

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger

**Phosphorylierung von MAP-Kinasen (ERK-2 und p38) in Azinuszellen des
Pankreas durch oxidativen Stress *in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Behrus Salehin

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.
Dekan

Referent: PD Dr. med. Reinhard Lüthen

Korreferent: Prof. Dr. med. Jörg Plum

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AP	akute Pankreatitis
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serum-Albumin (bovine serum albumin)
BSO	Buthioninsulfoximin
DTNB	5-5´Dithio-bis(2-Nitro-benzoesäure)
EA	Etacrynsäure: 2,3-Dichloro-4 [Methylenbutyryl] Phenoxyessigsäure
ECL	Enhanced-Chemiluminescence-Kit
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Proteinkinase
g	Gramm
g	Umdrehungen
µg	Microgramm
γ-GT	γ-Glutamyltransferase
GDP	Guanosin-Diphosphat
GR	Glutathionreduktase
GSH	L-γ-Glutamyl-L-Cysteinylglycine
GSSH	oxidiertes Glutathiondisulfid
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
MSO	Methionin-Sulfoximin
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduziertes Nicotinamid–adenin-dinucleotid
NEM	n-Ethyl-maleimid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
s.c.	subcutan
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS/PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOS	„son of sevenless“
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
V	Volt

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Histologische Ergebnisse nach BSO/EA Gabe
Tabelle 2	Histologische Ergebnisse nach Diamid Gabe
Abbildung 1	Intrazelluläre MAP-Kinasen Aktivierungskaskade
Abbildung 2	Prinzip des ECL-Kits
Abbildung 3	Standardgerade von Albumin
Abbildung 4.1	Phosphorylierung von ERK-2 nach BSO/EA Gabe (Membran und Grafik)
Abbildung 4.2	Phosphorylierung von p38 nach BSO/EA Gabe (Film und Grafik)
Abbildung 4.3	Glutathiongehalt nach BSO/EA Gabe
Abbildung 4.4	Serumamylasegehalt nach BSO/EA Gabe
Abbildung 5.1	Phosphorylierung der ERK-2 nach Diamid Gabe (Membran und Grafik)
Abbildung 5.2	Phosphorylierung der p38 nach Diamid Gabe (Film und Grafik)
Abbildung 5.3	Glutathiongehalt nach Diamid Gabe
Abbildung 5.4	Serumamylasegehalt nach Diamid Gabe

Inhaltsverzeichnis

Seiten

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Definition und Ätiologie der akuten Pankreatitis	1
1.2	Pathogenese und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis	2
1.3	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	3
1.3.1	Intrazelluläre MAP-Kinase-Aktivierungskaskaden	5
1.4	Bedeutung des Glutathion	6
1.5	Metabolismus des Glutathion bei AP	7
1.6	Modelle zur Erzeugung von oxidativem Stress im Pankreas <i>in vivo</i>	8
1.6.1	BSO (L-Buthionine-[S,R]-Sulfoximine/Etacrinsäure) -Modell der akuten Pankreatitis	8
1.6.2	Diamid (Azocarboxylsäure-bis-Dimethylamid) -Modell der akuten Pankreatitis	9
1.7	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Versuchstiere	11
2.2	Chemikalien und Material	11
2.3	Apparate	12
2.4	Statistische Analysen	12
2.5	Tiermodelle und Aufbereitung des Pankreasgewebes	13
2.5.1	Etacrinsäure und BSO	13
2.5.2	Diamid	13
2.6	Gewebsprobenaufbereitung und Western Blot Analyse der MAPK-Phosphorylierung	14
2.7	Proteinmessung	16
2.8	Bestimmung des Glutathiongehaltes	17
2.9	Amylase Assay	18
3	Ergebnisse	19
3.1	BSO/EA-Modell	19
3.1.1	Histologie des Pankreas	19
3.1.2	ERK-2 Phosphorylierung	20
3.1.3	p38-Phosphorylierung	22
3.1.4	Gesamtglutathiongehalt	23
3.1.5	Serumamylasegehalt	24

3.2	Diamid-Modell	25
3.2.1	Histologie des Pankreas	25
3.2.2	ERK-2 Phosphorylierung	26
3.2.3	p38-Phosphorylierung	27
3.2.4	Gesamtglutathiongehalt	28
3.2.5	Serumamylasegehalt	29
4	Diskussion	31
5	Literaturverzeichnis	35
6	Danksagung	44
7	Lebenslauf	45
8	Abstract	46

1 Einleitung

1.1 Definition und Ätiologie der akuten Pankreatitis

Unter dem Krankheitsbild „akute Pankreatitis“ (AP) versteht man einen plötzlich auftretenden entzündlichen Prozeß des Pankreas mit Ödembildung und möglicher Mitbeteiligung benachbarten Gewebes oder anderer Organsysteme [Bradley, 1993]. Nach dem heutigen Kenntnisstand stehen hinsichtlich der Ätiologie neben Pankreasgangobstruktionen (etwa 2%) besonders die Gallenwegserkrankungen (etwa 50%) und chronischer Alkoholismus (etwa 20%) im Vordergrund. Metabolische Ursachen wie Hyperkalzämie bei Hyperparathyreoidismus, Urämie und Hyperlipoproteinämie Typ 1 sind eher von untergeordneter Rolle [Lerch und Schmid, 1995]. Operationen, Traumata und Medikamente sind weitere pathogenetische Faktoren [Frayne 1986, Renner 1985]. Die jährliche Inzidenz liegt bei 10-73 Erkrankungen auf 100.000 Erwachsene. Die Krankheit betrifft somit ca. 2% des klinischen Krankengutes [Niederau und Lüthen 1996, Mössner 1998]. Weltweit ist ein Ansteigen der Inzidenz zu beobachten, was auf einen verbesserten Lebensstandard und die damit einhergehende Zunahme ätiologisch relevanter Faktoren, wie vermehrter Alkoholkonsum und hyperkalorische Ernährung mit konsekutiver Gallensteinbildung, zurückgeführt wird. Die höchste Inzidenz findet man bei AIDS-Kranken, von denen bis zu 25% an einer akuten Pankreatitis erkranken [Steinberg, und Tenner, 1994; Schulz et al., 1998].

Abhängig vom Schweregrad der Erkrankung versterben 5-10% aller Patienten mit einer akuten Pankreatitis. Die leichte ödematös-interstitielle Pankreatitis weist eine Letalität von 1-2% auf, während die schweren hämorrhagisch-nekrotisierenden Formen auch heute noch mit einer Letalität von 10-30% behaftet sind [Chetty et al. 1980, Niederau 1996, Steinberg 1987].

1.2 Pathogenese und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis

Im Gegensatz zur Ätiologie ist die *Pathogenese* der akuten Pankreatitis noch immer weitgehend unbekannt. Dies betrifft vor allem die frühen zellulären Ereignisse. Das Konzept der Autodigestion des Pankreas, als Hypothese der Pathogenese, geht davon aus, dass die vom Pankreas selbst produzierten Verdauungsenzyme vorzeitig, das heißt noch im Pankreas selbst, aktiviert werden und konsekutiv eine Selbstverdauung der Drüse bewirken [Schulz et al., 1998]. Neben dieser Idee der Pathogenese werden auch Veränderungen von Sauerstoffradikalbildung [Dabrowski 1988, Lüthen 1995], des Prostaglandinstoffwechsels [Closa 1994], des Zytoskeletts [Tani 1987] und des Energiestoffwechsels [Lüthen 1995] als beteiligte Pathomechanismen angesehen.

Das zentrale *pathophysiologische* Ereignis ist, unabhängig vom Schweregrad, die massive Exsudation von Gewebsflüssigkeit, Plasma und Blut in die Umgebung mit sekundärer Störung der Mikrozirkulation. Bei der nekrotisierenden Verlaufsform der AP führen tryptische Enzyme zu lokalen und systemischen Folgeschäden unter besonderer Beeinträchtigung der Lungenfunktion. Neben der Dysregulation des Kreislaufs und der Entwicklung eines ARDS (adult respiratory distress syndrome) kann es zu einer renalen Insuffizienz, Hypomotilität des Darms sowie schweren metabolischen Entgleisungen kommen [Rünzi und Layer, 1997]. Es besteht ein sepsisähnliches Krankheitsbild, das auf einer primär abakteriell induzierten systemischen Entzündungsreaktion beruht [Bone et al., 1992]. Der Patient zeigt zumeist das klinische Bild eines akuten Abdomens mit Abdominalschmerz, Druckschmerz und diffuser Abwehrspannung. Das Abdomen ist in der Regel gebläht und fakultativ können Erbrechen, Tachykardie, Fieber vorhanden sein [Bradley 1993, Schulz et al. 1998].

Die molekularen und intrazellulär biochemischen Mechanismen der AP sind bis heute nicht eingehend geklärt. Es lässt sich jedoch zeigen, dass unter dem Einfluß oxidativen Stresses Zellreaktionen induziert und charakterisiert werden können. Weiterhin ist bekannt, daß freie Sauerstoffradikale verschiedene intrazelluläre Kinasen, wie mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), aktivieren können [Dabrowski, 1996].

1.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

MAPK gehören zur Gruppe der Serin oder Threonin Proteinkinasen, die Komponenten eines allgegenwärtigen Signaltransduktionsnetzes sind, welches durch eine Vielzahl von verschiedenen Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone und Stressoren aktiviert wird [Schäfer und Williams, 2000]. Bis heute wurden drei wichtige MAPK Untergruppen charakterisiert: Extrazellulär-signal-regulierte Kinasen (ERK), c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) / Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) und p38 [Robinson und Coob, 1997]. Die Aktivität der MAPK ist durch duale Phosphorylierung / Dephosphorylierung von Thr und Tyr der MAP-Kinasen-Kinasen bzw. Proteinphosphatasen reguliert. Die MAPKK werden durch Phosphorylierung, vermittelt durch MAPKKK, aktiviert. Stress-aktivierte MAPK-Signalaktivierungskaskaden können durch die sequentiellen Wirkungen der MAPKKK, MAPKK und MAPK gebildet werden [Schaeffer und Weber, 1999, Kyriakis und Avruch, 2001]. Inaktivierungen der Proteinkinasen werden durch Phosphatasen, wie Ser-Phosphatasen, Tyr-Phosphatasen und duale spezifische Phosphatasen, reguliert. Der Mechanismus der Aktivierung durch duale Phosphorylierung ist unklar, aber es ist anzunehmen, daß diese Phosphorylierung die Struktur der Proteine verändert und ein funktionell anderes Protein entsteht [Keyse, 2000]. MAPK-Phosphorylierungen haben einen wichtigen Einfluß auf das Zytoplasma, den Zellkern, das Zytoskelett und die Membranen. Sie sind beteiligt an der Regulation von Zellwachstum, Apoptose [Xia et al. 1995] sowie Reaktionen durch Umwelteinflüsse [Widmann et al., 1999, Seger et al. 1995, Karin, 1995].

ERK-1 und ERK-2, auch bekannt als p42 und p44 MAPK, sind die am frühesten charakterisierten MAPK und werden durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli und Protoonkogene aktiviert, die eine Proliferation oder erhöhte Zelldifferenzierung bewirken [Widmann et al., 1999, Cobb und Goldsmith, 1995, Anderson et al., 1990]. Auch Wachstumsfaktoren und in geringerem Umfang „zellulärer Stress“ spielen bei der Aktivierung der ERKs eine Rolle [Whitmarsh et al. 1995, Hill et al. 1995, Kyriakis und Avruch, 2001].

Die MAPK p38 sind Homologe der HOG-1 MAPK der *Saccharomyces cerevisiae* [Han et al. 1994, Davis, 1995]. Im Gegensatz zu ERKs, die im Wesentlichen durch Hormone und Wachstumsfaktoren aktiviert werden, werden p38 in vielen Zellen durch Interleukin-1 β (IL-1) und andere unterschiedlichen Stressbedingungen, wie zum Beispiel UV-Strahlung [Keyse, 1995], Hyperosmolarität [Häussinger et al., 1999, Radler-Pohl 1993], Hitzeschock, Tumornekrosefaktor alpha und Lipopolysaccharide aktiviert [Raingeaud et al. 1995, Jiang et al. 1996, Shapiro et al. 1995, Ichijo et al. 1997]. Im Allgemeinen parallel zu den JNKs (c-Jun N-terminale Kinasen), obwohl JNK und p38 über voneinander unabhängige Signalmodule aktiviert werden [Mendelson et al. 1996]. In neuerer Zeit wurde ebenfalls berichtet, daß hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie Granulozyten/Makrophagen-Stimulationsfaktor 1 den p38 MAPK Weg aktivieren [Foltz et al., 1997]. Schäfer et al. haben die Rolle der p38 MAPK bei Cholecystokinin-induzierten Pankreatitismodell untersucht und stellten fest, daß im weiteren Verlauf, durch die Phosphorylierung von small heat shock proteins (Hsp 27), p38 MAPK an der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind [Schäfer et al., 1998]. JNKs und p38 Kinasen sind auch unter dem Begriff SAPKs, Stress-aktivierte Proteinkinasen, bekannt. Ihre Hauptrolle besteht in der Regulation von Proliferation und Apoptose [Schäfer und Williams, 2000]. Einzelne Untersuchungen haben gezeigt, daß p38-MAPK eine aktive Rolle in der Apoptoseinduktion haben [Xia et al. 1995, Graves et al. 1996, Kawasaki et al. 1997, Kummer et al. 1997, Brenner et al. 1997].

Ein hohes Niveau an JNK/SAPK-Aktivität korreliert in vielen Fällen mit dem Einsetzen einer Apoptose [Xia et al. 1995, Chen et al. 1996, Goillot et al. 1997, Yang et al. 1997]. Unter einigen Stressbedingungen, die zur Apoptose führen, ist die ERK-Aktivität unterdrückt. Dies führte zur Auffassung, daß das Gleichgewicht zwischen JNK/SAPK- und ERK-Aktivitäten ein Schlüsselfaktor zur Regulation der Apoptose ist [Xia et al. 1995].

1.3.1 Intrazelluläre MAP-Kinasen-Aktivierungskaskade

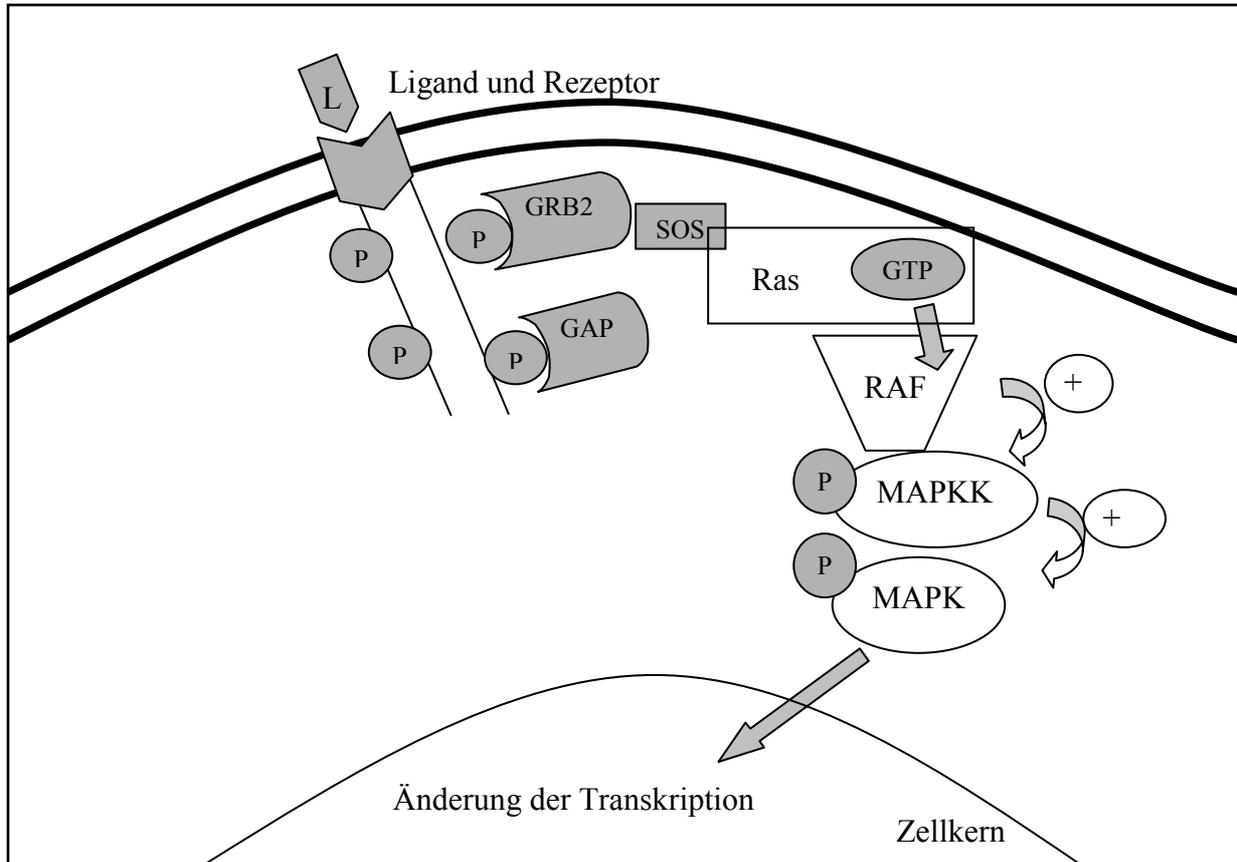


Abbildung 1: Intrazelluläre MAP-Kinasen Aktivierungskaskade. (Modifiziert nach Waskiewicz und Cooper, 1995 und Widmann et al., 1999).

Die intrazelluläre MAP-Kinasen-Aktivierungskaskade wird durch eine Phosphorylierungskaskade reguliert. Nach Bindung des Liganden (L) werden spezifische Thyrosylreste der jeweiligen Rezeptoren phosphoryliert und dienen dann als Bindungsstellen einer Reihe von Adapterproteine. Diese verfügen hierzu über eine sogenannte SH₂-Domäne, die ursprünglich in der viralen src-Kinase entdeckt wurde. Für die Induktion der für die mitogenen Antwort verantwortlichen Gene ist dabei die MAPK von besonderer Bedeutung.

Aktiviert wird Ras durch einen mehrstufigen Vorgang: das Adapterprotein bindet über eine SH₂ Domäne an den aktivierten Rezeptor (Grb2) und bindet dann ein als SOS (= engl. Son of sevenless, nach einem verwandeten Protein bei *Drosophila*) bezeichnetes Protein, das an einem in die Membran integrierten Ras-Protein zu einem Austausch von GDP gegen GTP führt. GTP-Ras ist ein Aktivator einer als Raf bezeichneten Proteinkinase, die das erste Glied in einer Kaskade von Proteinkinasen darstellt. Nachfolgend werden MAPKK dual phosphoryliert [Post und Brown, 1996, Davis, 1993].

1.4 Bedeutung des Glutathion

L- γ -Glutamyl-L-Cysteinylglycine (GSH), welches einen der wichtigsten Defensivmechanismen der Zelle gegen oxidativen Stress darstellt und als ubiquitäres Molekül unter anderem auch in der Pankreaszelle vorhanden ist, misst man eine wesentliche Bedeutung bei der Abwehr oxidativen Stresses bei [Lüthen 1995].

GSH ist das wichtigste intrazelluläre Thiol. Aufgrund seiner geringen Anzahl an Aminosäuren wird es als Nicht-Proteinthiol bezeichnet, und unter Verbrauch von ATP aus seinen drei Aminosäurebestandteilen synthetisiert [Meister und Tate, 1976]. Das Tripeptid Glutathion hat Funktionen im γ -Glutamyl-Zyklus, bei reduktiven Prozessen der Proteinsynthese, im Rahmen der Strukturbildung der DNA, als Coenzym, als Konjugatbildner und als Bestandteil metabolischer Produkte, wobei die Prostaglandine hervorzuheben sind. Zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zum Glutathion haben gezeigt, daß 90% des im Plasma vorkommenden Glutathions (20-30 μ M) aus der Leber stammen [Githens 1991]. Von diesen werden etwa 2/3 in der Niere und ein weiterer Teil im Pankreas metabolisiert. Nur ein Bruchteil des GSH wird intakt in die Zelle aufgenommen. Ein weiterer Teil des Glutathions gelangt nach Hydrolyse durch die basolaterale γ -Glutamyltransferase (γ GT) in die Zelle. Der Hauptanteil des Glutathions wird nach Aufnahme der Aminosäuren neu synthetisiert [Githens 1991]. Für die Pankreaszellen wird ein hoher Glutathionumsatz angenommen. Dies bedeutet, daß einer raschen Biosynthese ein ebenso rascher Metabolismus gegenüber steht. An beiden Zellprozessen sind im Pankreas unter anderem die Glutathiontransferase [Mannervik 1980] und die Glutathionoxidoreduktase beteiligt [Githens 1991].

In Untersuchungen an Tumorzellen kann gezeigt werden, daß Trypsin nach Zugabe von thiolhaltigen Molekülen in seiner Aktivität gehemmt werden kann [Steven 1978]. Die Aufrechterhaltung des Redoxpotentials zwischen der reduzierten Form des Glutathion (GSH) und der oxidierten Form des Glutathions (GSSG) hat wesentlichen Einfluß auf verschiedene Zellfunktionen [Hwang 1992]. Dabei beträgt das Verhältnis zwischen GSH und GSSG im Zytoplasma der normalen Pankreaszelle etwa 30-100:1 [Lüthen 1995, Neuschwander-Tetri 1996, Lüthen 1997] Im mitochondrialen Glutathionpool ist der Quotient deutlich zugunsten des GSSG verschoben [Jocelin 1975].

Es ist bekannt, daß es zumindest teilweise durch freie Sauerstoffradikale zu einer Depletion von GSH und Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen (ERKs) kommt, und zum anderen zu frühzeitigen Veränderungen der intrazellulären Vorgängen, die den Grad der Azinuszellschädigung (Nekrose/Apoptose) bestimmen [Dabrowski, 1996]. Beide Prozesse könnten über intrazelluläre Prozesse und Signaltransduktionsketten mit einander verbunden sein. Daneben führt aber auch die Induktion einer Thiol-Redox-Imbalance – auch ohne Einwirkung freier Radikale – zu einer Aktivierung von ERK und JNK in HeLa-Zellen [Rhoads, 2000].

1.5 Metabolismus des Glutathion bei AP

Im Vergleich zu den pathophysiologischen und klinischen Veränderungen im Verlauf der AP, wie beispielsweise der Anstieg der Amylaseaktivität im Serum, die intrazelluläre Vakuolenbildung, die Mitochondrienschwellung oder der Nachweis von Trypsinogen-Aktivierungs-Peptid (TAP), als Hinweis auf eine vorzeitige Trypsinaktivität, entsteht ein GSH-Abfall bei den bisher durchgeführten Untersuchungen sehr früh. Ein GSH-Abfall ist bereits innerhalb der ersten Stunde nach Einsetzen der AP zu erkennen [Lüthen 1995 und 1997]. Die große Gruppe der thiolhaltigen Proteine, die in reduzierter Form vorliegen und die aus cysteinreichen Proteinen bestehen, sind neben Glutathion der zweite wichtige Thiolpool der Pankreaszelle. Die freien, reduzierten Thiolgruppen können direkt oder durch enzymatische Katalysatoren oxidiert werden. Eine solche Oxidation könnte zum Beispiel durch einen hohen Gehalt an Sauerstoffradikalen und Peroxiden verursacht werden. Dieser, auch als „oxidativer Stress“ bezeichnete Prozeß, tritt in der Frühphase

einer AP auf [Dabrowski 1990, Schulz 1994]. Ein Ungleichgewicht im Glutathionstoffwechsel, bedingt durch eine erhebliche Oxidation des GSH oder Sistieren der Synthese, könnte zu einer Dysregulation des oxidoreduktiven Stoffwechsels der Zellen führen [Niederau 1992]. Störungen des Zellmetabolismus haben zur Folge, daß strukturelle [Carbonera 1988] sowie funktionelle [Jaeschke 1992] Defekte entstehen, weil auch die als Enzymbestandteile vorliegenden reduzierten Thiole durch Oxidation strukturelle Änderungen erfahren [Karoui 1996].

Die Gegenwart von GSH und vielen Glutathion-umsetzenden Enzymen im Pankreasgewebe legt nahe, daß die oben erwähnten Funktionen auch für die Pankreaszelle von Bedeutung sind. Denn besonders hier hat GSH weitere Funktionen für eine einwandfreie Protein-Tertiärstruktur im endoplasmatischen Retikulum und die Stimulus-Sekretionskopplung [Hwang et al., 1992, Stenson et al. 1983]. Störungen dieser Funktionen könnten an der Pathophysiologie der AP beteiligt sein.

1.6 Modelle zur Erzeugung von oxidativem Streß im Pankreas *in vivo*

1.6.1 BSO/EA (L-Buthionine-[S,R]-Sulfoximine/Etacrynsäure) - Modell der akuten Pankreatitis

In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Modelle zur experimentellen Erzeugung oxidativen Stresses verwendet. Im ersten Modell, hier BSO/EA genannt, wird L-Buthionine-[S,R]-Sulfoximine (BSO) und Etacrynsäure (EA) verwendet.

BSO ist ein Analog des Methionin-Sulfoximin (MSO), eines effektiven Inhibitors der GSH-Biosynthese, welcher wahrscheinlich wegen Mangels an Spezifität bezüglich potenter Glutamin-Synthese-Inhibition sehr toxisch ist. Folglich wurden Analoge der MSO für die Spezifität der GSH-Inhibition und Aktivität synthetisiert und ausgewertet. BSO war das meist spezifischste und am wenigsten toxische Analogon [Griffith und Meister, 1983]. Es ist eine synthetische Aminosäure, die durch irreversible Inhibition der γ -Glutamylcysteinsynthase die Glutathionspeicher erschöpft. Die Hemmung dieses Enzyms ist ein kritischer Schritt in der Glutathionbiosynthese [Bailey 1998]. Frühe *in vivo* Versuche mit BSO konzentrierten sich auf die Effekte der einmaligen oder mehrfachen intraperitonealen (i.p.) Injektion. Kramer et al. untersuchten diese Effekte der ip Injektion

bei männlichen Mäusen [Kramer et al. 1987]. Frühere Versuche mit BSO bei Mäusen *in vivo* (Lüthen et al, 1994) zeigten eine GSH-Depletion im Pankreas ohne eine Pankreatitis auszulösen.

EA ist ein stark wirkendes Diuretikum. Im Bereich des gesamten Nephrons wird die Natrium-Resorption gehemmt, die Kalium-, Ammonium- und Säureausscheidung gesteigert, was zu einer hypochlorämischen Alkalose führen kann. In der Wirkungsweise zeigt es Parallelen zum Schleifendiuretikum Furosemid (Lasix[®]), ist aber chemisch nicht mit dieser Stoffklasse verwandt. Das als Thiolreagenz wirkende Diuretikum EA hat wegen seiner zum Teil irreversiblen Effekte, wie z.B. Zellschwellung, und Nebenwirkungen, hier besonders Hörschäden, in der Humanmedizin als Schleifendiuretikum (Hydromedin[®]) stark an Bedeutung verloren.

Die Kombination von BSO und EA soll den GSH-Gehalt auf ein Minimum herabsetzen und dadurch pankreatitis-artige Veränderungen hervorrufen [Lüthen 1994].

1.6.2 Diamid (Azocarboxylsäure-bis-Dimethylamid) - Modell der akuten Pankreatitis

Das thiol-oxidierende Agents, Diamid, $(\text{CH}_3)_2\text{NCON}=\text{NCON}(\text{CH}_3)_2$, zeigte stöchiometrisch die Oxidation von Glutathion (GSH) in sein Disulfid (GSSG) in der humanen roten Blutzelle und anderen Säugetierzellen. Nach Inkubation mit Glucose bei 37°C besteht bei Erythrozyten, nach kompletter Regeneration von GSH, keinerlei Störung der zellulären Funktion und keinerlei Veränderung von Hämoglobin, osmotischer Stabilität oder Zelldichte [Kosower et.al. 1969]. Eine Behandlung mit Diamid greift nicht in die normale Zellfunktion ein. Kosower et al. bewiesen eine annähernd komplette Regeneration von GSH nach Diamid Gabe. Diamid ist somit ein geeignetes Reagenz der intrazellulären Glutathion-Oxidation in einer Vielzahl biologischer Systeme.

1.7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Aktivierung von MAPK in Pankreasgewebe unter Einfluß induzierten oxidativen Stresses *in vivo* zu untersuchen. Wir konzentrierten uns hierbei auf die Aktivität von ERK-2 und p38-Kinasen. Hierzu wurde bei Mäusen mit BSO/EA sowie Diamid oxidativer Streß erzeugt, um Zeitpunkt und Ausmaß einer Aktivitätsänderung dieser Signaltransduktionsmechanismen zu charakterisieren. Zudem wird die Auswirkung dieser Modelle auf den Glutathiongehalt und die Serumamylase in Pankreasgewebe untersucht. Diese Aktivitätsänderungen sollten dann mit den histologischen Veränderungen korreliert werden.

2 Material und Methodik

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Swiss-Webster-Mäuse der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf, deren Gewicht zwischen 15 g und maximal 20 g lag. Die Tiere wurden unter kontrolliertem Tages-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden gehalten und bei freiem Zugang zu Futter mit einer Altromin 300 R Standarddiät und Wasser ernährt.

2.2 Chemikalien und Material

Antikörper: Monoclonal Anti p38, aktiviert; Monoclonal Anti MAP-Kinase, aktiviert: Sigma Chemical[®], St.Louis, MO, USA.

ECL-Kit: Enhanced Chemiluminescence Kit; Amersham[®], Arlington Heights, IL, USA.

Proteaseinhibitor: Aprotinin, Boehringer Biochemical[®], Mannheim, Deutschland

Nichtionisches Detergenz: Nonidet P40: Boehringer Biochemical[®], Mannheim, Deutschland

Filme: X-OMAT AR Film; BIO MAX Film: Eastman Kodak Company[®], Rochester, NJ, USA.
Hyperfilm: Amersham[®], Arlington Heights, IL, USA.

Membranen: Protran Nitrocellulose Transfermembran: Schleicher & Schuell[®], Dassel, Deutschland.
Trans-Blot Nitrocellulose Transmembran: Bio-Rad[®], Hercules, CA, USA

Salze:	Na ₂ CO ₃ , CuSO ₄ , K-Na-Tartrat, Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, EDTA, EGTA, Na-desoxycholat, NaF, NaCl, PMSF, Na-Orthovanadat-Sodium, Trishydrochlorid, Glycerin,
Standardmarker:	Sigma Marker hochmolekular: Sigma Chemical [®] , St.Louis, MO, USA. Kaleidoscop prestained Standard: Bio-Rad [®] , Hercules, CA, USA.

Alle übrigen Substanzen wurden in höchstmöglichem Reinheitsgrad von den kommerziellen Herstellern bezogen.

2.3 Apparate

Milligrammwaage (Mettler[®]); Spektralphotometer (Beckman[®] DU-40); Elektrophoresis Contant Power Supply (Bio-Rad[®] Power Pac 300); Blot Transfer-Kammer (Bio-Rad[®] TransBlot TM), Röntgenfilmentwickler (3M[®] XP 2000), Densitometer (Herolab[®], Wiesloch), Scanner (Umax[®] 2000P)

2.4 Statistische Analysen

Alle Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Jede angegebene Tabelle enthält die Kontrollgruppe sowie die zugehörigen Gruppen aus Versuchsergebnissen. Die Signifikanz der Daten wurde mit dem Programm SigmaPlot[®] 4.0 (SPSS Inc.) berechnet. Mit Hilfe des t-Testes für ungepaarte Stichproben wurde der Mittelwert der Versuchsergebnisse auf Ihre statistische Signifikanz untersucht. Sofern nicht anders erläutert, dienen die Kontrollgruppen als Bezugsgröße. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in den Abbildungen mit * versehen. $P < 0.01$ wurde demnach mit **, $p < 0.001$ mit *** dargestellt.

2.5 Tiermodelle und Aufbereitung des Pankreasgewebes

2.5.1 Etacrynsäure und BSO

Den Versuchstieren, Swiss-Webster-Mäusen, wurde in einer 24 h Vorbehandlungsphase 10 mM Buthioninsulfoximin (BSO) Lösung ins Trinkwasser gegeben. Dies entspricht 2,23 g BSO pro 1000 ml Trinkwasser [Martenson et al. 1990]. Anschließend wurde den Tieren 1,5 mg Etacrynsäure (EA) einmalig intraperitoneal injiziert. EA wurde mit phosphatgepuffertes physiologischer Kochsalzlösung gelöst, mit 0,5 M NaOH neutralisiert (pH von 7), ultraschallbehandelt und steril gefiltert. Diese Standarddosis wurde in je 150 µl Volumenanteilen verabreicht. Zum Zeitpunkt ¼; 1; 6 und 24 Stunden nach Injektion und Gabe wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und das entnommene Pankreasgewebe rasch von Blutkoageln, Fett, Lymphknoten, Gefäßen und Bindegewebe befreit. Nach vorsichtiger Spülung wurde das Pankreasgewebe mit einer Schere in gleichgroße Stücke (Pellets) zerkleinert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Arterio-venöses Mischblut wurde asserviert und in Form von Serumproben eingefroren. Die mitgeführten Kontrolltiere erhielten weiterhin das normale Laborfutter und wurden nach ansonsten gleichem Versuchsaufbau, jedoch ohne BSO-Gabe, behandelt.

2.5.2 Diamid (Azocarboxylsäure-bis-Dimethylamid)

Für das Diamid-Modell wurde Swiss-Webster-Mäusen einmalig 10 mg Diamid subcutan injiziert. Diese Standarddosis wurde in 100 µl Volumenanteilen einer steril gefilterten PBS-Lösung (phosphate buffered saline) verabreicht. Zum Zeitpunkt 5; 15; 60 und 360 Minuten nach Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und Pankreasgewebe entnommen. Die Gewebsproben und Blutproben wurden in der oben geschilderten Weise weiterverarbeitet. Kontrolltiere wurden, ohne Diamid Injektion, unter gleichen Versuchsbedingungen und Versuchsaufbau behandelt.

2.6 Gewebeprobenaufbereitung und Western Blot Analyse der MAPK-Phosphorylierung

Der Western Blot wird zur Detektion von Proteinen angewandt. Die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht in einer SDS/PAGE aufgetrennt und auf einer Nitrocellulosemembran geblottet. Auf der Membran fixierte Proteine können nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Ein Teil des gewonnenen Pankreasgewebes wurde nach Formalin-Fixierung von einem erfahrenen Pathologen des Instituts für Pathologie (M.S.) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, der nicht über die Identität der Proben informiert wurde, histologisch ausgewertet.

Für die MAPK-Bestimmung wurde ein weiterer Teil der gewonnenen Pellets mit 1 ml Lysispuffer versetzt und mit Hilfe eines Stößels zerkleinert. Die Zellysate wurden bei 4 °C mit 10.000 U/min für 15 min zentrifugiert und die Überstände aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Ein Teil wurde für die Proteinbestimmung nach Lowry verwendet. Ein weiterer Teil wurde nach der Methode von Laemmli aufbereitet (Laemmli, 1970). Dazu wurden die Zellextraktionen mit gleichen Volumen 2x SDS-Loadingpuffer [50 µl SDS Laemmli, 27 µl Mercapto-Ethanol, 127 µl 0.2 % Bromphenolblau] versetzt und bei 95 °C für 5 min gekocht. Davon wurden 20-40 µl auf ein SDS-Gel (4,5 % Sammelgel, 8 % bzw. 10 % Trenngel) sowie ein Proteingewichtsmarker aufgetragen. Die angegebenen Resultate sind Daten aus jeweils n=3 bis 5 Versuchsansätzen. Zusätzlich wurde eine Positiv-Kontrolle einer Anisomycin-Probe aufgetragen. Die Proteine wurden mit einer konstanten Spannung von 150 V und 40-70 mA über 3-4 Stunden aufgetrennt und anschließend bei 15 V und 240-400 mA über 1 Stunde auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Harlow und Lane, 1988). Das Blocken der Membran erfolgte mit 5 % BSA/PBS und 0,1 % Tween 20 für 1 Stunde. Ein zu 1:250 in 1 % BSA/PBS und 0,05 % Tween 20 verdünnter Maus Anti-MAPK-activated-Antikörper oder ein Anti-p38-activated-Antikörper wurde auf der Membran bei 4 °C über Nacht belassen. Nach dreimaligem 10-minütigem Waschen mit 1% BSA/PBS und 0,05 % Tween 20 wurde die Membran mit 1:6000 in 1 % BSA/PBS in 0,05 Tween 20 verdünntem und Peroxidase gebundenem Goat-Anti-Maus-IgG-Antikörper bei 4 °C 1-2 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem, 10-minütigem Waschen mit 1 % BSA/PBS und 0,05 % Tween 20 wurde die Membran mit einem Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit (Abbildung 3) behandelt und in einer Dunkelkammer auf

einem Amersham Hyperfilm oder Kodak® X-OMAT AR Film entwickelt. Die Belichtungszeit entsprach dabei den Angaben der Filmhersteller.

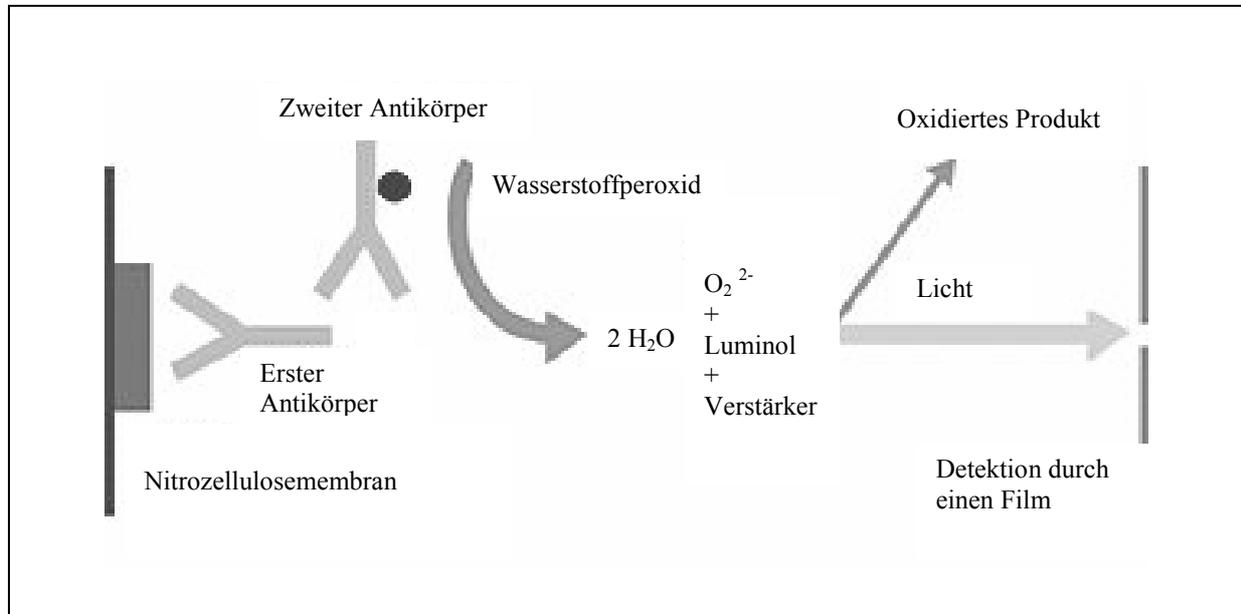


Abbildung 2: zeigt Prinzip des ECL-Kits. Der erste Antikörper bindet z.B. an die dual phosphorylierten p38-Kinasen auf der Nitrocellulosemembran. Ein zweiter Antikörper greift an und durch eine chemische Reaktion mit Wasserstoffperoxid entsteht Wasser, Sauerstoff und ein Luminol. Durch Abspalten eines oxidierten Produktes entsteht Licht, das eine Belichtung des aufgelegten Films bewirkt.

2.7 Proteinmessung

Proteinkonzentrationen in den Proben wurden nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) gemessen. Als Berechnungsstandard diente Rinderserumalbumin.

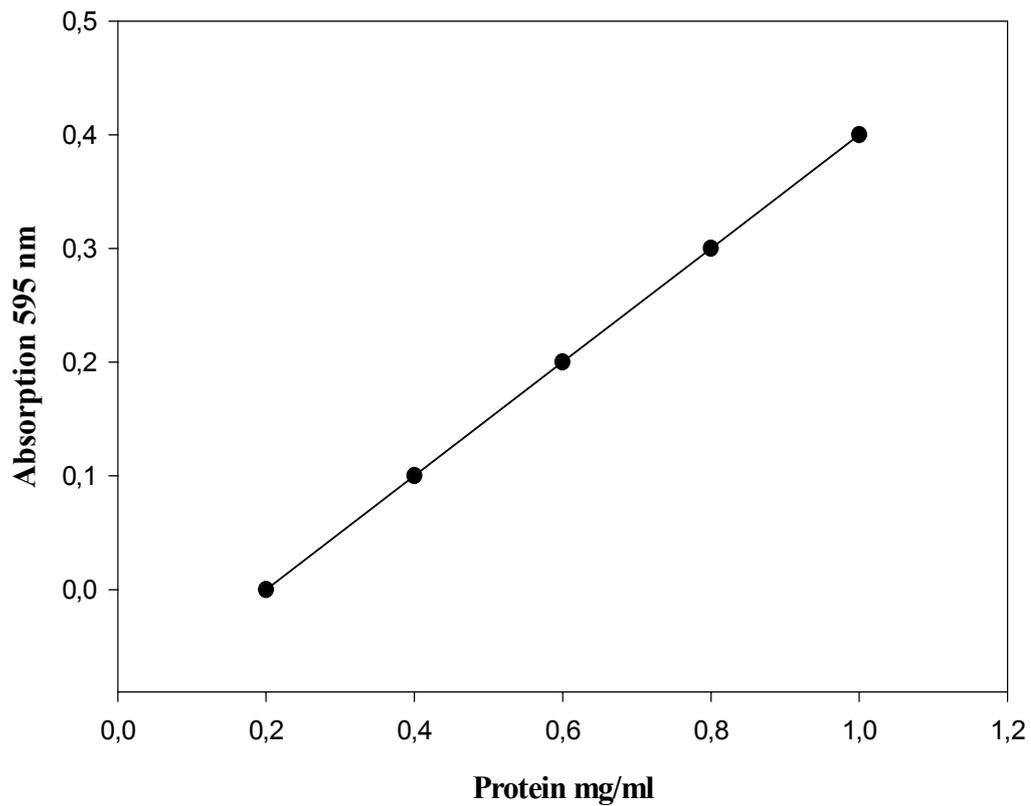
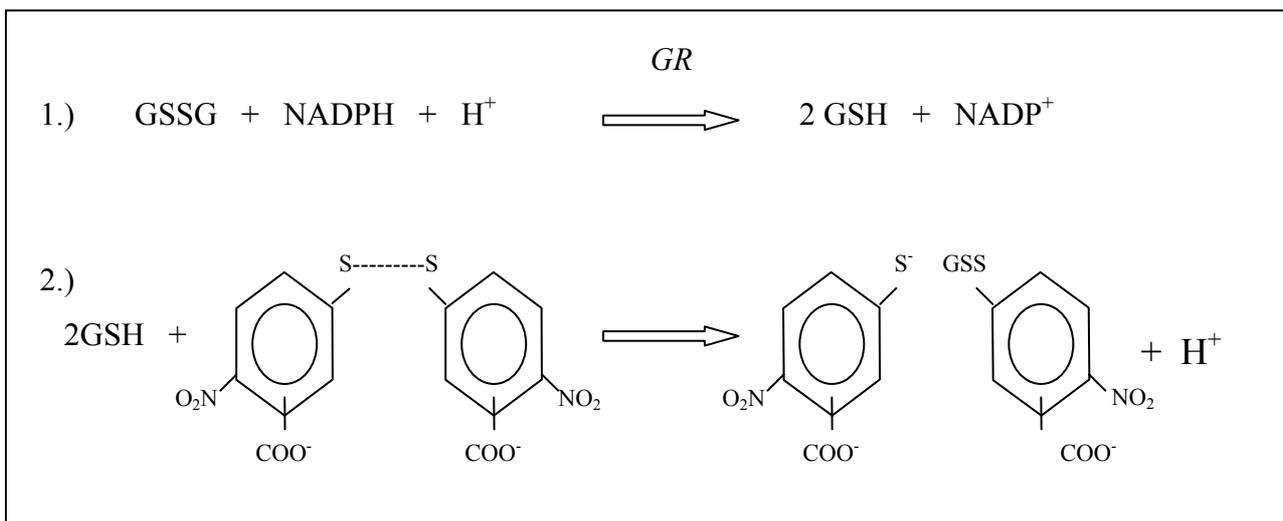


Abbildung 3: Standardgerade von Rinderserumalbumin. Aufgetragen ist die Proteinmenge in mg pro ml gegen die Absorption bei 595 nm

2.8 Bestimmung des Glutathiongehaltes

Die Bestimmung des Glutathiongehaltes wurde mit einer modifizierten Methode nach Tietzke (1969) durchgeführt. Dieser Test beruht auf zwei Reaktionen: 1.) Der Glutathionreduktase (GR) katalysierten Reduktion von oxydiertem Glutathion (GSSG) und 2.) der Reaktion von reduziertem Glutathion (GSH) mit 5-5'-Dithio-bis (2-Nitrobenzoesäure) (DTNB):



Für diesen Test wurden Pellets wie unter 2.5 beschrieben aufgearbeitet und die zytosolischen Fraktionen geteilt und getrennt weiterbehandelt. Die eine Hälfte wurde nach Neutralisation mit KOH für die Bestimmung des totalen Glutathiongehaltes eingesetzt, die andere Hälfte wurde nach Anheben des pH-Wertes auf 8,0 mit 25 mmol/l NEM (n-Ethylmaleimid) versetzt. NEM reagiert mit reduziertem Glutathion und blockiert die Sulfhydrylgruppe, so daß dieses nicht mehr mit DTNB reagieren kann (Sacheata et al., 1986).

Für die Bestimmung des Glutathiongehaltes wurde in einer Küvette 700 µl NADPH-Lösung (280 µmol/l NADPH, 6 mmol EDTA und 120 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,5) vorgelegt. 100 µl (für die GSH-Bestimmung) bzw. 500 µl Probe (für die GSSG-Bestimmung) sowie 100 µl DTNB (6 mmol/l in 100 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,5) wurden hinzugegeben und die Küvette 5 min bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde

durch Zugabe von 0,5 U/Reaktionsansatz Glutathionreduktase gestartet und die Extinktionszunahme der Lösung bei 412 nm über 4 min aufgezeichnet.

2.9 Amylase Assay

Nach Zentrifugieren wurde der Überstand mit einem blau gefärbten, durch Quervernetzung wasserunlöslichen Stärkepolymer 15 min lang bei 37 °C inkubiert. Das Stärkepolymer wurde dabei in der Gegenwart von α -Amylase zu wasserlöslichen Fragmenten hydrolysiert. Durch Zugabe von NaOH (0,1 mol/l) wurde die Reaktion abgebrochen. Die Lösungen wurden zentrifugiert (10 min / 1500 g) und die Extinktion des Überstandes bei 620 nm spektrophotometrisch bestimmt. Die Extinktion ist dabei direkt von der Aktivität der α -Amylase in der Probe abhängig und konnte über eine Standardkurve in Aktivitätswerte umgerechnet werden.

3 Ergebnisse

3.1 BSO/EA - Modell

3.1.1 Histologie des Pankreas

	Nekrosen	Entzündungen
BSO/EA 0 min.	0	0
BSO/EA 15 min.	5%	< 5%
BSO/EA 1 h	5%	< 5%
BSO/EA 6 h	5-15%	0
BSO/EA 24 h	5-15%	0

Tabelle 1: Tabellarische Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse nach BSO/EA Gabe. Angaben der histopathologischen Untersuchung ab Beginn der Fütterung der Diät und Injektion von EA. Die Prozentangaben beziehen sich auf das mikroskopische Gesichtsfeld.

Bereits nach 15 min kann eine diskrete Gewebnekrose des Pankreas festgestellt werden, die sich bis 24 Stunden nach Versuchsbeginn verstärkt. Die Nekrosenbildung, 6 h bzw. 24 h nach Versuchsbeginn, betrifft 5-15 % des Gesichtsfeldes. Histologisch finden sich 15 min nach Versuchsbeginn nur sehr diskrete Entzündungszeichen, die sich auch noch 1 h nach Versuchsbeginn zeigen. Bei längerer Versuchsdauer zeigen sich keine Entzündungszeichen mehr.

3.1.2 ERK-2 Phosphorylierung

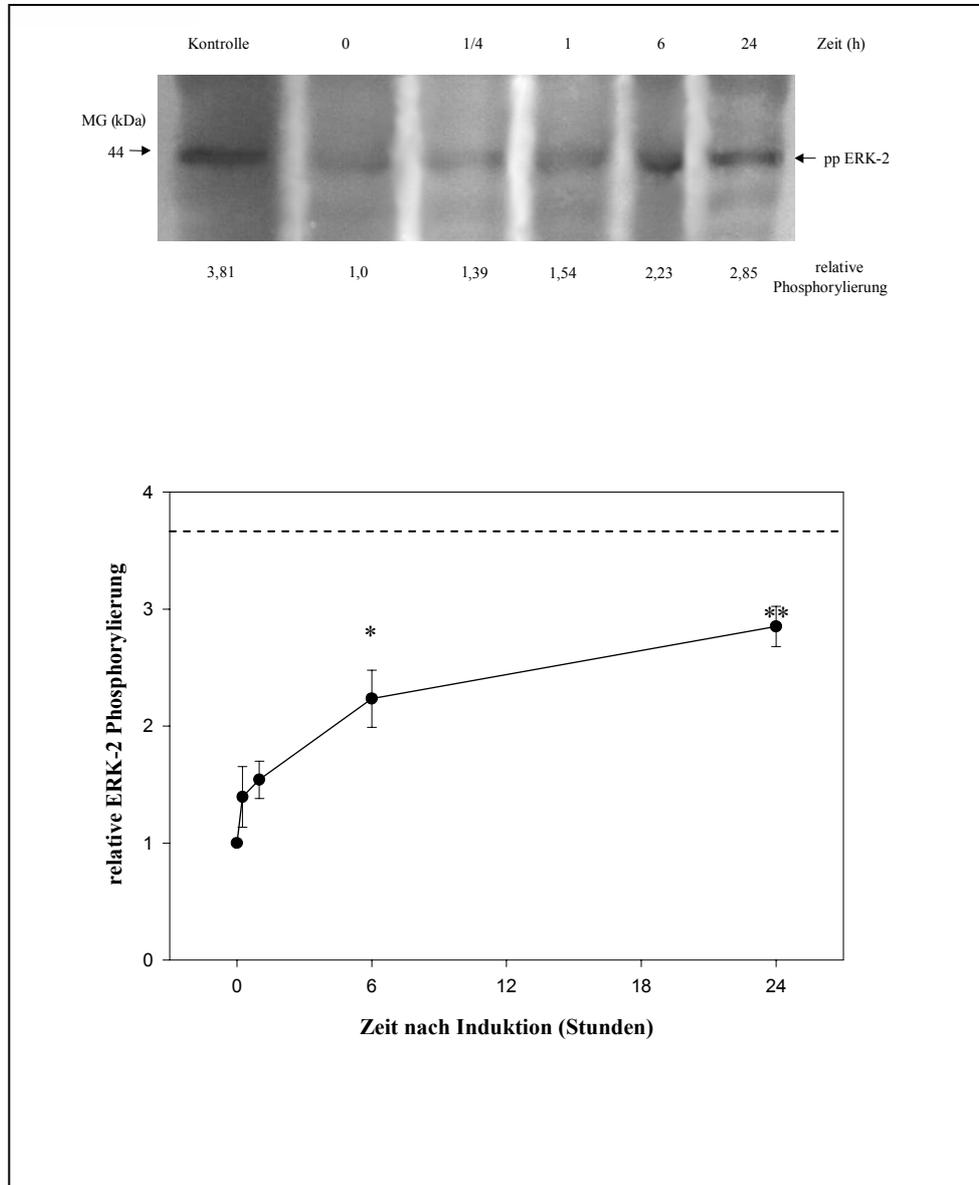


Abbildung 4.1: Phosphorylierung von ERK-2 nach BSO/EA Gabe in Pankreasgewebe nach Extraktion und Aufbereitung auf einer Nitrocellulosemembran. Die relative Phosphorylierung von ERK-2 ist grafisch dargestellt. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm Standardfehler. Die Signifikanz bezieht sich auf die mitgeführte 0 Std. Probe. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in den Abbildungen mit * versehen. $P < 0.01$ wurde demnach mit **, $p < 0.001$ mit *** dargestellt. Die Positiv-Kontrolle (Anisomycin) ist mit ---- gekennzeichnet.

Um festzustellen, ob ERK-2 durch BSO/EA aktiviert werden, untersuchten wir die Kinasen-Phosphorylierung in Zellysaten, die mit BSO/EA induziert wurden, gegenüber Zellysaten bei 0 h (Kontrolle). Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, wurde eine zeitabhängige BSO/EA vermittelte Steigerung der ERK-2 Phosphorylierung detektiert. Die relative Aktivität der Banden ist auch grafisch dargestellt.

Schon $\frac{1}{4}$ h nach Versuchsbeginn ist ein Anstieg der Phosphorylierung von ERK-2 gegenüber dem Kontrollniveau zu beobachten. Nach 1 h ($1,5 \pm 0,1$) wird ein signifikanter Anstieg auf etwa das Doppelte der Phosphorylierung, verglichen mit der Kontrollgruppe, erreicht. Nach weiteren 18 h steigen die Werte der ERK-2 signifikant an und erreichen 24 h nach Versuchsbeginn ihr Maximum. Die Phosphorylierung von ERK-2 ist nach 24 h auf das $2,8 \pm 0,1$ fache gestiegen.

3.1.3 p38-Kinasen Phosphorylierung

Wir untersuchten die Aktivität von p38-Kinasen in Zellysaten *in vivo*, die mit BSO/EA induziert wurden, gegenüber Zellysaten der Kontrollgruppe bei 0 h und einer mitgeführten Positivkontrolle.

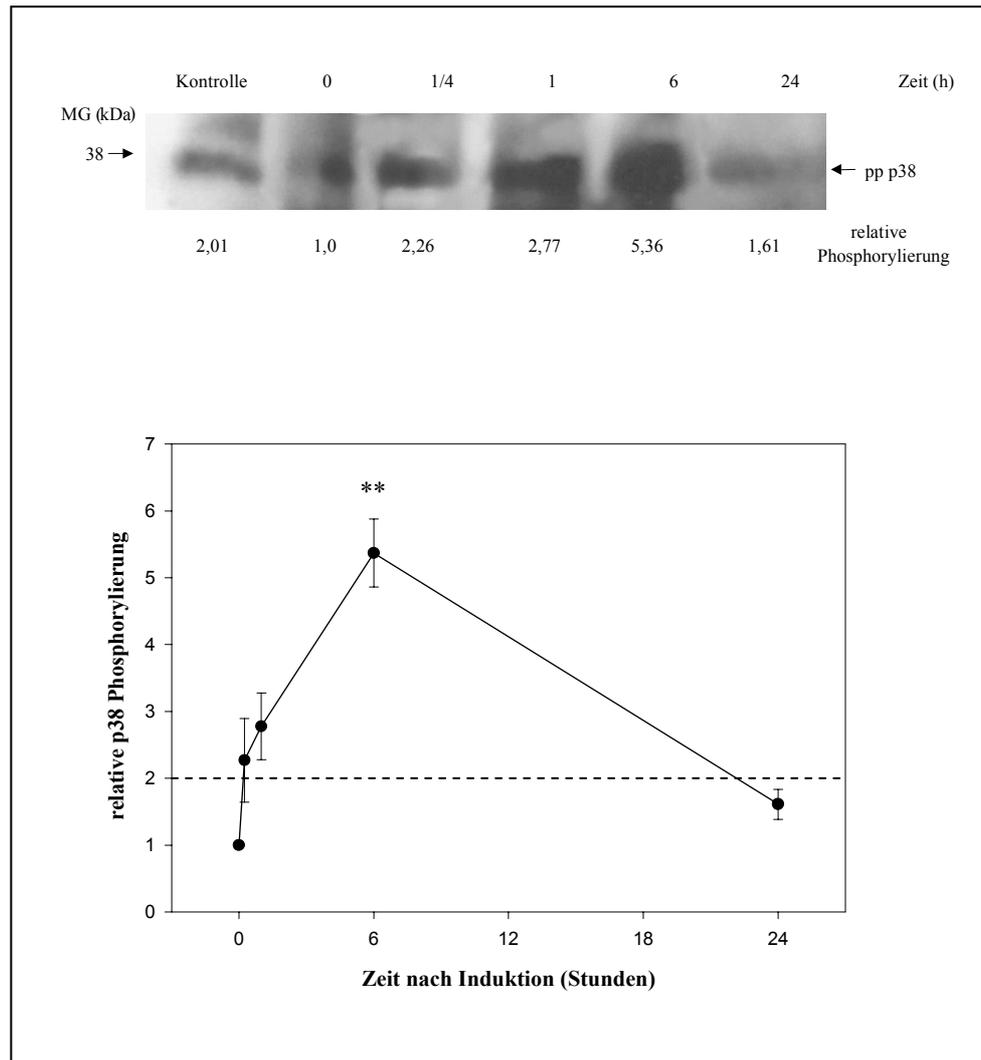


Abbildung 4.2: Phosphorylierung von p38 nach BSO/EA Gabe im Pankreasgewebe nach Extraktion und Aufbereitung auf einem Film. Die relative Aktivität der Banden ist grafisch dargestellt. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm Standardfehler. Die Signifikanz bezieht sich auf die mitgeführte 0 Std. Probe. Die Positiv-Kontrolle (Anisomycin) ist mit ----- gekennzeichnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in der Abbildung mit ** versehen.

Abbildung 4.2 zeigt den Verlauf der Phosphorylierung der p38. Bereits $\frac{1}{4}$ h ($2,2 \pm 0,6$) nach Versuchsbeginn steigen die Werte gegenüber der Kontrollgruppe stark an. Sechs Stunden nach Versuchsbeginn wird nach einem signifikanten Anstieg das Maximum ($5,3 \pm 0,5$) der Phosphorylierung gemessen. Diese Werte sind höher als die Werte der aufgetragenen Positivkontrolle. Bis zum Versuchsende kommt es nach 24 h ($1,6 \pm 0,2$) zu einem Abfall auf Basalniveau.

3.1.4 Gesamtglutathiongehalt

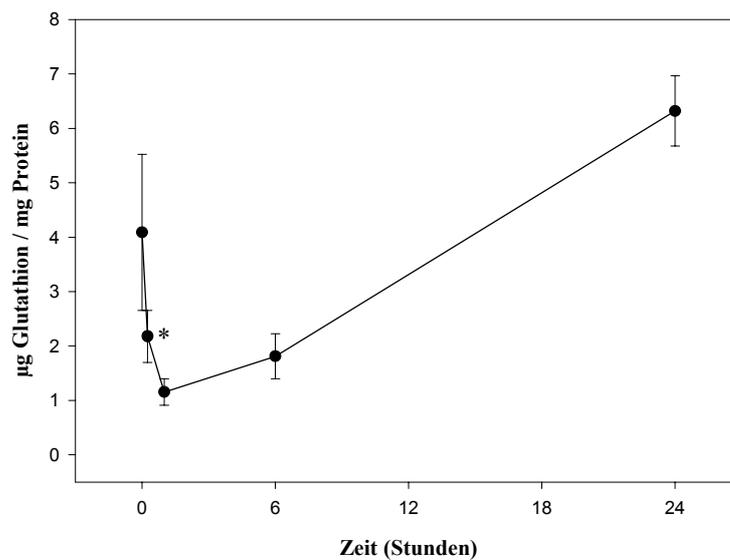


Abbildung 4.3: Gehalt an gesamtem Glutathion nach BSO/EA Gabe *in vivo*. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in der Abbildung mit * versehen.

Der Gehalt des Glutathions nimmt vom Kontrollniveau ($4,1 \pm 1,4 \mu\text{g GSH} / \text{mg Protein}$) zu Beginn des Versuchs kontinuierlich ab und erreicht nach 1 h ein Minimum ($1,1 \pm 0,2 \mu\text{g GSH} / \text{mg Protein}$). Innerhalb der folgenden 6 h kommt es nach pharmakologischer Manipulation von Pankreasgewebe mit BSO/EA zu einem leichten Ansteigen der Gesamtglutathionwerte im Pankreasgewebe. Nach 24 h wird mit $6,3 \pm 0,6 \mu\text{g GSH} / \text{mg Protein}$ ein Maximum der Werte erreicht (Kontrolle: $4,1 \pm 1,4 \mu\text{g GSH} / \text{mg Protein}$). (Abbildung 4.3)

3.1.5 Serumamylasegehalt

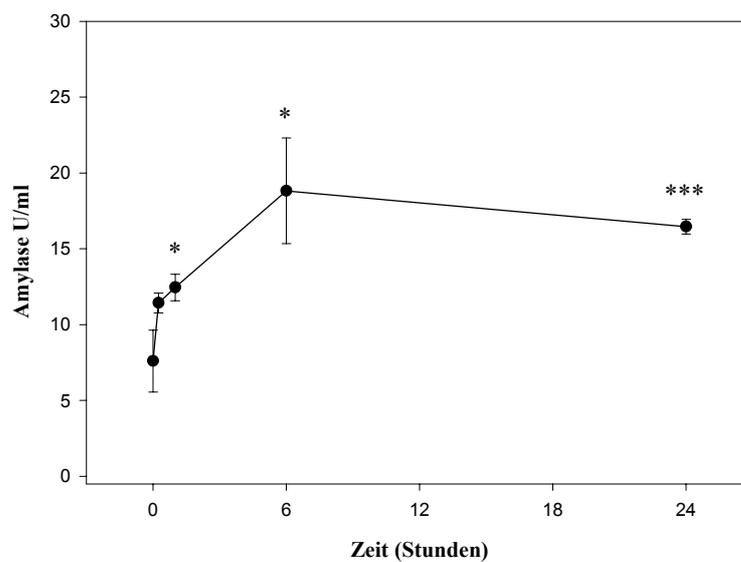


Abbildung 4.4: Gehalt an Serumamylase nach BSO/EA Gabe im Zeitverlauf. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in der Abbildung mit * versehen. $P < 0,001$ wurde mit *** dargestellt.

Der Serumamylasewert steigt im Verlauf der BSO/EA Pankreatitis kontinuierlich an ($\frac{1}{4}$ h: $11,4 \pm 0,6$ U/ml, 1 h: $12,4 \pm 0,9$ U/ml) und erreicht nach einem signifikanten Anstieg nach 6 h sein Maximum von $18,8 \pm 3,4$ U/ml (Kontrolle: $7,6 \pm 2,0$ U/ml). Nach 24 h ist der Gehalt an Serumamylase gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht ($16,4 \pm 0,5$ U/ml).

3.2 Diamid – Modell

3.2.1 Histologie des Pankreas

	Nekrosen	Entzündungen
Diamid 0 min	0	0
Diamid 5 min	< 5%	0
Diamid 15 min	5-15%	0
Diamid 60 min	< 5%	< 5%
Diamid 360 min	0	< 5%

Tabelle 2: Tabellarische Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse der Gruppentiere nach Diamid Gabe. Die Prozentangaben beziehen sich auf das mikroskopische Gesichtsfeld.

Nach 5 bis 15 Minuten treten im Pankreas die ersten minimalen Nekrosebildungen auf, die nach 15 Minuten mit 5 bis 15% maximal ausgeprägt sind, und danach bis zum Versuchsende wieder nahezu vollständig abklingen. Im gleichen Zeitraum von 5 bis 15 Minuten kommt es auch zu einer Ausbildung intrazellulärer Vakuolen in den Azini. Entzündungszeichen hingegen sind in diesem Modell kaum ausgeprägt und auch erst gegen Versuchsende zu finden.

3.2.2 ERK-2 Phosphorylierung

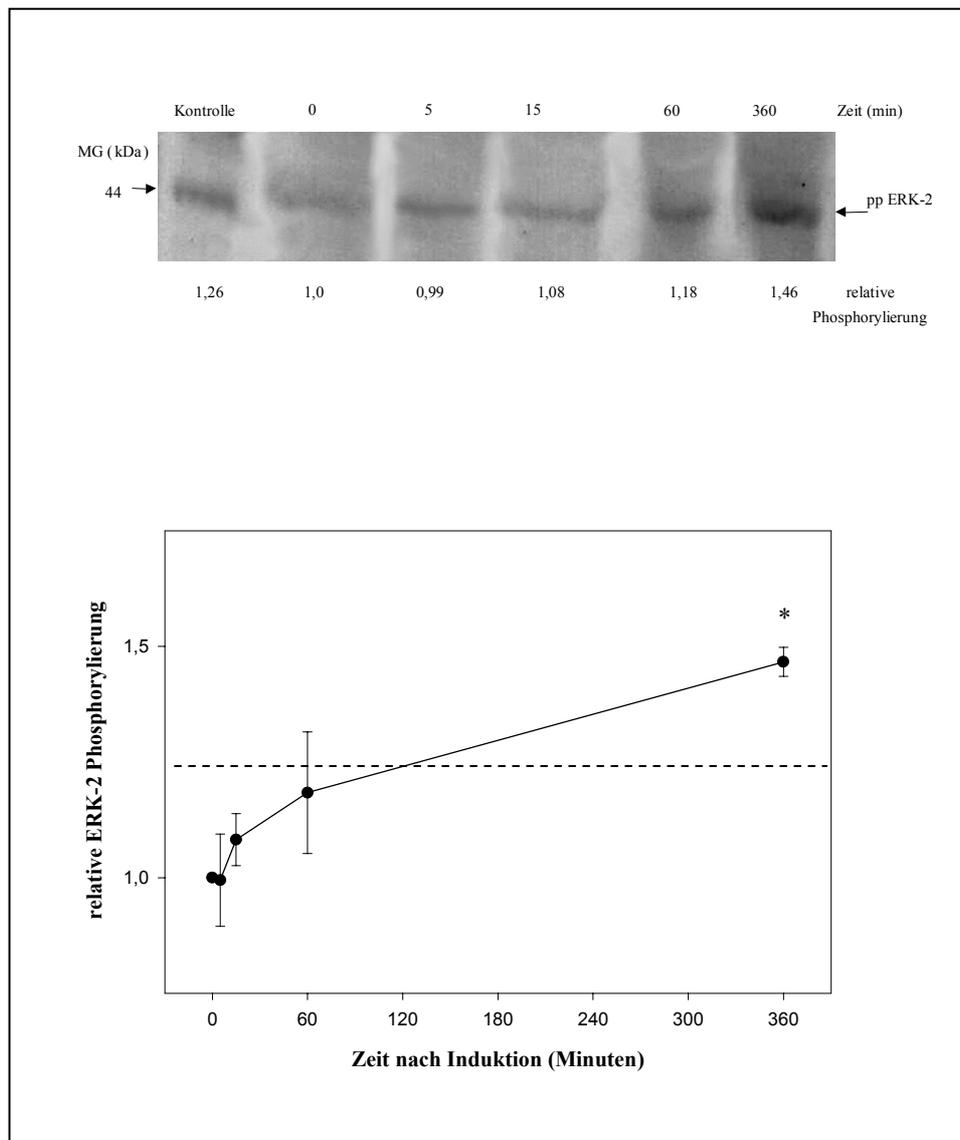


Abbildung 5.1:

Phosphorylierung von ERK-2 nach Diamid Gabe im Pankreasgewebe nach Extraktion und Aufbereitung auf einer Nitrocellulosemembran. Die relative Phosphorylierung der Banden ist grafisch dargestellt. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm Standardfehler. Die Positiv-Kontrolle (Anisomycin) ist mit ----- gekennzeichnet. Die Signifikanz bezieht sich auf die mitgeführte 0 min Probe. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in der Abbildung mit * versehen.

Ausgehend von einem Kontrollwert ist über die Zeit der Untersuchung ein konstanter Anstieg der ERK-2 Phosphorylierung zu beobachten, die nach einem signifikanten Anstieg nach 360 min ihr Maximum erreicht. Der am Versuchsende erreichte Wert ist etwa 1,4 fach höher als der Ausgangswert der Kontrollgruppe. (Abbildung 5.1)

3.2.3 p38-Kinasen Aktivität

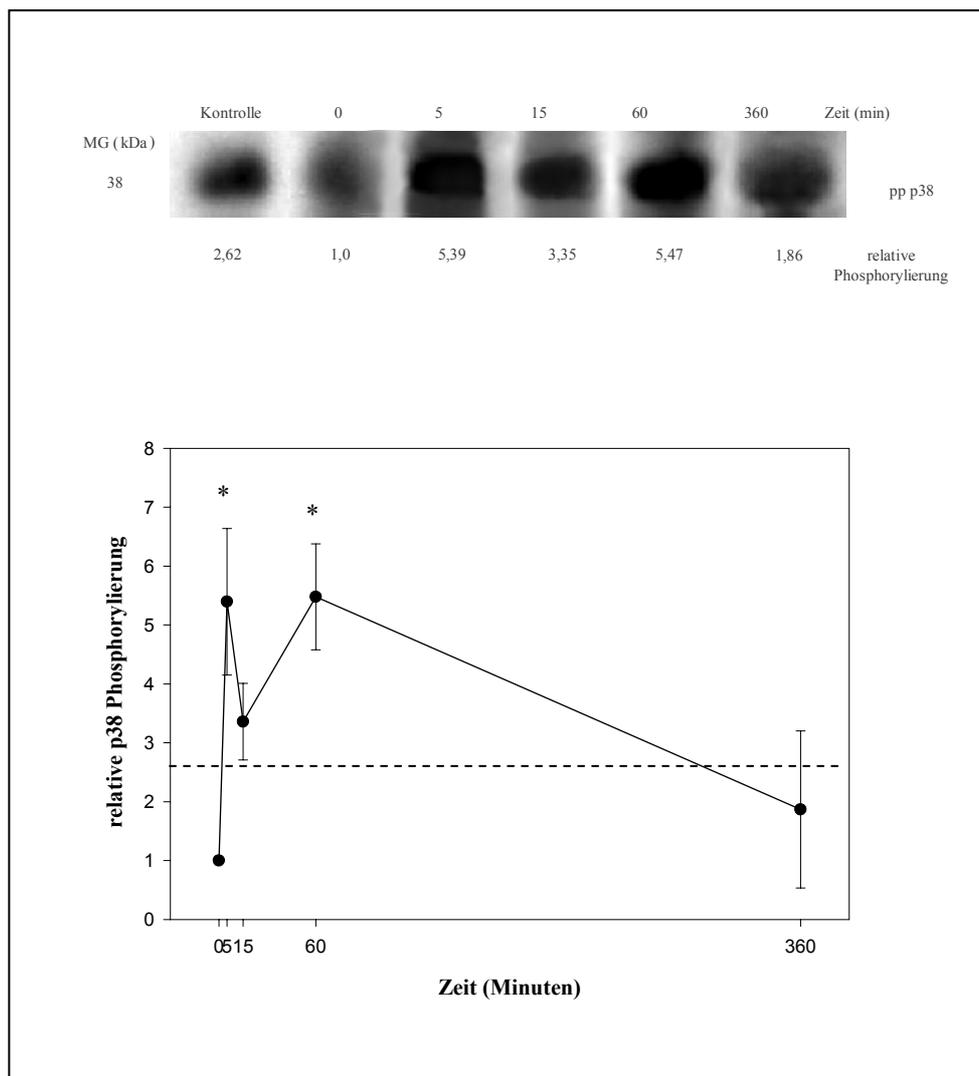


Abbildung 5.2: Phosphorylierung von p38-Kinasen nach Diamid Gabe in Pankreasgewebe nach Extraktion und Aufbereitung auf einem Film. Die relative Aktivität der Banden ist grafisch dargestellt. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm Standardfehler. Die Positiv-Kontrolle (Anisomycin) ist mit ---- gekennzeichnet. Die Signifikanz bezieht sich auf die mitgeführte 0 min Probe. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von

$p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in der Abbildung mit * versehen.

Die Phosphorylierung von p38 zeigt nach Stimulation mit Diamid einen ab- und ansteigenden Verlauf. Bereits 5 min nach Versuchsbeginn steigen die Werte der p38-Kinasen signifikant steil an und erreichen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, einen $5,4 \pm 0,8$ höheren Wert. Nach 15 min kommt es zu einer kurzfristigen Verminderung ($3,3 \pm 1,4$) gegenüber dem Wert nach 5 min. Sechzig Minuten nach Versuchsbeginn kommt es zu einem signifikanten Anstieg. Ein Rückgang auf Normalwerte wird 360 min ($1,8 \pm 0,9$) nach Behandlung der Tiere mit Diamid beobachtet (Abbildung 5.2).

3.2.4 Gesamtglutathiongehalt

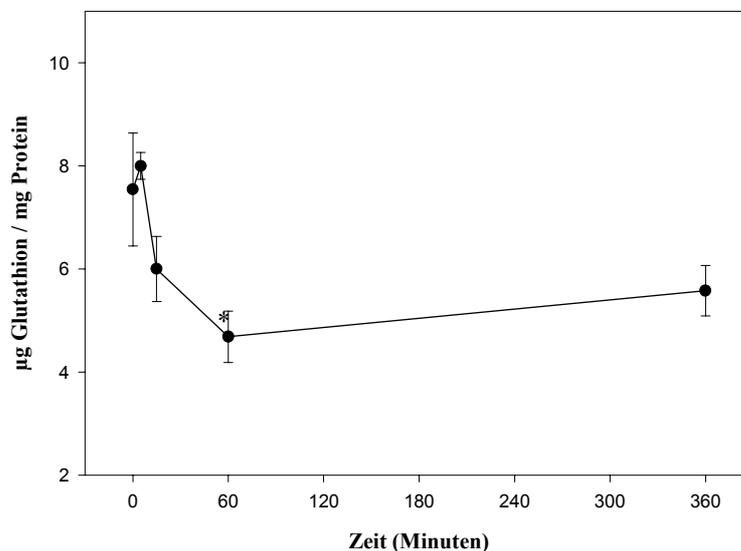


Abbildung 5.3: Glutathiongehalt im Pankreasgewebe. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in der Abbildung mit * versehen.

Zu Beginn des Versuches nimmt der Gehalt an Glutathion vom Kontrollniveau aus kontinuierlich ab und erreicht nach 60 min ein Minimum von $4,6 \pm 0,5 \mu\text{g}$ Glutathion / mg Protein (Kontrolle: $7,5 \pm 1,1 \mu\text{g}$ Glutathion / mg Protein). Nach 60 min ist die Verminderung signifikant. Nach 360 min wird nach einem diskreten Anstieg ein Wert von $5,6 \pm 0,5 \mu\text{g}$ Glutathion / mg Protein gemessen (Abb.5.3).

3.2.5 Serumamylasegehalt

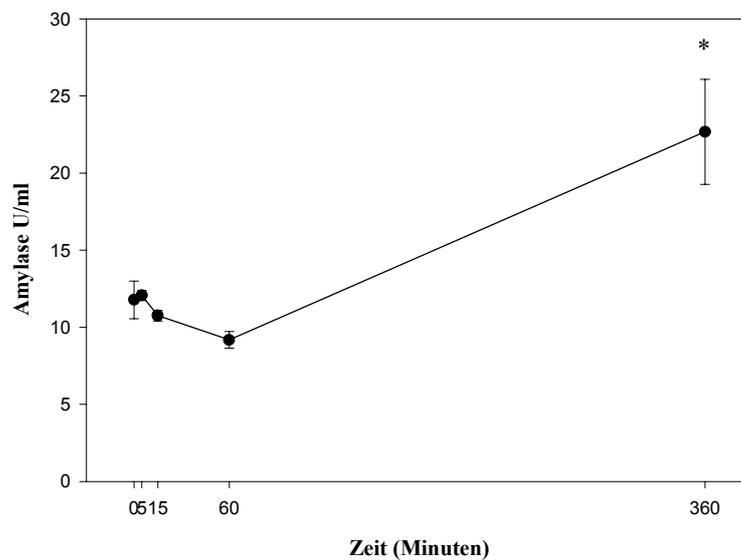


Abbildung 5.4: Serumamylasegehalt der mit Diamid behandelten Tiere nach der einmaligen s.c. Injektion. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und in der Abbildung mit * versehen.

Bis 60 min nach Versuchsbeginn bleiben die Werte der Amylasemessung nahezu auf Kontrollniveau ($11,7 \pm 1,2$ U/ml). Nach 360 min kann ein signifikanter Anstieg beobachtet werden. Das Maximum wird mit $22,6 \pm 3,4$ U/ml am Versuchsende erreicht. (Abb. 5.4)

4 Diskussion

Bei der akuten Pankreatitis kommt es im Tiermodell und beim Menschen in den Azinuszellen des Pankreas einerseits zu einer - zumindest teilweise durch freie Sauerstoffradikale vermittelten - Depletion von GSH, und zum anderen zu frühzeitigen intrazellulären Vorgängen, die den späteren Grad der Azinuszellschädigung und damit wahrscheinlich auch den Schweregrad der Erkrankung bestimmen. Diese Untersuchung sollte klären, ob im Tiermodell – ohne ein klassisches Modell einer akuten Pankreatitis – durch alleinige Depletion von reduziertem Glutathion in der Azinuszelle eine Aktivierung von MAPK induziert werden kann. Zudem sollte der zeitliche Verlauf und Aktivierungsgrad der MAPK festgestellt und mit dem Schädigungsgrad korreliert werden.

Die vorliegende Studie zeigt, daß ERK-2 und p38 in der Pankreasazinuszelle *in vivo* durch pharmakologisch induzierte Depletion des Glutathions aktiviert werden. Nach BSO/EA Gabe kommt es zu einer anhaltenden ERK-2 Phosphorylierung bei nur zeitlich begrenztem Anstieg der Phosphorylierung von p38. Die histologische Untersuchung des Pankreas belegt eine minimale bis leichtgradige Pankreatitis mit nur mittelgradigem Nekroseausmaß. Bis zum Zeitpunkt 24 h nahm das Ausmaß der Zellnekrosen zu, erreichte aber allenfalls ein geringes Ausmaß. Hinsichtlich der Intensität der entzündlichen Infiltrate wurde ebenfalls nur ein leichter Grad erreicht, der nachfolgend wieder abnahm. Nach Gabe von Diamid ist - bei allerdings nur kurzer Versuchsdauer - ein konstanter Anstieg der ERK-2-Phosphorylierung zu beobachten. Hingegen zeigt die Phosphorylierung der p38-Kinasen nach Stimulation mit Diamid einen unregelmäßigen Verlauf; jedoch mit Tendenz zu einem temporären Anstieg. Gegen Versuchsende wird nach Diamid Gabe eine Verdoppelung der Serumamylasewerte gemessen. Die Glutathionwerte schwanken zwischen 7,5 und 4,5 µg Glutathion / mg Protein. Im Gegensatz dazu fallen die Glutathionwerte nach BSO/EA Gabe auf niedrigere Werte ab.

Unterschiedlich fällt der Zeitpunkt der maximalen Zellnekrosenbildung in den Modellen aus. Die diskrete Nekrosenbildung im BSO/EA-Modell tritt gegen Ende des Versuchs auf, hingegen bilden sich die ebenfalls nur diskreten Nekrosen im Diamid-Modell in Versuchsmitte und nehmen mit zunehmender Zeit nach Injektion wieder ab. Diese Beobachtungen können wie folgt gedeutet werden: BSO führt durch Inhibition der

Glutathionsynthese und EA bedingter Oxidation des Glutathions zu einer zunehmenden, starken ERK-2 Phosphorylierung und nur zeitlich begrenzter Phosphorylierung von p38. Diamid hingegen oxidiert GSH auf direktem Weg und aktiviert ERK-2 weniger stark und SAPK rasch und nur kurzanhaltend.

In einer Studie von Dabrowski et al. konnte gezeigt werden, daß Streß zur Apoptose und Erniedrigung der ERK-1 und ERK-2 führt. Hingegen werden JNK und p38-Kinasen, die Wachstumsarrest und Zelltod bewirken, durch Stressoren, wie zum Beispiel osmotischer Schock, Hitze, ionisierende Strahlen, aktiviert [Dabrowski et al., 2000, Schäfer et al., 1998]. Paraskevas et al. beschrieb, daß p38 MAP-Kinasen eine wesentliche Rolle im Zellstreß-Reaktionsweg spielen. Die p38-Kinasen vermitteln den Zelltod einiger Zelltypen durch Apoptose als Ergebnis einer Verminderung der Wachstumsfaktoren. Hohe p38-Kinase-Aktivität korreliert nach seinen Ergebnissen mit geringem Zellüberleben. [Paraskevas et al., 1999]. Unter physiologischen Bedingungen besteht also eine Balance zwischen der Aktivität von ERKs, die Wachstum und Differenzierung der Zelle gewährleisten sollen, und p38 MAP-Kinasen, die mit dem programmierten Zelltod (Apoptose) assoziiert werden [Piotrowicz et al., 1997]. Auch freie Sauerstoffradikale können verschiedene intrazelluläre Proteinkinasen aktivieren [Dabrowski et al., 1996]. In Abwesenheit freier Radikale führt eine einzige Induktion einer Thiol-Redox-Imbalance zu einer Aktivität von ERK und JNK in HeLa-Zellen [Rhoads, 2000]. Unsere Ergebnisse zeigen, daß solche Aktivierungen auch durch GSH-Depletion induzierbar sind. Sie relativieren somit die Bedeutung freier Radikale und unterstreichen den Stellenwert des Glutathions im Rahmen bestimmter Schädigungsprozesse des Pankreas.

Bisher wurden vergleichbare Untersuchungen nur am Hyperstimulationsmodell (Caerulein) durchgeführt. Die Hyperstimulation des Pankreas mit Caerulein zeigte Parallelen zu den hier durchgeführten Untersuchungen: Wagner et al. verglichen die Aktivität der ERK-1 und ERK-2, JNKs und p38 nach Stimulation mit Caerulein. Die Aktivierung der p38 Kinasen folgte dabei derer der ERK-1 und ERK-2 und wurde als früheste messbare Veränderung nach Caerulein-induzierter Pankreatitis beschrieben [Wagner et al., 1999]. Auch *in vitro* und *in vivo* Hyperstimulation (Caerulein-Pankreatitis) von Azinuszellen des Pankreas durch Caerulein führt zur Aktivierung verschiedener mitogen-aktivierter Proteinkinasen (wie ERK und JNK) [Dabrowski et al., 1996; Han et

al., 1997]. Bei nur temporären Anstieg der MAPK kam es in diesem Modell zu einem späteren massiven Anstieg der JNK [Dabrowski et al., 1996], was gut mit dem Eintreten von Zelluntergängen und eventuell auch Entzündung des Pankreas bei diesem Modell vereinbar ist. Durch erhöhte JNK-Aktivität wird möglicherweise das physiologische Gleichgewicht zwischen Proliferation bzw. Zelldifferenzierung und Apoptose zugunsten des programmierten Zelltodes verschoben.

Auch Metzler et al. konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass nach Hyperstimulation durch Caerulein, die Aktivität der MAPK, JNK und p38 im Pankreas stark zunimmt. Als Antwort auf die Caerulein-Hyperstimulation werden die p38 Kinasen verglichen mit der MAPK-Aktivität sehr viel schneller und mit längerer Dauer aktiviert. Die Stimulation auf submaximale Caeruleindosen war schwach, aber messbar. Die Serumamylase und Serumlipase stieg nach Stimulation von Caerulein an [Metzler et al., 1999].

Aktivierungen von MAPK konnten wir auch durch unsere Methoden induzieren, wenngleich das Ausmaß und Muster der Aktivierungen, welche bei der Caerulein-Pankreatitis gefunden wurden, nicht erreicht wird [Dabrowski et al., 1996]. Die GSH-Depletion in Pankreasazinuszellen *in vivo* durch Pharmaka hat also ein unterschiedliches Muster der MAP-Kinasen-Aktivität als die GSH-Depletion, die durch die AP induziert wird, zur Folge. Es kommt bei beiden Modellen zu einer anhaltenden ERK-Aktivierung bei nur temporärer p38-Kinasen-Aktivierung und induzieren nach laborchemischen und histologischen Kriterien eine minimale bis leichtgradige Pankreatitis mit nur geringem Ausmaß von Nekrosen. Die Serumamylase zeigt im Gegensatz zur Caerulein-Pankreatitis einen späten und weniger ausgeprägter Anstieg der Aktivität.

Durch die hier verwendeten Modelle konnte eine GSH Depletion um 72 % nach BSO/EA Gabe und eine Depletion um 38 % nach Diamid Gabe erreicht werden. Bei beiden Modellen wurden schon früh erniedrigte GSH-Werte gemessen. Im BSO/EA-Modell war bereits eine Stunde nach Versuchsbeginn der niedrigste Wert erreicht, im Diamid-Modell wurde der niedrigste GSH-Wert 60 Minuten nach Versuchsbeginn beobachtet. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Lüthen [Lüthen et al., 1995] Ein Ungleichgewicht im Glutathionstoffwechsel, bedingt durch eine erhebliche Oxidation des GSH oder Sistieren der Synthese, könnte zu einer Dysregulation des oxidoreduktiven Stoffwechsels der Zellen führen [Niederau 1992]. Störungen des Zellmetabolismus haben zur Folge, daß strukturelle [Hwang et al. 1992, Carbonera 1988]

sowie funktionelle [Jaeschke 1992] Defekte entstehen, weil auch die als Enzyme vorliegenden reduzierten Thiole durch Oxidation strukturelle Änderungen erfahren können [Karoui 1996]. Dem frühen Abfall des Glutathion bei der Pathogenese der AP wird daher eine große Bedeutung beigemessen [Seres 1996, van de Water et al. 1996, Lüthen 1994].

Die GSH-Depletion, durch Syntheseinhibition und Thioloxydation, führt in unseren Untersuchungen zu einer milden Form einer pankreatitis-ähnlichen Schädigung. Durch Induktion von BSO/EA oder Diamid kommt es besonders im ersten Modell zu einer raschen Depletion des Glutathion. Die ERK Phosphorylierung, die eine Proliferation oder erhöhte Zelldifferenzierung bewirkt, erreicht in beiden Modellen eine signifikante Zunahme der Werte gegenüber dem Ausgangswert. Die p38 Phosphorylierung, deren Hauptrolle in der Regulation von Proliferation und Apoptose besteht, zeigt in beiden Modellen einen raschen, temporären Anstieg mit späterer Abnahme der Werte auf Ausgangsniveau. Die Phosphorylierungen der MAPK beider Modelle sind als Reaktionen auf Streß zu werten. Untersuchungen konnten zeigen, daß bei Streßsituationen, die zur Apoptose führen, die MAP-Kinase-Aktivität meist vermindert ist, wohingegen JNK und p38-Kinasen durch Stressoren, die zu Wachstumsstillstand und Zelltod führen, aktiviert werden [Dabrowski et al., 2000].

Auch wenn molekulare und biochemische Vorgänge in der Frühphase der akuten Pankreatitis nicht ausreichend verstanden werden, konnte gezeigt werden, dass das Pankreas auf Stress, in Form von GSH-Depletion, mit Änderungen der Phosphorylierungen der MAPK reagieren kann. Es kann darüber spekuliert werden, ob durch die GSH-Depletion Teilaspekte der akuten Pankreatitis simuliert werden können.

5 Literaturverzeichnis

- Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K. and Sturgill, T.W. (1990), Requirement for integration of signal from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinases, *Nature*, **343**, 651-653
- Bailey, H.H., (1998), L-S,R-buthionine sulfoximine: Historical development and clinical Issues, *Chem. Biol. Interact*, **111-112** (-HD-) :239-254
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., et al. (1992), Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis, *Chest*, **101**, 1644-1655
- Brenner, B., Koppenhoefer U., Weinstock C., Linderkamp O., Lang, F., Gulbins, E., (1997), Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22173-22181
- Carbonera, D., Azzone, G.F., (1988), Permeability of inner mitochondria membrane and oxidative stress, *Biochemica and Biophysica Acta*, **943**, 245-255
- Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J., und Tan, T.H., (1996), The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31929-31936
- Chetty, U., Gilmour, H.M., Taylor, T.V., (1980), Experimental acute pancreatitis in the rat – a new model, *Gut 1980*, **21**, 115-117
- Closa, D., Rosello, J., Fernandez, L., Gelpi, E., (1994), Prostaglandin E2, F2 and E1 in early phase of experimental acute necrohemorrhagic pancreatitis in rats, *Pancreas*, **9**, 73-79

- Cobb, M., Goldsmith, E., (1995), How MAP Kinases are regulated, *J. Biol. Chem.*, **271**, 14843-14846
- Dabrowski, A., Chwiecko, M., (1990), Oxygen radicals mediate depletion of pancreatic sulfhydryl compounds in rats with caerulein-induced acute pancreatitis, *Digestion*, **47**, 15-19
- Dabrowski, A., Grady, T., Logsdon, C.D., Williams, J.A., (1996), Jun Kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.*, **271**, 5686-5690
- Dabrowski, A., Gabryelewicz, A., Wereszczynska, U., (1988), Oxygen derived free radicals in caerulein-induced pancreatitis, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **23**, 1245-1249
- Dabrowski, A., Tribillo, I., Dabrowski, M., Wereszczynska-Siemiatkowska, U., Gabryelewicz, A., (2000), Activation of mitogen-activated protein kinases in different models of pancreatic acinar cell damage, *Z Gastroenterol.*, **38**, 469-481
- Davis, R.J., (1993), The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway, *J. Biol. Chem.*, **268**, 14553-14556
- Davis, R.J., (1995), MAPKs: new JNK expands the group, *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 470-473
- Ding, X.Z., Adrian, T.E., (2001) MEK/ERK-Mediated Proliferation is negatively regulated by p38 MAP Kinase in human pancreatic cancer cell line, PANC-1, *Biol and Biophy Research Comm.*, **282**, 447-453
- Foltz, I.N., Lee, J.C., Young, P.R., Schrader, J.W., (1997), Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, *J. Biol. Chem.*, **272**, 3296-3301

- Githens, S., (1991), Glutathion metabolism in the pancreas compared with that in the liver, kidney and small intestine, *International Journal of Pancreatology*, **8**, 97-109
- Griffith, O.W., Meister, A., (1979), Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7558-7560
- Goillot, E., Raingeaud, J., Ranger, A., Trepper, R.I., Davis, R.J, Harlow, E., und Sanchez, I., (1997), Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 3302-3307
- Graves, J.D., Draves, K.E., Craxton, A., Saklatvala, J., Krebs, E.G, und Clark, E.A., (1996), Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mIgM-induced apoptosis of human B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13814-18518
- Häussinger D., Schliess F., Dombrowski F., vom Dahl St., (1999), Involvement of p38^{MAPK} in the regulation of proteolysis by liver cell hydration, *Gastroenterology*; **116**, 921-935
- Han, J., Lee, J.-D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994), A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells, *Science*, **265**, 808-811
- Han-B; Klonowski-Stumpe-H; Schliess-F; Meereis-Schwanke-K; Luthen-R; Sata-N; Haussinger-D; Niederau-C, (1997), Cell volume changes modulate cholecystikinin- and carbachol-stimulated amylase release in isolated rat pancreatic acini, *Gastroenterology*, **113**, 1756-1766
- Hill, C.S., Treisman, R., (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF, *Cell*, **81(7)**, 1159-70.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K. tenDijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., und Gotoh, Y., (1997), Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, **275**, 90-94

- Jaeschke, H., Benzik, A.E., (1992), Pathophysiological consequences of enhanced intracellular superoxide formation in isolated perfused rat liver, *Chemico-Biological Interactions*, **84**, 55-68
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., und Han, J. (1996), Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J. Biol. Chem.*, **271**, 17920-17926
- Jocelin, P.C., (1975), Some properties of mitochondrial glutathione, *Biochemica and Biophysica Acta*, **369**, 427-436
- Karin, M., (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16483-16486
- Karoui, H., Hogg, N., Frejaville, C., Tordo, P., Kalyanaraman, B., (1996), Characterisation of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies, *J. Biol. Chem.*, **271**, 6000-6011
- Kawasaki, H., Morooka, T., Shimohama, S., Kimura, J., Hirano, T., Gotoh, Y., und Nishida, E., (1997), Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells, *J. Biol. Chem.*, **272**, 18518-18512
- Keyse, S.M., (1995), An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases, *Biochemica et Biophysica Acta*, **1265**, 152-160
- Keyse, S.M. (2000), Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinases signalling, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 186-192
- Kosower, N. S., Kosower, E. und Wertheim B. (1969), Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfides, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **37**, 593-596

- Kramer, R.A., Greene, D., Ahmad, S., Vistica, D.T., (1987), Chemosensitization of L-phenylalanin mustard by the thiol-modulated agent buthionine sulfoximine, *Cancer Res.* , **47**, 1593-1597
- Kummer, J.L., Rao, P.K., und Heidenreich, K.A., (1997), Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase *J. Biol. Chem.*, **272**, 20490-20494
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (2001), Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiol. Rev.*, **81(2)**, 807-870
- Lerch, MM, Schmid R. (1995), Klinik der akuten Pankreatitis, *Acta Chir.*,**27**, 186-189
- Lüthen, R., Niederau, C., (1990), Pathophysiologie der akuten Pankreatitis, *Z Gastroenterol*, **28**, 211-221
- Lüthen, R., Niederau, C., Grendell, J.H., (1995), Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathion during caerulein induced pancreatitis in rats, *A. J. of Physiol.*, **268**, (4 PT 1) G 592-604
- Lüthen, R., Neuschwander-Tetri, B.A., Niederau, C., Ferrell, L.D., Grendell, J.H., (1994), The effect of L-BSO on the pancreas in mice, *International Journal of Pancreatology*, **16**, 31-35
- Mannervik, B., Axelsson, K., (1980), Role of cytoplasmic thioltransferase in cellular regulation by thiol-disulphide interchange, *Biochem. J.*, **190**, 125-130
- Martenson, J., Jain, A., Meister, A., (1990), Glutathion is required for intestinal function, *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, **87**, 1715-1719
- Meister, A., Tate, S.S., (1976) Glutathione and related γ -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization, *Annu. Rev. Biochem.* , **45**, 559-604

- Meister, A., Anderson, M., (1983), Glutathione, *Ann Rev. of Biochem.*, **52**, 711-760
- Mendelson, K.G., Contois, L.R., Tevosian, S.G., Davis, R.J. und Paulson, K.E., (1996)
Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **23**, 12908-12913
- Metzler, W., Höfgen, T., Weber, H., Printz, H., Göke, B., Wagner, A.C.C., (1999)
Hyperthermia, inducing pancreatic heat-shock proteins, fails to prevent cerulein-induced stress kinase activation, *Pancreas*, **19 (2)**, 150-157
- Neuschwander-Tetri, B., Ferrell, L., Grendell, J., (1996) Glutathion monoethyl ester ameliorates caerulein-induced pancreatitis in the mouse, *Journal of Clinical Investigation*, **89**, 109-116
- Niederau, C., Niederau, M., Borchard, F., Ude, C., Lüthen, R., Strohmeyer, G., Ferrell, L., Grendell, J., (1992), Effects of antioxidants and free radical scavengers in three different models of acute pancreatitis, *Pancreas*, **7**, 486-496
- Niederau, C., Lüthen, R., (1996), Neue Aspekte zur Pathogenese der akuten Pankreatitis, *Schweizer Rundschau für Medizin* 1996, 102-108
- Paraskevas, S., Aikin, R., Maysinger, D., Lakey, J.R.T., Cavanagh, T.J., Hering, B., Wang, R., Rosenberg, L., (1999), Activation and expression of ERK, JNK, and p38 MAP-Kinasen in isolated islets of Langerhans: implications for cultured islet survival, *FEBS*, **455**, 203-208
- Piotrowicz, R.S., Levin, E.G. (1997) Basolateral membrane-associated 27 kDa heat shock protein and micro filament polymerization, *J. Biol. Chem*, **272**, 25920-25927
- Post, G., R., Brown, J.,H.,(1996) G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses, *FASEB*, **10**, 741-749

- Radler-Pohl A ; Sachsenmaier C ; Gebel S ; Auer HP ; Bruder JT ; Rapp U ; Angel P ; Rahmsdorf HJ ; Herrlich P (1993), UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase., *EMBO J*, **12(3)**, 1005-12
- Raingaud, J., Grupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., und Davis, R.J.(1995), Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine, *J. Biol. Chem.*, **270**, 7420-7426
- Renner, I.G., Savage, W.T., Pantoja, J.L., Renner, V.J., (1985), Death due to acute pancreatitis: a retrospective analysis of 405 autopsy cases, *Dig. Dis. Sci.*, **30**, 1005-1018
- Rhoads, M.J., Argenzio, R.A., Chen, W., Graves, L.M., Licato, L.L., Blikslager, A.T., Smith, J., Gratzky, J., Brenner, A.D., (2000), Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPK`s by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism, *Gastroenterology*, **118**, 90-100
- Robinson, M.J., Coob, M.H.,(1997), Mitogen-activated protein kinase pathways, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 180-186
- Rünzi, M., Layer, P., (1997), Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis, *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **127**, 849-853
- Schäfer, C., Ross-SE; Bragado-MJ; Groblewski-GE; Ernst-SA; Williams-JA (1998), A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini, *J. Biol. Chem.*, **273(37)**, 24173-80
- Schaeffer, H. J. und Weber, M. J. (1999), Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2435-2444

- Schulz, H.U., Ebert, M., Manger, T., Weiss, G., Lippert, H., (1998), Akute Pankreatitis, *Viszeralchirurgie*, **33**, 96-105
- Schulz, H.U., Loggen, B., Lippert, H. (1998), Differentialdiagnose des plötzlichen Oberbauchschmerzes aus chirurgischer Sicht: Cholecystitis, Pankreatitis, Ulkusp perforation, *Kassenarzt*, **35** (3), 43-48
- Schulz, U., Niederau, C., (1994), Oxidative stress induced changes in pancreatic acinar cells: insights from in vitro studies, *Hepato gastroenterology*, **41**, 309-312
- Seger, R. und Krebs, E.G., (1995), The MAPK signaling cascade, *FASEB J.*, **9**, 726-735
- Shapiro, L., und Dinarello, C.A. (1995), Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92** (26), 12230-12234
- Seres, T., Ravichandran, V., Moriguchi, T., Rokutan, K., Thomas, J.A., Johnston, R.B., (1996), Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effect of oxidative stress, *J. Immunology*, **156**, 1973-1980
- Steinberg, W.M., Schlesselman, S.E., (1987), Treatment of acute pancreatitis. Comparison of animal and human studies, *Gastroenterology* 1987, **93**, 1420-1427
- Steinberg, W., Tenner, S., (1994), Acute pancreatitis, *N. Engl. J. Med.*, **330**, 100-103
- Stenson, W.F., Lobos, E., Wedner, H.J., (1983), Glutathion depletion inhibits amylase release in guinea pig pancreatic acini, *Am. J. Physiol*, **244**, 273-277
- Tani, S., Otsuki, M., Itoh, H., (1987), Histologic and biochemical alterations in experimental acute pancreatitis induced by supramaximal caerulein stimulation, *International Journal of Pancreatology*, **2**, 337-348

- Wagner, A.C.C., Metzler, W., Höfgen, T., Weber, H., Göke, B., (1999), p38 MAP Kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following cerulein hyperstimulation, *Digestion*, **60**, 41-7
- van de Water, B., Zoetewij, J.P., Nagelkerke, J.F., (1996), Alkylation induced oxidative cell injury of renal proximal tubular cells: involvement of glutathione redox cycle inhibition, *Arch. Of. Biochem. Biophy*, **327**, 71-80
- Waskiewicz, A.J. and Cooper, J.A., (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**, 798-805
- Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D., und Davis, R.J., (1995), Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*, **269**, 403-407
- Widmann, Chr., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L., (1999), Mitogen-activated protein kinase: Conservation of three-kinase module from yeast to human, *Physiol. Rev.*, **79**, 143-180
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., und Greenberg, M.E., (1995), Opposing effects of Erk and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **270**, 1326-1331
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y. und Baltimore, D., (1997), Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, **89**, 1067-1076
- Zanke, B.W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L.A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F., Woodgett, J.R., (1996), The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat, *Curr. Biol*, **6**, 606-613

6 Danksagung

Danken möchte meinem Doktorvater PD Dr. med. Reinhard Lüthen für die Überlassung des Themas. Er war stets offen für Fragen, unterstützte mich im gesamten Verlauf meiner Arbeit und vermittelte mir naturwissenschaftliches Denken und Arbeiten. Die zahlreichen kritischen Diskussionen und die wertvollen Beratungen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit geführt. Ebenso danke ich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger, dem Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik und Unterstützung dieser Dissertation. Den Mitarbeitern der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf danke ich für Ihre Hilfe und Mitarbeit an den Experimenten. Herrn PD Dr. med. M. Sabia möchte ich für die histopathologischen Beurteilungen der Proben danken. Besonderer Dank gilt vor allem Frau Dr. Hanne Klonowski-Stumpe und Herrn PD Dr. Freimuth Schließ für Ihre immer freundliche, sehr geduldige Unterstützung, Teamfähigkeit und Zuverlässigkeit. Ihre stetige aber herzliche Ermahnung und dissertationserfahrenen Ratschläge haben erheblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank ist außerdem an meine Eltern gerichtet, die mir das Studium großzügig ermöglicht haben und mir immer alle Freiheiten gelassen haben. Meinen Geschwistern, Freunden und meiner Freundin danke ich für Ihre rückhaltlose Unterstützung und Motivation in jeder Phase meiner Arbeit.

7 Lebenslauf

Behrus Salehin

geboren am 29. September 1972 in Mönchengladbach als Sohn des Arztes für Frauenheilkunde Dr. med. Bahman Salehin und dessen Ehefrau Hannelore, geborene Wilmes.

1979 - 1983	Grundschule Krahnendonk, Mönchengladbach
1983 - 1993	Gymnasium Neuwerk, Mönchengladbach
Mai 1993	Abitur
Okt.1993 - Jan.1995	Zivildienst als Krankenpflegehelfer, Krankenhaus Neuwerk „Maria v. d. Aposteln“, Innere Medizin, Mönchengladbach
April 1995 – Nov. 2001	Studium der Humanmedizin an der Heinrich–Heine-Universität Düsseldorf
August 1997	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
August 1998	Allgemein- und Unfallchirurgie, Sportmedizin und Chirotherapie, Praxisklinik Rathenaustraße, Mönchengladbach
August 1998	1. Staatsexamen, Medizin
März 1999	Bezirkskrankenhaus St.Johann, Innere Medizin, St.Johann in Tirol, Österreich
Juli - Aug. 1999	Gynäkologie und Geburtshilfe, Praxis, Dortmund
Sept. 1999	Ministry of Health, Victoria Hospital, Mahe´, Department of Gynaecology and Obstetrics, Republic of Seychelles
September 2000	2. Staatsexamen, Medizin
Okt. 2000 - Feb. 2001	1.Tertial „Praktisches Jahr“: Allgemein-,Viszeral- und Gefäßchirurgie, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Städtische Kliniken Neuss, Lukaskrankenhaus, Neuss
Feb. - Mai 2001	2.Tertial „Praktisches Jahr“: Departement Innere Medizin, Universitätskliniken, Kantonsspital Basel, Schweiz
Juni - Sept. 2001	3.Tertial „Praktisches Jahr“: Frauenklinik, Städtische Kliniken Neuss, Lukaskrankenhaus, Neuss
November 2001	3. Staatsexamen, Medizin
Dez. 2001 – Jun 2003	Arzt im Praktikum, Krankenhaus Neuwerk „Maria v. d. Aposteln“, Frauenklinik, Mönchengladbach
seit Juni 2003	Assistenzarzt, Krankenhaus Neuwerk „Maria v. d. Aposteln“, Frauenklinik, Mönchengladbach

8 Abstract

Phosphorylierung von MAP-Kinasen (ERK-2 und p38) in Azinuszellen des Pankreas durch oxidativen Stress *in vivo*

Untersuchungen bei Modellen der akuten Pankreatitis (AP) und an stimulierten Azinuszellen zeigten Aktivierungen ERK-1/ERK-2 und p38 abhängiger Signaltransduktionskaskaden. Ob isoliert oxidativer Stress ähnliche Veränderungen verursacht, war unbekannt. **Methodik:** Mäusen wurde a) nach oraler BSO Gabe 1 x Etacrynsäure (EA) injiziert oder b) 1 x Diamid s.c. injiziert. Nach 15 min, 1 h, 6 h und 24 h; bzw. nach 5 min, 15 min, 1 h und 6 h wurde Pankreasgewebe gewonnen und hinsichtlich der Aktivierung von ERK-2 und p38 sowie histopathologisch untersucht. Zudem wurde die Auswirkung dieser Modelle auf den Glutathiongehalt und die Serumamylase in Pankreasgewebe gemessen. **Ergebnisse:** Die Behandlung mit BSO/EA führte zu einer langsam zunehmenden Phosphorylierung von ERK-2, die bei 15 min begann und den maximalen Wert bei 24 h erreichte. Die p38 Phosphorylierung war nach 6 h maximal (stärker als die Positivkontrolle Anisomycin). Erniedrigte GSH-Werte wurden bei beiden Modellen schon früh gemessen. Im BSO/EA-Modell war bereits eine Stunde nach Versuchsbeginn der niedrigste Wert erreicht. Histologisch zeigte sich nach 15 min leichte Entzündung, Nekrosen waren nach 24 h deutlich. Bereits 5 min nach Damit Gabe begann die Aktivierung von ERK-2 und erreichte nach 6 h den Höchstwert. Auch die p38 Phosphorylierung stieg nach 5 min, durchlief das Maximum nach 1 h und fiel schon nach 6 h wieder ab. Der niedrigste GSH-Wert wurde 60 Minuten nach Versuchsbeginn beobachtet. Histologisch zeigten sich nach 15 min leichte Nekrosen und nach 1 h Entzündungen. Sechs Stunden nach Injektion war das Pankreas wieder unauffällig. **Diskussion:** Untersuchungen des eigenen Labors hatten eine MAP-Kinasen Aktivierung in Azinuszellen durch CCK/Hypoosmolarität gezeigt (GE 1997; 113; 1756). Oxidativer Stress phosphoryliert die ERK-2 und p38 abhängigen Signaltransduktionskaskaden in pankreatischen Azinuszellen. BSO führt durch Inhibition der Glutathionsynthese und EA bedingter Oxidation des Glutathions zu einer zunehmenden, starken ERK-2 Phosphorylierung und nur zeitlich begrenzter Phosphorylierung der p38 Kinasen. Diamid hingegen oxidiert GSH auf direktem Weg und phosphoryliert ERK-2 weniger stark und SAPK rasch und nur kurzanhaltend. Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die der Stressbewältigung und Regeneration auch bei AP dienen, lassen sich so näher analysieren.