



Fakultät für Medizin

**Regeneration des Pankreas und Rolle der
Stresskinase JNK2 nach Caerulein-induzierter
Pankreatitis im Mausmodell**

Sina Alica Fritzsche

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Christoph Michalski
2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 07.12.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.07.2022 angenommen.

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

Kong, B., Bruns, P., Behler, N., Chang, L., Schlitter, A. M., Cao, J., Gewies, A., Ruland, J., Fritzsche, S., Valkovskaya, N., Jian, Z., Regel, I., Raulefs, S., Irmeler, M., Beckers, J., Friess, H., Erkan, M., Mueller, N. S., Roth, S., Hackert, T., Esposito, I., Theis, F.J., Kleeff, J., Michalski, C. W. (2018). Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut*, 67(1), 146–156

Kong, B., Behler, N., Bruns, P., Schlitter, A.M., Valkovskaya, N., Fritzsche, S., Raulefs, S., Regel, I., Erkan, M., Theis, F.J., Esposito, I., Kleeff, J., Michalski, C.W., 2013. Pancreatic Progenitor Expansion, Mesenchymal Cell Proliferation and Inflammation are Required During Early Carcinogenesis. *Pancreas* 42, 1360-1361

Behler, N., Kong, B., Schlitter, S., Fritzsche, S., Bruns, P., Valkovskaya, N., Raulefs, S., Regel, I., Friess, H., Esposito, I., Kleef, J., Michalski, C.W., 2012. Oncogenic KrasG12D – mediated "switch-on" in cell proliferation during pancreatic regeneration. Postervortrag im Rahmen der 33. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub, Leipzig

Bruns, P., Kong, B., Fritzsche, S., Behler, N., Valkovskaya, N., Raulefs, S., Regel, I., Friess, H., Theis, F., Michalski, C.W., Kleeff, J., 2012. Comparative analysis of the microenvironment switch in early stages of pancreatic carcinogenesis. Kurzvortrag im Rahmen der 33. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub, Leipzig

Fritzsche, S., Wu, W., Leinenkugel, G., Kong, B., Michalski, C.W., Friess, H., Kleeff, J., 2011. JNK2 deficiency augments the inflammatory response in a mouse model of acute pancreatitis. Kurzvortrag im Rahmen der 32. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub, Marburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pankreas - Anatomie und Funktion	1
1.2	Akute Pankreatitis	2
1.2.1	Ätiologie	2
1.2.2	Symptome und Diagnostik	3
1.2.3	Therapie	4
1.2.4	Pathophysiologie	6
1.2.5	Akute Pankreatitis im Mausmodell	8
1.3	Von der Inflammation zur Karzinogenese	9
1.3.1	Zellerneuerung im Pankreas	9
1.3.2	Überblick über das PDAC	10
1.3.3	Die Rolle der Pankreatitis bei der PDAC-Entstehung	12
1.4	c-Jun N-terminale Kinase 2	14
1.4.1	Überblick über MAPK	14
1.4.2	JNK-Isoformen und deren Funktion	15
1.4.3	JNK in der Pankreatitis	17
2	Problemstellung	19
3	Material	20
4	Methoden	27
4.1	Versuchsaufbau	28
4.1.1	Versuchstiere	28
4.1.2	Analgesie	28
4.1.3	Induktion der Pankreatitis	28
4.2	Serumanalysen	31
4.3	Histologische Analysen	31
4.3.1	Gewebeprozessierung	31
4.3.2	H&E-Färbung	32
4.3.3	Immunhistochemie	33
4.4	Western Blot	34
4.4.1	Proteinextraktion	34
4.4.2	Proteinkonzentrationsmessung	34
4.4.3	Western Blot	34
4.5	RNA-Microarray	36
4.5.1	RNA-Extraktion	36
4.5.2	Qualitätskontrolle	36
4.5.3	RNA-Microarray und Datenanalyse	37

4.6	Quantitative Real-Time PCR	38
4.6.1	cDNA-Synthese.....	38
4.6.2	Quantitative Real-Time PCR.....	38
4.7	Statistische Analysen	40
5	Ergebnisse	41
5.1	Regeneration des Pankreas nach akuter Pankreatitis in Wildtyp-Mäusen	41
5.1.1	Transformation der Gewebestruktur des Pankreas	41
5.1.2	Identifikation der involvierten molekularen Mechanismen.....	43
5.1.3	Proliferationsreaktion	45
5.2	Einfluss des JNK2-Verlusts auf die pankreatische Regeneration	48
5.2.1	Beurteilung der Histologie des Pankreas in JNK2 ^{-/-} -Tieren nach Induktion einer akuten Pankreatitis	48
5.2.2	Proliferationsreaktion	49
5.2.3	Analyse der Zellzyklusphasen.....	50
5.3	Einfluss des JNK2^{-/-}-Verlusts auf die frühe Phase der akuten Pankreatitis	54
5.3.1	Grad der Inflammation	54
5.3.2	Immunzellreaktion	55
5.3.3	Ausbildung von E-Cadherin, Hsp 27 und Claudin 4	56
5.4	Auswirkung erhöhter Hsp 27-Konzentrationen auf die akute Pankreatitis in WT-Mäusen	60
6	Diskussion	62
6.1	Die Inflammation ist ein Prozess, der in drei klar voneinander abgrenzbaren Phasen verläuft	62
6.1.1	Auf Ebene der Histologie	62
6.1.2	Auf molekularer Ebene	63
6.1.3	Auf Ebene der Proliferation	63
6.2	JNK2-defiziente Mäuse weisen eine verminderte Proliferation und eine Zellzyklusphasenverschiebung im Rahmen des pankreatischen Inflamationsverlaufs auf	65
6.3	Das Ausmaß der Inflammation ist in JNK2-defizienten Mäusen erhöht	67
6.4	Die Reaktion auf Zellstress und die Ausbildung von Zellverbindungen in der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis ist in JNK2^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt ...	69
6.4.1	E-Cadherin	70
6.4.2	Claudin 4.....	71
6.4.3	Hsp 27.....	72
6.5	Erhöhte Hsp 27-Konzentrationen mildern das Ausmaß der akuten Pankreatitis in WT-Mäusen	73
7	Zusammenfassung	75

Literaturverzeichnis

Appendix

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
A	Arteria
ADM	acinar-to-ductal metaplasia
AFL	atypische flache Läsion
AJ	Adberens Junction
al.	alii
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
APS	Ammoniumsulfat
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATF2	activating transcription factor 2
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
BTC	Betacellulin
bzw	beziehungsweise
C	Celsius
CD	cluster of differentiation
Cdh1	E-Cadherin
cDNA	complementary DNA
Cldn4	Claudin 4
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
dl	Deziliter
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FSC	fakultative Stammzellen
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HRP	horseradish peroxidase
Hsp	Heat Shock Protein
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IPMN	Intraduktale Papilläre muzinöse Neoplasie
JIP1	JNK interacting protein 1
JNK	c-Jun NH2-terminal kinases
kDa	Kilodalton
Kras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
MAP-Kinasen	mitogen activated protein kinase
mg	Milligramm
Min	Minute
MKK	MAP-Kinase-Kinasen

Abkürzungsverzeichnis

MKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinasen
MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
MP1	MEK partner 1
mRNA	messenger RNA
N.	Nervus
NaCl 0,9%	Kochsalzlösung
ng	Nanogramm
p38 MAPK	p38 mitogen activated protein kinase
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
Pdx1	pancreatic and duodenal homeobox 1
pH3	phospho-Histon 3
PPIB	Peptidylprolyl Isomerase B
Ptf1a	Pancreas Associated Transcription Factor 1a
RNA	ribonucleic acid, ribonucleic acid
ROI	regions of interest
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
s.	siehe
SD	standard deviation
siRNA	small interfering RNA
SIRS	Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome
TC	Tubulärkomplex
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Th	T-Helferzellen
TJ	Tight Junction
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Unit
u.a.	unter anderem
UPR	adaptive unfolded protein response
V	Vena
v.a.	vor allem
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entstehungs- und Progressionsmodell des pankreatischen duktales Adenokarzinoms	12
Abb. 2: Vereinfachte Darstellung des MAPK-Signalwegs	15
Abb. 3: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Inflammationsverlaufs nach Caerulein-induzierter Pankreatitis in WT-Mäusen	41
Abb. 4: Repräsentative H&E-Färbung des WT-Pankreasgewebes in den verschiedenen Phasen der Regeneration nach Caerulein-Behandlung.....	42
Abb. 5: Gruppierung der Transkriptionsprofile von Wildtyppankreatita nach Induktion einer akuten Pankreatitis	44
Abb. 6: Quantitative Analyse der Proliferation in der akuten Pankreatitis in WT-Mäusen.....	46
Abb. 7: Anzahl der CD45-positiven Zellen im Verlauf der verschiedenen Phasen der akuten Pankreatitis in WT-Mäusen.	47
Abb. 8: Repräsentative H&E-Färbung von JNK2 ^{-/-} - und WT-Pankreasgewebe in den verschiedenen Phasen der Regeneration nach Caerulein-Behandlung.....	49
Abb. 9: Quantitative Analyse der Proliferation in der akuten Pankreatitis von JNK2 ^{-/-} - und WT-Mäusen	50
Abb. 10: Überblick über die eukaryotischen Zellzyklusphasen und deren Markierung durch Antikörper.....	51
Abb. 11: Analyse der Zellzyklusphasen im Inflammationsverlauf von WT- und JNK2 ^{-/-} -Pankreatita.	52
Abb. 12: Verteilung der Zellzyklusphasen in Relation zur Gesamtproliferation im Verlauf der Pankreatitis in JNK2 ^{-/-} - und WT-Mäusen.	53
Abb. 13: Die Ausprägung der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis in WT und JNK2-defizienten Mäusen	55
Abb. 14: Anzahl der CD45-positiven Zellen in einer akuten Pankreatitis von WT- und JNK2 ^{-/-} -Mäusen	56
Abb. 15: Ausprägung von E-Cadherin, Claudin 4 und Hsp 27 in der akuten Pankreatitis von WT- und JNK2 ^{-/-} -Mäusen.	58
Abb. 16: Serumlevel der Pankreasenzyme Amylase und Lipase nach Injektion verschiedener Dosierungen eines rekombinanten Hsp 27 in einer akuten Pankreatitis in WT-Mäusen.	60
Abb. 17: Serumlevel der Pankreasenzyme Amylase und Lipase nach Injektion von rekombinantem Hsp 27 in einer akuten Pankreatitis in WT-Mäusen.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	20
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 3: Reagenzien	22
Tabelle 4: Lösungen.....	23
Tabelle 5: Oligonukleotid-Primer.....	25
Tabelle 6: Antikörper.....	26
Tabelle 7: Kits.....	26
Tabelle 8: Software.....	26
Tabelle 9: Anzahl der zur Untersuchung der akuten Pankreatitis verwendeten Versuchstiere	29
Tabelle 10: Anzahl der zur Untersuchung der Pankreasregeneration verwendeten Wildtypmäuse	30
Tabelle 11: Anzahl der zur Untersuchung der Pankreasregeneration verwendeten JNK2 ^{-/-} -Mäuse.....	30
Tabelle 12: Anzahl der Versuchstiere zur Untersuchung der Auswirkung von rekombinantem Hsp 27 auf die akute Pankreatitis	30
Tabelle 13: Zur Gewebeprozessierung verwendetes Programm des Gewebeinfiltrationsautomaten	32
Tabelle 14: Verwendetes Amplifizierungsschema des LightCycler.....	39

1 Einleitung

1.1 Pankreas - Anatomie und Funktion

Das Pankreas ist ein Organ, das Verdauungsenzyme und Hormone produziert, die vor allem den Blutzuckerhaushalt regulieren. Es besitzt eine Länge von 15 bis 23 cm und befindet sich im Retroperitonealraum auf Höhe des 1. bis 3. Lendenwirbels. Die Einteilung erfolgt in Pankreaskopf, der in der Krümmung des Duodenum liegt, Pankreaskorpus und Pankreasschwanz, der bis an den Milzhilus reicht. Die arterielle Versorgung erfolgt über die Arteria (= A.) pancreaticoduodenalis superior (A. hepatica communis). Der Kopf wird zusätzlich aus der A. pancreaticoduodenalis inferior (A. mesenterica superior) gespeist, Korpus und Schwanz aus den Ästen der A. splenica sowie der quer verlaufenden A. pancreatica transversa. Der venöse Abfluss erfolgt im Kopfbereich über die Vena (= V.) mesenterica superior, in der Korpus- und Schwanzregion über die V. splenica (Reutter, 2004).

Das Drüsengewebe gruppiert sich in Lobi und Lobuli und wird durchzogen von dem Ausführungsgang Ductus pancreaticus (= Ductus Wirsungianus), der gemeinsam mit dem Ductus Choledochus über die Papilla duodeni major (= Papilla Vateri) im Duodenum mündet. Mitunter existiert als weiterer Ausführungsgang der Ductus pancreaticus accessorius (= Ductus Santorini), der über die Papilla duodeni minor meist eine eigene Mündung ins Duodenum aufweist (Bob, 2001).

Das Drüsengewebe besteht aus einem exokrinen und einem endokrinen Kompartiment. Die exokrinen Azinuszellen bilden die stärkespaltende Amylase, fettspaltende Enzyme (Lipase, Cholinesterase, Phospholipase A), proteolytische Enzyme (Trypsinogen, Chymotrypsinogen A und B, Proelastase, Kallikreinogen, Procarboxypeptidase A und B) sowie die nukleolytisch wirksame Ribonuklease und Desoxiribonuklease. Die Sekretion wird über den N. vagus und hormonell über Cholezystokinin, das von Dünndarmzellen ausgeschüttet wird, stimuliert.

Ein Teil dieser Enzyme liegt dabei als inaktives Proenzym (= Zymogen) vor, um eine Selbstverdauung des Pankreas zu verhindern. Vor einer vorzeitigen Aktivierung der Zymogene schützen sich im Gangsystem befindende Trypsininhibitoren. Erst im Duodenum wandelt eine dort produzierte Enteropeptidase Trypsinogen zu Trypsin um, was wiederum zur Aktivierung weiterer Proenzyme führt.

In den Gangepithelien des Pankreas werden Wasser und Elektrolyte sezerniert, so dass durch Bikarbonat der pH-Wert angehoben und so der saure Magensaft im Duodenum neutralisiert werden kann. Die Sekretion wird über Sekretin angeregt, das von Dünndarmzellen

ausgeschüttet wird. Im exokrinen Gewebe verteilt befinden sich verschiedene endokrine Zellen, die sich in sogenannten Langerhans-Inseln gruppieren und Glukagon (A-Zellen), Insulin (B-Zellen), Somatostatin (D-Zellen) und pankreatisches Polypeptid (PP-Zellen) bilden und direkt ins Blut abgeben (Huppelsberg & Walter, 2009).

1.2 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis betrifft weltweit jährlich 33 bis 74 Menschen pro 100.000 Einwohner, mit tendenziell steigender Inzidenz und hoher Morbidität, Hospitalisierungsrate und Mortalität (Greenberg et al., 2016; Xiao et al., 2016). Anhand der Atlanta-Klassifikation werden zwei Verlaufsformen unterschieden: Die interstitiell-ödematöse und die hämorrhagisch-nekrotisierende Form. In ca. 80-85% der Fälle tritt dabei die milde interstitiell-ödematöse Form der Erkrankung ein, die meist mit einem komplikationslosen Verlauf einhergeht. Im Rahmen der hämorrhagisch-nekrotisierenden Form hingegen, die 15-20% der Patienten betrifft (Bradley & Allen, 1991), kommt es zur Ausbildung von Komplikationen wie Fisteln, Abszessen, Nekrosen oder Pseudozysten und einem Anstieg der Mortalität auf ca. 20%. Durch das Auftreten systemischer Reaktionen, wie einer Sepsis bis hin zum Multiorganversagen, kann die Mortalität je nach Ausprägung sogar auf über 40% ansteigen (Perez et al., 2002). Nach Überleben dieser schweren Form kann es durch endokrine und exokrine Pankreasdysfunktionen langfristig zu Bauchmerzen, Diarrhoe, Gewichtsverlust und Diabetes mellitus kommen; die Lebensqualität wird oft als eingeschränkt erlebt (Hochman et al., 2006).

2013 wurde eine Revision der Atlanta-Klassifikation beschlossen, die nun eine neue Einteilung des Schweregrads der akuten Pankreatitis in drei Kategorien vorsieht, basierend auf dem Auftreten lokaler und systemischer Komplikationen sowie dem Vorhandensein und der zeitlichen Dauer von Organversagen (Banks et al., 2013): Die leichte Pankreatitis, die 61% der Fälle ausmacht, die mittelschwere, die zu 30% vorkommt, und die schwere Form der Pankreatitis, die 9% der Erkrankten betrifft (Párniczky et al., 2016).

1.2.1 Ätiologie

In den Industrieländern gilt mit 38% als wichtigster auslösender Faktor für die akute Pankreatitis die Cholelithiasis (Wang et al., 2009). Dabei kommt es durch die Verlegung der Vaterischen Papille zu einem Rückstau von Gallen- und Pankreassekret, was zu einer vorzeitigen Aktivierung von Pankreasenzymen und somit zu Selbstverdauung und der Ausbildung einer Entzündungsreaktion führt (Hazem, 2009). Den zweithäufigsten Auslöser

stellt mit 36% ein übermäßiger Alkoholkonsum dar (Wang et al., 2009), hierbei scheint vor allem der Konsum erheblicher Mengen harten Alkohols das Risiko, eine akute Pankreatitis zu entwickeln, zu erhöhen (Sand et al., 2007). Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen konnten bislang nicht ausreichend geklärt werden. Als weitere mögliche Ursachen treten die Hypertriglyceridämie (v.a. bei Werten über 1000 mg/dl), bestimmte Medikamente wie Azathioprin und Statine, Infektionen (z.B. Coxsackie-Virus, Zytomegalie-Virus, Hepatitis-Viren), Autoimmunerkrankungen, Hyperkalzämie und die iatrogene Genese (z.B. postoperativ, nach Durchführung einer endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikographie = ERCP) in Erscheinung. Auch scheinen genetische Varianten zu existieren, die die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer akuten Pankreatitis begünstigen. Zudem wird diskutiert, inwiefern anatomische Fehlbildungen der Ausführungsgänge oder ein Pankreas divisum mit der Entwicklung einer akuten Pankreatitis assoziiert sind. In einigen Fällen kommt es zur idiopathischen Pankreasentzündung ohne erkennbare Ursache (Garber et al., 2018; Rawla et al., 2017).

1.2.2 Symptome und Diagnostik

Als Leitsymptom der akuten Pankreatitis gilt ein akut eintretender, starker epigastrischer Schmerz, der oftmals gürtelförmig in den Rücken ausstrahlt und auch die Schulter- oder Thoraxregion betreffen kann. Begleitet wird dies häufig von Übelkeit, Erbrechen, Meteorismus, paralytischem (Sub-)Ileus, Fieber und Kreislaufinstabilität. In der klinischen Untersuchung lässt sich ein prall-elastischer Widerstand der Bauchdecke tasten („Gummibauch“), in einigen Fällen kommt es auch zu Aszites oder Ikterus (Gerok, 2007). Selten imponieren subkutane Einblutungen in der Flanken- und Umbilikalregion (Gray-Turner- und Cullen-Zeichen), welche mit einer ungünstigen Prognose einhergehen (Bem & Bradley, 1998).

Mögliche lokale Komplikationen der akuten Pankreatitis stellen Abszesse, Pseudozysten (= nicht von einer regulären Zellwand begrenzte Zysten), Obstruktionen benachbarter Strukturen (z.B. Gallengangs- und Magenausgangsstenose), Fistelbildung, Thrombosen (z.B. Milzvenen- und Pfortaderthrombose) und Hämorrhagien durch Gefäßarrosionen dar (Beger et al., 2013; Holzheimer & Mannick, 2001). Als gefährlichste lokale Komplikation gilt die Pankreasnekrose, da sich diese häufig durch bakterielle Superinfektionen von einer sterilen zu einer infizierten Nekrose wandelt, was mit einem deutlichen Anstieg der Mortalität von 12 auf 30% verbunden ist (Donald et al., 2012).

Bei besonders schweren Verlaufsformen der akuten Pankreatitis kommt es zu systemischen Komplikationen, wie der Entwicklung einer SIRS (= Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome) oder einer Sepsis, sowie zu Verbrauchskoagulopathie, akuter Niereninsuffizienz und ARDS (= Acute Respiratory Distress Syndrome), was letztlich in Multiorganversagen münden kann (Zerem, 2014).

Neben dem klinischen Erscheinungsbild nimmt die laborchemische Untersuchung einen großen Stellenwert in der Diagnostik sowie der Prognoseeinschätzung der akuten Pankreatitis ein. Hierbei lässt sich im Serum ein Anstieg der pankreasspezifischen Amylase und Lipase über das dreifache der oberen Norm sowie eine Leukozytose beobachten. Bei der biliären Pankreatitis können auch die Cholestaseparameter (alkalische Phosphatase, gamma-GT, Bilirubin) ansteigen. Eine Erhöhung des CRP-Werts (= C-reaktives Protein) kann einen Hinweis auf das Vorhandensein von Nekrosen bieten (Gerok, 2007). Als Indikator für einen schweren Verlauf der Erkrankung gelten das Auftreten einer Hypokalziämie sowie eine Erhöhung von Kreatinin, Harnstoff, Nüchtern glukose und Hämatokrit (Chhabra et al., 2016; Muddana et al., 2009; Wu et al., 2011).

Zur Diagnosesicherung, Ursachenforschung, Stadieneinteilung und Früherkennung potentieller Komplikationen kommen bildgebende Verfahren wie die Abdomen- und Endosonographie, die kontrastmittelgestützte Computertomographie und die Magnetresonanztomographie zum Einsatz (Busireddy et al., 2014).

1.2.3 Therapie

Die Behandlung der akuten Pankreatitis beläuft sich zumeist auf die Anwendung supportiver Maßnahmen und Komplikationsmanagement. Eine kausale Therapie steht, mit Ausnahme der Beseitigung auslösender Faktoren (z.B. Steinextraktion bei biliärer Pankreatitis), derzeit nicht zur Verfügung (Janisch & Gardner, 2015).

Aufgrund des potentiell lebensbedrohlichen Verlaufs bedarf jede akute Pankreatitis einer stationären Überwachung, je nach Schweregrad kann eine Verlegung auf die Intensivstation notwendig sein. Zur Prognoseabschätzung existieren verschiedene Scoring-Systeme (z.B. Ranson-Score, APACHE II-Score), anhand derer potentiell schwere und komplikationsreiche Verläufe identifiziert werden sollen, um rechtzeitig geeignete Maßnahmen ergreifen zu können (Cho et al., 2015).

Während früher eine strikte Nahrungskarenz als fester Bestandteil der Therapie der akuten Pankreatitis galt ("nil per os"), wird davon mittlerweile Abstand genommen, um eine

Atrophie der Darmmukosa und ein Ungleichgewicht der bakteriellen Darmbesiedelung und so mögliche Infektionen zu vermeiden (Janisch & Gardner, 2015). Während es bei einer leichten Pankreatitis ausreichend sein kann, durch den Verzicht auf fetthaltige Nahrung eine weitere Reizung des Pankreas durch Steigerung der Pankreassaftsekretion zu vermeiden, kann bei schwereren Verläufen die Anlage einer nasogastralen Sonde oder einer Jejunalsonde erforderlich werden. Sollte eine parenterale Ernährung unumgänglich sein, wird die zusätzliche Aufnahme einer geringen Nahrungsmenge über den enteralen Weg empfohlen, da sich dies positiv auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt (Pan et al., 2017).

Weiterhin nimmt eine frühzeitige ausgiebige Flüssigkeitssubstitution eine wichtige Rolle in der Therapie der akuten Pankreatitis ein. Im Rahmen der entzündlichen Prozesse erhöht sich die Kapillarpermeabilität, was eine vermehrte peripankreatische und retroperitoneale Sequestration zur Folge hat und zur Ausbildung einer Hypovolämie führt (Aggarwal et al., 2014). Eine großzügige Flüssigkeitssubstitution bereits im frühen Krankheitsverlauf führt zu einem reduzierten Auftreten lokaler und systemischer Komplikationen (Warndorf et al., 2011).

Einen weiteren Pfeiler der Therapie dieser schmerzhaften Erkrankung stellt eine suffiziente Analgesie dar. Hier können Nicht-Opiod-Basisanalgetika (z.B. Novaminsulfon) mit Opioiden kombiniert werden. Sollten über einen längeren Zeitraum hohe Dosen an Opioiden benötigt werden, kann auch eine Periduralanalgesie in Betracht gezogen werden (Stigliano et al., 2017).

Gegenstand vieler Diskussionen ist die Frage der Anwendung einer prophylaktischen antibiotischen Therapie, um eine Superinfektion bestehender Nekrosen zu verhindern (Mourad et al., 2017). Aktuell wird dies eher kritisch betrachtet, stattdessen soll eine kalkulierte antibiotische Therapie bei Nachweis einer bakteriellen Infektion begonnen werden (Dellinger et al., 2007).

Invasive Eingriffe werden aufgrund des Risikos einer erhöhten postoperativen Morbidität und Mortalität zurückhaltend angewendet, kommen aber bei bestimmten Komplikationen wie infizierten Pankreasnekrosen, Abszessen, symptomatischen Pankreasfisteln und Pseudozysten zum Einsatz (Zerem, 2014). Bevorzugt finden hier möglichst minimalinvasive Maßnahmen (z.B. perkutane Drainagen bei infizierten Nekrosen) aus dem Gebiet der interventionellen Radiologie und Endoskopie sowie laparoskopische Eingriffe Anwendung (Navadgi et al., 2015). Bei einer biliären Pankreatitis mit nachgewiesener Choledocholithiasis und Cholangitis wird die baldige Durchführung einer ERCP empfohlen, im Verlauf sollte eine Cholezystektomie stattfinden (Tse & Yuan, 2012).

1.2.4 Pathophysiologie

Die exakten pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entstehung einer akuten Pankreatitis führen, sind noch nicht vollständig bekannt. Es existieren verschiedene Erklärungsansätze, die jedoch meist nur spezifische Teilaspekte betrachten und erklären können (Wang et al., 2009). Eine dieser Theorien bezieht sich auf die Selbstverdauung des Pankreas und wurde von Hans Chiari bereits Ende des 19. Jahrhunderts entwickelt (Chiari, 1896).

Als allgemein anerkannt gilt, dass ein Schlüsselereignis bei der Entstehung der akuten Pankreatitis die vorzeitige intraaziniäre Trypsinogen-Aktivierung darstellt, was zur einer kaskadenartigen Aktivierung weiterer Proenzyme und schließlich zu Autodigestion, Azinuszellschaden und einer zunächst lokalen Entzündungsreaktion führt. Dies geschieht, wenn protektive Mechanismen (z.B. Trypsininhibitoren, niedrige intrazelluläre Kalziumspiegel) versagen, die normalerweise die vorzeitige Trypsin-Aktivierung unterbinden oder dessen Aktivität senken (Wang et al., 2009).

Als weiterer zentraler Vorgang gilt die in der akuten Pankreatitis beobachtbare exzessive Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum. Denn während ein physiologischer Kalziumanstieg eine Sekretion der Verdauungsenzyme auslöst (Petersen & Tepikin, 2008), führen sehr hohe und anhaltende intrazelluläre Kalziumkonzentrationen zu einer intrazellulären Trypsinaktivierung (Petersen et al., 2011).

Bereits früh in der akuten Pankreatitis werden im Pankreasgewebe zahlreiche proinflammatorische Entzündungsmediatoren produziert (z.B. IL-6, IL-8, TNF- α) (Makhija & Kingsnorth, 2002). Daraufhin werden Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten aktiviert und durch Chemotaxis angezogen, was eine weitere Gewebeschädigung und die Verstärkung der Inflammation durch zusätzliche Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zur Folge hat. Es kommt zu einer Aktivierung der vaskulären Endothelien und einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was zu einer gesteigerten Transmigration von Entzündungszellen durch die Gefäßwand und Ödembildung führt. Daneben entstehen Sauerstoffradikale, die einen weiteren Gewebeschaden hervorrufen und ebenfalls zur Freisetzung vasoaktiver Mediatoren beitragen (z.B. Stickstoffmonoxid, Plättchenaktivierender Faktor, Endothelin) (Rau et al., 2000). Im Rahmen des Inflammationsgeschehens wird zudem die Koagulationsneigung erhöht (Dumnicka et al., 2017). Die entstehende Mikrozirkulationsstörung führt zur Begünstigung von Nekrosen (Frossard et al., 2008).

Andere Publikationen konnten u.a. zeigen, dass die intrazelluläre Trypsinaktivierung eine frühe lokale Azinuszellschädigung auslöst, aber nicht essentiell ist für die darauf folgende Inflamationsreaktion (Dawra et al., 2011; Ji et al., 2009).

Es wurden weitere pathophysiologische Mechanismen identifiziert, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung der akuten Pankreatitis einnehmen. Hierzu zählt die Beeinträchtigung der Autophagie, die bereits sehr früh in der akuten Pankreatitis festgestellt werden kann und vor allem durch eine lysosomale Dysfunktion gekennzeichnet ist (Gukovskaya & Gukovsky, 2012). So scheint die Akkumulation von Vakuolen in Azinuszellen, wie sie bei der akuten Pankreatitis beobachtbar ist, Zeichen eines Defekts dieses Prozesses darzustellen (Mareninova et al., 2009). Die Autophagie stellt physiologischerweise einen Mechanismus dar, durch den beschädigte Zellbestandteile abgebaut und die einzelnen Bestandteile zur Wiederverwertung bereit gestellt werden. Eine Dysfunktion führt unter anderem zu einer Ansammlung beschädigter Mitochondrien, was wiederum zu einer Überproduktion von ROS (= reactive oxygen species) und zu apoptotischem oder nekrotischem Zelltod führt. Die entstehenden ROS bewirken einen Gewebeschaden und eine verstärkte Inflamationsreaktion und tragen so weiter zur Aufrechterhaltung und Aggravation der Pankreatitis bei (Green et al., 2011). Interessanterweise kann eine Beeinträchtigung der Autophagie auch eine vermehrte Ansammlung aktivierten Trypsins in Azinuszellen bedingen (Mareninova et al., 2009).

Weiterhin rückte die Rolle des endoplasmatischen Retikulums (= ER) bei der Pathogenese der akuten Pankreatitis in den Fokus der Forschung. Das ER ist unter anderem verantwortlich für die korrekte Faltung und Prozessierung von Proteinen. Da Azinuszellen auf die Synthese von Verdauungsenzymen spezialisiert sind und die höchste Proteinsyntheserate im menschlichen Gewebe aufweisen, ist ein möglichst reibungsfreier Ablauf dieses Prozesses von besonderer Bedeutung (Case, 1978). Kommt es durch ER-Stress zur Ansammlung fehl- und ungefalteter Proteine, wird das UPR (= unfolded protein response) aktiviert. Das UPR passt unter anderem die Menge der zu prozessierenden Proteine an die gegenwärtige ER-Kapazität an, um das System zu entlasten und weiteren Stress zu verhindern, fördert die Chaperon-Bildung und unterstützt den Abbau der fehl- und ungefalteten Proteine, die potentiell zellschädigend wirken. Greifen diese Mechanismen nicht ausreichend, kann das UPR Zelltodprogramme aktivieren (Mori, 2000). Beeinträchtigungen in der UPR führen zu weiterem ER-Stress, was einen Anstieg von ROS, dysfunktionaler Autophagie, gesteigerter Inflammation und Störungen des Kalziumhaushaltes zur Folge hat. In der akuten Pankreatitis führt eine Dysfunktion des UPR zu lokalem Gewebeschaden und einer Inflamationsreaktion (Barrera et al., 2018). Es ist Gegenstand der aktuellen

Forschung, inwiefern dies ein sehr frühes und möglicherweise initiales Ereignis bei der Entstehung der Erkrankung darstellt.

Im Verlauf der Pankreatitis erfolgt die Formation sogenannter azinär zu duktalem Metaplasien (= acinar-to-ductal metaplasia = ADM). Dies sind Strukturen, die histologisch ein gangähnliches Erscheinungsbild mit Tubulärkomplexen (= TC) aufweisen und eine wichtige Rolle bei der Regeneration nach entzündlichem Gewebeschaden einnehmen (Murtaugh & Keefe, 2015). Trotz der duktalem Morphologie entstammen diese Läsionen exokrinem Gewebe. Es handelt sich dabei um dedifferenzierte Azinuszellen, die durch eine verminderte Ausprägung azinuszellspezifischer Gene (z.B. Verdauungsenzyme) und eine vermehrte Expression gangspezifischer Marker (z.B. Zytokeratin 19) gekennzeichnet sind (Morris et al., 2010b; Zhong et al., 2004). Dies geht einher mit der vorübergehenden Reaktivierung diverser Transkriptionsfaktoren und Signalwege, die auch bei der embryonalen Entwicklung des Pankreas eine Rolle spielen (wie Notch, Wnt/ β -Catenin, Sox9, Pdx1) (Jensen et al., 2005; Morris et al., 2010b; Furuyama et al., 2011; Gu et al., 2002). Dieser Vorgang der Dedifferenzierung ist vorübergehend und ermöglicht Azinuszellen über den Erwerb von Vorläuferzellen-ähnlichen Fähigkeiten eine schnelle Repopulation des exokrinen Kompartiments nach entzündlicher Schädigung, bevor eine Umwandlung zurück zu differenzierten Azinuszellen erfolgt. Die gleichen Zellen bilden auch jenen Zellpool, der sich onkogenen Transformationen gegenüber suszeptibel zeigt (Morris et al., 2010b).

An dem komplexen Prozess der Regeneration sind noch weitere Zellarten und –kompartimente beteiligt, z.B. modulieren aktivierte Sternzellen den Gewebeumbau und Makrophagen fördern über TNF- α die Bildung der ADM (Liou et al., 2013; Zimmermann et al., 2002). Im Verlauf kommt es schließlich zur Redifferenzierung der Zellen mit einer Wiederaufnahme des azinären Programms (Reid & Walker, 1999).

1.2.5 Akute Pankreatitis im Mausmodell

Die Erforschung der humanen Pankreatitis *in vivo* gestaltet sich als Herausforderung, was unter anderem durch den eingeschränkten Zugang zu erkranktem Gewebe bedingt ist. Um eine Untersuchung der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis zu ermöglichen, wurden verschiedene experimentelle Tiermodelle entwickelt. Hierzu zählt unter anderem die Auslösung der Entzündung über Arginin, die Ligation des Ausführungsgangs oder die Injektion von Gallenflüssigkeit. Ein gut etabliertes und weit verbreitetes Modell stellt die Caerulein-induzierte Pankreatitis dar. Die Pankreatitis entsteht hierbei über die supramaximale Stimulation mit Caerulein, das der Haut der australischen Froschart "Litorea

caerulea” entstammt (Lerch & Gorelick, 2013). Das Modell wurde in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts an Ratten etabliert, bevor es auch auf Mäuse angepasst wurde (Lampel & Kern, 1977). Caerulein weist große strukturelle Ähnlichkeiten zum Peptidhormon Cholezystokinin auf, das von enteroendokrinen Zellen ausgeschüttet wird, um Azinuszellen zur Sekretion von Verdauungsenzymen zu stimulieren. Im experimentellen Aufbau in einer unphysiologisch hohen Dosierung injiziert, bewirkt Caerulein Veränderungen, die denen einer humanen akuten Pankreatitis ähneln. Es kommt zu einer Zerstörung des Zytoskeletts, was die Enzymsekretion behindert und zu einer intrazellulären Trypsin-Aktivierung führt (Adler et al., 1982). Im Rahmen des darauf folgenden Entzündungsprozesses lassen sich Ödembildung, Leukozyteninfiltration, Vakuolisierung, verstärkte lysosomale Aktivität und die Bildung von ADM und Zelltod beobachten. Im Serum kann eine Erhöhung der Amylase und Lipase nachgewiesen werden (Lerch & Gorelick, 2013; Murtaugh & Keefe, 2015).

Aufgrund der vorhandenen pathophysiologischen Ähnlichkeiten zwischen der humanen Pankreatitis und der durch Caerulein in Mäusen ausgelösten Entzündungsreaktion kann die Arbeit an diesem Tiermodell eine Annäherung an die realen Gegebenheiten des menschlichen Organismus vermitteln.

1.3 Von der Inflammation zur Karzinogenese

1.3.1 Zellerneuerung im Pankreas

Welche Zellart im Pankreas den Ursprung für die Geweberegeneration darstellt, konnte bisher noch nicht genau definiert werden. Es ist bekannt, dass bei der Zellerneuerung in Leber und Magen transdifferenzierende Knochenmarkszellen involviert sind (Krause et al., 2001; Theise et al., 2000). Bezüglich der Relevanz dieser Zellen im Pankreas existieren widersprüchliche Studien. Während beobachtet werden konnte, dass durch transplantiertes Knochenmark Insulin-exprimierende Zellen gebildet werden (Janus et al., 2003), konnte nicht bestätigt werden, dass Knochenmarkszellen eine signifikante Rolle bei der erwachsenen B-Zell-Erneuerung einnehmen (Lechner et al., 2004).

In Organen mit einem hohen Zellumsatz, wie dem Darm und dem hämatopoetischen System, scheinen klassische Stammzellen, die die Fähigkeit zur Ausbildung verschiedener Zelllinien inne haben, zu existieren (Barker et al., 2007; Wilson et al., 2008). Unter *in vitro*-Bedingungen konnten auch im Pankreas Nestin-positive Zellen expandiert werden, die sowohl Zellen mit exokrinen als auch Zellen mit endokrinen Markern hervorbringen (Seaberg et al., 2004; Smukler et al., 2011; Zulewski et al., 2001). Noch ist unklar, ob diese Stammzellen auch *in vivo* sämtliche pankreatische Zelllinien erneuern können, oder ob es sich hierbei um

unter Zellkulturbedingungen erworbene Fähigkeiten mit ausbleibender biologischer Relevanz handelt. Zudem gibt es Hinweise, die dagegensprechen, dass klassische Stammzellen bei der Zellerneuerung im adulten Pankreas eine signifikante Rolle einnehmen. So konnte nachgewiesen werden, dass sich in Gangstrukturen befindende Sox9-positive Zellen kontinuierlich zur Erneuerung exokriner Zellen im erwachsenen Pankreas beitragen, nicht jedoch zu der von endokrinen Zellen (Furuyama et al., 2011). Dies deutet auf das Vorhandensein exokrin-spezifischer Progenitorzellen hin. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine vollständige Deletion der Pdx1 (= pancreatic and duodenal homeobox 1) - positiven Vorläuferzellen zur Entwicklung apankreatischer Mäuse führt (Offield et al., 1996). Der Transkriptionsfaktor Ptf1 α (= Pancreas Associated Transcription Factor 1a) ist ebenfalls essentiell für die Entwicklung des exokrinen Pankreas (Krapp et al., 1998; Kawaguchi et al., 2002). Das Pankreas entwickelt sich aus Vorläuferzellen, welche Pdx1 und Ptf1 α exprimieren. Die Ablation eines Großteils der Pdx1-Zellen während der Embryogenese der Maus bewirkt zudem eine Reduktion der Größe des Pankreas bei Geburt, die sich auch im weiteren Verlauf nicht mehr erholt (Stanger et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass der Regenerationsprozess nicht durch klassische pankreatische Stammzellen vermittelt wird.

Eine weitere Zellpopulation, die zur Erneuerung bestimmter Zelllinien beitragen kann, sind reife Epithelzellen. So konnte durch Lineage-Tracing-Experimente mehrfach nachgewiesen werden, dass neue β - und Azinuszellen im Mauspankreas durch die jeweils bereits bestehenden reifen Epithelzellen gebildet werden und so das jeweilige Kompartiment wieder regeneriert werden kann (Desai et al., 2007; Dor et al., 2004; Fendrich et al., 2008; Strobel et al., 2007). Im Laufe dieses Prozesses reduziert sich die Ausprägung von Azinuszellmarkern, stattdessen werden vermehrt Faktoren reaktiviert, die auch während der Pankreasentwicklung exprimiert werden (Jensen et al., 2005). Dies führte zur Entwicklung der Theorie, dass im erwachsenen Pankreas sogenannte fakultative Stammzellen (FSC) existieren, die eine gewisse Progenitor-Kapazität beibehalten und bei Bedarf aktiviert werden, um sich zu teilen und die jeweilige Zelllinie zu erneuern (Yanger & Stanger, 2011). Die Mechanismen, die dazu führen, sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

1.3.2 Überblick über das PDAC

Das Pankreaskarzinom ist eine äußerst aggressive Erkrankung und stellt in Deutschland wie in den USA die vierthäufigste Krebstodesursache dar. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 9% bildet es die Krebsentität mit der schlechtesten Prognose, die sich trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert hat (Siegel et al., 2019; Robert-Koch-Institut, 2017). Mehr als 90% aller Pankreaskarzinome stellen duktale Adenokarzinome (=

PDAC) des exokrinen Kompartiments dar (Adamska et al., 2017). Die Erkrankung schreitet rasch lokal fort und metastasiert früh. Die Diagnose des PDAC erfolgt aufgrund fehlender Frühsymptome und kaum existierender Möglichkeiten zur Früherkennung meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium (Gudjonsson, 1987), so dass eine chirurgische Resektion im Gesunden - die als einzige potentiell kurative Behandlung gilt - nur selten durchgeführt werden kann (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013). Das Langzeitüberleben liegt auch nach kurativer Resektion bei unter 20%, da es häufig zu Rezidiven kommt (Wagner et al., 2004). Zu den berichteten Symptomen zählen, abhängig von Größe und Lokalisation des Tumors, ein schmerzloser Ikterus (Townsend, 2012), Stuhlfärbung, Dunkelfärbung des Urins und Juckreiz (Zhang et al., 2016) sowie gürtelförmig in den Rücken ausstrahlende Schmerzen (Townsend, 2012) und Gewichtsverlust (Nemer et al., 2017). Generell kann es zu unspezifischen gastrointestinalen Beschwerden kommen wie Appetitverlust, Aufstoßen, Dysphagie, Übelkeit, veränderte Stuhlgewohnheiten und Blähungen (Holly et al., 2004; Keane et al., 2014). Auch ein neu aufgetretener Diabetes kann einen Hinweis auf PDAC liefern (Magruder et al., 2011). Des Weiteren werden Fälle von Fatigue berichtet (Olson et al., 2016).

Es werden verschiedene Faktoren, die die Entstehung von PDAC begünstigen können, diskutiert. Hierzu zählen Nikotinkonsum (Coughlin et al., 2000; Silverman et al., 1994), Adipositas (Arslan et al., 2010; Michaud et al., 2001; Patel et al., 2005), Diabetes mellitus und exzessiver Alkoholkonsum (Silverman, 2001; Ye et al., 2002). Als wichtiger Risikofaktor gilt die chronische Pankreatitis (Bansal & Sonnenberg, 1995; Lowenfels et al., 1993; Malka et al., 2002), hier liegt ein 10- bis 20-fach höheres Risiko vor, an PDAC zu erkranken. Bei Vorliegen einer hereditären Pankreatitis steigt die Auftrittswahrscheinlichkeit sogar auf 30 – 40% (Lowenfels & Maisonneuve, 2004).

Als zentraler Faktor bei der Entstehung des PDAC gilt das Auftreten genetischer Veränderungen diverser Onkogene und Tumorsuppressorgene. So werden in nahezu allen PDAC onkogene Kras-Mutationen aufgefunden und stellen dabei das initiiierende genetische Ereignis der Karzinogenese dar (Kanda et al., 2012). Im Rahmen einer Adenom-Karzinomsequenz schreitet der Tumor über die schrittweise Anhäufung weiterer genetischer Events voran, wobei hier v.a. Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p16, SMAD4 und p53 zu nennen sind, und entwickelt sich über nicht-invasive Vorläuferläsionen wie pankreatische intraepitheliale Neoplasien (= PanIN), intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien (= IPMN), muzinös-zystische Neoplasien (= MCN) und atypische flache Läsionen (= AFL) zu einem malignen PDAC (Iacobuzio-Donahue et al., 2012; von Figura et al., 2017; Singhi & Maitra, 2018) (s. **Abb. 1**). Welche Zellpopulation dabei als Ursprung dient, ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Als vorherrschende Meinung gilt, dass sich das

PDAC aus ADM, also transdifferenzierten Azinuszellen, entwickelt (Guerra et al., 2007; Habbe et al., 2008).

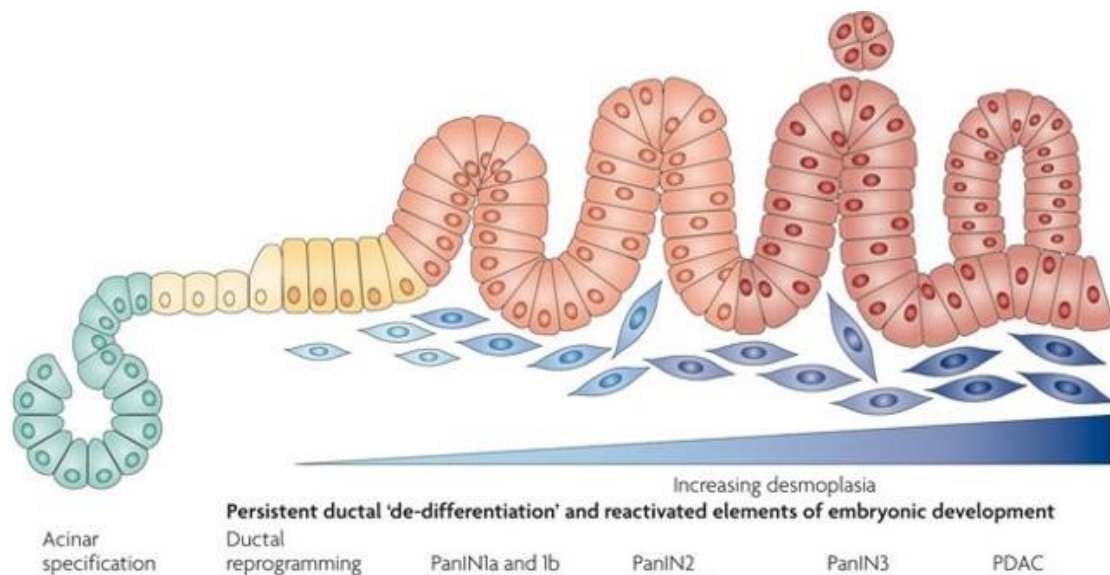


Abb. 1: Entstehungs- und Progressionsmodell des pankreatischen duktales Adenokarzinoms (= PDAC) (aus Morris et al., 2010a). Die Anhäufung genetischer Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (z.B. onkogene Kras-Mutationen) führt in pankreatischen Zellen (z.B. Azinuszellen) zu zunehmender Dedifferenzierung und der Ausbildung einer duktales Morphologie, wodurch sich im Verlauf über die Formation non-invasiver Vorläuferläsionen (z.B. pankreatische intraepitheliale Neoplasien = PanIN) maligne PDAC herausbilden können.

Es existieren verschiedene Theorien darüber, welche Zellart den Ursprung des PDAC bietet (Bo Kong et al., 2011; Strobel et al., 2007; Yanger & Stanger, 2011). Obgleich PDAC eine duktales Morphologie präsentiert, konnte nicht bewiesen werden, dass die Veränderungen auch tatsächlich duktales Ursprungs sind. Mehr noch, durch Verfolgung des duktales Kompartiments konnte mit Ausnahme vereinzelter PanIN-ähnlicher Strukturen keine PDAC-Entwicklung beobachtet werden (Ray et al., 2011; Xu et al., 2019). Im Gegensatz dazu scheinen exokrin-spezifische Vorläuferzellen sowie reife Azinus- und Insulin-produzierende Zellen zuverlässig zur Bildung von PanINs beizutragen (Kopp et al., 2012; Maitra & Leach, 2012).

1.3.3 Die Rolle der Pankreatitis bei der PDAC-Entstehung

Wird im Mausmodell während der Embryogenese das onkogene Kras in Pankreasepithelzellen aktiviert, bilden sich präneoplastische Läsionen, die sich im Verlauf in ca. einem Drittel der Fälle zu Karzinomen entwickeln (Hingorani et al., 2003, 2005). Lineage-Tracing-Experimente haben gezeigt, dass eine onkogene Kras-Aktivierung allein in reifen Azinuszellen nicht ausreicht, um ein PDAC auszulösen (Friedlander et al., 2009; Guerra et al.,

2007; Morris et al., 2010b). In Gegenwart eines entzündlichen Umfelds jedoch zeigen sich Azinuszellen auch im erwachsenen Pankreas im Mausmodell wieder empfänglich für onkogene Kras-Transformationen (Guerra et al., 2007), und auch Insulin-positive Zellen bilden im Rahmen einer chronischen Entzündung PDAC-Vorläuferstrukturen aus (Gidekel Friedlander et al., 2009). Zudem wird das Risiko für humane PDAC-Entstehung deutlich begünstigt durch Pankreatitiden (Lowenfels et al., 1993).

Diese Zusammenhänge zwischen Inflammation und Karzinogenese legen die Vermutung nahe, dass in einem entzündlichen Umfeld eine Zellart aktiviert wird, die für onkogene Transformationen empfänglich ist (Maniati et al., 2011; Morris et al., 2010b; Siveke et al., 2008). Deren Identifizierung gestaltet sich schwierig, da die genauen Mechanismen des Gewebeumsatzes und der Regeneration im adulten Pankreas noch nicht charakterisiert werden konnten.

Die Zellen, die die Zellerneuerung im Pankreas übernehmen, besitzen über ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung eine Parallele zu Karzinomzellen. Dies steht sowohl bei der Pankreatitis als auch bei der Karzinogenese in Zusammenhang mit einem Zustand der Dedifferenzierung verschiedener Zellen, die mit einer erhöhten Vulnerabilität für onkogene Stimuli einhergeht (Kopp et al., 2012; Stanger & Hebrok, 2013; Zhou & Melton, 2018). Durch die Reaktivierung embryonischer Transkriptionsprogramme (Beck & Blanpain, 2013) werden stammzellähnliche Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Differenzierung und Resistenz gegenüber Apoptose erworben (Aguilar-Medina et al., 2019; Jensen et al., 2005; Reya et al., 2001). So kann im PDAC z.B. eine Heraufregulation von SOX9 und Pdx1 nachgewiesen werden (Koizumi et al., 2003; Shroff et al., 2014). Eine intakte Regulation dieser embryonischen Signalwege während der Regeneration ist von großer Bedeutung, eine aberrante Aktivierung kann das Entartungspotential steigern. So reicht eine dauerhafte Aktivierung von Pdx1 aus, um Metaplasien im exokrinen Kompartiment des Mauspankreas auszulösen (Miyatsuka et al., 2006).

Einen weiteren Zusammenhang zwischen Pankreatitis und PDAC-Entstehung könnte darstellen, dass die Anhäufung von ROS, wie sie bei der Inflammation zu finden ist, eine genomische Instabilität bewirkt (Stanger & Hebrok, 2013). Des Weiteren wird der zur Geweberegeneration benötigte erhöhte Zellumsatz durch Signale reguliert, die auch die Hyperproliferation bereits entarteter Zellen begünstigen (Stanger & Hebrok, 2013).

Die enge Verbindung zwischen der Regeneration nach Gewebeschädigung und der Karzinogenese veranlasste Dvorak zu der Aussage "Krebs ist eine Wunde, die niemals heilt" (Dvorak, 1986).

1.4 c-Jun N-terminale Kinase 2

1.4.1 Überblick über MAPK

JNK (= c-Jun NH₂-terminal kinases = stress-activated protein kinases = SAPKS) bilden gemeinsam mit ERK (= extracellular signal-regulated kinases) und der p38 MAPK (= p38 mitogen activated protein kinase) die wichtigsten Vertreter der Familie der MAP-Kinasen (= mitogen activated protein kinase). Angeregt durch zahlreiche Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Zellstress, erfolgt deren Aktivierung über eine Kinasenkaskade (Cargnello & Roux, 2011). Hierbei werden die MAPK an Threonin- und Tyrosin-Enden durch vorgeschaltete MKK (= MAP-Kinase-Kinasen) phosphoryliert und diese wiederum durch MKKK (= MAP-Kinase-Kinase-Kinasen), wozu z.B. MEKK (= mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1), MLK (= mixed lineage kinase) und Raf (= rapidly accelerated fibrosarcoma) zählen. Deren Aktivierung wird mediiert via Phosphorylierung oder durch Interaktion mit GTPasen der Ras/Rho-Familie, die zu den GTP-bindenden Proteinen zählen (Hall, 2005) (s. **Abb. 2**). Dieser komplexe Aktivierungsweg ermöglicht sehr spezifische Reaktionen auf unterschiedliche Stimuli. Hinzu kommt eine zusätzliche Regulierungsmöglichkeit über sogenannte „Scaffold-Proteine“ wie JIP1 (= JNK interacting protein 1) und MP1 (= MEK partner 1). Diese Vermittlerproteine beeinflussen die Enzym-Substrat-Affinität und erleichtern deren Komplexbildung, so dass hierdurch eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Spezifität und Feinabstimmung gegeben ist (Whitmarsh et al., 1998). Nach der Aktivierung phosphorylieren die MAPK verschiedene nachgeschaltete Substrate, darunter weitere Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und genregulatorische Proteine, und nehmen so Einfluss auf Prozesse wie die Embryogenese, die Zellteilung, den Zelltod und das Inflammationsgeschehen (Chang & Karin, 2001).

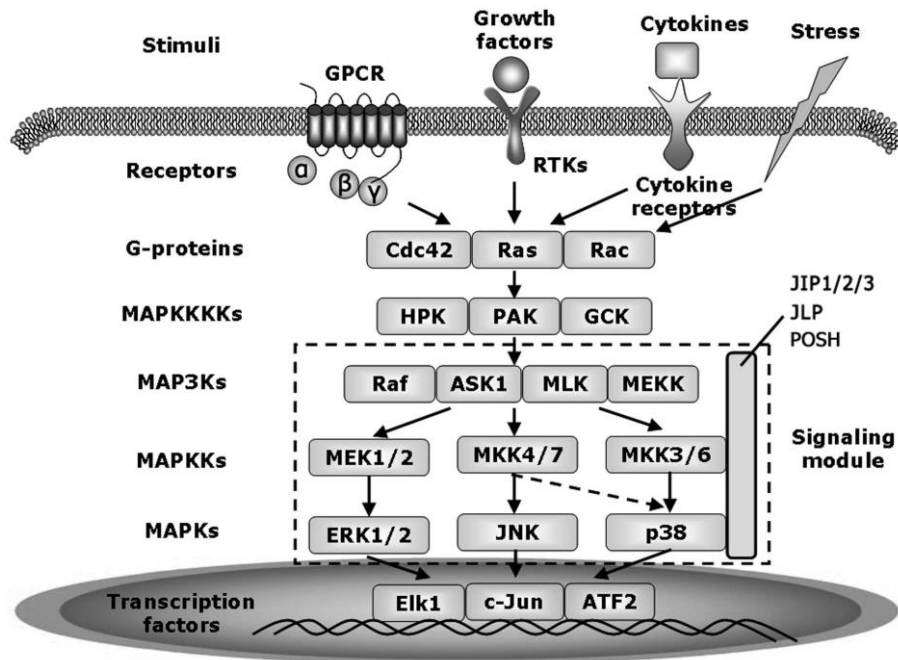


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung des MAPK-Signalwegs (aus Zhao et al., 2015). Die MAPK-Familie, zu der vornehmlich die JNK, ERK, und p38-Kinase zählen, wird durch Reize wie Stress, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert. Dies führt zu einer Rezeptorbindung, die eine Aktivierung von GTP-bindenden Proteinen bewirkt. Daraufhin wird eine Proteinkinaskaskade ausgelöst, wobei die Kinasen über Phosphorylierung die jeweils nächste Kinasenstufe aktivieren. Scaffold Proteine vermitteln die Komplexbildung. Die aktivierten MAPK phosphorylieren im Zellkern Transkriptionsfaktoren wie Elk1, c-Jun oder ATF2.

1.4.2 JNK-Isoformen und deren Funktion

JNK werden durch Zellstress (z.B. UV-Strahlung, Noxen, Hitze) und inflammatorische Zytokine stimuliert, weswegen sie auch als „Stress aktivierte Kinasen“ bezeichnet werden. Nach deren Aktivierung, die über membranständige Rezeptoren oder direkt im Zytosol erfolgt, phosphorylieren sie unter anderem sich im Zellkern befindende Transkriptionsfaktoren, wodurch sie Einfluss auf diverse physiologische Prozesse wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Zelltod und Zellmetabolismus nehmen (Davis, 1994). Hierzu zählt der Transkriptionsfaktor c-Jun, was zur Bezeichnung „c-Jun N-terminale Kinasen“ führte. Weitere der zahlreichen nuklearen Substrate stellen beispielsweise JunD, ATF2, Elk1 und c-Myc dar. Zu den zytosolischen Substraten lassen sich Proteine zählen, die beim Spleißen von mRNA, im Proteinabbau (z.B. E3-Ligasen), der Apoptose (z.B. Mitglieder der Bcl2-Familie) und der Zellmigration (z.B. Paxillin, Mikrotubuli-assoziierte Proteine) involviert sind (Bogoyevitch & Kobe, 2006). Des Weiteren beeinflussen sie Elemente des Zytoskeletts, intrazelluläre Transportproteine und Zelladhäsionsproteine (Zeke et al., 2016).

Kodiert werden die JNK von den drei Genen JNK1, 2 und 3. Durch alternatives Spleißen der JNK-Transkripte entstehen zehn Isoformen, die sich anhand der COOH-Termini unterscheiden und sich in 46-kDa- und 54-kDa-Varianten aufteilen. Die verschiedenen Isoformen werden durch unterschiedliche Faktoren aktiviert und phosphorylieren

verschiedene Substrate, so dass spezifische Antworten generiert werden können (Gupta et al., 1996). Während JNK 1 und 2 ubiquitär exprimiert werden, findet sich JNK3 vor allem in Herz-, Nerven- und Hodenzellen (Davis, 2000) sowie pankreatischen β -Zellen (Abdelli et al., 2009). JNK3 wurde vor allem im Hinblick auf die Rolle in neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen untersucht (Antoniou et al., 2011).

Zu Beginn der Erforschung von JNK1 und 2 wurde davon ausgegangen, dass sich die beiden Kinasen ergänzend zueinander verhalten. Mittlerweile ist anerkannt, dass sich JNK1 und JNK2 in ihren Funktionen unterscheiden. Tatsächlich scheint ein gewisses Potential zur gegenseitigen Kompensation vorhanden zu sein, so dass die Deletion je eines der beiden Gene lebensfähige Versuchstiere hervorbringt; JNK1- und JNK2-Doppelknockout-Tiere aufgrund von Neuralrohrdefekten hingegen bereits in der frühen Embryogenese versterben (Yamasaki et al., 2012). JNK1^{-/-}-Mäuse weisen Abweichungen bei der Gehirnentwicklung und Störungen der metabolische Regulation auf, wie eine erhöhte Resistenz gegenüber Adipositas und damit in Verbindung stehenden metabolischen Veränderungen (Tuncman et al., 2006). Eine Deletion von JNK2 hat Störungen der Differenzierung von CD4⁺-Zellen zu Th1-Zellen zur Folge, da hierbei die für diesen Vorgang benötigte Produktion von IFN- γ beeinträchtigt ist (Yang et al., 1998). Das Immunsystem stellt generell einen Bereich dar, in dem die JNK wichtige Funktionen ausüben, so dass gewisse Erreger wie z.B. Salmonellen sogar diesen Signalweg nutzen, um die Immunreaktion zu ihren Gunsten zu beeinflussen (Mazurkiewicz et al., 2008). JNK werden u.a. durch Lipopolysaccharide und inflammatorische Zytokine wie TNF- α und Interleukin-1 aktiviert (Kyriakis et al., 1994). Sie regulieren die Genexpression in Makrophagen und werden benötigt für die Induktion von T-Zell-Zytokinen (Dong et al., 2000; Han et al., 2013). Die Deletion von JNK1 führt zu einer geringeren Proliferation von CD8⁺-Zellen als Reaktion auf Viruspartikel im Vergleich zum Wildtyp, während sie in JNK2^{-/-}-Mäusen zunimmt (Karin & Gallagher, 2005).

In JNK2^{-/-}-Fibroblasten konnte *in vitro* eine Anhäufung mitochondrialer ROS festgestellt werden, was für die Ansammlung beschädigter Mitochondrien spricht. Auch *in vivo* wurde in JNK2-defizienten Mäusen eine Akkumulation dieser nachgewiesen werden in Verbindung mit einer erhöhten Sterblichkeit im Falle des Auftretens einer Sepsis. Zudem konnte gezeigt werden, dass die TNF α -induzierte NF- κ B-Aktivierung in WT-Zellen durch JNK-Inhibierung gesteigert und somit die Inflammationsreaktion verstärkt wird. Auch hier gibt es Hinweise, dass dies durch erhöhte endosomale ROS-Produktion geschieht (Choi et al., 2015). Somit scheint JNK2 durch Promotion der Mitophagie, also der Autophagie von beschädigten Mitochondrien, protektiv zu wirken (Zhang et al., 2015).

Einen weiteren Aufgabenbereich von JNK stellt die Regulation der Proliferation und des Zelltods dar (Ryoo et al., 2004; Zhang & Liu, 2002). Nach einer Gewebeschädigung müssen sowohl beschädigte Zellen eliminiert als auch Zellen zur kompensatorischen Proliferation angeregt werden, um das Gewebe zu regenerieren. Dies erfordert eine geordnete und kontrollierte Abstimmung von Apoptose und Proliferation, wobei die Stresskinasen involviert sind (Chen, 2012; Cosolo et al., 2019). Ob diese eine pro- oder antiproliferative bzw. – apoptotische Wirkung ausüben, scheint unter anderem abhängig von Stimulus und Zelltyp, Intensität und Dauer der JNK-Aktivierung zu sein. Während eine akute und vorübergehende Aktivierung eher vermag, die Proliferation anzuregen, ist eine anhaltende Aktivierung von JNK häufig assoziiert mit vermehrtem Zelltod (Chung et al., 2014; Cosolo et al., 2019).

Die involvierten Mechanismen umfassen dabei unter anderem die Beeinflussung der Genexpression im Nukleus oder das Modulieren von pro- und anti-apoptotischen Proteinen durch Phosphorylierung im Zytoplasma (Dhanasekaran & Reddy, 2008). Des Weiteren modulieren JNK den Zellzyklusverlauf. Dabei kann die Zellteilungsrate angehoben, ruhende Zellen wieder dem Zellzyklus und beschädigte Zellen dem programmierten Zelltod zugeführt werden (MacCorkle-Chosnek et al., 2001). Die JNK-Aktivität nimmt in der späten S-Phase zu und greift schließlich an dem G2/M-Checkpoint an (Dhanasekaran & Reddy, 2017; Du et al., 2004). Dies geschieht unter anderem über die Phosphorylierung der Phosphatase Cdc25C (= cell division cycle 25C), was eine Inaktivierung von Cdk1 (= cyclin dependent kinase 1) zur Folge hat und hierdurch zu einem Zellzyklusstop führt (Gutierrez et al., 2010). Auch können JNK das Histon 3 phosphorylieren und hiermit auf den Zellzyklus Einfluss nehmen (Lee & Song, 2008). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibierung von JNK2 in der S-Phase eine Anhäufung von Zellen mit 4N DNA-Inhalt bewirkt (MacCorkle & Tan, 2004). Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme auf den Zellzyklus stellt für JNK die Fähigkeit der Regulation des Tumorsuppressorproteins p53 dar. In nicht beeinträchtigten Zellen markieren sie p53 für die Ubiquitinierung und den darauffolgenden Abbau. In gestressten oder beschädigten Zellen verändern sie p53 über Phosphorylierung hin zu einem stabileren Konformationszustand (Fuchs, Adler, et al., 1998).

1.4.3 JNK in der Pankreatitis

Die Phosphorylierung von JNK ist eines der am frühesten zu beobachtenden Ereignisse nach Induktion einer akuten Pankreatitis im Tiermodell (Dabrowski et al., 1996; Grady et al., 1996). Es bestehen Hinweise darauf, dass die Aktivierung von Trypsinogen über den JNK-Signalweg reguliert wird (Yang et al., 2018).

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass die Inhibierung von JNK die Entwicklung einer akuten Pankreatitis abschwächt. Dies wurde sowohl *in vitro* (Wagner et al., 2000) als auch *in vivo* festgestellt (Fleischer et al., 2001; Jo et al., 2014; Minutoli et al., 2004). Eine JNK-Inhibierung kann zudem den im Rahmen einer schweren Verlaufsform auftretenden Lungenschaden reduzieren (Liu et al., 2012). Ein protektiver Effekt von JNK in Bezug auf die Ausprägung einer Pankreatitis konnte hingegen bei Dahlhoff et al. nachgewiesen werden (Dahlhoff et al., 2010).

Im Rahmen der akuten Pankreatitis kann eine JNK1-abhängige Degradierung von Ferritin beobachtet werden, was eine vermehrte ROS-Bildung nach sich zieht und die Inflammation verstärkt (Sledzinski et al., 2013). JNK1-spezifische Untersuchungen in pankreatischem Gewebe finden sich weiterhin vornehmlich in Bezug auf die Insulinresistenz, welche durch JNK1 über eine veränderte Genexpression, die Steuerung der Produktion bestimmter Hormone und Zytokine sowie des Fettstoffwechsels moduliert wird (Sabio & Davis, 2010).

Ein JNK2-Knockout führt zu einer Th1-Differenzierungsstörung und somit zu einer Verschiebung zugunsten der Th2-Zellen, was mit einer Reduktion der destruktiven Insulitis bei Diabetes Typ 1 in Zusammenhang steht (Jaeschke et al., 2005).

JNK3 ist im Pankreas nur in den Insulin produzierenden β -Zellen vorhanden, die Forschung bezüglich JNK3 im Pankreas fokussiert sich auf den Insulin-Signalübertragungsweg (Abdelli et al., 2009).

2 Problemstellung

Die Mechanismen der Gewebemöostase und der Regeneration im Pankreas sind noch nicht vollständig verstanden und charakterisiert. Der oben dargelegte Zusammenhang zwischen Inflammation und Karzinogenese legt die Vermutung nahe, dass im Rahmen der Regeneration ein gewisses Zellkompartiment aktiviert wird, das den entstandenen Schaden durch Zellerneuerung zu beheben versucht und sich dabei empfänglicher für onkogene Transformationen zeigt als reife Epithelzellen. Denn obgleich PDAC eine duktale Morphologie präsentiert, scheint es nicht dem duktalem Gewebe zu entspringen. Die Identifikation der Ursprungszellen stellt eine Herausforderung dar, da die Zellerneuerung und Regeneration des Pankreas noch nicht hinreichend erforscht ist.

Es ist daher von großer Bedeutung, zunächst den physiologischen Regenerationsprozess im Wildtyp nach inflammatorischer Schädigung durch eine zeitlich besonders kleinschrittige Analyse genauer zu charakterisieren, so dass ein besseres Verständnis der regenerativen Zellerneuerung im Pankreas erlangt werden kann. Das Verständnis der Zellerneuerung ist auch für die PDAC-Entstehung entscheidend. Aus diesen Gründen soll die Morphologie, die Proliferationsreaktion sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Regeneration, die zur Zellerneuerung nach Gewebeschädigung beitragen, definiert werden.

Des Weiteren soll die Rolle der Stresskinase JNK2 in der Pankreatitis untersucht werden. Es gibt Hinweise darauf, dass diese im Rahmen der Geweberegenerierung die Koordination von Apoptose und kompensatorischer Proliferation steuert (Fuchs & Steller, 2015; Sun & Irvine, 2014). Es soll geprüft werden, ob und auf welche Weise sich ein JNK2-Verlust auf das Inflammations- und Regenerationsgeschehen in der Caerulein-induzierten Pankreatitis auswirkt. In dieser Studie wird ein Versuchsaufbau mit JNK2-Knockout-Mäusen gewählt, um die Auswirkung eines spezifischen JNK2-Verlusts auf die Pankreatitis und deren Regeneration zu eruieren.

3 Material

Tabelle 1: Geräte	
Gerät	Hersteller
Allgemeiner Gebrauch	
Analysenwaage	Sartorius analytic, Göttingen
Autoklav VX75	Systemec, Wettenberg
Flockeneisbereiter AF100	Scotsman, Vernon Hills IL (USA)
Gefrierschrank -20°C	Bosch, München
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Kühlschrank 4°	KBS, Mainz
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra, Fernwald
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Mixer	Neolab, Heidelberg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5414 R	Eppendorf, Hamburg
Gewebeprozessierung und Histologie	
Einbettgerät EG1160	Leica Microsystems, Wetzlar
Gewebeinfiltrationsautomat ASP200 S	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlplatte COP30	Medite, Burgdorf
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop DM E	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop-Kamera AxioCam ICc3	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrotom RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar
Paraffin-Streckbad	GFL, Burgwedel
Schüttler	IKA, Staufen
Trockenschrank	Advantage lab, Schilde (Belgien)
Proteinextraktion und Western Blot	
Mikroplatten-Photometer MultiskanEx	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Rollenmischer	Baeuerle, Schwarzwald
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Optimax	Protec, Oberstenfeld
Röntgenkassette	Rego, Augsburg
Western Blot-Equipment	Bio-Rad, München
Western Blot-Stromversorgung	Biometra, Göttingen
RNA-Extraktion und –Verarbeitung	
2100 Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara (USA)
Elektrophorese-Equipment	Whatman, Göttingen
Elektrophorese-Stromversorgung	Lifetechnologies, Darmstadt
Gewebehomogenisator TissueLyser LT	Qiagen, Hilden
LightCycler 480	Roche Applied Science, Mannheim

Spectrophotometer NanoDrop® 2000	Peqlab, Erlangen
UV-Reiniger-Box	Biosan, Riga (Lettland)
UV-Transilluminator	VWR, Darmstadt

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	
Material	Hersteller
Allgemeiner Gebrauch	
Einkanalpipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Peqlab, Erlangen
Einmal-Spritzen (10 ml, 20 ml)	B.Braun, Melsungen
Kanülen	B.Braun, Melsungen
Insulinspritze Micro-Fine 1 ml (U100), 0,33 mm (29G) x 12,7 mm	BD, Heidelberg
Insulinspritze Micro-Fine 0,3 ml (U100), 0,30 mm (30G) x 8 mm	BD, Heidelberg
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Starlab, Hamburg
Reaktionsgefäße (1 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen Falcon™ (15 ml, 50 ml)	BD, Heidelberg
Serologische Pipetten (10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebeprozessierung und Histologie	
Begrenzungsstift	Dako Denmark, Glostrup (Dänemark)
Deckgläser (24x24 mm, 24x50 mm)	Menzel, Braunschweig
Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe
Filzstift Securline Marker II Superfrost	Aspen Surgical, Caledonia MI (USA)
Mikrotomklingen Leica 819	Leica, Wetzlar
Objektträger Superfrost® Ultra Plus	Menzel, Braunschweig
Paraffinpastillen Histosec®, ohne DMSO	Merck, Darmstadt
Proteinextraktion und Western Blot	
Blotting-Papier	Whatman, Dassel
Nitrozellulose-Transfermembran Protran™	Whatman, Dassel
Pipettenspitzen (100 µl, schlank)	Brand, Essex CT (USA)
Röntgenfilm Amersham™ Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
RNA-Extraktion und –Verarbeitung	
96-Loch-Mikroplatte	Starlab, Hamburg
GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara CA (USA)
LightCycler 480 Versiegelungsfolien	Roche Applied Science, Mannheim

Tabelle 3: Reagenzien	
Reagenz	Hersteller
Allgemeiner Gebrauch	
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco`s PBS	PAA, Pasching (Österreich)
Ethylendiamintetraessigsäure (= EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Flüssiger Stickstoff	Tec-Lab, Königstein
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd 8%	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Histologie	
30% Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe
Dako EnVision + System-HRP labelled Polymer Anti-mouse	Dako, Carpinteria CA (USA)
Dako EnVision + System-HRP labelled Polymer Anti-rabbit	Dako, Carpinteria CA (USA)
Eindeckmedium Vectamount™	Vector Laboratories, Burlingame CA (USA)
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin Y	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (50%, 70%, 96%, 99,8%)	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Flüssiges DAB + Substrat Chromogen System	Dako, Carpinteria CA (USA)
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Rinderserumalbumin (= Bovine Serum Albumin = BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Zitronensäuremonohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Injektionslösungen	
0,9% Natriumchloridlösung	B. Braun, Melsungen
Bromdesoxyuridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Buprenorphin (Temgesic®)	Essex Pharma, München
Caerulein C9026	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rekombinantes Hsp 27	Abcam, Cambridge (UK)
Proteinextraktion und Western Blot	
3-Morpholino-Propansulfonsäure (= MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe

Amersham ECL Anti-mouse IgG HRP - linked whole Antibody	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Amersham ECL Anti-rabbit IgG HRP - linked whole Antibody	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Amersham ECL TM Western Blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Ammoniumpersulfat (= APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lysepuffer 10x	Cell Signaling, Danvers MA (USA)
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker	Fermentas, St. Leon-Rot
Probenpuffer NuPAGE® LDS	Invitrogen, Carlsbad CA (USA)
Proben-Reduktionsmittel NuPAGE®	Invitrogen, Carlsbad CA (USA)
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, EDTA frei	Roche Applied Science, Mannheim
Protein Ladder, prestained	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Tetramethylethylenediamine (= TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
RNA-Extraktion und –Verarbeitung	
1-Bromo-3-Chloropropan	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
6x Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
37% Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligonukleotid-Primer	Metabion, Martinsried
RNase Away Sprühflüssigkeit	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA (USA)
Tri-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Universal Probe Library	Roche Applied Science, Mannheim

Tabelle 4: Lösungen		
Lösung	Menge	Reagenzien
Histologie		
20x Zitratpuffer	21,09 g	Zitronensäuremonohydrat
	500 ml	ddH ₂ O
	pH einstellen auf 6,0	mit 5N NaOH
10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (= Tris Buffered Saline = TBS)	85 g	NaCl
	12,1 g	Tris Base
	800 ml	ddH ₂ O
	pH einstellen auf 7,4	mit 5N HCl

	auffüllen auf 1 l	H ₂ O
Blocking-Puffer	3% BSA in 1xTBS	
Eosin	1,5 g	Eosin Y
	300 ml	Ethanol 96%
	150 µl	Essigsäure 100%
Peroxidase-Blocking-Puffer	100 µl	Wasserstoffperoxid 30%
	900 µl	Methanol
TBS/0,1% BSA	100 ml	TBS 10x
	1 g	BSA
	auffüllen auf 1 l	ddH ₂ O
TBS/0,1% BSA T	0,5% Tween20 in TBS/0,1% BSA	
Proteinextraktion und Western Blot		
Blocking-Puffer	5% Milchpulver in TBS/0,5% Tween20	
20x Elektrophoresepuffer	209,2 g	MOPS
	121,2 g	Tris Base
	20 g	SDS
	6 g	EDTA
	auffüllen auf 1 l	dH ₂ O
Master-Mix	6,25 µl	Probenpuffer
	2,5 µl	Reduktionsmittel
	20 µl- (20 µg Probe in µl)	Lysepuffer
	20 µg in µl	Probe
Sammelgel	3,0 ml	ddH ₂ O
	1,3 ml	Tris-HCL 0,5 mol/L (pH 6,8)
	750 µl	30% Acrylamid/Bis
	50 µl	10% SDS
	25 µl	10% APS
	10 µl	TEMED
Stripping-Puffer	15 g	Glycin
	16,5 g	NaCl
	800 ml	ddH ₂ O
	pH einstellen auf 2,5	mit 5N HCl
	auffüllen auf 1 l	ddH ₂ O
Transferpuffer	29,1 g	Tris Base
	14,7 g	Glycin
	1 l	Methanol
	0,1875 g	SDS
	auffüllen auf 5 l	ddH ₂ O
Trenngel	3,4 ml	ddH ₂ O
	2,6 ml	Tris-HCL 0,5 mol/L (pH 6,8)
	4 ml	30% Acrylamid/Bis
	100 µl	10% SDS
	50 µl	10% APS

	15 µl	TEMED
Waschpuffer	0,5% Tween20 in 1xTBS	
RNA-Extraktion und –Verarbeitung		
25x Tris Borate EDTA (= TBE)	605,5 g	Tris Base
	275,1 g	Borsäure
	0,6 g	EDTA
	auffüllen auf 2 l ddH ₂ O	
Elektrophorese-Gel	100 ml	TBE
	0,8 g	Agarose
	1 ml	Formalinaldehyd
	3,5 µl	Ethidiumbromid
Electrophorese Master-Mix	2 µl	Ladepuffer (6x)
	4 µl	Formamid
	2 µl	ddH ₂ O
	1 µg	Probe
qRT-PCR Master-Mix	4,4 µl	Wasser, RNase-frei
	0,2 µl	Primer Links
	0,2 µl	Primer Rechts
	0,2 µl	Universal Probe
	10 µl	LC 480 Probes Master
	1 µg	cDNA

Tabelle 5: Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz (5' - 3')	Universal Probe
Cdh1 links	ATC CTC GCC CTG CTG ATT	18
Cdh1 rechts	ACC ACC GTT CTC CTC CGT	18
Claudin 4 links	GAG GGC TGG GGA CCT AGA	26
Claudin 4 rechts	GCA AGA CAG TGC GGA AAA	26
HSPB1 links	CTG GAC GTC AAC CAC TTC	100
HSPB1 rechts	CTG CCT TTC TTC GTG CTT	100
Il-6 links	GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A	6
Il-6 rechts	CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA	6
PPIB links	TTC TTC ATA ACC ACA GTC AAG ACC	20
PPIB rechts	TCC ACC TTC CGT ACC ACA TC	20
TNF-α links	TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC	49
TNF-α rechts	GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT	49

Tabelle 6: Antikörper				
Antikörper	Anwendung	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller
β-Actin	WB	1:2000	4967	Cell Signaling, Danvers MA (USA)
BrdU	ICH	1:500	5292	Cell Signaling, Danvers MA (USA)
CD45	ICH	1:400	NB110-93609	Novus Biologicals, Littleton CO (USA)
Claudin 4	ICH	1:200	NB100-91712	Novus Biologicals, Littleton CO (USA)
	WB	1:500		
E-Cadherin	ICH	1:200	3195	Cell Signaling, Danvers MA (USA)
HSP 27	WB	1:1000	NBP1-75477	Novus Biologicals, Littleton CO (USA)
HSPB1/ HSP 27	ICH	1:200	LS-B2642	LifeSpan Biosciences, Seattle WA (USA)
Ki67	ICH	1:1000	6530	Novus Biologicals, Littleton CO (USA)
Phospho-Histone H3	ICH	1:500	9701	Cell Signaling, Danvers MA (USA)

Tabelle 7: Kits	
Kit	Manufacturer
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
LightCycler® 480 Probes Master	Roche Applied Science, Mannheim
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quantitect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 8: Software	
Software	Provider
Ascent Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Axiovision Software	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Computer Hardware	Medion, Essen
Excel	Microsoft, Washington (USA)
GraphPad Prism	Graphpad Software, San Diego (USA)
LightCycler™ 480 Software	Roche Applied Science, Mannheim
Mendeley	Elsevier, Amsterdam (Niederlande)
Windows 7	Microsoft, Washington (USA)
Word	Microsoft, Washington (USA)

4 Methoden

Versuche zur Regeneration des Pankreas nach akuter Pankreatitis in Wildtyp-Mäusen

Planung der Experimente: Sina Fritzsche, Dr. Nora Behler, Nataliya Valkovskaya; Dr. Dr. Bo Kong, Prof. Dr. Christoph Michalski, Prof. Dr. Jörg Kleeff

Mauszucht und Genotypkontrolle: Nadja Maeritz, Manja Thorwirth, Janina Schäffer, Irina Fuchs

Tierbehandlung, Organentnahme, RNA-Isolation und Qualitätskontrolle: Sina Fritzsche, Dr. Nora Behler, Nataliya Valkovskaya

H&E-Färbung: Sina Fritzsche, Auswertung: AG Prof. Dr. Irene Esposito

Immunhistochemie Ki67, pH3, BrdU: Sina Fritzsche; CD45: Nataliya Valkovskaya

RNA-Endkontrolle und Microarray-Durchführung: AG Dr. Martin Irmeler, Dr. Philip Bruns (Helmholtzzentrum)

Bioinformatische Analysen: Dr. Philip Bruns

Versuche zur Untersuchung des Einflusses eines JNK2^{-/-}-Verlusts auf die akute Pankreatitis und deren pankreatische Regeneration

Planung der Experimente: Sina Fritzsche; Dr. Dr. Bo Kong, Prof. Dr. Christoph Michalski, Prof. Dr. Jörg Kleeff

Mauszucht und Genotypkontrolle: Nadja Maeritz, Manja Thorwirth

Tierbehandlung: Sina Fritzsche, Manja Thorwirth

Organentnahme, RNA-/Protein-Isolation, H&E, Immunhistochemie, Western Blot, qRT-PCR: Sina Fritzsche

Versuch zur Untersuchung des Einflusses einer rekombinanten Hsp 27 – Applikation auf die akute Pankreatitis im WT

Planung der Experimente: Sina Fritzsche; Dr. Dr. Bo Kong, Prof. Dr. Christoph Michalski, Prof. Dr. Jörg Kleeff

Tierbehandlung, Organentnahme: Sina Fritzsche

4.1 Versuchsaufbau

4.1.1 Versuchstiere

Die tierexperimentelle Arbeit wurde an Labormäusen (= *Mus Musculus*) durchgeführt. Es wurden die Mausstämme C57BL/6J und JNK2^{-/-} verwendet. C57BL/6J-Mäuse sind 1921 von C.C. Little erstmals beschriebene Wildtypmäuse, welche bei Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben wurden. Bei den JNK2^{-/-}-Mäusen handelt es sich um globale Knockout-Mäuse, bei denen das JNK2-Gen in sämtlichen Zellen funktionell ausgeschaltet ist (Yang et al., 1998). Betroffen sind beide Allele; es besteht also ein vollständiger JNK2-Genverlust. Die Knockout-Tiere wurden von Jackson Laboratories bezogen. Zur Sicherstellung des Genotyps wurde vor Verwendung dieser Mäuse von Nadja Maeritz, Manja Thorwirth, Janina Schäffer und Irina Fuchs eine Genotypisierung mit Gewebe aus dem Ohr durchgeführt.

Die Mauslinien wurden unter SPF-Bedingungen (= specific pathogen free) gehalten und gezüchtet. Alle durchgeführten Tierexperimente entsprechen den EU Richtlinien für die Pflege und Verwendung von Labortieren und wurden von den lokalen Behörden genehmigt.

4.1.2 Analgesie

Die Entzündung des Pankreas und eine damit einhergehende Reizung des Peritoneums kann den Versuchstieren Schmerzen bereiten und eine Stressreaktion auslösen. Um diesem entgegenzuwirken, wurde den Mäusen vor Beginn der Caerulein-Behandlung subkutan 0,1 mg/kg KG des Opioid-Analgetikums Buprenorphin injiziert. Erfolgt die Caerulein-Injektionen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, erhielten die Versuchstiere an beiden Tagen Buprenorphin. Den Kontrolltieren wurde die gleiche Behandlung zuteil.

4.1.3 Induktion der Pankreatitis

4.1.3.1 Caerulein

Die Auslösung der Pankreatitis erfolgte pharmakologisch durch Applikation des Dekapeptids Caerulein, dessen Wirkung auf seiner strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu Cholezystokinin, einem Hormon des Gastrointestinaltrakts, basiert (Lampel & Kern, 1977). Freigesetzt bewirkt es eine Kontraktion der Gallenblase und eine Sekretion von Protease-reichen Pankreasenzymen; eine supramaximale Stimulierung führt in Nagetieren über eine vorzeitige Trypsinogenaktivierung zu einer Entzündung des Pankreas und simuliert das klinische Bild der humanen akuten ödematösen Pankreatitis (Adler et al., 1982). Während in

Ratten eine milde interstitiell-ödematöse Pankreatitis induziert wird, treten in Mäusen bei ähnlichem Vorgehen auch nekrotische Areale auf (Bhatia, 2004; Kaiser et al., 1995). Das Verfahren ist gering invasiv, das Ausmaß der Entzündung und der Gewebeschädigung gut kontrollierbar und reproduzierbar. Die Verwendung von Caerulein zur experimentellen Auslösung einer akuten Pankreatitis bei Nagetieren hat sich als Pankreatitis-Modell etabliert.

4.1.3.1.1 Protokoll zur Auslösung einer akuten Pankreatitis

Das Krankheitsbild der akuten Pankreatitis wurde durch zehn Caerulein-Injektionen hervorgerufen, die in einem Abstand von einer Stunde verabreicht wurden. Dafür wurde das Mittel in isotoner Kochsalzlösung (= Natriumchlorid 0,9% = NaCl 0,9%) gelöst und in einer Dosis von 1 µg pro Maus je Stunde (Gesamtdosis 10 µg/Maus) intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppen erhielten stattdessen Injektionen mit isotoner Kochsalzlösung. Eine Stunde nach Ende der Behandlung erfolgte die Tötung der Versuchstiere sowie die Blut- und Organentnahme. Die Anzahl und Art der verwendeten Mäuse lässt sich der **Tabelle 9** entnehmen.

Tabelle 9: Anzahl der zur Untersuchung der akuten Pankreatitis verwendeten Versuchstiere		
Mauslinie	Caerulein	NaCl 0,9 %
JNK2 ^{-/-}	10	6
C57Bl/6J	8	6

4.1.3.1.2 Protokoll zur Untersuchung der Regeneration

Zur Untersuchung des Heilungsprozesses nach einer akuten Pankreatitis wurde ein weiteres Versuchsmodell eingesetzt, welches aufgrund eines erweiterten Injektionsschemas und einer höheren Gesamtdosis ausgedehntere strukturelle Schädigungen des Pankreasgewebes zur Folge hat. Hierfür wurde das Caerulein an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in acht stündlich erfolgenden Injektionen pro Tag appliziert (Jensen et al., 2005). Die verwendete Dosis betrug dabei 2 µg pro Maus je Stunde (Gesamtdosis 32 µg/Maus), die Kontrollgruppen erhielten stattdessen isotone Kochsalzlösung. Um die Proliferationsleistung des regenerierenden Gewebes zu beurteilen, wurden zwei Stunden vor der Organentnahme einmalig 2,5 µg des Nukleosids Bromodeoxyuridin (= BrdU) subkutan injiziert. Als synthetisches Thymidinanalogon wird dies während der S-Phase der Replikation in die DNA interkaliert; immunhistochemische Verfahren ermöglichen schließlich eine Detektion des inkorporierten BrdU. Zur Verlaufsbeurteilung des Regenerationsprozesses wurde den Versuchstieren das Pankreas an verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Der Zeitpunkt der letzten Injektion

wurde als Stunde Null gewertet. Die Organentnahme der Kontrolltiere wurde eine Stunde nach der letzten Injektion durchgeführt; die der Caerulein-behandelten Tiere an 13 verschiedenen Zeitpunkten zwischen 3 Stunden bis 14 Tagen nach der letzten Injektion. Eine genaue Aufstellung der gewählten Zeitpunkte und der Anzahl der verwendeten WT- und JNK2^{-/-}-Versuchstiere befindet sich in **Tabelle 10** und **11**.

Tabelle 10: Anzahl der zur Untersuchung der Pankreasregeneration verwendeten Wildtypmäuse

Zeitpunkt	0h	3h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h	d5	d7	d14
H&E	5	3	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	4
IHC	10	10	4	8	4	10	-	8	-	8	10	7	4
Microarray	5	3	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	4

Tabelle 11: Anzahl der zur Untersuchung der Pankreasregeneration verwendeten JNK2^{-/-}-Mäuse

Zeitpunkt	0h	3h	24h	48h	d5	d7
N	2	4	4	4	4	4

4.1.3.1.3 Applikation von rekombinantem Hsp 27

Zur Untersuchung der Auswirkung von Hsp 27 auf die Caerulein-induzierte akute Pankreatitis, wurde WT-Mäusen eine Stunde vor Caerulein-Behandlung subkutan rekombinantes Hsp 27 injiziert. Die Kontrolltiere erhielten stattdessen isotone Kochsalzlösung. Eine Auflistung der verwendeten Versuchstiere befindet sich in **Tabelle 12**.

Tabelle 12: Anzahl der Versuchstiere zur Untersuchung der Auswirkung von rekombinantem Hsp 27 auf die akute Pankreatitis

Injektionslösung	NaCl 0,9%	Hsp 27
WT + NaCl 0,9%	7	5
WT + Caerulein	14	10

4.1.3.2 Tötung der Versuchstiere, Gewinnung und Prozessierung des Gewebematerials

Zunächst wurden die Versuchstiere mit dem Narkosemittel Isofluran betäubt. Um Material für die Durchführung von Serumanalysen zu gewinnen, wurde ihnen anschließend retrobulbär Blut entnommen und bis zur weiteren Aufbereitung auf Eis gelagert.

Danach erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch Luxation der Halswirbelsäule. Nach Eröffnung des Bauchraums durch eine mediane Laparotomie wurde das Pankreas freipräpariert und entnommen. Zur Entfernung von Blutresten wurde das Organ in Phosphate Buffered Saline (= PBS) gewaschen, bevor es in mehrere Stücke geschnitten wurde. Ein Teil davon wurde in RLT-Puffer mit 1% β -Merkaptoethanol gegeben und in einem Gewebehomogenisator drei Minuten lang mit 50 Oszillationen pro Sekunde homogenisiert. Das Lysat wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Gefrierschrank bei -80°C gelagert, um zu einem späteren Zeitpunkt für die RNA-Isolation zur Verfügung zu stehen. Die Gewebelysate, aus denen die RNA für die Microarray-Experimente gewonnen werden sollte, wurden ohne weitere Verzögerung der sofortigen RNA-Extraktion zugeführt.

Ein weiteres Stück des Pankreas wurde schockgefroren und bei -20°C zur späteren Proteinextraktion aufbewahrt. Der Rest des Organs wurde in 4% Paraformaldehyd fixiert und für histologische Analysen weiter prozessiert.

4.2 Serumanalysen

Für die Separation des Serums von den korpuskulären Bestandteilen wurde das Blut fünf Minuten lang bei 4°C mit 6000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde für die Analyse in isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Die Messung der Enzymlevel wurde durch den Kooperationspartner in der Abteilung der klinischen Chemie (Klinikum rechts der Isar, München) durchgeführt.

4.3 Histologische Analysen

4.3.1 Gewebeprozessierung

Die Gewebeproben wurden nach ihrer Entnahme durch Einlegen in 4% Paraformalinaldehyd für 12 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert, darauf folgte die Überführung in 70% Ethanol für mindestens zwölf weitere Stunden. Anschließend wurde das Gewebe in Einbettkassetten gelegt und mit Hilfe eines Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten in verschiedenen Konzentrationen von Ethanol dehydriert, in Xylen entfettet und mit Paraffin durchspült. Das verwendete Programm ist in **Tabelle 13** dargestellt.

Tabelle 13: Zur Gewebeprozessierung verwendetes Programm des Gewebefiltrationsautomaten	
Reagenz	Dauer (h)
Ethanol 70%	0,45
Ethanol 80%	0,45
Ethanol 96%	1,00
Ethanol 96%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Ethanol 100%	1,00
Xylen	0,45
Xylen	1,00
Xylen	1,15
Paraffinwachs	1,00
Paraffinwachs	1,00
Paraffinwachs	1,00

Schließlich wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Von den Gewebelöcken wurden mit einem Mikrotom 3,5 µm dicke Schnitte angefertigt, welche in einem 37°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgebracht wurden. Danach erfolgte die Trocknung über Nacht in einem Wärmeofen bei 36°C.

4.3.2 H&E-Färbung

Die Hämatoxylin und Eosin (= H&E) – Färbung ist eine Routine-Färbemethode der Histologie, die durch Anfärbung verschiedener Strukturen eine Übersicht über die Morphologie des untersuchten Gewebes ermöglicht. Basophile Strukturen, wie Zellkerne, färben sich bei Behandlung mit Hämatoxylin blau, wohingegen azidophile, zu denen etwa Proteine zählen, durch Eosin rot gefärbt werden.

Zu Beginn wurden die Schnitte in Roticlear deparaffinisiert (3x10 Min.) und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (3x100%, 1x96%, 1x70%, 1x50%, je 3 Min.). Nach einem Waschvorgang mit deionisiertem Wasser (= dH₂O) erfolgte die Überführung in Hämatoxylin für 30 Sekunden und die Anhebung des pH-Werts durch 10 Minuten langes Spülen mit Leitungswasser, um die charakteristische Blaufärbung basophiler Strukturen zu erreichen. Anschließend wurden die Objektträger 5 Sekunden in Eosin geschwenkt, um azidophile Strukturen rot anzufärben. Nach der Entfernung von Eosinresten durch kurzes Waschen mit dH₂O folgte die Dehydrierung der Objektträger in einer aufsteigenden

Ethanolreihe (1x70%, 1x96%, 3x100%, je 3 Min.) und der Fixierung in Roticlear (3x10 Min). Zuletzt wurden die Schnitte mit Vectamount Medium und Deckgläsern versehen.

4.3.3 Immunhistochemie

4.3.3.1 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie ist eine Färbemethode, die die Detektion von gesuchten Gewebestrukturen mit Hilfe von markierten Antikörpern ermöglicht. In dieser Arbeit fand die indirekte Methode ihren Einsatz. Hierbei wird zunächst ein Primärantikörper eingesetzt, der sich gegen ein spezifisches Antigen richtet. Dieser wird in einem weiteren Schritt durch einen Sekundärantikörper gebunden, an den ein Enzym gekoppelt ist. Eine Enzym-Substrat-Reaktion löst die Bildung eines Farbstoffes aus, durch den die Antikörper-markierten Strukturen sichtbar werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, welche einen Komplex mit dem Chromogen DAB (= 3,3'-Diaminobenzidin) bilden. Durch die katalytische Wirkung der Peroxidase wird dabei das DAB oxidiert, was zu der Entwicklung einer lichtmikroskopisch detektierbaren Braunfärbung führt.

Die immunhistochemischen Färbungen in dieser Arbeit wurden nach folgendem Protokoll angefertigt: Nach Deparaffinisierung mit Roticlear (3x10 Min.) wurden die Objektträger mit Ethanol rehydriert (3x100% 1x96% 1x70% 1x50%, je 2 Min.) und mit dH₂O gewaschen. Zur Freilegung von Bindestellen, die während der Fixierung der Organe in Formalin verdeckt werden können, wurde eine Antigendemaskierung durchgeführt. Dafür wurden die Objektträger in Zitratpuffer für 15 Minuten in der Mikrowelle erwärmt. Danach wurde der Puffer durch Waschvorgänge mit dH₂O und TBS/3% BSA abgespült. Um unspezifische Anfärbung zu verhindern, wurde die endogene Peroxidase-Aktivität des zu untersuchenden Gewebes durch eine zehnmünütige Inkubation mit 3% Wasserstoffperoxid enthaltendem Methanol blockiert. Danach wurden die Schnitte erneut mit dH₂O und TBS/0,1% BSA gewaschen. Schließlich erfolgte ein einstündiges Blocken mit TBS/3% BSA, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen und eine Hintergrundfärbung zu vermindern. Schließlich wurden die Objektträger über Nacht im Kühlschrank bei 4°C mit in TBS/3% BSA verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Die verwendeten Antikörper finden sich in **Tabelle 6** (s. Abschnitt 3 „Material“). Am nächsten Tag wurden die Antikörper zunächst mit TBS/0,1% BSA abgespült und für zehn Minuten zwei Mal mit TBS/0,1% BSA T und einmal mit TBS/0,1% BSA gewaschen. Danach folgte der Auftrag des Sekundärantikörpers. Nach 45-minütiger Inkubation bei 20°C wurde der Antikörper durch zwei Waschvorgänge mit

TBS/0,1% BSA T und einem mit TBS/0,1% BSA (je 10 Min.) entfernt. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Substrat-Chromogen-Systems. Zur besseren Sichtbarmachung der Umgebungsstrukturen erfolgte eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin (15 Sek.). Schließlich wurden die Schnitte mit Ethanol dehydriert (1x50% 1x70% 1x96% 3x100%, je 5 Min.) und mit Roticlear behandelt (3x10 Min.). Zuletzt wurden die Schnitte mit Vectamount-Medium (Vector) und Deckgläsern eingedeckt.

4.3.3.2 Immunhistochemische Analysen

Zur Quantifizierung der Proliferationsfärbungen (Ki67, pH3, BrdU) wurden von jedem Gewebeschnitt fünf Bilder in 200-facher Vergrößerung erstellt. Es wurden alle gefärbten Zellkerne und die Gesamtzahl aller Zellkerne ausgezählt und jeweils der Mittelwert berechnet. Die Darstellung erfolgte als Verhältnis der Anzahl der gefärbten Zellkerne zu den Zellkernen insgesamt. Zur Auswertung der Immunzellfärbungen (CD45) wurden je Maus 5 Regionen (= regions of interest = ROI) ausgezählt.

4.4 Western Blot

4.4.1 Proteinextraktion

Schockgefrorenes Gewebe wurde in Lysepuffer (500 µl 10x Lysepuffer + 4,5 ml ddH₂O + ½ Protease Inhibitor Cocktail Tablette) gegeben und drei Minuten lang mit 50 Oszillationen pro Sekunde in einem Gewebhomogenisator behandelt. Das Lysat wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach 20 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert (14000 g). Der das Protein enthaltende Überstand wurde schließlich aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4.4.2 Proteinkonzentrationsmessung

Die Konzentration der extrahierten Proteine wurde nach Anweisungen des Herstellers mit dem BCA Protein Assay Kit bestimmt, um bei dem nachfolgenden Western Blot eine gleiche Proteinladung der Proben erreichen zu können.

4.4.3 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Dabei werden die Proteine zunächst ihrer Größe nach aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen. Auf dieser können sie dann mit Hilfe verschiedener Methoden nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde ein zweistufiges Antikörpersystem, bei dem ein spezifischer Primärantikörper von

einem markierten sekundären Antikörper gebunden wird, verwendet. Die Signale wurden schließlich mittels eines Detektionssystems auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

Für die Auftrennung der Proteine wurden diese in einem Sammelgel (4 %) gesammelt und anschließend in einem Trenngel (12 %) nach ihrer Größe separiert (Anleitung der Gele s. **Tabelle 4** in Abschnitt 3 „Material“). Pro Probe wurde ein Master Mix erstellt (s. **Tabelle 4** in Abschnitt 3 „Material“), 10 Min. auf einem Heizblock bei 70°C erwärmt und zusammen mit einem Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 30 Min. lang mit einer Spannung von 100 Volt und eine Stunde lang bei 150 Volt in 1x Elektrophoresepuffer durchgeführt. Danach wurde das Gel der Vorrichtung entnommen, auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht und gemeinsam mit Filterpapieren und Schwämmen in eine Kassette gegeben. Diese wurde in die Blotkammer eingesetzt und mit 1x Transferpuffer befüllt. Die Proteine wurden für eine Stunde bei 150 mA auf die Membran transferiert. Danach wurde die Membran drei Mal je 10 Min. lang mit TBS/T (0,5% Tween20 in 1xTBS) gewaschen und mit 5% Milchpulver TBS/T eine Stunde lang bei Raumtemperatur die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (s. **Tabelle 6** in Abschnitt 3 „Material“) über Nacht auf einem Schwenktisch im Kühlschrank bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran gewaschen, für eine Stunde in 5% Milchpulver in TBS/T gegeben und schließlich mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:3000, gelöst in 5% Milchpulver TBS/T) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgten vier Waschvorgänge in TBS/T für je 10 Min. Zur Signaldetektion wurde schließlich die nach Angaben des Herstellers gemischte Flüssigkeit des Amersham Chemiluminescence System auf die Membran aufgebracht. Die Entwicklung des Röntgenfilms fand in einer Dunkelkammer mit Hilfe eines Röntgenfilm-Prozessors statt.

Das in eukaryotischen Zellen ubiquitär vorkommende Zytoskelettprotein β -Actin wurde als Ladekontrolle zur Überprüfung einer gleichmäßigen Proteinbeladung auf derselben Membran genutzt. Hierfür wurde die Membran zunächst 20 Min. lang bei 80°C in Stripping-Puffer gegeben, um die darauf gebundenen Antikörper zu lösen, und im Anschluss vier Mal je 10 Min. in TBS/T gewaschen. Nach dieser Behandlung konnte die Membran mit einem weiteren Primärantikörper versehen werden. Die Beurteilung der Ausprägung der Proteinbanden wurde ohne Quantifizierung vorgenommen.

4.5 RNA-Microarray

4.5.1 RNA-Extraktion

Die Isolation der für die Microarray-Untersuchungen bestimmten RNA fand unmittelbar nach Gewinnung des Gewebes statt, um das Risiko der Degradation so gering wie möglich zu halten. Alle Proben wurden anhand des RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers der RNA-Extraktion zugeführt.

4.5.2 Qualitätskontrolle

4.5.2.1 Spektrophotometermessung

Um eine hohe Qualität der verwendeten RNA-Proben zu gewährleisten, wurden zunächst Konzentration und Reinheit mit einem Spektrophotometer gemessen. Da Proteine und weitere organische Substanzen ein anderes Absorptionsmaximum aufweisen als Nukleinsäuren, kann über das Absorptionsverhältnis der Wellenlängen 260 nm und 280 nm eine Kontamination festgestellt werden. Proben mit einer zu geringen Konzentration (<150 ng/µl) oder nicht ausreichenden Reinheit (260/280-Wert <2,0) wurden verworfen, die restlichen Proben aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.5.2.2 Gelelektrophorese

Der Denaturierungsgrad der RNA wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese überprüft. Hierbei führt das Anlegen eines elektrischen Feldes dazu, dass die Nukleinsäuren mit ihren negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung der Anode wandern. Dabei bewegen sich kleine Fragmente schneller fort, was zu einer Auftrennung der RNA nach ihrer Größe führt. Durch verschiedene Methoden, wie z.B. dem Hinzufügen von Ethidiumbromid, welches in die RNA interkaliert, kann diese sichtbar gemacht und fotografiert werden. Eine intakte ribosomale RNA zeichnet sich durch zwei deutlich erkennbare Banden aus, die 28S- und 18S-Einheit.

Vor Beginn wurde zur RNase-Dekontamination des Elektrophoreseequipments 70% Ethanol und RNase-away Spray eingesetzt. Für das Gel wurden 100 ml TBE, 1 ml Formaldehyd und 0,8 g Agarose gemischt und bis zur Auflösung der Agarose in einer Mikrowelle erhitzt. Danach wurden 3,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das flüssige Gel in einen Gelschlitten gegossen. Für jede Probe wurde ein Master-Mix aus 4 µl Formamid, 2 µl ddH₂O und 2 µl 6x Ladepuffer erstellt und 1 µg RNA zugegeben (s. **Tabelle 4** in Abschnitt 3 „Material“). Anschließend wurden diese Ansätze zehn Min. bei 60°C inkubiert. Danach

wurde der Gelschlitten in eine mit Elektrophoresepuffer (1x TBE) gefüllte Kammer gegeben. Die Proben wurden in die einzelnen Taschen pipettiert und für 115 Min. bei einer Spannung von 150 Volt aufgetrennt. Schließlich wurde das Gel zur Signaldetektion unter einen UV-Transiluminator gegeben und die detektierten Signale zur Dokumentation fotografiert. Nur Proben, die eindeutig zu erkennende 18s und 28s Banden aufwiesen, wurden für weitere Analysen verwendet.

4.5.2.3 RIN-Messung

Die vorselektierten Proben wurden der AG des Kollaborationspartners Dr. Irmeler (Helmholtz Zentrum München) übergeben. Zur weiteren Qualitätskontrolle der RNA wurde dort der RIN-Wert (= RNA-Integritätsnummer = RNA Integrity Number) gemessen. Dieser erlaubt eine genauere Aussage zur RNA-Qualität aufgrund einer digitalisierten Erfassung der Kettenlänge. Auf einer Skala von 1-10 geben die Werte an, ob es sich um degradierte (1) oder intakte RNA (10) handelt. Nur Proben mit RIN-Werten von über 7 wurden für die Microarray-Analysen verwendet.

4.5.3 **RNA-Microarray und Datenanalyse**

RNA-Microarrays ermöglichen eine quantitative Analyse der Genexpression eines gesamten Transkriptoms. Die Grundlage hierfür bieten auf einem Chip aufgebrachte Gensonden, die für bekannte Exons in einem bestimmten Gensatz (z.B. dem der Maus) stehen. Die RNA wird durch einen fluoreszierenden Farbstoff markiert und hinzugefügt. Auf dem Chip hybridisiert sie mit Nukleotidsequenzen, die spezifisch für bestimmte Gene sind. Die Quantifikation der Genexpression erfolgt über die Detektion der Signalintensität pro Gensonde durch einen Laser. In dieser Studie wurden Microarrays vom Typ GeneChip Mouse Gene 1.0 ST (Affymetrix) nach Herstellerangaben verwendet, welche die Untersuchung von 28,853 verschiedenen Genen ermöglichen.

Die Arbeitsgruppe von Dr. Martin Irmeler (Institut für Experimentelle Genetik) am Helmholtz Zentrum in München führte die Microarrays in Kollaboration mit jeweils drei biologischen Replikaten pro Untersuchungszeitpunkt durch. Die bioinformatische Datenauswertung wurde von Dr. Phillip Bruns mit der Software Bioconductor vorgenommen (Bruns, 2016).

4.6 Quantitative Real-Time PCR

4.6.1 cDNA-Synthese

Zunächst wurde das eingefrorene Gewebelysat auf Eis aufgetaut und die RNA anhand des RNeasy Mini Kit Plus nach Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die Transkription von mRNA (= messenger RNA) hin zu cDNA (= complementary DNA) erfolgt über das Enzym Reverse Transkriptase, das beim Ablesen der mRNA mit ihrer DNA-Polymerase-Aktivität einen komplementären DNA-Strang bildet. Nach Abbau des verbleibenden RNA-Strangs wird eine zum bereits bestehenden DNA-Strang komplementäre DNA synthetisiert, so dass eine Doppelstrang-DNA entsteht. Die cDNA wurde mit Hilfe des Quantitect Reverse Transcription Kit nach Angaben des Herstellers synthetisiert.

4.6.2 Quantitative Real-Time PCR

Das Ziel einer Polymerase-Kettenreaktion (= Polymerase Chain Reaction = PCR) ist die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Zwei Oligonukleotid-Primer, die an komplementäre Sequenzen binden, markieren dabei den gewünschten Bereich für die Replikation durch die DNA-Polymerase.

Die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR (= quantitative real time PCR = qRT-PCR) ermöglicht nicht nur die Amplifikation von Nukleinsäuren, sondern zugleich die Quantifizierung des cDNA-Gehalts der Proben im Vergleich zu einem sogenannten Haushaltsgen. Dies beschreibt ein Gen, das für ein im zu untersuchenden Gewebe konstitutiv exprimiertes Protein kodiert und so als Referenz im Prozess der Quantifizierung der Proben-DNA dienen kann.

In dieser Arbeit wurden sequenzspezifische Hybridisierungssonden der Universal Probes Library eingesetzt. Diese Einzelstrang-Oligonukleotide besitzen einen fluoreszierenden Reporter an dem einen Ende und einen fluoreszierenden Quencher am anderen Ende. Während der Hybridisierungsphase binden diese die komplementäre DNA-Sequenz zwischen den Primern. Der Quencher blockiert das fluoreszierende Signal, so lange er sich in der Nähe des Reporters befindet. Während der Elongationsphase werden die Sonden durch die Taq-Polymerase hydrolysiert, was die Inhibierung durch den Quencher aufhebt und den Farbstoff freisetzt. Durch eine Lichtquelle wird die Fluoreszenz stimuliert und nach jeder Amplifikationsrunde quantifiziert. Je mehr DNA in der Probe enthalten ist, desto stärker fällt das Fluoreszenzsignal aus, das in Echtzeit ausgelesen wird. Da die Sonden der Universal

Probes Library nur die cDNA detektieren, die exakt deren komplementäre Sequenz enthält, führt deren Verwendung zu einem hochspezifischen Ergebnis.

Zur Wahrung der Integrität der verwendeten Reagenzien und zur Verhinderung einer vorzeitigen Fluoreszenzaktivierung, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis und unter Ausschluss einer direkten Lichteinstrahlung durchgeführt. Um die Reliabilität der Ergebnisse zu erhöhen, wurden für jede Probe Duplikate generiert. Als Haushaltsgen wurde die Peptidylprolyl Isomerase B (= PPIB) gewählt. Des Weiteren wurden Primer für E-Cadherin (= Cdh1), Claudin 4 (= Cldn4) und Heat Shock Protein 27 (= Hspb1 = Hsp 27) verwendet (s. **Tabelle 5** in Abschnitt 3 „Material“). Pro Reaktion wurden jeweils 4,4 µl RNase-freies Wasser, 0,2 µl Primer Links, 0,2 µl Primer Rechts, 0,2 µl Universal Probe und 10 µl Probes Master durch Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt und in ein Loch einer 96-Loch-Platte gefüllt. 1 µg der zu untersuchenden cDNA wurde dem Mix hinzugefügt. Um eine Kontamination mit DNA-Material ausschließen zu können, wurden Negativkontrollen mit RNase-freiem Wasser angesetzt. Die Platte wurde mit einer Verschlussfolie versiegelt und zwei Minuten bei 4°C zentrifugiert (1500 x g). Eine Übersicht über das im LightCycler verwendete Programm befindet sich in **Tabelle 14**.

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen	Prozess
Pre-Inkubation	95°C	5 min	1	Denaturierung
Amplifikation	95°C	10s	45	Hybridisierung und Elongation
	60°C	30s		
	72°C	1s		
Abkühlung	40°C	30s	1	Abkühlung

Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler™ 480 Software, die während der qRT-PCR die sogenannten Ct-Werte (= cycle threshold) aufzeichnet. Diese geben die benötigte Anzahl der Zyklen an, bis sich das Signal signifikant vom Hintergrundrauschen abhebt und verhalten sich damit umgekehrt proportional zu der Menge der enthaltenen cDNA. Proben mit einer Signaldetektion von über 40 Zyklen wurden aus der Wertung ausgeschlossen, da mögliche Ursachen für ein spätes Auftreten des Ct-Werts umweltbedingte Verunreinigungen oder Hintergrundrauschen darstellen können. Die Auswertung erfolgte mit dem Excel-Programm (Microsoft, Washington, USA). Zunächst wurden hierbei die Mittelwerte der Duplikate berechnet und die Ct-Werte der Zielgene von den Ct-Werten des Referenzgens subtrahiert (ΔCt). Die ΔCt -Werte der behandelten Proben wurden nun von den ΔCt -Werten der

Kontrollen der Zielwerte abgezogen und so der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert bestimmt. Schließlich wurde der n-fache Expressionsunterschied zwischen den Proben berechnet.

4.7 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde die GraphPad Prism 5 Software verwendet. Der ungepaarte Student-t-Test wurde für gruppenweise Vergleiche eingesetzt; das Level der statistischen Signifikanz wurde dabei auf $p < 0,05$ festgelegt. Dabei kennzeichnet $p < 0,01$ einen statistisch hoch und $p < 0,001$ einen höchst signifikanten Unterschied an. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte über die GraphPad Prism 5 Software (GraphPad, San Diego, USA) und Microsoft Excel (Microsoft, Washington, USA).

5 Ergebnisse

Aufgrund der Anzahl der erzeugten Daten entstand ein Teil der in Abschnitt 5.1 vorgestellten Ergebnisse in enger Zusammenarbeit mit Kollegen. Die H&E-Färbung wurde durch die AG von Prof. Dr. Irene Esposito evaluiert. Die Durchführung der Microarray-Untersuchung entstand in Kooperation mit der AG Dr. Martin Imler, die bioinformatischen Analysen wurden von Dr. Philipp Bruns erstellt. Die CD45-Kurve wurde von Nataliya Valkovskaya angefertigt. Diese Beteiligungen werden auch in den jeweiligen Abbildungsbeschriftungen erwähnt. Die Abbildungen 3, 4, 5 und 7 wurden aus der Publikation der Arbeitsgruppe adaptiert (Kong et al., 2018). Eine detaillierte Aufgliederung der Kontributionen findet sich zudem in Abschnitt 4 („Methoden“).

5.1 Regeneration des Pankreas nach akuter Pankreatitis in Wildtyp-Mäusen

Als Grundlage für die ausführliche Untersuchung des Inflammationsverlaufs und der Regeneration des Pankreas wurde eine akute Pankreatitis in WT-Mäusen induziert. Hierfür wurde ein gut etabliertes pharmakologische Modell gewählt, bei dem die Entzündung durch eine intraperitoneale Injektion des Cholezystokinin-Analogons Caerulein ausgelöst wird (Greer et al., 2013; Lampel & Kern, 1977; Morris et al., 2010b). Um die verschiedenen Stadien der auf die Entzündung folgenden Regeneration des Pankreas eingehend untersuchen zu können, erfolgte die Organentnahme an eng gesteckten Zeitpunkten (s. **Abb. 3**). Die Kontrolltiere erhielten isotone Kochsalzlösung, das Pankreas wurde ihnen eine Stunde nach der letzten Injektion entnommen.

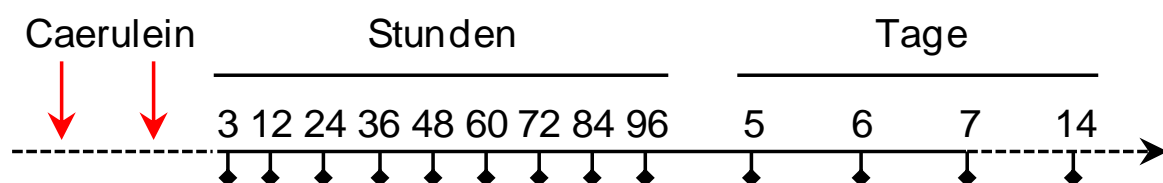


Abb. 3: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Inflammationsverlaufs nach Caerulein-induzierter Pankreatitis in WT-Mäusen (in Anlehnung an Kong et al., 2018). Es erfolgten je 8 Caerulein-Injektionen pro Tag in stündlichen Abständen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Der Zeitpunkt der letzten Injektion wurde als Stunde Null gewertet, die Organentnahme fand an 13 verschiedenen Zeitpunkten zwischen 3 Stunden und 14 Tagen statt.

5.1.1 Transformation der Gewebestruktur des Pankreas

Um eine Beurteilung der mikroskopischen Anatomie der untersuchten Organe zu ermöglichen, wurde eine H&E-Färbung an Paraffinschnitten angefertigt. Die Evaluation und Bilder der Färbungen entstanden in Kooperation mit dem Institut für Allgemeine Pathologie

und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München. Entsprechend der Stadien der histologischen Veränderungen konnten die Zeitpunkte hierbei drei verschiedenen Phasen zugeteilt werden: Der Inflammationsphase (3-36h, s. **Abb. 4 A**), der Regenerationsphase (d2-6, s. **Abb. 4 B**) und der Refinement-Phase (d7-14, s. **Abb. 4 C**).

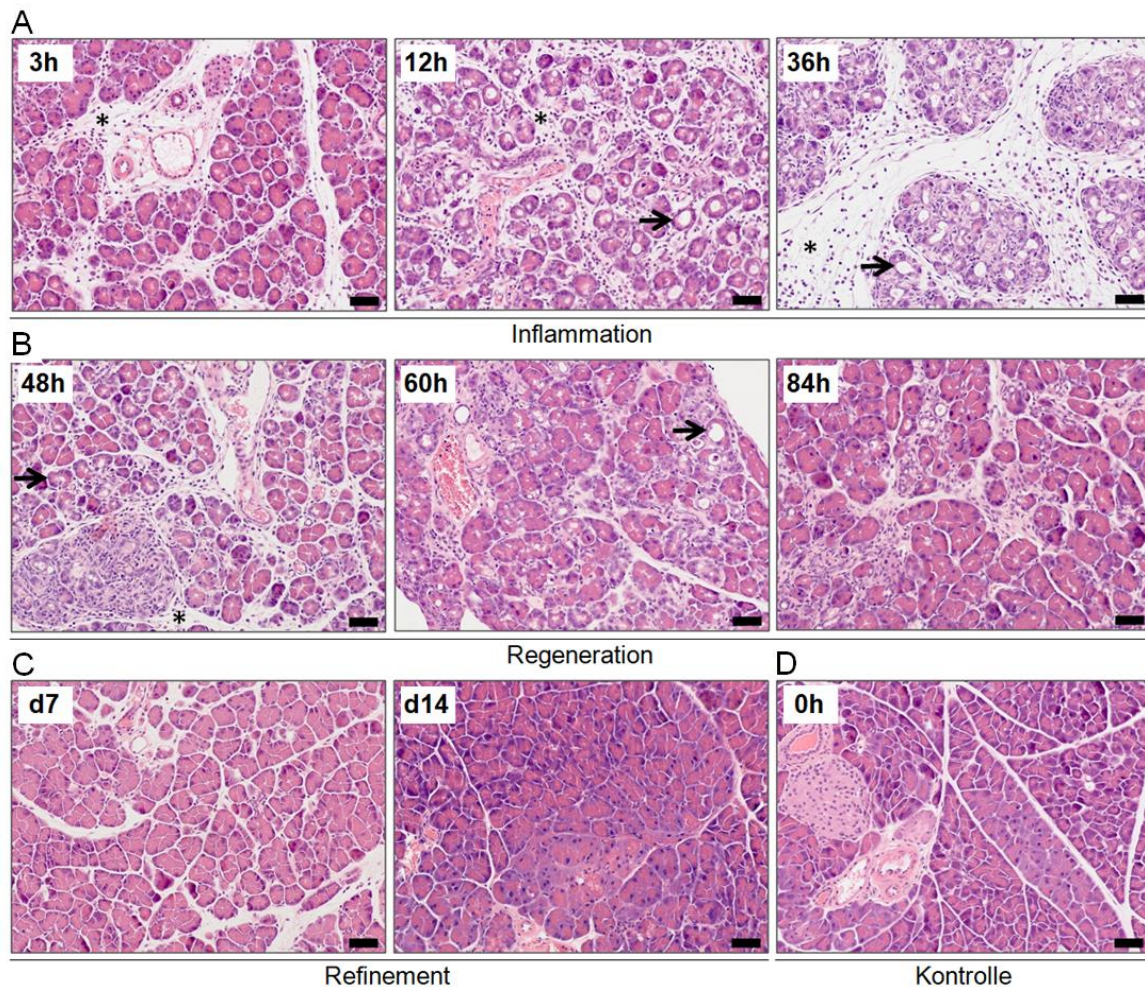


Abb. 4: Repräsentative H&E-Färbung des WT-Pankreasgewebes in den verschiedenen Phasen der Regeneration nach Caerulein-Behandlung (in Anlehnung an Kong et al., 2018). Die Histologie der ersten 36h, hier als „Inflammationsphase“ bezeichnet, ist gekennzeichnet von Merkmalen der Entzündungsreaktion wie Ödembildung und Immuzellinfiltration (s. Asterisk) und Bildung von azinär zu duktalem Metaplasien (= ADM) (s. Pfeil) (A). Während der „Regenerationsphase“ von 48h bis d5 zeigen sich die Veränderungen rückläufig, es tritt vermehrt wieder reguläres Pankreasgewebe auf (B). Ab d7 werden im Rahmen der „Refinement-Phase“ letzte Rückstände abgebaut, so dass das Pankreasgewebe an d14 beinahe vollständig in seinen ursprünglichen Zustand zurückgekehrt ist (C) und den Kontrollen ähnelt (D). Maßstabsbalken: 50 µm. Die Tierbehandlung und Organentnahme wurde durchgeführt durch die Erstellerin der Dissertationsschrift, Dr. Nora Behler und Nataliya Valkovskaya. Die H&E-Färbungen wurden durch die Erstellerin der Dissertationsschrift angefertigt, die Auswertung erfolgte durch das Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München.

Die Inflammationsphase, welche die ersten 36 Stunden umfasst, beginnt mit Ödembildung und der Einwanderung von Immuzellen in das Pankreasgewebe (s. **Abb. 4 A-B**, Asterisk). Zudem konnte die Vakuolisierung von Azinuszellen sowie die Apoptose einzelner Zellen beobachtet werden. Auch treten bereits beginnende Transformationen zu TC im Rahmen

von ADM auf (s. **Abb. 4 A-B**, Pfeil). Diese Veränderungen nehmen im Verlauf (3h-36h) in ihrem Ausmaß zu, gegen Ende der Entzündungsphase werden zusätzlich atrophische Azini und TC mit Apoptosen sichtbar (s. **Abb. 4 A**).

Zu Beginn der von Tag 2 bis Tag 6 andauernden Regenerationsphase konnte eine rückläufige Inflammationsreaktion beobachtet werden. Im Laufe dieses Stadiums nimmt gemäß der histopathologischen Beurteilung auch die Anzahl der apoptotischen Zellen und der TC ab, während wieder vermehrt reguläres Pankreasgewebe gebildet wird. Zuletzt bestehen nur noch minimale Zeichen der Inflammation, und auch atrophisierte Azini und TC konnten nur noch fokal festgestellt werden (s. **Abb. 4 B**).

In der abschließenden Refinement-Phase, die sich von Tag 7 bis Tag 14 erstreckt, werden letzte Rückstände der vorangegangenen Veränderungen abgebaut. Nach 14 Tagen ist das Pankreasgewebe beinahe vollständig in seinen ursprünglichen Zustand zurückgekehrt (s. **Abb. 4 C**).

Eine detaillierte Darstellung der Auswertung befindet sich in **Appendix I**.

5.1.2 Identifikation der involvierten molekularen Mechanismen

Für die Überprüfung der in der Histologie beobachteten Phasen auf molekularem Level wurden die Genexpressionsmuster des regenerierenden Pankreas in den verschiedenen Stadien mit Hilfe von RNA-Microarray-Analysen charakterisiert. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte durch die Kollaboration mit Dr. Philipp Bruns (Institut für Computational Biology, Helmholtz Zentrum München).

Gene, die keinen signifikanten Expressionsschwankungen unterlagen oder in sämtlichen Proben auf sehr niedrigem Level exprimiert wurden, wurden nicht weiter analysiert. Die übrigen Proben wurden durch die Methode des unüberwachten Clustering der Ähnlichkeit ihrer Transkriptionsprofile nach in Gruppen zusammengefasst und als Dendrogramm visualisiert (s. **Abb. 5 A**).

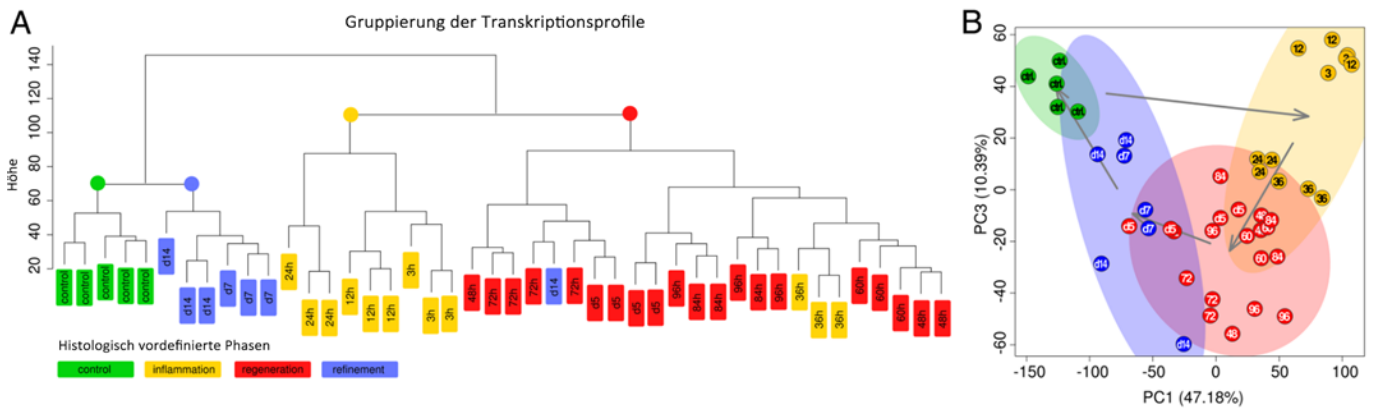


Abb. 5: Gruppierung der Transkriptionsprofile von Wildtyppankrea nach Induktion einer akuten Pankreatitis (in Anlehnung an Kong et al., 2018). Unüberwachtes Clustering der Transkriptionsprofile in Wildtypmäusen: Homogene Cluster korrespondieren mit den histologisch definierten Phasen (A). Hauptkomponentenanalyse: Biplot der Transkriptionsprofile mit 95% Konfidenzbereich in Form von Ellipsoiden, deren verschiedene Farben den vordefinierten Phasen entsprechen (Grün=Kontrolle, Gelb=Inflammation, Rot=Regeneration, Blau=Refinement). Der zeitliche Verlauf der Inflammation im Pankreas von Wildtypmäusen ist ein sich selbst auflösender Prozess, der einen zyklischen Verlauf formt (hervorgehoben durch Pfeile zwischen den einzelnen Gruppen) (B). Die RNA-Isolation und Qualitätskontrolle erfolgte durch die Erstellerin der Dissertationsschrift, Dr. Nora Behler und Nataliya Valkovskaya. Die RIN-Messung und Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte durch Dr. Philipp Bruns (Institut für Computational Biology, Helmholtz-Zentrum München).

Es konnten vier verschiedene Cluster beobachtet werden, die den durch die Histologie vordefinierten Gruppen entsprachen: Kontrolle, Inflammation, Regeneration und Refinement. Innerhalb dieser histologisch definierten Gruppen zeigen die Proben ähnliche Transkriptionsprofile; zwischen den einzelnen Gruppen besteht ein deutlicher Unterschied.

Mit Ausnahme des Regenerations-Clusters umfassen alle Gruppen ausschließlich die jeweils zugehörigen Zeitpunkte. Das Regenerations-Cluster beinhaltet zusätzlich drei 36h-Proben, die eigentlich der Inflammationsphase zugeordnet worden sind, und eine d14-Probe aus der Refinement-Phase. Da die Histologie der 36h-Proben deutliche Entzündungsmerkmale aufzeigt, wurden die molekularen Profile der Proben weiterhin als Teil der Inflammationsphase behandelt. Die Transkriptionsprofile der Proben von d7 und d14 ähneln denen der Kontrollproben, bilden aber ein eigenes Refinement-Subcluster.

Zur weiteren Analyse des umfangreichen Datensatzes wurde mit den 50% der Gene, die die höchste Varianz in den Proben zeigten, eine Hauptkomponentenanalyse (= Principal component analysis = PCA) durchgeführt (s. **Abb. 5 B**). Bei dieser Methode werden die wichtigsten Variablen der Genexpression herausgefiltert und jeder Probe anhand dessen eine Position in einem zweidimensionalen Koordinatensystem zugewiesen. Hierbei befinden sich Tiere mit ähnlichem Expressionsmuster näher beieinander, als die, die sich stärker voneinander unterscheiden, so dass anhand der Entfernung Zusammenhänge unter den Proben sichtbar werden. Für jede vordefinierte Phase wurde ein Konfidenzellipsoid erstellt.

Diese Ellipsoide veranschaulichen das Areal, in dem eine zur jeweiligen Phase gehörende Probe mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% lokalisiert ist.

Während die Kontrolltiere in ihrem Genexpressionsmuster den Tieren der Refinement-Phase ähneln, unterscheiden sich die Proben der Inflammations- und Regenerationsphase sowohl voneinander, als auch von den beiden anderen Gruppen. Eine Verbindung der Mittelpunkte der Ellipsoide offenbarte einen Verlauf in einem zyklischen Muster, ausgehend von der Kontrolle über die Inflammations- und Regenerations- hin zur Refinementphase, die wiederum der Kontrolle ähnelt. Daraus kann schlussgefolgert werden, dass die Entzündung in WT-Pankreata einen sich selbst auflösenden Prozess darstellt, der einem zeitlich stark kontrollierten und koordinierten Ablauf folgt.

Zusammengefasst zeigen die biochemischen Analysen, dass die histologisch ermittelten Phasen des Inflammationsverlaufs auch auf transkriptioneller Ebene wiederzufinden sind und dass diese Phasen einem zyklischen Muster folgen.

5.1.3 Proliferationsreaktion

Um die biologische Relevanz der histologischen und molekularen Erkenntnisse zu untersuchen, wurde eine Charakterisierung des Proliferationsverhaltens nach entzündlicher Schädigung des Pankreasgewebes angestrebt. Hierfür wurde zunächst die Gesamtproliferation im Verlauf der einzelnen Phasen (Kontrolle, Inflammation, Regeneration, Refinement) bestimmt.

Dazu wurden immunhistochemische Färbungen mit dem Proliferationsmarker Ki67 angefertigt (s. **Abb. 6 A**). Das Protein Ki67 wird in sämtlichen proliferierenden Zellen exprimiert, während es in ruhenden Zellen nicht vorhanden ist. Somit markiert es alle Zellen, die sich in der G1-, S-, G2- und M-Phase befinden. Für die Färbungen wurden Schnitte von vier bis zehn Versuchstieren pro Zeitpunkt verwendet, eine genaue Aufstellung ist in **Tabelle 10** (s. Abschnitt 4.1.3.1.2 „Protokoll zur Untersuchung der Regeneration“) zu finden. Von jedem Gewebeschnitt wurden fünf Bilder aus zufällig gewählten, sich nicht überschneidenden Bereichen erstellt und ausgewertet. Die Anzahl der angefärbten Zellnuklei wurde ins Verhältnis zu deren Gesamtzahl gesetzt (s. **Abb. 6 B**).

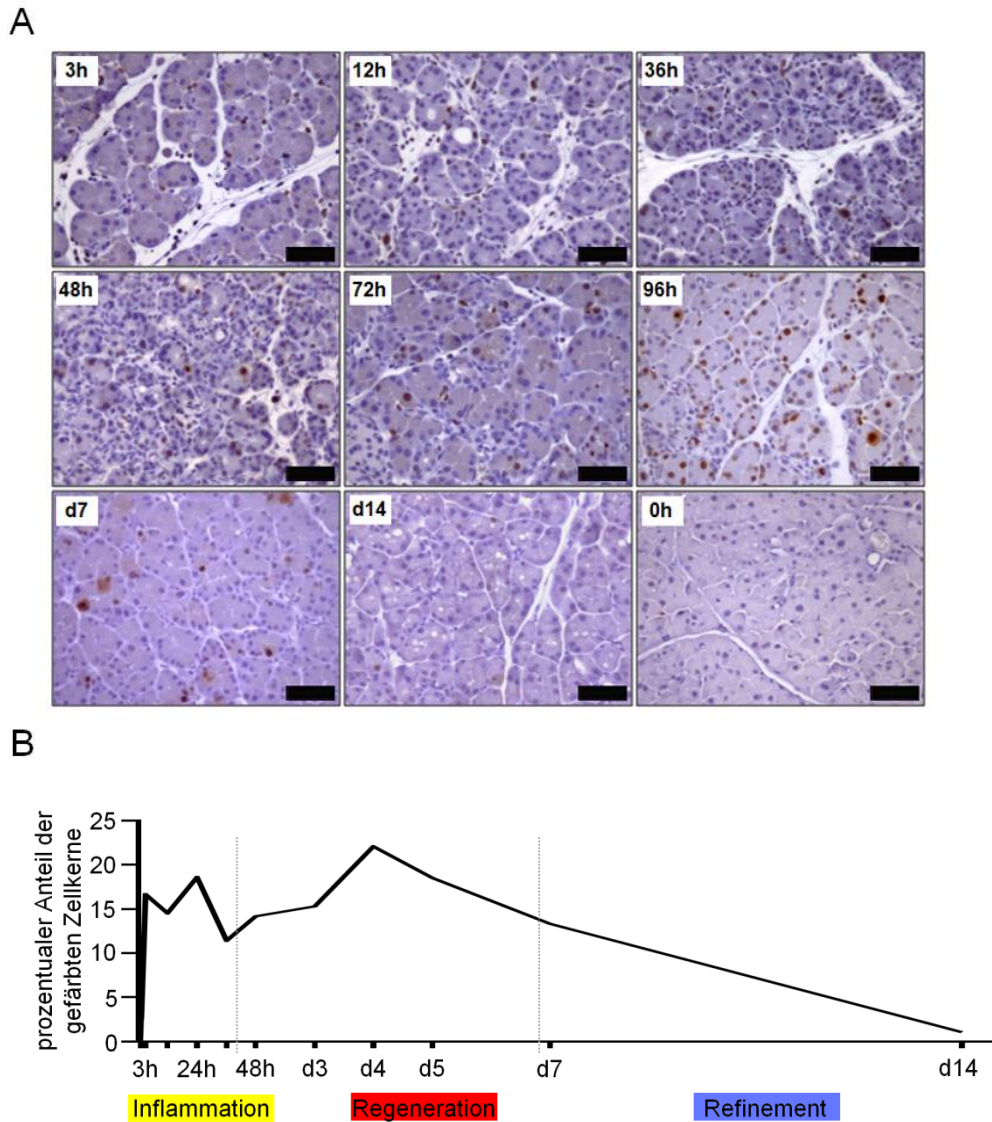


Abb. 6: Quantitative Analyse der Proliferation in der akuten Pankreatitis in WT-Mäusen. Repräsentative Bilder der immunohistochemischen Proliferationsfärbungen (Ki67-Antikörper) (A) und Darstellung der Proliferationsrate im Verlauf der verschiedenen Phasen der Inflammation (Inflammation – Regeneration - Refinement) (B). Es lassen sich zwei Proliferationswellen feststellen, die mit der Inflammations- und der Regenerationsphase korrelieren. Maßstabsbalken: 50 μ m. Die immunohistochemischen Färbungen sowie deren Auswertung erfolgte durch die Erstellerin der Dissertationschrift.

Die Anzahl der Ki67-positiven Zellen steigt zu Beginn der Inflammationsphase steil an und mündet in zwei Peaks bei 3h (16,7%, SD 4,8) und 24h (18,6%, SD 2,5), bevor sie bei 36h auf 11,4% (SD 2,6) sinkt. Danach beginnt ein erneuter Anstieg während der Regenerationsphase bis hin zu einem Maximalwert von 22,1% (SD 7,4) an d4. Schließlich sinkt die Anzahl der proliferierenden Zellen kontinuierlich bis d14 (1,1%, SD 1,0).

Die Evaluation der immunohistochemischen Färbungen offenbarte zwei Proliferationswellen. Die erste korreliert zeitlich mit der Inflammationsphase, während die zweite ein größeres Ausmaß aufweist und zeitlich der Regenerationsphase zugeordnet werden kann. Im Laufe der

Refinement-Phase sinkt die Anzahl der proliferierenden Zellen, bis sie an Tag 14 auf dem Level der Kontrolltiere angelangt ist.

Um einen Einblick dahingehend zu gewinnen, wie sich Immunzellen im Verlauf der akuten Pankreatitis verhalten und welchen Anteil sie an der Gesamtproliferation einnehmen, wurden von Nataliya Valkovskaya immunhistochemische Färbungen mit dem Leukozytenmarker CD45 angefertigt (s. **Abb. 7**).

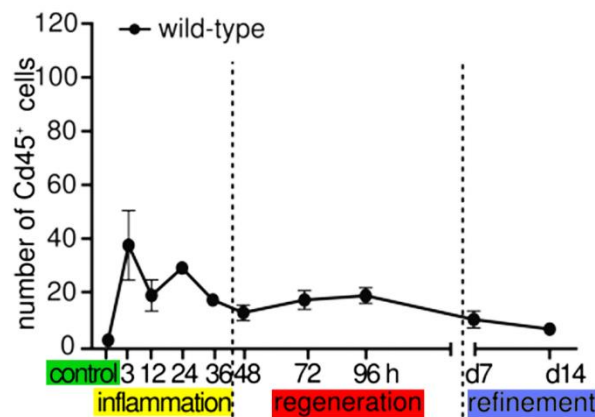


Abb. 7: Anzahl der CD45-positiven Zellen im Verlauf der verschiedenen Phasen der akuten Pankreatitis in WT-Mäusen (in Anlehnung an Kong et al., 2018). Es findet sich ein deutliches Infiltrationsmaximum während der Inflamationsphase. Die immunhistochemischen Färbungen sowie deren Auswertung erfolgte durch Nataliya Valkovskaya.

Zu Beginn der Inflamationsphase nimmt die Anzahl der infiltrierenden Immunzellen (CD45+) stark zu und bildet einen doppelgipfligen Peak bei 3h und 24h. In diesem Abschnitt ähnelt der Verlauf dem der Gesamtproliferation. Nach einer leichten Erhöhung an 96h sinken die Werte langsam wieder ab, an d14 sind sie mit denen der Kontrolltiere vergleichbar.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Proliferation während der Inflamationsphase zu einem Großteil durch Immunzellen bestimmt wird. Dies wird bestärkt durch die Lokalisation vieler proliferierender Zellen im Interstitium, die sich histologisch den Leukozyten zuordnen lassen, während die Zellteilung im Verlauf der Regeneration vermehrt im Gewebe selbst aufzutreten scheint. Für den zweiten Anstieg der Gesamtproliferationsrate, der sich während der Regenerationsphase präsentiert, scheinen die Immunzellen nicht verantwortlich zu sein. Die Frage, welche Zellkompartimente aktiviert werden und welche Zellarten zur Proliferation beitragen, wurde von Dr. Nora Behler weiterbearbeitet (Behler, 2019).

5.2 Einfluss des JNK2-Verlusts auf die pankreatische Regeneration

Die Regulation der Proliferation im Rahmen der Regeneration wird durch die Stresskinasen gesteuert (Fuchs & Steller, 2015; Sun & Irvine, 2014). Es wurde die Auswirkung eines defekten JNK2-Signalwegs auf den Verlauf der Caerulein-induzierten Pankreatitis mithilfe JNK2-defizienter Mäuse analysiert. Nachdem bei den vorherigen Untersuchungen, wie an den jeweiligen Stellen beschrieben, z.T. eine Zusammenarbeit mit Kollegen erfolgte, wurden die ab hier beschriebenen Ergebnisse allein von der Erstellerin der Dissertationsschrift generiert.

5.2.1 Beurteilung der Histologie des Pankreas in JNK2^{-/-}-Tieren nach Induktion einer akuten Pankreatitis

Die JNK2^{-/-}-Tiere wurden wie die WT-Tiere mit Caerulein behandelt, um die Entzündung und Regeneration vergleichen zu können. Mit den genetisch modifizierten Tieren wurde nun ebenso verfahren wie zuvor mit den Wildtyp-Mäusen: Ihnen wurde, dem Regenerationsschema folgend, intraperitoneal Caerulein injiziert. Für die Durchführung der Organentnahme wurden die Zeitpunkte 3h, 24h, 48h, d5 und d7 nach der letzten Injektion gewählt (n = 4).

Mit Hilfe einer H&E-Färbung wurde die mikroskopische Anatomie analysiert und auf potentielle Unterschiede in der Histologie zwischen Knockout- und WT-Mäusen untersucht (s. **Abb. 8**). Bei der Auswertung der Färbungen wurden, analog zu den WT-Tieren, drei Phasen festgestellt (Inflammation, Regeneration, Refinement).

Die Inflamationsphase (3h, 24h) zeichnet sich entsprechend durch Ödembildung und Einwanderung von Immunzellen (s. **Abb. 8 3-48h**, Asterisk), Vakuolisierung von Azinuszellen, der Apoptose einzelner Zellen und Transformationen zu TC (s. **Abb. 8 3-48h**, Pfeil) aus, wobei die Anzahl der einwandernden Immunzellen im Vergleich zum WT vermindert zu sein schien. Während der Regenerationsphase (48h, d5) nimmt die Inflamationsreaktion ab und es konnte reguläres Pankreasgewebe beobachtet werden. In der Refinement-Phase (d7, d14) ist das Pankreasgewebe fast vollständig regeneriert.

Die morphologischen Merkmale entsprechen im Ausmaß in etwa denen der WT-Tiere, demnach konnten zwischen JNK2^{-/-} und WT-Mäusen histologisch keine relevanten Abweichungen gefunden werden.

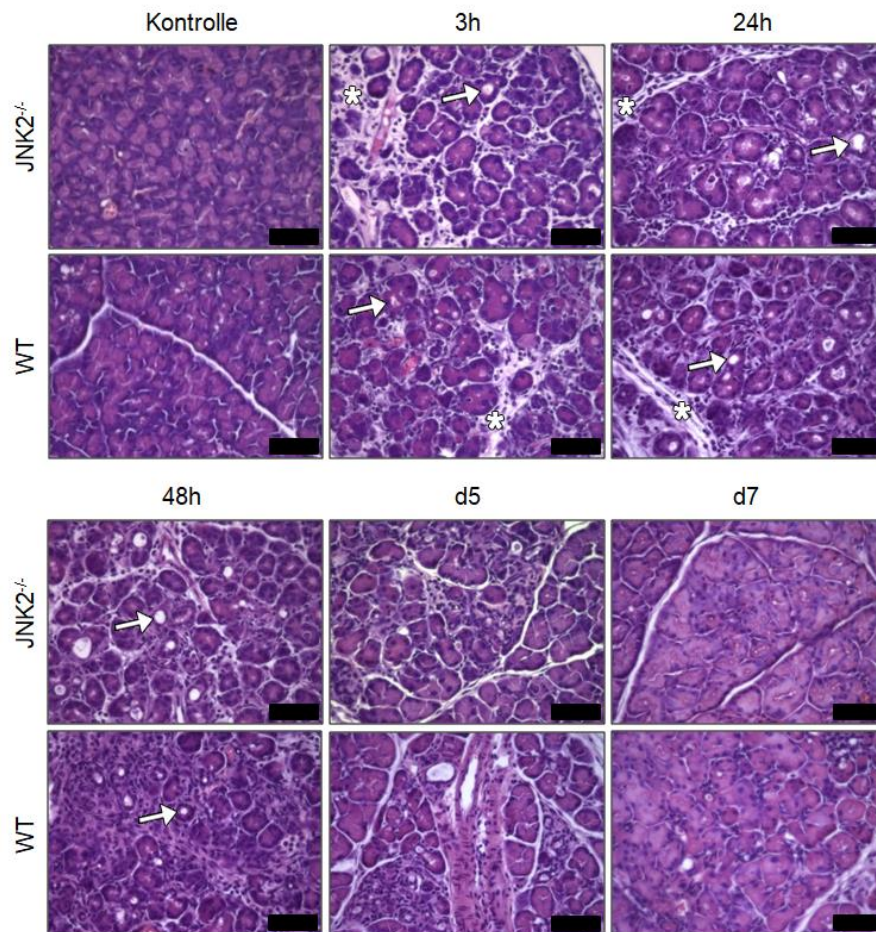


Abb. 8: Repräsentative H&E-Färbung von $JNK2^{-/-}$ und WT-Pankreasgewebe in den verschiedenen Phasen der Regeneration nach Caerulein-Behandlung. Die $JNK2$ -defizienten Versuchstiere präsentieren einen mit dem WT vergleichbaren Verlauf: Während der Inflammationsphase (3h, 24h) finden sich Ödembildung und Immunzellinfiltration (s. Asterisk) und Bildung von azinär zu duktalem Metaplasien (= ADM) (s. Pfeil). Die Regenerationsphase (48h, d5) ist gekennzeichnet durch einen Rückgang dieser Veränderungen und einer Zunahme regulären Pankreasgewebes. In der Refinementphase (d7) ähnelt der Zustand wieder dem der Kontrollen. Maßstabsbalken: 50 μ m.

5.2.2 Proliferationsreaktion

Um potentielle Unterschiede auf funktioneller Ebene festzustellen, wurde das Proliferationsverhalten der Knockout-Mäuse analysiert. Hierfür wurde - analog zu den Versuchen mit WT-Mäusen - eine Gesamtproliferationskurve anhand immunhistochemischer Färbungen mit einem gegen Ki67 gerichteten Antikörper erstellt (s. **Abb. 9**).

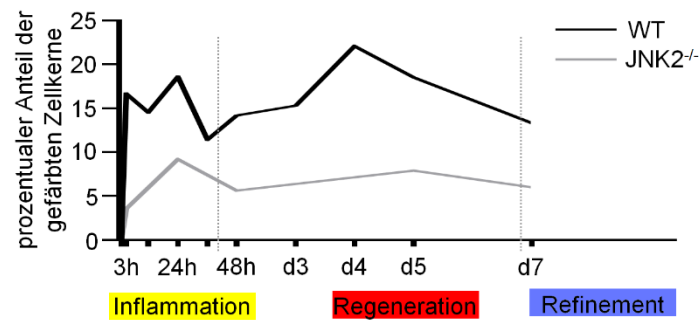


Abb. 9: Quantitative Analyse der Proliferation in der akuten Pankreatitis von JNK2^{-/-}- und WT-Mäusen. In den JNK2^{-/-}- Versuchstieren findet sich zu allen untersuchten Zeitpunkten eine deutlich verminderte Proliferationsrate. Hierbei lassen sich - ähnlich wie im WT - zwei Proliferationswellen beobachten, die mit der Inflammations- und der Regenerationsphase korrespondieren.

Bei Betrachtung der Gesamtproliferation zeigte sich, dass die Werte der JNK2-defizienten Versuchstiere zu allen untersuchten Zeitpunkten deutlich niedriger ausfallen als die der WT-Mäuse. Wie bei den WT-Versuchen konnten bei den JNK2^{-/-}-Mäusen zwei Proliferationspeaks beobachtet werden. Der erste befindet sich bei 24h (9,2%, SD 2,7) und korrespondiert mit der Inflammationsphase, der zweite bei d5 (7,9%, SD 5,2), korrelierend mit der Regenerationsphase. Im Gegensatz zum WT liegt das Proliferationsmaximum der JNK2^{-/-}-Tiere während der Regenerationsphase unter dem der Inflammationsphase. Dies könnte daran liegen, dass als Zeitpunkt der Organentnahme hier d5 gewählt worden war. Betrachtet man die WT-Proliferation fällt jedoch auf, dass der Höhepunkt der Zellteilung schon an d3 bis d4 stattfindet.

5.2.3 Analyse der Zellzyklusphasen

Um der reduzierten Proliferationsrate in JNK2^{-/-}-Mäusen genauer nachzugehen, wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen charakterisiert. Hierfür wurden Antikörperfärbungen etabliert, die in Kombination vollständig den aus G1-, S-, G2- und M-Phase bestehenden Zellzyklus repräsentieren (s. **Abb. 10**).

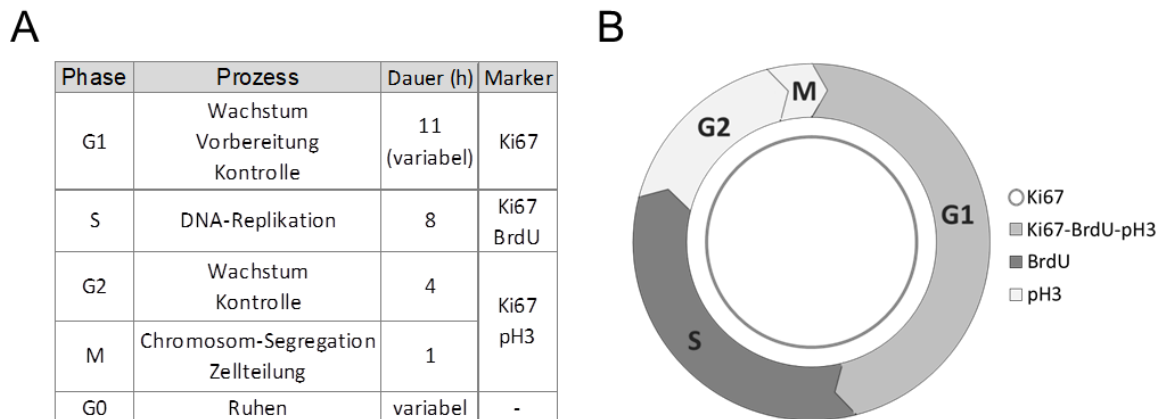


Abb. 10: Überblick über die eukaryotischen Zellzyklusphasen und deren Markierung durch Antikörper. Tabelle mit Darstellung der während der einzelnen Zellzyklusphasen ablaufenden Prozesse und deren Dauer, sowie die Markierung durch entsprechende Antikörper (A). Darstellung der relativen Dauer der Zellzyklusphasen und deren Markierung durch Antikörper (B).

Neben Ki67, das sämtliche Zellphasen umfasst, wurden Antikörper gegen pH3 (= phosphoryliertes Histon 3) und BrdU (= Bromodeoxyuridin) eingesetzt. pH3 bildet eine Komponente der Chromatinstruktur der Chromosomen. Dessen Modulation beeinflusst die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und führt dadurch zu einer modifizierten Genexpression. Eine Phosphorylierung und somit Aktivierung findet vorwiegend in der späten G2- und M-Phase statt, während BrdU als Marker für die S-Phase dient, da es als Thymidinanalogon in die DNA inkorporiert wird.

Die immunhistochemischen Färbungen in den JNK2^{-/-}-Mäusen sowie im WT wurden per Auszählung ausgewertet (s. **Abb. 11**).

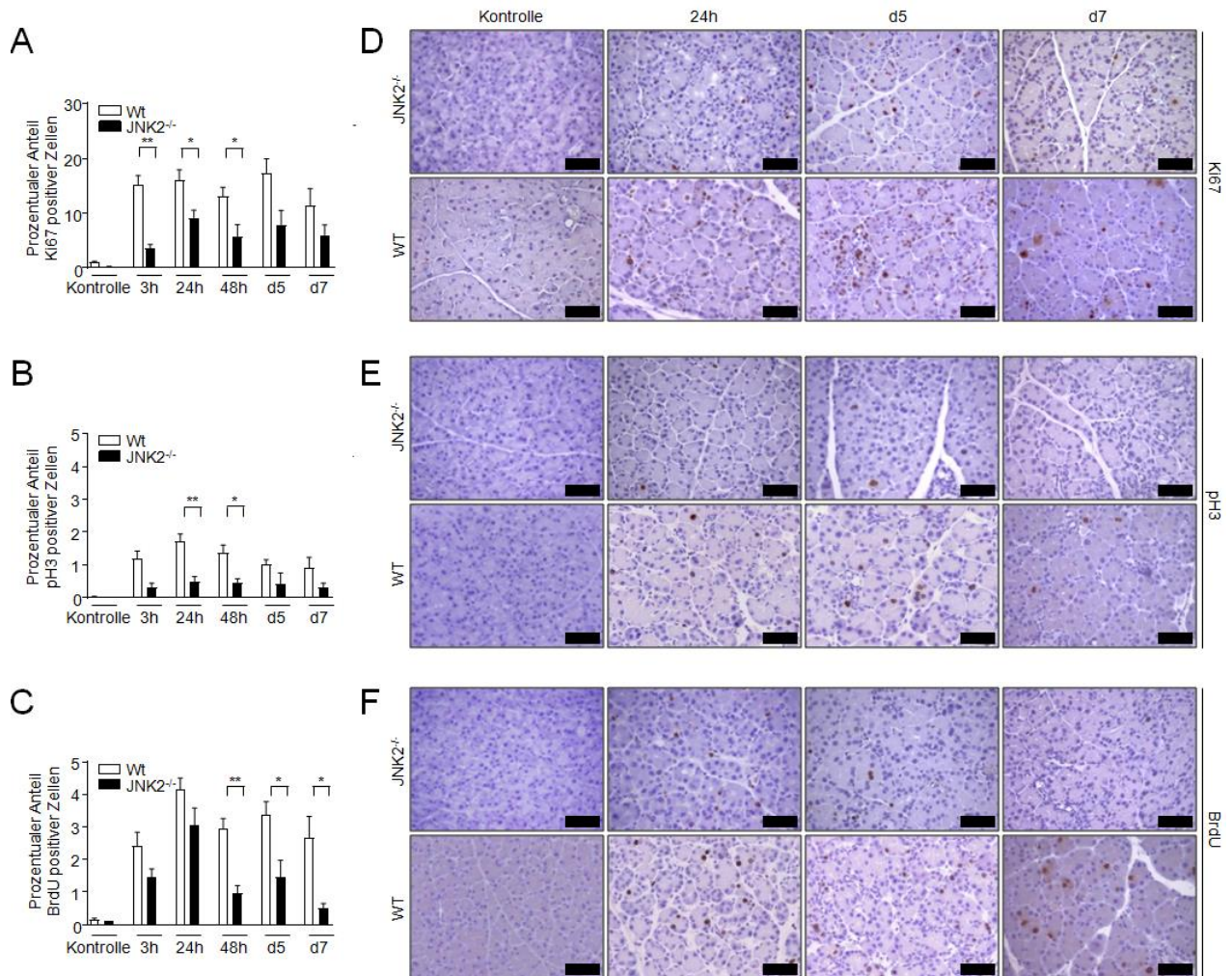


Abb. 11: Analyse der Zellzyklusphasen im Inflamationsverlauf von WT- und JNK2^{-/-}-Pankreata. Die Anzahl der proliferierenden Zellen ist in JNK2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT zu allen untersuchten Zeitpunkten vermindert: Die Gesamtproliferation, dargestellt durch Ki67 (A), die durch pH3 gekennzeichnete G2/M-Phase (B) sowie die von BrdU repräsentierte S-Phase (C). Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen mit Ki67 (D), pH3 (E) und BrdU (F). Maßstabsbalken: 50 µm. Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken den Standardfehler der Mittelwerte dar. Einfacher t-Test, *: p<0.05; ** p<0.01; ***: p<0.001.

Die Zellzyklusanalyse zeigte auf, dass die JNK2-defizienten Tiere an allen untersuchten Zeitpunkten geringere Proliferationswerte aufweisen als die WT-Mäuse (s. **Abb. 11 A-C**). Für Ki67 konnte an den Zeitpunkten 3h, 24h und 48h ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, für pH3 an 24h und 48h sowie für BrdU an 48h, d5 und d7. Zur besseren Veranschaulichung der Zellzyklusphasenverteilung wurde ein gestapeltes Flächendiagramm von den JNK2^{-/-}- und WT-Tieren erstellt (s. **Abb. 12**).

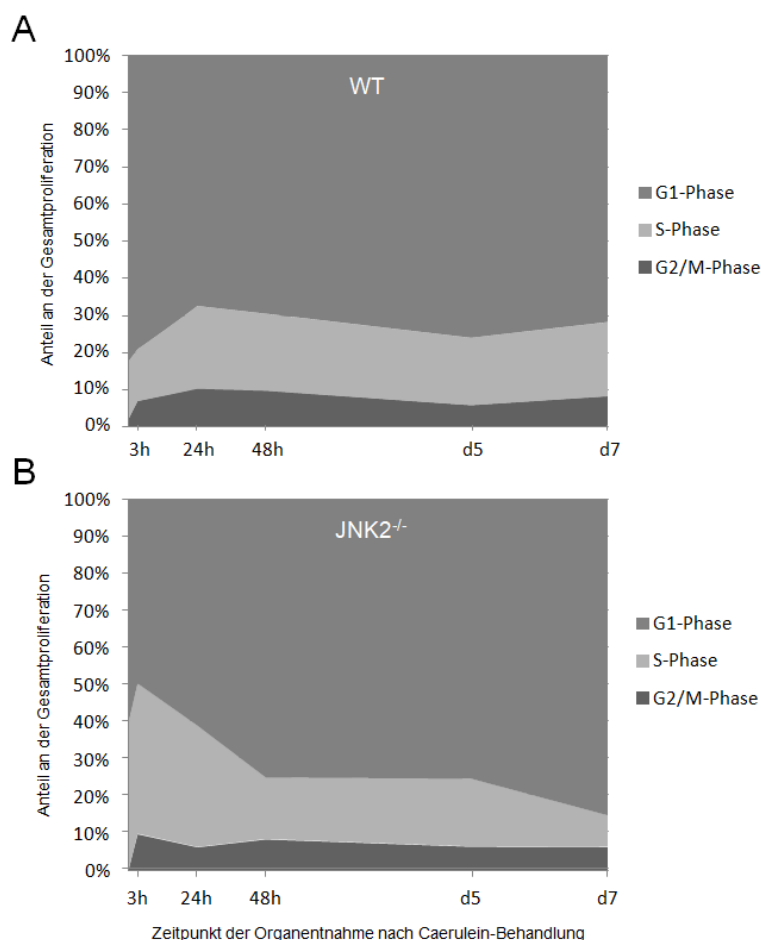


Abb. 12: Verteilung der Zellzyklusphasen in Relation zur Gesamtproliferation im Verlauf der Pankreatitis in JNK2^{-/-}- und WT-Mäusen. Das Verhältnis der einzelnen Zellzyklusphasen zueinander gestaltet sich im WT annähernd konstant (A). In den JNK2-defizienten Mäusen lässt sich in den ersten 48 Stunden nach Pankreatitisinduktion ein deutlicher Anstieg der S-Phase feststellen, der im Verlauf auf ein ähnliches Level wie im WT abnimmt (B).

Im WT verhält sich der Anteil der Zellzyklusphasen im Verlauf der Pankreatitis annähernd konstant, wobei die S-Phase durchgehend etwa 18-22%, die G2/M-Phase 5-8% einnimmt nach einem geringen Peak bei 24h mit ca. 10% (s. **Abb. 12 A**). In den JNK2^{-/-}-Mäusen kann in den ersten 48 Stunden nach Induktion der akuten Pankreatitis ein starker Anstieg des S-Phasen-Anteils mit bis zu 40% beobachtet werden, im weiteren Verlauf nimmt dieser ab und ist vergleichbar mit dem WT (16-18%), er erreicht ein Minimum an d14 mit 8% (s. **Abb. 12 B**). Der G2/M-Phasen-Anteil zeigt nach 3h einen geringen Peak mit über 9% und verläuft dann mit 5-7% auf einem ähnlichen Niveau wie im WT.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im gesamten Inflamationsverlauf eine deutlich verminderte Zellteilungsrate in den JNK2-defizienten Mäusen zu beobachten war. Dabei konnte, ähnlich wie bei den WT-Mäusen, eine Tendenz zu zwei Proliferationspeaks ausgemacht werden. Die Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung offenbarte in den

JNK2^{-/-}-Mäusen in den ersten 48 Stunden nach Auslösung einer Caerulein-induzierten Pankreatitis einen im Vergleich zum WT deutlich erhöhten S-Phasen-Anteil.

5.3 Einfluss des JNK2^{-/-}-Verlusts auf die frühe Phase der akuten Pankreatitis

5.3.1 Grad der Inflammation

5.3.1.1 Level der Pankreasenzyme Amylase und Lipase

In der Begutachtung der Histologie der JNK2^{-/-}-Mäuse ergab sich der Eindruck, dass die Anzahl der infiltrierenden Immunzellen im Vergleich zum WT vermindert sein könnte (s. Abschnitt 5.2.2. „Beurteilung der histologischen Struktur“). Für die detaillierte Analyse der Inflammationsreaktion wurde ein Protokoll zur Auslösung der akuten Pankreatitis gewählt, das eine bessere Beurteilung der frühen Phase der Inflammation ermöglicht. Hierfür wurden WT- und JNK2^{-/-}-Mäusen 10 Injektionen Caerulein (Gesamtdosis pro Versuchstier 10 µg) stündlich verabreicht. Mit isotoner Kochsalzlösung behandelte Tiere dienten als Kontrolle. Organe und Blut wurden eine Stunde nach der letzten Injektion entnommen.

Amylase und Lipase sind Verdauungsenzyme, die im Pankreas gebildet und bei einer Entzündung des Pankreas vermehrt freigesetzt werden. Obwohl nicht immer eine direkte Korrelation mit dem Schweregrad der Entzündung besteht, wurde der Serumspiegel dennoch zur ersten Einschätzung verwendet. Die Serumlevel von Amylase und Lipase wurden vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar (München) gemessen (s. **Abb. 13 A-B**).

Der durchschnittliche Amylase-Level der mit isotoner Kochsalzlösung behandelten Kontrollmäuse lag bei 1716 U/l (WT, n=6) und 1855 U/l (JNK2^{-/-}, n=6). Nach Induktion der akuten Pankreatitis stiegen diese an auf 22408 U/l (WT, n=8) und 40447 U/l (JNK2^{-/-}, n=10).

Die Kontrollmäuse wiesen mittlere Lipase-Level von 49 U/l (WT, n=6) und 41 U/l (JNK2^{-/-}, n=6) auf. Bei den mit Caerulein behandelten Mäusen konnten Durchschnittswerte von 686 U/l (WT, n=8) und 1393 U/l (JNK2^{-/-}, n=10) gemessen werden.

Verglichen mit den Kontrollmäusen konnte bei allen mit Caerulein behandelten Versuchstieren ein deutlicher Anstieg der Pankreasenzyme Amylase und Lipase beobachtet werden, was auf die Entwicklung einer akuten Pankreatitis hindeutet. Die JNK2-defizienten Mäuse wiesen dabei statistisch signifikant höhere Amylase- und Lipaselevel als die Wildtyp-Mäuse auf (s. **Abb. 13 A-B**).

5.3.1.2 Transformation des Pankreasgewebes

Zur Beurteilung der morphologischen Strukturen wurde eine H&E-Färbung an Paraffinschnitten durchgeführt (s. **Abb. 13 C**). In allen Caerulein-behandelten Versuchstieren lassen sich eine Ödembildung, Einwanderung von vermutlich Immunzellen, beginnende ADM und nekrotische Areale erkennen. Das Ausmaß der Veränderungen zeigt sich in den JNK2^{-/-}-Mäusen deutlich stärker ausgeprägt, einzig die Zellinfiltration scheint in den Knockout-Tieren vermindert zu sein.

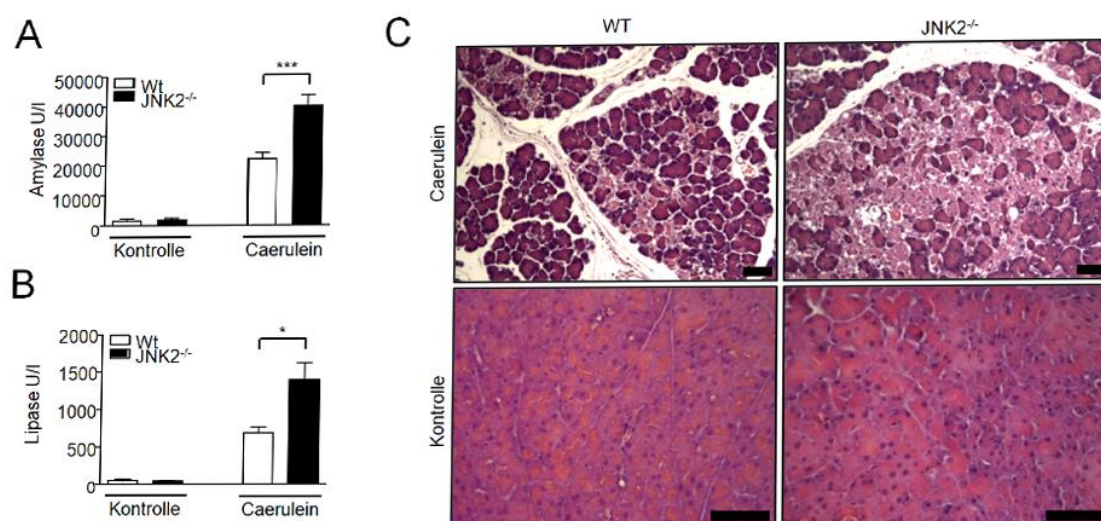


Abb. 13: Die Ausprägung der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis in WT und JNK2-defizienten Mäusen. Die Serumspiegel der Pankreasenzyme Amylase (A) und Lipase (B) sind in JNK2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT deutlich erhöht. Repräsentative Bilder einer H&E-Färbung zeigen eine verstärkte Ausprägung der Inflammation (C). Maßstabsbalken: 50 μ m. Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken den Standardfehler der Mittelwerte dar. Einfacher t-Test, *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$.

5.3.2 Immunzellreaktion

Zur Überprüfung und Objektivierung der Hypothese, dass in den JNK2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen die Anzahl der infiltrierenden Immunzellen in einer akuten Pankreatitis verringert ist, wurden immunhistochemische Färbungen mit dem Leukozytenoberflächenmarker CD45 durchgeführt. Für die Auswertung wurden zufällig ausgewählte Bereiche von Interesse (= region of interest = ROI) verwendet (s. **Abb. 14**).

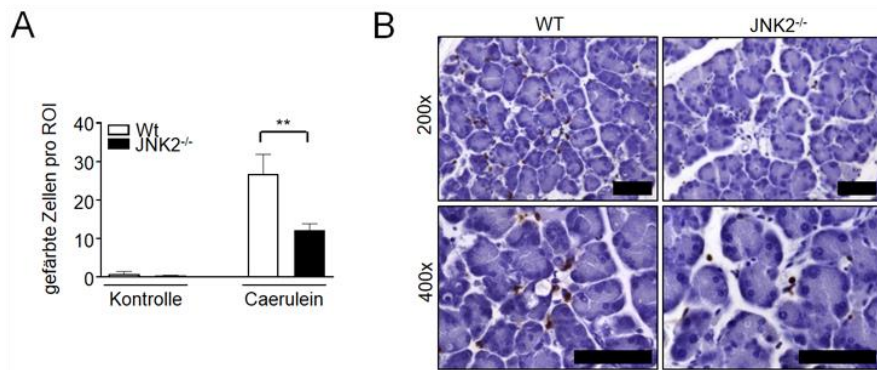


Abb. 14: Anzahl der CD45-positiven Zellen in einer akuten Pankreatitis von WT- und JNK2^{-/-}-Mäusen. Die Anzahl der gefärbten Zellen ist in JNK2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT vermindert (A). Repräsentative Bilder der analysierten immunohistochemischen CD45-Färbungen (B). Maßstabsbalken: 50 μ m. Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken den Standardfehler der Mittelwerte dar. Einfacher t-Test, ** $p < 0.01$.

Die Anzahl der gefärbten Zellen pro ROI betrug in den WT-Kontrolltieren 0,8 (n=6) und in den JNK2^{-/-}-Kontroll-Mäusen 0,2 (n=6). In den mit Caerulein behandelten WT-Mäusen wurde eine mittlere Anzahl von 26,8 Zellen (n=8) pro ROI beobachtet, während die JNK2-defizienten Mäuse einen Durchschnittswert von lediglich 12,0 (n=10) gefärbten Zellen pro ROI aufwiesen. Der Unterschied erwies sich als statistisch hoch signifikant.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Neutrophilen in einer akuten Pankreatitis von JNK2^{-/-}-Mäusen vermindert ist.

5.3.3 Ausbildung von E-Cadherin, Hsp 27 und Claudin 4

Die Forschungsgruppe um Yutaka Shimada untersuchte die Genexpression in der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis in WT-Mäusen (Nakada et al., 2010). Unter den Genen, die als hochreguliert identifiziert werden konnten, befanden sich unter anderem solche, die für Zell-Zell-Verbindungen und die Durchführung der Stressreaktion benötigt werden (s. **Appendix II**). Dazu zählen das Transmembranprotein E-Cadherin (6,50-fach erhöht), das Chaperon Hitzeschockprotein 27 (= Heat shock protein 27 = Hsp 27) (6,75-fach erhöht) und das Tight Junction-Protein Claudin 4 (165,90-fach erhöht). Aufgrund der weitreichenden Rolle von JNK, die in manchen Organen und Zellarten auch die Regulation verschiedener Zellverbindungsproteine und Hsp umfasst (Tokuda et al., 2003; Zheng et al., 2014), sollte geprüft werden, ob deren Dysfunktion für die Pathologie der JNK2^{-/-}-Mäuse verantwortlich ist.

5.3.3.1 Immunhistochemie

Hierfür wurden zunächst immunhistochemische Analysen der WT- und JNK2^{-/-}-Mäuse mit gegen E-Cadherin, Claudin 4 und Hsp 27 gerichteten Antikörpern durchgeführt (s. **Abb. 15 A**).

Während sich im Gewebe der mit E-Cadherin gefärbten Kontrolltiere keine Anfärbung abzeichnet (s. **Appendix III**), ist in den mit Caerulein behandelten Mäusen eine spezifische E-Cadherin-Färbung der Zellmembran zu erkennen. Dabei war in der Ausprägung kein relevanter Unterschied zwischen den WT- und JNK2^{-/-}-Mäusen zu detektieren.

Auch für Claudin 4 konnte keine Färbung in den Kontrolltieren nachgewiesen werden (s. **Appendix III**), wohingegen die Versuchstiere mit induzierter Pankreatitis eine spezifische Claudin 4-Anfärbung der Zellmembranen aufweisen. In den JNK2^{-/-}-Mäusen konnte eine Tendenz zur geringeren Ausprägung von Claudin 4 beobachtet werden.

In den mit Hsp 27 gefärbten Kontrollschnitten fand sich keine spezifische Färbung (s. **Appendix III**), während in den Caerulein-behandelten Mäusen eine zytoplasmatische Anfärbung sichtbar wurde. In der Intensität bestehen sowohl innerhalb verschiedener Bereiche der einzelnen Schnitte als auch zwischen den einzelnen Versuchstieren größere individuelle Varianzen, so dass eine genaue Einschätzung bezüglich der Unterschiede zwischen JNK2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nicht möglich war.

Zusammengefasst ergab sich bei der Färbung mit E-Cadherin zunächst kein Hinweis auf eine unterschiedliche Ausprägung zwischen WT- und JNK2^{-/-}-Mäusen, Claudin 4 schien in den JNK2^{-/-}-Mäusen tendenziell leicht reduziert zu sein und bei der Untersuchung von Hsp 27 konnten aufgrund der individuellen Unterschiede in der Anfärbung keine aussagekräftigen Schlüsse gezogen werden, weswegen weiterführende Experimente durchgeführt wurden.

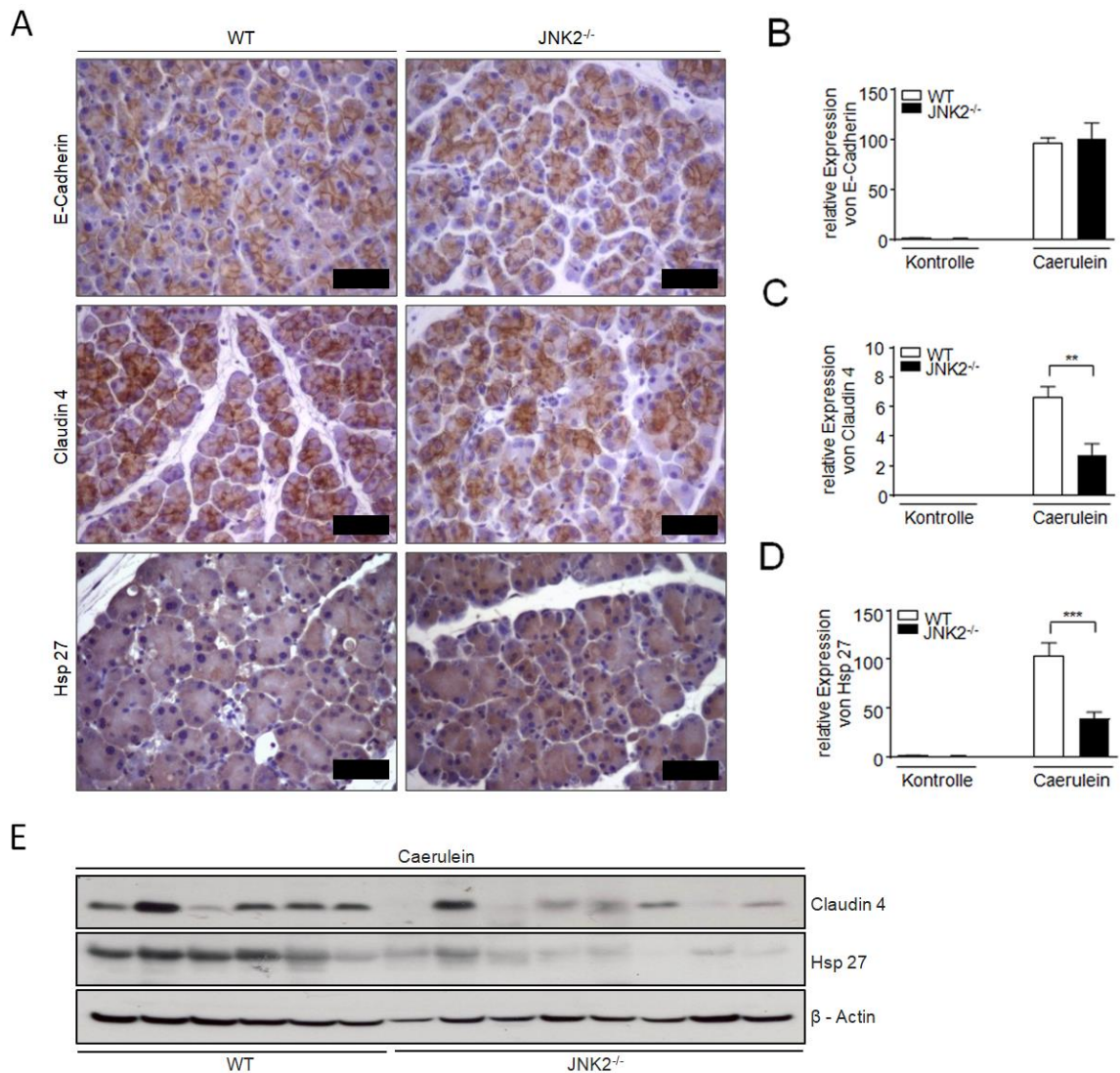


Abb. 15: Ausprägung von E-Cadherin, Claudin 4 und Hsp 27 in der akuten Pankreatitis von WT- und JNK2^{-/-}-Mäusen. In den immunohistochemischen Färbungen ließen sich keine eindeutigen Unterschiede feststellen und objektivieren. Maßstabsbalken: 50 µm. (A). Die Untersuchung der E-Cadherin-Expression durch qRT-PCR-Analysen ergab keinen relevanten Unterschied (B), jedoch konnte eine deutlich verminderte Expression von Claudin 4 (C) und Hsp 27 (D) in JNK2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT festgestellt werden. Die Claudin 4 - Werte der mit isotoner Kochsalzlösung behandelten Kontrolltiere konnten nicht verwertet werden, so dass die Normalisierung hier in Bezug auf die Caerulein-behandelten WT-Mäuse erfolgte (C). Die Herabregulation von Hsp 27 und Claudin 4 konnte durch Western-Blot-Untersuchungen auf Proteinebene bestätigt werden (E). Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken den Standardfehler der Mittelwerte dar. Einfacher t-Test, ** p<0.01; ***: p<0.001.

5.3.3.2 Quantitative real-time PCR

Zur Objektivierung potentieller Unterschiede zwischen JNK2-defizienten und WT-Tieren nach einer akuten Pankreatitis wurde die Expression von E-Cadherin, Claudin 4 und Hsp 27 auf mRNA-Ebene analysiert (s. **Abb. 15 B-D**).

Im Vergleich zu den Kontrolltieren präsentierten sich die E-Cadherin-Level der mit Caerulein behandelten Mäuse als deutlich erhöht. Dabei ließ sich jedoch kein relevanter Unterschied zwischen den JNK2^{-/-}- und den WT-Mäusen nachweisen (s. **Abb. 15 B**).

Die Hsp 27 – Expression der Versuchstiere, die Caerulein erhalten hatten, ist im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenfalls erhöht. Die Ausprägung ist dabei in den JNK2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp um das 2,64-fache vermindert, ein Unterschied, der sich als statistisch höchst signifikant erwies ($p=0,0005$) (s. **Abb. 15 C**).

Die Claudin 4 - Werte der mit isotoner Kochsalzlösung behandelten Kontrolltiere konnten nicht verwendet werden, da auch nach Überschreiten von 40 Zyklen noch kein ausreichendes Signal detektiert werden konnte. Die Werte wurden daraufhin in Bezug auf die mit Caerulein behandelten WT-Mäuse normalisiert. Die Expression von Claudin 4 präsentierte sich dabei im Vergleich zu den WT-Mäusen um das 2,41-fache vermindert, wobei es sich um einen statistisch hoch signifikanten Unterschied handelt ($p=0,0018$) (s. **Abb. 15 D**).

5.3.3.3 Western Blot

Basierend auf den bisher erlangten Erkenntnissen wurde überprüft, ob sich die verminderte Expression der mRNA von Claudin 4 und Hsp 27 in JNK2-defizienten Mäusen auch auf der Proteinebene widerspiegelt (s. **Abb. 15 E**).

Bei den WT-Mäusen weisen alle Proben eine sichtbare Bande auf Höhe von Claudin 4 (22 kDa) auf, im Vergleich innerhalb der Gruppe zeigt sich dabei eine von insgesamt sechs untersuchten Proben stärker und eine schwächer ausgeprägt. In den Proben der JNK2^{-/-}-Mäuse konnte im Vergleich zum Wildtyp eine der Banden als verstärkt wahrgenommen werden, die restlichen sieben von insgesamt acht untersuchten Proben ergaben eine abgeschwächte Ausprägung bei gleicher Ladung (s. β -Actin) ($n=8$).

Auf Höhe von Hsp 27 (27 kDa) konnten in allen Wildtyp-Proben gut sichtbare Signale detektiert werden, wobei sich eine der sechs Banden leicht abgeschwächt darstellt. Von den acht analysierten JNK2^{-/-}-Proben erscheinen mit einer Ausnahme sämtliche Proben im Vergleich zur WT-Gruppe in der Ausprägung deutlich reduziert.

Somit weisen die Ergebnisse des Western Blot – Verfahrens auf eine geringere Expression der Proteine Claudin 4 und Hsp 27 in JNK2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT hin und unterstützen die Ergebnisse der mRNA-Analyse. In JNK2^{-/-}-Tieren scheinen Hsp 27 und Claudin 4 auf Ebene der mRNA und auf Protein-Ebene herabreguliert zu sein.

Für E-Cadherin ergab sich in der qRT-PCR kein Unterschied in der mRNA-Expression zwischen den beiden Gruppen nach Caerulein-Induktion. Auf Proteinebene konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

5.4 Auswirkung erhöhter Hsp 27-Konzentrationen auf die akute Pankreatitis in WT-Mäusen

Um der Vermutung nachzugehen, dass erhöhte Hsp 27-Konzentrationen einen protektiven Effekt auf die akute Pankreatitis ausüben, wurde WT-Mäusen eine Stunde vor Beginn der Caerulein-Behandlung subkutan rekombinantes Hsp 27 injiziert. Um eine Arbeitsdosis zu bestimmen, wurden verschiedene Hsp 27-Konzentrationen (D1=10 µg, D2=1 µg, D3=0,1 µg, D4=0,01 µg, D5=0,001 µg) getestet (n=2 pro Gruppe). Die Hälfte der Versuchsgruppen erhielt zusätzlich noch eine weitere Gabe derselben Dosis unmittelbar vor der fünften Caerulein-Injektion (als „x2“ in der Abb. 16 gekennzeichnet).

Aus dem eine Stunde nach der letzten Caerulein-Injektion entnommenen Blut wurde Serum gewonnen und dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar (München) zur Bestimmung der Serumlevel der Pankreasenzyme Amylase und Lipase übergeben (s. **Abb. 16**).

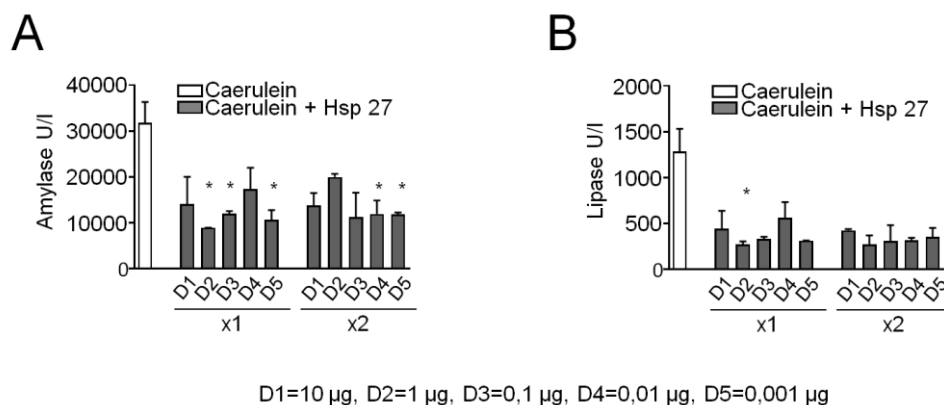


Abb. 16: Serumlevel der Pankreasenzyme Amylase und Lipase nach Injektion verschiedener Dosierungen eines rekombinanten Hsp 27 in einer akuten Pankreatitis in WT-Mäusen. In sämtlichen mit Hsp 27 behandelten Mäusen zeigen sich verminderte Amylase- (A) und Lipase-Werte (B). Die Kennzeichnung „x1“ und „x2“ im Bereich der X-Achse steht für die Häufigkeit der Applikation der gewählten Dosis. Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken den Standardfehler der Mittelwerte dar. Einfacher t-Test, *: $p < 0.05$.

In allen mit Hsp 27 vorbehandelten Versuchstieren konnten im Vergleich zu den Mäusen, die ausschließlich Caerulein erhalten hatten, deutlich verminderte Amylase- und Lipase-Konzentrationen festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass durch die Applikation von Hsp 27 eine Abmilderung der akuten Pankreatitis bewirkt werden kann. Um diese These zu unterstützen, wurde der Versuch mit einer höheren Fallzahl wiederholt mit zweimaligen Injektionen von 10 µg Hsp 27 (n=5-14; s. **Tabelle 12** in Abschnitt 4 „Methoden“). Hierfür

wurde eine zweimalige Injektion von 10 µg Hsp 27 gewählt. Auch in diesem Versuch zeigten die mit rekombinantem Hsp 27 behandelten Mäuse (nicht-signifikant) reduzierte Amylase- und Lipase-Werte (s. **Abb. 17**).

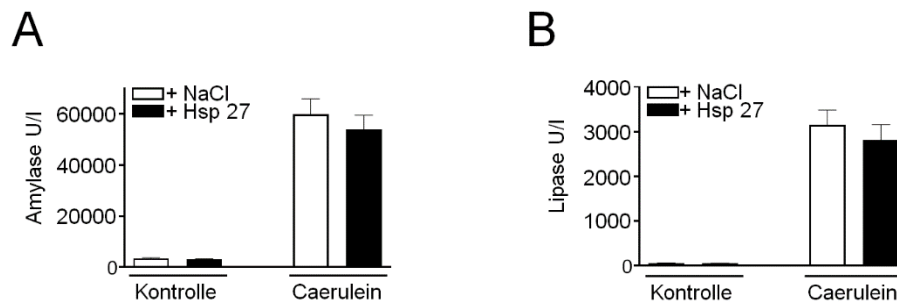


Abb. 17: Serumlevel der Pankreasenzyme Amylase und Lipase nach Injektion von rekombinantem Hsp 27 in einer akuten Pankreatitis in WT-Mäusen. Die mit Hsp 27 behandelten Versuchstiere wiesen die Tendenz zu verminderten Amylase- (A) und Lipase-Konzentrationen (B) auf, eine statistische Signifikanz konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken den Standardfehler der Mittelwerte dar.

6 Diskussion

6.1 Die Inflammation ist ein Prozess, der in drei klar voneinander abgrenzbaren Phasen verläuft

Das in dieser Arbeit gewählte Verfahren zur Induktion einer Pankreatitis wird am häufigsten verwendet (Perides et al., 2005) und folgt dem etablierten Protokoll der supramaximalen intraperitonealen Injektionen von Caerulein (Jensen et al., 2005). Dies führt zur Ausbildung einer Entzündung im Nagetierpankreas mit Autodigestion, Ödembildung, Vakuolisierung, Azinuszelldegranulation, erweiterten Azinuszellen, Nekrose und zytoplasmischer Destruktion der pankreatischen Azini (Lampel & Kern, 1977; Yamaguchi et al., 1989) und ist in ihren Eigenschaften mit der humanen Pankreatitis vergleichbar. Natürlich gilt es dennoch zu beachten, dass die Bedingungen im Mausmodell sich nicht eins zu eins auf den Menschen übertragen lassen. Versuche am Tier können immer nur eine Annäherung an die Gegebenheiten des Menschen darstellen.

6.1.1 Auf Ebene der Histologie

In der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Analyse der voranschreitenden Veränderungen des dynamischen Regenerationsprozesses durch eine hohe zeitliche Auflösung durchgeführt. Bisherige Forschungsarbeiten weisen keine so enge zeitliche Aufschlüsselung der frühen Phase einer akuten Pankreatitis auf (Jensen et al., 2005; Morris et al., 2010b; Nakada et al., 2010). Histologisch konnte eine klar abgrenzbare Einteilung des Entzündungsverlaufs in drei verschiedene Phasen, nach deren Funktionalität als Inflammations-, Regenerations- und Refinement-Phase benannt, identifiziert werden: Die Inflammationsphase in den ersten 36 Stunden zeigt sich morphologisch mit Ödembildung, Immunzellinvasion, Vakuolisierung von Azinuszellen, vereinzelt auftretender Apoptose sowie der Bildung von TC und weist somit typische Zeichen einer Pankreatitis auf (Klöppel et al., 1986). Tag 2 bis Tag 6 entspricht der Regenerationsphase: Die Inflammationsreaktion, die Anzahl der apoptotischen Zellen und die TC nehmen ab; es kann vermehrt reguläres Pankreasgewebe beobachtet werden. Der Regenerationsphase schließt sich von Tag 7 bis Tag 14 die Refinement-Phase an, während der die Rückstände der erfolgten Veränderungen abgebaut werden. Das folgenlose Abheilen innerhalb von 14 Tagen nach Caeruleingabe entspricht bisherigen Beobachtungen (Guerra et al., 2011). Wesentlich und bislang einzigartig ist die hohe zeitliche Auflösung des Versuchsaufbaus, die eine eindeutige Einteilung des Verlaufs der akuten Pankreatitis in die drei beschriebenen Phasen erlaubt.

6.1.2 Auf molekularer Ebene

Die Untersuchung der Pankreatitis und deren Regeneration auf molekularer Ebene erfolgte mit Microarray-Analysen. Im Rahmen eines unüberwachten Clustering wurden die Proben der einzelnen Zeitpunkte zunächst nach Ähnlichkeit der Transkriptionsprofile in Gruppen zusammengefasst, wobei sich vier verschiedene, den histologisch vordefinierten Gruppen entsprechende, Cluster ergaben: Die der unbehandelten Kontrollen, der Inflammations-, der Regenerations- und der Refinement-Phase. Einzig eine Tag 14 – Probe und die des 36h – Zeitpunkts fanden sich in der molekularen Analyse entgegen der ursprünglichen Einteilung im Regenerationscluster wieder. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die molekularen Veränderungen zum 36h – Zeitpunkt noch nicht zu einer Anpassung der Morphologie geführt hatten. Aufgrund der histologisch eindeutigen Zuteilung zur Inflammationsphase wurden diese Proben dennoch weiterhin als dieser zugehörig behandelt.

Die Anwendung einer Hauptkomponentenanalyse offenbarte Übereinstimmungen in den Profilen der unbehandelten Kontrolltiere und der Refinement-Phase, während sich die der Inflammations- und Regenerationsmuster sowohl von diesen als auch untereinander unterschieden. Somit stützt auch die Hauptkomponentenanalyse die auf Basis der Histologie getroffene Phaseneinteilung des Inflammationsverlaufs. Des Weiteren zeigte sich, dass die einzelnen Phasen ineinander übergingen, so dass sich ein zyklischer Verlauf von Kontrolle zur Inflammation und über die Regeneration hin zur Refinement-Phase und wieder zurück zum Ausgangspunkt der Kontrollen ergab. Dies weist darauf hin, dass die Inflammation einen sich selbst auflösenden Prozess darstellt und lässt vermuten, dass es hierfür eines zeitlich stark kontrollierten und koordinierten Ablaufs bedarf (Kong et al., 2018).

Die bioinformatische Auswertung konnte während der Inflammationsphase Gennetzwerke identifizieren, die eine entzündliche Signatur aufweisen. Weiterhin zeigte sich, dass die Organrekonstitution auf einer komplexen Interaktion eines Gennetzwerks basiert, das die Azinuszellhomöostase, die exokrine Spezifizierung und die interzelluläre Signalübertragung steuert. Eine ausführliche Besprechung der Microarray-Daten findet sich in der Dissertation von Dr. P. Bruns (Bruns, 2016) und der Publikation der Arbeitsgruppe (Kong et al., 2018).

6.1.3 Auf Ebene der Proliferation

Zur Feststellung, ob sich die getroffene Phaseneinteilung auch auf Ebene der Zellproliferation widerspiegelt, wurde die Proliferation im Pankreasgewebe an verschiedenen Zeitpunkten durch immunhistochemische Analysen untersucht. Hierbei gilt zu bedenken, dass nur ein geringer Ausschnitt des Pankreas betrachtet wurde, der möglicherweise nicht

repräsentativ für das gesamte Organ sein muss. Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurden daher immer je fünf Ausschnitte aus verschiedenen Bereichen eines Gewebeschnitts analysiert. Da die Auszählung manuell erfolgte, ist eine gewisse Varianz nicht auszuschließen.

Ki67, ein Marker für sämtliche sich in der Teilung befindenden Zellen, zeigte zwei klar voneinander trennbare Proliferationswellen. Nach einem ersten deutlichen Anstieg mit einem doppelgipfligen Peak innerhalb der ersten 24h kam es zu einem Absinken der Anzahl der sich teilenden Zellen nach 36h. Somit zeigte sich die erste Welle in einem direkten zeitlichen Zusammenhang zu der Inflammationsphase. Der zweite Anstieg vollzog sich mit einem Peak an d4 und einem darauffolgenden stetigen Abflachen, bis die Proliferationswerte beinahe auf die der Kontrolle sanken. Die zweite Welle korrelierte zeitlich mit der Regenerationsphase. Somit konnte gezeigt werden, dass auch das Proliferationsverhalten die histologisch vorbestimmten Phasen rekapituliert (Kong et al., 2018). Die Rekrutierung von Immunzellen erfolgt bereits frühzeitig nach Induktion der Pankreatitis durch Caerulein (Abdulla et al., 2011; Gukovskaya et al., 2002). Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnten innerhalb der ersten 36h histologisch und immunhistochemisch vermehrt Leukozyten nachgewiesen werden. Vermutlich lässt sich die Proliferationswelle in der Inflammationsphase durch einen Anstieg sich teilender Immunzellen begründen.

Da die inflammatorische Schädigung des Pankreas durch Caerulein mit Verlusten im Bereich des azinären Kompartiments einhergeht (Lerch & Gorelick, 2000), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die mit der Regenerationsphase korrelierende Proliferationswelle vornehmlich von Azinuszellen gebildet wird - bzw. von einer Zellart, aus der diese hervorgehen - um durch deren Repopulation das Pankreas wiederherzustellen. Einen hierfür in Frage kommenden Zelltyp stellen Stammzellen dar, die proliferieren und dann in Azinuszellen differenzieren, ähnlich der Stammzellproliferation während der embryonalen Entwicklung des Dünndarms (Itzkovitz et al., 2012).

Neben den Stammzellen könnte auch eine Untergruppe von fakultativen Stammzellen (= FSC) existieren. Dabei handelt es sich um adulte Epithelzellen, die eine gewisse Progenitor-Kapazität beibehalten und bei Bedarf die jeweilige Zelllinie erneuern können (Desai et al., 2007; Yanger & Stanger, 2011). Die bestehende Hypothese wurde dahingehend erweitert, dass pankreatische Stamm- oder Progenitorzellen im Laufe ihres Lebens zunächst zu reifen Epithelzellen differenzieren, die sich ein gewisses Proliferationsprogramm beibehalten und bei Bedarf die Regeneration der jeweiligen Epithelzelllinie ermöglichen (Kong et al., 2011). Im weiteren Verlauf verlieren die Zellen dieses Zellerneuerungspotential und entwickeln sich zu nicht-proliferativen adulten Epithelzellen. Je nach Art und Ausmaß des Gewebes Schadens könnte so ein passender Zellerneuerungsmechanismus aktiviert werden. Regulär benötigt

der vollständige Gewebeumsatz im Pankreas etwa 4 Monate (Finegood et al., 1995), die Regeneration des Organs nach inflammatorischer Schädigung erfolgt jedoch in einer deutlich höheren Geschwindigkeit (Morris et al., 2010b). Für die Regeneration des Organs könnten verschiedene Mechanismen beitragen. Eine Entzündungsreaktion überfordert möglicherweise die Kapazität der Zellen, die die reguläre Gewebemöostase im Pankreas aufrechterhalten (wie z.B. Stamm- oder Vorläuferzellen), so dass zur Kompensation FSC aktiviert werden könnten. Um die Zellpopulation, aus der nach inflammatorischer Schädigung des Pankreas neues Gewebe generiert wird, genauer zu definieren, wurde in weiterführenden Arbeiten von Dr. Nora Behler die Kontribution verschiedener Zelltypen und -kompartimente im Rahmen der Gesamtproliferation ermittelt (Behler, 2019).

6.2 JNK2-defiziente Mäuse weisen eine verminderte Proliferation und eine Zellzyklusphasenverschiebung im Rahmen des pankreatischen Inflamationsverlaufs auf

Die Regeneration nach Gewebeschaden mit Wiederherstellung der Gewebeintegrität bedarf einer präzisen räumlich-zeitlichen Kontrolle von Apoptose geschädigter Zellen und kompensatorischer Proliferation. Die Koordination dieses komplexen Zusammenspiels der Prozesse Apoptose, Zellüberleben und Proliferation wird maßgeblich durch JNK gesteuert (Liu & Lin, 2005; Mollereau & Ma, 2016; Ryoo et al., 2004). So können JNK durch eine Beschleunigung der Zellzyklusrate und eine Förderung des Wiedereintritts ruhender Zellen in die Mitose eine Steigerung der Zellproliferation initiieren (MacCorkle-Chosnek et al., 2001), zugleich fördern sie auch die Apoptose (Mollereau & Ma, 2016). Des Weiteren können die Stresskinasen einen Zellzyklusstillstand bewirken und über die Hochregulation protektiver Mechanismen das Zellüberleben fördern (Fulda et al., 2010). Der exakte zelluläre Kontext scheint zu definieren, ob die jeweiligen Zellen der Proliferation, dem Zellzyklusstopp oder dem Zelltod zugeführt werden (Dhanasekaran & Reddy, 2017).

Hier konnten in den JNK2^{-/-}-Mäusen - wie auch im WT - zwei Proliferationspeaks beobachtet werden, einer nach 24 Stunden und einer an Tag 5. Im Gegensatz zum WT wies der zweite Peak bei den JNK2^{-/-}-Tieren dabei niedrigere Höchstwerte als der erste auf. Dies könnte daran liegen, dass als Zeitpunkt der Organentnahme hier d5 gewählt worden war. Betrachtet man die WT-Proliferationskurve fällt jedoch auf, dass der Höhepunkt der Zellteilung bereits früher, an d3 bis d4, stattfindet. Insgesamt präsentierte sich die Zellteilungsrate an sämtlichen getesteten Zeitpunkten im Vergleich zum WT als deutlich reduziert, was auf eine Störung der kompensatorischen Proliferation hinweist.

In der Literatur wird ein durch JNK-Inhibierung ausgelöster G2/M-Phasenstillstand beschrieben, der eine Erklärung für die verminderte Proliferationsrate in JNK2^{-/-}-Mäusen bieten könnte (Lee & Song, 2008; Oktay et al., 2008; Xia et al., 2006; Alexaki et al., 2008; Kuntzen et al., 2005). Der Eintritt in die Mitose am G2/M-Checkpoint erfolgt durch die Phosphorylierung von pH3, welche durch JNK vermittelt wird (Lee & Song, 2008; Oktay et al., 2008). Die Anwendung des JNK-Inhibitors SP-600125 resultiert in verschiedenen Tumorzelllinien - wie z.B. gastrointestinalen Tumorzellen (Xia et al., 2006) und humanen Melanomzellen (Alexaki et al., 2008) - in einem G2/M-Phasenstillstand und einer Induktion von Apoptose (Kuntzen et al., 2005).

Im Gegensatz zu der bestehenden Studienlage konnte in der vorliegenden Arbeit in den Zellzyklusphasenanalysen kein relevanter Anstieg der G2/M-Phase in JNK2-defizienten Mäusen beobachtet werden. Dies kann bedeuten, dass in dem Versuchsaufbau tatsächlich kein G2-/M-Phasenanstieg erreicht wird. Eine weitere mögliche Ursache kann die durch einen Phasenstillstand potentiell bewirkte Polyploidie darstellen, welche zu einem schnelleren apoptotischen Abbau führt (MacCorkle & Tan, 2004).

In den durchgeführten Versuchen konnte ein deutlicher Anstieg des S-Phasen-Anteils in den ersten 48 Stunden nach Induktion einer akuten Pankreatitis in JNK2-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Dies könnte auf kompensatorisch gesteigerte Reparaturmechanismen im Rahmen der insgesamt reduzierten Proliferationsrate hindeuten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit stellt das Auftreten eines Zellzyklusphasenstillstands durch einen verzögerten Übergang von der S- in die G2-Phase dar. In JNK2^{-/-}-Fibroblasten konnte bereits ein verfrühter Übergang in die S-Phase und somit eine Steigerung des S-Phasen-Anteils im Vergleich zum WT festgestellt werden (Sabapathy et al., 2004). Auch humane Glioblastomzellen weisen nach JNK2-Inhibierung durch Antisense-Oligonukleotide eine verminderte Proliferation in Verbindung mit einer Akkumulation von sich in der S-Phase befindenden Zellen auf (Potapova et al., 2000). In humanen Leberzellkarzinom-Zellen lässt sich in Zusammenhang mit einer reduzierten JNK-Aktivierung ebenfalls eine signifikante Steigerung des S-Phasen-Anteils bei reduzierter Gesamtproliferationsrate beobachten (Yan et al., 2010).

Um die pathophysiologischen Hintergründe, die beteiligten Signalwege und molekularen Ursachen zu verstehen, bedarf es weiterführender Untersuchungen.

6.3 Das Ausmaß der Inflammation ist in JNK2-defizienten Mäusen erhöht

In weiteren Untersuchungen kam ein Caerulein-Protokoll zum Tragen, das insbesondere eine Analyse der frühen Phase der Pankreatitis erlaubt, während der sich die Inflamationsreaktion vornehmlich abspielt. In den Blutserumanalysen wurden die Pankreasenzyme Amylase und Lipase bestimmt, die im Rahmen einer Pankreatitis bis auf ein Vielfaches des Normwerts ansteigen können. Bei allen mit Caerulein behandelten Versuchstieren zeigten sich sowohl Amylase als auch Lipase im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht, wobei die JNK2-Mäuse statistisch signifikant höhere Amylase- und Lipase-Werte aufwiesen als die Wildtyp-Mäuse. Dies kann als erster Hinweis auf eine Aggravation der Pankreatitis in JNK2^{-/-}-Mäusen gewertet werden. Da die Spezifität bei hoher Sensitivität der Enzymwerte jedoch eher gering ist und keine direkte Korrelation mit dem Schweregrad der Entzündung bestehen muss (Yadav et al., 2002), wurde zur genaueren Analyse des Grads der Gewebeschädigung eine H&E-Färbung angefertigt. Auch hier offenbarte sich ein vermehrtes Ausmaß an Inflammation, erkennbar an Ödembildung, einer vermutlich gesteigerten Immunzellinvasion, dem gehäuftem Auftreten von ADM und vermehrtem Gewebeschaden.

Dies war insofern unerwartet, als JNK im Rahmen der gegenwärtigen Studienlage meist mit einer Aggravation von inflammatorischem Geschehen in Verbindung gebracht wird. JNK-Inhibitoren wie SP600125 werden erfolgreich in der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen wie Sepsis-induziertem Lungenschaden (Lou et al., 2019), Arthritis (Han et al., 2001) und auch der akuten Pankreatitis in Nagetieren eingesetzt (Fleischer et al., 2001; Minutoli et al., 2004). Andere Gruppen konnten zeigen, dass JNK auch protektive Signalwege einleiten kann. So wird JNK im Rahmen der Wundheilung von Atemwegsepithelzellen benötigt, eine Inhibierung blockiert die Migration der Zellen in die Wundregion (White et al., 2005). Arbeiten mit JNK2-Knockout-Mäusen schreiben epitheliale JNK2 eine schützende Rolle in Bezug auf die Ausbildung einer Kolitis zu (Chromik et al., 2007; Kersting et al., 2013; Mandić et al., 2017). Die Arbeitsgruppe um Dahlhoff konnte zudem eine Abschwächung der Pankreatitis in Knockout-Mäusen nachweisen, die über eine Überexpression von BTC (= Betacellulin) eine verstärkte JNK-Aktivierung aufzeigen (Dahlhoff et al., 2010).

Aufgrund der kontrovers diskutierten Funktion von JNK muss beachtet werden, mit welchem Versuchsmodell jeweils gearbeitet wurde. Bisherige Kenntnisse über JNK wurden hauptsächlich durch *in vitro* Versuche, in denen die Aktivität durch einen JNK-Inhibitor blockiert wurde, gewonnen. JNK-Inhibitoren verursachen jedoch sogenannte „off-target“-Effekte, da sie auch andere Angriffspunkte aufweisen. Der häufig verwendete Inhibitor SP600125 z.B. interagiert in einem gewissen Ausmaß auch mit ERK1/2 (Minutoli et al.,

2004). Häufig liegen Daten vor zu nicht Isoform-selektiven JNK-Inhibitoren, so dass kaum Schlüsse über die spezifischen Funktionen von JNK2 gezogen werden können (Graczyk, 2013). Bei Versuchsmodellen mit genetischen Knockout-Tieren sollte die Möglichkeit einer Kompensation durch eine Überaktivierung von JNK1 in Betracht gezogen werden, da sich die beiden Kinasen in einigen Wirkungsbereichen überschneiden (Mandić et al., 2017). Bei der Verwendung eines globalen Knockout-Tiermodells kann zumindest ein Teil der beobachteten Effekte durch die JNK2-Defizienz in außerhalb des Pankreas lokalisierten Zellen (wie z.B. hämatopoetische Zellen) mitbedingt sein. So besteht die Möglichkeit, dass die verstärkte Inflammation in den Versuchen durch den JNK2-Verlust in Immunzellen oder dem veränderten Zytokinprofil in JNK2^{-/-}-Mäusen verursacht wurden (Samuel et al., 2006).

Die bestehende Varianz in den Untersuchungsergebnissen kann weiterhin durch den Einfluss der jeweiligen Zellart und des auslösenden Stimulus begründet sein, wie das in Bezug auf die Rolle von JNK in der Apoptose gezeigt werden konnte (Lin & Dibling, 2002). Auch gibt es Hinweise darauf, dass die Ausprägung und die Dauer der JNK-Aktivierung die Wirkung von JNK beeinflussen. Während hohe Level an JNK1 meist zu Zellzyklusarrest und Zelltod führen, leiten niedrige Level Signalwege für Zellüberleben und Proliferation ein (Zeke et al., 2016). Des Weiteren bietet die Interaktion mit diversen Transkriptionsfaktoren die Möglichkeit verschiedener nachgeschalteter Effekte. Es gibt Untersuchungen, die auch der Lokalisation der JNK-Aktivität eine Rolle zuschreiben. Im Rahmen des physiologischen Entwicklungsprozesses der Neuroblasten z.B. fördert JNK die Zellproliferation bei Lokalisation im Wachstumskegel des Axons, während eine erhöhte Aktivität in anderen Lokationen apoptotische Signalwege einleitet (Zeke et al., 2016). Eine weitere Variationsmöglichkeit der Wirkung von JNK besteht über die Fähigkeit, Substraten durch deren Phosphorylierung zu mehr Stabilität zu verhelfen. So wandelt JNK bei Auftreten von DNA-Schäden den Tumorsuppressor p53 in eine stabilere Konformation um (Fuchs, Fried, et al., 1998).

Des Weiteren kann das verwendete Caerulein-Spritzschema sowie der Zeitpunkt der Untersuchung des Gewebes nach den Injektionen von Bedeutung sein. So ließen sich in dem zunächst gewählten Regenerationsprotokoll zwar Unterschiede in der Proliferation sowie angedeutet auch in der Immunzellinfiltration feststellen, während auf histologischer Ebene - im Gegensatz zu den nachfolgenden Befunden der frühen Phase - keine strukturellen Veränderungen ersichtlich waren.

Die in der hier durchgeführten Untersuchung der akuten Phase beobachtete Aggravation der Pankreatitis in JNK2^{-/-}-Mäusen korrelierte nicht mit einer Zunahme von Entzündungszellen.

Im Gegenteil präsentierte sich eine reduzierte Anzahl an Leukozyten im Vergleich zum WT. Dies könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Anwesenheit von JNK2 essentiell für die Differenzierung von CD4⁺ zu Th1-Zellen ist (Yang et al., 1998). Da Th1-Zellen u.a. Makrophagen aktivieren (Luckheeram et al., 2012), die über die Ausschüttung bestimmter Zytokine und Entzündungsmediatoren selbst wiederum weitere Leukozyten anlocken (Zheng et al., 2013), könnte sich ein Mangel an Th1-Zellen auf diese Weise womöglich zusätzlich auf die Anzahl der Entzündungszellen auswirken.

Im Allgemeinen lässt sich festhalten, dass JNK ein breites Wirkungsspektrum bedienen und dass deren nachgeschaltete Effekte vielfältigen Faktoren und Einflüssen unterliegen. Um diese weitreichenden Funktionen, die verschiedenen Signalwege und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu charakterisieren, bedarf es weiterer Forschung.

6.4 Die Reaktion auf Zellstress und die Ausbildung von Zellverbindungen in der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis ist in JNK2^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt

Die Arbeitsgruppe um Shimada veröffentlichte anhand von Microarrays erstellte Genexpressionsanalysen von Wildtypmäusen mit Caerulein-induzierter Pankreatitis (Nakada et al., 2010). Unter den in der Pankreatitis vermehrt exprimierten Genen befanden sich einige, die bei der Reaktion auf Zellstress sowie in der Bildung von Zellverbindungen involviert sind (s. **Appendix II**). Die am stärksten hochregulierten Gene aus den genannten Bereichen bildeten dabei das Tight Junction (= TJ) Protein Claudin 4, das Transmembranprotein E-Cadherin und das Chaperon Hsp 27. Über die Rolle von JNK2 in der Regulation dieser Proteine im Rahmen einer akuten Pankreatitis existieren bislang keine Kenntnisse. JNK sind jedoch an diversen Prozessen beteiligt, die eine dynamische Formation und Auflösung von Zellverbindungen erfordern, wie z.B. der Zellmigration während des Wundheilungsprozesses (Rämet et al., 2002), der Gewebeentwicklung (Chang & Karin, 2001), der Angiogenese (Pedram et al., 2001) und der Tumormetastasierung (Igaki et al., 2006). Auch wird epithelalem JNK2 eine protektive Rolle in Bezug auf die Aufrechterhaltung der Epithelbarrierefunktion bei Kolitis zugeschrieben (Mandić et al., 2017). Eine Verbindung zwischen JNK2 und Zellverbindungsproteinen könnte auch in der Pankreatitis vorstellbar sein. Ähnlich verhält es sich mit den Hitzeschockproteinen. Diese werden - wie auch die JNK - bereits kurze Zeit nach Einwirkung von Zellstress aktiviert und verhindern eine Fehlfaltung von Proteinen. So schützen sie vor Denaturierung oder beschleunigen den Abbau bereits beschädigter Proteine, um weiteren Schaden zu verhindern (Richter et al., 2010). Um die Hypothese, dass JNK2 im Pankreas auch die Regulation von Zellverbindungen und Hsp

umfasst, um rasch und adäquat auf Zellstress reagieren zu können, zu überprüfen, wurde die Expression von E-Cadherin, Claudin 4 und Hsp 27 in der akuten Pankreatitis von JNK2^{-/-}-Mäusen exploriert. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen zur Beurteilung der Exprimierung im Kontext des umliegenden Gewebes, sowie qRT-PCR-Analysen zur quantitativen Objektivierung verwendet. Western Blot-Untersuchungen zur Überprüfung der Ausprägung auf Proteinebene wurden ebenfalls inkludiert, da eine erhöhte Expression auf mRNA-Ebene sich durch Faktoren wie die posttranskriptionelle Regulation und die Proteinstabilität nicht direkt in einer erhöhten Proteinexpression widerspiegeln muss.

6.4.1 E-Cadherin

Das Transmembranprotein E-Cadherin wird an der Oberfläche von Epithelien exprimiert und stellt im Rahmen von Adherens Junctions (= AJ) Verbindungen zwischen benachbarten Zellen her (van Roy & Berx, 2008). Zellverbindungen spielen eine wichtige Rolle u.a. in der Morphogenese, der Gewebeintegrität und der Zelldifferenzierung (Gumbiner, 1996).

In Keratinozytenzellen führt eine Aktivierung von JNK zur Störung der Ausbildung von AJ, ein Prozess, der durch eine siRNA-Blockade verhindert werden kann (Lee et al., 2009; You, Padmashali, et al., 2013). Darmgewebe reagiert auf eine JNK-Inhibierung mit einer Reduktion des durch Dehnung induzierten Auseinanderweichens von AJ, was mit einer Limitierung der erhöhten parazellulären Permeabilität einhergeht (Samak et al., 2014). In der durch Caerulein ausgelösten Pankreatitis kommt es regulär zu einer Hochregulation von E-Cadherin (Lerch et al., 1997), ein spezifischer Knockout des pankreatischen E-Cadherin bewirkt Pankreatitis-ähnliche Veränderungen (Kaneta et al., 2020). Eine Aufrechterhaltung der Funktion der Adhäsionsmoleküle könnte also einen protektiven Effekt erzielen.

Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten immunhistochemischen E-Cadherin-Färbungen zeigten ein deutliches Signal im Bereich der Zellmembranen in den mit Caerulein behandelten Mäusen, wobei in der Ausprägung kein relevanter Unterschied zwischen WT- und JNK2^{-/-} ersichtlich wurde. In qRT-PCR-Analysen konnte ebenso kein Unterschied in Bezug auf die E-Cadherin-Expression zwischen WT und Knockout-Tieren festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass ein JNK2-Verlust in diesem Fall entweder keinen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression hat oder aber eine mögliche Auswirkung durch die immunhistochemischen und die qRT-PCR-Analysen nicht aufgedeckt werden konnte.

6.4.2 Claudin 4

Claudine bilden einen zentralen Bestandteil der TJ, die die Durchlässigkeit von Flüssigkeiten und Molekülen zwischen den Epithelzellen regulieren (You et al., 2013). Untersuchungen offenbarten, dass die im Darmepithel mit osmotischem Stress einhergehende TJ-Störung mit einer Aktivierung von JNK in Verbindung steht und durch JNK-Inhibierung abgeschwächt wird (Naydenov et al., 2009). Auch ein gezielter JNK2-Knockdown *in vitro* sowie *in vivo* hat diesen Effekt und beschleunigt die Wiederherstellung der intakten Zellbarriere (Samak et al., 2010). Auch in einer akuten Pankreatitis erhöht die Zerstörung der Zellverbindungen die Permeabilität, was zu einem interstitiellem Ödem führt und die Inflammationszellmigration sowie den auftretenden Gewebeschaden verstärkt (Sato et al., 2019). Es wird vermutet, dass TJ den Austritt von Proteasen ins Interstitium und somit weiteren Zell- und Gewebeschaden verhindern (Schmitt et al., 2004). Es konnte ein Zusammenhang zwischen der in der Pankreatitis erhöhten Permeabilität und einer reduzierten Expression des TJ-Proteins Claudin 4 hergestellt werden (Sonika et al., 2017). Eine Heraufregulation von Claudin 4 wird als protektiver Mechanismus der Azinuszellen zur Wiederherstellung der Zellbarriere angesehen (Nakada et al., 2010).

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen ergab sich der Eindruck, dass Claudin 4 in der Pankreatitis von JNK2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT gering vermindert war. Zur Objektivierung des Befundes wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Hierbei konnte in den mit isotoner Kochsalzlösung behandelten Kontrolltieren nach 40 Zyklen noch kein ausreichendes Signal detektiert werden. Dem könnte einerseits ein zu geringer cDNA-Gehalt zu Grunde liegen, andererseits aber auch durch umweltbedingte Verunreinigungen oder Hintergrundrauschen bedingt sein. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Messungen in der Auswertung nicht berücksichtigt, die Normalisierung erfolgte stattdessen in Bezug auf die mit Caerulein behandelten WT-Mäuse. Dabei zeigte sich eine statistisch hoch signifikante Reduktion des Claudin 4 - Levels der JNK2^{-/-}-Mäuse. Das Ergebnis der Western Blot-Untersuchungen bestätigte eine Herabregulation von Claudin 4 auch auf der Proteinebene. Damit konnte eine mögliche Beteiligung von JNK2 an der Regulation der Claudin 4 – Expression im Rahmen einer Caerulein-induzierten Pankreatitis nachgewiesen werden.

Ein solcher Zusammenhang zwischen JNK2 und Claudin 4 in einer akuten Pankreatitis war bislang unbekannt, in anderen Organen und Erkrankungen konnten jedoch vereinzelt Interaktionen zwischen JNK und TJ beobachtet werden. So besteht in alveolären Basalepithelzellen der Lunge ein Zusammenspiel zwischen JNK und der Formation von TJ. Eine JNK-Inhibierung durch P600125 *in vitro* und *in vivo* schützt gegen akuten

Lungenschaden über eine Steigerung der Claudin 4-Expression (Zheng et al., 2014). Eine weitere Studie weist hingegen einen protektiven Effekt von JNK in der Lunge nach; eine JNK-Aktivierung in *in vitro*-Untersuchungen führt demnach zu einer Induktion von Claudin 4 und einer Limitierung des Lungenödems, während JNK-Inhibitoren diesen Effekt verhindern (Wray et al., 2009). In Brustepithelzellen wiederum führt die Anwendung eines JNK-Inhibitors durch Modulieren der Claudin-Expression zu einer Stärkung der Epithelzellbarriere, und gezieltes Silencing des JNK2-Gens zu einer Erhöhung der Expression von Claudin 4 (Carrozzino et al., 2009). Darmzellen reagieren sowohl auf eine JNK-Inhibierung durch P600125 als auch auf eine spezifische JNK2-Inaktivierung über Oligonukleotide mit einer Abschwächung der durch Dehnung induzierten Störung von TJ und AJ sowie einer Milderung der erhöhten parazellulären Permeabilität (Samak et al., 2014).

6.4.3 Hsp 27

Hsp sind Proteine, die im Rahmen von Zellstress (z.B. extreme Temperaturen, Ischämie, toxische Stoffe) Proteine stabilisieren und Proteinschäden reparieren oder eine Degradation in die Wege leiten (Morimoto et al., 1997). Auch tragen sie zur Aufrechterhaltung der Epithelzellbarriere bei Stress durch erhöhte Temperaturen im Darmepithel bei (Dokladny et al., 2006). Im Rahmen einer Caerulein-induzierten Pankreatitis kommt es zu einer vermehrten Expression von Hsp, die vermutlich dem Schutz der verbleibenden Azinuszellen dient (Strowski et al., 1997). Transgene Mäuse, die Hsp 27 spezifisch in den Azinuszellen überexprimieren, entwickeln nach Induktion über Caerulein eine abgeschwächte Form der Pankreatitis mit supprimierter Trypsinaktivität und Reduktion des Azinuszellschadens (Kubisch et al., 2004). Im Rahmen der experimentellen akuten Pankreatitis konnte bislang Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70 und Hsp 90 eine protektive Rolle zugeschrieben werden (Savković et al., 2004).

In den hier dargestellten Versuchen wurde in der Immunhistochemie eine zytoplasmatische Anfärbung von Hsp 27 in den mit Caerulein behandelten Mäusen sichtbar. In der Intensität bestanden sowohl innerhalb verschiedener Bereiche der einzelnen Schnitte als auch zwischen den einzelnen Versuchstieren größere individuelle Varianzen, was eine genaue Einschätzung bezüglich potentieller Unterschiede zwischen JNK2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nicht zuließ. In qRT-PCR-Analysen ließ sich eine eindeutige und statistisch signifikante Herabregulation von Hsp 27 in der akuten Pankreatitis von JNK2^{-/-}-Mäusen nachweisen. Die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen offenbarten eine verminderte Expression von Hsp 27 auch auf der Proteinebene. Somit konnte erstmals eine mögliche Verbindung von JNK2 und Hsp 27 in einer Caerulein-induzierten Pankreatitis aufgezeigt werden.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen JNK und Hsp in anderen Organen und Zellarten wird in der Forschung bereits vermutet und diskutiert. Eine Arbeit liefert Hinweise darauf, dass in Fibroblasten der Maus die Expression von Hsp 27 unter Arsenit-Exposition über JNK2-abhängige Mechanismen reguliert wird (Liu et al., 2010). Des Weiteren ist bekannt, dass JNK1 in die durch Hitzeschock induzierte Apoptose von Monozyten involviert ist, vermutlich über die Phosphorylierung von Hsp 27 (Enomoto et al., 2001). In Osteoblasten reduziert sich durch eine JNK-Inhibierung über SP600125 dosisabhängig das Hsp 27, was eine Rolle von JNK in der Hsp 27-Regulation in Osteoblasten nahe legt (Tokuda et al., 2003). Die p38-MAPK reduziert Azinuszellschaden in der Caerulein-induzierten Pankreatitis über die Phosphorylierung von Hsp 27 (Fleischer et al., 2001).

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit ein protektiver Effekt von JNK2 sowie erstmals eine mögliche Rolle in der Regulation von Claudin 4 und Hsp 27 in der Caerulein-induzierten Pankreatitis im Mausmodell demonstriert werden. Da sowohl eine Intaktheit der Zellverbindungen als auch die Aktivität der Hsp eine Milderung der akuten Pankreatitis bewirken (Sato et al., 2019; Strowski et al., 1997), ist denkbar, dass die hier beobachtete Aggravation der Pankreatitis in JNK2^{-/-}-Mäusen durch die verminderte Claudin 4- und Hsp 27-Expression mitbedingt ist. Abschließend bleibt jedoch zu bedenken, dass die hier beschriebenen Veränderungen in einem globalen Knockout-Modell entstanden sind und somit die Beteiligung auch außerhalb des Pankreas lokalisierter JNK2-defizienter Zellen denkbar ist. Weiterhin müssen die beobachteten Effekte nicht zwingend direkt auf die Abwesenheit von JNK2 zurückzuführen sein, sondern könnten auch eine Folge der erhöhten Inflammation und des vermehrten Gewebes Schadens in JNK2-defizienten Mäusen darstellen (Lerch et al., 1997).

6.5 Erhöhte Hsp 27-Konzentrationen mildern das Ausmaß der akuten Pankreatitis in WT-Mäusen

Die hier dargestellten Untersuchungen offenbarten eine Aggravation der Pankreatitis sowie eine erniedrigte Hsp 27-Expression in JNK2^{-/-}-Mäusen. Hitzeschockproteine werden, wie bereits beschrieben, in Reaktion auf Zellstress aktiviert und üben einen protektiven Effekt aus (Morimoto et al., 1997). Es existieren bereits Versuchsmodelle, die durch eine Applikation von rekombinantem Hsp eine Besserung verschiedener Erkrankungen erreichen konnten.

So senkt intravenös appliziertes rekombinantes Hsp 70 in einem zerebralen Ischämie Modell das Infarkt volumen in Ratten und bessert die sensorisch-motorische Funktion (Zhan et al.,

2010). Im Rahmen der Lysetherapie zur Apoplexbehandlung reduziert eine zusätzliche intravenöse Gabe von rekombinantem Hsp 27 das Infarktvolume in Mäusen (Shimada et al., 2018). Wird Patienten nach einer Hirntumoroperation rekombinantes Hsp 70 in die Resektionshöhle gespritzt, kommt es zu einer Reduktion der immunsuppressiven T-Zellen (Shevtsov et al., 2014). Subkutane Injektionen von rekombinantem Hsp 27 reduzieren Atheroskleroseläsionen in Mäusen (Seibert et al., 2013), eine Implantation von Hsp 27-abgebenden Stents in Karotiden von Hasen verbessert die Reendothelialisierung (Ma et al., 2014). In einem Mausmodell der atopischen Dermatitis mildern subkutane Injektionen von rekombinantem Hsp 70 die allergische Inflammation und bessern das klinische Erscheinungsbild (Kao et al., 2020).

In der Caerulein-induzierten Pankreatitis in Mäusen sollte die Hypothese überprüft werden, ob mit der Verabreichung von rekombinantem Hsp 27 ebenfalls eine Verbesserung des Krankheitsbilds erreicht werden kann. Für die Etablierung des Protokolls wurde zunächst eine Testreihe mit verschiedenen Dosierungen des rekombinanten Hsp 27 in WT-Mäusen durchgeführt. Die Ausprägung der akuten Pankreatitis wurde durch Serumanalysen der Enzyme Amylase und Lipase beurteilt. Erste Beobachtungen bezüglich der Wirkung auf die Pankreatitis und die Determinierung einer geeigneten Injektionsdosis zeigten in sämtlichen mit Hsp 27 vorbehandelten Versuchstieren geringere Amylase- und Lipasewerte als bei den Mäusen, die kein Hsp 27 erhalten hatten, darunter mehrere statistisch signifikant. Für eine genauere Analyse wurde das Experiment mit einer höheren Tierzahl und einer festgelegten Dosierung wiederholt. Auch hier konnte eine Minderung der Amylase- und Lipasewerte beobachtet werden, wobei sich der Unterschied als statistisch nicht signifikant erwies. Diese Analysen liefern erste Hinweise darauf, dass durch eine Behandlung mit subkutan appliziertem Hsp 27 eine Abschwächung der Caerulein-induzierten Pankreatitis im Mausmodell erreicht werden kann. Zukünftige Versuche, die durch die Anwendung verschiedener Dosierungen und ggfs. einer alternativen Applikationsart des Hsp 27 gekennzeichnet sind, können weitere Erkenntnisse zur therapeutischen Nutzung dieses rekombinanten Proteins liefern.

7 Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis betrifft weltweit jährlich 33 bis 74 Menschen pro 100.000 Einwohner. Tritt sie in der hämorrhagisch-nekrotisierenden Form auf, ist sie mit einer Mortalität von ca. 20% verbunden. Die Pankreatitis gilt zudem als der wichtigste Risikofaktor für das Auftreten eines PDAC, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas. PDAC ist eine äußerst aggressive Erkrankung mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 9% und stellt damit die Krebsentität mit der schlechtesten Prognose dar.

Als kritisches Ereignis in der frühen Karzinogenese des PDAC konnten onkogene Kras-Mutationen identifiziert werden. Experimente am Mausmodell demonstrieren, dass eine solche Kras-Aktivierung allein nicht ausreicht, um PDAC zu induzieren. Erst die Gegenwart eines entzündlichen Umfelds bewirkt, dass sich die Zellen des erwachsenen Pankreas empfänglich für onkogene Transformationen zeigen. Der Zusammenhang zwischen Inflammation und Karzinogenese legt die Vermutung nahe, dass im Rahmen der Pankreatitis ein Zellkompartiment aktiviert wird, das den entstandenen Schaden durch Zellerneuerung zu beheben versucht und dadurch empfänglicher für maligne Entartung ist. Die genaue Zellart, die den Ursprung des PDAC bildet, konnte noch nicht exakt identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde der physiologische Regenerationsprozess nach Caerulein-induzierter inflammatorischer Schädigung des Pankreas in WT-Mäusen durch eine zeitlich besonders kleinschrittige Analyse genauer charakterisiert. Es konnte eine Einteilung der Regeneration in drei klar voneinander abgrenzbare Phasen vorgenommen werden (Inflammation, Regeneration und Refinement), welche sich auf Ebene der Morphologie, der Proliferationsreaktion sowie der Genexpressionsmuster widerspiegelt. Diese hier gewonnenen Erkenntnisse tragen zum besseren Verständnis der Zellerneuerung im Pankreas und damit der Entstehung von PDAC bei. Die detaillierte Analyse der frühen Karzinogenese ist ein wichtiger Schritt für die Entwicklung eines spezifischen Biomarkers für PDAC und folglich auch für eine frühere Diagnosestellung.

Die kompensatorische Proliferation nach inflammatorischer Gewebeschädigung wird u.a. von der zu den MAP-Kinasen zählenden JNK2 reguliert. Daher wurde die Auswirkung einer JNK2-Defizienz auf die Pankreatitis und deren Regeneration im Knockout-Mausmodell untersucht. JNK2-defiziente Tiere wiesen eine deutlich verminderte Proliferation sowie einen temporär erhöhten S-Phasenanteil auf. Zudem konnte ein protektiver Effekt von JNK2 auf den Verlauf der Caerulein-induzierten Pankreatitis nachgewiesen werden und eine Beteiligung von JNK2 in der Regulation des TJ-Proteins Claudin 4 und des

Hitzeschockproteins Hsp 27. Die Applikation von rekombinatem Hsp 27 in WT-Tieren bewirkte eine leichte Abschwächung der Caerulein-induzierten Pankreatitis.

Zusammengefasst liefert diese Arbeit eine vertiefte Einsicht in die komplexen und dynamischen Vorgänge der regenerativen Zellerneuerung im Pankreas, was langfristig zur Erforschung der frühen Karzinogenese des PDAC beitragen kann. Des Weiteren dienen die Ergebnisse zu JNK2 und Hsp 27 als Ansatzpunkt zur Entwicklung therapeutischer Strategien gegen die akute Pankreatitis.

Literaturverzeichnis

- Abdelli, S., Puyal, J., Biemann, C., Buchillier, V., Abderrahmani, A., Clarke, P. G. H., Beckmann, J. S., & Bonny, C. (2009). JNK3 is abundant in insulin-secreting cells and protects against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia*, *52*(9), 1871–1880. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1431-7>
- Abdulla, A., Awla, D., Thorlacius, H., & Regnér, S. (2011). Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. *Journal of Leukocyte Biology*, *90*(5), 975–982. <https://doi.org/10.1189/jlb.0411195>
- Adamska, A., Domenichini, A., & Falasca, M. (2017). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071338>
- Adler, G., Rohr, G., & Kern, H. F. (1982). Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Digestive Diseases and Sciences*, *27*(11), 993–1002. <https://doi.org/10.1007/BF01391745>
- Aggarwal, A., Manrai, M., & Kochhar, R. (2014). Fluid resuscitation in acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(48), 18092–18103. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18092>
- Aguilar-Medina, M., Avendaño-Félix, M., Lizárraga-Verdugo, E., Bermúdez, M., Romero-Quintana, J. G., Ramos-Payan, R., Ruíz-García, E., & López-Camarillo, C. (2019). SOX9 Stem-Cell Factor: Clinical and Functional Relevance in Cancer. *Journal of Oncology*, *2019*, 6754040. <https://doi.org/10.1155/2019/6754040>
- Alexaki, V.-I., Javelaud, D., & Mauviel, A. (2008). JNK supports survival in melanoma cells by controlling cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *21*(4), 429–438. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00466.x>
- Anastasi, A., Erspamer, V., & Endean, R. (1967). Isolation and structure of caerulein, an active decapeptide from the skin of *Hyla caerulea*. *Experientia*, *23*(9), 699–700. <https://doi.org/10.1007/BF02154119>
- Antoniou, X., Falconi, M., Di Marino, D., & Borsello, T. (2011). JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *24*(4), 633–642. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-091567>
- Arslan, A. A., Helzlsouer, K. J., Kooperberg, C., Shu, X.-O., Steplowski, E., Bueno-de-Mesquita, H. B., Fuchs, C. S., Gross, M. D., Jacobs, E. J., Lacroix, A. Z., Petersen, G. M., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Zheng, W., Albanes, D., Amundadottir, L., Bamlet, W. R., Barricarte, A., Bingham, S. A., Boeing, H., Boutron-Ruault, M.-C., Buring, J. E., Chanock, S. J., Clipp, S., Gaziano, J. M., Giovannucci, E. L., Hankinson, S. E., Hartge, P., Hoover, R. N., Hunter, D. J., Hutchinson, A., Jacobs, K. B., Kraft, P., Lynch, S. M., Manjer, J., Manson, J. E., McTiernan, A., McWilliams, R. R., Mendelsohn, J. B., Michaud, D. S., Palli, D., Rohan, T. E., Slimani, N., Thomas, G., Tjønneland, A., Tobias, G. S., Trichopoulos, D., Virtamo, J., Wolpin, B. M., Yu, K., Zeleniuch-Jacquotte, A., Patel, A. V. (2010). Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Archives of Internal Medicine*, *170*(9), 791–802. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.63>

- Banks, P. A., Bollen, T. L., Dervenis, C., Gooszen, H. G., Johnson, C. D., Sarr, M. G., Tsiotos, G. G., & Vege, S. S. (2013). Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*, *62*(1), 102–111. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302779>
- Bansal, P., & Sonnenberg, A. (1995). Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology*, *109*(1), 247–251. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90291-0)
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, *449*(7165), 1003–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Barrera, K., Stanek, A., Okochi, K., Niewiadomska, Z., Mueller, C., Ou, P., John, D., Alfonso, A. E., Tenner, S., & Huan, C. (2018). Acinar cell injury induced by inadequate unfolded protein response in acute pancreatitis. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, *9*(2), 37–46. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v9.i2.37>
- Beck, B., & Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. In *Nature reviews. Cancer* (Bd. 13, Nummer 10, S. 727–738). <https://doi.org/10.1038/nrc3597>
- Beger, H. G., Büchler, M. W., Dralle, H., Lerch, M. M., Malfertheiner, P., Mössner, J., & Riemann, J. F. (2013). *Erkrankungen des Pankreas: Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf*. Springer Verlag, Berlin.
- Behler, N. (2019). *Persistenz entzündlicher Proliferations- und Transkriptionsmuster in der Pankreaskarzinogenese unter Einfluss von onkogenem KrasG12D*. Technische Universität München, München.
- Bem, J., & Bradley, E. L. 3rd. (1998). Subcutaneous manifestations of severe acute pancreatitis. *Pancreas*, *16*(4), 551–555. <https://doi.org/10.1097/00006676-199805000-00015>
- Bhatia, M. (2004). Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *286*(2), G189-96. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00304.2003>
- Bob, A., & Bob, K. (2001). *Duale Reihe Innere Medizin*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Bogoyevitch, M. A., & Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *70*(4), 1061–1095. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-06>
- Bradley, E. L. 3rd, & Allen, K. (1991). A prospective longitudinal study of observation versus surgical intervention in the management of necrotizing pancreatitis. *American Journal of Surgery*, *161*(1), 15–19. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(91\)90355-h](https://doi.org/10.1016/0002-9610(91)90355-h)
- Bruns, P. E. (2016). *In vivo and in silico models of early pancreatic carcinogenesis*. Technische Universität München.
- Busireddy, K. K., AlObaidy, M., Ramalho, M., Kalubowila, J., Baodong, L., Santagostino, I., & Semelka, R. C. (2014). Pancreatitis-imaging approach. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, *5*(3), 252–270. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i3.252>

- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- Carrozzino, F., Pugnale, P., Féraille, E., & Montesano, R. (2009). Inhibition of basal p38 or JNK activity enhances epithelial barrier function through differential modulation of claudin expression. *American journal of physiology. Cell physiology*, 297(3), C775-87. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00084.2009>
- Case, R. M. (1978). Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 53(2), 211–354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1978.tb01437.x>
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37–40. <https://doi.org/10.1038/35065000>
- Chen, F. (2012). JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Research*, 72(2), 379–386. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1982>
- Chhabra, P., Rana, S. S., Sharma, V., Sharma, R., & Bhasin, D. K. (2016). Hypocalcemic tetany: a simple bedside marker of poor outcome in acute pancreatitis. *Annals of Gastroenterology*, 29(2), 214–220. <https://doi.org/10.20524/aog.2016.0015>
- Chiari, H. (1896). Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Z Heilkunde*, 69–96.
- Cho, J. H., Kim, T. N., Chung, H. H., & Kim, K. H. (2015). Comparison of scoring systems in predicting the severity of acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(8), 2387–2394. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i8.2387>
- Choi, H., Dikalova, A., Stark, R. J., & Lamb, F. S. (2015). c-Jun N-terminal kinase attenuates TNF α signaling by reducing Nox1-dependent endosomal ROS production in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 86, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.015>
- Christein, J. D., Kendrick, M. L., Iqbal, C. W., Nagorney, D. M., & Farnell, M. B. (2005). Distal pancreatectomy for resectable adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *Journal of Gastrointestinal Surgery : Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 9(7), 922–927. <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2005.04.008>
- Chromik, A. M., Müller, A. M., Körner, J., Belyaev, O., Holland-Letz, T., Schmitz, F., Herdegen, T., Uhl, W., & Mittelkötter, U. (2007). Genetic deletion of JNK1 and JNK2 aggravates the DSS-induced colitis in mice. *Journal of Investigative Surgery : The Official Journal of the Academy of Surgical Research*, 20(1), 23–33. <https://doi.org/10.1080/08941930601126140>
- Chung, H. K., Rao, J. N., Zou, T., Liu, L., Xiao, L., Gu, H., Turner, D. J., Yang, P., & Wang, J.-Y. (2014). Jnk2 deletion disrupts intestinal mucosal homeostasis and maturation by differentially modulating RNA-binding proteins HuR and CUGBP1. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 306(12), C1167-75. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00093.2014>
- Cosolo, A., Jaiswal, J., Csordás, G., Grass, I., Uhlírova, M., & Classen, A.-K. (2019). JNK-dependent cell cycle stalling in G2 promotes survival and senescence-like phenotypes in tissue stress. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.41036>

- Coughlin, S. S., Calle, E. E., Patel, A. V., & Thun, M. J. (2000). Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults. *Cancer Causes & Control: CCC*, 11(10), 915–923. <https://doi.org/10.1023/a:1026580131793>
- Dabrowski, A., Grady, T., Logsdon, C. D., & Williams, J. A. (1996). Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 271(10), 5686–5690.
- Dahlhoff, M., Algül, H., Siveke, J. T., Lesina, M., Wanke, R., Wartmann, T., Halangk, W., Schmid, R. M., Wolf, E., & Schneider, M. R. (2010). Betacellulin protects from pancreatitis by activating stress-activated protein kinase. *Gastroenterology*, 138(4), 1585–1594, 1594.e1-3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.045>
- Davis, R. J. (1994). MAPKs: new JNK expands the group. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(11), 470–473. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90132-5)
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2), 239–252. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00116-1)
- Dawra, R., Sah, R. P., Dudeja, V., Rishi, L., Talukdar, R., Garg, P., & Saluja, A. K. (2011). Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 141(6), 2210-2217.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.08.033>
- Dellinger, E. P., Tellado, J. M., Soto, N. E., Ashley, S. W., Barie, P. S., Dugernier, T., Imrie, C. W., Johnson, C. D., Knaebel, H.-P., Laterre, P.-F., Maravi-Poma, E., Kissler, J. J. O., Sanchez-Garcia, M., & Utzolino, S. (2007). Early antibiotic treatment for severe acute necrotizing pancreatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Annals of Surgery*, 245(5), 674–683. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000250414.09255.84>
- Desai, B. M., Oliver-Krasinski, J., De Leon, D. D., Farzad, C., Hong, N., Leach, S. D., & Stoffers, D. A. (2007). Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet β cell, regeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 971. <https://doi.org/10.1172/JCI29988>)
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, & AWMF. (2013). *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom*. AWMF Registernummer: 032-010OL. <http://leitlinienprogramm.onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
- Dhanasekaran, D N, & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27(48), 6245–6251. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.301>
- Dhanasekaran, Danny N, & Reddy, E. P. (2017). JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes & Cancer*, 8(9–10), 682–694. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.155>
- Distler, M., Rückert, F., Hunger, M., Kersting, S., Pilarsky, C., Saeger, H.-D., & Grützmann, R. (2013). Evaluation of survival in patients after pancreatic head resection for ductal adenocarcinoma. *BMC Surgery*, 13, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2482-13-12>
- Dokladny, K., Moseley, P. L., & Ma, T. Y. (2006). Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 290(2), G204-12. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00401.2005>

- Donald, G., Donahue, T., Reber, H. A., & Hines, O. J. (2012). The evolving management of infected pancreatic necrosis. *The American Surgeon*, *78*(10), 1151–1155.
- Dong, C., Yang, D. D., Tournier, C., Whitmarsh, A. J., Xu, J., Davis, R. J., & Flavell, R. A. (2000). JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature*, *405*(6782), 91–94. <https://doi.org/10.1038/35011091>
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., & Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, *429*(6987), 41–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129273>
- Du, L., Lyle, C. S., Obey, T. B., Gaarde, W. A., Muir, J. A., Bennett, B. L., & Chambers, T. C. (2004). Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(12), 11957–11966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304935200>
- Dumnicka, P., Maduzia, D., Ceranowicz, P., Olszanecki, R., Drożdż, R., & Kuśnierz-Cabala, B. (2017). The Interplay between Inflammation, Coagulation and Endothelial Injury in the Early Phase of Acute Pancreatitis: Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020354>
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England Journal of Medicine*, *315*(26), 1650–1659. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>
- Enomoto, A., Suzuki, N., Liu, C., Kang, Y., Zhu, J., Serizawa, S., Matsumoto, Y., Morita, A., Ito, M., & Hosoi, Y. (2001). Involvement of c-Jun NH2-terminal kinase-1 in heat-induced apoptotic cell death of human monoblastic leukaemia U937 cells. *International Journal of Radiation Biology*, *77*(8), 867–874. <https://doi.org/10.1080/09553000110062512>
- Fendrich, V., Esni, F., Garay, M. V. R., Feldmann, G., Habbe, N., Jensen, J. N., Dor, Y., Stoffers, D., Jensen, J., Leach, S. D., & Maitra, A. (2008). Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology*, *135*(2), 621–631. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.011>
- Finegood, D. T., Scaglia, L., & Bonner-Weir, S. (1995). Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes*, *44*(3), 249–256. <https://doi.org/10.2337/diab.44.3.249>
- Fleischer, F., Dabew, R., Göke, B., & Wagner, A. C. (2001). Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, *7*(2), 259–265.
- Frossard, J.-L., Steer, M. L., & Pastor, C. M. (2008). Acute pancreatitis. *Lancet (London, England)*, *371*(9607), 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60107-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60107-5)
- Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S. N., & Ronai, Z. (1998). JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes & Development*, *12*(17), 2658–2663. <https://doi.org/10.1101/gad.12.17.2658>
- Fuchs, S. Y., Fried, V. A., & Ronai, Z. (1998). Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene*, *17*(11 Reviews), 1483–1490. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202184>

- Fuchs, Y., & Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(6), 329–344. <https://doi.org/10.1038/nrm3999>
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 214074. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J. M., Behringer, R. R., Nakamura, T., & Uemoto, S. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature Genetics*, 43(1), 34–41. <https://doi.org/10.1038/ng.722>
- Garber, A., Frakes, C., Arora, Z., & Chahal, P. (2018). Mechanisms and Management of Acute Pancreatitis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2018, 6218798. <https://doi.org/10.1155/2018/6218798>
- Gerok, W. (2007). *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt* (11. Auflage). Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Gidekel Friedlander, S. Y., Chu, G. C., Snyder, E. L., Girnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., Vasile, E., DePinho, R. A., & Jacks, T. (2009). Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell*, 16(5), 379–389. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.027>
- Graczyk, P. P. (2013). JNK inhibitors as anti-inflammatory and neuroprotective agents. *Future Medicinal Chemistry*, 5(5), 539–551. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.34>
- Grady, T., Dabrowski, A., Williams, J. A., & Logsdon, C. D. (1996). Stress-activated protein kinase activation is the earliest direct correlate to the induction of secretagogue-induced pancreatitis in rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 227(1), 1–7.
- Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6046), 1109–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>
- Greenberg, J. A., Hsu, J., Bawazeer, M., Marshall, J., Friedrich, J. O., Nathens, A., Coburn, N., May, G. R., Pearsall, E., & McLeod, R. S. (2016). Clinical practice guideline: management of acute pancreatitis. *Canadian Journal of Surgery. Journal Canadien de Chirurgie*, 59(2), 128–140. <https://doi.org/10.1503/cjs.015015>
- Greer, R. L., Staley, B. K., Liou, A., & Hebrok, M. (2013). Numb regulates acinar cell dedifferentiation and survival during pancreatic damage and acinar-to-ductal metaplasia. *Gastroenterology*, 145(5), 1088–1097.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.027>
- Gu, G., Dubauskaite, J., & Melton, D. A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 129(10), 2447–2457.
- Gudjonsson, B. (1987). Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer*, 60(9), 2284–2303. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19871101\)60:9<2284::aid-cnrcr2820600930>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19871101)60:9<2284::aid-cnrcr2820600930>3.0.co;2-v)

- Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A. J., Hernández-Porras, I., Cañamero, M., Rodríguez-Justo, M., Serrano, M., & Barbacid, M. (2011). Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, *19*(6), 728–739. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.011>
- Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Cañamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E. P., & Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell*, *11*(3), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012>
- Gukovskaya, A. S., & Gukovsky, I. (2012). Autophagy and pancreatitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *303*(9), G993–G1003. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00122.2012>
- Gukovskaya, A. S., Vaquero, E., Zaninovic, V., Gorelick, F. S., Lusic, A. J., Brennan, M.-L., Holland, S., & Pandol, S. J. (2002). Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*, *122*(4), 974–984. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32409>
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, *84*(3), 345–357. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81279-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81279-9)
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Dérijard, B., & Davis, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO Journal*, *15*(11), 2760–2770.
- Gutierrez, G. J., Tsuji, T., Cross, J. V., Davis, R. J., Templeton, D. J., Jiang, W., & Ronai, Z. a. (2010). JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint. *The Journal of biological chemistry*, *285*(19), 14217–14228. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121848>
- Habbe, N., Shi, G., Meguid, R. A., Fendrich, V., Esni, F., Chen, H., Feldmann, G., Stoffers, D. A., Konieczny, S. F., Leach, S. D., & Maitra, A. (2008). Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(48), 18913–18918. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810097105>
- Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society Transactions*, *33*(Pt 5), 891–895. <https://doi.org/10.1042/BST20050891>
- Han, M. S., Jung, D. Y., Morel, C., Lakhani, S. A., Kim, J. K., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6116), 218–222. <https://doi.org/10.1126/science.1227568>
- Han, Z., Boyle, D. L., Chang, L., Bennett, B., Karin, M., Yang, L., Manning, A. M., & Firestein, G. S. (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, *108*(1), 73–81. <https://doi.org/10.1172/JCI12466>
- Hazem, Z. M. (2009). Acute biliary pancreatitis: diagnosis and treatment. *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*, *15*(3), 147–155. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.54740>

- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V. E., Hruban, R. H., Lowy, A. M., & Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437–450. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00309-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00309-x)
- Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S., & Tuveson, D. A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7(5), 469–483. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.023>
- Hochman, D., Louie, B., & Bailey, R. (2006). Determination of patient quality of life following severe acute pancreatitis. *Canadian Journal of Surgery. Journal Canadien de Chirurgie*, 49(2), 101–106.
- Holly, E. A., Chaliha, I., Bracci, P. M., & Gautam, M. (2004). Signs and symptoms of pancreatic cancer: a population-based case-control study in the San Francisco Bay area. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 2(6), 510–517. [https://doi.org/10.1016/s1542-3565\(04\)00171-5](https://doi.org/10.1016/s1542-3565(04)00171-5)
- Holzheimer, R. G., & Mannick, J. A. (2001). *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. Zuckschwerdt, München.
- Huppelsberg, J., & Walter, K. (2009). *Kurzlehrbuch Physiologie* (3. Auflage). Thieme Verlag, Stuttgart.
- Iacobuzio-Donahue, C. A., Velculescu, V. E., Wolfgang, C. L., & Hruban, R. H. (2012). Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(16), 4257–4265. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0315>
- Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D., & Hussain, M. A. (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 843–850. <https://doi.org/10.1172/JCI16502>
- Igaki, T., Pagliarini, R. A., & Xu, T. (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 16(11), 1139–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.042>
- Izkovitz, S., Blat, I. C., Jacks, T., Clevers, H., & van Oudenaarden, A. (2012). Optimality in the development of intestinal crypts. *Cell*, 148(3), 608–619. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.025>
- Jaeschke, A., Rincón, M., Doran, B., Reilly, J., Neuberg, D., Greiner, D. L., Shultz, L. D., Rossini, A. A., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2005). Disruption of the *Jnk2* (*Mapk9*) gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), 6931–6935. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502143102>

- Janisch, N., & Gardner, T. (2015). Recent Advances in Managing Acute Pancreatitis. *F1000Research*, 4. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7172.1>
- Jensen, J. N., Cameron, E., Garay, M. V. R., Starkey, T. W., Gianani, R., & Jensen, J. (2005). Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology*, 128(3), 728–741. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508504021997>
- Ji, B., Gaiser, S., Chen, X., Ernst, S. A., & Logsdon, C. D. (2009). Intracellular trypsin induces pancreatic acinar cell death but not NF-kappaB activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17488–17498. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.005520>
- Jo, I.-J., Bae, G.-S., Choi, S. B., Kim, D.-G., Shin, J.-Y., Seo, S.-H., Choi, M.-O., Kim, T.-H., Song, H.-J., & Park, S.-J. (2014). Fisetin attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through down regulation of JNK and NF- κ B signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 737, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.05.018>
- Johnston, W. C., Hoen, H. M., Cassera, M. A., Newell, P. H., Hammill, C. W., Hansen, P. D., & Wolf, R. F. (2016). Total pancreatectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: review of the National Cancer Data Base. *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 18(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2015.07.009>
- Kaiser, A. M., Saluja, A. K., Sengupta, A., Saluja, M., & Steer, M. L. (1995). Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *The American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 1), C1295-304. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1295>
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.-M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R. H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., & Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4), 730-733.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.042>
- Kaneta, Y., Sato, T., Hikiba, Y., Sugimori, M., Sue, S., Kaneko, H., Irie, K., Sasaki, T., Kondo, M., Chuma, M., Shibata, W., & Maeda, S. (2020). Loss of Pancreatic E-Cadherin Causes Pancreatitis-Like Changes and Contributes to Carcinogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 9(1), 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.09.001>
- Kao, J.-K., Hsu, T.-F., Lee, M.-S., Su, T.-C., Lee, C.-H., Hsu, C.-S., Shieh, J.-J., Wang, J.-Y., & Yang, R.-C. (2020). Subcutaneous injection of recombinant heat shock protein 70 ameliorates atopic dermatitis skin lesions in a mouse model. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 36(3), 186–195. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12163>
- Karin, M., & Gallagher, E. (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*, 57(4–5), 283–295. <https://doi.org/10.1080/15216540500097111>
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., & Wright, C. V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature genetics*, 32(1), 128–134. <https://doi.org/10.1038/ng959>
- Keane, M. G., Horsfall, L., Rait, G., & Pereira, S. P. (2014). A case-control study comparing

- the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open*, 4(11), e005720. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005720>
- Kersting, S., Reinecke, K., Hilgert, C., Janot, M. S., Haarmann, E., Albrecht, M., Müller, A. M., Herdegen, T., Mittelkötter, U., Uhl, W., & Chromik, A. M. (2013). Knockout of the c-Jun N-terminal Kinase 2 aggravates the development of mild chronic dextran sulfate sodium colitis independently of expression of intestinal cytokines TNF α , TGFB1, and IL-6. *Journal of Inflammation Research*, 6, 13–23. <https://doi.org/10.2147/JIR.S36415>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V, Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2, 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Klöppel, G., Dreyer, T., Willemer, S., Kern, H. F., & Adler, G. (1986). Human acute pancreatitis: its pathogenesis in the light of immunocytochemical and ultrastructural findings in acinar cells. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, 409(6), 791–803. <https://doi.org/10.1007/BF00710764>
- Koizumi, M., Doi, R., Toyoda, E., Masui, T., Tulachan, S. S., Kawaguchi, Y., Fujimoto, K., Gittes, G. K., & Imamura, M. (2003). Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer. *Surgery*, 134(2), 260–266. <https://doi.org/10.1067/msy.2003.231>
- Kong, B., Bruns, P., Behler, N. A., Chang, L., Schlitter, A. M., Cao, J., Gewies, A., Ruland, J., Fritzsche, S., Valkovskaya, N., Jian, Z., Regel, I., Raulefs, S., Irmeler, M., Beckers, J., Friess, H., Erkan, M., Mueller, N. S., Roth, S., Hackert, T., Esposito, I., Theis, F.J., Kleeff, J., Michalski, C. W. (2018). Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut*, 67(1). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310913>
- Kong, Bo, Michalski, C. W., Erkan, M., Friess, H., & Kleeff, J. (2011). From tissue turnover to the cell of origin for pancreatic cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.114>
- Kopp, J. L., von Figura, G., Mayes, E., Liu, F.-F., Dubois, C. L., Morris, J. P. 4th, Pan, F. C., Akiyama, H., Wright, C. V. E., Jensen, K., Hebrok, M., & Sander, M. (2012). Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 22(6), 737–750. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.10.025>
- Krapp, A., Knöfler, M., Ledermann, B., Bürki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbüchle, O., & Wellauer, P. K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & development*, 12(23), 3752–3763. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3752>
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., & Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3), 369–377. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00328-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00328-2)
- Kubisch, C., Dimagno, M. J., Tietz, A. B., Welsh, M. J., Ernst, S. A., Brandt-Nedelev, B., Diebold, J., Wagner, A. C. C., Göke, B., Williams, J. A., & Schäfer, C. (2004). Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced

- pancreatitis. *Gastroenterology*, 127(1), 275–286.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.005>
- Kulu, Y., Schmied, B. M., Werner, J., Muselli, P., Büchler, M. W., & Schmidt, J. (2009). Total pancreatectomy for pancreatic cancer: indications and operative technique. *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 11(6), 469–475.
<https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2009.00085.x>
- Kuntzen, C., Sonuc, N., De Toni, E. N., Opelz, C., Mucha, S. R., Gerbes, A. L., & Eichhorst, S. T. (2005). Inhibition of c-Jun-N-terminal-kinase sensitizes tumor cells to CD95-induced apoptosis and induces G2/M cell cycle arrest. *Cancer Research*, 65(15), 6780–6788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2618>
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., & Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 369(6476), 156–160. <https://doi.org/10.1038/369156a0>
- Lampel, M., & Kern, H. F. (1977). Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histology*, 373(2), 97–117. <https://doi.org/10.1007/BF00432156>
- Lechner, A., Yang, Y.-G., Blacken, R. A., Wang, L., Nolan, A. L., & Habener, J. F. (2004). No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes*, 53(3), 616–623. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.616>
- Lee, K., & Song, K. (2008). Basal c-Jun N-terminal kinases promote mitotic progression through histone H3 phosphorylation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(2), 216–221. <https://doi.org/10.4161/cc.7.2.5155>
- Lee, M.-H., Koria, P., Qu, J., & Andreadis, S. T. (2009). JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), 3874–3883. <https://doi.org/10.1096/fj.08-117804>
- Lerch, M M, & Gorelick, F. S. (2000). Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *The Medical Clinics of North America*, 84(3), 549–563, viii. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(05\)70239-x](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(05)70239-x)
- Lerch, M M, Lutz, M. P., Weidenbach, H., Müller-Pillasch, F., Gress, T. M., Leser, J., & Adler, G. (1997). Dissociation and reassembly of adherens junctions during experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 113(4), 1355–1366. <https://doi.org/10.1053/gast.1997.v113.pm9322531>
- Lerch, Markus M, & Gorelick, F. S. (2013). Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 144(6), 1180–1193. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.043>
- Lin, A., & Dibling, B. (2002). The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging Cell*, 1(2), 112–116. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00014.x>
- Liou, G.-Y., Döppler, H., Necela, B., Krishna, M., Crawford, H. C., Raimondo, M., & Storz, P. (2013). Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF- κ B and MMPs. *The Journal of Cell Biology*, 202(3), 563–577. <https://doi.org/10.1083/jcb.201301001>

- Liu, Jing, & Lin, A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Research*, 15(1), 36–42. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290262>
- Liu, Jinyi, Zhang, D., Mi, X., Xia, Q., Yu, Y., Zuo, Z., Guo, W., Zhao, X., Cao, J., Yang, Q., Zhu, A., Yang, W., Shi, X., Li, J., & Huang, C. (2010). p27 Suppresses Arsenite-induced Hsp27/Hsp70 Expression through Inhibiting JNK2/c-Jun- and HSF-1-dependent Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26058–26065. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20566634>
- Liu, M., Shi, L., Chen, M., Chen, S., & Zou, X. (2012). Effects of c-Jun N-terminal kinase signaling pathway on severe acute pancreatitis-associated lung injury. *Pancreas*, 41(3), 358–366. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182297f09>
- Lou, L., Hu, D., Chen, S., Wang, S., Xu, Y., Huang, Y., Shi, Y., & Zhang, H. (2019). Protective role of JNK inhibitor SP600125 in sepsis-induced acute lung injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(2), 528–538.
- Lowenfels, A B, Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R. W., Lankisch, P. G., Andersen, J. R., Dimagno, E. P., Andrén-Sandberg, A., & Domellöf, L. (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 328(20), 1433–1437. <https://doi.org/10.1056/NEJM199305203282001>
- Lowenfels, Albert B, & Maisonneuve, P. (2004). Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 34(5), 238–244. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyh045>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Ma, X., Hibbert, B., McNulty, M., Hu, T., Zhao, X., Ramirez, F. D., Simard, T., de Belleruche, J. S., & O'Brien, E. R. (2014). Heat shock protein 27 attenuates neointima formation and accelerates reendothelialization after arterial injury and stent implantation: importance of vascular endothelial growth factor up-regulation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(2), 594–602. <https://doi.org/10.1096/fj.13-230417>
- MacCorkle-Chosnek, R. A., VanHooser, A., Goodrich, D. W., Brinkley, B. R., & Tan, T. H. (2001). Cell cycle regulation of c-Jun N-terminal kinase activity at the centrosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1), 173–180. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5948>
- MacCorkle, R. a, & Tan, T.-H. (2004). Inhibition of JNK2 disrupts anaphase and produces aneuploidy in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(38), 40112–40121. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405481200>
- Magruder, J. T., Elahi, D., & Andersen, D. K. (2011). Diabetes and pancreatic cancer: chicken or egg? *Pancreas*, 40(3), 339–351. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318209e05d>
- Maitra, A., & Leach, S. D. (2012). Disputed paternity: the uncertain ancestry of pancreatic ductal neoplasia. *Cancer Cell*, 22(6), 701–703. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.015>

- Makhija, R., & Kingsnorth, A. N. (2002). Cytokine storm in acute pancreatitis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, *9*(4), 401–410. <https://doi.org/10.1007/s005340200049>
- Malka, D., Hammel, P., Maire, F., Rufat, P., Madeira, I., Pessione, F., Lévy, P., & Ruszniewski, P. (2002). Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*, *51*(6), 849–852. <https://doi.org/10.1136/gut.51.6.849>
- Mandić, A. D., Bennek, E., Verdier, J., Zhang, K., Roubrocks, S., Davis, R. J., Denecke, B., Gassler, N., Streetz, K., Kel, A., Hornef, M., Cubero, F. J., Trautwein, C., & Sellge, G. (2017). c-Jun N-terminal kinase 2 promotes enterocyte survival and goblet cell differentiation in the inflamed intestine. *Mucosal Immunology*, *10*(5), 1211–1223. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.125>
- Maniati, E., Bossard, M., Cook, N., Candido, J. B., Emami-Shahri, N., Nedospasov, S. A., Balkwill, F. R., Tuveson, D. A., & Hagemann, T. (2011). Crosstalk between the canonical NF- κ B and Notch signaling pathways inhibits Ppar γ expression and promotes pancreatic cancer progression in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(12), 4685–4699. <https://doi.org/10.1172/JCI45797>
- Mareninova, O. A., Hermann, K., French, S. W., O’Konski, M. S., Pandol, S. J., Webster, P., Erickson, A. H., Katunuma, N., Gorelick, F. S., Gukovsky, I., & Gukovskaya, A. S. (2009). Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(11), 3340–3355. <https://doi.org/10.1172/JCI38674>
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J. A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., & Holden, D. W. (2008). SpvC is a Salmonella effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Molecular Microbiology*, *67*(6), 1371–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06134.x>
- Michaud, D. S., Giovannucci, E., Willett, W. C., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., & Fuchs, C. S. (2001). Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA*, *286*(8), 921–929. <https://doi.org/10.1001/jama.286.8.921>
- Minutoli, L., Altavilla, D., Marini, H., Passaniti, M., Bitto, A., Seminara, P., Venuti, F. S., Famulari, C., Macrì, A., Versaci, A., & Squadrito, F. (2004). Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis. *Life sciences*, *75*(24), 2853–2866. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.03.040>
- Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V. E., & Fujitani, Y. (2006). Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes & Development*, *20*(11), 1435–1440. <https://doi.org/10.1101/gad.1412806>
- Mollereau, B., & Ma, D. (2016). Rb-mediated apoptosis or proliferation: It’s up to JNK. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *15*(1), 11–12. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1119492>
- Mori, K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, *101*(5), 451–454. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80855-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80855-7)
- Morimoto, R. I., Kline, M. P., Bimston, D. N., & Cotto, J. J. (1997). The heat-shock

- response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays in Biochemistry*, 32, 17–29.
- Morris, J. P., Cano, D. A., Sekine, S., Wang, S. C., & Hebrok, M. (2010). Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 508–520. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2810083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mourad, M. M., Evans, R., Kalidindi, V., Navaratnam, R., Dvorkin, L., & Bramhall, S. R. (2017). Prophylactic antibiotics in acute pancreatitis: endless debate. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 99(2), 107–112. <https://doi.org/10.1308/rcsann.2016.0355>
- Muddana, V., Whitcomb, D. C., Khalid, A., Slivka, A., & Papachristou, G. I. (2009). Elevated serum creatinine as a marker of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 104(1), 164–170. <https://doi.org/10.1038/ajg.2008.66>
- Murtaugh, L. C., & Keefe, M. D. (2015). Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annual Review of Physiology*, 77, 229–249. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071727>
- Nakada, S., Tsuneyama, K., Kato, I., Tabuchi, Y., Takasaki, I., Furusawa, Y., Kawaguchi, H., Fujimoto, M., Goto, H., Hikiami, H., Kondo, T., Takano, Y., & Shimada, Y. (2010). Identification of candidate genes involved in endogenous protection mechanisms against acute pancreatitis in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(3), 1342–1347. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.047>
- Navadgi, S., Pandanaboyana, S., & Windsor, J. A. (2015). Surgery for Acute Pancreatitis. *The Indian Journal of Surgery*, 77(5), 446–452. <https://doi.org/10.1007/s12262-015-1357-x>
- Naydenov, N. G., Hopkins, A. M., & Ivanov, A. I. (2009). c-Jun N-terminal kinase mediates disassembly of apical junctions in model intestinal epithelia. *Cell cycle Georgetown Tex*, 8(13), 2110–2121. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502798>
- Nemer, L., Krishna, S. G., Shah, Z. K., Conwell, D. L., Cruz-Monserrate, Z., Dillhoff, M., Guttridge, D. C., Hinton, A., Manilchuk, A., Pawlik, T. M., Schmidt, C. R., Talbert, E. E., Bekaii-Saab, T., & Hart, P. A. (2017). Predictors of Pancreatic Cancer-Associated Weight Loss and Nutritional Interventions. *Pancreas*, 46(9), 1152–1157. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000898>
- Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., Hogan, B. L., & Wright, C. V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development (Cambridge, England)*, 122(3), 983–995.
- Oktay, K., Buyuk, E., Oktem, O., Oktay, M., & Giancotti, F. G. (2008). The c-Jun N-terminal kinase JNK functions upstream of Aurora B to promote entry into mitosis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(4), 533–541. <https://doi.org/10.4161/cc.7.4.5660>
- Olson, S. H., Xu, Y., Herzog, K., Saldia, A., DeFilippis, E. M., Li, P., Allen, P. J., O'Reilly, E. M., & Kurtz, R. C. (2016). Weight Loss, Diabetes, Fatigue, and Depression Preceding Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 45(7), 986–991. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000590>

- Pan, L.-L., Li, J., Shamoan, M., Bhatia, M., & Sun, J. (2017). Recent Advances on Nutrition in Treatment of Acute Pancreatitis. *Frontiers in Immunology*, 8, 762. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00762>
- Párniczky, A., Kui, B., Szentesi, A., Balázs, A., Szűcs, Á., Mosztbacher, D., Czimmer, J., Sarlós, P., Bajor, J., Gódi, S., Vincze, Á., Illés, A., Szabó, I., Pár, G., Takács, T., Czakó, L., Szepes, Z., Rakonczay, Z., Izbéki, F., Gervain, J., Halász, A., Novák, J., Crai, S., Hritz, I., Góg, C., Sümegi, J., Golovics, P., Varga, M., Bod, B., Hamvas, J., Varga-Müller, M., Papp, Z., Sahin-Tóth, M., Hegyi, P. (2016). Prospective, Multicentre, Nationwide Clinical Data from 600 Cases of Acute Pancreatitis. *PloS One*, 11(10), e0165309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165309>
- Patel, A. V, Rodriguez, C., Bernstein, L., Chao, A., Thun, M. J., & Calle, E. E. (2005). Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(2), 459–466. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0583>
- Pedram, A., Razandi, M., & Levin, E. R. (2001). Natriuretic peptides suppress vascular endothelial cell growth factor signaling to angiogenesis. *Endocrinology*, 142(4), 1578–1586. <https://doi.org/10.1210/endo.142.4.8099>
- Perez, A., Whang, E. E., Brooks, D. C., Moore, F. D. J., Hughes, M. D., Sica, G. T., Zinner, M. J., Ashley, S. W., & Banks, P. A. (2002). Is severity of necrotizing pancreatitis increased in extended necrosis and infected necrosis? *Pancreas*, 25(3), 229–233. <https://doi.org/10.1097/00006676-200210000-00003>
- Perides, G., Sharma, A., Gopal, A., Tao, X., Dwyer, K., Ligon, B., & Steer, M. L. (2005). Secretin differentially sensitizes rat pancreatic acini to the effects of supramaximal stimulation with caerulein. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(4), G713-21. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00519.2004>
- Petersen, O. H., Gerasimenko, O. V, & Gerasimenko, J. V. (2011). Pathobiology of acute pancreatitis: focus on intracellular calcium and calmodulin. *F1000 Medicine Reports*, 3, 15. <https://doi.org/10.3410/M3-15>
- Petersen, O. H., & Tepikin, A. V. (2008). Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. *Annual Review of Physiology*, 70, 273–299. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100618>
- Potapova, O., Gorospe, M., Bost, F., Dean, N. M., Gaarde, W. A., Mercola, D., & Holbrook, N. J. (2000). c-Jun N-terminal kinase is essential for growth of human T98G glioblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24767–24775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M904591199>
- Rämet, M., Lanot, R., Zachary, D., & Manfrulli, P. (2002). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in Drosophila. *Developmental Biology*, 241(1), 145–156. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0502>
- Rau, B., Poch, B., Gansauge, F., Bauer, A., Nüssler, A. K., Nevalainen, T., Schoenberg, M. H., & Beger, H. G. (2000). Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Annals of Surgery*, 231(3), 352–360. <https://doi.org/10.1097/00000658-200003000-00008>

- Rawla, P., Bandaru, S. S., & Vellipuram, A. R. (2017). Review of Infectious Etiology of Acute Pancreatitis. *Gastroenterology Research*, *10*(3), 153–158. <https://doi.org/10.14740/gr858w>
- Ray, K. C., Bell, K. M., Yan, J., Gu, G., Chung, C. H., Washington, M. K., & Means, A. L. (2011). Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to Kras(G12D)-initiated tumorigenesis in a mouse model. *PloS One*, *6*(2), e16786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016786>
- Reid, L. E., & Walker, N. I. (1999). Acinar cell apoptosis and the origin of tubular complexes in caerulein-induced pancreatitis. *International Journal of Experimental Pathology*, *80*(4), 205–215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1999.00116.x>
- Reutter, K.-H. (2004). *Chirurgie essentials* (5. Auflage). Thieme Verlag, Stuttgart.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, *40*(2), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
- Robert-Koch-Institut, & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2017). *Krebs in Deutschland für 2013/2014* (11. Auflage). Zentrum für Krebsregisterdaten, Berlin.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T., & Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Developmental Cell*, *7*(4), 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.019>
- Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S. Y., Bauer, A., Karin, M., & Wagner, E. F. (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Molecular Cell*, *15*(5), 713–725. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.028>
- Sabio, G., & Davis, R. J. (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(9), 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.004>
- Samak, G, Suzuki, T., Bhargava, A., & Rao, R. K. (2010). c-Jun NH2-terminal kinase-2 mediates osmotic stress-induced tight junction disruption in the intestinal epithelium. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*, *299*(3), G572–G584. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595622>
- Samak, Geetha, Gangwar, R., Crosby, L. M., Desai, L. P., Wilhelm, K., Waters, C. M., & Rao, R. (2014). Cyclic stretch disrupts apical junctional complexes in Caco-2 cell monolayers by a JNK-2-, c-Src-, and MLCK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *306*(11), G947-58. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00396.2013>
- Samuel, I., Zaheer, A., & Fisher, R. A. (2006). In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, *10*(10), 1376–1383. <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2006.09.003>
- Sand, J., Lankisch, P. G., & Nordback, I. (2007). Alcohol consumption in patients with acute

- or chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 7(2–3), 147–156.
<https://doi.org/10.1159/000104251>
- Sato, T., Shibata, W., & Maeda, S. (2019). Adhesion molecules and pancreatitis. *Journal of Gastroenterology*, 54(2), 99–107. <https://doi.org/10.1007/s00535-018-1500-0>
- Savković, V., Gaiser, S., Iovanna, J. L., & Bödeker, H. (2004). The stress response of the exocrine pancreas. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 22(3), 239–246. <https://doi.org/10.1159/000082795>
- Schmitt, M., Klonowski-Stumpe, H., Eckert, M., Lüthen, R., & Häussinger, D. (2004). Disruption of paracellular sealing is an early event in acute caerulein-pancreatitis. *Pancreas*, 28(2), 181–190.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Möhle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., & Wagner, E. F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes & Development*, 13(5), 607–619. <https://doi.org/10.1101/gad.13.5.607>
- Seaberg, R. M., Smukler, S. R., Kieffer, T. J., Enikolopov, G., Asghar, Z., Wheeler, M. B., Korbitt, G., & van der Kooy, D. (2004). Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nature Biotechnology*, 22(9), 1115–1124. <https://doi.org/10.1038/nbt1004>
- Seibert, T. A., Hibbert, B., Chen, Y.-X., Rayner, K., Simard, T., Hu, T., Cuerrier, C. M., Zhao, X., de Belleruche, J., Chow, B. J. W., Hawken, S., Wilson, K. R., & O'Brien, E. R. (2013). Serum heat shock protein 27 levels represent a potential therapeutic target for atherosclerosis: observations from a human cohort and treatment of female mice. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(16), 1446–1454. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.041>
- Shevtsov, M. A., Kim, A. V., Samochernych, K. A., Romanova, I. V., Margulis, B. A., Guzhova, I. V., Yakovenko, I. V., Ischenko, A. M., & Khachatryan, W. A. (2014). Pilot study of intratumoral injection of recombinant heat shock protein 70 in the treatment of malignant brain tumors in children. *Oncotargets and Therapy*, 7, 1071–1081. <https://doi.org/10.2147/OTT.S62764>
- Shimada, Y., Shimura, H., Tanaka, R., Yamashiro, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Urabe, T., & Hattori, N. (2018). Phosphorylated recombinant HSP27 protects the brain and attenuates blood-brain barrier disruption following stroke in mice receiving intravenous tissue-plasminogen activator. *PloS One*, 13(5), e0198039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198039>
- Shroff, S., Rashid, A., Wang, H., Katz, M. H., Abbruzzese, J. L., Fleming, J. B., & Wang, H. (2014). SOX9: a useful marker for pancreatic ductal lineage of pancreatic neoplasms. *Human Pathology*, 45(3), 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.10.008>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Silverman, D. T. (2001). Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 21(1), 7–25. [https://doi.org/10.1002/1520-6866\(2001\)21:1<7::aid-tcm3>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1520-6866(2001)21:1<7::aid-tcm3>3.0.co;2-a)
- Silverman, D. T., Dunn, J. A., Hoover, R. N., Schiffman, M., Lillemoe, K. D., Schoenberg, J.

- B., Brown, L. M., Greenberg, R. S., Hayes, R. B., & Swanson, G. M. (1994). Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *Journal of the National Cancer Institute*, *86*(20), 1510–1516. <https://doi.org/10.1093/jnci/86.20.1510>
- Singhi, A. D., & Maitra, A. (2018). The molecular pathology of precursor lesions of pancreatic cancer. In *Pancreatic Cancer*. Springer NY, New York.
- Siveke, J. T., Lubeseder-Martellato, C., Lee, M., Mazur, P. K., Nakhai, H., Radtke, F., & Schmid, R. M. (2008). Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis. *Gastroenterology*, *134*(2), 544–555. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.003>
- Sledzinski, M., Borkowska, A., Sielicka-Dudzin, A., Halon, M., Wozniak, M., Spodnik, J. H., Antosiewicz, A. H., & Antosiewicz, J. (2013). Cerulein-induced acute pancreatitis is associated with c-Jun NH(2)-terminal kinase 1-dependent ferritin degradation and iron-dependent free radicals formation. *Pancreas*, *42*(7), 1070–1077. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318287d097>
- Smukler, S. R., Arntfield, M. E., Razavi, R., Bikopoulos, G., Karpowicz, P., Seaberg, R., Dai, F., Lee, S., Ahrens, R., Fraser, P. E., Wheeler, M. B., & van der Kooy, D. (2011). The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell Stem Cell*, *8*(3), 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.015>
- Sonika, U., Goswami, P., Thakur, B., Yadav, R., Das, P., Ahuja, V., & Saraya, A. (2017). Mechanism of Increased Intestinal Permeability in Acute Pancreatitis: Alteration in Tight Junction Proteins. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *51*(5), 461–466. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000612>
- Stanger, B. Z., & Hebrok, M. (2013). Control of cell identity in pancreas development and regeneration. *Gastroenterology*, *144*(6), 1170–1179. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.074>
- Stanger, B. Z., Tanaka, A. J., & Melton, D. A. (2007). Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature*, *445*(7130), 886–891. <https://doi.org/10.1038/nature05537>
- Stigliano, S., Sternby, H., de Madaria, E., Capurso, G., & Petrov, M. S. (2017). Early management of acute pancreatitis: A review of the best evidence. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, *49*(6), 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.01.168>
- Strobel, O., Dor, Y., Alsina, J., Stirman, A., Lauwers, G., Trainor, A., Castillo, C. F.-D., Warshaw, A. L., & Thayer, S. P. (2007). In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology*, *133*(6), 1999–2009. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.009>
- Strowski, M. Z., Sparmann, G., Weber, H., Fiedler, F., Printz, H., Jonas, L., Göke, B., & Wagner, A. C. (1997). Caerulein pancreatitis increases mRNA but reduces protein levels of rat pancreatic heat shock proteins. *American Journal of Physiology*, *273*(4 Pt 1), G937–G945.
- Sun, G., & Irvine, K. D. (2014). Control of growth during regeneration. *Current Topics in Developmental Biology*, *108*, 95–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00003->

- Sun, Y., Tang, S., Jin, X., Zhang, C., Zhao, W., & Xiao, X. (2013a). Opposite effects of JNK and p38 MAPK signaling pathways on furazolidone-stimulated S phase cell cycle arrest of human hepatoblastoma cell line. *Mutation Research*, *755*(1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.04.015>
- Sun, Y., Tang, S., Jin, X., Zhang, C., Zhao, W., & Xiao, X. (2013b). Involvement of the p38 MAPK signaling pathway in S-phase cell-cycle arrest induced by Furazolidone in human hepatoma G2 cells. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, *33*(12), 1500–1505. <https://doi.org/10.1002/jat.2829>
- Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M., & Krause, D. S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *31*(1), 235–240. <https://doi.org/10.1002/hep.510310135>
- Tokuda, H., Niwa, M., Ito, H., Oiso, Y., Kato, K., & Kozawa, O. (2003). Involvement of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in endothelin-1-induced heat shock protein 27 in osteoblasts. *European journal of endocrinology European Federation of Endocrine Societies*, *149*(3), 239–245.
- Townsend, C. M. (2012). *Sabiston Textbook of Surgery* (19. Auflag). Saunders, Philadelphia.
- Tse, F., & Yuan, Y. (2012). Early routine endoscopic retrograde cholangiopancreatography strategy versus early conservative management strategy in acute gallstone pancreatitis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *5*, CD009779. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009779.pub2>
- Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., & Hotamisligil, G. S. (2006). Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(28), 10741–10746. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603509103>
- van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *65*(23), 3756–3788. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>
- von Figura, G., Fahrenkrog-Petersen, L., Hidalgo-Sastre, A., Hartmann, D., Hüser, N., Schmid, R. M., Hebrok, M., Roy, N., & Esposito, I. (2017). Atypical flat lesions derive from pancreatic acinar cells. *Pancreatology*, *17*(3), 350–353. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.04.014>
- Wagner, A. C., Mazzucchelli, L., Miller, M., Camoratto, A. M., & Göke, B. (2000). CEP-1347 inhibits caerulein-induced rat pancreatic JNK activation and ameliorates caerulein pancreatitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *278*(1), G165–72. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.1.G165>
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., & Büchler, M. W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *The British Journal of Surgery*, *91*(5), 586–594. <https://doi.org/10.1002/bjs.4484>
- Wang, G.-J., Gao, C.-F., Wei, D., Wang, C., & Ding, S.-Q. (2009). Acute pancreatitis: etiology

- and common pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 15(12), 1427–1430. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1427>
- Warndorf, M. G., Kurtzman, J. T., Bartel, M. J., Cox, M., Mackenzie, T., Robinson, S., Burchard, P. R., Gordon, S. R., & Gardner, T. B. (2011). Early fluid resuscitation reduces morbidity among patients with acute pancreatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 9(8), 705–709. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.03.032>
- White, S. R., Tse, R., & Marroquin, B. A. (2005). Stress-activated protein kinases mediate cell migration in human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(4), 301–310. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0118OC>
- Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., & Davis, R. J. (1998). A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5383), 1671–1674. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1671>
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C. F., Eshkind, L., Bockamp, E., Lió, P., Macdonald, H. R., & Trumpp, A. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135(6), 1118–1129. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.048>
- Wisdom, R., Johnson, R. S., & Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *The EMBO Journal*, 18(1), 188–197. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.188>
- Wray, C., Mao, Y., Pan, J., Chandrasena, A., Piasta, F., & Frank, J. A. (2009). Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 297(2), L219–L227.
- Wu, B. U., Bakker, O. J., Papachristou, G. I., Besselink, M. G., Repas, K., van Santvoort, H. C., Muddana, V., Singh, V. K., Whitcomb, D. C., Gooszen, H. G., & Banks, P. A. (2011). Blood urea nitrogen in the early assessment of acute pancreatitis: an international validation study. *Archives of Internal Medicine*, 171(7), 669–676. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.126>
- Xia, H. H.-X., He, H., De Wang, J., Gu, Q., Lin, M. C. M., Zou, B., Yu, L. F., Sun, Y. W., Chan, A. O. O., Kung, H. F., & Wong, B. C.-Y. (2006). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a specific c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP-600125, in gastrointestinal cancers. *Cancer Letters*, 241(2), 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.031>
- Xiao, A. Y., Tan, M. L. Y., Wu, L. M., Asrani, V. M., Windsor, J. A., Yadav, D., & Petrov, M. S. (2016). Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 1(1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30004-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30004-8)
- Xu, Y., Liu, J., Nipper, M., & Wang, P. (2019). Ductal vs. acinar? Recent insights into identifying cell lineage of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of Pancreatic Cancer*, 2. <https://doi.org/10.21037/apc.2019.06.03>

- Yadav, D., Agarwal, N., & Pitchumoni, C. S. (2002). A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, *97*(6), 1309–1318. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05766.x>
- Yamaguchi, H., Kimura, T., Mimura, K., & Nawata, H. (1989). Activation of proteases in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas*, *4*(5), 565–571. <https://doi.org/10.1097/00006676-198910000-00007>
- Yamasaki, T., Kawasaki, H., & Nishina, H. (2012). Diverse Roles of JNK and MKK Pathways in the Brain. *Journal of Signal Transduction*, *2012*, 459265. <https://doi.org/10.1155/2012/459265>
- Yan, F., Wang, X.-M., Liu, Z.-C., Pan, C., Yuan, S.-B., & Ma, Q.-M. (2010). JNK1, JNK2, and JNK3 are involved in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT*, *9*(3), 287–295.
- Yang, D. D., Conze, D., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Davis, R. J., Rincón, M., & Flavell, R. A. (1998). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity*, *9*(4), 575–585. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9806643>
- Yang, Z., Yang, W., Lu, M., Li, Z., Qiao, X., Sun, B., Zhang, W., & Xue, D. (2018). Role of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in the activation of trypsinogen in rat pancreatic acinar cells. *International Journal of Molecular Medicine*, *41*(2), 1119–1126. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3266>
- Yanger, K., & Stanger, B. Z. (2011). Facultative stem cells in liver and pancreas: fact and fancy. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *240*(3), 521–529. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22561>
- Ye, W., Lagergren, J., Weiderpass, E., Nyrén, O., Adami, H.-O., & Ekblom, A. (2002). Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut*, *51*(2), 236–239. <https://doi.org/10.1136/gut.51.2.236>
- You, H., Lei, P., & Andreadis, S. T. (2013). JNK is a novel regulator of intercellular adhesion. *Tissue Barriers*, *1*(5), e26845. <https://doi.org/10.4161/tisb.26845>
- You, H., Padmashali, R. M., Ranganathan, A., Lei, P., Girnius, N., Davis, R. J., & Andreadis, S. T. (2013). JNK regulates compliance-induced adherens junctions formation in epithelial cells and tissues. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 12), 2718–2729. <https://doi.org/10.1242/jcs.122903>
- Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., & Bogoyevitch, M. A. (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *80*(3), 793–835. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-14>
- Zerem, E. (2014). Treatment of severe acute pancreatitis and its complications. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(38), 13879–13892. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13879>
- Zhan, X., Ander, B. P., Liao, I. H., Hansen, J. E., Kim, C., Clements, D., Weisbart, R. H., Nishimura, R. N., & Sharp, F. R. (2010). Recombinant Fv-Hsp70 protein mediates neuroprotection after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, *41*(3), 538–543. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.572537>

- Zhang, Qiao, Kuang, H., Chen, C., Yan, J., Do-Umehara, H. C., Liu, X., Dada, L., Ridge, K. M., Chandel, N. S., & Liu, J. (2015). The kinase Jnk2 promotes stress-induced mitophagy by targeting the small mitochondrial form of the tumor suppressor ARF for degradation. *Nature Immunology*, *16*(5), 458–466. <https://doi.org/10.1038/ni.3130>
- Zhang, Qiubo, Zeng, L., Chen, Y., Lian, G., Qian, C., Chen, S., Li, J., & Huang, K. (2016). Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Gastroenterology Research and Practice*, *2016*, 8962321. <https://doi.org/10.1155/2016/8962321>
- Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, *12*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- Zhao, H.-F., Wang, J., & Tony To, S.-S. (2015). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *International Journal of Oncology*, *47*(2), 429–436. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3052>
- Zheng, Y., Zhang, M., Zhao, Y., Chen, J., Li, B., & Cai, W. (2014). JNK inhibitor SP600125 protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury via upregulation of claudin-4. *Experimental and therapeutic medicine*, *8*(1), 153–158. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1684>
- Zheng, L., Xue, J., Jaffee, E. M., & Habtezion, A. (2013). Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, *144*(6), 1230–1240. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.042>
- Zhong, B., Zhou, Q., Toivola, D. M., Tao, G.-Z., Resurreccion, E. Z., & Omary, M. B. (2004). Organ-specific stress induces mouse pancreatic keratin overexpression in association with NF-kappaB activation. *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 9), 1709–1719. <https://doi.org/10.1242/jcs.01016>
- Zhou, Q., & Melton, D. A. (2018). Pancreas regeneration. *Nature*, *557*(7705), 351–358. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0088-0>
- Zimmermann, A., Gloor, B., Kappeler, A., Uhl, W., Friess, H., & Büchler, M. W. (2002). Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans. *Gut*, *51*(4), 574–578. <https://doi.org/10.1136/gut.51.4.574>
- Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Müller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K., & Habener, J. F. (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*, *50*(3), 521–533. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.3.521>

Appendix

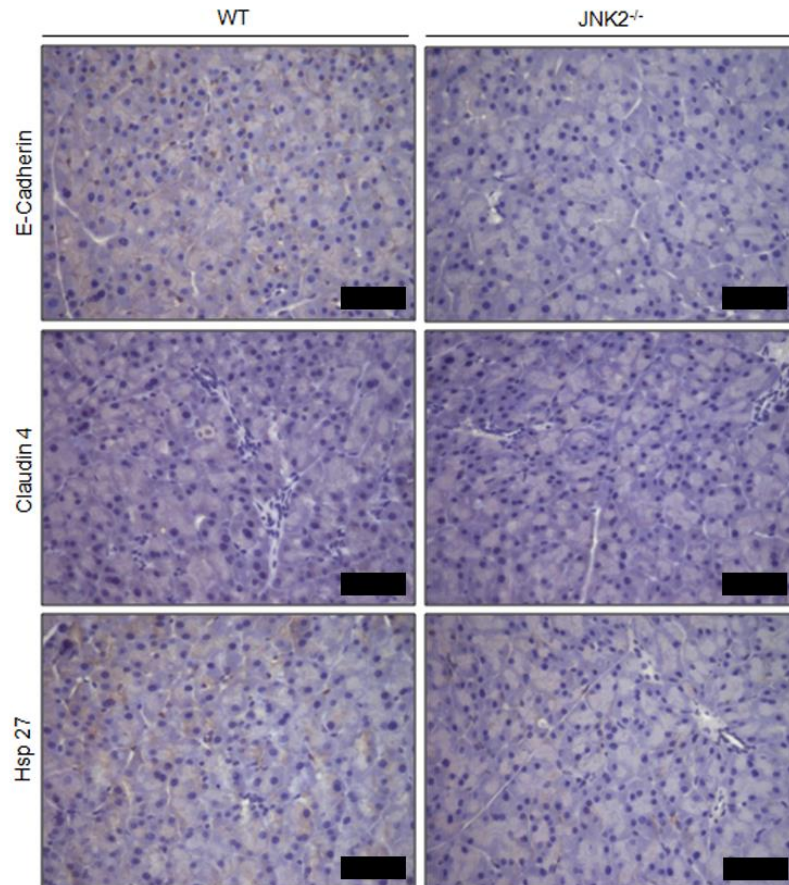
I. Evaluation der Gewebestruktur von WT-Mäusen in einem Regenerationsmodell der akuten Pankreatitis

Zeitpunkt	Histologische Veränderungen	
3h	Vakuolisierung von Azinarzellen	Inflammation
	Vereinzelt apoptotische Azinarzellen	
	Beginnende Transformation zu Tubulärkomplexen (= TC)	
12h	Gesteigerte Inflammation	
	Azini mit größeren Lumina	
	Weniger apoptotische Zellen als nach 3h	
	Beginnende Formation von TC	
24h	Vermehrt neutrophile Granulozyten	
	Vereinzelt apoptotische Zellen	
	Keine kompletten TC	
36h	Ödem	
	Atrophie von Azini	
	Viel Apoptose	
	Einige komplette TC	
48h	Apoptose	Regeneration
	Komplette TC	
72h	Minimale Inflammation	
	Kleine Bereiche mit TC (10-15%) und Atrophie	
96h	Weniger Atrophie und TC als nach 72h	
d5	Minimale Inflammation	
	Nur kleine Bereiche mit TC und Atrophie	
d7	Veränderungen vergleichbar mit d5	Refinement
	Spärliche Inflammation	
	Kleine Bereiche mit TC und Atrophie, weniger als an d5 und d6	
d14	Fast normale Struktur	
	Fast vollständige Regeneration	

II. Hochregulierte Gene in einer Caerulein-induzierten Pankreatitis in WT-Mäusen (aus Nakada et al., 2010)

Gene name	Function	GenBank #	Fold
<i>Iip-regulated</i>			
Claudin 4	Tight junction, permeability	NM_009903	165.90
S100 calcium-binding protein G	Calcium ion binding	NM_009789	58.67
Keratin 8	Structural molecule activity	NM_031170	14.22
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6b	Endopeptidase inhibitor activity	NM_011454	10.76
S100 calcium-binding protein A10 (calpactin)	Calcium ion binding	NM_009112	9.42
Lectin, galactose binding, soluble 3	Anti-apoptosis	NM_001145953	8.92
S100 calcium-binding protein A4	Calcium ion binding	NM_011311	7.91
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a	Endopeptidase inhibitor activity	NM_009254	7.56
Heat shock protein 1	Response to stress	NM_013560	6.75
Cadherin 1	Cell-cell adhesion	NM_009864	6.50
Interferon regulatory factor 3	Transcription of interferon alpha/beta genes	NM_016849	6.43
Integrin beta 4	Cell-matrix adhesion	NM_001005608	6.35
Syndecan 1	Cell-matrix adhesion, wound repair	NM_011519	6.25
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9	Endopeptidase inhibitor activity	NM_009256	5.43
Regulator of calcineurin 1	Calcineurin inhibitor	NM_001081549	5.31
Heat shock protein 1B	Response to stress	NM_010478	5.02
Actinin, alpha 1	Cortical cytoskeleton organization	NM_134156	4.92
Calpain 5	Calium-dependent cysteine-type endopeptidase activity	NM_007602	4.75
Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha	Autophagic vacuole formation	NM_025735	4.69
Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I beta	cAMP-dependent protein kinase regulator activity	NM_008923	4.68
Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	Response to stress	NM_010480	4.16
Claudin 7	Tight junction, permeability	NM_016887	3.89
BCL2-antagonist/killer 1	Apoptosis	NM_007523	3.68
Calpain 2	Calium-dependent cysteine-type endopeptidase activity	NM_009794	3.55
BCL2-like 1	Anti-apoptosis	NM_009743	3.14
Rous sarcoma oncogene	Cell adhesion, survival	NM_001025395	3.01
F11 receptor	Tight junction, permeability	NM_172647	2.73
Plectin1	Cell-cell and cell-matrix adhesion	NM_011117	2.72
BCL2-associated X protein	Apoptosis	NM_007527	2.55
Calpain, small subunit 1	Calium-dependent cysteine-type endopeptidase activity	NM_009795	2.40

III. Ausprägung von E-Cadherin, Claudin 4 und Hsp 27 in WT- und JNK2^{-/-}-Kontrollen im Mausmodell. Maßstabsbalken: 50 μ m.



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, all denjenigen herzlich zu danken, die zum Gelingen dieser Promotion beigetragen und mich auf meinem Weg dorthin begleitet und unterstützt haben:

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Jörg Kleeff für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, meine Arbeit an diesem spannenden Projekt in seiner Abteilung durchzuführen.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Michalski bedanke ich mich vielmals für die exzellente Betreuung. Seine Begeisterung für die Wissenschaft ist mitreißend und hat mich auch in schwierigen Phasen angespornt. Durch seine Förderung konnte ich mich fachlich und nicht zuletzt persönlich weiterentwickeln, was ich überaus zu schätzen weiß.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Dr. Bo Kong, der mir in jeder Phase dieser Dissertation mit seiner Expertise, seiner Geduld und wertvollen Ratschlägen zur Seite stand. Den Austausch habe ich immer als äußerst wertvoll und bereichernd empfunden. Vielen Dank für die unschätzbare Unterstützung!

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der AG Kleeff/Michalski meinen Dank für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre sowie die stetige Unterstützung in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen aussprechen. Mein besonderer Dank gilt dabei Nataliya Valkovskaya, Dr. Ivane Abiatari und Dr. Charlotte Bruse für die lehrreiche Einführung in die Methodik. Ganz herzlich möchte ich auch Dr. Nora Behler und PD Weiwei Wu für die intensive und freundschaftliche Zusammenarbeit, die motivierenden Gespräche und den wertvollen gemeinsamen Austausch danken. Weiterhin bedanke ich mich bei Manja Thorwirth, Nadja Maeritz, Irina Fuchs und Isabell Schäffer für die großartige Unterstützung bei allen Fragen rund um die Arbeit im Labor und am Mausmodell.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Kathleen Schuck und Dr. Ivonne Regel für ihre hilfreichen Anmerkungen und Änderungsvorschläge bei der Korrektur dieser Dissertation.

Vielen Dank auch an die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Irene Esposito und Dr. Martin Irmeler, die an der Auswertung unserer Daten beteiligt waren. Hierbei möchte ich ein besonderes Dankeschön an Dr. Philip Bruns für die hervorragende bioinformatische Expertise und die engagierte Zusammenarbeit richten.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Nico Grupp für seine mentale und moralische Unterstützung, seine Geduld und seine ermutigende Begleitung während der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Mein abschließender und ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, auf deren bedingungslose Unterstützung ich mich jederzeit und in sämtlichen Lebenslagen uneingeschränkt verlassen kann und ohne die ich meinen Weg nie hätte gehen können.