



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

Expression und Regulation von ROCK in exokrinen Azinuszellen der Ratte

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

Sabine Unterweger, geb. Grünbauer
aus
Rosenheim
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Schäfer

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Rust, Priv.-Doz. Dr. med. A. Kleespies

Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. C. Kubisch

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2013

Meinen Eltern,
die immer für mich da waren
und mich in allen Lebenslagen unterstützten
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie des Pankreas	1
1.1.1 Allgemeine Anatomie des Pankreas	1
1.1.2 Das exokrine Pankreas und seine Funktion	2
1.1.3 Die funktionelle Anatomie des exokrinen Pankreas	3
1.1.4 Die Signaltransduktion in der Azinuszelle	5
1.1.5 Das Aktin-Zytoskelett	8
1.1.5.1 Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts	9
1.1.5.2 Die Rho-Signaltransduktionskaskade	9
1.1.5.2.1 Rho	10
1.1.5.2.2 ROCK	12
1.1.5.2.3 Lim-Kinase	14
1.1.5.2.4 Cofilin	15
1.2 Die akute Pankreatitis	17
1.2.1 Die akute Pankreatitis im Tiermodell	18
1.2.2 Die Pathogenese der akuten Pankreatitis	18
1.2.3 Pathophysiologische Vorgänge in der Frühphase der akuten Pankreatitis	19
1.3 Ziel dieser Arbeit	21
2. Methoden	23
2.1 Arbeiten mit den Pankreas-Azinuszellen	23
2.1.1 Gewinnung von isolierten Pankreas-Azinuszellen	23
2.1.2 Stimulation der Azinuszellen	24
2.1.3 Amylase-Aktivitätsmessung	25
2.1.4 Präparation von Pankreasfragmenten	25
2.1.5 Zellfraktionierung	26
2.1.6 Immunpräzipitation	26
2.2 Western Blot	27
2.2.1 Probenaufbereitung	27
2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.3 Rho-GTPase Pull down-Assay	28

2.4	In Vitro-Kinaseaktivitäts–Assay	29
2.5.	Statistik	30
3.	Geräte und Materialien	31
3.1	Allgemeine Chemikalien	31
3.2	Verwendete Antikörper	32
3.3	Verwendete Sekretagoga	33
3.4	Verwendete Substrate	33
3.5	Spezifische Inhibitoren	33
3.6	Puffer und Lösungen	33
3.6.1	Azinus-Zellisolierung	33
3.6.2	Probenaufbereitung	34
3.6.3	Western Blot	35
3.6.4	Kinase-Assay	37
3.7	Reagenzien und Kits	38
3.8	Technische Geräte und Materialien	38
3.9	Tiere	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Nachweis der Stimulierbarkeit intakter Azini mit CCK im Amylase-Assay	40
4.2	Expression und Regulation von ROCK	41
4.2.1	Nachweis von ROCK-II in der Azinus-Zelle im Western Blot und nach Stimulation mit CCK	42
4.2.2	Zeitkinetische und dosisabhängige Darstellung von ROCK-II in der Azinuszelle aufgetrennt nach Zytosol- und Zytoskelettfraktion	43
4.2.3	Aktivitätsnachweis von ROCK im Kinase-Assay	45
4.2.3.1	Substratabhängigkeit von ROCK-II	45
4.2.3.2	Dosis- und zeitabhängige Effekte nach Stimulierung mit CCK	47
4.2.3.3	Abhängigkeit der Stimulierbarkeit von ROCK-II von verschiedenen Sekretagoga	49

4.2.4	Amylase-Assay mit und ohne dem ROCK-Inhibitor γ -27632	50
4.2.5	Effekte verschiedener Sekretagoga auf die Amylase-Sekretion mit und ohne γ -27632	52
4.2.6	Wirkung von γ -27632 auf andere Signalkaskaden	53
4.3	Expression und Regulation von Rho	54
4.3.1	Nachweis von RhoA in der Azinuszelle durch Western Blot	55
4.3.2	Co-Immunopräzipitation mit Rho und ROCK	56
4.3.3	Rho-GTPase Pull-Down-Assay	57
4.4	Expression und Regulation der LIM-Kinase	59
4.4.1	Nachweis der LIMK2 durch Western Blot	59
4.4.2	Aktivitätsnachweis der LIMK2 im Kinase-Assay	60
4.4.3	Immunpräzipitation mit ROCK und LIMK	62
4.4.4	Effekt von γ -27632 auf die CCK-induzierte LIMK-Aktivität	63
4.5	Expression von Cofilin in der Azinus-Zelle	65
4.5.1	Nachweis durch Western Blot	65
5.	Diskussion	66
6.	Zusammenfassung	76
7.	Literaturverzeichnis	78
8.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	91
9.	Danksagung	93
10.	Eigene Veröffentlichungen zum Thema	94

1 Einleitung

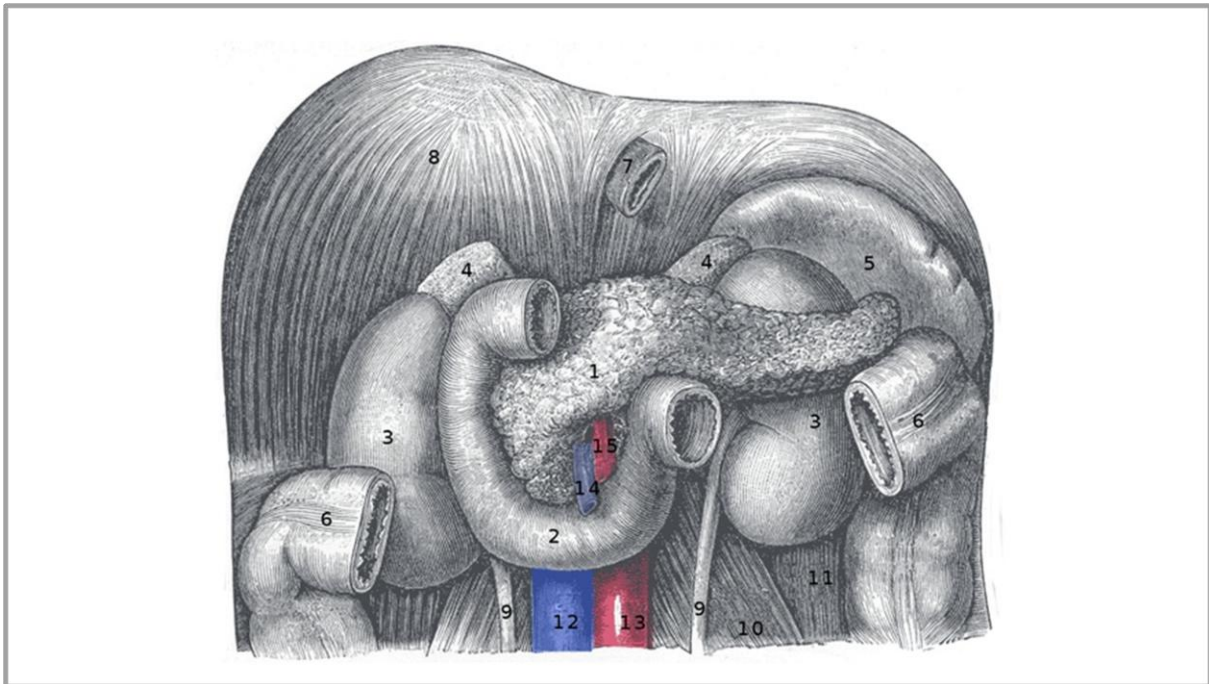
1.1 Anatomie und Physiologie des Pankreas

1.1.1 Allgemeine Anatomie des Pankreas

Das Pankreas des Menschen als zentrales Organ für die Verdauung und die Regulation des Blutzuckers ist eine exokrine und endokrine Drüse. Sie ist ein ca. 15 bis 25cm langes, 3 bis 4cm breites und 1 bis 2cm dickes, keilförmiges Organ mit einem Gewicht zwischen 70 und 150g (Slack 1995). Das Organ ist in Läppchen gegliedert, welche auch die Oberfläche charakteristisch strukturieren.

Das Pankreas liegt im Retroperitonealraum hinter dem Bauchfell, zwischen Magen, Milz und Leber und den großen Blutgefäßen des Bauchraums. Es steht in enger Beziehung zum Zwölffingerdarm, der den Pankreaskopf umfasst (Abb. 1).

Abb. 1: Topografische Beziehung des Pankreas



aus Gray's Anatomy (1918), unverändert

Topografische Beziehung des Pankreas;

(Leber, Gallenwege, Magen, Dünndarm und Colon transversum nicht dargestellt)

- | | | |
|----------------|--------------------|-----------------------------|
| 1. Pankreas | 6. Colon | 11. M. quadratus lumborum |
| 2. Duodenum | 7. Oesophagus | 12. V. cava inferior |
| 3. Nieren | 8. Zwerchfell | 13. Aorta |
| 4. Nebennieren | 9. Ureter | 14. V. mesenterica superior |
| 5. Milz | 10. M. psoas major | 15. A. mesenterica superior |

Makroskopisch unterscheidet man beim Menschen drei Abschnitte der Bauchspeicheldrüse: den Pankreaskopf (Caput pancreatis), den Pankreaskörper (Corpus pancreatis) und den Pankreasschwanz (Cauda pancreatis). Die Incisura pancreatis (Pankreaseinkerbung) ist die Stelle, an der der gekrümmte rechte Teil des Pankreas in den horizontalen, die Wirbelsäule auf Höhe des zweiten Lendenwirbels querenden Teil übergeht. Sie grenzt den vom Zwölffingerdarm umfassten Pankreaskopf vom Pankreaskörper ab. An dieser Einkerbung verlaufen auch die Arteria und Vena mesenterica.

Der Ductus pancreaticus (oder Wirsungianus-Gang) mündet als Ausführungsgang gemeinsam mit dem Hauptgallengang (Ductus choledochus) in den Zwölffingerdarm über die Papilla duodeni major oder Vater'sche Papille und ist etwa 2mm weit. Bei manchen Menschen ist ein zweiter, kleiner Ausführungsgang vorhanden, der Ductus pancreaticus accessorius, der dann auf der Papilla duodeni minor in das Duodenum mündet.

1.1.2 Das exokrine Pankreas und seine Funktion

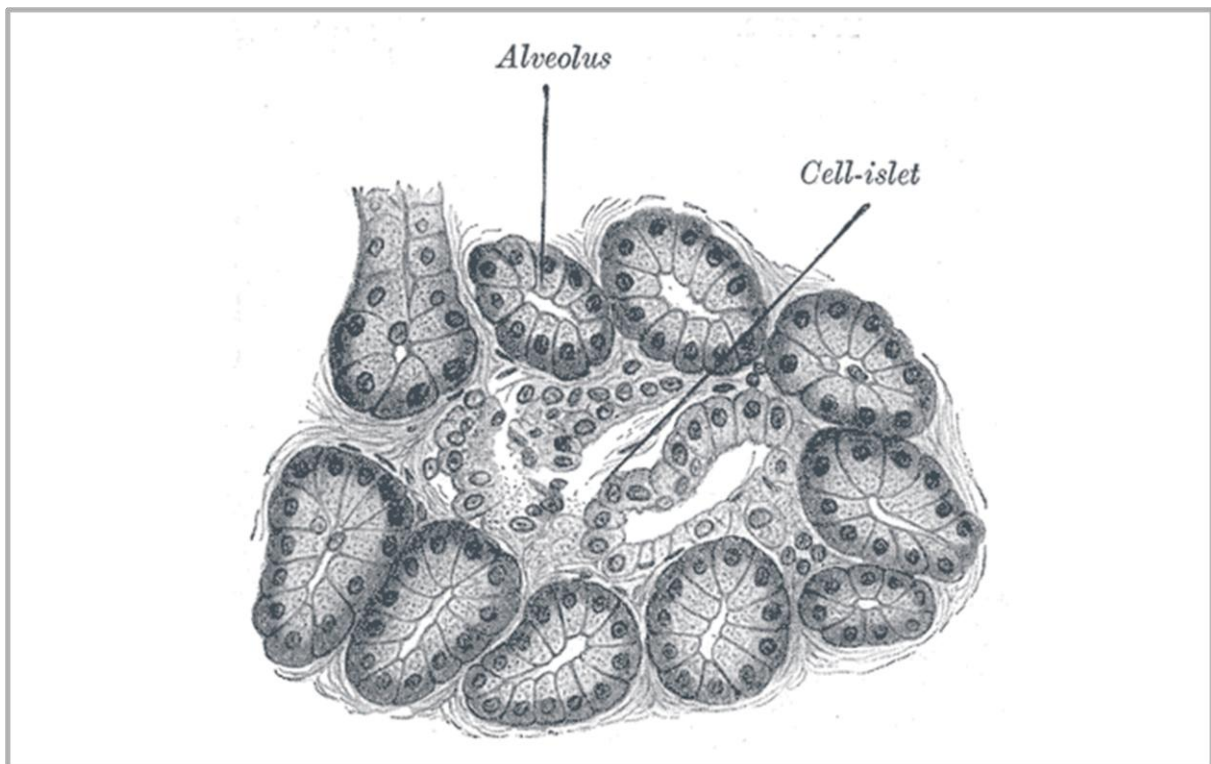
Das menschliche Pankreas setzt sich aus zwei verschiedenen Zellpopulationen zusammen: den endokrinen Zellen, die Hormone in die Blutbahn abgeben und den exokrinen Zellen, die Enzyme in den Verdauungstrakt sezernieren (Slack 1995). In der vorliegenden Arbeit ist der endokrine Anteil des Pankreas, welcher nur ca. 5% des Gesamtorgans ausmacht, nicht von Bedeutung.

Das exokrine Pankreas ist die Hauptbildungsstätte der Verdauungsenzyme. Es produziert zwischen 6 und 20g Protein pro Tag und damit mehr als jedes andere Organ im Körper des Menschen (Schmid, Uhl, et al., 1996). Dabei handelt es sich um eine verzweigte azinäre Drüse, die aus tausenden, schon makroskopisch sichtbaren Läppchen besteht. Die morphologischen und funktionellen Grundeinheiten in diesen Läppchen bilden die Drüsenendstücke (Azini), die über Schaltstücke an ein verzweigtes Gangsystem angeschlossen sind (Abb. 2).

Die pyramidenförmigen Azinuszellen bilden die sekretorische Einheit des exokrinen Pankreas. Sie produzieren und sezernieren die Verdauungsenzyme, von denen es mindestens 22 verschiedene gibt. Die Sekretion des Pankreassaftes wird durch hormonale Stimulation reguliert, hauptsächlich durch Sekretin, Cholezystokinin,

Gastrin sowie durch neuronale Stimulation (Slack 1995). Nach Bindung der Liganden an die Rezeptoren an der basalen Seite der Azini, wird eine Reihe von intrazellulären Schritten aktiviert. Letztendlich führt dies zu einem gerichteten Transport von membranumgebenen Speicherorganellen, den sogenannten Zymogengranula zur apikalen Seite der Zelle, wo sie mit der Membran verschmelzen und ihren Inhalt ins azinäre Ganglumen entlassen (Lampel M, Kern 1977).

Abb. 2: *Mikroskopische Anatomie der beerenförmig angeordneten Azinuszellen*

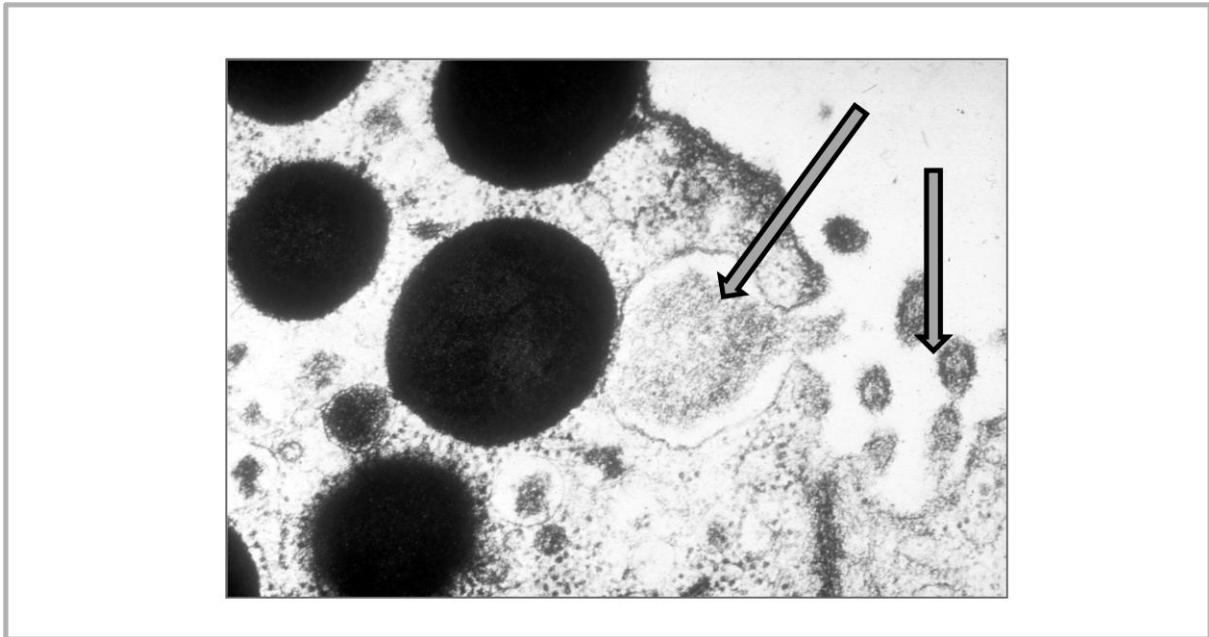


aus Gray's Anatomy (1918), unverändert

1.1.3 Die funktionelle Anatomie des exokrinen Pankreas

Die exokrine Zelle des Pankreas ist schon seit langem Studienobjekt vieler Forschungsarbeiten, ausgezeichnet durch hohe Proteinsynthese und Sekretion (Palade, 1975). Sie ist eines der am besten untersuchten Modelle der exozytischen Sekretion (Bruzzone, 1990) mit einer klar polarisierten Struktur und Funktion (Petersen, 1999). Die Länge der pyramidenförmig gebauten Azinuszelle beträgt vom apikalen zum basalen Zellpol etwa 12-15µm. Die mit Mikrovilli besetzte apikale Membran begrenzt das Azinulumen. Gegenüber benachbarten Zellen erfolgt ein Abschluss durch Tight junctions (Abb. 3).

Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Azinuszelle mit erkennbaren fusionierten Granula (mit Pfeilen markiert)



Zur wichtigsten Aufgabe der pankreatischen Azinuszelle gehört die Synthese, Verpackung und Sekretion einer Vielzahl an Verdauungsenzymen. Dabei unterliegt die exokrine Zelle einer komplexen Beeinflussung durch an die Zellmembran gelangende chemische Signale wie Ionen, Lipide, Kohlenhydrate, Fettsäurederivate, Isoprenoide, Steroide, Amine, Aminosäuren und Polypeptide. An der Plasmamembran müssen die meisten externen Signale durch spezielle Übertragungsmechanismen in interne umgewandelt werden. Bei der polarisierten Azinuszelle befinden sich die signalaufnehmenden Strukturen (Rezeptoren) an der basolateralen Membran, während im apikalen Bereich der Zelle die Exozytose erfolgt. Im rauhen endoplasmatischen Retikulum werden die gebildeten Proteine gesammelt und gerichtet zum Golgi-Apparat transportiert, wo posttranslationale Veränderungen stattfinden. Der Golgi-Apparat besteht aus einem oder mehreren Stapeln membranbegrenzter flacher Hohlräume, den sogenannten Zisternen. Diese unterscheiden sich in ihrer Struktur und Funktion je nach ihrer Lage. Die beiden Pole des Golgi-Apparates bezeichnet man als *cis*- und *trans*-Seite. In der Regel nimmt die *cis*-Seite Substanzen in den Golgi-Apparat auf und auf der *trans*-Seite verlassen sie ihn als Bläschen, den sogenannten Golgi-Vesikeln oder Vakuolen. So werden vorwiegend inaktive Pro-Enzyme oder Zymogene an der *trans*-Seite des Golgi-Apparates verpackt und in Richtung luminale Plasmamembran

befördert. Im Verlauf ihrer Reifung konzentrieren die Vakuolen ihren Inhalt durch Zunahme der Elektronendichte. An der Plasmamembran des apikalen Zellpols fusionieren diese reifen Zymogengranula mit der Oberfläche der Membran und durch Verschmelzung entlassen sie ihren Inhalt in das azinäre Ganglumen.

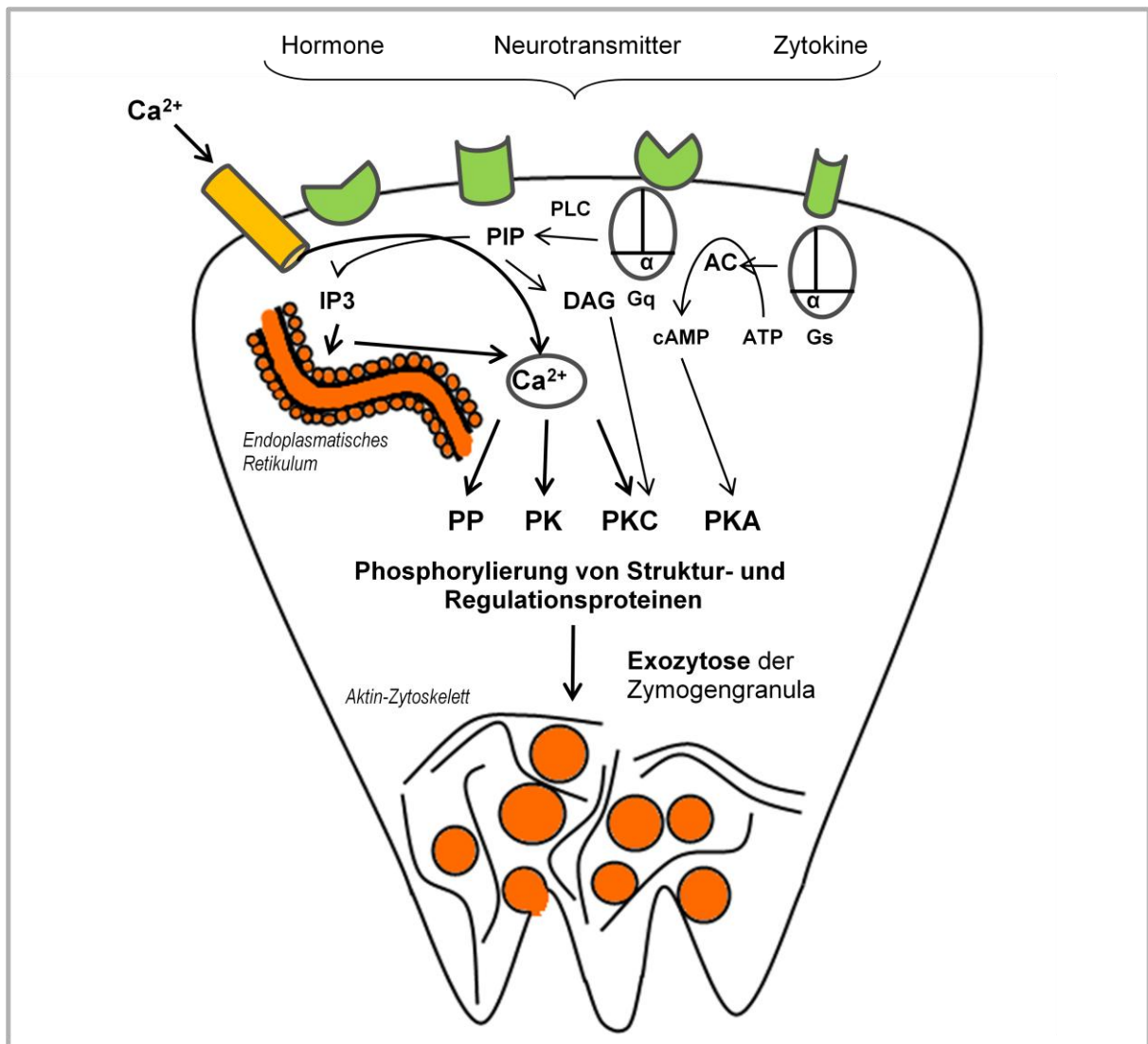
Der komplexe Ablauf in der Zelle und der konsekutiven Auslösung der Sekretion, lässt sich im Wesentlichen in drei Abschnitte gliedern: (1) Rezeptor-vermittelte Ereignisse einschließlich der Generation von Botenstoffen, (2) durch die Botenstoffe ausgelöste Reaktionen und (3) Aktivierung des Sekretionsmechanismus.

1.1.4 Die Signaltransduktion in der Azinuszelle

Der Signaltransduktionsapparat besteht aus drei Komponenten. Einem Rezeptor, einem Guaninnukleotid-bindenden Protein (G-Protein), dass schließlich an den Effektor, die Phospholipase C bindet. Das klassische Beispiel eines Signaltransduktionsprozesses ist die hormonelle Aktivierung des membrangebundenen Enzyms Adenylatzyklase mit der folgenden Bildung des intrazellulären Botenstoffes zyklisches Adenosin- 3', 5'-Monophosphat (zyklisches AMP, cAMP). Die Bindung eines Hormons („first messenger“) an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran resultiert in einem Anfluten von cAMP in der Zelle. Dies wiederum führt zum Beispiel zur Phosphorylierung eines spezifischen Enzyms oder Ionen-Kanals (Petersen, 1999).

Dieser Ablauf wird als „stimulus secretion coupling“ (Stimulus-Sekretionskopplung) bezeichnet (Abb. 4). Letztendlich führt diese Informationskette zu einer Verschmelzung der Zymogengranula mit der luminalen Plasmamembran und zur Sekretion ihrer Inhalte (Williams and Yule, 1993).

Abb. 4.: Stimulus-Secretion-Coupling in Azinuszellen



Die Bindung von Hormonen oder Neurotransmittern an ihre entsprechenden Rezeptoren führt zu einer Aktivierung G-Protein gekoppelter second messengers. Daraus resultiert eine Aktivierung verschiedener Kinasen und Phosphatasen und eine Änderung des Phosphorylierungszustands verschiedener Regulatorproteine (Modifiziert nach Schäfer & Williams).

AC = Adenylatcyclase; PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLC = Phospholipase C; IP3 = Inositol-1,4,5-trisphosphat; PK = Proteinkinase; PP = Proteinphosphatase; PKC = Proteinkinase C; PKA = Proteinkinase A; DAG = Diacylglycerol

Auf Azinuszellen verschiedener Spezies sind Rezeptoren für Cholezystokinin, Bombesin, Acetylcholin, VIP und Sekretin nachgewiesen worden.

Entsprechend ihrer pharmakologischen Eigenschaften, kann man die Rezeptoren in zwei allgemeine Kategorien einteilen. Die einen sind an die Mobilisation von zellulärem Ca^{2+} gebunden (Cholezystokinin, Bombesin, Acetylcholin, Tachykinin, Muscarin) und die anderen an die Aktivierung der Adenylatzyklase (Sekretin und VIP) (Bruzzone, 1990).

Alle pankreatischen Rezeptoren sind Membranrezeptoren mit sieben hydrophoben transmembranösen Abschnitten, die an G-Proteine gekoppelt sind.

G-Proteine sind Proteine, die Membranrezeptoren an das Effektorsystem binden. Sie sind Heterotrimere, die aus einer α - (die GTP-bindende Kette), β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt sind. In der Azinuszelle gehören hierzu die Vertreter der vier Hauptfamilien, benannt nach der α -Untereinheit G_q , G_s , G_i/G_o und G_{12} . Für den Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} über CCK-Rezeptoren ist die G_q -Protein-Familie verantwortlich. Sie setzt sich aus den α_q -, α_{11} - und α_{14} -Untereinheiten zusammen, die alle in der Azinuszelle vorkommen (Yule et al., 1999). Diese G-Proteine sind überwiegend an der basolateralen Membran, einige aber auch intrazellulär lokalisiert (Williams, 2001).

Bindet ein Ligand an den Rezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptor-G-Proteinkomplexes. Bestandteile des Rezeptors, hauptsächlich die dritte intrazelluläre Schleife, aktivieren das G-Protein und induzieren so den Austausch von GDP durch energiereiches GTP. Jetzt dissoziiert die α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex und aktiviert den entsprechenden membranständigen Effektor, welcher seinerseits die Bildung des intrazellulären Botenstoffs initiiert. Letztlich wird durch intrinsische GTPase-Aktivität GTP wieder zu GDP gespalten und die α -Untereinheit reassoziert wieder mit dem $\beta\gamma$ -Komplex (Dohlman et al., 1991).

In der Azinuszelle kommt es zu einem Calciumanstieg hauptsächlich durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Bruzzone, 1990). Zwei Enzyme sind hier von zentraler Bedeutung. Die phospholipidspezifische Phospholipase C und die Adenylatzyklase. Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und DAG. Die Adenylatzyklase konvertiert ATP zu zyklischem AMP (cAMP) (Williams, 2001). IP₃ bindet an einen IP₃-Rezeptor auf dem endoplasmatischen Retikulum. Dieser Rezeptor, der als ein Ca^{2+} -Kanal fungiert, öffnet sich und entlässt Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum. Durch die anschließende Inaktivierung der IP₃-Rezeptoren und die Wiederaufnahme des Ca^{2+} aus dem Zytoplasma über Membranpumpen wird wieder der Ruhewert der Ca^{2+} -Konzentration erreicht. Bei einer IP₃-Konzentration in der richtigen Höhe kann ein Zyklus von Abgabe und Wiederaufnahme des Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum entstehen, der zu Ca^{2+} -Oszillationen führt (Streb et al., 1983; Sneyd et al., 2000). Dieser Ca^{2+} -Anstieg ist am intensivsten im apikalen Zymogengranulareichen

Bereich der Zelle. Bisher konnte man nur dort Rezeptoren für IP_3 finden. Der hervorgerufene Anstieg von zytosolischem Ca^{2+} im apikalen Pol der Zelle hat zwei wichtige physiologische Konsequenzen: die exozytotische Sekretion von Verdauungsenzymen und die Ausschüttung von Ca^{2+} über die Plasmamembran durch Plasmamembran-gebundene Ca^{2+} -Pumpen (PMCA) (Petersen, 1999).

Der letzte Schritt in der Stimulus-Sekretionskopplung in der pankreatischen Azinuszelle involviert das Zytoskelett und resultiert in der Verschmelzung der Membran der Sekretionsvesikel mit der apikalen Plasmamembran, was zur Abgabe des Inhalts der Zymogengranula ins azinäre Lumen führt. Das subapikale F-Aktin-Netzwerk spielt hier eine entscheidende Rolle in der Regulation. Die Exposition der Azini mit zum Beispiel einer supramaximalen Konzentration von Cholezystokinin oder seinem Dekapeptid-Analogen Caerulein führt zu einer Hemmung der Sekretion der Verdauungsenzyme. Dieses Phänomen steht im Zusammenhang mit dem Abbau des apikalen F-Aktin-Netzwerks und es liegt nahe, dass diese Veränderungen im Zytoskelett die Ursache einer daraus folgenden Hemmung der Sekretion ist (Singh et al., 2001).

1.1.5 Das Aktin-Zytoskelett

Das Aktin-Zytoskelett ist ein hochdynamisches Netzwerk, das sich aus Aktin-Polymeren und einer Vielzahl von beteiligten Proteinen zusammensetzt.

Aktin wurde erstmals vor einem halben Jahrhundert als ein Hauptbestandteil kleiner, dünner Filamente in der Muskulatur entdeckt. Spätere Arbeiten in den 1960ern und 1970ern konnten zeigen, dass Aktin sowohl in nicht-muskulären Zellen als auch in Pflanzen und Protozoen vorkommt (Theriot, 1997). Die Hauptfunktion des Aktin-Zytoskeletts liegt darin, die Zellbewegung und Zellform während des Zellzyklus und als Antwort auf extrazelluläre Stimuli zu vermitteln, das Zytoplasma zu organisieren und mechanische Kräfte in der Zelle zu erzeugen (Trifaro and Vitale, 1993; Schmidt and Hall, 1998; Valentijn et al., 1999). Die Veränderungen im Aktin-Zytoskelett und seine Funktion werden von Signalkaskaden reguliert.

Aktin existiert entweder in einer monomeren globulären Form (G-Aktin) oder in einer polymerischen filamentösen (F-Aktin) Form. G-Aktin polymerisiert leicht unter physiologischen Bedingungen zu filamentösem Aktin (F-Aktin) bei gleichzeitiger Hydrolyse von ATP. Dabei bildet F-Aktin eine Doppel-Helix. Dieser Vorgang wird

über eine große Anzahl von Aktin-bindenden Proteinen reguliert, die ihrerseits durch extrazelluläre oder intrazelluläre Signale reguliert werden (Ku et al., 1999). Einige dieser Aktin-bindenden Proteine erleichtern die Organisation der Filamente, während andere eine regulatorische Funktion auf den Auf- und Abbau der Filamente haben und eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts als Antwort auf eintreffende Signale bewirken (Ayscough, 1998).

1.1.5.1 Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts

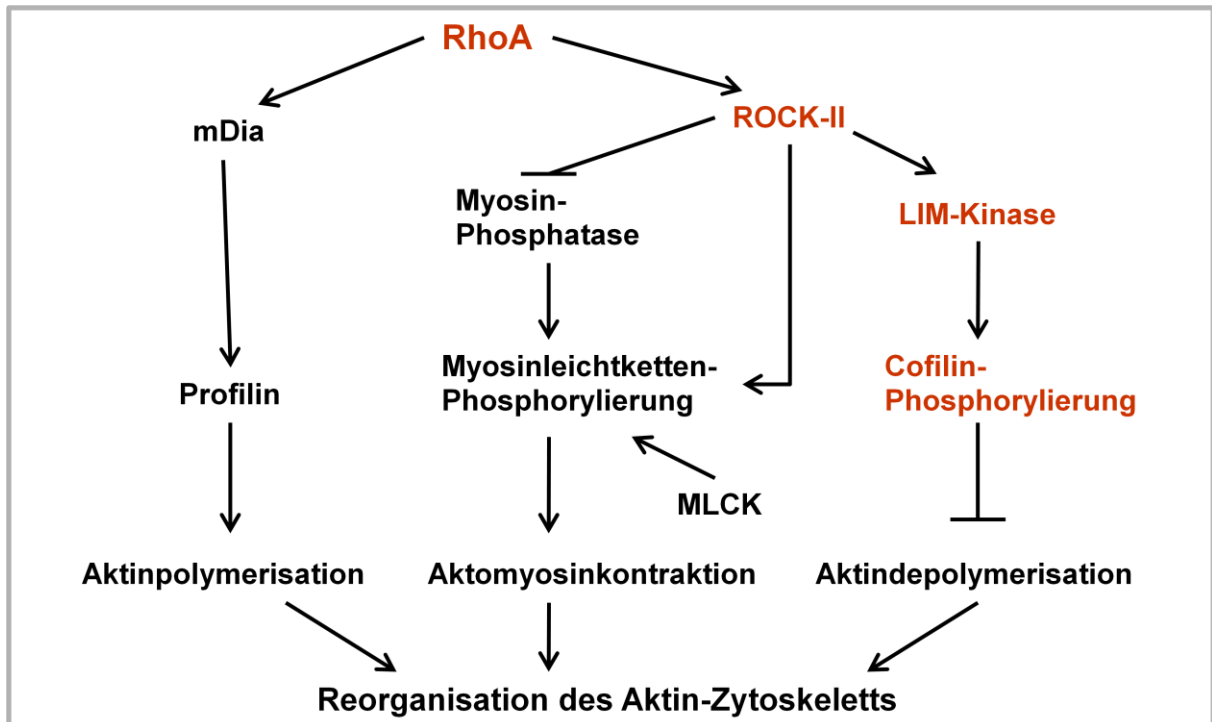
Das Aktin-Zytoskelett wird während der Sekretion reorganisiert, um den Vesikeltransport als Antwort auf inter- und extrazelluläre Signale zu regulieren. Das in der Zellspitze (Apex) liegende terminale „Aktin web“ (Aktinnetz) bildet dabei eine physikalische Struktur, um sekretorische Vesikel in der Nähe der Plasmamembran zu verankern. Auf Stimulation reagiert das Aktin-Myosin-Netzwerk (hierzu gehören Profilin, ADF/Cofilin, und das sogenannte „Capping Protein“), um die physikalische Barriere für die Granula aufzulösen und ihre Bewegung hin zur Seite der Membranverschmelzung zu gewährleisten. Viele an den Vesikeltransport beteiligten Proteine werden in der Apex von Parietalzellen, Hepatozyten und Pankreaszellen gefunden (Ku et al 1999). Die Aktivität dieser regulierenden Proteine wird von Signalmolekülen wie Ca^{2+} , Phosphoinositide und durch kleine GTPasen, zu denen Rho, Rac und Cdc42 gehören, angepasst.

1.1.5.2 Die Rho-Signaltransduktionskaskade

In verschiedenen Modellversuchen in unterschiedlichen Zellen des Körpers konnten bereits Regulationsmechanismen des Aktin-Zytoskeletts beschrieben werden. Der wohl bekannteste ist die Regulierung des Aktin-Zytoskeletts über die GTPase Rho. Durch Stimulation kommt es zur Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK), welche über die LIM-Kinase und Cofilin letztendlich zu einer Reorganisation von F-Aktin führt (Maekawa, Ishizaki et al., 1999). Außerdem wird über ROCK die Myosin-bindende Untereinheit (MYPT1) der Myosinphosphatase (MLCP) phosphoryliert. Dadurch wird die Phosphatase in ihrer Aktivität gehemmt und es resultiert eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK). Die Myosin-Leichte-Kette (MLC) wird vermehrt phosphoryliert, wodurch eine Interaktion von

Myosin mit den Aktinfilamenten und somit eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts bewirkt wird. Ebenso wird das Enzym mDia von RhoA aktiviert und führt über eine Interaktion mit Profilin zu einer Aktinpolymerisation (Abb. 5).

Abb. 5: RhoA-Signaltransduktionskaskaden



Signaltransduktionskaskade über RhoA [modifiziert nach Maekawa et al. (Maekawa, Ishizaki et al. 1999)]. Die in Rot dargestellten Enzyme wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich auf den erstgenannten Regulationsweg über ROCK-LIMK-Cofilin eingegangen.

1.1.5.2.1 Rho

Mit der Analyse im Jahr 1985 von RhoA (Ras Homologon) wurde ein neues Mitglied der Ras-Familie der kleinen Guanosin-Triphosphatasen (GTPasen) beschrieben (Madaule and Axel, 1985; Abb. 6). Heute können die Rho-GTPasen in sechs Unterfamilien mit jeweils mehreren Mitgliedern unterteilt werden: Rho, Rac, Cdc42, Rn, RhoBTB und RhoT/Miro. Daneben gibt es einzelne Rho-GTPasen, die keiner dieser Unterfamilie zugeordnet werden.

Direkte Hinweise, dass Rho auf das Aktin-Zytoskelett wirkt erhielt man durch Mikroinjektion von Zellen mit rekombinanten Rho-Proteinen oder Plasmiden, die

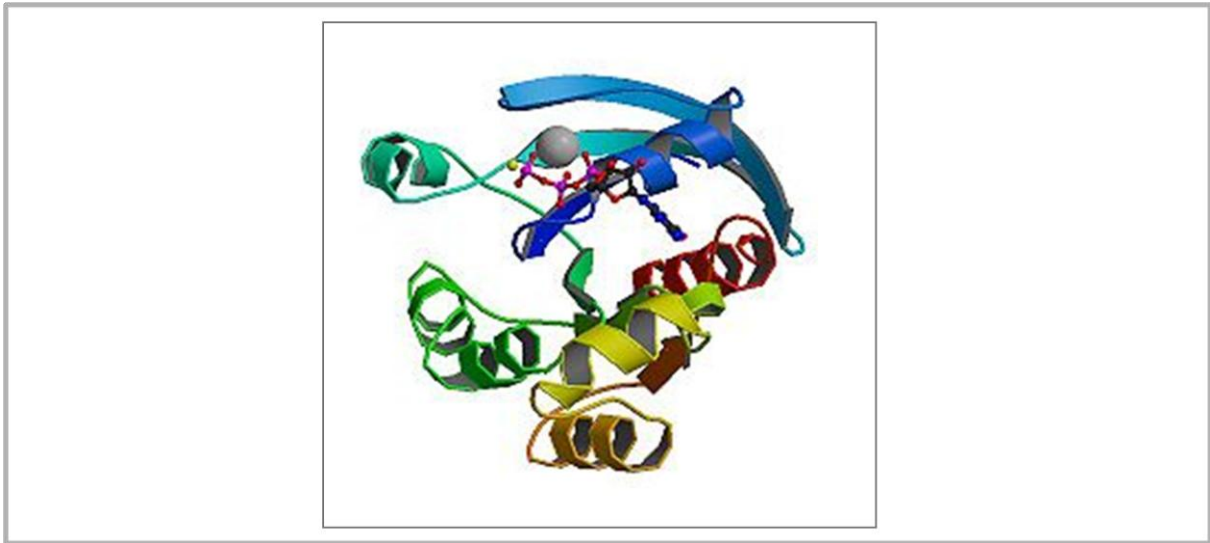
Rho-cDNAs exprimieren. Man hat herausgefunden, dass Rho eine schnelle Reorganisation von Aktinkabeln in einer Vielfalt von Zelllinien verursacht (Paterson et al 1990). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass Rho-Proteine in der Regulierung der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind (Ridley and Hall 1992). In Mastzellen von Ratten konnte Price et al zeigen, dass Rho einen entscheidenden Einfluss auf die Zellsekretion haben (Price et al., 1995). So führte eine Aktivierung der Proteine zu einer gesteigerten, jedoch deren Hemmung zu einer abnehmenden Sekretion.

Die GTPasen der Rho-Familie dienen als molekularer Schalter. Ihre Aktivierung wird aber nicht wie bei den heterotrimerischen G-Proteinen direkt durch die Interaktion mit einem Agonist gebundenen, G-Protein gekoppelten Rezeptor reguliert, sondern über einen GTPase-Zyklus an dem drei verschiedene Regulatorfamilien beteiligt sind, von denen jeweils mehrere Vertreter bekannt sind. Hierzu gehören Proteine, die den Nukleotidaustausch fördern (guanine nucleotide dissociation stimulators, GDS oder GEF), ihn hemmen (guanine nucleotide dissociations inhibitors, GDI) oder die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine aktivieren (GTPase-activating Protein, GAP) (Aspenström, 1999; Sah et al., 2000). In der aktiven GTP-gebundenen Form interagieren Rho-Proteine mit ihren Effektoren, wie die Rho-Kinase und p140mDia und regulieren hierdurch das Aktin-Zytoskelett (Abb. 5) und eine Vielzahl weiterer Signalprozesse wie axonales Wachstum, Antigenpräsentation in T-Zellen, Endozytose, Phagozytose und Sekretion (Schmidt and Hall 1998; Machesky and Hall, 1996).

Eine wichtige Rolle spielt Rho in der Bildung von kontraktile Kräfte durch eine gesteigerte Phosphorylierung der Myosinleichtkette (Myosin light chain; MLC). Dadurch reguliert Rho die Bildung von Aktinkabeln, fokaler Adhäsion und Zellbewegung (Migration) (Ridley and Hall 1992). Die durch Rho induzierte Synthese von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) wird ebenfalls für die Bildung fokaler Adhäsionspunkte und Aktinkabel benötigt. Es wurde auch gezeigt, dass Rho die DNA-Synthese stimuliert und an der Ras-induzierten Zelltransformation beteiligt ist und somit eine wichtige Rolle im Zellzyklus einnimmt (Ren et al 1999).

Mittlerweile wird Rho als genereller Regulator der auf Aktin basierender zytoskelettalen Reorganisation angesehen.

Abb. 6: *RhoA* (*Ras homolog gene family, member A*)



Menschlicher *RhoA*/GTP-Komplex (von PDP, Protein data bank; www.pdp.org)

1.1.5.2.2 ROCK

Zahlreiche Effektoren von Rho wurden bereits identifiziert.

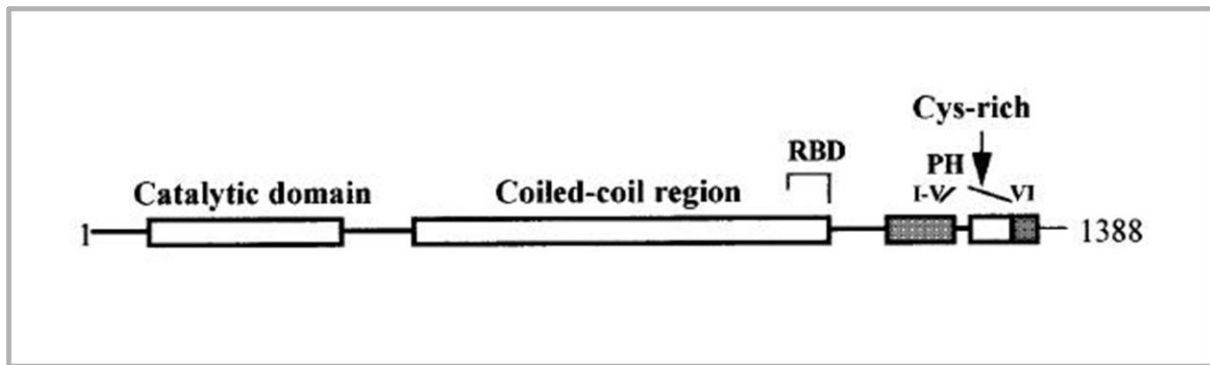
Leung und Manser konnten 1995 über eine Genanalyse die 150kDa schwere Kinase ROK α identifizieren. ROK α ist ein Mitglied der Familie der Serin/Threonin-Kinasen und besitzt eine RhoA-bindende Domäne (Leung, Manser et al. 1995).

1996 konnten Ishizaki et al ein 160 kDa schweres zytosolisches Protein isolieren, welches ebenfalls eine RhoA-bindende Domäne besitzt. Auch dieses Protein ist eine Serin/Threoninkinase, die eine lange coiled-coil-Struktur besitzt (Ishizaki et al., 1996, Machesky und Hall, 1996). Dieses Protein, genannt p160^{ROCK} (eine Rho associated, coiled-coil containing protein kinase) oder ROK β ist sowohl in vitro als auch in vivo nicht nur physikalisch, sondern auch funktionell mit dem GTP-gebundenen Rho assoziiert und wird durch diese Bindung aktiviert.

Es gibt also zwei ROCK-Isoformen, ROCK-I und ROCK-II. ROCK-I (ROK β oder p160^{ROCK}) -mRNA wird vor allem in der Leber, Milz, Niere und den Testes gefunden. ROCK-II (ROK α , 150 kDa) -mRNA überwiegt in anderen Geweben, vor allem im Gehirn und in der Skelettmuskulatur (Nakagawa et al., 1996) und ist an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Leung, Chen et al. 1996). ROCK-I und ROCK-II besitzen eine Rho- assoziierte Kinase-Domäne am N-Terminus, eine lange amphipathische alpha-Helix, die fähig ist, in der Mitte ein coiled-coil-Struktur zu formen und eine Pleckstrin-Homologitäts (PH)-Region im C-terminalen Ende, die in

zwei Teile durch einen Zystein-reichen Zinkfinger gespalten wird (Abb. 7). Sie sind Serin/Threonin-Protein-Kinasen und zu 64% innerhalb ihrer Struktur und zu 90% innerhalb der Kinase-Domäne identisch (Narumiya, Ishizaki and Watanabe, 1997; Amano, Fukata et al., 2000).

Abb. 7.: Die Domänen-Struktur von ROCK-II



aus Redowicz MJ, 1999

Die aktive Form von Rho bindet an die C-terminale PH-Domäne von ROK/ROCK und legt so die N-terminale coiled-coil-Region zur Komplexbildung sowie die C-terminale Lipidbindende Region für die Membrananhaftung frei (Rao et al., 2003; Kusama et al. 2003).

ROCK-I (ROK β , p160-ROCK) und ROCK-II (ROK α) induzieren ausgehend von Rho die Bildung von Aktinkabeln (stress fibers) und den Zusammenbau von örtlichen Kontakten (Prozesse, die die Kontraktilität des Aktomyosinsystems regulieren). In Nervenzellen induziert aktiviertes Rho die Neuritenretraktion, ein Prozess, bei dem sich herausstellte, dass er ROCK-I und/oder ROCK-II benötigt (Hirose et al., 1998). Alle Substrate dieser Kinasen, die bisher beschrieben wurden, sind Bestandteile des Zytoskeletts, vor allem MBS (Myosin-bindende Untereinheit der Myosin-Phosphatase) und MLC (Myosin-Leichtkette), die beide die Aktivität von Myosin II regulieren (Hall, 1998). Andere Substrate sind das Aktin-bindende Protein Adducin, die Intermediärfilamentproteine GFAP (glial fibrillary acidic protein) und Vimentin. Vimentin wird an Ser71 phosphoryliert und diese Phosphorylierung wird nur während der späten Mitose beobachtet, was zu der Annahme einer Rolle in der Zytokinese führt (Aspenström 1999). Außerdem phosphoryliert ROCK-II Moesin, ein Protein mit einer wichtigen Rolle in der Vermittlung des Rho-induzierten Zusammenbaus von Aktinkabeln und schließlich die LIM-Kinase, die über die Aktivierung von Cofilin zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führt (Maekawa et al., 1999; Ohashi, et

al., 2000). Verschiedene Verbindungen wurden bereits entwickelt, die in Konkurrenz mit ATP die Kinase-Aktivität der Rho-Kinase hemmen sollen, wie zum Beispiel y-27632, um die Rho-Kinase-Funktionen in den Zellen zu erforschen (Uehata et al., 1997; Fukata et al 2001).

1.1.5.2.3 Lim-Kinase

Zwei LIM-Kinasen, LIMK1 und LIMK2, sind bisher in Säugetieren identifiziert worden. Obwohl man die LIM-Kinase bisher als ein Gehirn-spezifisches Protein betrachtet hatte, wurde die LIMK in allen Geweben der Maus gefunden (Foletta et al., 2004; Acevedo et al., 2006).

Das LIM-Sequenzmotiv wurde nach den Großbuchstaben der drei Proteine Lin-11, Isl-1 und Mec-3 benannt. Es besitzt eine gepaarte Zink-Finger-Sequenz die sich aus 50 bis 60 Aminosäureresten zusammensetzt mit Cystein- und Histidin-Resten (Okano et al., 1995).

Es gibt einige Krankheiten, die mit einem Defekt des LIMK1-Gens oder mit einer Überexpression der LIM-Kinase einhergehen. So sei hier das Williams-Syndrom, die Alzheimer-Krankheit, Prostata- und Mamma-Carcinom, sowie verschiedene psoriatische Hautkrankheiten erwähnt (Bernard, 2006).

In der genomischen Struktur sind die zwei LIM-Kinasen identisch. In ihrer gesamten Aminosäuresequenz gleichen sie sich zu 50%. LIM-Kinasen sind aus zwei LIM-Domänen, einer PDZ-Domäne am N-terminalen Ende und einer Ser/Thr-Protein-Kinase-Domäne am C-Terminus zusammengesetzt. Von der LIMK1 gibt es zwei Varianten. Der LIMK1-short (LIMK1-s) fehlen 20 Aminosäuren in der Kinase-Domäne, die sie inaktiv durch die Modifizierung der ATP-Bindungsstelle machen, und dLIMK1, die keine Kinase-Domäne besitzt. Ihr spezifisches Gewicht beträgt um die 70kDa, variierend je nach Gewebe. Auch 45 bis 50kDa schwere Varianten konnten z.B. im Magen gefunden werden (Foletta et al., 2004). Von der LIMK2 existieren drei Varianten. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese translatiert werden. Die komplette Struktur der LIM-Kinasen ist also noch nicht völlig aufgeklärt (Bernard, 2006).

Obwohl die Funktion der endogenen LIMK1 bisher gut etabliert ist, weiß man noch sehr wenig über die Funktion der endogenen LIMK2. Während die LIMK1 hauptsächlich an fokalen Adhäsionspunkten lokalisiert ist, findet man LIMK2 im

Zytoplasma. Beide Proteine zeigen die gleiche Aktivität *in vitro*, also könnte der Grund ihrer verschiedenen Funktionen in ihrer Formvariante oder ihrer Lokalisation in der Zelle liegen (Acevedo et al., 2006; Bernard, 2006). Studien zeigen, dass endogene Proteine verschieden reguliert werden und verschiedene biologische Funktionen haben können, abhängig von deren Lokalisation (Bernard, 2006).

In Studien konnte gezeigt werden, dass LIMK1 und LIMK2 die Aktin-Dynamik über die Phosphorylierung und Inaktivierung von ADF/Cofilin regulieren. Die Aktivität beider Proteine wird durch Mitglieder der Rho-GTPase-Familie Rho, Rac und Cdc42 reguliert über die jeweiligen Effektormoleküle p21-aktivierte Kinase (PAK) 1 und 4 und die Rho-Kinase (ROCK). Diese Kinasen phosphorylieren und aktivieren so die LIMK am Threonin-Rest innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinase (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998; Edwards et al., 1999; Maekawa et al., 1999; Ohashi et al., 2000). Dabei wird die LIMK1 am Threonin-Rest 508 und die LIMK2 am Threonin-Rest 505 phosphoryliert (Amano, Tanabe et al., 2001).

Die LIM-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung eines N-terminalen Serinrests auf dem Protein Cofilin. Das phosphorylierte Cofilin wird dadurch inaktiviert und kann nicht mehr länger Aktinfilamente depolymerisieren, was zu einer vermehrten Akkumulation von Aktinfilamenten (F-Aktin) führt (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998; Aspenström, 1999).

Auch wenn bisher viele mit der LIM-Kinase reagierende Proteine identifiziert wurden, so ist das bisher einzig etablierte Substrat der LIM-Kinase ADF/Cofilin (Bernard, 2006).

1.1.5.2.4 Cofilin

Als ein funktionell wichtiges Substrat für die LIM-Kinase wurde ein Protein namens Cofilin identifiziert. Dabei reguliert die LIM-Kinase die Aktin-Dynamik durch Phosphorylierung und Inaktivierung von Cofilin, das sowohl an F-Aktin, als auch an Aktin-Monomere bindet und notwendig für die Depolymerisation der Aktinfilamente ist (Theriot, 1997).

Im dynamischen Prozess der Zellbewegung wird Aktin ständig depolymerisiert und wieder repolymerisiert. Es konnte gezeigt werden, dass für die Zytokinese (Zellteilung), Endozytose und andere Zellprozesse, die von einem raschen Auf-und

Abbau von Aktin-Filamenten abhängig sind, neben den bereits genannten und weiteren zahlreichen Proteinen, Cofilin benötigt wird.

Cofilin gehört zu einer Gruppe von niedrig molekularen Aktin-bindenden Proteinen (15-21kDa), die Aktin-Filamente depolymerisieren. Zu dieser Gruppe gehören das Cofilin der Wirbeltiere und ADF (Aktin-Depolimerisierungsfaktor oder auch Destrin genannt), Twinstar von *Drosophila*, Depactin der Stachelhäuter, ADFs der Pflanzen, Unc-60 von Nematoden, Cofilins von *Saccharomyces* und *Dictyostelium* und Actophorin aus *Acanthamoeba catellanii* (Renoult et al., 1999).

Der Name Cofilin steht für „cofilamentous protein“ (oder kofilamentöses Protein) und spiegelt die Filament-bindende Eigenschaft des Cofilins wieder, die anfangs offensichtlicher schien als dessen depolymerisierende Eigenschaft (Nishida, Maekawa et al. 1984).

In Säugetieren gibt es drei Mitglieder der ADF/Cofilin-Familie: muskelspezifisches Cofilin (cof2), nichtmuskelspezifisches Cofilin (cof1) und ADF (Sarmiere and Bamberg, 2004). Cofilin selbst ist ein 21kDa schweres Protein (Nishida et al. 1984), das aus dem Gehirn und der Niere von Säugetieren isoliert wurde. Bei einem nahezu neutralen pH bindet Cofilin an das F-Aktin in einem 1:1-molaren Verhältnis.

Ebenso ist Cofilin in der Lage, monomerisches Aktin (G-Aktin) zu binden. Die Bindung von Cofilin an F-Aktin blockiert die Bindung von Tropomyosin an F-Aktin und hemmt somit die Aktin-Myosin-Interaktion (Nishida et al. 1984; Yonezawa et al., 1985).

Cofilin wird reguliert durch die Phosphorylierung eines N-terminalen Serin-Rests. Dadurch wird seine Aktivität, F-Aktin zu depolymerisieren inaktiviert (Rosenblatt and Mitchison 1998; Sumi, Matsumoto et al. 2001). Weitere Regulationsmechanismen sind bereits beschrieben worden. So zum Beispiel wird die Aktin-bindende und –dynamisierende Aktivität der Cofiline durch end-capping der Aktinfilamente, durch Aip 1, die Bindung an 14-3-3-Proteine und der Bindung an Phosphoinositide reguliert (Sarmiere and Bamberg, 2004).

Ser-3 scheint die einzige Phosphorylierungsbindungsstelle von Cofilin in Säugetierzellen zu sein. In vitro bindet phosphoryliertes Cofilin weder an G- noch an F-Aktin, wohingegen nichtphosphoryliertes Cofilin dies tut. Phosphorylation ist also ein Inaktivierungsprozess, der zu einer enormen Abnahme seiner Fähigkeit, mit Aktin zusammenzuwirken führt (Ayscough, 1998). Andererseits bindet phosphoryliertes

Cofilin an Phosphoinositide. Das ist eher überraschend, da bekannt ist, dass Phosphoinositide die Bindung von Cofilin an Aktin hemmen (Moriyama et al., 1996). Die biologische Funktion von ADF/Cofilin liegt darin, die Anzahl von Ereignissen in Aktinfilamenten, die als „treadmilling“ bezeichnet werden zu steigern. Treadmilling, oder frei übersetzt „Tretmühlenmechanismus“ ist ein Vorgang, der bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen von G-Aktin und F-Aktin auftritt. Dabei polymerisiert ein Aktinfilament am Plus-Ende genauso schnell, wie es am Minus-Ende depolymerisiert. Netto verändert sich die Länge des Filaments dabei nicht (Theriot 1997; Carlier 1998), aber durch die Bindung kommt es zu einer leichten Rotation der Aktin-Untereinheiten, sodass die helikale Windung des Aktin-Filaments um ungefähr 20% gekürzt wird (Sarmiere et al., 2004). Somit wird durch eine Veränderung der Geometrie der F-Aktin-Helix die Affinität für Aktin verändert (Mc Gough, 1998) und dieser Effekt führt zu einer Fragmentation der Filamente (Mc Gough, 1998; Renoult et al., 1999; Mannherz et al., 2007).

ADF und Cofilin kommen beide in den Säugetierzellen vor und werden häufig in der Literatur in einem Zusammenhang erwähnt. Yeoh et al. konnten 2002 zeigen, dass ADF der potentere Aktin-Depolymerisationsfaktor zu sein scheint. Beide Proteine unterscheiden sich kaum in ihren Fähigkeiten, Filamente zu binden, Proteine oder Untereinheiten zu trennen. Auch zeigen sie keinen signifikanten Unterschied in Ihrer Affinität zum monomeren Aktin: Beide binden 15-fach fester an Aktin-ADP als an Aktin-ATP. Der hauptsächliche Unterschied zwischen beiden Proteinen ist der, dass die Kern-bildende Aktivität von Cofilin-Aktin-ADP-Komplexen doppelt so stark ist wie die des ADF-Aktin-ADP und die wiederum ist doppelt so hoch als die von Aktin-ATP alleine (Yeoh et al., 2002).

1.2 Die akute Pankreatitis

Auf dem Symposium von Marseille 1984 wird die akute Pankreatitis als ein akutes Geschehen definiert, charakterisiert durch akuten abdominalen Schmerz, einhergehend mit einem Anstieg pankreatischer Enzyme im Blut und/oder im Urin (Singer et al., 1985). Es treten verschieden schwere Verlaufsformen auf, von einer milden subklinischen Entzündung bis hin zu hämorrhagischer Nekrose, die letztendlich multiples Organversagen und Tod zur Folge haben kann (Rattner, 1996).

Der exakte Mechanismus der Entstehung der Pankreatitis ist unklar. Es ist zum Beispiel unklar, warum alkoholinduzierte Pankreatitis erst nach vielen Jahren des Alkoholabusus auftritt und nicht nach einem einzigen Alkoholexzess eines Menschen, der nicht an Alkohol gewöhnt ist (Mechanisms of alcoholic Pancreatitis, 2002).

1.2.1 Die akute Pankreatitis im Tiermodell

Eine Reihe von Tiermodellen wurde entwickelt, um die Pathogenese der akuten Pankreatitis verstehen zu lernen. Keine ist streng vergleichbar mit den menschlichen Bedingungen. Gallensteine und Alkoholabusus zum Beispiel sind verantwortlich für ca. 75 Prozent der Fälle der akuten Pankreatitiden beim Menschen, aber in keinem Tiermodell konnte diese Situation exakt rekonstruiert werden. Außerdem sind die üblicherweise in Tiermodellen verwendeten Substanzen, um eine Pankreatitis zu erzeugen, wie Caerulein und Cholin-reduzierte, Ethionin-ergänzte Diät, nicht anerkannte Ursachen einer akuten Pankreatitis beim Menschen.

Nichtsdestotrotz sind die strukturellen und biochemischen Veränderungen, die in der frühen Phase der akuten Pankreatitis gesehen werden außergewöhnlich konstant in den verschiedenen Modellen und ähnliche Veränderungen konnten während der akuten Pankreatitis beim Menschen gezeigt werden. Desweiteren sind die klinischen und pathologischen Hauptmerkmale der akuten Pankreatitis beim Menschen, ungeachtet der auslösenden Ereignisse, sehr ähnlich.

1.2.2 Die Pathogenese der akuten Pankreatitis

Pathogenetisch lässt sich die akute Pankreatitis in drei Phasen einteilen. (1) Eine Initialphase, (2) eine Phase, die Azinuszell-Ereignisse, wie die Zellschädigung beinhaltet und (3) eine extraazinäre Phase, in der es zu einer pankreatischen Entzündung sowie zu systemischen Komplikationen wie Lungen- und Nierenversagen als Antwort auf die Azinuszellverletzung kommt.

Initial bedarf es eines auslösenden Ereignisses, bei dem es sich in den meisten Fällen um extrapankreatische Ursachen handelt. Klinisch scheinen die wichtigsten Ursachen die Passage von Gallensteinen und Alkoholabusus zu sein. Andere

Ursachen, wie die Einnahme von pankreastoxischen Medikamenten, Ischämie und Infektion können ebenso imstande sein, eine akute Pankreatitis auszulösen. Alle bisher beobachteten experimentellen Modelle der akuten Pankreatitis sind durch eine defekte pankreatische exokrine Sekretion charakterisiert. Dies hat zur Annahme geführt, dass so ein Phänomen, also ein Ereignis, dass die Sekretion der Verdauungsenzyme aus der Azinuszelle stört, ein frühes kritisches Ereignis in der Pathogenese bei allen Formen der Pankreatitis sein kann (Steer, 1999).

In der zweiten (frühen) Phase der Pankreatitis treten Ereignisse in den Vordergrund, die innerhalb der Azinuszelle (intraazinär) stattfinden.

Letztendlich bestimmt eine dritte Phase die Schwere einer akuten Pankreatitis, die sich sowohl aus Ereignissen in der Azinuszelle, wie auch aus Ereignissen außerhalb der Azinuszelle zusammensetzt. Diese Ereignisse sind im hohen Maße von der lokalen und systemischen Bildung von Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, Chemokine und anderen Faktoren abhängig. Diese Mediatoren regulieren und koordinieren die lokale Entzündungsreaktion, die den Typ, sowie das Ausmaß des pankreatitischen Zelltodes beeinflussen und letztendlich zu systemischen Komplikationen wie Pankreatitis-assoziierte Lungen- oder Nierenerkrankungen führen (Steer, 1999).

Betrachtet man die verschiedenen Ursachen, also die Initialphase der akuten Pankreatitis, so fällt auf, dass bei allen Formen der akuten Pankreatitis, unabhängig vom auslösenden Ereignis, eine ähnliche Symptomatik und ein vergleichbarer klinischer Verlauf auftreten. Es ist also anzunehmen, dass bei allen Krankheitsbildern eine gemeinsame Pathophysiologie vorliegt (Keim, 2002).

1.2.3 Pathophysiologische Vorgänge in der Frühphase der akuten Pankreatitis

Das exokrine Pankreas synthetisiert und sezerniert eine Vielfalt von Verdauungsenzymen, die normalerweise aktiviert werden, nachdem sie das Duodenum erreicht haben. Eines der frühesten Ereignisse der akuten Pankreatitis ist die Blockade der Sekretion von pankreatischen Enzymen, während deren Synthese weiter fortgeführt wird (Steer, 1997). Die inadäquate intraazinäre Aktivierung des proteolytischen Enzyms Trypsin stellt dabei einen initialen Schritt in der Entwicklung der akuten Pankreatitis dar. Wenn die Trypsinaktivierung die lokalen

Regulationsmechanismen überschreitet, wird ein Circulus vitiosus in Gang gesetzt, in dem auch andere pankreatische Verdauungsenzyme wie Phospholipasen, Chymotrypsin und Elastase, sowie andere Enzymkaskaden aktiviert werden mit folgender Autodigestion des Pankreas (Steer, 1997; Lerch and Gorelick 2000; Vogetseder, 2004).

Normalerweise wird die Selbstverdauung des Pankreas durch kleine Mengen intraazinär aktivierten Trypsins durch verschiedene Mechanismen verhindert:

(1) durch den Serinproteaseinhibitor Kazal Typ I (SPINK1 oder PSTI (pankreatisch sezernierter Trypsin-Inhibitor) kann reversibel bis zu 20 % des Trypsins gebunden und blockiert werden, welches durch vorzeitige Aktivierung von Trypsinogen unter pathologischen Bedingungen anfällt, (2) durch Autolyse des vorzeitig aktivierten Trypsins, (3) durch trypsinaktivierte trypsinähnliche Enzyme, wie Mesotrypsin und Enzym Y, die Trypsin lysieren und inaktivieren und (4) durch unspezifische Antiproteasen im Pankreasparenchym, wie alpha-1-Antitrypsin oder alpha-2-Makroglobulin (Whitcomb et al., 1996; Mitchell et al., 2003).

Während die Synthese der Verdauungsenzyme in der frühen Phase der akuten Pankreatitis weiterläuft, kommt es gleichzeitig zu einer Blockade ihrer Sekretion (Koike et al., 1982). Somit akkumulieren neu synthetisierte Enzyme in der Zelle und gleichzeitig tritt durch die gesteigerte Expression zahlreicher zellulärer Akutphaseproteine (Hitzeschock-Proteine, Pankreatitis-assoziierte Proteine wie z.B. p8 oder PAP) eine Akutphase-Reaktion auf, vermutlich reguliert über MAP-Kinasen bzw. NfκB (Keim et al., 1994; Keim, 2002).

Die Enzyme in der Azinuszelle, die unter physiologischen Bedingungen zu den Lysosomen transportiert werden sollten, scheinen während der akuten Pankreatitis fehlgeleitet zu werden und erscheinen im basolateralen Bereich der Zelle, wo sich jetzt auch fehlgeleitete Zymogengranula befinden. So kommt es zu einer Kolokalisierung (Verschmelzung) von lysosomalen Enzymen mit Verdauungsenzymen innerhalb zytoplasmatischer Organellen (Steer, 1997). Eine derartige Verschmelzung zu großen Vakuolen im Zytoplasma konnte bereits 1977 von Lampel und Kern als frühes Ereignis in der akuten Pankreatitis beobachtet werden (Lampel and Kern, 1977). Man nimmt an, dass es durch die Kolokalisierung zu einer frühzeitigen Aktivierung von Trypsinogen, vermittelt durch die lysosomale Hydrolase Cathepsin B kommt, und dass, einmal aktiviert, Trypsin andere Zymogene aktivieren kann (Steer, 1999). Die Vakuolen werden im Verlauf der frühen Phase der

akuten Pankreatitis zunehmend instabil. Durch ihre Ruptur gelangen so aktivierte Verdauungsenzyme in den zytoplasmatischen Raum und führen so zu einer Zellschädigung (Steer, 1997; Grady et al., 1998). Hier sei darauf hingewiesen, dass es auch unter physiologischen Bedingungen in einem gewissen Ausmaß zu einer Kolokalisierung von lysosomalen Enzymen und Verdauungsenzymen kommt, ohne dass dadurch eine Pankreatitis auftritt (Kukor et al., 2002).

Es wird zusehends offensichtlich, dass die zentrale Voraussetzung für die Auslösung der akuten Pankreatitis die intraazinäre Aktivierung von proteolytischen Enzymen ist, welche letztendlich zu einer Autodigestion der Drüse führt. Inwieweit pH-Wert (Gorelick and Otani, 1999), die gestörte Signalkette von Kalzium oder das Zytoskelett eine Rolle spielen, ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt.

Raraty et al. konnten zeigen, dass eine Überstimulation mit CCK zu einer Trypsinaktivierung und Vakuolenbildung in der pankreatischen Azinuszelle führt (Raraty et al., 2000). Beide Vorgänge scheinen dabei von einem anhaltenden Ca^{2+} -Anstieg abhängig zu sein. Nemoto et al. konnten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der akuten Pankreatitis und der Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts zeigen. Besonders im Hinblick auf die Vakuolenbildung scheint hier das Aktin-Zytoskelett eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte eine Art Ummantelung der Zymogengranula durch F-Aktin beobachtet werden. Physiologischerweise dient dies wahrscheinlich vor allem der Stabilisierung der Vakuolenmembran. Durch eine Zerstörung des F-Aktins während der akuten Pankreatitis kommt es so zu einem Verlust der Stabilität und die Ruptur der Membran wird begünstigt (Nemoto et al., 2004).

Während einer akuten Pankreatitis kommt es also in der Azinuszelle zu einer Störung des intrazellulären Transports, zu einer Hemmung der Sekretion und zu einer Fehlleitung von sekretorischen Vesikeln von der apikalen zur basolateralen Membran (Lampel and Kern, 1977; Koike et al., 1982; Keim et al., 1994) mit konsekutiven Selbstverdau der Bauchspeicheldrüse.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Viele Arbeitsgruppen haben sich bisher mit den pathophysiologischen Ereignissen der akuten Pankreatitis beschäftigt. Trotzdem bleibt der genaue Entstehungsmechanismus unklar.

Die regulierte Sekretion in den Azinuszellen des Pankreas hängt von der Intaktheit des Aktin-Zytoskeletts ab (Muallem et al., 1995). Die Stimulation mit einer supramaximalen sekretorischen Konzentration von CCK oder seinem Abkömmling Caerulein führt zu einer Zerstörung des apikalen Aktinnetzes (O’Konski and Pandol 1990). Hierbei ist auch der p38-MAP-Kinase-Signalweg und Hsp27 involviert (Schäfer, Ross et al. 1998; Schäfer, Clapp et al. 1999; Schäfer and Williams, 2000; Kubisch et al., 2004). Diesem Prozess folgt die Hemmung der Sekretion und es tritt eine Fehlsortierung der Zymogengranula auf, also eine Verschmelzung der Zymogengranula mit Lysosomen oder mit der basolateralen Membran (Saluja, Bhagat et al. 1999). Diese Veränderungen führen zu einer vorzeitigen Aktivierung von Verdauungsenzymen mit der folgenden Zerstörung der Azinuszelle *in vitro* und verursachen somit eine akute Pankreatitis im Tiermodell, die der akuten ödematösen Pankreatitis beim Menschen gleicht. Dieses Modell wurde verbreitet eingesetzt und gut beschrieben (O’Konski and Pandol, 1990). Konsequenterweise kann man annehmen, dass F-Aktin eine der Schlüsselrollen einnimmt, die verantwortlich für den strukturellen Umbau der Azinuszelle während der initialen Phase der akuten Pankreatitis ist.

Da Rho und ROCK das Aktin Zytoskelett in den verschiedensten Zelltypen regulieren und da das mikrotubulär/mikrofilamentöse System an der Vermittlung der Enzymsekretion beteiligt ist, ist davon auszugehen, dass der Rho-Signaltransduktionsweg bei der pankreatischen Enzymsekretion eine Rolle spielt und an der Pathogenese der akuten Pankreatitis beteiligt ist (Kusama et al., 2003).

Als Ziel in der vorliegenden Arbeit galt es, die Expression und Regulation der Rho-aktivierten Kinase (ROCK) in den exokrinen Azinuszellen zu untersuchen. Hierbei wurde mit Hilfe von etablierten Modellen durch Stimulation mit entsprechenden Sekretagoga eine Pankreatitis *in vitro* erzeugt und der Einfluss der Kinase auf andere Signalkaskaden, die konzentrations- und zeitabhängige Stimulierbarkeit der Kinase, der Einfluss etablierter Inhibitoren sowie ihr Einfluss auf vor- oder nachgeschaltete Kinasen untersucht. Es wurde versucht, so die komplette Rho-Signaltransduktionskaskade in der Azinuszelle nachzuweisen und ihren Einfluss auf die Enzymsekretion über die Beeinflussung des Aktinzytoskeletts während der akuten Pankreatitis.

2 Methoden

2.1 Arbeiten mit den Pankreas-Azinuszellen

2.1.1 Gewinnung von isolierten Pankreas-Azinuszellen

Die Methode der isolierten Azinuszellpräparation wurde zum ersten Mal von Amsterdam und Jamieson 1972 beschrieben (Amsterdam and Jamieson, 1972) und von Williams et al. 1978 modifiziert (Williams et al., 1978).

Unter der Verwendung von Plastikmaterial aus Polycarbonat (PC) - da Vorversuche ergeben hatten, dass Kontakt mit Glas die Azinuszellen stark beschädigt - wurde im Rahmen dieser Arbeit im Einzelnen folgendermaßen vorgegangen:

Vor der Organentnahme wurden die Versuchstiere dekapitiert und ausgeblutet. Die Bauchhöhle wurde großflächig eröffnet und das Pankreas unter Schonung von Duodenum und Magen vorsichtig herauspräpariert. In einer Petrischale mit 0,9%iger gekühlter NaCl-Lösung wurde die Milz abgelöst und das Pankreas von Lymph- und Fettgewebe gesäubert.

Basismedium für die Isolierung der Azinuszellen war ein modifizierter Krebs-Henselet-Bicarbonat (KHB)-Puffer mit folgender Zusammensetzung: 22mM Glucose, 2ml einer nicht-essentiellen Aminosäurenlösung, 2mM Glutamin, 0,110M NaCl, 1,13mM MgCl₂, 4,7mM KCl, 0,55mM Na₂HPO₄, 32,5mM NaHCO₃ und 0,51mM CaCl₂. Der Puffer wurde mit 5% CO₂ und 95% O₂ (Carbogen) begast und anschließend der pH-Wert auf 7,35-7,4 eingestellt. Zu 10ml des Puffers wurden 25mg Rinderserum-Albumin, 3000 U/L Kollagenase und eine Spatelspitze Trypsin-Inhibitor hinzugefügt (Kollagenase-Lösung). Mit einer 5ml-Spritze wurden dann 5ml des Puffers aufgenommen und vorsichtig in das Pankreasgewebe injiziert, bis sich die einzelnen Pankreas-Läppchen klar voneinander separierten. Anschließend wurde das Gewebe in einen 25ml Plastik-Erlenmeierkolben überführt und mit Carbogen kurz begast. In einem 37°C warmen Wasserbad wurde das Pankreasgewebe 10 min bei 120 Rüttlungen pro Minute gerüttelt. Nach 10 min wurde das alte Medium gegen frisches Medium gewechselt, das Pankreasgewebe nochmals kurz mit Carbogen begast und anschließend für weitere 25 min gerüttelt. Dann wurde das Gewebe nach Zugabe einer Spatelspitze Trypsin-Inhibitor mechanisch zu einer Gewebe-Zell-Suspension homogenisiert, indem es zunächst durch absteigend großen

Ansaugöffnungen (\varnothing 3mm-0,9mm) einer Polypropylen-Pipette gesaugt wurde. Zur Isolierung der Zellen wurde nun die Gewebssuspension durch ein befeuchtetes Nylonnetz mit einer Porengröße von $150\mu\text{m}$ gefiltert und die gewonnenen Zellen in einem 50ml Falcon-Tube aufgefangen. Das Nylonnetz wurde dann zusätzlich mit 10ml frischen KHB-Puffer, welcher 100mg BSA und eine Spatelspitze Trypsininhibitor enthielt durchspült, um noch die restlichen Zellen aus dem Gewebsverband herauszulösen. Im Anschluss wurden die Azinuszellen über einen Albumingradienten dreimal für jeweils ca. 5 min in einer Sedimentationslösung gewaschen, wobei der Sedimentationsüberstand jeweils verworfen wurde. Dann wurden die Azinuszellen in eine Inkubationslösung aufgenommen. Abhängig vom weiteren Versuchsablauf wurden die Zellen entweder direkt weiterverarbeitet oder für 20 min bis 3 h unter stündlicher Begasung bei 37°C präinkubiert und anschließend mit verschiedenen Testsubstanzen stimuliert

2.1.2 Stimulation der Azinuszellen

Frisch isolierte Ratten-Azinuszellen konnten mit verschiedenen Sekretagoga in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert werden, um das Enzymsekretionsverhalten von Azinuszellen zu untersuchen.

Vor der Stimulation mit den verschiedenen Testsubstanzen wurde eine definierte Menge (z.B. 1ml) der Zellsuspension entnommen und in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) bei 13500 rpm für 15 sec zentrifugiert. 200 μl Überstand wurden in ein frisches Eppendorf-Tube überführt und auf Eis gelagert (T0-Fraktion). T0 entspricht hierbei der Nullwertprobe und drückt die Enzymsekretion zum Zeitpunkt Null aus.

Anschließend wurde nochmals dieselbe Menge aus der Suspension entnommen, kurz zentrifugiert, und das Pellet im Ultraschall-Sonicator zerstört (P1-Fraktion). In der P1-Fraktion befindet sich nun der Gesamtgehalt der Amylase, der sich aus intra- und extrazellulären Anteilen zusammensetzt. Dieser Wert dient zur Ermittlung des prozentualen Anteils der durch die Stimulation freigesetzten Amylase, die in % des Gesamtgehalts dargestellt wird.

Die restlichen Zellen wurden zu je 2ml Endvolumen aufgeteilt, die entsprechenden Testsubstanz hinzugegeben, ca. 3 sec mit Sauerstoff begast und im Wasserbad bei 37°C und bei ca. 20 Rüttlungen pro Minute für die entsprechende Zeit stimuliert. Anschließend wurden die Suspensionen in Eppendorf-Tubes überführt, zentrifugiert

und auf Eis gelagert. Aus den übriggebliebenen, am längsten inkubierten, unstimulierten Zellen wurde eine definierte Menge (z.B. 1ml) in ein Eppendorf-Tube überführt, wie oben zentrifugiert und der Überstand auf Eis gelagert (T1-Fraktion).

Die T1-Fraktion entspricht hierbei der basalen Sekretion von Amylase innerhalb der Stimulationsphase ohne Zusatz von Sekretagoga.

Die Amylase-Freisetzung wurde als Prozent des Absolutgehalts der intakten Azini zu Beginn der Inkubation ausgedrückt. Der Ausgangswert T0 wurde von allen anderen Werten abgezogen. Zur Bestimmung der Basissekretion wurden die Werte T1 und T0 voneinander abgezogen. In jedem Experiment zur Amylase-Bestimmung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.1.3 Amylase-Aktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Amylase wurde ein fertiger Test-Kit von Sigma Diagnostics (Infinity Amylase Reagenz) verwendet. Hierbei wird das im Reagenz enthaltene Substrat Ethyliden-p-Nitrophenol-Glucose 7 durch α -Amylase in kleinere Fragmente gespalten, auf die dann α -Glucosidase einwirken kann unter Freisetzung von p-Nitrophenol als Chromophor. Dabei entsteht ein farbiges Produkt. Die Geschwindigkeit der Bildung von p-Nitrophenol ist dabei proportional zur Aktivität der α -Amylase und kann in einem Spektrophotometer anhand des Extinktionsanstiegs bei 405nm über einen Zeitraum von 120 sec gemessen werden. Ethyliden verhindert dabei den Abbau des Substrats durch Exoenzyme, sodass bei einem Mangel an α -Amylase kein Farbumschlag stattfindet.

2.1.4 Präparation von Pankreasfragmenten

Zur Isolierung einzelner Pankreasfragmente, wurde das entnommene Pankreas in der Petrischale in einzelne ca. 2x2mm große Fragmente zerlegt und zur Weiterbearbeitung sofort in HEPES-Puffer auf Eis überführt. Anschließend wurden die Fragmente mit den verschiedenen Testsubstanzen stimuliert und bei 4°C und 14000 rpm für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Pankreasfragmente wurden dann nach Zugabe eines Lysis-Puffers im Ultraschall-Sonicator zerstört oder im Homogenisator homogenisiert. Danach wurde der

Proteingehalt mit einem Protein-Assay-Kit (BioRad, München) bestimmt und die Proben entsprechend zubereitet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode. Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, durch Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau an Proteine im sauren Milieu. Die Kalibriergerade wurde mit definierten BSA Standards (0,2-0,8mg/ml) angefertigt. Die Verdünnung des Reagenz und die Durchführung erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

2.1.5 Zellfraktionierung

Zur Auftrennung in Zytosolfraktion und Pelletfraktion wurden Pankreasfragmente verwendet, die, wie bereits oben beschrieben, präpariert wurden. Diese wurden in HEPES-Puffer aufgenommen und mit der jeweiligen Testsubstanz stimuliert. Danach wurden die Fragmente bei Raumtemperatur für 15 sec zentrifugiert, der Überstand restlos entfernt und verworfen. Anschließend wurden die Fragmente in einem Lysispuffer im Homogenisator homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden dann für 10 min bei 10000 rpm und 4°C in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Im Überstand, der sogenannten Zytosolfraktion, wurde dann mit Hilfe eines Protein-Assay-Kits (BioRad, München) der Proteingehalt gemessen, die Proben entsprechend aliquotiert und die Reaktion mit 4XSDS-Puffer gestoppt. Die übriggebliebenen Zellen im Pellet wurden mit Lysispuffer, der zusätzlich 2% NP-40 (IGEPAL CA-630) enthielt im Sonicator zerstört. In dieser Pelletfraktion wurde anschließend der Proteingehalt bestimmt und die Proben wie oben beschrieben aufbereitet.

2.1.6 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation wurden die Azini wie bereits beschrieben präpariert und mit den entsprechenden Testsubstanzen stimuliert, oder ein Stück Pankreasgewebe wurde isoliert und mit Lysispuffer in einem Homogenisator mit einem Glaskolben homogenisiert. Das Zellpellet oder Pankreashomogenat wurde dann in der Eppendorf-Kühlzentrifuge bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang

wurde einmal wiederholt. Im Überstand wurde im Anschluss mit Hilfe eines Bio-Rad Protein-Assay-Kits der Proteingehalt bestimmt und die Proben auf 1 mg Protein pro μl aliquotiert.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Proben rotierend bei 4°C für 30 min mit 30 μl Protein A- bzw. Protein G-Beads inkubiert. Danach wurden sie für 30 sec bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Dem Überstand wurden jeweils 10 μl des jeweiligen Antikörpers, und 35 μl der entsprechenden Beads hinzugefügt. Dabei bindet der Antikörper an das spezifische Antigen und die Beads an die Antikörper, welche somit abzentrifugiert werden können. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht oder für 2 Stunden bei 4°C. Danach wurden die Proben dreimal mit 500 μl Lysispuffer in der Kühlzentrifuge bei 4°C, 2500 rpm und 30 sec gewaschen. Der Überstand wurde restlos entfernt und die Reaktion mit jeweils 10 μl 4XSDS-Puffer gestoppt.

2.2 Western Blot

2.2.1 Probenaufbereitung

Pankreasläppchen oder Azinuszellen wurden wie oben beschrieben präpariert, mit den entsprechenden Testsubstanzen stimuliert und in einem eiskalten Lysispuffer lysiert. Die im Lysispuffer enthaltenen Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren, sowie die konsequente Kühlung, diente der Antagonisierung der aus den Pankreaslysaten freigesetzten Phosphatasen und Proteinasen. Danach wurden die Proben im Sonicator lysiert und in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Im Überstand wurde dann der Proteingehalt bestimmt.

Mit dem Laemmli-Puffer wurde die Reaktion unter 5-minütigen Kochen bei 95°C gestoppt und gleichzeitig die Proben angefärbt, wobei durch das im Puffer enthaltene Mercaptoethanol sowie die hohe Temperatur Disulfidbrücken gespalten und Proteine denaturiert wurden.

2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Protein-Auftrennung erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

Für die Auftrennung wurde jeweils eine definierte Proteinmenge auf Acrylamidgele aufgetragen. Die Acrylamidgele bestanden dabei aus einem Sammelgelanteil, auf dem die Proben aufgetragen wurden und einem Trenngelanteil, in welchem die Auftrennung der Proteine erfolgte. Als Molekulargewichtsstandard wurde Prestained SDS-PAGE Standards (BioRad, München) verwendet. Die Dicke des Gels richtete sich dabei nach der Größe des zur Auftrennung gewünschten Proteins. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei 35mA und 300V in einem SDS-Laufpuffer. Danach wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dieser Transfer wurde bei 300mA für 50 min oder bei 30mA über Nacht in einem Transfer-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit 10% Trockenmilch/TBST-Lösung bei 30 Rüttlungen pro Minute geblockt. Nach einem 10-minütigen Waschgang in TBST wurde dann der 1. Antikörper für eine Stunde oder über Nacht aufgetragen. Danach wurde dreimal im TBST/Top-Block-Puffer (2%) gewaschen und dann die Membran mit dem 2. Antikörper inkubiert. Nach weiteren fünf Waschgängen mit 2%iger TBST/Top-Block-Lösung wurden die jeweils nachzuweisenden Proteine durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL-Lösung) gemäß den Angaben des Herstellers mittels ECL-Film detektiert.

Die Auflagezeit des Films für eine zuverlässige Detektion betrug in der Regel ca. 5-10 min. Die Größe der detektierten Proteine wurde durch den Vergleich eines Protein-Standard-Markers festgestellt.

2.3 Rho-GTPase Pull down-Assay

Zur Darstellung von aktiviertem Rho wurde ein nicht-radioaktiver GTPase Pull-Down Kit der Firma Pierce Biotechnology verwendet. Der Kit beinhaltet ein GST (Glutathion-S-Transferase) -Fusionsprotein der Rhotekin-Bindungsstelle (GST-Rhotekin-RBD), um zusammen mit Glutathion-Agarose-Beads spezifisch aktives Rho herauszuziehen, sowie einen Anti-Rho-Antikörper für die Western Blot -Detektion. Außerdem sind zwei Kontroll-Nukleotide, GTPys und GDP enthalten, die dazu verwendet werden können, um jeweils Positiv- und Negativkontrollen aufzuzeigen.

Azini wurden wie oben beschrieben isoliert und ein Teil mit CCK stimuliert. Nach Zentrifugation bei 13400 rpm bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500µl Lysispuffer des Kits sonifiziert. Dann wurde für 4 min bei 4°C

und 14.000 rpm zentrifugiert und der Proteingehalt im Überstand gemessen. Ein Drittel des Pankreas wurde homogenisiert und mit dem Kit- Lysispuffer zweimal für 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Im Überstand wurde der Proteingehalt bestimmt.

Den Lysaten wurde nun 10µl 0,5M EDTA und 5µl 10mM GTPγS oder 5µl 10mM GDP zugefügt, mit Lysispuffer auf 500µl Gesamtmenge aufgefüllt und bei leichtem Rütteln über 15 min bei 30°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Proben auf Eis überführt und 32µl 1M MgCl₂ zugeführt.

Der Pull-down Assay wurde in den weiteren Schritten entsprechend den Instruktionen des Herstellers ausgeführt. Den Proben wurden Glutathion-Agarose-Beads zugeführt, die an mit Rhotekin-RBD fusioniertes GST gekoppelt waren. Über Nacht erfolgte die Inkubation unter leichtem Rütteln bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit je 400µl Lysispuffer wurde die Reaktion mit Laemmli-Puffer gestoppt. Die präzipitierte, aktive GTPase wurde mit dem entsprechenden Antikörper durch Western Blot -Analyse nachgewiesen.

2.4 *In vitro*-Kinaseaktivitäts-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der einzelnen Kinasen wurden Pankreasfragmente mit den entsprechenden Testsubstanzen stimuliert und anschliessend die Fragmente bei Raumtemperatur und 13500 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 15 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach Zugabe von 500µl Lysispuffer wurden die Fragmente im Sonicator zerstört. Anschließend wurde der Protein-Gehalt bestimmt und die Proben auf 1mg Protein pro µl aliquotiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Proben für 30 min mit je 35µl Protein G-Beads inkubiert, bei 4°C und 2500 rpm für 30 sec zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde dann mit jeweils 10µl Antikörper und 30µl Protein G-Beads über Nacht bei 4 °C im Rotor inkubiert und somit die spezifische Bindung des Antigens ermöglicht.

Am folgenden Tag wurden die Proben zweimal mit Lysispuffer gewaschen und zuletzt einmal mit einem Kinase-Assay-Puffer.

Im Isotopenlabor wurden danach den Proben je 20µl des P³² γ-ATP enthaltene Kinase-Aktivitätspuffer zugegeben. Anschliessend wurden die Proben im 30°C-warmen Wasserbad für 20 min bei 120 Rüttlungen pro Minute gerüttelt. Dann wurde

die Reaktion mit jeweils 10µl 4XSDS-Puffer gestoppt und die Proben bei 95°C für 5 min gekocht. Zur Auftrennung der Proteine wurden die Proben auf einem 12 %-Acrylamid-Gel aufgetragen und bei 35mA aufgetrennt.

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen wurde das Gel mit einer Coomassie-Blau-Färbung (Staining) -Lösung für 3 min angefärbt. Mit einer „Destaining“ -Lösung wurde das Gel durch zwei bis dreimaliges Waschen wieder entfärbt und für einige Minuten im bidestillierten Wasser gewaschen. Dann wurde das Gel in einem Gelrockner bei 80°C für 45 min getrocknet und anschliessend für 12 und 36 Stunden bei -80°C autoradiographiert.

Anschließend wurden die Gele eingescannt und mittels ImageJ[®] analysiert. Die Signalintensitäten der Proteine boten verschiedene Graustufen, welche zueinander ins Verhältnis gesetzt und digitalisiert wurden. Daraus konnte eine graphische Darstellung erfolgen, und eine Quantifizierung der Ergebnisse war möglich.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Sigma Stat, Version 2.03 (SYSTAT Software Inc., Chicago, IL). Die graphischen Auswertungen und Abbildungen wurden mit Sigma Plot, Version 11.0 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden jeweils mit den Mittelwerten und den zugehörigen Standardabweichungen (standard error of means, SEM) dargestellt. Die einzelnen Proben aus einem Experiment wurden jeweils z.B. doppelt oder dreifach gemessen und daraus ein Mittelwert (mean) gebildet. Bei mehreren Experimenten wurden dann die jeweils ermittelten Mittelwerte wiederum verwendet, um die Standardabweichung zu ermitteln. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem „one sample t-test“ oder dem „Student´s t-test“ berechnet. Dabei wurde $p < 0,05$ und $p < 0,01$ als statistisch signifikant betrachtet.

3 Geräte und Materialien

3.1 Allgemeine Chemikalien

30% Acrylamid-Bis	BioRad GmbH, München, Dtlid.
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Benzamidine (MG156,6)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Dtlid.
Blotting Grad Blocker Non-Fat Dry Milk	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Brij® 35, 30%-Lösung	Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Calciumchlorid; CaCl ₂ (MG 147)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Dtlid.
Coomassie™ Violet R200	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Dinatriumhydrogenphosphat; Na ₂ HPO ₄ (MG 268,07)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
D ₂ – Dithiothreitol (DDT) (MG 154,3)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
D-(+)-Glucose (MG180,2)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
EDTA (MG 372,2)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Essigsäure C ₂ H ₄ O ₂	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Glycerol (MG 92,09)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
β-Glycerophosphat (MG 216)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Glycin (MG 92,09)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES) (MG 238,3)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Isofluran “Forene®”	Abbott GmbH, Wiesbaden, Dtlid.
Isotonische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen, Dtlid.
IGEPAL CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Kaliumchlorid; KCl (MG 74,55)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Kaliumhydrogenphosphat; KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Mg ²⁺ -ATP	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Magnesiumchlorid; MgCl ₂ (MG 203,3)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Manganchlorid; MnCl ₂ (MG 197,9)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
β-Mercaptoethanol (MG 78,13)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Methanol; MeOH	Merck GmbH, Schwalbach/Ts. Dtlid.

Natriumchlorid; NaCl (MG 58,44)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulphate, SDS) (MG 288,38)	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Natriumfluorid; NaF (MG 41,99)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Natriumhydrogencarbonat; NaHCO ₃ (MG 81,01)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Natriumhydroxid; NaOH (MG 40,0)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Natriumorthovanadat; Na ₃ VO ₄ (MG183,9)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Natriumpyrophosphat; Na ₄ P ₂ O ₇ (MG 446,1)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Nicht-essentielle Aminosäuren (Non-essential-Aminoacids)	Invitrogen, Karlsruhe, Dtlid.
Prestained SDS PAGE Standards; broad range und low range	P ³² Perkin Elmer, Köln, Dtlid. BioRad GmbH, München, Dtlid.
Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20) (MG 216,6)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Protease-Inhibitor-Cocktail Set I	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Salzsäure (HCl _{aq}) (MG 36,46)	Merck GmbH, Darmstadt, Dtlid.
N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Top-Block	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Dtlid.
0,2% Triton [®] X-100	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trizma [®] -Base (MG 121,1)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Trizma [®] -Hydrochlorid (MG 157,6)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtlid.

3.2 Verwendete Antikörper

Anti-mouse IgG	Amersham pharmacia, biotech, UK
Anti-rabbit IgG	Amersham pharmacia, biotech, UK
Rho A (119):sc-179 (MG 24 kDa)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Europa
Rock-2 (H-85): sc-5561, (MG 150 kDa)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Europa
LIMK-2 (H-78): sc-5577	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Europa
Cofilin (MG 19kDa),	BD Transduction Lab., Heidelberg, Dtlid.
Immobilized Protein G	Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA
Immobilized Protein A	Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA

3.3 Verwendete Sekretagoga

CCK	Research Plus, Manasquan, New Jersey
Carbachol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtl.
Bombesin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtl.
TPA (PMA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtl.
CCK-JMV-180	Amersham pharmacia, biotech, UK

3.4 Verwendete Substrate

Histone H1, Calf Thymus	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
MYPT-1	Upstate biotechnology, NY, USA
Myelin Basic Protein (MBP)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Dtl.
Human Recombinant Cofilin (MG 20kDa)	Cytoskeleton Inc., Denver, USA

3.5 Spezifische Inhibitoren

y-27632 (MW 338,3)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
--------------------	-------------------------------

3.6 Puffer und Lösungen

3.6.1 Azinus-Zellisolierung

Krebs-Ringer-Puffer (KRB)

Glucose	22mM
Nicht-essentielle Aminosäuren	20x
Glutamin	2mM
NaCl	0,110 M
MgCl ₂	1,13mM
KCl	4,7mM
Na ₂ HPO ₄	0,55mM
NaHCO ₃	32,5mM
CaCl ₂	0,51mM

Begasen mit 5% CO₂ und 95% O₂ (Carbogen)

pH-Titration auf pH 7,35-7,4

HEPES-Ringer-Puffer (HRB)

Glucose	22mM
Nicht essentielle. Aminosäuren	20x
Glutamin	2mM
NaCl	0,127M
MgCl ₂	0,565mM
KCl	4,7mM
Na ₂ HPO ₄	0,55mM
HEPES	10mM
CaCl ₂	1,275mM

Begasen mit 100% O₂

pH Titration auf pH 7,45-7,48

Collagenase-Lösung

KBR	10ml
BSA	25mg
Collagenase	3000U

Wasch-Lösung

KBR	10ml
BSA	100mg

Sedimentationslösung

KBR	50ml
BSA	2g

Inkubationslösung

HBR	200ml
BSA	200mg

3.6.2 Probenaufbereitung**Lysispuffer**

Trizma [®] -Base	50mM
NaCl	150mM
Triton X-100	0,2%
EDTA	5mM
NaF	25mM
Natriumpyrophosphat	10mM
β-Glycerophosphat	25mM
Natriumorthovanadat	2mM
Protease-Inhibitor-Cocktail	100µl/10ml

pH-Titration auf pH 7,4

Lysispuffer mit NP-40 (IGEPAL CA 630)

Trizma [®] -Base	50mM
NaCl	150mM
Triton X-100	0,2%
EDTA	5mM
NaF	25mM
Natriumpyrophosphat	10mM
β-Glycerophosphat	25mM
Natriumorthovanadat	2mM
NP-40 bzw. IGEPAL CA-630	2%
Protease-Inhibitor-Cocktail	100µl/10ml
<i>pH-Titration auf pH 7,4</i>	

Laemmli-Puffer

Trizma [®] -HCl	0,2M (pH 6,8)
SDS	8%
β-Mercaptoethanol	10%
Bromphenolblau	0,2%
Glycerol	40%

Sodiumdodecylsulfat (4XSDS)-Puffer:

Trizma [®] -Base	1M
SDS	20%
Glycerol	4ml
DDT	0,4M
Mercaptoethanol	5%

3.6.3 Western Blot**Trenngelpuffer**

Trizma [®] -Base	1,5M
SDS	0,014M
Aqua dest.	
<i>pH-Titration auf pH 8,8</i>	

Sammelgelpuffer

Trizma [®] -Base	0,5M
SDS	0,014M
Aqua dest.	
<i>pH-Titration auf pH 6,8</i>	

SDS-Laufpuffer-Stammlösung

Trizma®-Base	25mM
Glycin	0,2 M
SDS	10mM
Aqua dest.	

Transfer-Puffer

TrisBase	25mM
Glycin	0,2M
SDS	30mM
Methanol	5M
mit Aqua dest.	

Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween®20 (TBS-T)

TrisBase	20mM
NaCl	140mM
Aqua dest.	
<i>pH-Titrierung auf pH 7,6</i>	
Tween® 20	0,15%

Blocklösung

TBS-T	
Non-Fat Dry Milk/Top Block	5%

Waschlösung

TBS-T	
Non-Fat Dry Milk/Top Block	2%

Trenngel 10% (für 4 Minigele)

Trenngelpuffer	4,0 ml
Aqua dest.	6,7ml
30% Acrylamid-Bis	5,3ml
APS 10%	25µl
TEMED	12,5µl

Sammelgel

Sammelgelpuffer	2,5ml
Aqua dest.	5,9ml
30% Acrylamid-Bis	1,6ml
APS 10%	60µl
TEMED	20µl

3.6.4 Kinase-Assay

Lysispuffer für Kinase-Assay

Trizma®-Base	50mM
NaCl	150mM
Natriumorthovanadat	1mM
NP-40 bzw. IGEPAL CA-630	1%
NaF	25mM
β-Glycerophosphat	25mM
Natriumpyrophosphat	10mM
EDTA	5mM
Benzamidin	1mM
<i>pH-Titration auf pH 7,4</i>	

Kinase-Assay-Puffer

HEPES	50mM
MgCl ₂	10mM
MnCl ₂	5mM
Brij 35	0,02%
DDT	2mM
<i>pH-Titration auf pH-Wert 7,4</i>	

Kinase-Aktivitäts-Puffer (pro Sample)

P ³² _γ -ATP	5μCi
Mg ²⁺ -ATP	2,5μl
Myosin Basic Protein (MBP) oder anderes Substrat	5μg/μl
Kinase-Assay-Puffer ad 20μl	

Coomassie-Färbe-Lösung

Methanol	500ml
Essigsäure 100%	100ml
Coomassie Brillant-Blau	2,5g
H ₂ O	400ml

Destaining (Entfärbe) -Lösung

Methanol	100ml
Essigsäure 100%	70ml
H ₂ O	830ml

3.7 Reagenzien und Kits

Amylasebestimmung

Amylase-Reagenz, INFINITY™, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA

Proteinbestimmung

BioRad Protein Assay, BioRad, München

Protease Inhibitor Cocktail Set I Calbiochem, La Jolla, Kanada

Western Blot

ECL Western Blotting Detection Reagents Amersham Biosciences

GTPase Pull-Down-Assay

Active Rho Pull-Down and Detection Kit, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA

3.8 Technische Geräte und Materialien

Analysenwaage	Satorius, Göttingen, Dtl.
Aufnahmesystem für Agarosegele	BioRad, München, Dtl.
Blot Kammer	BioRad, München, Dtl.
Einmal-Küvetten, UV	Sarstedt, Nümbrecht, Dtl.
Gel-Blotting Papier, 0,37 mm	Schleicher & Schüll, Dassel, Dtl.
Geltrockner	BioRad, München, Dtl.
Kreisrüttler Rocky 3D	Fröbel Labortechnik, Lindau, Dtl.
Hyperfilm™ECL High performance chemiluminescence film	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Isofluran Vaporator	Dräger, Lübeck, Dtl.
Kanülen, 27G	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Kühlzentrifuge 541712	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MiniSpin Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke, Staufen, Dtl.
Minigelapparatur	BioRad, München, Dtl.
Nitrocellulosemembran „Protran“	Schleicher & Schüll, Dassel, Dtl.
pH Meter InoLab pH Level 1	WTW, Weilheim, Dtl.
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Dtl.

Polytron Homogenisator	Kinematica AG, Littau/Luzern, Schweiz
Power Supply (Elektrophorese)	Amersham Phamacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Reagenzwasser System (Aqua dest.)	Millipore, Molsheim, Frankreich
Sonoplus Bandelin HD 2070	Bandelin Electronic, Berlin, Dtlid.
Überkoprotator	Fröbel Labortechnik, Lindau, Dtlid.
Ultrospec 3100 pro	Amersham Phamacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Vortex Mixer 2020	neoLab, Heidelberg, Dtlid.
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel, Dtlid.

3.9 Tiere

Für die Präparation von Lämpchen und isolierten Azinuszellen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 100-150g verwendet. Die Tiere wurden in vollklimatisierten Ställen mit einem konstanten 12 h Licht-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter und unter den entsprechenden 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.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der Stimulierbarkeit intakter Azini mit CCK im Amylase-Assay

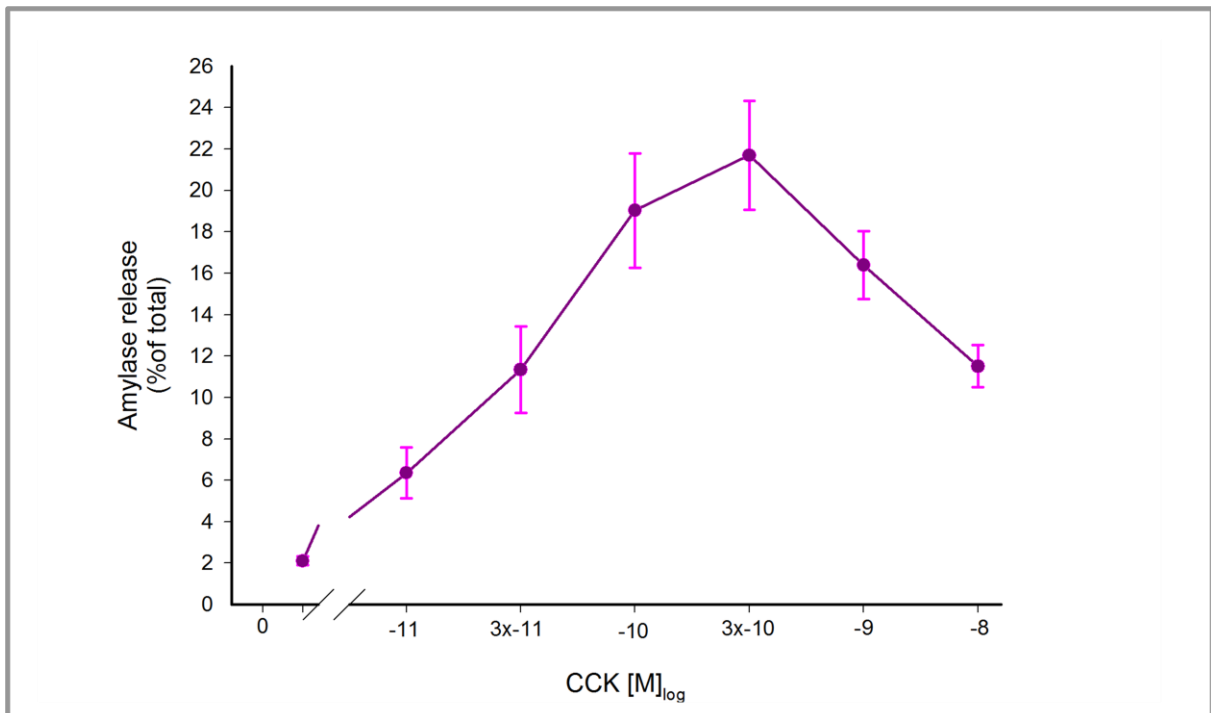
Da Azinuszellen ohne Verlust ihrer Zellpolarität nicht zu kultivieren sind, müssen experimentelle Untersuchungen an frisch präparierten Zellen stattfinden. Die Schwierigkeit besteht darin, strukturelle und funktionell intakte Azinuszellen aus dem Pankreasgewebe zu isolieren.

Die Präparationstechnik der Azinuszellen wurde Anfang der 70er Jahre von Amsterdam und Jamieson entwickelt (Amsterdam and Jamieson, 1972, 1974). 1978 wurde diese Methode von J.A. Williams modifiziert (Williams et al., 1978) und im Rahmen dieser Arbeit angewendet. Durch kontrollierte enzymatische Digestion zuvor explantierter Pankreata von Ratten mit gereinigter Kollagenase und Chymotrypsin, gefolgt von mechanischem Herauslösen der exokrinen Zellen vom umgebenen Gewebe, können letztendlich nach Anwenden eines Dichtegradienten und durch Zentrifugation die verschiedenen Zellfraktionen getrennt werden.

Die Funktionstüchtigkeit und damit die Intaktheit der Azinuszellen wurde durch Messung der sekretorischen Antwort auf Stimulation untersucht.

Abbildung 8 zeigt die Dosis-Wirkungskurve von CCK auf die Amylasesekretion in der Azinuszelle der Ratte nach 30 Minuten Stimulation mit verschiedenen CCK-Konzentrationen. Die Höhe der Amylasesekretion (ca. 22% gegenüber der Basalsekretion von 2%) stimmt dabei mit früher publizierten Ergebnissen überein (Williams and Yule, 1993). In den vorliegenden Ergebnissen kommt es mit einer CCK-Konzentration von 300pM zur maximalen Amylasesekretion. Aufgrund der Konstanz und des übereinstimmenden Kurvenverlaufs kann somit eine Validität des Azinusmodells als gesichert angesehen werden. Charakteristisch für dieses Modell ist eine Hemmung der Sekretion nach Stimulation mit supramaximalen Konzentrationen von CCK (>1nM). Dies konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen ebenfalls gezeigt werden.

Abb. 8: graphische Darstellung der Amylasesekretion nach 30 Minuten mit verschiedenen CCK-Konzentrationen



Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm dem mittleren Standardfehler von 6 unabhängigen Experimenten.

4.2 Expression und Regulation von ROCK

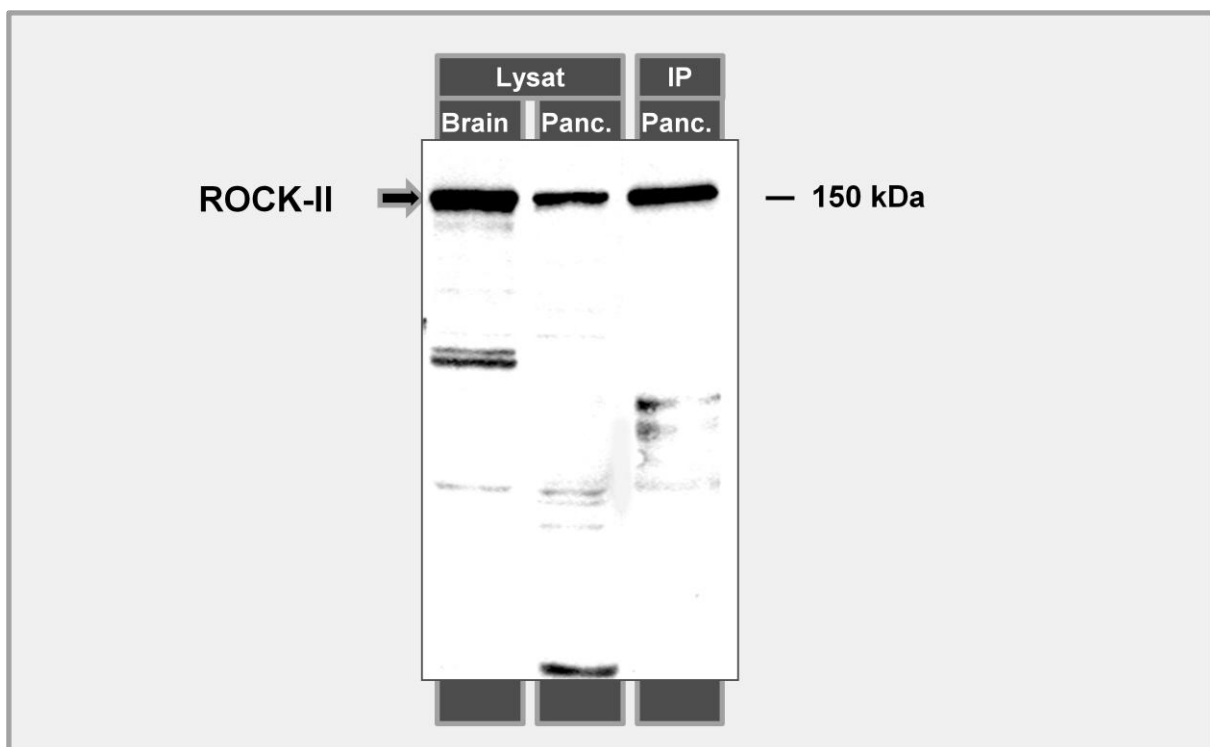
Es gibt zwei Isoformen der Rho-Kinase: ROCK-I und ROCK-II. ROCK-I (ROK β oder p160^{ROCK}) wird vor allem in der Leber, Milz, Niere und den Testes gefunden. ROCK-II (ROK α , 150 kDa) überwiegt in anderen Geweben, vor allem im Gehirn und in der Skelettmuskulatur (Nakagawa et al., 1996).

Beide sind Serin/Threonin-Kinasen, die selektiv an GTP-Rho binden und durch diese Bindung aktiviert werden. Dabei phosphoryliert ROCK die LIMK2 am Threonin-Rest 508 und die LIMK1 am Threonin-Rest 505 innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinase und aktiviert sie somit (Amano, Tanabe et al., 2001).

4.2.1 Nachweis von ROCK-II in der Azinus-Zelle im Western Blot und nach Stimulation mit CCK

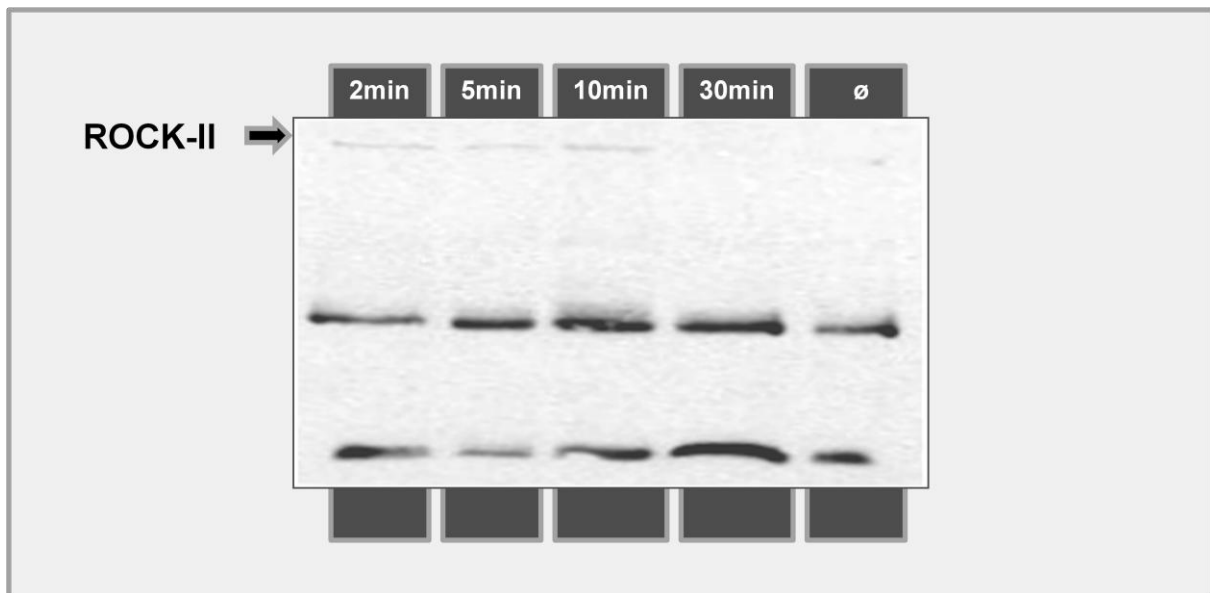
Abbildung 9 zeigt die Expression von ROCK-II in der Azinuszelle sowohl im unstimulierten Zustand, als auch nach Immunpräzipitation. Als Kontrolle wurde Gewebe aus dem Gehirn der Ratte verwendet. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass ROCK-II in der Azinuszelle des Pankreas der Ratte auf Proteinebene exprimiert wird.

Abb. 9: Nachweis der Expression von ROCK-II in der Azinuszelle



Jeweils 20µg Protein aus unstimulierter Azinus-Zellsuspension und Rattenhirn (Bahn 1 und 2), und nach Immunpräzipitation im Azinuszelllysat mit ROCK-II-Antikörper (goat) (Bahn 3) wurden pro Bahn aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-ROCK-II-Antikörper (goat) in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (bovine-Anti-goat) erfolgt in einer Konzentration von 1:15000.

Um eine Abhängigkeit der Expression der Kinase von der Inkubationszeit mit CCK zu untersuchen, wurden frisch isolierte Azinuszellen über 2, 5, 10 und 30 Minuten stimuliert und die Proteine mittels Western Blot getrennt. In Abbildung 10 konnte eine Zunahme der ROCK-II Expression nach unterschiedlich langer Stimulation mit der gleichen CCK-Konzentration gezeigt werden.

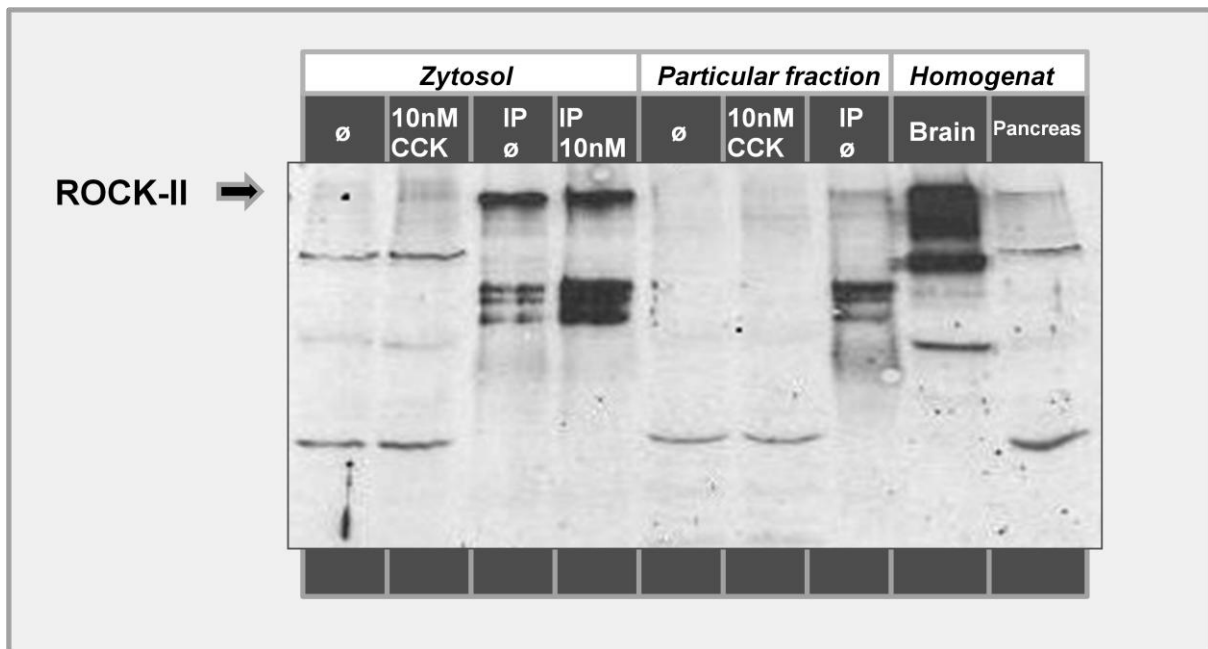
Abb. 10: ROCK-II in der Azinuszelle nach unterschiedlich langer Stimulation mit CCK

Der Reihe nach wurde Protein aus Azini-Zellsuspension nach unterschiedlich langer Stimulation mit 10nM CCK (2min (Bahn 1), 5min (Bahn 2), 10min (Bahn3), 30min (Bahn 4)) aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle dienten unstimulierte Azinuszellen (Bahn 5). Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-ROCK-II-Antikörper (goat) in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper erfolgte in einer Konzentration von 1:15000.

4.2.2 Zeitkinetische und dosisabhängige Darstellung von ROCK-II in der Azinuszelle aufgetrennt nach Zytosol- und Zytoskelettfraktion

Zur Bestimmung der Lokalisation von ROCK-II in den Pankreas-Azinuszellen wurden Azinuszellen der Ratte isoliert und nach Stimulation mit 10nM CCK durch Sonifikation sowie Zentrifugation in eine zytosolische und eine zytoskelettale Fraktion getrennt. Nach Immunpräzipitation mit einem ROCK-II-Antikörper wurden die Proteine per Western-Transfer getrennt und danach die Membran mit einem ROCK-II-Antikörper markiert (Abb. 11).

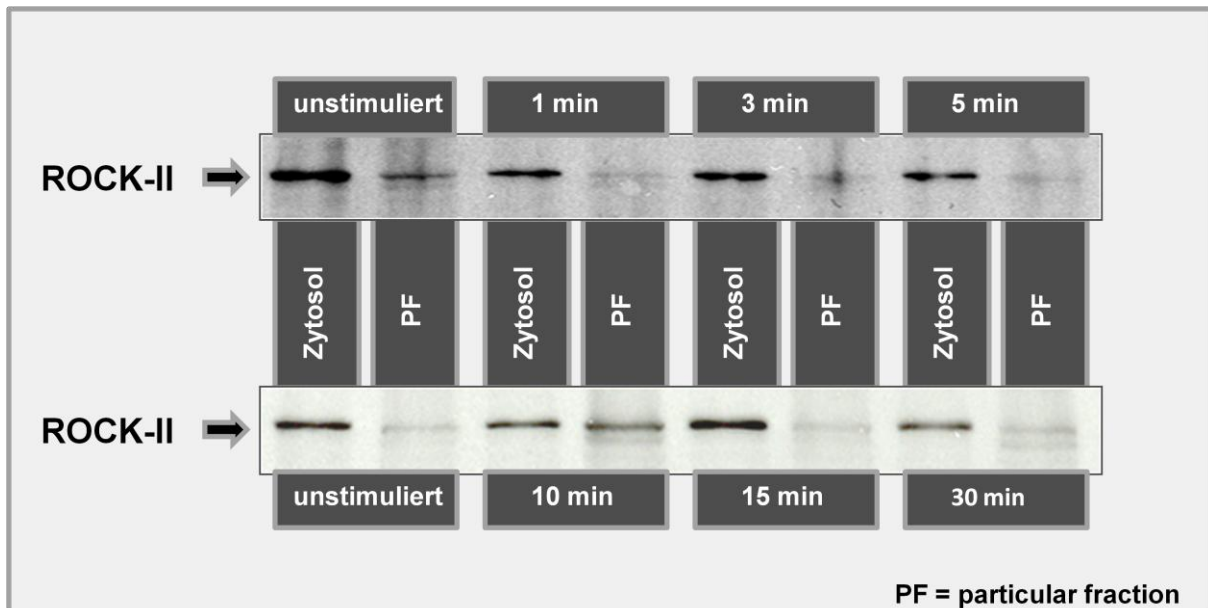
Deutliche Proteinbanden sind in der Zytosolfraktion zu sehen, wohingegen in der zytoskelettalen Fraktion sich keine eindeutige Proteinbande demarkiert hat. Insgesamt lässt das Ergebnis darauf schließen, dass ROCK-II überwiegend im Zytosol vorliegen muss und dabei eine Zunahme der Expression nach Stimulation mit CCK erfolgt. Hierbei wurde eine Stimulation mit einer supramaximalen Konzentration von CCK (10nM), welche bekanntermaßen das Aktin-Zytoskelett zerstört, gewählt.

Abb. 11: ROCK-II in zytosolischen und zytoskelettalen Fraktionen der Azinuszellen

Aus der zytosolischen Zellfraktion wurden auf Bahn 1 und 2 jeweils 100µg Protein unstimuliert und nach Stimulation mit 10nM CCK aufgetragen, auf Bahn 3 und 4 nach Immunpräzipitation mit ROCK-II unstimuliert und stimuliert mit 10nM CCK. Aus der zytoskelettalen Fraktion (particular fraction) wurde auf Bahn 5 und 6 jeweils 100µg Protein unstimuliert und stimuliert mit 10nM CCK und auf Bahn 7 stimuliert mit 10nM CCK nach Immunpräzipitation mit ROCK-II der Reihe nach aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle wurden jeweils 50µg Protein aus Rattenhirn-Homogenat und Pankreas-Homogenat aufgetragen (Bahn 8 und 9). Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-ROCK-II-Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper erfolgt in einer Konzentration von 1:15000.

Um die zeitliche Abhängigkeit der Stimulation der Azinuszellen mit CCK zu überprüfen wurden Pankreasfragmente über 1, 3, 4, 5, 10, 15 und 30 Minuten mit 10nM CCK stimuliert und erneut durch Sonifikation das Zytosol von der zytoskelettalen Fraktion getrennt. Nach Proteintransfer auf Nitrozellulose und Markierung mit einem ROCK-II-Antikörper konnte der Unterschied zwischen Zytoskelett- (PF-) und Zytosolfraktion deutlich gemacht werden (Abb.12). Während ROCK unabhängig von der Dauer der Stimulation mit CCK in der zytoskelettalen Fraktion kaum nachweisbar ist, erscheint die Kinase deutlich in der zytosolischen Fraktion. Eine eindeutige Zeitabhängigkeit lässt sich hier allerdings nicht erkennen, wobei eine intensivere Bande nach 15 Minuten zu vermuten ist, nach 30 Minuten diese jedoch schon wieder undeutlicher erscheint.

Abb.12: ROCK-II in Zytosol und Pelletfraktionen von Pankreasfragmenten in zeitkinetischer Darstellung



Abwechselnd wurde jeweils 20 µg Proteine aus der zytosolischen (Z) und der zytoskelettalen (P) Fraktion nach vorausgegangener Stimulation mit 10nM CCK über 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten auf die Bahnen wie abgebildet aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-ROCK-II-Antikörper (mouse) in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper erfolgte in einer Konzentration von 1:5000. Das Experiment wurde insgesamt 3x wiederholt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

4.2.3 Aktivitätsnachweis von ROCK im Kinase-Assay

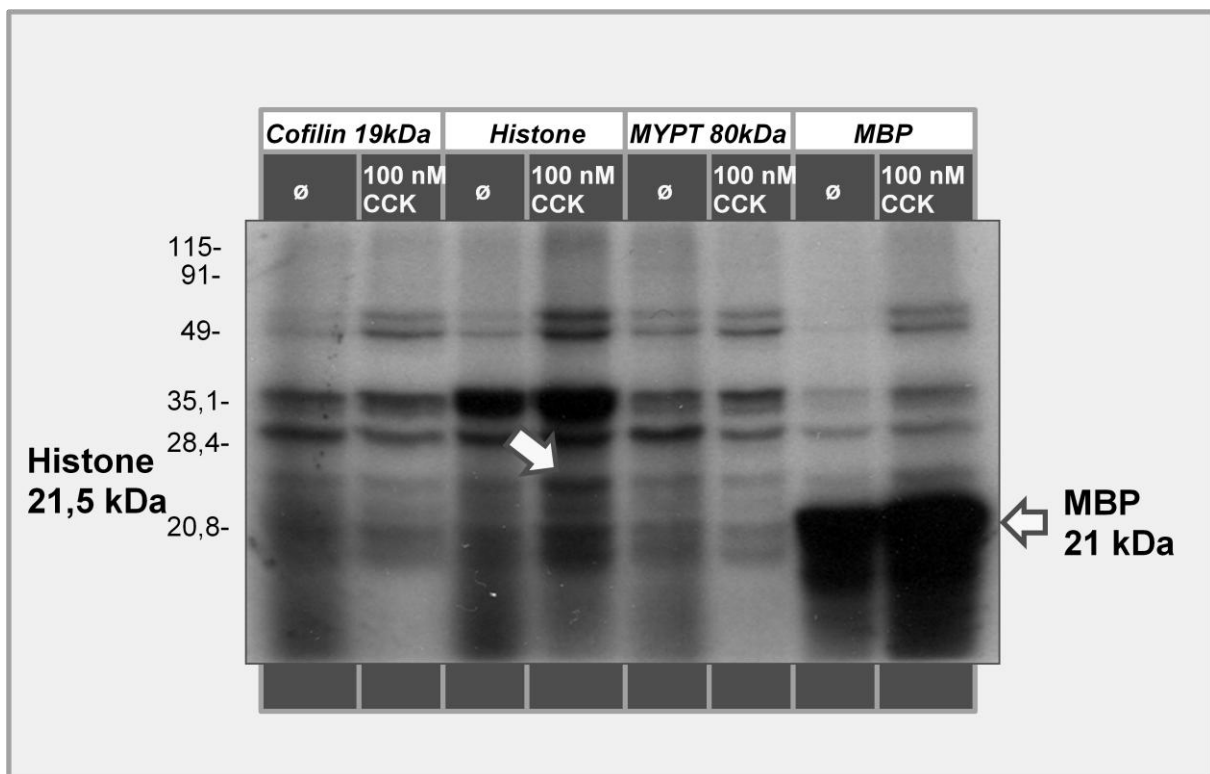
Die Kinase-Aktivität von ROCK-II im Pankreas wurde durch die Phosphorylierung von Substraten (z.B. Myelin basic Protein) nachgewiesen (Leung, Manser et al., 1995). Hierzu wurde gereinigtes Protein aus Pankreasfragmenten nach Immunpräzipitation mit ROCK-II mit P^{32} radioaktiv markiert, mit einem Substrat inkubiert und anschließend autoradiographiert. Diese Methode erlaubt eine schnelle Bestimmung der Substratphosphorylierung in Abhängigkeit von aktivierter Rho-Kinase.

4.2.3.1 Substratabhängigkeit von ROCK-II

Um zu prüfen, inwiefern es zu einer Phosphorylierung verschiedener an der Aktinregulation beteiligter Substrate durch ROCK-II in der Azinuszelle kommt, wurde

Protein aus unstimulierten und mit 100nM CCK stimulierten Fragmente des Rattenpankreas nach Immunpräzipitation mit ROCK-II-Antikörper radioaktiv mit P^{32} markiert und anschließend mit den Substraten (MYPT, Cofilin, MBP und Histone) inkubiert. Im Western Blot wurden die Proteine aufgetrennt und anschließend bei -80°C für 12 Stunden autoradiographiert (Abb. 13).

Abb. 13: Phosphorylierung verschiedener an der Aktinregulation beteiligter Substrate durch ROCK-II



Pankreasfragmente wurden mit 100nM CCK für 15min stimuliert. Nach Immunpräzipitation mit ROCK-II erfolgte die radioaktive Markierung mit $P^{32}\gamma$ -ATP und Zugabe der verschiedenen Substrate. Pro Bahn wurde jeweils 1 mg/ml Protein der Reihe nach, unstimuliert und stimuliert mit CCK, aufgetragen (Bahn 1 bis 6). Bei 35mA wurden die Proteine per SDS/Page aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in einem Gelrockner getrocknet und anschließend für 12 Stunden bei -80°C autoradiographiert.

Die kinetische Analyse der Reaktion zeigt in Anwesenheit von ROCK eine schnelle und deutliche Phosphorylierung von MBP und einen etwas niedrigeren Phosphorylierungsgrad von Histone. Nach Stimulation mit CCK kommt es bei beiden Substraten zu einer verstärkten Aktivierung.

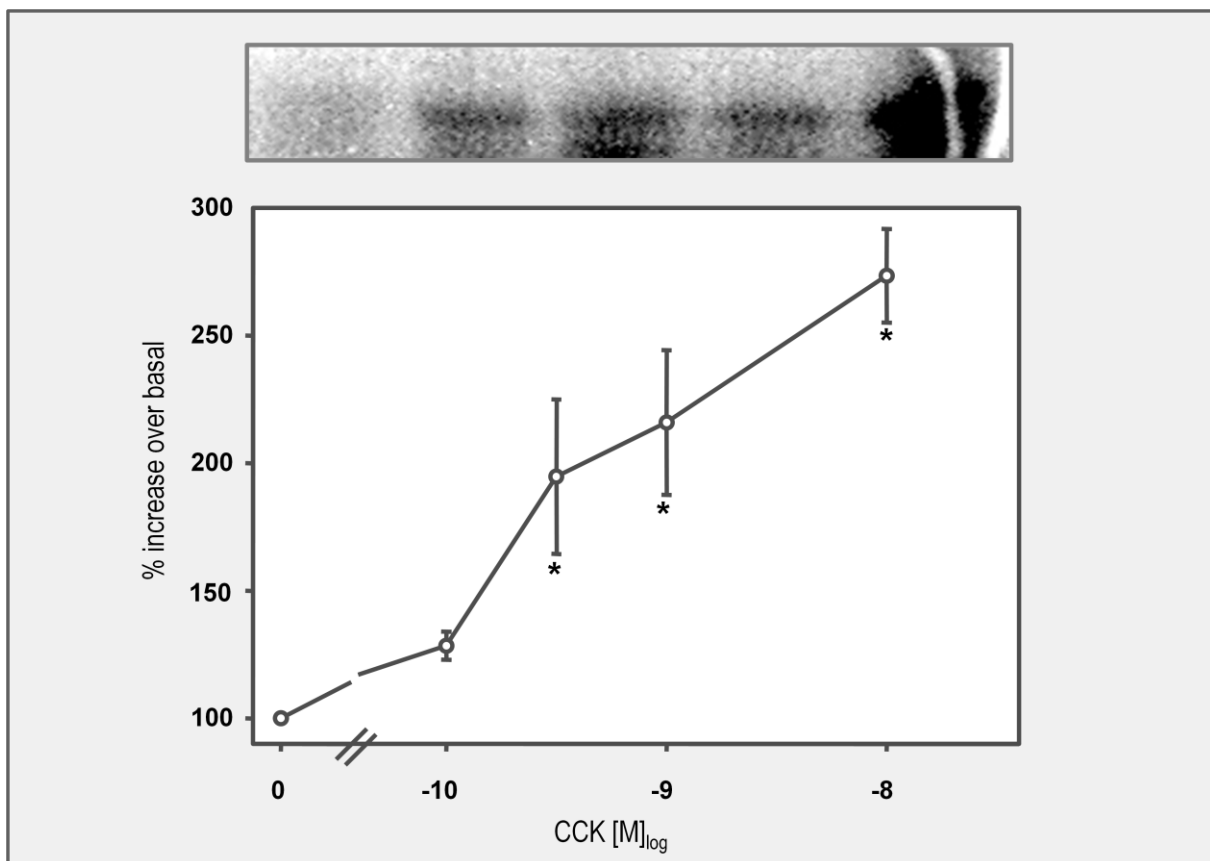
Keine wesentliche Aktivierung zeigt sich hingegen bei Cofilin und MYPT.

4.2.3.2 Dosis- und zeitabhängige Effekte nach Stimulierung mit Cholezystokinin

Um einen dosis- und zeitabhängigen Effekt auf die Aktivierung von ROCK-II durch CCK zu demonstrieren, wurden Pankreasfragmente mit ansteigenden Konzentrationen von CCK stimuliert, mit ROCK-II immunpräzipitiert und anschließend radioaktiv markiert. Als Substrat wurde MBP (Myelin Basic Protein) verwendet.

Die Messung der ROCK-Aktivität nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von CCK ergab eine Aktivierung nach Stimulation mit 300pM CCK für 15 Minuten und eine maximale Aktivität nach Stimulation mit 1 bis 10nM CCK (Abb. 14).

Abb. 14: Dosisabhängige Aktivierung von ROCK-II durch CCK im Kinase-Assay

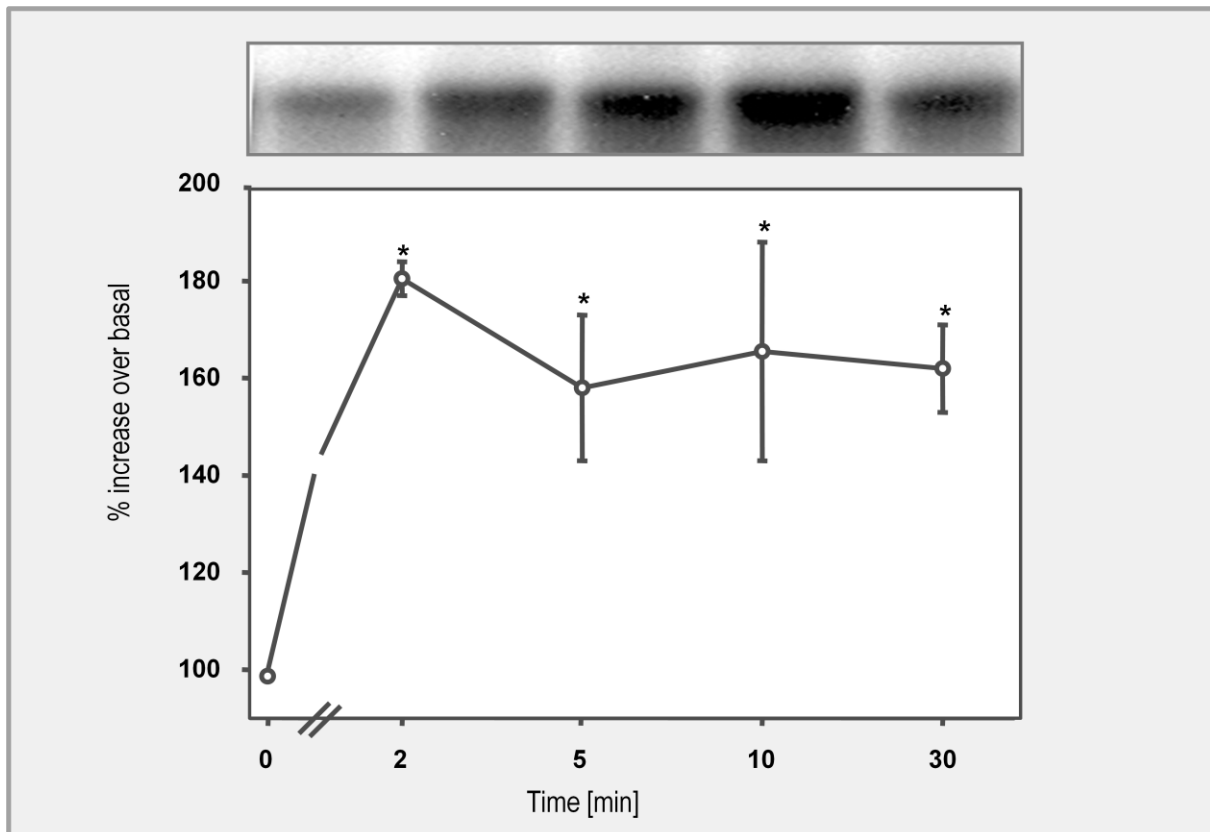


Pankreasfragmente wurden in ansteigenden Konzentrationen für 15min mit CCK stimuliert. Nach Markierung mit $P^{32}\gamma$ -ATP und Substratzugabe (MBP) wurden pro Bahn jeweils 1mg/ml Protein wie folgt aufgetragen: unstimuliert (Bahn 1), 300pM CCK (Bahn 2), 300pM CCK (Bahn 3), 1nM CCK (Bahn 4), 10nM (Bahn 5). Bei 35mA wurden die Proteine per SDS/Page aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in einem Geltrockner getrocknet und anschließend für 12 Stunden bei -80°C autoradiographiert.

Eine representative Autoradiografie ist im oberen Bildabschnitt dargestellt. Eine quantitative Analyse von 4 individuellen Experimenten ist im unteren Bildabschnitt dargestellt.

Ebenso konnte eine Aktivitätszunahme der Kinase in Abhängigkeit von der Stimulierungszeit gezeigt werden. Hier fand sich nach Stimulation der Fragmente mit 1nM CCK eine rasche Aktivierung von ROCK, bereits nach 2 Minuten messbar mit fast maximaler Aktivität, und bis zu 30 Minuten nach Stimulation nachweisbar (Abb. 15).

Abb. 15: Zeitabhängige Aktivierung von ROCK-II durch CCK im Kinase-Assay



Pankreasfragmente wurden verschieden lang mit 1nM CCK stimuliert. Nach Markierung mit $P^{32}\gamma$ -ATP und Substratzugabe (MBP) wurden pro Bahn jeweils 1mg/ml Protein wie folgt aufgetragen: unstimuliert (Bahn 1), 2min (Bahn 2), 5min (Bahn 3), 10min (Bahn 4), 30min (Bahn 5). Bei 35mA wurden die Proteine per SDS/Page aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in einem Geltrockner getrocknet und anschließend für 12 Stunden bei -80°C autoradiographiert. Eine representative Autoradiografie ist im oberen Bildabschnitt dargestellt. Eine quantitative Analyse ist im unteren Bildabschnitt dargestellt.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm der mittleren Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

4.2.3.3 Abhängigkeit der Stimulierbarkeit von ROCK-II von verschiedenen Sekretagoga

Einen Einfluss auf die Rho-ROCK-Signaltransduktionskaskade konnte für verschiedene Sekretagoga (CCK-JMV-180, Bombesin, Carbachol, TPA) gezeigt werden (Williams and Yule, 1993).

CCK-JMV-180 ist ein eng verwandtes Analogon des C-terminalen Heptapeptids des Cholezystokinins (CCK) und ist ein atypischer Ligand des menschlichen CCK-1-Rezeptores. Als Agonist an high-affinity CCK-Rezeptoren und als Antagonist an low-affinity CCK-Rezeptoren führt es zu einer maximalen Enzym-Sekretion bei einer CCK-JMV-180 Konzentration von $0,1\mu\text{m}$ und zu keiner Abnahme der Sekretion bei höheren Konzentrationen. (Piiper et al., 1991; Sato et al., 1989).

Bombesin ist ein Tetradekapeptid. Der Bombesinrezeptor ist ein Mitglied der G-Protein-bindenden Rezeptorfamilie. Die Stimulation mit Bombesin führt zur Sekretion in Azinuszellen, aber die Antwortkurve ist monophasisch und nicht biphasisch, wie bei der Stimulation durch CCK (Williams, 2001). Bei supramaximalen Konzentrationen hemmt Bombesin nicht, wie CCK, die Amylase-Sekretion. Die Signaltransduktionskaskaden, die durch CCK- oder Bombesinrezeptoren aktiviert werden, scheinen größtenteils identisch zu sein (Williams, 2001; Nishino et al., 1998). Dabei ist CCK um das Zehnfache potenter als Bombesin (Matozaki, Zhu et al., 1991). Auch kann durch Stimulation mit supramaximalen Konzentrationen von Bombesin keine Pankreatitis im Tiermodell induziert werden.

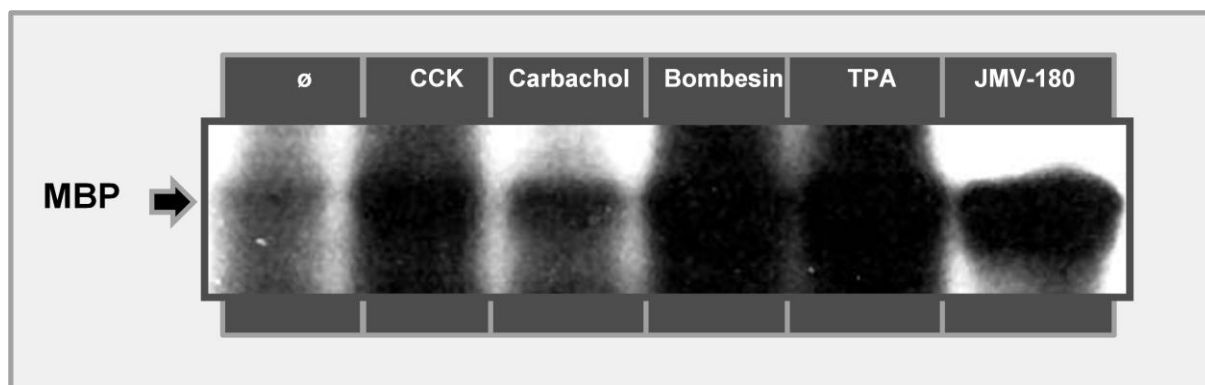
Carbachol ist ein Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin und ein nicht-selektiver cholinergischer Agonist, der durch die Cholinesterase nicht abgebaut werden kann. Carbachol kann eine Zymogenaktivierung in isolierten Azinuszellen des Pankreas hervorrufen (Schmid et al., 1998).

12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), auch genannt Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ist ein potenter Tumorpromotor, der eine DAG-ähnliche Struktur besitzt und das Signaltransduktionsenzym Proteinkinase C (PKC) aktivieren kann (Williams and Yule, 1993).

Für jedes der Sekretagoga konnte in vorausgegangenen, hier nicht gezeigten Versuchen, die Fähigkeit zur Stimulierung von Azinuszellen mit folgender Amylasesekretion gezeigt werden.

Im folgenden Versuch wurden Pankreasfragmente mit den jeweiligen Konzentrationen stimuliert, die eine maximale Amylasesekretion hervorrufen. Nach Markierung mit ROCK-II konnte so im Aktivitätsassay ein Einfluss auf die Stimulierbarkeit von ROCK-II durch die verschiedenen Sekretagoga gezeigt werden (Abb. 16).

Abb. 16: Aktivität von ROCK-II nach Stimulierung mit CCK, Carbachol, Bombesin, TPA und CCK-JMV-180

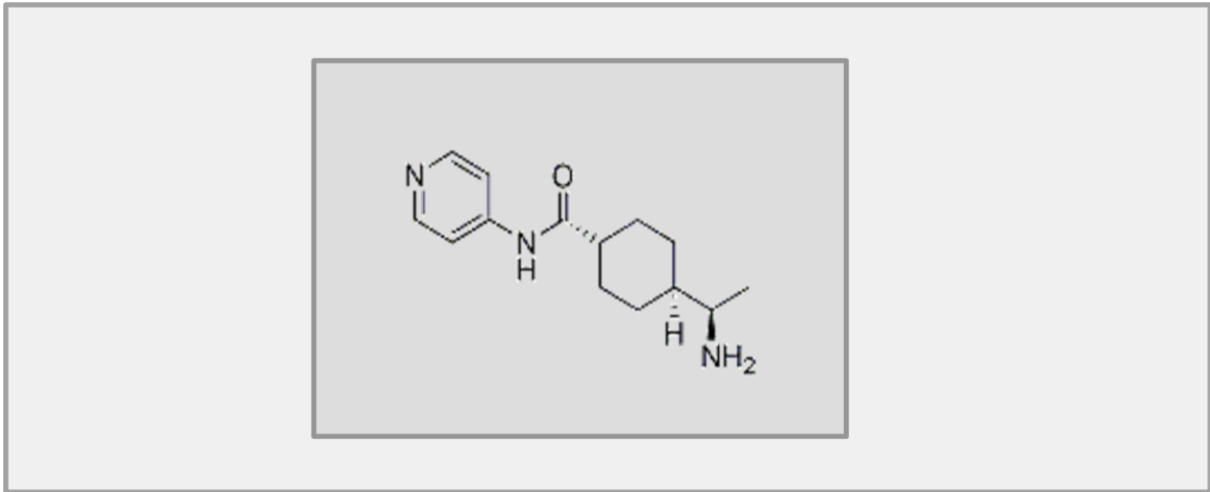


Pankreasfragmente wurden mit den verschiedenen Sekretagoga für jeweils 15min stimuliert. Die Stimulation erfolgte für CCK in einer Konzentration von 10nM, für Carbachol in einer Konzentration von 10µM, für Bombesin in einer Konzentration von 100nM, für TPA/PMA in einer Konzentration von 10µM und für CCK-JMV-180 in eine Konzentration von 2µM. Nach Immunpräzipitation mit ROCK-II, Markierung mit $P^{32}\gamma$ -ATP und Substratzugabe (MBP) wurden pro Bahn jeweils 1mg/ml Protein der Reihe nach -unstimuliert, CCK, Carbachol, Bombesin, TPA/PMA, CCK-JMV-180- aufgetragen (Bahn 1 bis 6). Bei 35mA wurden die Proteine per SDS/Page aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in einem Gelrockner getrocknet und anschließend für 12 Stunden bei -80°C autoradiographiert.

4.2.4 Amylase-Assay mit und ohne dem ROCK-Inhibitor γ -27632

γ -27632 ((R)-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride monohydrate) ist ein Pyridin-Derivat, das selektiv p160^{ROCK} dosisabhängig hemmt (Uehata, Ishizaki et al., 1997) (Abb. 17). Kinetische Analysen mit gereinigtem Enzym haben gezeigt, dass γ -27632 ROCK hemmt, indem es mit ATP um die Bindungsstelle an der katalytischen Einheit konkurriert. Dabei ist eine Hemmung bei Konzentrationen im Mikromolarbereich möglich.

Abb. 17: Y-27632 ((R)-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride monohydrate)



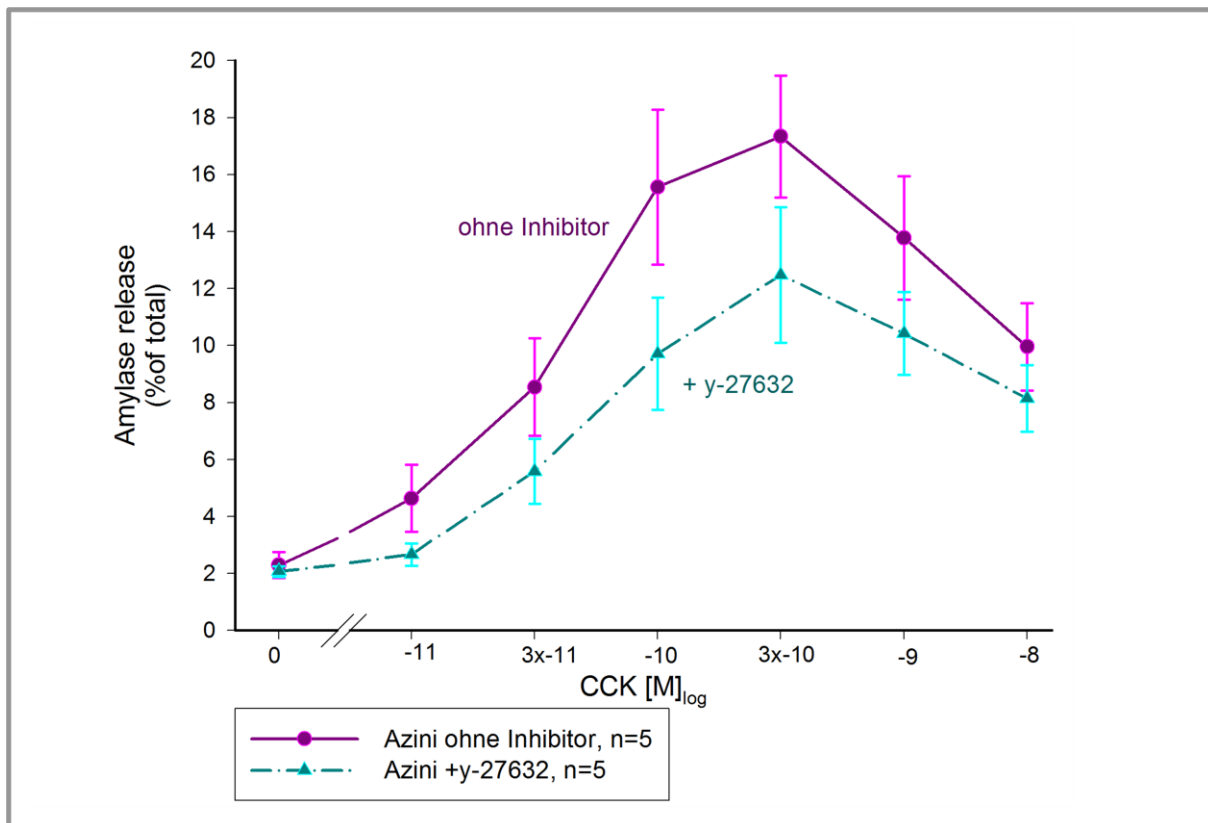
Empirische Formel: $C_{14}H_{21}N_3O \cdot 2HCl \cdot H_2O$

Molekulargewicht: 338.27 kDa

(von biorbyt, www.biorbyt.com)

Die Aufnahme in die intakte Zelle erfolgt durch eine durch eine Trägersubstanz erleichterte Diffusion. Ein Aufnahmeplateau wird nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C erreicht, d.h., dann ist in der Zelle ungefähr die gleiche Menge an Inhibitor vorhanden wie außerhalb der Zelle. Daraus folgt eine minimale Inkubationszeit von 30 Minuten, um eine maximale Hemmung zu erreichen (Amano, Fukata et al., 2000; Narumiya, Ishizaki et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht, den beschriebenen Einfluss des Inhibitors auf die Azinuszelle nach Inkubation mit CCK zu übertragen. Dabei wurde die eine Hälfte der Zellen über 30 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert und anschließend über 30 Minuten mit den verschiedenen Konzentrationen von CCK stimuliert (30pM, 100pM, 300pM, 1nM und 10nM) und die Amylasesekretion im Amylase-Assay gemessen (Abb. 18).

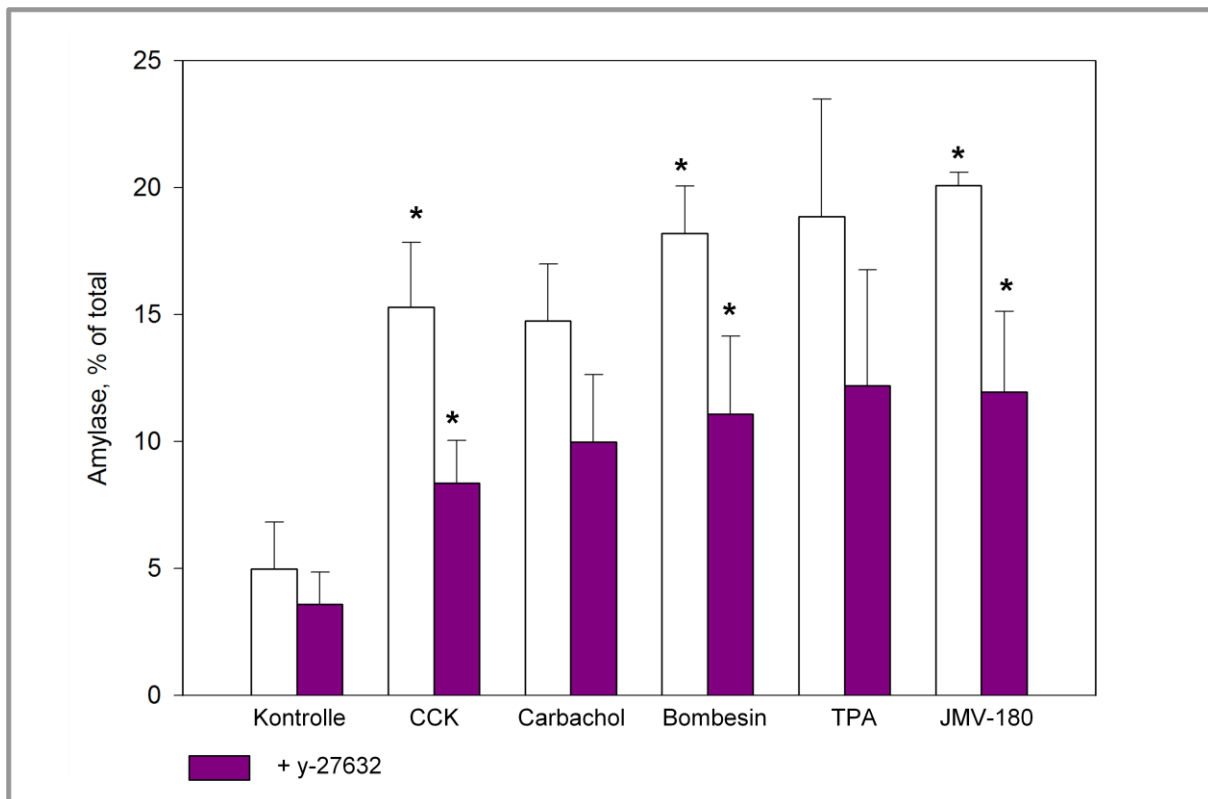
Abb. 18: Einfluss des ROCK-Inhibitors γ -27632 auf die Amylasesekretion im Amylase-Assay

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm dem mittleren Standardfehler von 5 unabhängigen Experimenten.

* $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle betrachtet. Eine statistisch signifikante Hemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.5 Effekte verschiedener Sekretagoga auf die Amylase-Sekretion mit und ohne γ -27632

Um die Unabhängigkeit des ROCK-Inhibitors von den verschiedenen Sekretagoga zu prüfen, haben wir nach Isolierung der Pankreasazinuszellen diese mit und ohne γ -27632 über 2 Stunden inkubiert und die Zellen mit den verschiedenen Sekretagoga stimuliert (CCK, Carbachol, Bombesin, TPA und CCK-JMV-180). Wie in Abbildung 19 zu sehen, zeigte sich hier eine signifikante Hemmung der Amylasesekretion unabhängig der verwendeten Sekretagoga.

Abb. 19: Amylasesekretion verschiedener Sekretagoga mit und ohne γ -27632

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte + der mittleren Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Probe ohne γ -27632 betrachtet.

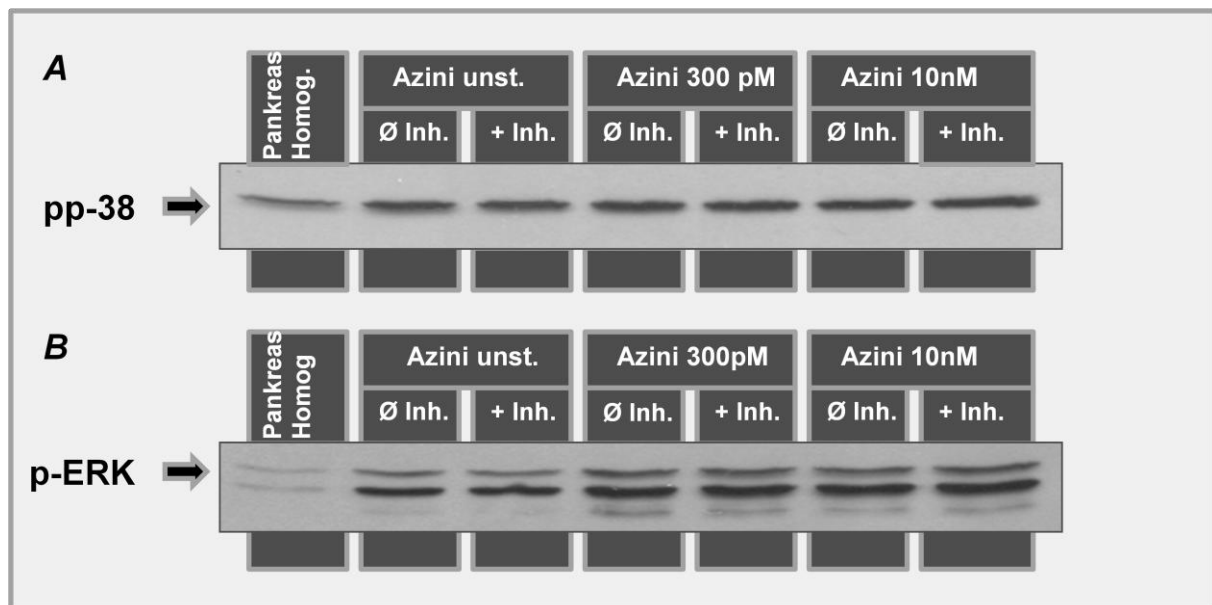
4.2.6 Wirkung von γ -27632 auf andere Signalkaskaden

CCK aktiviert im Pankreas drei MAPK-Kaskaden: ERKs (extracellular regulated kinase, ERK1/2), JNKs (c-Jun-N-terminale Kinasen) und p38 MAPK (Dabrowski et al, 1996; Schäfer, Ross et al., 1998; Williams, 2001).

Mitogen-aktivierte Kinasen (MAPKs) sind kleine Proteinkinasen mit einer Molekülmasse zwischen 36.000-44.000 Da. Es handelt sich um Serin-/Threonin-Kinasen, die durch Mitogene aktiviert werden. Sie können durch eine Vielfalt von Stimuli aktiviert werden, zu denen Wachstumsfaktoren, Zytokine, Neurotransmitter, Hormone, extrazelluläre Matrixmoleküle und Zellstress gehören. MAP-Kinasen erhalten Informationen über die Rezeptoren an der Zelloberfläche. Sie regulieren eine Vielzahl von Zellprozessen, wie der Gentranskription, Proteintranslation, Stoffwechsel und die Funktion des Zytoskeletts. Folglich sind MAPKs an der Kontrolle des Zellwachstums, an der Differenzierung, am Überleben und an der Apoptose beteiligt (Williams, 2001).

Um einen möglichen Einfluss und damit die Spezifität des ROCK-Inhibitors auf MAP-Kinase-Kaskaden zu untersuchen, wurden Azini mit CCK stimuliert und gleichzeitig mit dem ROCK-Inhibitor γ -27632 inkubiert und im Western Blot mit dem entsprechenden Antikörpern der ERK und p38 MAPK detektiert. Deutlich erkennbar ist eine Zunahme der Signalintensität nach Stimulierung mit höheren Konzentrationen von CCK. Eine Signalintensitätsabnahme nach Inkubation mit dem ROCK-Inhibitor ist nicht zu erkennen (Abb. 20A und B).

Abb. 20: Wirkung von γ -27632 auf pp-38 und p-ERK



Auf Bahn 2 bis 7 wurde jeweils 20 μ g Protein aus Azinus-Zell-Suspension nach folgender Behandlung aufgetragen: unstimuliert ohne (Bahn 2) und mit Inhibitor (Bahn 3), nach Stimulation mit 300pm CCK ohne (Bahn 4) und mit Inhibitor (Bahn 5) und mit 10nM CCK ohne (Bahn 6) und mit Inhibitor (Bahn 7) aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle wurde 20 μ g Protein aus Pankreas-Homogenat aufgetragen (Bahn 1). Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

A: Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-p-ERK-Antikörper (rabbit) in einer Konzentration von 1:5000 über Nacht bei 4°C markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper erfolgte in einer Konzentration von 1:10000.

B: Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-pp-38-Antikörper (rabbit) in einer Konzentration von 1:1000 über Nacht bei 4°C markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper erfolgte in einer Konzentration von 1:10000.

4.3. Expression und Regulation von Rho

Unter den kleinen, niedermolekularen GTP-bindenden Proteinen (GTPasen) werden heute mindestens fünf "Subfamilien" zusammengefasst. Hierzu gehören die Ras-, Rab-, Arf-, Ran- und Rho-Familien.

Zu den Rho-Proteinen zählen RhoA-E, RhoG, RhoH, Rac1-3, Cdc42, TC10 und Rnd 1 und 2. Besonders gut untersucht sind die Proteine der Rho-, Rac- und Cdc42-Subtypen (Cdc42, Rac1, RhoA). Sie werden durch spezifische extrazelluläre Signale aktiviert und regeln die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Schmidt and Hall, 1998). In der aktiven GTP-gebundenen Form interagieren Rho-Proteine mit ihren Effektoren, wie die Rho-Kinase, Proteinkinase N und Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase und regulieren hierdurch das Aktin-Zytoskelett und eine Vielzahl weiterer Signalprozesse (Machesky and Hall, 1996).

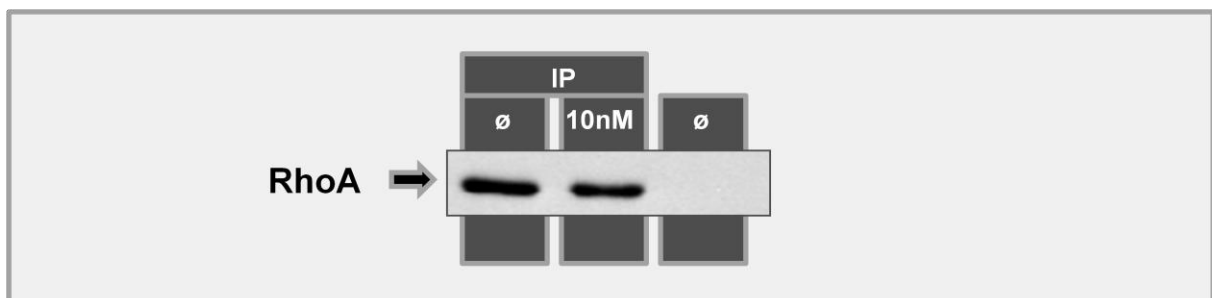
In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf den Regulationsweg über RhoA-ROCKII-LIMKII-Cofilin gelegt und auf die Azinuszelle übertragen.

4.3.1 Nachweis von RhoA in der Azinuszelle durch Western Blot

Mit Hilfe der Immunpräzipitation und anschließendem Western Blot gelang es, die Expression von RhoA in den pankreatischen Azinuszellen auf Proteinebene zu zeigen. Hierzu wurden Pankreaszellen frisch aus dem Rattenpankreas isoliert und mittels Immunpräzipitation unstimulierte und mit 10nM CCK stimulierte Zellen jeweils mit ROCK II und RhoA immunpräzipitiert. Nach Auftrennen der Proteine im Western Blot und anschließender Markierung der Membran mit einem RhoA-Antikörper konnten spezifische Banden für RhoA nachgewiesen werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 21) zeigt im Western-/Immunoblot RhoA in der Azinuszelle, isoliert aus Ratten-Pankreas

Abb. 21: *RhoA in der Azinuszelle im Western-/Immunoblot*

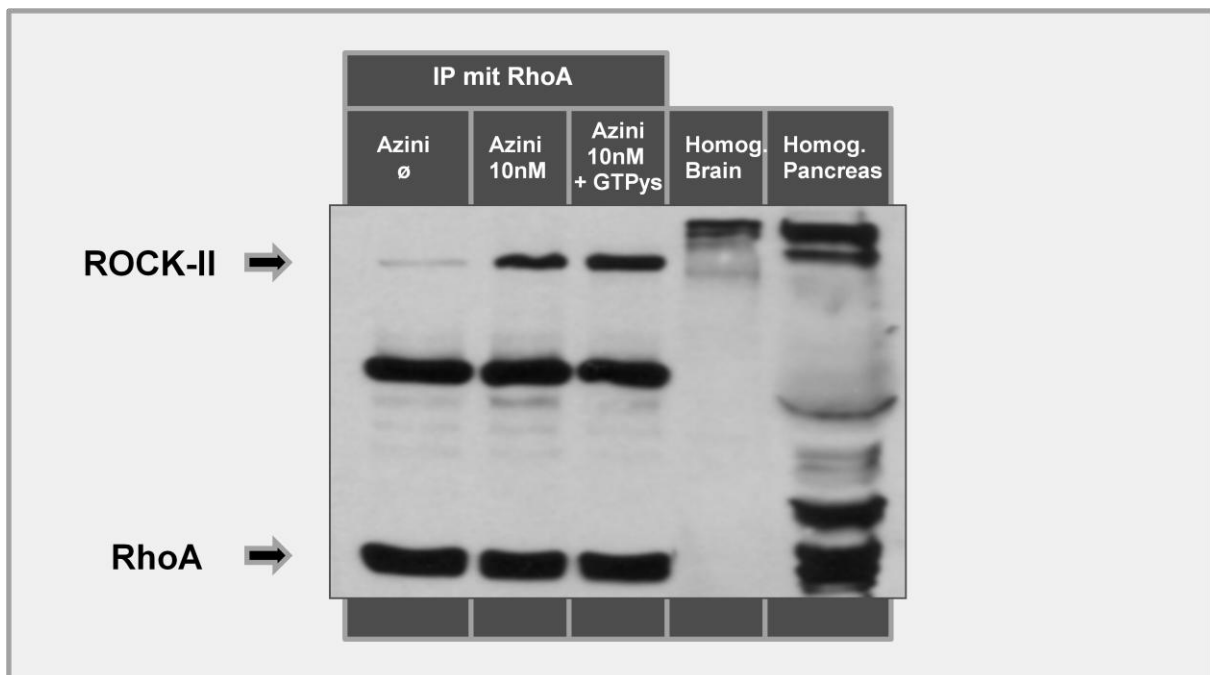


Jeweils 10µg Protein aus Azini-Zellsuspension, unstimuliert und stimuliert mit 10nM CCK und immunpräzipitiert mit RhoA-Antikörper (Bahn 1 und 2) und 30µg Proteine aus Azinuszell-Homogenat (Bahn 3). Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-RhoA-Antikörper (mouse) in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper erfolgt in einer Konzentration von 1:10000.

4.3.2 Co-Immunopräzipitation mit Rho und ROCK

ROCK ist ein nachgeschalteter Effektor von Rho. Um eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen Rho und ROCK zu demonstrieren, wurde zunächst Rho mittels Immunpräzipitation (IP) in den jeweiligen Azinussuspensionen (stimuliert und unstimuliert) markiert und im Western Blot durch die Verwendung eines ROCK-Antikörpers entsprechend detektiert (Abb. 22). Deutlich wird hier, dass nach vorausgegangener zusätzlicher Aktivierung mit $GTP\gamma S$ eine deutlichere Bande zu sehen ist. Ebenso deutlich ist bei 150kDa eine der ROCK-II entsprechende Bande zu sehen, die aufgrund der vorausgegangenen Stimulation mit CCK auch zu sehen sein muss.

Abb. 22: Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Rho und ROCK durch Co-Immunopräzipitation



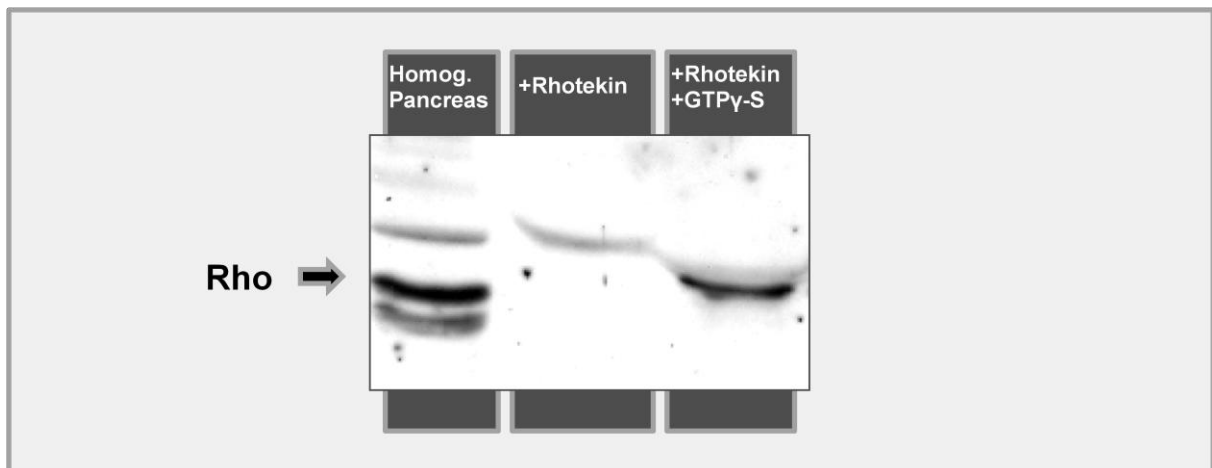
Nach Immunpräzipitation mit Rho A wurde Protein aus Azinuszellen unstimuliert, nach Stimulation mit 10nM CCK und nach Stimulation mit 10nM CCK + $GTP\gamma S$ der Reihen nach aufgetragen (Bahn 1 bis 3). Jeweils 30 μ g Protein aus Rattenhirnhomogenat und Pankreashomogenat wurden auf die Bahnen 4 und 5 aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-ROCK-II-Antikörper (goat) in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (bovine-Anti-mouse) erfolgt in einer Konzentration von 1:5000. Repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

4.3.3 Rho-GTPase Pull-Down-Assay

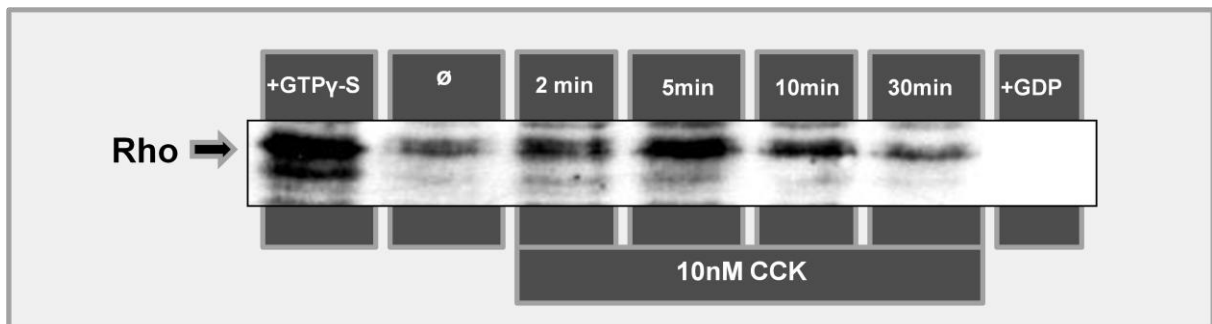
Wie andere kleine GTPasen ist Rho aktiv, wenn es an GTP gebunden ist und inaktiv, wenn es an GDP gebunden ist. Bei der Aktivierung dieser Proteine kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP und daraufhin zu einer Konformationsänderung des Proteins, durch die die Bindung an ein Substratprotein ermöglicht wird. Dies bedeutet, dass nur die aktive Form des Rho-Proteins an sein Substrat bindet. Beim Pull-down-Assay ist das Substrat (in diesem Fall Rhotekin) an Glutathion-S-Transferase (GST) gebunden, welche mit dem an Agarose-Beads gekoppelten Glutathion eine Enzym-Substrat-Bindung eingeht. Durch Abzentrifugieren der Beads und Entfernen des Überstands kann so der aktive Anteil des gesuchten Rho-Proteins in einer Probe aufkonzentriert und anschließend im Western Blot quantifiziert werden.

Im vorliegenden Experiment (Abb. 23) wurde Pankreashomogenat verwendet. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Zellen aus unstimuliertem Pankreashomogenat mit GTP γ S (Guanosin 5'-O-[gamma-thio]Triphosphat) inkubiert, ein G-Protein aktivierendes Analogon der Guanosin-Phosphatasen. Es stimuliert die Nukleotidbindenden Proteine und führt damit zu einer gesteigerten Aktivierung. Nach Auftrennen der Proteine im Western Blot und anschließender Markierung der Membran mit einem RhoA-Antikörper konnten spezifische Banden für aktiviertes RhoA nachgewiesen werden. Eine gesteigerte Expression zeigte sich nach vorausgegangener Stimulation der Zellen mit CCK.

In einem weiteren Versuch konnte nach Stimulation der Zellen mit 10nM CCK eine rasche Aktivierung von RhoA gezeigt werden. Hierzu wurden frisch isolierte Azinuszellen mit 10nM CCK über 2, 5, 10 und 30 Minuten stimuliert. Den Proben wurden Glutathion-Agarose-Beads zugeführt, die an mit Rhotekin-RBD fusioniertes GST gekoppelt waren. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Teil der unstimulierten Azinuszellen mit GTP γ S inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der unstimulierten Zellen mit GDP inkubiert, um die GTPase zu inaktivieren (Abb. 24).

Abb. 23: Aktivierung von RhoA im Rho-GTPase Pull-Down-Assay

Jeweils 20 μ g Protein aus Pankreas-Homogenat wurden pro Bahn aufgetragen (Bahn 1 bis 3). Die Proben auf Bahn 2 und 3 wurden nach entsprechender Aufbereitung und Stimulation mit Glutathion-Agarose-Beads, die an mit Rhotekin-RBD fusioniertes GST gekoppelt waren, inkubiert. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-RhoA-Antikörper (mouse) in einer Konzentration von 1:500 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-Mouse-IgG-HRP) erfolgt in einer Konzentration von 1:10000.

Abb. 24: Zeitabhängige Aktivierung von RhoA im Rho-GTPase Pull-Down-Assay

Jeweils 10 μ g Protein aus Azini-Zellsuspension wurden pro Bahn aufgetragen. Alle Proben wurden nach entsprechender Aufbereitung und Stimulation mit Glutathion-Agarose-Beads, die an mit Rhotekin-RBD fusioniertes GST gekoppelt waren, inkubiert. Auf Bahn 1, 2 und 7 wurden unstimulierte Zellen aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde die Probe auf Bahn 1 mit GTP γ S inkubiert, als Negativkontrolle wurde die Probe auf Bahn 7 mit GDP inkubiert. Auf Bahn 3 bis 6 wurden die Proben nach Stimulation der Zellen mit CCK aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-RhoA-Antikörper (mouse) in einer Konzentration von 1:500 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-Mouse-IgG-HRP) erfolgt in einer Konzentration von 1:10000.

4.4 Expression und Regulation der LIM-Kinase

In Studien konnte gezeigt werden, dass LIMK1 und LIMK2 die Aktin-Dynamik über die Phosphorylierung und Inaktivierung von ADF/Cofilin regulieren. Die Aktivität beider Proteine wird durch Mitglieder der Rho-GTPase-Familie Rho, Rac und Cdc42 reguliert über die jeweiligen Effektormoleküle p21-aktivierte Kinase (PAK) 1 und 4 und die Rho-Kinase (ROCK). Diese Kinasen phosphorylieren und aktivieren so die LIMK am Threonin-Rest innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinase. (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998; Edwards et al., 1999; Maekawa et al., 1999; Ohashi et al., 2000). LIMK1 wird am Threonin-Rest 508 und die LIMK2 am Threonin-Rest 505 phosphoryliert (Amano, Tanabe et al., 2001). Dabei spielt LIMK2 spezifisch im „downstream“ von Rho und Cdc42 eine entscheidende Rolle, wohingegen LIMK1 sowohl im „downstream“ von Rho als auch von Rac involviert ist (Ohashi et al., 2000). Die LIM-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung eines N-terminalen Serinrests auf dem Protein Cofilin. Das phosphorylierte Cofilin wird dadurch inaktiviert und kann nicht mehr länger Aktinfilamente depolymerisieren, was zu einer vermehrten Akkumulation von Aktinfilamenten (F-Aktin) führt. (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998; Aspenström, 1999)

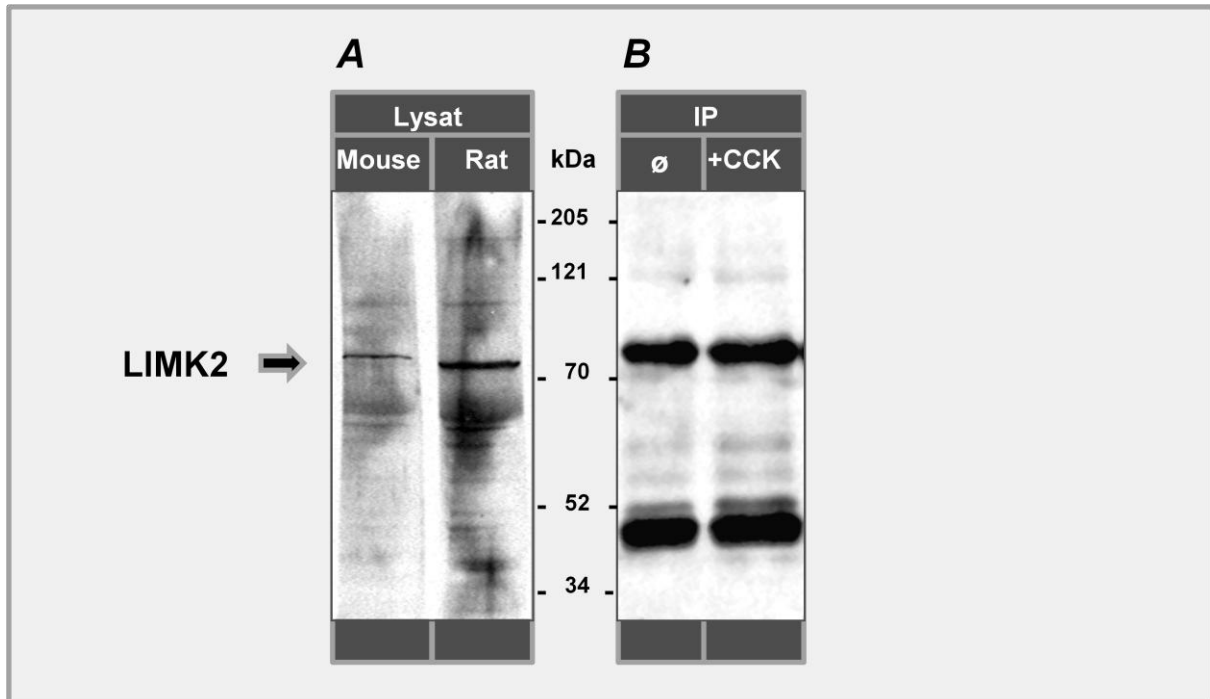
4.4.1 Nachweis der LIMK2 durch Western Blot

Zwei LIM-Kinasen, LIMK1 (72kDa) und LIMK2 (65kDa), sind bisher in Säugetieren identifiziert worden. Obwohl man die LIM-Kinase bisher als ein Gehirn-spezifisches Protein betrachtet hatte, wurde die LIMK in vielen Geweben der Maus gefunden (Foletta et al., 2004; Acevedo et al., 2006). Das LIM-Sequenzmotiv wurde nach den Großbuchstaben der drei Proteine Lin-11, Isl-1 und Mec-3 benannt. Es besitzt eine gepaarte Zink-Finger-Sequenz die sich aus 50-60 Aminosäureresten zusammensetzt mit Cystein- und Histidin-Resten (Okano et al, 1995).

In isolierten Azinuzellen der Maus und der Ratte konnte nach Auftrennen der Proteine im Western Blot erstmals das Vorhandensein der LIMK2 in der pankreatischen Azinuzellen gezeigt werden (Abb. 25A). Auch mit Hilfe der Immunpräzipitation konnte die Kinase in einem weiteren Experiment in Azini isoliert werden (Abb. 25B). Nach Auftrennen der Proteine im Western Blot wurde die

Membran mit einem spezifischen LIMK2-Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 markiert.

Abb. 25: Nachweis der Expression der LIM-Kinase2 in exokrinen Azini der Maus und Ratte



A: Jeweils 20µg Protein aus isolierten Azini der Maus (Bahn1) und der Ratte (Bahn2) wurden pro Bahn aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-LIMK2-Antikörper (rabbit) in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-rabbit) erfolgte in einer Konzentration von 1:10000.

B: Nach Immunpräzipitation mit einem LIMK2-Antikörper wurden jeweils 1mg/ml Protein aus Azini-Zellsuspension unstimuliert (Bahn 1) und stimuliert mit CCK (Bahn 2) pro Bahn aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-LIMK2-Antikörper (rabbit) in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-rabbit) erfolgte in einer Konzentration von 1:10000.

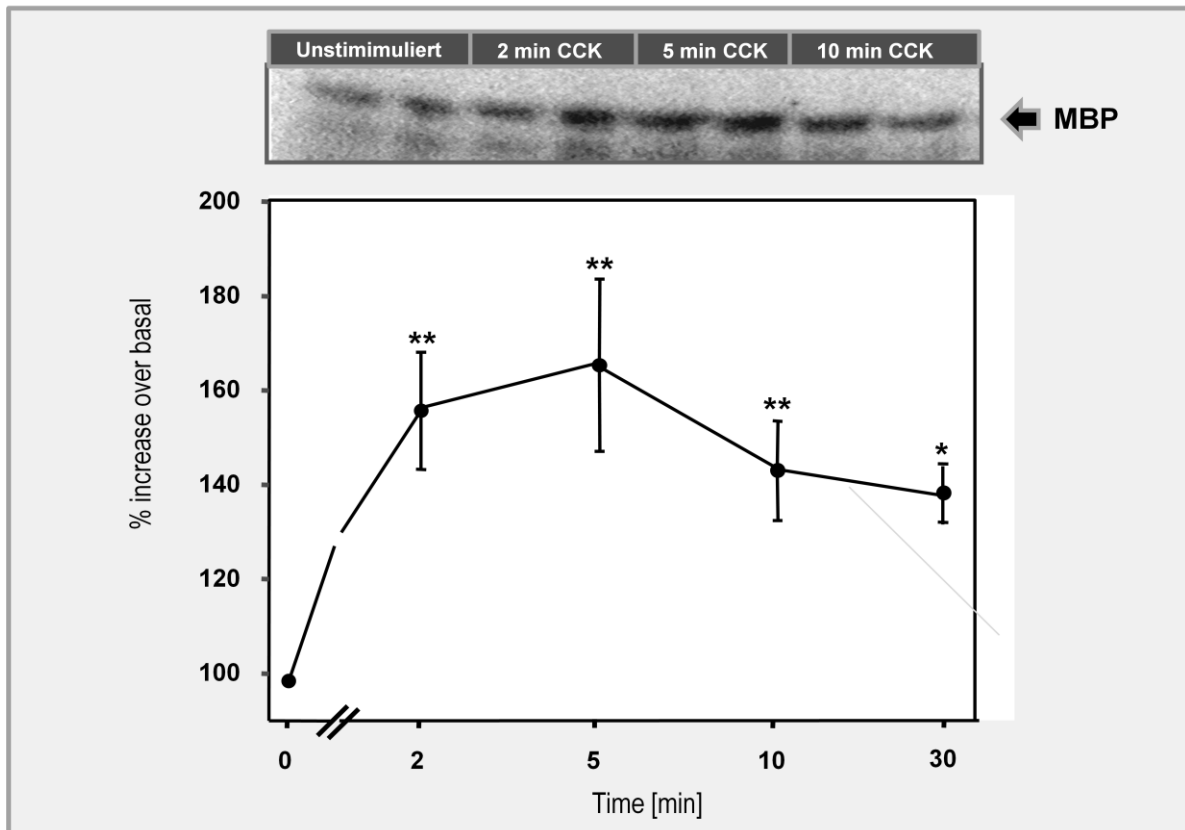
4.4.2 Aktivitätsnachweis der LIMK2 im Kinase-Assay

Die Bestimmung der LIMK-Aktivität erfolgte nach dem Protokoll des Kinase-Aktivitäts-Assays. Hierzu wurde gereinigtes Protein aus Pankreasfragmenten über Nacht mit LIMK2 immunopräzipitiert, mit P^{32} radioaktiv markiert und die Aktivität anhand der Phosphorylation von Myelin Basic Protein (MBP) nach Auftrennung in einem SDS-Gel und anschließender Autoradiographie bestimmt.

Um einen zeitabhängigen Effekt auf die Aktivierung der LIMK2 durch CCK zu zeigen, wurden hierzu in einer Doppelbestimmung frisch isolierte Azinuszellen über 2, 5 und

10 Minuten mit 10nM CCK stimuliert. Somit konnte eine Aktivitätszunahme der Kinase in Abhängigkeit von der Stimulierungszeit gezeigt werden. Hier fand sich nach Stimulation der Fragmente mit 10nM CCK eine rasche Aktivierung der LIMK, bereits nach 2 Minuten messbar mit fast maximaler Aktivität, und bis mindestens 10 Minuten nach Stimulation signifikant nachweisbar (Abb. 26).

Abb. 26: Zeitabhängigkeit der LIMK2-Aktivierung nach CCK-Stimulation im Kinase-Assay



Azinuszellen wurden verschieden lang in einer Doppelbestimmung mit 10nM CCK stimuliert. Nach Markierung mit $P^{32}\gamma$ -ATP und Substratzugabe (MBP) wurden pro Bahn jeweils 1mg/ml Protein wie folgt aufgetragen: unstimuliert (Bahn 1 und 2), 2min (Bahn 3 und 4), 5min (Bahn 5 und 6), 10min (Bahn 7 und 8). Bei 35mA wurden die Proteine per SDS/Page aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in einem Gelrockner getrocknet und anschließend für 12 Stunden bei -80°C autoradiographiert.

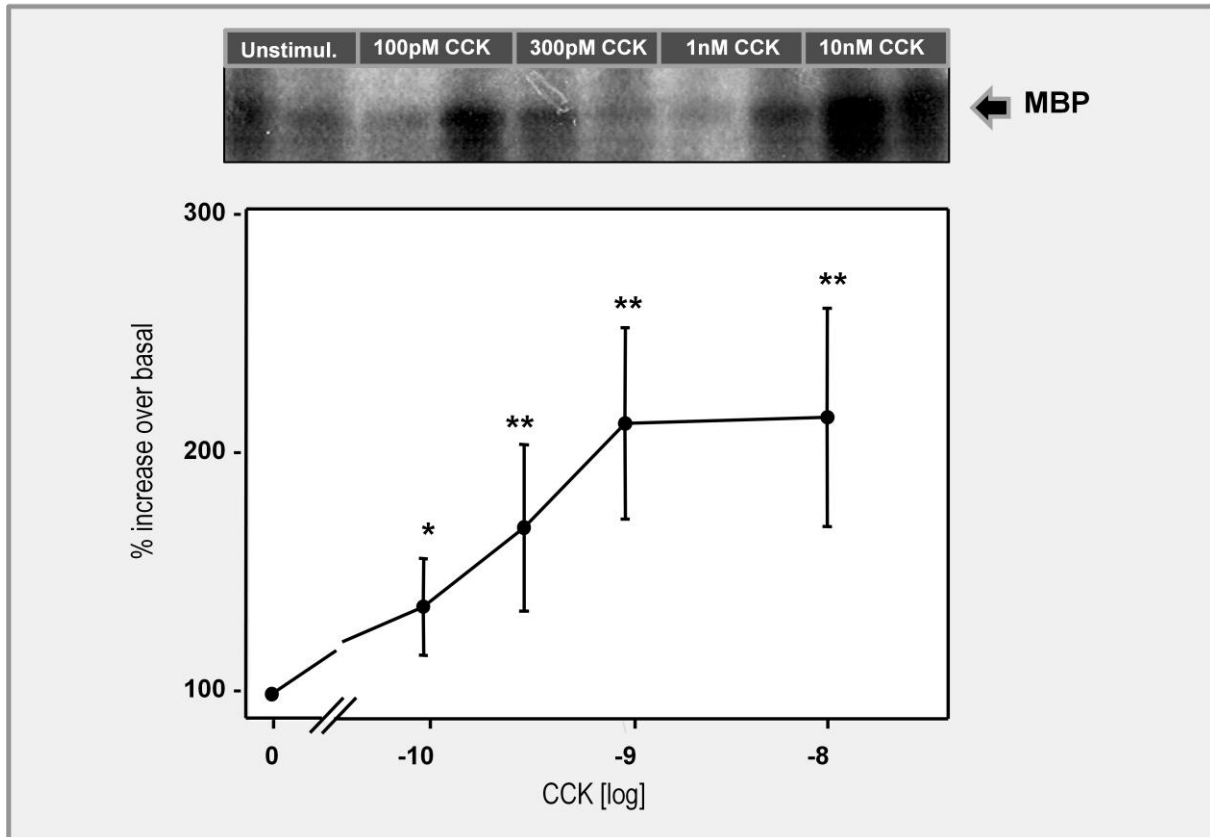
Eine representative Autoradiografie ist im oberen Bildabschnitt dargestellt. Eine quantitative Analyse inkl. der Ergebnisse nach 30 minütiger Stimulation ist im unteren Bildabschnitt dargestellt.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm der mittleren Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle betrachtet

In einem weiteren Versuch gelang es, eine dosisabhängige Aktivierung der LIMK zu zeigen. Die Messung der LIMK-Aktivität nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von CCK ergab ebenso wie bei ROCK, bereits eine signifikante

Aktivierung der LIM Kinase nach Stimulation mit 100pM CCK und eine maximale Aktivität nach Stimulation mit 1 bis 10nM CCK (Abb. 27).

Abb. 27: Dosisabhängige Aktivierung der LIMK2 nach CCK-Stimulation im Kinase-Assay



Azinuszellen wurden in ansteigenden Konzentrationen für 15 Minuten in einer Doppelbestimmung mit CCK in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Nach Markierung mit $P^{32}\gamma$ -ATP und Substratzugabe (MBP) wurden pro Bahn jeweils 1mg/ml Protein wie folgt aufgetragen: unstimuliert (Bahn 1 und 2), 100pM CCK (Bahn 3 und 4), 300pM CCK (Bahn 5 und 6), 1nM CCK (Bahn 7 und 8), 10nM CCK (Bahn 9 und 10). Bei 35mA wurden die Proteine per SDS/Page aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in einem Gelrockner getrocknet und anschließend für 12 Stunden bei -80°C autoradiographiert.

Eine representative Autoradiografie ist im oberen Bildabschnitt, eine quantitative Analyse im unteren Bildabschnitt dargestellt.

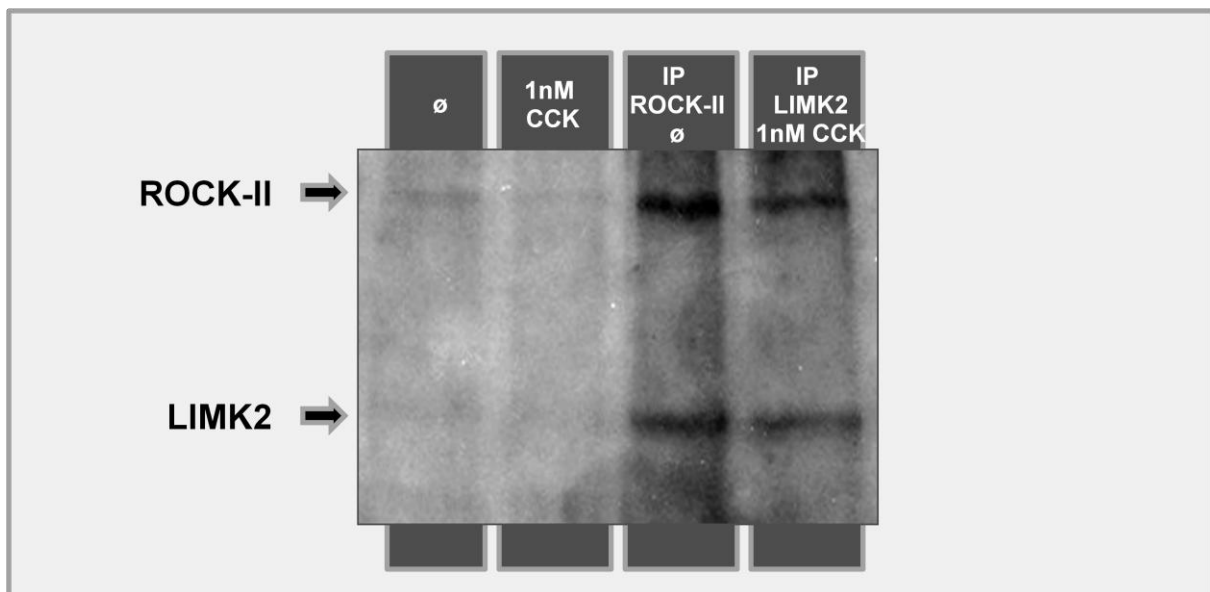
Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm der mittleren Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. $*p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle betrachtet

4.4.3 Immunpräzipitation mit ROCK und LIMK

Um auch die direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen ROCK und der LIM-Kinase zu demonstrieren, wurden ROCK mittels Immunpräzipitation aus den unstimulierten Azinuszellen und die LIM-Kinase nach Stimulation der Zellen mit 1nM CCK aufkonzentriert. Als Positivkontrolle wurde Homogenat des Rattenpankreas

unstimuliert und nach Stimulation mit 1nM CCK verwendet. Im Western Blot konnten die entsprechenden Banden (ROCK-II: 150kDa und LIMK2: 65kDa) durch die Verwendung eines ROCK-II-Antikörpers sichtbar gemacht werden (Abb. 28). Man sieht deutlich beide Proteinbanden entsprechend ihres Molekulargewichts, wie zu erwarten in Bahn 3 nach Immunpräzipitation mit ROCK-II. Bahn 4 macht deutlich, dass nach Aktivierung der Zellen eine deutliche Proteinwechselwirkung zu verzeichnen ist.

Abb. 28: Co-Immunopräzipitation von LIMK und ROCK-II in Azinuszellen



Jeweils 20µg Protein aus unstimulierten Azini und stimulierten Acini wurden der Reihe nach aufgetragen (Bahn 1 und 2). Auf Bahn 3 wurde Protein von unstimulierten Azinuszellen nach I.P. mit ROCK-II, auf Bahn 4 Protein aus Acini nach Stimulation mit 1nM CCK und folgender I.P. mit LIMK2 aufgetragen. Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde zunächst mit einem spezifischen Anti-ROCK-II-Antikörper (goat) in einer Konzentration von 1:1000 markiert. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-goat) erfolgte in einer Konzentration von 1:15000.

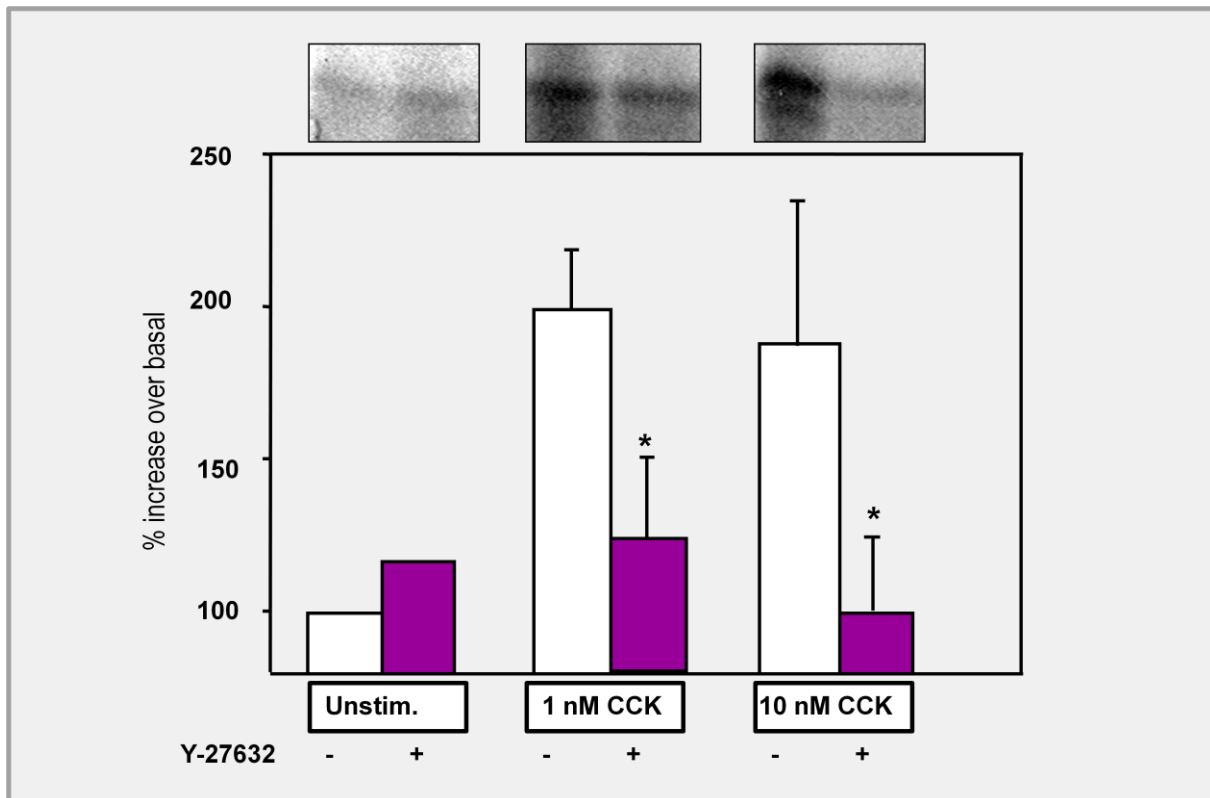
4.1.1 Effekt von γ -27632 auf die CCK-induzierte LIMK-Aktivität

Um zu beweisen, dass die LIMK im Signaltransduktionsweg „downstream“ von ROCK liegt und von der Aktivierung von ROCK abhängig ist, müsste ROCK selektiv gehemmt werden. Diese Inhibierung der ROCK-Aktivität sollte dann in einer Hemmung der LIM Kinase messbar sein.

Wir präinkubierten isolierte Azini für 60 min mit 20µM Y-27632 vor Stimulation mit CCK. Anschließend wurden die Kinase-Assays laut Protokoll durchgeführt.

Interessanterweise hemmte Y-27632 fast vollständig die CCK-induzierte LIMK-Aktivität (Abb. 29). Somit scheint gesichert, dass in isolierten Azini die Stimulation mit CCK zur Aktivierung von ROCK führt, ROCK nachfolgend LIMK aktiviert und diese Aktivierung spezifisch durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 gehemmt werden kann.

Abb. 29: Effekt von y-27632 auf die LIMK-Aktivität



Azinuszellen wurden mit 1nM und 10nM CCK stimuliert. Nach Markierung mit P^{32} -ATP und Substratzugabe (MBP) wurden pro Bahn jeweils 1mg/ml Protein wie folgt aufgetragen: unstimuliert (Bahn 1 und 2), 1nM CCK (Bahn 3 und 4), 10nM CCK (Bahn 5 und 6). Bei 35mA wurden die Proteine per SDS/Page aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in einem Geltrockner getrocknet und anschließend für 12 Stunden bei -80°C autoradiographiert.

Eine repräsentative Autoradiografie ist im oberen Bildabschnitt dargestellt. Eine quantitative Analyse ist im unteren Bildabschnitt dargestellt.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm der mittleren Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zur Probe ohne y-27632 betrachtet.

4.5 Expression von Cofilin in der Azinus-Zelle

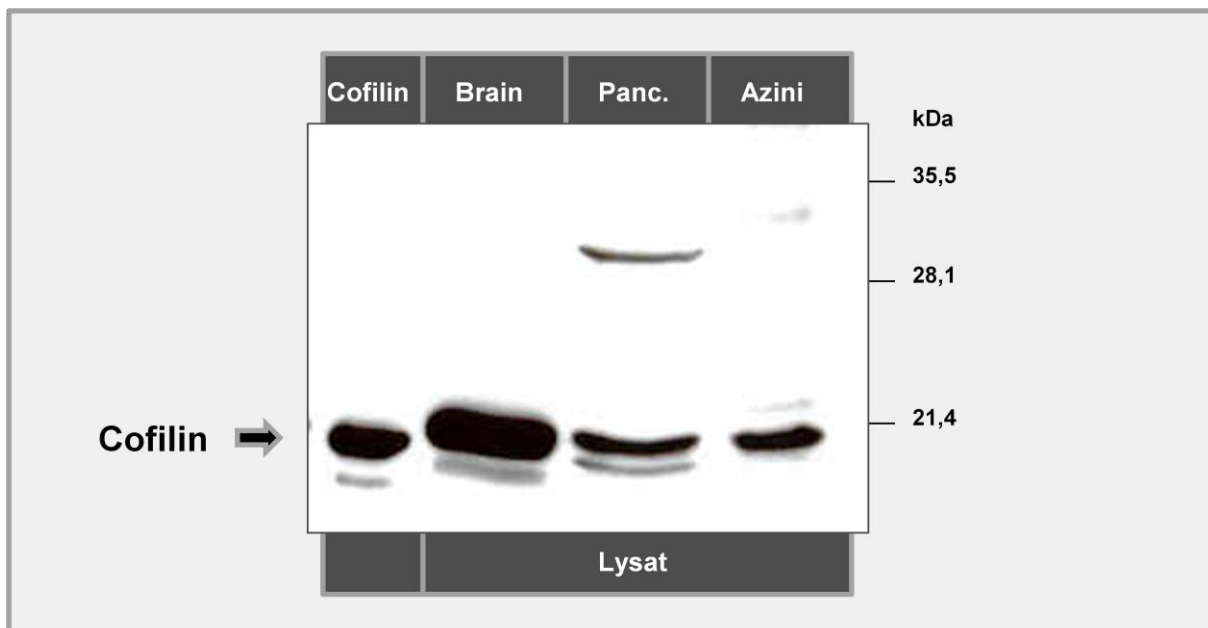
Als ein funktionell wichtiges Substrat für die LIM-Kinase wurde ein Protein namens Cofilin identifiziert. Dabei reguliert die LIM-Kinase die Aktin-Dynamik durch Phosphorylierung und Inaktivierung von Cofilin, das sowohl an F-Aktin, als auch an Aktin-Monomere bindet und notwendig für die Depolymerisation der Aktinfilamente ist (Theriot, 1997).

Cofilin ist ein 19-21kDa schweres Protein (Nishida et al., 1984), das aus dem Gehirn und der Niere von Säugetieren gewonnen wurde. Bei einem nahezu neutralen pH bindet Cofilin an das F-Aktin in einem 1:1 molaren Verhältnis.

4.5.1 Nachweis durch Western Blot

Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen und spezifischen Antikörpers konnten wir im Western Blot die Expression von Cofilin in Azinuszellen nachweisen (Abb. 30).

Abb. 30: Nachweis der Expression von Cofilin in der Azinuszelle



Jeweils 40µg Protein aus Rattenhirn (Bahn 2), Pankreashomogenat (Bahn 3) und unstimulierter Azinus-Zellsuspension und (Bahn 4) wurden pro Bahn aufgetragen. Als positiv-Kontrolle diente rekombinantes Protein (Bahn1). Die Proteine wurden per SDS/Page aufgetrennt und anschließend per Western-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit einem spezifischen Anti-Cofilin-Antikörper markiert.

5 Diskussion

Als Ziel in der vorliegenden Arbeit galt es, einen neuen, das Aktin-Zytoskelett regulierenden Signalweg, in welchem die Expression und Regulation der Rho-aktivierten Kinase (ROCK) eine zentrale Rolle spielt, in der exokrinen Azinuszelle des Rattenpankreas zu untersuchen. Dabei gelang es, auch die anderen Mitglieder der Rho-Signaltransduktionskaskade in der Azinuszelle bzw. im Pankreas nachzuweisen und deren Beziehung untereinander zu untersuchen und eben diesen bereits in anderen Zellen untersuchten Signalpfad (Maekawa et al., 1999) und ihren Einfluss auf die Enzymsekretion über die Beeinflussung des Aktinzytoskeletts während der akuten Pankreatitis nachzuweisen.

5.1 Kritische Bewertung der Experimente

Um eine möglichst hohe Qualität der verwendeten Azinuszellen zu gewährleisten, wurden die Zellen nach der von J.A. Williams im Jahr 1978 modifizierten Präparationstechnik nach Amsterdam und Jamieson isoliert (Williams et al., 1978; Amsterdam and Jamieson, 1972 und 1974) und ihre Intaktheit durch Messung der Amylase-Sekretion als Stimulationsantwort nach Behandlung mit CCK geprüft (Abbildung 8). Eine gewisse Instabilität der Ergebnisse ließ sich dabei leider nicht immer vermeiden, zumal anfangs eine ausreichende enzymatische Digestion durch eine zunächst nicht optimierte Menge und Qualität der verwendeten Kollagenase nicht gewährleistet war und die Zellen in ihrer Stimulierbarkeit äußerst sensibel auf äußere Faktoren, wie z.B. Präparationsstress reagierten. Allerdings konnten nach Optimierung des Präparationsprotokolls und der Kinase-Assays nach ausreichender Präinkubation der Zellen zur Reduktion des Präparationsstresses, reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

Mittels Western Blot konnten in den direkt nach der Organexplantation gewonnenen Pankreashomogenaten und isolierten Azinuszellen der Ratte alle Proteine der Rho-ROCK-Signaltransduktionskaskade nachgewiesen werden. Auf die Methode der Immunopräzipitation konnte dabei meist nicht verzichtet werden, da es im Western Blot bei den hier verwendeten Antikörpern in unstimulierten Zellen häufig nur zu einer

geringen Expression der Proteine kam, was allerdings auch auf eine niedrige Expression der jeweiligen Proteine in den Azinuszellen hinweisen könnte.

5.2 Expression und Aktivierung von ROCK-II in der Azinuszelle des Pankreas

Die Stimulation mit einer supramaximalen sekretorischen Konzentration von CCK oder seinem Abkömmling Caerulein führt zu einer Zerstörung des apikalen Aktinnetzes (O'Konski and Pandol 1990, Schäfer, Ross et al., 1998). Es konnte in verschiedenen Publikationen gezeigt werden, dass Rho A bei der Vermittlung der pankreatischen Enzymsekretion beteiligt ist, die durch CCK und Carbachol hervorgerufen wird.

ROCK-II oder ROK α wurde erstmals von Leung und Manser 1995 als ein Mitglied der Familie der Serin/Threonin-Kinasen mit einer RhoA-bindenden Domäne identifiziert (Leung, Manser et al. 1995). Mittlerweile sind zwei Isoformen der Rho-Kinase bekannt: ROCK-I und ROCK-II. Beide sind Serin/Threonin-Kinasen, die selektiv an GTP-Rho binden und durch diese Bindung aktiviert werden.

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung von ROCK-II. Nachdem ROCK-II in der Azinuszelle nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9), wurde die Stimulierbarkeit durch das Hormon Cholezystokinin (CCK) untersucht. Dabei konnte eine zeitabhängige Zunahme der ROCK-II-Aktivierung gezeigt werden (Abbildung 10). CCK-Konzentrationen von 1nM und höher, sowie eine Stimulierung über 10 bzw. 15 Minuten führten zu einer Zunahme der Expression, übereinstimmend mit den Ergebnissen des Amylase-Assays (Abbildung 8). Hier kam es zu einer optimalen Sekretionsantwort der Zellen nach Stimulation mit 300pM CCK. Bei höheren Konzentrationen von CCK (ab 1nM) nahm die Amylasesekretion ab. Nach Stimulation mit einer supramaximalen Konzentration von Cholezystokinin kommt es also zu einer Zerstörung des Aktinzytoskeletts mit verminderter Amylasesekretion und gesteigerter Expression von ROCK-II.

Nach 30-minütiger Stimulation mit CCK ist keine ROCK-II-Aktivierung mehr nachweisbar. Dies kann durch Zelluntergang nach Isolation durch verschiedene Stresstimuli verursacht worden sein, wie z.B. durch fortschreitende Hypoxie mit

zunehmendem Alter der isolierten Zellen, oder durch toxische Effekte durch CCK auslösbar, oder auch im Rahmen der Zeitkinetik mit einer Adaptation erklärbar sein. Als nächstes wurde versucht, die Lokalisation der Kinase in der Zelle zu untersuchen. In bisher publizierten Ergebnissen wird ROCK-II als insbesondere im Zytosol lokalisierte Kinase beschrieben (Ishizaki et al., 1996). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine vermehrte Signalintensität für ROCK-II in den zytosolischen Zellanteilen nachgewiesen werden (Abbildung 11). Die vermehrte Expression nach Stimulation mit CCK (Abbildung 12) lässt darauf schließen, dass auch nach erfolgter Aktivierung keine Lokalisationsänderung erfolgt und zeigt somit, dass ROCK als Kinase im Zytosol aktiv ist und der Einfluss auf das Zytoskelett nicht direkt über ROCK-II erfolgen kann, sondern über dazwischen geschaltete Kinasen.

Als Kinase spielt ROCK eine wichtige Rolle in der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts. Bereits Leung, Chen et al konnten 1996 eine direkte Beziehung zwischen dem Grad der Kinase-Aktivität und dem Ausmaß der morphologischen Veränderungen in der Zelle zeigen (Leung, Chen et al., 1996).

Die Aktivität von Kinasen lässt sich in einem *In vitro*-Kinase-Assay bestimmen, in dem die Kinase radioaktiv markierte Phosphatgruppen auf ein Substrat überträgt.

Diese Methode erlaubt eine schnelle Bestimmung der Substratphosphorylierung in Abhängigkeit von aktivierter Rho-Kinase. Um zu prüfen, inwiefern es zu einer direkten Phosphorylierung verschiedener an der Aktinregulation beteiligter Substrate durch ROCK-II in der Azinuszelle kommt, wurde Protein aus mit CCK stimulierten Fragmenten des Rattenpankreas nach Immunpräzipitation mit ROCK-II-Antikörper radioaktiv markiert und anschließend mit den Substraten MYPT, Cofilin, MBP und Histone inkubiert. In der kinetischen Analyse der Reaktion kommt es in Anwesenheit von ROCK-II zu einer deutlichen Phosphorylierung von MBP und zu einer etwas niedrigeren, aber doch deutlichen Phosphorylierung von Histone, übereinstimmend mit bisher veröffentlichten Daten (Leung, Manser et al., 1995). Auch nach Stimulation mit CCK kommt es hier zu einer Zunahme der Signalintensität und damit zu einer gesteigerten Aktivierung der beiden Substrate (Abbildung 13).

Die Substrate MYPT und - wie zu erwarten - Cofilin zeigen keine wesentliche Aktivierung, was auf keine direkte Phosphorylierung durch die Rho-Kinase schließen lässt (Mekawa et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde in den weiteren Kinase-Assays MBP als direktes Substrat von ROCK in der Azinuszelle eingesetzt und der Aktivierungsgrad der Kinase über die Phosphorylierung des Substrats gemessen.

Auch die bereits in den vorausgegangenen Ergebnissen gezeigte Dosis- und Zeitabhängigkeit der Substratphosphorylierung durch ROCK-II nach Stimulierung mit CCK konnte im Kinase-Assay gezeigt werden. Dabei führte eine Stimulierung der Pankreaszellen mit ansteigenden CCK-Konzentrationen zu einem Anstieg der Kinase-Aktivität, wobei eine maximale Aktivierung bei einer Stimulation mit einer Konzentration von 10nM CCK erreicht wird (Abbildung 14). Ebenso konnte eine Aktivitätszunahme der Kinase in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt werden (Abbildung 15). Dabei kommt es zu einem schnellen Anstieg der Aktivität, welche bereits nach 2 Minuten messbar und bis zu einer Stimulierungszeit von 30 Minuten nachweisbar ist.

Im Folgenden wurde nun versucht, den in früheren Studien bereits beschriebenen Einfluss anderer Sekretagoga auf ROCK-II, wie CCK-JMV-180, Bombesin, Carbachol und TPA, die in vivo keine Pankreatitis auslösen, zu untersuchen (Matozaki, Zhu et al., 1991; Piiper et al., 1991; Williams and Yule, 1993; Nishino et al., 1998).

In vorausgegangenen, hier nicht gezeigten Versuchen, war die Fähigkeit der genannten Sekretagoga zur Stimulierung von Azinuszellen anhand der Amylasesekretion überprüft worden. Nach Stimulation der Pankreasfragmente mit den jeweiligen CCK-Konzentrationen, die eine maximale Amylasesekretion hervorriefen, zeigte sich im Aktivitätsassay ein Einfluss auf die Stimulierbarkeit von ROCK-II. Dabei war eine direkte Phosphorylierung von MBP am deutlichsten nach Stimulation mit CCK-JMV-180 zu erkennen (Abbildung 16). Als Agonist an *high-affinity*-CCK-Rezeptoren und als Antagonist an *low-affinity*-CCK-Rezeptoren führt es laut Literatur zu einer maximalen Enzym-Sekretion bei einer CCK-JMV-180 Konzentration von 0,1µM und zu keiner Abnahme der Sekretion bei höheren Konzentrationen (Piiper et al, 1991; Sato et al., 1989).

5.3 Hemmung von ROCK-II durch γ -27632

Y-27632 oder (*R*)-(+)-*trans*-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride monohydrate ist ein Pyridin-Derivat, das sowohl ROCK-I als auch ROCK-II dosisabhängig hemmt (Ishizaki, Uehata et al., 2000). Kinetische Analysen

mit gereinigtem Enzym haben gezeigt, dass γ -27632 ROCK hemmt, indem es mit ATP um die Bindungsstelle an der katalytischen Einheit konkurriert. Dabei ist eine Hemmung bei Konzentrationen im Mikromolarbereich möglich. Die Aufnahme in die intakte Zelle erfolgt über eine durch eine Trägersubstanz erleichterte Diffusion. Ein Aufnahmeplateau wird nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C erreicht, das heißt, dann ist in der Zelle ungefähr die gleiche Menge an Inhibitor vorhanden wie außerhalb der Zelle. Daraus folgt eine minimale Inkubationszeit von 30 Minuten, um eine maximale Hemmung zu erreichen (Uehata et al., 1997; Amano, Fukata et al., 2000; Narumiya, Ishizaki et al., 2000). Nach Inkubation frisch isolierter Azinuszelle mit dem ROCK-Inhibitor über 30 Minuten ist somit mit einer Hemmung von ROCK und einer folgenden Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts zu rechnen. In den vorliegenden Ergebnissen konnte eine Hemmung der Amylasesekretion nach Zugabe des Inhibitors zwar gezeigt, eine statistische Signifikanz der Hemmung jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 18).

Auch Kusama et al konnten 2003 in isolierten Ratten-Azinuszellen keine Hemmung, sondern vielmehr eine Steigerung der basalen Enzymsekretion nach Zugabe des ROCK-Inhibitors nachweisen. In vivo konnten sie zudem eine Zunahme des pathophysiologischen Schadens im frühen Stadium einer akuten Pankreatitis zeigen (Zunahme des interstitiellen Ödems und der intrazellulären Vacuolisierung) (Kusama et al, 2003). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Bi und Williams gemacht, die einen fehlenden Einfluss des Inhibitors auf die Amylasesekretion in Azinuszellen beobachten konnten. Auch Studien mit anderen Zellen, wie Mast- und Parietalzellen zeigten keinen Effekt auf die Sekretion (Sullivan et al., 1999; Tashiro et al., 2003; Bi and Williams, 2005). Somit stellt sich die Frage, inwiefern die Rho-Kinase Einfluss auf die Amylasesekretion in Azinuszellen hat.

Nach Stimulation der Zellen mit den Sekretagoga CCK-JMV-180, Bombesin, Carbachol und TPA, die zu keiner Pankreatitis in vivo führen, konnte überraschenderweise jedoch eine signifikante Abnahme der Amylasesekretion nach Zugabe des ROCK-II-Inhibitors nach Stimulation mit den Sekretagoga CCK, Bombesin und CCK-JMV-180 gezeigt werden (Abbildung 19). Es lässt also vermuten, dass γ -27632, unabhängig von den verwendeten Sekretagoga, ROCK-II hemmt und somit zu einer konsekutiven Hemmung der Amylasesekretion führt.

Um die Spezifität des ROCK- Inhibitors zu prüfen wurde der Einfluss auf die ebenfalls an der Signaltransduktion beteiligten und der durch CCK aktivierbaren MAP-Kinasen untersucht (Williams, 2001).

Einen Einfluss des ROCK-Inhibitors auf die Kinasen ERK und p38 MAPK konnte in keinem der vorliegenden Experimente gezeigt werden, auch nicht nach Stimulierung der Zellen mit CCK (Abbildungen 20A und B), was mit bisher publizierten Ergebnissen übereinstimmt. Y-27632 scheint also ein spezifischer ROCK-Inhibitor zu sein (Uehata et al., 1997; Amano, Fukata et al., 2000; Narumiya, Ishizaki et al., 2000).

Allerdings stellt sich die Frage, inwieweit ein Kinase-Inhibitor als spezifisch zu beurteilen ist, indem man seinen Effekt auf andere Kinasen untersucht, die in ihrer Struktur eng verwandt sind. Davies et al. untersuchten hierzu anhand einer großen Anzahl von Proteinkinasen die Spezifität vieler bisher als spezifische Hemmer bestimmter Serin/Threonin-Kinasen beschriebener Inhibitoren, darunter auch y-27632. Als Beispiel hemmt Y-32885, ein eng verwandtes Molekül von y-27632 PRK1, eine Rho-abhängige Protein-Kinase in einer Konzentration ähnlich der, die die ROCK-Isoformen hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass y-27632 PRK2 hemmt (eine Kinase, die eng mit PRK1 verwandt ist) und zwar in einer Stärke, die ähnlich der für ROCK-II ist. Die katalytische Einheit von PRK1/PRK2 teilen jedoch nur 35-38% identische Aminosäuresequenzen mit ROCK-I und ROCK-II. Auch konnten drei andere Proteinkinasen durch y-27632 gehemmt werden, aber bis zu 50-mal stärker als bei PRK2 und ROCK-II (MSK, MAPKAP-K1b/RSK 2, PHK).

Es gibt also keine Garantie, dass Hemmer der Proteinkinasen nicht andere Proteinkinasen oder andere Typen von Enzymen hemmen, die nicht untersucht wurden, auch wenn der untersuchte Wirkstoff nur eine von 20-30 Kinasen hemmt (Davies et al, 2000).

5.4 Die Rho-Signaltransduktionskaskade im Aktin-Zytoskelett

Rho-GTPasen werden durch spezifische extrazelluläre Signale aktiviert und regeln die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Schmidt and Hall, 1998). In der aktiven GTP-gebundenen Form interagieren Rho-Proteine mit ihren Effektoren, wie z.B. der Rho-Kinase, und regulieren hierdurch das Aktin-Zytoskelett und eine Vielzahl

weiterer Signalprozesse (Machesky and Hall, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, ausgehend von ROCK-II die Rho-Signaltransduktionskaskade auf die Azinuszelle im Pankreas zu übertragen.

RhoA

Die Serin/Threonin-Kinase ROCK-II bindet selektiv an GTP-Rho und wird dadurch als Effektor im „downstream“ von Rho aktiviert (Ishizaki et al., 1997). Das Vorhandensein von RhoA konnte bei den hier verwendeten Antikörpern nur nach Immunpräzipitation gezeigt werden, eine Expression im Western Blot gelang leider nicht, was möglicherweise für ein niedriges Expressionsniveau der Kinase auf Proteinebene sprechen könnte.

Nachdem der Nachweis von RhoA in der Azinuszelle gelang (Abbildung 21), wurde versucht, die zu erwartende direkte Protein-Protein-Interaktion mit ROCK-II nachzuweisen. Dabei konnten mittels der Co-Immunpräzipitation im Western Blot mit Hilfe eines ROCK-Antikörpers Rho-Proteine als Hinweis auf eine direkte Protein-Interaktion detektiert werden. Eine gesteigerte Aktivierung zeigte sich nach vorausgegangener und damit gesteigerter Aktivierung von RhoA mit GTP γ S (Abbildung 22). Zur Validierung des Ergebnisses wurde versucht, mit ROCK-Antikörper markierte Proteine mit einem Rho-Antikörper zu detektieren (Abbildung nicht dargestellt). Eine geeignete Darstellung im Western Blot gelang hier jedoch nicht und ist möglicherweise auf die verwendeten Antikörper zurückzuführen.

Wie andere kleine GTPasen ist Rho aktiv, wenn es an GTP gebunden ist und inaktiv, wenn es an GDP gebunden ist. Bei der Aktivierung dieser Proteine kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP und daraufhin zu einer Konformationsänderung des Proteins, durch die die Bindung an ein Substratprotein ermöglicht wird. Dies bedeutet, dass nur die aktive Form des Rho-Proteins an sein Substrat bindet.

GTP γ S (Guanosin 5'-O-[gamma-thio]Triphosphat), ein G-Protein aktivierendes Analogon der Guanosin-Phosphatasen stimuliert die Nukleotid-bindenden Proteine und führt damit zu einer gesteigerten Aktivierung. Pankreashomogenat und Azinuszellen zeigten nach Zugabe von GTP γ S deutliche Proteinbanden. Die mit GDP behandelten Lysate, und damit die GTPase- inaktiven Zellen, führten zu keiner Expression von RhoA. Dagegen konnte eine gesteigerte Expression nach Stimulation mit CCK nachgewiesen werden, wodurch belegt werden konnte, dass die

Stimulierung mit CCK zu einer raschen Aktivierung von RhoA führt (Abbildungen 23 und 24).

LIM-Kinase

Als nachgeschalteter Effektor von ROCK in der Rho-Signaltransduktionskaskade wurde die LIMK beschrieben. Zwei LIM-Kinasen, LIMK1 (72kDa) und LIMK2 (65kDa), sind bisher in Säugetieren identifiziert worden. Diese Proteine regulieren die Aktin-Polymerisation über eine Phosphorylierung und Inaktivierung von ADF/Cofilin (Arber et al. 1998; Yang et al., 1998, Sumi et al. 2001).

ROCK phosphoryliert und aktiviert die LIMK am Threonin-Rest innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinase (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998; Edwards et al., 1999; Maekawa et al., 1999; Ohashi et al., 2000).

Die bisher publizierten Ergebnisse zeigen, dass die Funktion der LIMK1 und der LIMK2 *in vitro* sehr ähnlich ist, da sie beide Cofilin phosphorylieren und damit zu dessen Inaktivierung führen. Der wesentliche Unterschied der beiden Proteine liegt in ihrer Zelltyp-spezifischen Expression und in der unterschiedlichen Lokalisation in den Zellen (Acevedo et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde speziell die vor allem im Zytoplasma vorkommende LIMK2 untersucht.

Erstmals gelang es hier im Western Blot und mit Hilfe der Immunopräzipitation, das Vorhandensein der LIMK2 in der pankreatischen Azinuszelle zu beweisen (Abbildung 25A und B).

Ebenso konnte die LIMK2 im *in vitro*-Kinaseaktivitäts-Assay nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CCK sowohl eine zeit-, als auch eine dosisabhängige Aktivierung der LIMK in exokrinen Azinuszellen induziert (Abbildung 26 und 27). Dieser Effekt konnte bereits bei ROCK in ähnlicher Weise gezeigt werden (siehe oben).

Als nachgeschalteter Effektor von ROCK ist eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen LIMK und ROCK zu erwarten. Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation konnte zwar im Western Blot durch einen ROCK-Antikörper sowohl LIMK-Proteine als auch ROCK-II-Proteine als Hinweis auf eine direkte Protein-Interaktion dargestellt werden (Abbildung 28), ob die LIMK eine vorgeschaltete- oder eine nachgeschaltete Kinase ist, also im Signalweg „up“- oder „downstream“ von ROCK liegt, konnte damit nicht gezeigt werden. Um nun zu beweisen, dass LIMK2 im Signalweg „downstream“ von

ROCK liegt und von der Aktivierung von ROCK abhängig ist, wurde in einem weiteren Experiment versucht, ROCK selektiv zu hemmen. Diese Inhibierung der ROCK-Aktivität sollte dann in einer Hemmung der LIM-Kinase messbar sein. Hierzu wurden isolierte Azinuszellen für 60 min mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 präinkubiert und anschließend mit CCK stimuliert. In den anschließenden Kinaseaktivitäts-Assays zeigte sich eine fast vollständige Hemmung der CCK-induzierte LIMK-Aktivität (Abbildung 29). Somit scheint gesichert, dass in isolierten Azini die Stimulation mit CCK zur Aktivierung von ROCK führt, ROCK nachfolgend LIMK aktiviert und diese Aktivierung spezifisch durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 gehemmt werden kann.

Cofilin

LIM-Kinasen regulieren die Aktin-Dynamik durch Phosphorylierung von Cofilin, das sowohl an F-Aktin, als auch an Aktin-Monomere bindet und notwendig für die Depolymerisation der Aktinfilamente ist (Theriot, 1997; Arber et al., 1998; Yang et al., 1998; Aspenström, 1999). Cofilin gehört zu einer Gruppe von niedrigmolekularen Aktin-bindenden Proteinen (15-21kDa). Es wird reguliert durch die Phosphorylierung eines N-terminalen Serin-Endes. Dadurch wird seine Fähigkeit F-Aktin zu depolymerisieren inaktiviert (Rosenblatt and Mitchison 1998; Sumi, Matsumoto et al., 2001; Ayscough, 1998). In vitro bindet phosphoryliertes Cofilin weder an G- noch an F-Aktin, wohingegen nichtphosphoryliertes Cofilin an Aktin bindet. Phosphorylation ist also ein Inaktivierungsprozess, der zu einer enormen Abnahme der Fähigkeit, mit Aktin zusammenzuwirken führt (Ayscough, 1998). In der Azinuszelle wird Cofilin exprimiert (Abbildung 30) und bildet somit den Endpunkt der Rho-ROCK-LIMK-Cofilin-Enzymkaskade. Eine Inaktivierung von Cofilin durch dessen Phosphorylierung nimmt also Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett und damit Einfluss auf die regulierte Sekretion in der Azinuszelle des Pankreas.

Zusammenfassend führt in vitro die Stimulation mit einer supramaximalen sekretorischen Konzentration von CCK zu einer Aktivierung der Rho-ROCK-Enzymkaskade mit der Zerstörung des apikalen Aktinnetzes als Endpunkt über die Phosphorylierung von Cofilin. Diesem Prozess folgt die Hemmung der Sekretion und es tritt eine Fehlsortierung der Zymogengranula auf, also eine Verschmelzung der Zymogengranula mit Lysosomen oder mit der basolateralen Membran (Saluja,

Bhagat et al. 1999). Diese Veränderungen führen zu einer vorzeitigen Aktivierung der Amylase mit der folgenden Zerstörung der Azinuszelle, entsprechend einer akuten Pankreatitis beim Menschen (O'Konski and Pandol 1990; Williams et al., 2002; Bi and Williams, 2005; Bi et al., 2005).

6 Zusammenfassung

Die regulierte Sekretion in den Azinuszellen im Pankreas hängt von der Intaktheit des Aktin-Zytoskeletts ab (Muallem et al., 1995). Die Stimulation mit einer supramaximalen sekretorischen Konzentration von CCK führt zu einer Zerstörung des apikalen Aktinnetzes (O'Konski and Pandol 1990) mit folgender Hemmung der Sekretion und Fehlsortierung der die Verdauungsenzyme beinhaltenden Zymogengranula an der basolateralen Membran (Saluja et al., 1999). Es kommt zu einer vorzeitigen Aktivierung der Verdauungsenzyme mit der konsekutiven Zerstörung der Azinuszelle in vitro. Dieses an Tieren gut etablierte Modell entspricht der akuten ödematösen Pankreatitis beim Menschen (O'Konski, Pandol 1990).

Der wohl bekannteste Regulationsmechanismus des Aktin-Zytoskeletts ist die Regulierung über die Rho-Kinasen. Als Effektor von Rho reguliert ROCK das Aktin-Zytoskelett in den verschiedensten Zelltypen über die Phosphorylierung der LIMK und der folgenden Phosphorylierung von Cofilin, was zu dessen Inaktivierung und damit zu einer enormen Abnahme seiner Fähigkeit, mit Aktin zusammenzuwirken führt (Ayscough, 1998; Maekawa et al., 1999).

Als Ziel in der vorliegenden Arbeit galt es, die Expression und Regulation der Rho-aktivierten Kinase in den exokrinen Azinuszellen und ihre Bedeutung bei der akuten Pankreatitis als Mitglied der Rho-Signaltransduktionskaskade zu untersuchen.

Am Modell frisch isolierter Azinuszellen und Pankreashomogenaten konnte ROCK-II als zytosolisches Protein in der Azinuszelle nach Induktion einer in vitro erzeugten Pankreatitis über das Hormon Cholezystokinin nachgewiesen werden. Direkte Protein-Wechselwirkungen konnten mit den vorgeschalteten Proteinen Rho und dem nachgeschalteten Effektorprotein LIMK gezeigt werden. Über den Nachweis von Cofilin konnte somit der komplette Signaltransduktionspfad in der Azinuszelle nachgewiesen werden.

Als Kinase hat ROCK die Aufgabe, andere Substrate zu phosphorylieren. Im Kinase-Aktivitäts-Assay gelang es, ihre Aktivität in der Azinuszelle zu bestimmen und eine Aktivitätszunahme nach Induktion einer Pankreatitis in vitro nachzuweisen. Dabei ist ROCK-II nicht nur alleine auf die Aktivierung durch CCK angewiesen, auch andere Sekretagoga, die in vivo keine Pankreatitis auslösen, insbesondere der zum menschlichen CCK1-Rezeptor atypische Ligand CCK-JMV-180, führt zu einer ausgeprägten Aktivierung in vitro.

Eine signifikante Hemmung der Amylasesekretion durch den ROCK-II-Inhibitor γ -27632 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, analog zu vielen Publikationen, in denen eine Hemmung von ROCK-II durch γ -27632 berichtet wurde. Somit nimmt γ -27632 über ROCK-II Einfluss auf die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, indem es ROCK und die nachfolgenden Schritte in der Enzymkaskade hemmt und zu einer verminderten Amylasesekretion in der Pankreasazinuszelle führt. Ein gewisser protektiver Effekt könnte somit dem Enzym zugeschrieben werden und dient als möglicher Ansatzpunkt in einer therapeutischen Behandlung der akuten Pankreatitis. Einen Einfluss auf andere, ebenfalls an der Signaltransduktion beteiligten Signalkaskaden konnte für den Inhibitor in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die Rho-aktivierte Kinase nimmt als Bestandteil der Rho-Signaltransduktionskaskade einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Aktin-Zytoskeletts in der Azinuszelle des Pankreas. Somit übt sie einen indirekten Einfluss auf die akute Pankreatitis aus, indem sie durch Aktivierung über Rho und der folgenden Aktivierung ihrer nachgeschalteten Effektoren LIM-Kinase und Cofilin zu einer Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts mit folgender Fehlsortierung und frühzeitigen Aktivierung von Verdauungsenzymen führt. Bezüglich zukünftiger möglicher therapeutischer Ansatzpunkte in der Behandlung der akuten Pankreatitis, nimmt dabei der synthetisch hergestellte Inhibitor der Rho-Kinase γ -27632 eine interessante Stellung ein. In Zukunft müssten hierzu jedoch detailliertere Untersuchungen und *in-vivo*-Analysen durchgeführt werden, um einen möglichen Einfluss auf den Verlauf einer Pankreatitis genauer zu untersuchen. Desweiteren muss festgestellt werden, ob die Ergebnisse der tierexperimentellen Versuche auch auf menschliche Zellen übertragbar sind.

7 Literaturverzeichnis

Acevedo K, Moussi N, Li R, Soo P, Bernard O. LIM kinase 2 is widely expressed in all tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006 May; 54(5): 487-501. Epub 2006 Jan 6.

Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 1997 Feb 28; 275 (5304): 1308-11.

Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.* 2000 Nov 25; 261 (1): 44-51.

Amano T, Tanabe K, Eto T, Narumiya S, Mizuno K. LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem J.* 2001 Feb 15; 354 (Pt 1): 149-59.

Amsterdam A, Jamieson JD. Structural and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 69:3028-3032, 1972.

Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature.* 1998 Jun 25; 393 (6687): 805-9.

Aspenstrom P. Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol.* 1999 Feb; 11(1): 95-102.

Ayscough KR. In vivo functions of actin-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 1998, 10:102-111.

Bernard O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39 (6): 1071-6. Epub 2006 Nov 28. Review.

Bi Y, Williams JA. A role for Rho and Rac in secretagogue-induced amylase release by pancreatic acini. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Jul; 289 (1): C22-32. Epub 2005 Mar 2.

Bi Y, Page SL, Williams JA. Rho and Rac promote acinar morphological changes, actin reorganization, and amylase secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Sep; 289 (3): G561-70. Epub 2005 May 26.

Bruzzone R. The molecular basis of enzyme secretion. *Gastroenterology* 1990; 99: 1157-1176.

Carlier MF. Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Feb; 10(1): 45-51.

Cook LJ, Musa OA, Case RM. Intracellular transport of pancreatic enzymes. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 219: 1-5.

Dabrowski A, Grady T, Logsdon CD, Williams JA. Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1996 Mar 8; 271 (10): 5686-90.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 2000 Oct 1; 351 (Pt 1): 95-105.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MC, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 1991. 60: 653-88.

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep; 1 (5): 253-9.

Foletta VC, Moussi N, Sarmiere PD, Bamberg JR, Bernard O. LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp Cell Res.* 2004 Apr 1; 294 (2): 392-405

Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Jan; 22 (1): 32-9.

Gorelick FS, Otani T. Mechanisms of intracellular zymogen activation. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 1999 Jul;13 (2): 227-40.

Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science.* 2004 Apr 30; 304 (5671): 743-6.

Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol.* 1998 Nov; 275 (5 Pt 1): G1010-7.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998 Jan 23; 279 (5350): 509-14.

Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, Matsumura F, Maekawa M, Bito H, Narumiya S. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29; 141 (7): 1625-36.

Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 1996 Apr 15; 15 (8): 1885-93.

Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, Narumiya S. p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett.* 1997 Mar 10; 404 (2-3): 118-24.

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 2000 May; 57 (5): 976-83.

Keim V. Molekulare Pathogenese der Pankreatitis. *Z Gastroenterol.* 2002; 40: 48-50.

Keim V, Iovanna JL, Dagorn JC. The acute phase reaction of the exocrine pancreas. Gene expression and synthesis of pancreatitis-associated proteins. *Digestion.* 1994; 55: 65-72

Koike H, Steer ML, Meldolesi J. Pancreatic effects of ethionine: blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis. *Am J Physiol.* 1982 Apr; 242 (4): G297-307.

Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol.* 1999 Dec; 277 (6 Pt 1): G1108-37. Review.

Kubisch C, Dimagno MJ, Tietz AB, Welsh MJ, Ernst SA, Brandt-Nedelev B, Diebold J, Wagner AC, Göke B, Williams JA, Schäfer C. Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced pancreatitis. *Gastroenterology.* 2004 Jul; 127 (1): 275-86.

Kukor Z, Mayerle J, Krüger B, Tóth M, Steed PM, Halangk W, Lerch MM, Sahin-Tóth M. Presence of cathepsin b in the human pancreatic secretory pathway and its role in Trypsinogen activation during hereditary pancreatitis. *J. Biol Chem.* 2002 June 14; 277 (24): 21389-21396.

Kusama K, Nozu F, Awai T, Tanaka S, Honma I, Tsunoda Y, Mitamura K. Deactivation of ROCK-II by Y-27632 enhances basolateral pancreatic enzyme secretion and acute pancreatitis induced by CCK analogues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 30; 305 (2): 339-44.

Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997 May 9; 272 (19): 12257-60.

Lampel M, Kern FK. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1977 Mar 11; 373 (2): 97-117.

Lerch MM, Gorelick FS. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Med Clin North Am.* 2000 May; 84 (3): 549-63, viii. Review.

Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 1996 Oct; 16 (10): 5313-27.

Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem.* 1995 Dec 8; 270 (49): 29051-4.

Machesky LM, Hall A. Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 1996 Aug; 6 (8): 304-10.

Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell.* 1985 May; 41 (1): 31-40.

Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 1999 Aug 6; 285 (5429): 895-8.

Mannherz HG, Ballweber E, Galla M, Villard S, Granier C, Steegborn C, Schmidtmann A, Jaquet K, Pope B, Weeds AG. Mapping the ADF/cofilin binding site on monomeric actin by competitive cross-linking and peptide array: evidence for a second binding site on monomeric actin. *J Mol Biol.* **2007** Feb 23; 366 (3): 745-55. Epub 2006 Dec 15.

Matozaki T, Martinez J, Williams JA. A new CCK analogue differentiates two functionally distinct CCK receptors in rat and mouse pancreatic acini. *Am J Physiol.* 1989 Oct; 257 (4 Pt 1): G594-600.

Matozaki T, Zhu WY, Tsunoda Y, Göke B, Williams JA. Intracellular mediators of bombesin action on rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol.* 1991 Jun; 260 (6 Pt 1): G858-64.

Mc Gough A. F-actin-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 1998, 8: 166-176

Mechanisms of alcoholic pancreatitis. Proceedings of a conference. Chicago, Illinois, USA, November 2002. *Pancreas.* 2003 Nov; 27 (4): 281-355.

Mitchell RMS, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003; 361: 1447-55

Moriyama K, Iida K, Yahara I. Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells.* 1996 Jan; 1 (1): 73-86

Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol.* 1995 Feb; 128 (4): 589-98.

Narumiya S, Ishizaki T, Uehata M. Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods in Enzymology,* 2000; 325: 273-84

Narumiya S, Ishizaki T, Watanabe N. Rho effectors and reorganisation of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 1997 Jun 23; 410 (1): 68-72. Review.

Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 1996 Aug 26; 392 (2): 189-93.

Nemoto T, Kojima T, Oshima A, Bito h, Kasai H. Stabilisation of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J Biol Chem.*2004 Sep 3; 279 (36): 37544-50.

Nishida E, Maekawa S, Sakai H. Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry.* 1984 Oct 23; 23 (22): 5307-13.

Nishino H, Tsunoda Y, Owyang C. Mammalian bombesin receptors are coupled to multiple signal transduction pathways in pancreatic acini. *Am J Physiol.* 1998 Mar; 274 (3 Pt 1): G525-34.

Ohashi, K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K. Rho-associated Kinase ROCK Activates LIM-kinase 1 by Phosphorylation at Threonine 508 within the Activation Loop. *J. Biol Chem*, Vol. 275, Issue 5, 3577-3582, February 4, 2000.

Okano I, Hiraoka J, Otera H, Nunoue K, Ohashi K, Iwashita S, Hirai M, Mizuno K. Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs. *J Biol Chem.* 1995 Dec 29; 270 (52): 31321-30.

O'Konski MS., Pandol SJ. Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. *J Clin Invest.* 1990 Nov; 86 (5): 1649-57.

Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* 1975. August; 189: 347-358.

Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol.* 1990 Sep; 111 (3): 1001-7.

Petersen OH, Burdakov D, Tepikin AV. Polarity in intracellular calcium signaling. *Bioessays.* 1999 Oct; 21 (10): 851-60. Review.

Piiper A, Plusczyk T, Eckhardt L, Schulz I. Effects of cholecystokinin, cholecystokinin JMV-180 and GTP analogs on enzyme secretion from permeabilized acini and chloride conductance in isolated zymogen granules of the rat pancreas. *Eur J Biochem.* 1991 Apr 23; 197 (2): 391-8.

Price LS, Norman JC, Ridley AJ, Koffer A. The small GTPases Rac and Rho as regulators of secretion in mast cells. *Curr Biol.* 1995 Jan 1; 5 (1): 68-73.

Rattner DW. Experimental models of acute pancreatitis and their relevance to human disease.

Scand J Gastroenterol Suppl. 1996; 219: 6-9.

Rao JN, Guo X, Liu L, Zou T, Murthy KS, Yuan JX, Wang JY. Polyamines regulate Rho-kinase and myosin phosphorylation during intestinal epithelial restitution. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Apr; 284 (4): C848-59.

Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen OH. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Nov 21; 97 (24): 13126-31.

Redowicz MJ. Rho-associated kinase: Involvement in the cytoskeleton regulation. *Arch Biochem Biophys.* 1999 Apr 1; 364 (1): 122-4.

Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 1999 Feb 1; 18 (3): 578-85.

Renoult C, Ternent D, Maciver S K, Fattoum A, Astier C, Benyamin Y, Roustan C. The identification of a second cofilin binding site on actin suggests a novel, intercalated arrangement of F-actin binding. *J Biol Chem.* 1999 Oct 8; 274 (41): 28893-9.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992 Aug 7; 70 (3): 389-99.

Rosenblatt J, Mitchison TJ. Actin, cofilin and cognition. *Nature*. 1998 Jun 25; 393 (6687): 739-40.

Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40: 459-89.

Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*. 1999 Apr; 276 (4 Pt 1): G835-42.

Sarmiere PD, Bamburg JR. Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J Neurobiol*. 2004 Jan; 58 (1): 103-17.

Sato S, Stark HA, Martinez J, Beaven MA, Jensen RT, Gardner JD. Receptor occupation, calcium mobilization, and amylase release in pancreatic acini: effect of CCK-JMV-180. *Am J Physiol*. 1989 Aug; 257 (2 Pt 1): G202-9.

Schäfer C, Clapp P, Welsh MJ, Benndorf R, Williams JA. HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells. *Am J Physiol*. 1999 Dec; 277 (6 Pt 1): C1032-43.

Schäfer C, Ross SE, Bragado MJ, Groblewski GE, Ernst SA, Williams JA. 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*. 1998 Sep 11; 273 (37): 24173-80.

Schäfer C, Williams JA. Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: possible roles in normal function and disease. *J Gastroenterol*. 2000; 35 (1): 1-9. Review.

Schmid SW, Modlin IM, Tang LH, Stoch A, Rhee S, Nathanson MH, Scheele GA, Gorelick FS. Telenzepine-sensitive muscarinic receptors on rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol.* 1998 Apr; 274 (4 Pt 1): G734-41.

Schmid S, Uhl W, Büchler MW. Protease-antiprotease interactions and the rationale for therapeutic protease inhibitors. *Scand J Gastroenterol Suppl.* **1996**; 219: 47-50. Review.

Schmidt A, Hall MN. Signalling to the Actin cytoskeleton. *Annu. Rev. cell Dev. Biol.* 1998. 14: 305-38.

Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH. Rho as a Mediator of G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Mol Pharmacol* 1999 55: 949-956.

Singer MV, Gyr K, Sarles H. Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterology.* 1985 Sep; 89 (3): 683-5.

Singh VP, Saluja AK, Bhagat L, Hietaranta AJ, Song A, Mykoniatis A, Van Acker GJ, Steer ML. Serine protease inhibitor causes F-actin redistribution and inhibition of calcium-mediated secretion in pancreatic acini. *Gastroenterology.* 2001 Jun; 120 (7): 1818-27.

Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development.* 1995 Jun; 121 (6): 1569-80. Review.

Sneyd J, LeBeau A, Yule D. Traveling waves of calcium in pancreatic acinar cells: model construction and bifurcation analysis. *Physica D* 145 (2000) 158-179.

Steer ML. Early events in acute pancreatitis. 1999. *Baillière's Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 13, 213-225.

Steer ML. Pathogenesis of acute pancreatitis. *Digestion.* 1997; 58 (suppl 1): 46-49.

Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 1983 Nov 3-9; 306 (5938): 67-9.

Sullivan R, Price LS, and Koffer A. Rho controls cortical F-actin disassembly in addition to, but independently of, secretion in mast cells. *J Biol Chem* 274: 38140–38146, 1999.

Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T. Specific Activation of LIM kinase 2 via Phosphorylation of Threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 2001 Jan 5; 276 (1): 670-6.

Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Feb; 9 (1): 86-92.

Tashiro K, Nagao T, Kurose H, Ichijo H, and Urushidani T. Role of Rho in rabbit parietal cell. *J Cell Physiol* 197: 409–417, 2003.

Theriot JA. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *Cell Biol*. 1997 Mar 24; 136 (6): 1165-8.

Trifaró JM, Vitale ML. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci*. 1993 Nov; 16 (11): 466-72. Review.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997 Oct 30; 389 (6654): 990-4.

Valentijn KM, Gumkowski FD, Jamieson JD. The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and membrane retrieval in pancreatic acinar cells. *J Cell Sci*. 1999 Jan; 112 (Pt 1): 81-96.

Vogetseder W, Tilg H. Update - Akute Pankreatitis. *J Gastroenterol Hepatol Erkr* 2004; 2 (4): 19-23.

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996 Oct; 14 (2): 141-5.

Williams JA. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu. Rev. Physiol.* 2001. 63: 77-97.

Williams JA, Korc M, Dormer RL. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 235 (5): E517-E524, 1978 oder *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. Gastrointest. Physiol.* 4 (5): E517-E524, 1978.

Williams JA, Sans MD, Tashiro M, Schäfer C, Bragado MJ, Dabrowski A. Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells. *Pharmacol Toxicol.* 2002 Dec; 91 (6): 297-303. Review.

Williams JA, Yule DI. Stimulus-Secretion Coupling in Pancreatic Acinar Cells. *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease, Second Edition*, verlegt durch Vay Liang W.Go, et al. Raven Press, Ltd., New York 1993, pp. 167-189.

Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature.* 1998 Jun 25; 393 (6687): 809-12.

Yeoh S, Pope B, Mannherz HG, Weeds A. Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *J Mol Biol.* 2002 Jan 25; 315(4): 911-25.

Yonezawa N, Nishida E, Sakai H. pH control of actin polymerization by cofilin. *J Biol Chem.* 1985 Nov 25; 260 (27): 14410-2.

Yule DI, Baker CW, and Williams JA. Calcium signaling in rat pancreatic acinar cells: a role for $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ and $G\alpha_{14}$. *Am J. Physiol.* 276 (Gastrointest. Liver Physiol. 39): G271-G279, 1999.

8 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung(en)
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinder Serum Albumin
BSA	Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin)
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CCK	Cholezystokinin
DAG	Diacylglycerol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRB	HEPES-Ringer-Puffer
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
M	Molar [mol/l]
nM	nanomol
min	Minute
ml	Mililiter
mg	Miligramm

MW	Molekulargewicht
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Hydroniumionen [H ₃ O ⁺]
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sec	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulphate)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SEM	standard error of means (Standardabweichung)
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Unit, Enzymspezifische Angabe
U/L	Units/Liter
UV	Strahlung im ultravioletten Bereich
V	Volt
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

9 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Forschungslabors B der Medizinischen Klinik II des Klinikums der Universität München–Großhadern für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken, die erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Claus Schäfer, für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und die sehr gute Einarbeitung und intensive Betreuung. Die jederzeitige freundliche und geduldige Unterstützung hat mir sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. med. Constanze Kubisch für die hervorragende und allzeit freundschaftliche Unterstützung. Besonders die geduldige Vermittlung der Methoden wissenschaftlichen Arbeitens hat ganz wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Irmgard Plössl, 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.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Mann Thomas, der mich vor allem in der Endphase der Arbeit stets geduldig vorangetrieben hat und mich in meinem Weiterkommen tatkräftig und liebevoll unterstützt hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in meinem beruflichen Weiterkommen stets unterstützten und mir in allen Lebenslagen zur Seite stehen.

10 Eigene Veröffentlichungen zum Thema

C. Schäfer, C. Kubisch, **S. Grünbauer**, A.C.C. Wagner, B. Göke
„ROCK-Kinase is activated by Cholecystokinin in pancreatic acinar cells and involved in secretion”

Pancreatology 2: A3, 219; 2002.

Gastroenterology 122 (4) Suppl. 1:A S1128, 167; 2002

C. Schäfer, C. Kubisch, **S. Grünbauer**, B. Göke and A.C.C. Wagner
„LIM-Kinase is activated by Cholecystokinin and part of a new signaling cascade in pancreatic rat acini”

Pancreatology 2: A2, 218; 2002.

Gastroenterology 122 (4) Suppl. 1:A315, 37; 2002

C. Schäfer, C. Kubisch, **S. Grünbauer**, B. Göke, A.C.C. Wagner
„LIM-Kinase and ROCK are activated by cholecystokinin and part of a new signaling cascade in pancreatic rat acini”

GUT 51 (3) Suppl. III: OP-G-240, 70; 2002.

C. Schäfer, C. Kubisch, **S. Grünbauer**, B. Göke, and A.C.C. Wagner
„LIM- und ROCK-Kinase: Proteine einer neuen Signaltransduktionskaskade in isolierten Pankreasazini der Ratte“

Zeitschrift für Gastroenterologie, 2002.

C. Schäfer, C. Kubisch, **S. Grünbauer**, B. Göke, A.C.C. Wagner
„Regulation von RhoA und ROCK-Kinase-2 durch CCK in exokrinen Azini der Ratte“
Zeitschrift für Gastroenterologie, 2003.

C. Schäfer, **S. Grünbauer**, C. Kubisch, A.C.C. Wagner, B. Göke
„Regulation of a new signaling cascade by exocrine acini”,
Pancreas 27 (4): 407; 2003.