausübt. Da die Mäuse mit fehlerhafter IFN- $\gamma$ -abhängiger Signalübertragung einen schwereren Pankreatitisverlauf und gleichzeitig eine signifikante Reduktion apoptotischer Azinuszellen aufwiesen (Demols, Le Moine et al. 2002), lassen sich die protektiven Effekte von IFN- $\gamma$  wahrscheinlich der Induktion von Apoptose durch IFN- $\gamma$  in Azinuszellen zuschreiben, da bereits gezeigt worden ist, dass die Induktion von Apoptose den Schweregrad experimenteller Pankreatitiden reduzieren kann (Bhatia, Wallig et al. 1998; Gukovskaya, Gukovsky et al. 2002). Untermauert wird diese These dadurch, dass IFN- $\gamma$  auch in vielen anderen Zellarten dazu in der Lage ist, effektiv die Apoptose zu induzieren (Barber 2000). Apoptoseinduktion ist in vielen Zellarten von einer funktionellen STAT1-Signalübertragung abhängig (Chin, Kitagawa et al. 1997; Xu, Fu et al. 1998; Lee, Smith et al. 2000). Sollten die protektiven Effekte von IFN- $\gamma$  während der akuten Pankreatitis also durch die STAT1-vermittelte Apoptoseinduktion ausgelöst werden, so ist das Vorliegen eines funktionellen JAK2/STAT1-abhängigen Signaltransduktionsweges in Azinuszellen eine notwendige Bedingung hierfür. Diesen Signaltransduk-

tionsweg haben wir in dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen, so dass die Voraussetzungen für die beschriebene Signalübertragung erfüllt sind. Allerdings existieren einige Ungereimtheiten im Hinblick auf die durch IFN- $\gamma$  ausgelösten Effekte, die durch die Ergebnisse einer anderen Studie veranschaulicht werden können: Obwohl CD4-positive T-Zellen die Hauptquelle für IFN- $\gamma$  darstellen (Mosmann und Sad 1996), zeigen T-Zell-defiziente Nacktmäuse, die quasi keine intrapankreatische IFN- $\gamma$  Expression haben, verglichen mit Kontrollmäusen eine signifikante Reduktion des Schweregrades der akuten Pankreatitis. Gleichzeitig bewirkte der Transfer von T-Zellen in Nacktmäuse und die damit verbundene Erhöhung der intrapankreatischen IFN- $\gamma$  Expression die teilweise Wiederherstellung des Schweregrades der akuten Pankreatitis (Demols, Le Moine et al. 2000). Diese Beobachtungen widersprechen auf den ersten Blick der Vermutung, dass IFN- $\gamma$  bei der akuten experimentellen Pankreatitis eine protektive Rolle spielt. Andererseits erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass die (antiprotektive) Wirkung der aufgehobenen IFN- $\gamma$  Signaltransduktion durch die stärkere (protektive) Wirkung des fast vollständigen Fehlens der T-Zellen in diesen Tieren neutralisiert wurde. Zusammengenommen betonen die Ergebnisse dieser Arbeit die besondere Bedeutung der Immunantwort für die Entwicklung der akuten Pankreatitis, wobei die genaue Rolle von IFN- $\gamma$  in diesem Zusammenhang noch nicht abschliessend geklärt ist.

#### **4.3. Mögliche Bedeutung der Interaktion von Immun- und Pankreasazinuszellen für die akute Pankreatitis**

Das Konzept, dass Pankreasazinuszellen mit Immunzellen interagieren können, wird durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weiter unterstützt und veranschaulicht. Neben der bekannten Fähigkeit der Azinuszellen zur Produktion und Freisetzung von Chemo- und anderen Zytokinen bei der Entwicklung der akuten Pankreatitis wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass Pankreasazinuszellen auch selbst auf Zytokine, insbesondere IFN- $\gamma$ , über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg reagieren können. Diese Hypothese von der Reagibilität der Pankreasazinuszellen auf Zytokine ist neu und wird bislang nur

durch wenige andere Studien unterstützt. Es wurde gezeigt, dass IL-22 die Expression des Pankreas-assoziierten Proteins (PAP1) im Mäusepankreas und in isolierten Pankreasazinuszellen induziert (Aggarwal, Xie et al. 2001).

#### **4.4. Ausblick und weiterführende Experimente**

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass sowohl Präparationsstress als auch die Behandlung mit IFN- $\gamma$  die STAT1-Aktivierung bewirken können. Allerdings sind weiterführende Untersuchungen in anderen experimentellen Modellen, insbesondere in-vivo Studien, zur Bestätigung einer Generalisierbarkeit dieser Ergebnisse nötig. Da die präparationsinduzierte JAK/STAT-Signalübertragung in Pankreasazinuszellen zu veränderten Reaktionen auf verschiedene Behandlungen führen kann, sollte hierbei in Studien zu den Effekten von Stressstimuli auf Pankreasazinuszellen besondere Rücksicht genommen werden. Außerdem sollte durch weitere Arbeiten die Rolle von IFN- $\gamma$  während der Immunreaktion im Rahmen der akuten Pankreatitis eingehender untersucht werden. Da AG-490 die IFN- $\gamma$  induzierte STAT1-Phosphorylierung komplett unterbinden konnte, und da AG-490 intraperitoneal verabreicht von Mäusen gut vertragen wird (Xuan, Guo et al. 2001), sollten in-vivo Untersuchungen STAT1-vermittelter Effekte von IFN- $\gamma$  im Verlauf der akuten Pankreatitis als Anschluss-Studie durchgeführt werden.

Im Hinblick auf die Regulierung von STAT3 im Pankreas konnte aufgrund der konstitutiven Phosphorylierung keine eindeutige Aussage über den Einfluss der verschiedenen Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone auf den Phosphorylierungsstatus gemacht werden. Zur eindeutigen Beurteilung der Regulierung von STAT3 im Pankreas werden daher bessere Modelle benötigt. Da insbesondere für IL-6 schon gut beschrieben ist, dass es in vielen Zellarten zur Aktivierung von STAT3 führt, und da an genetisch veränderten Mäusen gezeigt wurde, dass IL-6 den Schweregrad der akuten Pankreatitis modulieren kann (Cuzzocrea, Mazzone et al. 2002; Schafer, Tietz et al. 2005), ist es wahrscheinlich, dass IL-6 auch in Pankreasazinuszellen zur Aktivierung von STAT3 führt.

Diese Vermutung wird zwar weiterhin dadurch bekräftigt, dass nach Behandlung von Pankreasazinuszellen mit TNF- $\alpha$  und IL-6 eine deutlich verstärkte Expression von STAT3 mRNA nachgewiesen werden kann (Vona-Davis, Frankenberry et al. 2005), allerdings ist die Validität dieser Studie höchst zweifelhaft, da die in ihr verwendete Zelllinie (AR42J) stark dedifferenziert ist und nicht mehr in derselben Weise wie Azinuszellen reagiert.

In AML-Zellen ist beschrieben worden, dass es durch autokrine Sekretion von IL-6 zur konstitutiven Tyrosinphosphorylierung von STAT3 kommt (Schuringa, Wierenga et al. 2000). Auch in Pankreasazinuszellen ist dies ein vorstellbarer Mechanismus zur Auslösung der konstitutiven STAT3-Phosphorylierung. So könnte eine autokrine IL-6 Sekretion durch den Präparationsstress der Pankreasläppchen verursacht werden. Vermeiden ließe sich eine solche konstitutive Phosphorylierung folglich nur durch in-vivo-Modelle bzw. durch (praktisch unmögliche) in-vitro-Modelle ohne jeglichen Präparationsstress. Ebenfalls möglich wäre es, die Pankreasläppchen vor der jeweiligen Stimulation mit anti-IL-6 Antikörpern zu präinkubieren (Suzuki, Miyasaka et al. 2000), da in AML-Zellen beschrieben wurde, dass diese Behandlung zur Reinduzierbarkeit der STAT3-Phosphorylierung führt (Schuringa, Wierenga et al. 2000).

Schliesslich sollten noch weitere Versuche zur Beschreibung der Regulation der anderen Mitglieder der JAK/STAT-Familie in Pankreasazinuszellen an geeigneten Modellen durchgeführt werden, da die vorliegende Arbeit hauptsächlich die Regulation von STAT1 und STAT3 in Pankreasazinuszellen untersucht. Von besonderem Interesse dürfte hierbei die Regulation der anderen STAT-Proteine nach Stimulation mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen, die den Schweregrad der akuten Pankreatitis beeinflussen, sein. Hierdurch soll das Zusammenspiel zwischen Pankreasazinuszellen und Immunzellen bei der Entwicklung der akuten Pankreatitis besser verstanden werden, woraus sich wiederum Möglichkeiten zur Beeinflussung des Verlaufs dieser Krankheit ableiten lassen könnten. Insbesondere immunmodulatorische (Bhatia, Neoptolemos et al. 2001) sowie die Apoptose beeinflussende Therapien (Alam 2003) erscheinen zum heutigen Zeitpunkt Erfolg versprechend zur Eingrenzung des

Schweregrades der akuten Pankreatitis. So konnte gezeigt werden, dass eine Einschränkung der Aktivität von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie die Gabe von IL-10 die systemische Stressreaktion während der akuten Pankreatitis im Tiermodell mildern kann und somit zu einer leichten Abnahme der Mortalität führt (Bhatia, Brady et al. 2000). Dementsprechende Erfolge in klinischen Studien konnten jedoch bislang noch nicht erreicht werden, so dass ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bei der immunologischen Reaktion durch weitere Grundlagenuntersuchungen nötig ist, was schliesslich zur Entwicklung eines verlässlichen Therapieansatzes führen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis beginnt in den Azinuszellen, allerdings bestimmen die sich anschließenden außerazinären, immunologischen Geschehnisse den Schweregrad der Erkrankung. Diese immunologische Reaktion wird über Zytokine vermittelt, die hauptsächlich von Immunzellen, zusätzlich aber auch von Pankreasazinuszellen selbst sezerniert werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Pankreasazinuszellen in der Lage sind, auf autokrin oder parakrin freigesetzte Zytokine zu reagieren. Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg, eine Phosphorylierungskaskade, die von Oberflächenrezeptoren initiierte Signale in den Zellkern weiterleitet, stellt den Haupteffektor der meisten Zytokine dar. Wir konnten mittels Immunopräzipitation und Western-Blot die meisten JAK und STAT Proteine in Pankreasazinuszellen nachweisen (JAK1, JAK2 und TYK2 sowie STAT1, STAT2, STAT3, STAT5 und STAT6). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass einige dieser Proteine in Pankreasazinustellen durch physiologische (Zytokine), aber auch unphysiologische (Stress) Stimuli phosphoryliert und damit aktiviert werden. Dies belegt neben der Expression zusätzlich eine Regulation dieser Proteine und damit eine funktionelle Rolle des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges im Pankreas. Exemplarisch wurde mittels Immunhistochemie gezeigt, dass IFN- $\gamma$  über JAK2 und STAT1-Phosphorylierung eine Verlagerung von STAT1 in den Zellkern bewirkt, was nahelegt, dass der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg in Pankreasazinuszellen analog zu den in Immunzellen beschriebenen Mechanismen funktioniert. Überraschenderweise ergaben sich keine Hinweise für eine CCK-abhängige Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 im Pankreas, obwohl einerseits CCK zur Aktivierung vieler Stress-Signaltransduktionswege im Pankreas führt, andererseits der JAK/STAT Signaltransduktionsweg durch Stress aktiviert wird.

Zusammengenommen unterstützen die in dieser Arbeit erhobenen Daten die Hypothese, dass Pankreasazinuszellen mit Immunzellen nicht nur mittels Sekretion von Zytokinen, sondern zusätzlich auch mittels Reaktion auf Zytokine interagieren können. Da solche Azinuszell-/Immunzellinteraktionen den Schweregrad einer akuten Pankreatitis beeinflussen können, könnte ein besseres

Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu therapeutischen Ansätzen bei dieser Erkrankung führen.

## 6. Literaturverzeichnis

**Aaronson, D. S. und C. M. Horvath** "*A road map for those who don't know JAK-STAT.*" *Science* 296(5573): 1653-5 (2002).

**Aggarwal, S., M. H. Xie, et al.** "*Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22.*" *J Interferon Cytokine Res* 21(12): 1047-53 (2001).

**Ahmed, S. T. und L. B. Ivashkiv** "*Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways.*" *J Immunol* 165(9): 5227-37 (2000).

**Alam, J. J.** "*Apoptosis: target for novel drugs.*" *Trends Biotechnol* 21(11): 479-83 (2003).

**Barber, G. N.** "*The interferons and cell death: guardians of the cell or accomplices of apoptosis?*" *Semin Cancer Biol* 10(2): 103-11 (2000).

**Bhatia, M.** "*Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad?*" *J Cell Mol Med* 8(3): 402-9 (2004a).

**Bhatia, M.** "*Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis.*" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286(2): G189-96 (2004b).

**Bhatia, M., M. Brady, et al.** "*Inflammatory mediators in acute pancreatitis.*" *J Pathol* 190(2): 117-25 (2000).

**Bhatia, M., J. P. Neoptolemos, et al.** "*Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis.*" *Curr Opin Investig Drugs* 2(4): 496-501 (2001).



- Bhatia, M., M. A. Wallig, et al.** "*Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis.*" *Biochem Biophys Res Commun* 246(2): 476-83 (1998).
- Bi, Y. und J. A. Williams** "*Receptor biology and signal transduction in pancreatic acinar cells.*" *Curr Opin Gastroenterol* 20(5): 427-34 (2004).
- Blinman, T. A., I. Gukovsky, et al.** "*Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase.*" *Am J Physiol Cell Physiol* 279(6): C1993-2003 (2000).
- Bode, J. G., P. Gatsios, et al.** "*The mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 and its upstream activator MAP kinase kinase 6 are involved in the activation of signal transducer and activator of transcription by hyperosmolarity.*" *J Biol Chem* 274(42): 30222-7 (1999).
- Brady, M., S. Christmas, et al.** "*Cytokines and acute pancreatitis.*" *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 13(2): 265-89 (1999).
- Briscoe, J., D. Guschin, et al.** "*JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines.*" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351(1336): 167-71 (1996).
- Carballo, M., M. Conde, et al.** "*Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes.*" *J Biol Chem* 274(25): 17580-6 (1999).
- Chen, M., A. Cheng, et al.** "*The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 6910-5 (1997).

- Chin, Y. E., M. Kitagawa, et al.** "Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis." *Mol Cell Biol* 17(9): 5328-37 (1997).
- Cuzzocrea, S., E. Mazzon, et al.** "Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice." *Cytokine* 18(5): 274-85 (2002).
- Dabrowski, A., T. Grady, et al.** "Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo." *J Biol Chem* 271(10): 5686-90 (1996).
- Darnell, J. E., Jr.** "The JAK-STAT pathway: summary of initial studies and recent advances." *Recent Prog Horm Res* 51: 391-403; discussion 403-4 (1996).
- Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, et al.** "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." *Science* 264(5164): 1415-21 (1994).
- de Vos, A. M., M. Ultsch, et al.** "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex." *Science* 255(5042): 306-12 (1992).
- Dembinski, A., Z. Warzecha, et al.** "Epidermal growth factor accelerates pancreatic recovery after caerulein-induced pancreatitis." *Eur J Pharmacol* 398(1): 159-68 (2000).
- Demols, A., O. Le Moine, et al.** "CD4(+)T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice." *Gastroenterology* 118(3): 582-90 (2000).

- Demols, A., O. Le Moine, et al.** "*Endogenous interferon gamma plays a protective role in acute experimental pancreatitis in mice*". Joint meeting of the European Pancreatic Club (EPC) and the International Association of Pancreatology (IAP). Heidelberg, Germany, Karger: Basel, Switzerland: 217-361 (2002).
- Duan, R. D. und J. A. Williams** "*Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini*." Am J Physiol 267(3 Pt 1): G401-8 (1994).
- Duan, R. D., C. F. Zheng, et al.** "*Activation of MAP kinase kinase (MEK) and Ras by cholecystokinin in rat pancreatic acini*." Am J Physiol 268(6 Pt 1): G1060-5 (1995).
- Dugernier, T., P. F. Laterre, et al.** "*Compartmentalization of the protease-antiprotease balance in early severe acute pancreatitis*." Pancreas 31(2): 168-73 (2005).
- Ehret, G. B., P. Reichenbach, et al.** "*DNA Binding Specificity of Different STAT Proteins. COMPARISON OF IN VITRO SPECIFICITY WITH NATURAL TARGET SITES*." J. Biol. Chem. 276(9): 6675-6688 (2001).
- El-Hashemite, N. und D. J. Kwiatkowski** "*IFN $\gamma$ -Jak-Stat Signaling in Pulmonary LAM and Renal AML: A Potential Therapeutic Target*." Am J Respir Cell Mol Biol (2005).
- Endo, T. A., M. Masuhara, et al.** "*A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases*." Nature 387(6636): 921-4 (1997).
- Fink, G. W. und J. G. Norman** "*Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin 1 family of genes during experimental acute pancreatitis*." Cytokine 9(12): 1023-7 (1997).

**Frank, S. J., G. Gilliland, et al.** "*Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase.*" *Endocrinology* 135(5): 2228-39 (1994).

**Frank, S. J., W. Yi, et al.** "*Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor.*" *J Biol Chem* 270(24): 14776-85 (1995).

**Frucht, D. M., M. Aringer, et al.** "*Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation.*" *J Immunol* 164(9): 4659-64 (2000).

**Gatsios, P., L. Terstegen, et al.** "*Activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway by osmotic shock.*" *J Biol Chem* 273(36): 22962-8 (1998).

**Gil, M. P., E. Bohn, et al.** "*Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12): 6680-5 (2001).

**Gomez-Cambronero, L. G., L. Sabater, et al.** "*Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications.*" *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1(4): 393-403 (2002).

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

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

- Groblewski, G. E., T. Grady, et al.** "*Cholecystokinin stimulates heat shock protein 27 phosphorylation in rat pancreas both in vivo and in vitro.*" *Gastroenterology* 112(4): 1354-61 (1997).
- Gross, V., H. G. Leser, et al.** "*Inflammatory mediators and cytokines--new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis?*" *Hepatogastroenterology* 40(6): 522-30 (1993).
- Gukovskaya, A. S., I. Gukovsky, et al.** "*Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis.*" *J Biol Chem* 277(25): 22595-604 (2002).
- Gukovskaya, A. S., I. Gukovsky, et al.** "*Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis.*" *J Clin Invest* 100(7): 1853-62 (1997).
- Gukovsky, I., J. H. Cheng, et al.** "*Phosphatidylinositide 3-kinase gamma regulates key pathologic responses to cholecystokinin in pancreatic acinar cells.*" *Gastroenterology* 126(2): 554-66 (2004).
- Gukovsky, I., A. S. Gukovskaya, et al.** "*Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis.*" *Am J Physiol* 275(6 Pt 1): G1402-14 (1998).
- Guo, D., J. D. Dunbar, et al.** "*Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor.*" *J Immunol* 160(6): 2742-50 (1998).
- Gurniak, C. B. und L. J. Berg** "*Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells.*" *Blood* 87(8): 3151-60 (1996).

**Halangk, W., M. M. Lerch, et al.** "*Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis.*" J Clin Invest 106(6): 773-81 (2000).

**Han, B. und C. D. Logsdon** "*Cholecystokinin induction of mob-1 chemokine expression in pancreatic acinar cells requires NF-kappaB activation.*" Am J Physiol 277(1 Pt 1): C74-82 (1999).

**Han, B. und C. D. Logsdon** "*CCK stimulates mob-1 expression and NF-kappaB activation via protein kinase C and intracellular Ca(2+).*" Am J Physiol Cell Physiol 278(2): C344-51 (2000).

**Haspel, R. L., M. Salditt-Georgieff, et al.** "*The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase.*" Embo J 15(22): 6262-8 (1996).

**Heath, D. I., A. Cruickshank, et al.** "*Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis.*" Gut 34(1): 41-5 (1993).

**Hemann, U., C. Gerhartz, et al.** "*Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation.*" J Biol Chem 271(22): 12999-3007 (1996).

**Hofbauer, B., A. K. Saluja, et al.** "*Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats.*" Am J Physiol 275(2 Pt 1): G352-62 (1998).

**Horvath, C. M.** "*STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals.*" Trends Biochem Sci 25(10): 496-502 (2000).

**Horvath, C. M. und J. E. Darnell** "*The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus.*" *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 233-9 (1997).

**Horvath, C. M. und J. E. Darnell, Jr.** "*The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein.*" *J Virol* 70(1): 647-50 (1996).

**Hughes, C. B., L. W. Gaber, et al.** "*Induction of acute pancreatitis in germ-free rats: evidence of a primary role for tumor necrosis factor-alpha.*" *Surgery* 117(2): 201-5 (1995).

**Hughes, C. B., J. Henry, et al.** "*Up-regulation of TNF alpha mRNA in the rat spleen following induction of acute pancreatitis.*" *J Surg Res* 59(6): 687-93 (1995).

**Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, et al.** "*Signaling through the hematopoietic cytokine receptors.*" *Annu Rev Immunol* 13: 369-98 (1995).

**Inagaki, T., M. Hoshino, et al.** "*Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis.*" *Pancreas* 14(1): 1-8 (1997).

**Ivanov, V. N., A. Bhoumik, et al.** "*Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription.*" *Mol Cell* 7(3): 517-28 (2001).

**James H. Grendell, M.** "*Acute Pancreatitis.*" *Current Opinion in Gastroenterology* 13: 381-385 (1997).

**JD Gardner, R. J.** "*Receptors for secretagogues on pancreatic acinar cells.*" *The pancreas.* E. D. VLW Go, JD Gardner, E Lebenthal, HA Reber, GA Scheele. New York, Raven Press: 151-166 (1993).

- Kald, B., A. Kald, et al.** "*Release of platelet-activating factor in acute experimental pancreatitis.*" *Pancreas* 8(4): 440-2 **(1993)**.
- Kawamura, M., D. W. McVicar, et al.** "*Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14): 6374-8 **(1994)**.
- Kim, T. K. und T. Maniatis** "*Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway.*" *Science* 273(5282): 1717-9 **(1996)**.
- Kohlhuber, F., N. C. Rogers, et al.** "*A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses.*" *Mol Cell Biol* 17(2): 695-706 **(1997)**.
- Krupinski, J., M. Slevin, et al.** "*Time-course phosphorylation of the mitogen activated protein (MAP) kinase group of signalling proteins and related molecules following middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats.*" *Neuropathol Appl Neurobiol* 29(2): 144-58 **(2003)**.
- Lee, C. K., E. Smith, et al.** "*STAT1 affects lymphocyte survival and proliferation partially independent of its role downstream of IFN-gamma.*" *J Immunol* 164(3): 1286-92 **(2000)**.
- Leonard, W. J.** "*STATs and cytokine specificity.*" *Nat Med* 2(9): 968-9 **(1996)**.
- Leonard, W. J.** "*Type I cytokines and interferons.*" *Fundamental Immunology*. W. Paul. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins **(2003)**.
- Leonard, W. J. und J. J. O'Shea** "*Jaks and STATs: biological implications.*" *Annu Rev Immunol* 16: 293-322 **(1998)**.



- Lerch, M. M. und F. S. Gorelick** "*Early trypsinogen activation in acute pancreatitis.*" *Med Clin North Am* 84(3): 549-63, viii (2000).
- Lerch, M. M., W. Halangk, et al.** "*The role of cysteine proteases in intracellular pancreatic serine protease activation.*" *Adv Exp Med Biol* 477: 403-11 (2000).
- Leser, H. G., V. Gross, et al.** "*Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis.*" *Gastroenterology* 101(3): 782-5 (1991).
- Luster, A. D.** "*Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation.*" *N Engl J Med* 338(7): 436-45 (1998).
- Mayer, J., B. Rau, et al.** "*Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications.*" *Gut* 47(4): 546-52 (2000).
- Meydan, N., T. Grunberger, et al.** "*Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor.*" *Nature* 379(6566): 645-8 (1996).
- Mosmann, T. R. und S. Sad** "*The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.*" *Immunol Today* 17(3): 138-46 (1996).
- Muller, M., J. Briscoe, et al.** "*The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction.*" *Nature* 366(6451): 129-35 (1993).
- Musso, T., J. A. Johnston, et al.** "*Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7.*" *J Exp Med* 181(4): 1425-31 (1995).

- Naka, T., M. Narazaki, et al.** "*Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor.*" *Nature* 387(6636): 924-9 (1997).
- Nakamura, Y., S. M. Russell, et al.** "*Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling.*" *Nature* 369(6478): 330-3 (1994).
- Norman, J.** "*The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis.*" *Am J Surg* 175(1): 76-83 (1998).
- Norman, J. G., G. W. Fink, et al.** "*Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression.*" *Arch Surg* 130(9): 966-70 (1995).
- Opie, E.** "*The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis.*" *John Hopkins Hosp Bull.* 12: 182-188 (1901a).
- Opie, E.** "*The relation of cholelithiasis to disease of pancreas and to fat necrosis.*" *John Hopkins Hosp Bull.* 12: 19-21 (1901b).
- Ortmann, R. A., T. Cheng, et al.** "*Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation.*" *Arthritis Res* 2(1): 16-32 (2000).
- Ouchi, T., S. W. Lee, et al.** "*Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5208-13 (2000).
- Owyang, C. und C. D. Logsdon** "*New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion.*" *Gastroenterology* 127(3): 957-69 (2004).

- Pan, J., K. Fukuda, et al.** "*Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes.*" *Circ Res* 84(10): 1127-36 **(1999)**.
- Peterson, W. M., Q. Wang, et al.** "*Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia.*" *J Neurosci* 20(11): 4081-90 **(2000)**.
- Ramana, C. V., M. P. Gil, et al.** "*Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12): 6674-9 **(2001)**.
- Saluja, A. K., L. Bhagat, et al.** "*Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini.*" *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): G835-42 **(1999)**.
- Saluja, A. K., E. A. Donovan, et al.** "*Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B.*" *Gastroenterology* 113(1): 304-10 **(1997)**.
- Saluja, A. K., M. Saluja, et al.** "*Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22): 8968-71 **(1989)**.
- Schafer, C., S. E. Ross, et al.** "*A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini.*" *J Biol Chem* 273(37): 24173-80 **(1998)**.
- Schafer, C., A. B. Tietz, et al.** "*Pathophysiology of acute experimental pancreatitis: lessons from genetically engineered animal models and new molecular approaches.*" *Digestion* 71(3): 162-72 **(2005)**.

**Schindler, C. und I. Strehlow** "*Cytokines and STAT signaling.*" *Adv Pharmacol* 47: 113-74 (2000).

**Schuringa, J. J., A. T. Wierenga, et al.** "*Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6.*" *Blood* 95(12): 3765-70 (2000).

**Sharfe, N., H. K. Dadi, et al.** "*Jak3 activation in human lymphocyte precursor cells.*" *Clin Exp Immunol* 108(3): 552-6 (1997).

**Shuai, K.** "*Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins.*" *Oncogene* 19(21): 2638-44 (2000).

**Silvennoinen, O., J. N. Ihle, et al.** "*Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases.*" *Nature* 366(6455): 583-5 (1993).

**Starr, R., T. A. Willson, et al.** "*A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.*" *Nature* 387(6636): 917-21 (1997).

**Steer, M. L.** "*Pathogenesis of acute pancreatitis.*" *Digestion* 58 Suppl 1: 46-9 (1997).

**Steer, M. L. und J. Meldolesi** "*The cell biology of experimental pancreatitis.*" *N Engl J Med* 316(3): 144-50 (1987).

**Suzuki, S., K. Miyasaka, et al.** "*Induction of acute pancreatitis by cerulein in human IL-6 gene transgenic mice.*" *Pancreas* 21(1): 86-92 (2000).

**Tortolani, P. J., B. K. Lal, et al.** "*Regulation of JAK3 expression and activation in human B cells and B cell malignancies.*" *J Immunol* 155(11): 5220-6 (1995).

- Uehara, S., K. Gothoh, et al.** "*Immune function in patients with acute pancreatitis.*" *J Gastroenterol Hepatol* 18(4): 363-70 **(2003)**.
- Velazquez, L., M. Fellous, et al.** "*A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway.*" *Cell* 70(2): 313-22 **(1992)**.
- Verbsky, J. W., E. A. Bach, et al.** "*Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non-lymphoid and non-myeloid cells.*" *J Biol Chem* 271(24): 13976-80 **(1996)**.
- Viedma, J. A., M. Perez-Mateo, et al.** "*Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A.*" *Gut* 33(9): 1264-7 **(1992)**.
- Vona-Davis, L. C., K. A. Frankenberry, et al.** "*Expression of STAT3 and SOCS3 in Pancreatic Acinar Cells(1,2).*" *J Surg Res* 127(1): 14-20 **(2005)**.
- Wagner, A. C., L. Mazzucchelli, et al.** "*CEP-1347 inhibits caerulein-induced rat pancreatic JNK activation and ameliorates caerulein pancreatitis.*" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(1): G165-72 **(2000)**.
- Wagner, A. C., W. Metzler, et al.** "*p38 map kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following cerulein hyperstimulation.*" *Digestion* 60(1): 41-7 **(1999)**.
- Walter, M. R., W. T. Windsor, et al.** "*Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor.*" *Nature* 376(6537): 230-5 **(1995)**.

- Watling, D., D. Guschin, et al.** "*Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway.*" *Nature* 366(6451): 166-70 **(1993)**.
- Weber, C. K., T. Gress, et al.** "*Supramaximal secretagogue stimulation enhances heat shock protein expression in the rat pancreas.*" *Pancreas* 10(4): 360-7 **(1995)**.
- Willemer, S., R. Bialek, et al.** "*Localization of lysosomal and digestive enzymes in cytoplasmic vacuoles in caerulein-pancreatitis.*" *Histochemistry* 94(2): 161-70 **(1990)**.
- Williams, J. A.** "*Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells.*" *Annu Rev Physiol* 63: 77-97 **(2001)**.
- Williams, J. A., M. Korc, et al.** "*Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini.*" *Am J Physiol* 235(5): 517-24 **(1978)**.
- Williams, J. A., M. D. Sans, et al.** "*Cholecystinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells.*" *Pharmacol Toxicol* 91(6): 297-303 **(2002)**.
- Xu, X., X. Y. Fu, et al.** "*IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression.*" *Cancer Res* 58(13): 2832-7 **(1998)**.
- Xuan, Y. T., Y. Guo, et al.** "*An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9050-5 **(2001)**.

**Yamamoto, K., F. W. Quelle, et al.** "*Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation.*" *Mol Cell Biol* 14(7): 4342-9 (1994).

**Yamaoka, K., P. Saharinen, et al.** "*The Janus kinases (Jaks).*" *Genome Biol* 5(12): 253 (2004).

**Zhang, X. und J. E. Darnell, Jr.** "*Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene.*" *J Biol Chem* 276(36): 33576-81 (2001).

**Zhao, Y., F. Wagner, et al.** "*The amino-terminal portion of the JAK2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c chain.*" *J Biol Chem* 270(23): 13814-8 (1995).

**Zhong, Z., Z. Wen, et al.** "*Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 4806-10 (1994).

**Zhou, W., B. A. Levine, et al.** "*Platelet-activating factor: a mediator of pancreatic inflammation during cerulein hyperstimulation.*" *Am J Pathol* 142(5): 1504-12 (1993).

## 7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin)
CCK	Cholezystokinin
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangio- Pankreatikographie
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRB	HEPES-Ringer-Puffer
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
JAB	JAK-binding protein
JH	JAK Homologie
kDa	Kilodalton
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
Min	Minute
NC	Nitrocellulose
NK	Natürliche Killerzellen
PAA	Polyacrylamid
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s.a.	Siehe auch
SDS	Sodiumdodecylsulfat



SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	Src-Homologie-Domäne-2 (Phosphotyrosinbindende Domäne)
SOCS	suppressor of cytokine signal
SSI	STAT-induced STAT inhibitor
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

## 8. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Forschungslabors B der Medizinischen Klinik II des Klinikums der Universität München – Großhadern für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die allzeit gern gewährte Hilfe und die vielen anregenden Gespräche bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Andreas Wagner, für die freundliche Überlassung des Arbeitsthemas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und die sehr gute Betreuung. Die jederzeitige freundliche Unterstützung hat mir sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Eike Gallmeier für die hervorragende Unterstützung. Besonders die geduldige Vermittlung des nötigen Hintergrundwissens und der Methoden wissenschaftlichen Arbeitens sowie die unermüdliche „Fernkorrektur“ haben ganz wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Dr. Claus Schäfer bedanke ich mich für die vielen Anregungen zu dieser Arbeit. Frau Claudia Jäger sowie alle Mitdoktoranden und Mitarbeiter des Arbeitskreises waren mir stets eine große Hilfe und haben ein angenehmes, herzliches Klima im Labor geschaffen.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für Ihre liebevolle Unterstützung und die Eröffnung aller Möglichkeiten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Matthias Fischer bedanken, der mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat und mich stets mit seinem Lachen ansteckt.

## 9. Eigene Veröffentlichungen zum Thema

### Artikel:

Gallmeier, E., C. Schäfer, **P. Moubarak**, A. Tietz, I. Plössl, R. Huss, B. Göke und A.C.C. Wagner

„JAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN- $\gamma$  in rat pancreatic acinar cells.”

*J Cell Physiol* 203(1): 209-216 (2005)

### Kongressbeitrag:

Gallmeier, E., I. Plössl, **P. Moubarak**, B. Göke, C. Schäfer, A.C. Wagner

“Expression and regulation of JAK and STAT proteins in pancreatic acinar cells”

*Gastroenterology* 124 (4): A501-A501 Suppl. S APR 2003

*American Academy of Gastroenterology Digestive Disease Week 2003*

## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name	Patricia Moubarak
Titel	Dipl.-Kffr.
Geburtsdatum	05.05.1980
Geburtsort	Rostock
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig
Eltern	Dipl.-Ing. Barbara Moubarak, Ingenieur für Schiffbau Dr. Elias Moubarak, Neurologe und Psychiater

### **Schulbildung**

03/1995	Außerplanmäßige Versetzung von Klasse 9/1 in Klasse 10/2
1998	Abitur am Albert-Einstein-Gymnasium in Buchholz i.d.N.

### **Hochschulstudium**

1998 – 2001	Studium der Humanmedizin und der BWL an der EMAU Greifswald
2001 – 2005	Studium der Humanmedizin an der LMU München und der BWL an der Fernuniversität Hagen (Abschluss beider Studiengänge in 2005)

### **Ärztliche Prüfungen**

09/2000	Ärztliche Vorprüfung
04/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Praktisches Jahr**

- 04 – 08/2004 Chirurgische Klinik des Hospital Civil Viejo, Guadalajara,  
Mexiko
- 08 – 11/2004 Medizinische Klinik II und III des Klinikums Großhadern,  
München
- 11/2004 – 02/2005 Pädiatrische Klinik des Hôpital Claude Bernard, Lyon

**Berufliche Tätigkeit**

- Seit 09/2005 Assistenzärztin an der Chirurgischen Klinik des Klinikums  
Großhadern, München