

**Etablierung, Optimierung und Anwendung
verschiedener Modelle zur Charakterisierung von
p38 MAPK Inhibitoren**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Sarah Nicole Fehr
aus Rottweil

Tübingen

2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

12. Oktober 2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Laufer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Schwab

MEINEN ELTERN
und GROSSELTERN

If you can dream--and not make dreams your master
If you can think--and not make thoughts your aim
If you can meet with Triumph and Disaster
And treat those two impostors just the same

Rudyard Kipling

DANKSAGUNG

Höchster Dank gilt Prof. Dr. Matthias Schwab für meine Übernahme ans IKP in Stuttgart. Er hat sich persönlich dafür eingesetzt, dass diese Promotion zu einem erfolgreichen Ende kommt.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Elke Schäffeler für die methodische Unterstützung und Betreuung bedanken. Auch Uschi Waldherr und Andrea Jarmuth bin ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft sehr dankbar.

Der Robert Bosch Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation.

Herrn Dr. Wolfgang Albrecht möchte ich für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die thematische Betreuung meiner Arbeit, sowie die Vermittlung ans IKP danken. Frau Dr. Anke Unger möchte ich besonders herzlich danken, da sie auch in anstrengenden Zeiten jederzeit ein offenes Ohr hatte. Danke für die tatkräftige Unterstützung, Loyalität und absolute Verlässlichkeit.

Prof. Dr. Stefan Laufer danke ich für die Übernahme der Erstkorrektur meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt allen freiwilligen Spendern und denen, die mir bei der Gewinnung der biologischen Proben geholfen haben. Zu nennen sind hier besonders die Abteilung Gastroenterologie des Robert-Bosch-Krankenhauses, Dr. Svitlana Igel, Dr. Simon Jäger, Ellen Kurz und Dr. Nikolas Pietrzik.

Bei allen Kollegen am IKP, insbesondere bei meinen Zimmerkollegen, möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre und die unterhaltsamen Gespräche bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich allen, die mir nahe stehen, ganz besonders Nik und meiner Familie für ihren Rückhalt und ihre Fürsorge.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	- 1 -
1.1 Die Entwicklung eines Arzneimittels	- 1 -
1.2 Die p38 MAPK als therapeutisches Zielmolekül ('Drug Target')	- 4 -
1.2.1 Der p38 MAPK Signaltransduktionsweg.....	- 4 -
1.2.2 Eigenschaften der p38 MAPK Isoformen	- 6 -
1.2.3 Die Hemmung der p38 MAP Kinase	- 8 -
1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und die p38 MAPK	- 11 -
1.3.1 Definition und Behandlung von Morbus Crohn (MC)	- 11 -
1.3.2 Erfahrungen mit p38 MAPK Inhibitoren in MC.....	- 12 -
1.4 Zielsetzung	- 14 -
2 MATERIAL UND METHODEN	- 15 -
2.1 Computergestützte Arbeiten	- 15 -
2.1.1 Internetseiten.....	- 15 -
2.1.2 Computerprogramme.....	- 15 -
2.2 Material	- 16 -
2.2.1 Versuchstiere.....	- 16 -
2.2.2 Patientenkollektiv und Probengewinnung.....	- 16 -
2.2.3 Technische Ausstattung	- 18 -
2.2.4 Enzyme, Kits und andere Produkte.....	- 19 -
2.2.5 Hemmstoffe/ p38 MAPK Inhibitoren	- 21 -
2.2.6 TaqMan® Custom Array/ Gene Expression Assays.....	- 23 -
2.2.7 Antikörper	- 25 -
2.2.7.1 Antikörper im p38 MAPK Enzymassay.....	- 25 -
2.2.7.2 Antikörper im Western Blot	- 26 -
2.2.7.3 ELISA Antikörperpaare	- 27 -
2.2.8 Rekombinante Proteine.....	- 27 -
2.2.9 Puffer und Lösungen	- 28 -
2.2.10 Kulturmedien.....	- 33 -
2.3 Methoden	- 34 -
2.3.1 <i>In vitro</i> Untersuchung mittels p38 MAPK Enzymassay	- 34 -

2.3.2	Ex vivo Untersuchung der Zytokinausschüttung in Vollblut	- 36 -
2.3.2.1	Verdünnung der Hemmstoff-Lösungen	- 36 -
2.3.2.2	Untersuchung der Zytokinausschüttung in humanem Vollblut.....	- 37 -
2.3.2.3	Untersuchung der TNF α Ausschüttung in Vollblut von Schweinen	- 38 -
2.3.2.4	Untersuchung der TNF α Ausschüttung in Vollblut von Ratten	- 39 -
2.3.3	Untersuchung der Zytokinausschüttung in PBMCs.....	- 40 -
2.3.3.1	Isolierung von PBMCs aus humanem Vollblut	- 40 -
2.3.3.2	Zellzählung und Vitalitätstest im Hämozytometer.....	- 41 -
2.3.3.3	Messung der Zellvitalität über den MTT-Umsatz	- 41 -
2.3.3.4	Untersuchung der Zytokinausschüttung in PBMCs.....	- 42 -
2.3.4	Untersuchung der TNF α Ausschüttung in Splenozyten.....	- 43 -
2.3.4.1	Isolation von Splenozyten/ Milzzellen der Maus	- 43 -
2.3.4.2	Stimulation der Splenozyten	- 43 -
2.3.5	Untersuchung der Transkription	- 45 -
2.3.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus PBMCs	- 45 -
2.3.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Kolongewebe und PBMCs.....	- 45 -
2.3.5.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Haarfollikelzellen	- 46 -
2.3.5.4	Quantitative RNA-Analyse (Nanodrop).....	- 47 -
2.3.5.5	Qualitative RNA-Analyse (RNA 6000 Nano Chip).....	- 47 -
2.3.5.6	cDNA Synthese durch Reverse Transkription.....	- 48 -
2.3.5.7	Semiquantitative `Real-Time` PCR.....	- 48 -
2.3.5.8	TaqMan® Custom Array/Low Density Array	- 51 -
2.3.6	Untersuchung der Zytokinausschüttung mittels ELISA	- 52 -
2.3.7	Untersuchung der p38 MAP Kinase Proteinexpression.....	- 53 -
2.3.7.1	Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen	- 53 -
2.3.7.2	Proteinextraktion aus PBMCs und Kolongewebe	- 53 -
2.3.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	- 54 -
2.3.7.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 54 -
2.3.7.5	Western Blot und Immundetektion	- 55 -
2.3.7.6	Proteome Profiler™ Human Phospho MAPK Array	- 56 -
2.3.8	Datenauswertung und Statistik.....	- 58 -
2.3.8.1	Berechnung von Hemmung und IC ₅₀ -Werten	- 58 -
2.3.8.2	Statistik	- 58 -

3	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	- 59 -
3.1	Etablierung eines modifizierten Enzymassays zur Testung von p38 MAPK Inhibitoren	- 59 -
3.1.1	Grundlagen (oder Messprinzip)	- 59 -
3.1.2	Modifizierung des p38 MAPK Enzymassays	- 60 -
3.1.3	Vergleich von p38 MAPK Hemmstoffen im Enzymassay	- 62 -
3.2	Ex vivo Untersuchungen mit Vollblut verschiedener Spezies	- 63 -
3.2.1	Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen.....	- 64 -
3.2.2	Vergleich von p38 MAPK Hemmstoffen zwischen Schwein, Ratte, Maus und Mensch	- 65 -
3.3	Untersuchungen zur Zytokinausschüttung, Genexpression und Kinase-Aktivierung in stimulierten humanen PBMCs	- 71 -
3.3.1	Etablierung der Versuchsbedingungen.....	- 71 -
3.3.1.1	Kinetik der Zytokinausschüttung nach Stimulation	- 71 -
3.3.1.2	Untersuchungen zur Expression entzündungsrelevanter Gene	- 76 -
3.3.1.3	Expression der p38 MAP Kinase Isoformen	- 84 -
3.3.1.4	Aktivierung der p38 MAP Kinase in stimulierten PBMCs	- 85 -
3.3.1.5	Versuchsprotokoll zur gleichzeitigen Bestimmung der Zytokinausschüttung, Genexpression und Kinase-Aktivität.....	- 90 -
3.3.2	Effekte von p38 MAPK Inhibitoren in stimulierten PBMCs von gesunden Spendern	- 91 -
3.3.2.1	Zytokinausschüttung und Genexpression nach Stimulation mit LPS	- 91 -
3.3.2.2	Zytokinausschüttung und Genexpression nach Stimulation mit TNF α	- 97 -
3.3.2.3	Effekte von p38 MAPK Inhibitoren auf die Expression der p38 MAPK Isoformen.....	- 101 -
3.3.2.4	Aktivierung der p38 MAPK Isoformen in stimulierten PBMCs von gesunden Spendern.....	- 102 -
3.3.3	Effekte von p38 MAPK Inhibitoren in stimulierten PBMCs von Morbus Crohn Patienten	- 103 -
3.3.3.1	Zytokinausschüttung und Genexpression nach Inkubation von PBMCs mit 'SB neu' und Stimulation mit LPS	- 103 -
3.3.3.2	Untersuchung der p38 MAPK Isoformen nach Inkubation von PBMCs mit 'SB neu' und Stimulation mit LPS	- 108 -
3.3.4	Untersuchungen in Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten	- 110 -

3.3.4.1	Expressionsanalyse mit dem <i>Taqman Custom Array</i>	- 110 -
3.3.4.2	p38 MAPK Isoformen in Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten	- 116 -
4	DISKUSSION	- 118 -
4.1	<i>In vitro</i> Modelle für p38 MAPK Inhibitoren.....	- 119 -
4.2	Speziesspezifische Effekte von p38 MAPK Inhibitoren	- 121 -
4.3	Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells mit PBMCs.....	- 124 -
4.4	P38 MAPK Inhibitoren wirken auf RNA- und Proteinebene	- 126 -
4.5	Effekte des p38 MAPK Inhibitors `SB neu´ in stimulierten PBMCs von Morbus Crohn Patienten	- 127 -
4.6	Aktivierte/Phosphorylierte p38 MAPK Isoformen in PBMCs und entzündetem Dickdarmgewebe.....	- 129 -
4.7	Fazit.....	- 131 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 133 -
6	ANHANG	- 135 -
6.1	Ergänzung zu Abschnitt 3.3.2.1.....	- 135 -
6.2	Ergänzung zu Abschnitt 3.3.2.2	- 137 -
6.3	Patienteninformationen	- 139 -
6.3.1	Morbus Crohn Patienten.....	- 139 -
6.3.2	`Nicht Morbus Crohn´ Gruppe	- 140 -
6.4	Gesamtdaten des <i>Taqman Custom Arrays</i>	- 141 -
6.4.1	Genexpression in PBMCs von gesunden Spendern.....	- 141 -
6.4.2	Genexpression in Dickdarmgewebe von MC Patienten.....	- 143 -
7	LITERATURVERZEICHNIS	- 146 -
	LEBENS LAUF	- 161 -

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Abb.	Abbildung
Akt 1-3	`v-akt murine thymoma viral oncogene homolog´
AP 1	`adaptor-related protein complex 1´
APS	Ammoniumpersulfat
ATF-2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	`bovine serum albumin´, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDAI	Morbus Crohn Aktivitätsindex
cDNA	komplementäre DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch entzündliche Lungenerkrankungen
CREB	`cAMP responsive element binding protein´
CRP	C reaktives Protein
CSF 2	Kolonie stimulierender Faktor 2
CU	Colitis Ulcerosa
CVD	Kardiovaskuläre Krankheiten
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DUSP 1/MKP 1	Dual-spezifische Phosphatase/ MAPK Phosphatase
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK 1/2	extrazelluläre signalregulierte Kinase
et al.	et aliter
FBS/FCS	fötales Rinder-/ Kälberserum
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP 27	Hitzeschockprotein
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration bei 50% Hemmung
IL-1α/1β/6/8/10/23α	Interleukin
JNK 1-3	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

MAPKAPK 2	MAPK aktivierte Proteinkinase 2
MAPKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MC	Morbus Crohn
MEKK 1-4	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
min	Minute
MKK 3/4/6	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase
MKP 1/DUSP 1	MAPK Phosphatase/ Dual-spezifische Phosphatase
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNK 1/2	`MAPK-interacting protein kinase´
mRNA	messenger oder Boten-RNA
MSK 1/2	Mitogen and stress activated protein kinase
MTT	Methylthiazoltetrazoliumbromid
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatpuffer
pg	Pikogramm
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RA	Rheumatoid Arthritis
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
rpm	`rounds per minute´ , Umdrehungen/Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium, Zellkulturmedium
RSK 2	`ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2´
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TLR 4	Toll-like Rezeptor 4
TMB	3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
V	Volt
w/v	`weight per volume´
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Die Entwicklung eines Arzneimittels

Die Entwicklung eines neuen Arzneimittels ist ein langwieriger und kostspieliger Prozess. Aus einer Vielzahl potenzieller Substanzen werden zunächst im Labor (chemische Synthese, Leitstrukturoptimierung und präklinische Phase) einzelne Kandidaten für die Weiterentwicklung herausgefiltert (Abbildung 1-1). Bis zur Marktzulassung muss die Wirksamkeit und Verträglichkeit jedes neuen Wirkstoffes in gesunden und kranken Testpersonen untersucht werden (klinische Phasen I-III). Auch die Verstoffwechslung im Körper und mögliche Wechselwirkungen mit anderen häufig eingenommenen Arzneimitteln wird überprüft. Nach einer Entwicklungszeit von 10-12 Jahren erreichen nur wenige Arzneimittel die Zulassung. Im Jahr 2010 kamen weltweit zum Beispiel nur 15 Medikamente mit neuem Wirkstoff (NMEs, 'new molecular entities') auf den Markt (Mullard, 2011).



Abbildung 1-1: Phasen der Arzneimittelentwicklung. Dargestellt sind die verschiedenen Stufen der Wirkstoffentwicklung von der Synthese und präklinischen Entwicklung im Labor bis zur Untersuchung im Mensch (klinische Phasen). Nur wenige Wirkstoffe, die bezüglich Sicherheitsprofil und Wirkung die strengen Kriterien erfüllen, werden auf dem Markt zugelassen (Quelle: VFA).

In der präklinischen Entwicklung (Abbildung 1-1, rot markiert) sind für eine zuverlässige Bewertung und Auswahl von möglichen Kandidaten effiziente Testsysteme essentiell. Indem ganze Substanzbibliotheken auf ihre biologische Wirksamkeit hin durchsucht werden, kann das atomare Grundgerüst eines potenziellen Wirkstoffs in Form von sogenannten Leitstrukturen ermittelt werden (Gray, 1998). Auf diesen Leitstrukturen basierende Substanzen oder auch aus Pflanzen isolierte Naturstoffe müssen in biochemischen bzw. biologischen Testsystemen auf ihre Wirksamkeit und Spezifität bewertet werden (Godl, 2003).

Zu den wichtigsten Zielmolekülen ('Drug-Targets') für potenzielle Arzneistoffe gehören Kinasen, die die Phosphorylierung von Substraten unter Verwendung von Adenosintriphosphat (ATP) katalysieren. Kinasen spielen eine zentrale Rolle in vielen zellulären Prozessen, sind aber auch entscheidend an der Pathogenese vieler Krankheiten beteiligt (Goldstein, 2008). Zur Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften von Proteinkinase-Inhibitoren stehen eine Vielzahl von effizienten Methoden zur Verfügung. Mit *in vitro* Enzymassays wird in erster Linie das Potenzial des Wirkstoffs erfasst, mit dem die Aktivität des Zielmoleküls moduliert wird (Laufer, 2005). In analoger Weise kann mit Enzymassays auch die Target-Spezifität des Wirkstoffs untersucht werden. Es gibt darüber hinaus Enzym-Bindungs- oder Verdrängungsassays, die von spezialisierten Forschungslaboratorien als Hochdurchsatzsysteme aufgebaut wurden, mit denen die Spezifität eines Wirkstoffs auf mehrere hundert verschiedene Kinasen in kurzer Zeit überprüft werden kann Wechselwirkungen mit anderen Kinasen, sogenannte 'Off Targets', die manchmal zu unerwünschten Nebenwirkungen der Inhibitoren führen, können somit aufgedeckt werden (Fabian, 2005; Karaman, 2008). Eine Extrapolation von Ergebnissen aus diesen *in vitro* Testsystemen auf die Wirkung eines Arzneistoffs in einer intakten Zelle oder gar in einem Organismus, ist jedoch nicht möglich (Hill, 2008). Um die biologische Umgebung mit einzubeziehen wurden zellbasierte Modellsysteme entwickelt, die den angestrebten pharmakologischen Effekt abbilden. Zur Charakterisierung anti-entzündlich wirkender Substanzen werden häufig *in vitro* Modelle mit kultivierten Zelllinien, Vollblut oder peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) verwendet, die nach entsprechender Vorbehandlung mit einer immunologischen Reaktion antworten, wobei das Ausmaß der Reaktion durch Messung geeigneter Biomarker qualitativ und quantitativ erfasst wird. Ein Standardversuch, der auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam, besteht darin, die in Vollblut enthaltenen immunkompetenten Zellen mit einem Endotoxin zu stimulieren und die hierdurch induzierte Ausschüttung von pro-inflammatorischen

Zytokinen über einen Zeitraum oder zu einem bestimmten Zeitpunkt zu messen (Laufer, 2002 und 2006). Vollblut oder aus Blut isolierte Zellen haben im Vergleich zur Verwendung von Zelllinien den Vorteil, dass sie geno- und phänotypisch nativ sind und somit eine Extrapolation zum Organismus eher ermöglichen als artifizielle Zelllinien (Habenberger, 2009). Die Verwendung von Zelllinien ist dann angebracht, wenn im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings aus sehr vielen Wirkstoffen die potentesten identifiziert werden sollen. Da die Wirkung von Inhibitoren zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen und Zelltypen variieren kann, ist den Zelllinien die Verwendung einer Zellpopulation vorzuziehen (Ross, 2006).

Im Anschluss an *in vitro* Versuche erfolgt der Nachweis der Wirksamkeit im lebenden Organismus. In geeigneten Krankheitsmodellen, meist in Nagern, werden die Effekte der Wirksubstanzen auf den kranken Organismus untersucht. Allerdings entspricht der pathologische Verlauf der Krankheit in den meisten Tiermodellen nicht der Situation, wie sie im Patienten beobachtbar ist, weshalb die Befunde zur Wirkung des Arzneistoffes im Tiermodell nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind. Eventuelle Speziesunterschiede werden meist nur unzureichend berücksichtigt. Eine Erweiterung der bisher verfügbaren *in vitro* Testverfahren mit Systemen, die am Krankheitsgeschehen beteiligte Zellen oder Gewebe aus Patienten verwenden, würde eine deutlich bessere präklinische Einschätzung der Testsubstanzen ermöglichen.

1.2 Die p38 MAPK als therapeutisches Zielmolekül (`Drug Target`)

1.2.1 Der p38 MAPK Signaltransduktionsweg

Die Familien der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind evolutionär hochkonservierte Serin/Threonin spezifische Proteinkinasen, die extrazelluläre Signale über eine dreistufige Phosphorylierungskaskade in die Zelle leiten (Kyriakis, 2001). Auf diese Art werden Informationen für wichtige zelluläre Prozesse übermittelt, welche von Proliferation und Differenzierung bis hin zu Apoptose reichen. Die drei am besten charakterisierten MAPK Familien sind die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK 1/2 auch p44/42 MAPK genannt), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK 1-3) und die p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase (Pearson, 2001; Cobb & Goldsmith, 1995). Während der ERK Signaltransduktionsweg vorwiegend die Zellproliferation reguliert und durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird, werden die p38 MAP Kinase und die JNK auch `Stress aktivierte Kinasen` (SAPK) genannt. Der p38 MAPK Signaltransduktionsweg wird extrazellulär durch inflammatorische Stimuli, wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1) aktiviert (Abbildung 1-2). Auch verschiedene Umweltfaktoren, wie UV-Strahlung, Hitze, osmotischer Schock und toxische Chemikalien stimulieren eine Antwort (Han, 1994; Ono, 2000; Schett, 2008; Liu, 2008). Die Aktivierung des p38 Enzyms erfolgt durch eine Doppelphosphorylierung an einem spezifischen Threonin – Glycin – Tyrosin Motiv (TGY) zwischen den Kinasedomänen VII und VIII (Hanks, 1995). In drei Stufen phosphorylieren MAP Kinase Kinase Kinasen die p38-spezifischen MAP Kinase Kinasen MKK 3, MKK 4 und MKK 6 und diese wiederum die vier p38 MAP Kinase Isoformen (α , β , γ und δ). Außerdem sind noch drei alternative Splicevarianten von p38 α und p38 β (Mxi2, Exip (Variante von p38 α), p38 β 2 (Variante von p38 β)) beschrieben, über die bisher nur wenig bekannt ist. Die phosphorylierte p38 MAPK kann zahlreiche Substratproteine aktivieren (Abbildung 1-2), unter anderem Transkriptionsfaktoren (gelb), wie ATF-2, Proteinkinasen, wie MAPKAPK 2, MSK 1/2 oder MNK 1/2 (lila) und zytosolische oder nukleäre Proteine (grün). Die nachgeschalteten Aktivitäten der p38 MAPK erfolgen zelltypspezifisch. Da in entzündetem Gewebe immer wieder phosphorylierte p38 MAPK nachgewiesen werden konnte (Renda, 2008; Korb,

2006; Wätzig, 2002), ist die Beteiligung an Entzündungsreaktionen und die Regulation der Zytokinproduktion die prominenteste Funktion der p38 MAPK. Weitere wichtige Aufgaben wurden bei der Differenzierung von Zellen, bei der Regulation des Zellzykluses und des Zelltods, sowie bei der Zellalterung oder bei 'RNA Splicing' beschrieben (Zarubin, 2005; Coulthard, 2009).

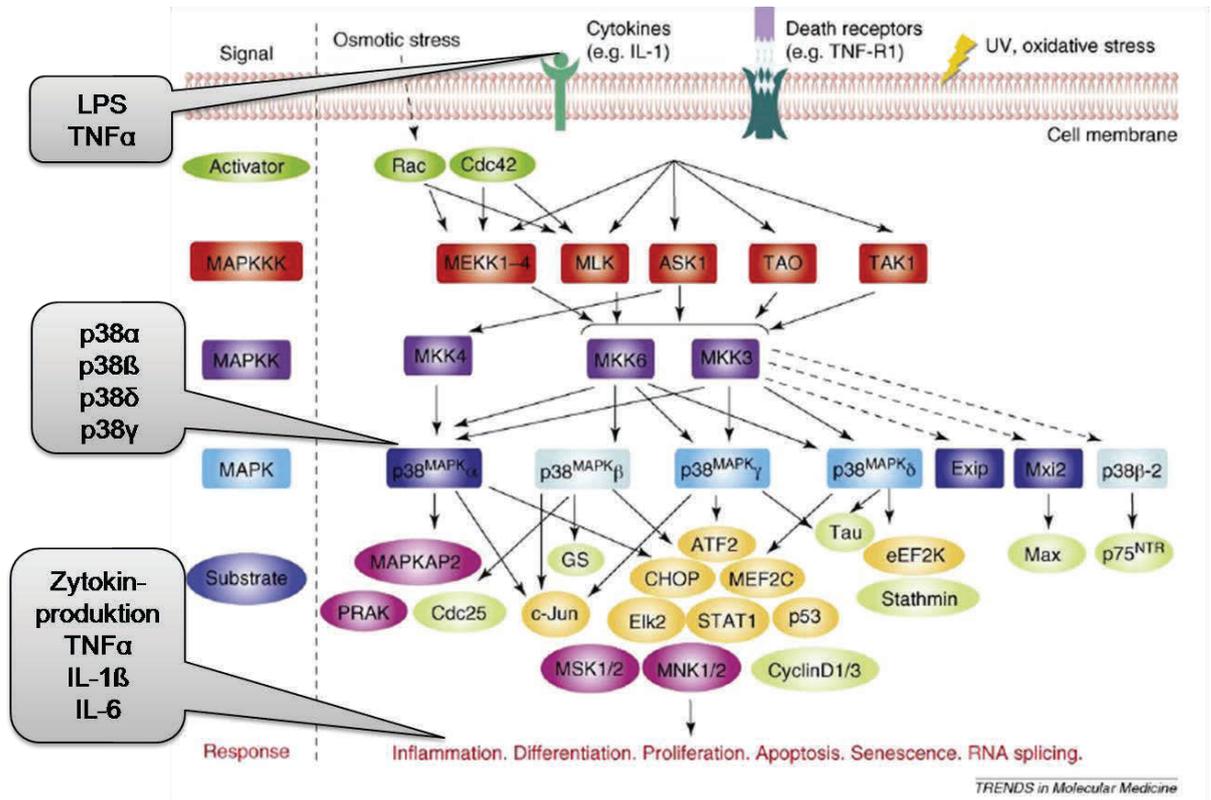


Abbildung 1-2: Der p38 MAPK Signalweg. Das Schema zeigt die Signaltransduktion im p38 MAPK Signalweg von der Aktivierung durch inflammatorische Stimuli (z.B. durch LPS oder TNFα) über die dreistufige Phosphorylierungskaskade (in der dritten Stufe p38 MAPK) bis zu den zahlreichen zellulären Antwortmöglichkeiten, wie z.B. einer Entzündungsreaktion (modifiziert nach Coulthard, 2009).

Die regulatorische Inaktivierung der MAP Kinasen erfolgt durch spezifische Phosphatasen (MKP), die die MAP Kinasen dephosphorylieren. Die Phosphatasen werden von den phosphorylierten MAP Kinasen selbst aktiviert, was einen negativen Rückkopplungsmechanismus schafft und eine zu starke Folgereaktion verhindern soll (Boutros, 2008). Insgesamt kann die Kinetik der p38 MAP Kinase aber auch durch parallele Aktivierung oder Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Mitgliedern der MAPK Familie beeinflusst werden, was die MAPK Signaltransduktion zum einen sehr vielfältig, zum anderen aber auch sehr komplex macht (Cano, 1995).

1.2.2 Eigenschaften der p38 MAPK Isoformen

Das menschliche Genom kodiert für vier p38 MAPK Gene, die p38 Isoformen p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ , deren Eigenschaften in Tabelle 1-1 zusammengefasst wurden.

Tabelle 1-1: Eigenschaften der p38 MAPK Isoformen. (TF= Transkriptionsfaktor)

p38 Isoform	p38 α	p38 β	p38 δ	p38 γ
Pseudonym	MAPK 14, CSBP1	MAPK 11, SAPK 2b	MAPK 13, SAPK 4	MAPK 12, ERK 6, SAPK 3
Homologie zu p38 α		72-100%	60%	60%
mRNA	3,5 kb	2,5 kb	1,8 kb	2 kb
Expression	Ubiquitär	ubiquitär	Lunge, Pankreas, Niere, Hoden, Epidermis, Dünndarm	Skelettmuskulatur, Herz, Lunge, Thymus, Hoden
Aminosäuren	360 AS	364 AS	366 AS	367 AS
Phosphorylierung	T180/Y182	T180/Y182	T180/Y182	T183/Y185
Molekulargewicht	38 kDa	39 kDa	40 kDa	43 kDa
Inhibitor	+	+	(BIRB 796)	(BIRB 796)
Stimulus	Stress, TNF α , IL-1 β , LPS, Anisomycin	Stress, TNF α , IL-1 β , LPS, Anisomycin	Stress, Osmose, TNF α , IL-1 β , PMA	Osmose, TNF α , IL-1 β
Aktivator	MKK 3/MKK 4/ MKK 6	MKK 6	MKK 3/MKK 6	MKK 3/MKK 6
Substrat	MAPKAPK 2, MSK 1/2, MNK 1/2	MAPKAPK 2, MSK 1/2, MNK 1/2	TFs: ATF-2	TFs: ATF-2
Funktion	Stressantwort, Differenzierung, Entzündung, Zellzyklus, Myogenese, Proliferation	Stressantwort, Entzündung, Proliferation	Entwicklung, Differenzierung, Proliferation, Apoptose von Keratinozyten	Differenzierung, Proliferation

Die Aminosäuresequenzen der vier Isoformen zeichnen sich durch eine Homologie von etwa 60% aus. Ihre Kinasedomänen sind sogar zu 90% identisch (Herlaar, 1999; Kumar, 2003; Laufer, 2002; Lee, 2000). Während die Isoformen weitgehend durch die gleichen Stimuli und vorgeschalteten Kinasen aktiviert werden, weisen sie doch Unterschiede im Expressionsmuster, in der Reaktionsverarbeitung, in ihrer Substratspezifität und

Sensitivität gegenüber Inhibitoren auf (Kumar, 1997). Die p38 MAP Kinasen können deshalb noch weiter in die Gruppen p38 α / p38 β und p38 δ / p38 γ unterteilt werden (Cuenda, 2007). Die Isoformen p38 α und p38 β sind in allen Geweben exprimiert und sehr gut charakterisiert. Ihnen wird eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen zugeschrieben, weil eine LPS stimulierte Zytokinausschüttung mit spezifischen Inhibitoren gehemmt werden kann (Jiang, 1996; Lee, 1994). Auch in den entzündungsrelevanten Zellen, Monozyten und Makrophagen, wird vor allem p38 α exprimiert und aktiviert (Hale, 1999; Adams, 2001).

Über die Isoformen p38 γ und p38 δ ist nur vergleichsweise wenig bekannt. Der einzige Hinweis auf eine Funktion von p38 γ bei Entzündungsreaktionen erfolgte, als in chronisch entzündetem Gewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis neben p38 α auch phosphoryliertes p38 γ nachgewiesen wurde (Korb, 2006). p38 γ wird hauptsächlich in der Skelettmuskulatur exprimiert, dazu auch im Herzen, in der Lunge, im Thymus und den Hoden (Li, 1996; Cuenda, 2007; Court, 2002). Für p38 γ wurde in der Literatur eine Rolle bei der Muskeldifferenzierung beschrieben (Wang, 1998).

Die Expression von p38 α und p38 δ in Makrophagen, Neutrophilen, CD4⁺ T-Zellen und Endothelzellen könnte ein Anzeichen für eine Beteiligung von p38 δ in der Entzündungskaskade sein (Hale, 1999). Darüber hinaus wird p38 δ in der Lunge, in der Niere, im Pankreas, in den Hoden, in der Epidermis und im Dünndarm exprimiert (Jiang, 1996; Kumar, 1997; Johansen, 2005; Goedert, 1997). Bisläng wurde p38 δ im Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen diskutiert, so z.B. bei der Reifung von Erythrozyten oder Enterozyten im Dünndarm (Uddin, 2004; Vachon, 2002, Eckert 2003).

1.2.3 Die Hemmung der p38 MAP Kinase

Im Jahr 1994 konnten Lee et al. die zentrale Rolle der p38 α MAPK bei der Zytokinproduktion zeigen. Durch die Hemmung der p38 MAPK mit einem Pyridinylimidazol wurde die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β in Monozyten blockiert (Lee, 1994). Zytokine sind Glykoproteine, die in einem Entzündungsprozess als hormonähnliche Botenstoffe von Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten ausgeschüttet werden (Herlaar, 1999). Entscheidend für den physiologischen Ablauf der Entzündungsreaktion ist dabei ein Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Signalen. Zytokine, die die Entzündungsreaktion fördern, werden als pro-inflammatorische Zytokine bezeichnet, während die Zytokine, die die Aktivität pro-inflammatorischer Zytokine unterdrücken, als anti-inflammatorische Zytokine gelten (Kim, 2008; Ashwell, 2006). Die Wirkung der Zytokine wird durch spezifische, im Organismus ubiquitär vorkommende Rezeptoren vermittelt. Heute ist bekannt, dass die Biosynthese von Zytokinen auf Transkriptions- und Translationsebene reguliert wird (Brook, 2006). Die Stabilität der Boten-RNA (mRNA) wird in Zytokinen über AU-reiche Sequenzen in der untranslatierten 3'-Region (3'-UTR) reguliert (Abbildung 1-3). Diese AU-reichen Sequenzen sind normalerweise von Bindeproteinen besetzt, die die Translation verhindern und zu einem raschen Abbau der mRNA führen. Als Antwort auf einen extrazellulären Stimulus wie LPS werden die Bindeproteine phosphoryliert, woraufhin sie sich von der mRNA ablösen. Die mRNA wird dadurch stabilisiert und das Protein kann translatiert, prozessiert und freigesetzt werden (Brook, 2006; Ross, 1995). Es wird angenommen, dass die p38 α /MAPKAP Kinase 2 Signalkaskade für die Phosphorylierung der Bindeproteine verantwortlich ist (Winzen, 1999). Da chronisch entzündliche Krankheiten fast immer mit einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen oder einem Defekt in der Zytokinsynthese im Zusammenhang stehen, gilt die Hemmung der p38 MAP Kinase als ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zur Behandlung von Krankheiten wie die Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) (Kaminska, 2005; Foster, 2000; Schett, 2008; Lee, 2000; van den Blink, 2001).

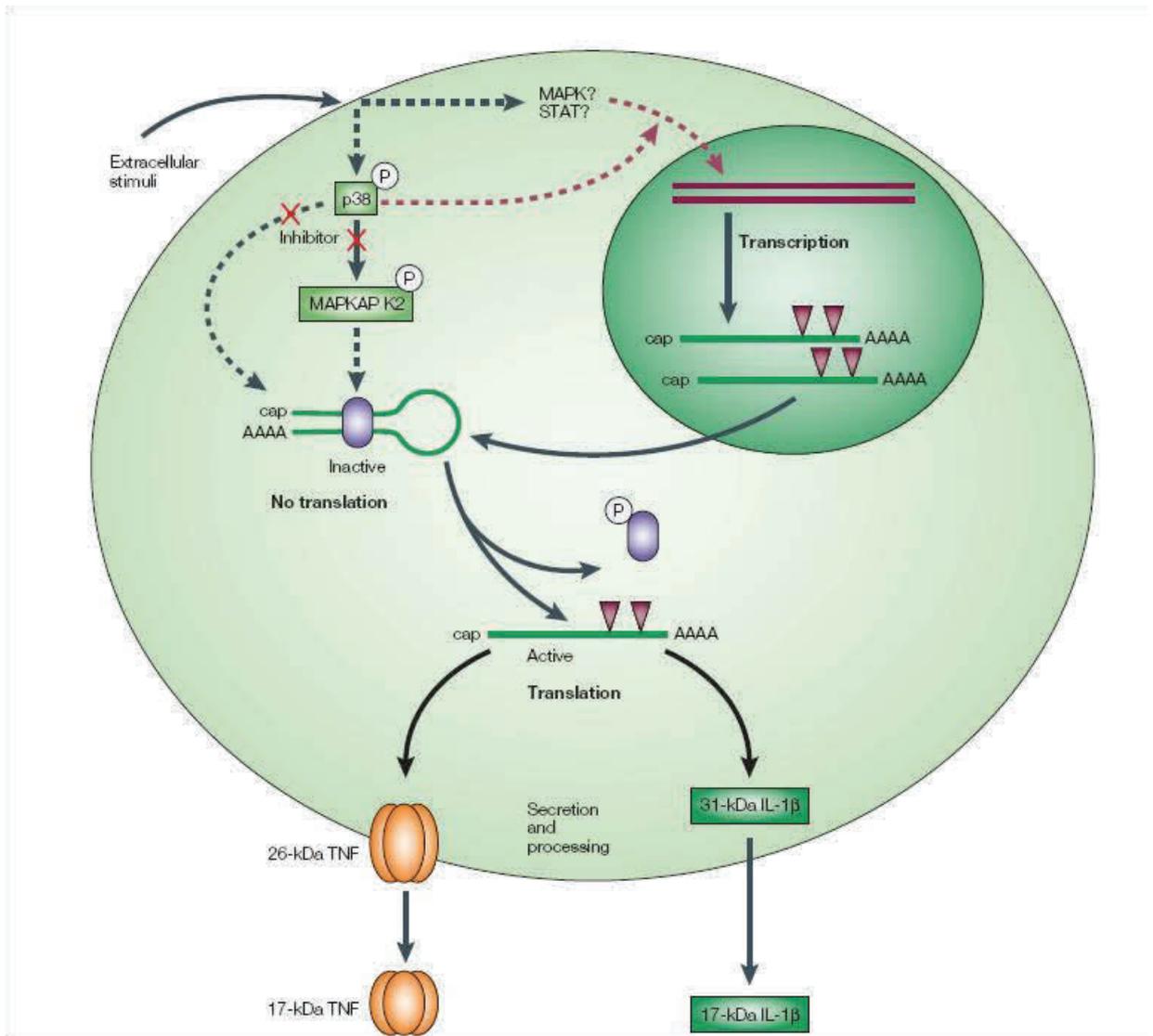


Abbildung 1-3: Die Funktion der p38 MAPK bei der Zytokinbiosynthese. Schematische Darstellung wie die mRNA Stabilität der Zytokine TNF α und IL-1 β über den p38 MAPK Signalweg und AU-reiche Bereiche (rote Dreiecke) reguliert wird. Die Hemmung der p38 MAPK führt dazu, dass die mRNA von einem Bindeprotein besetzt bleibt, was dazu führt, dass das Protein nicht translatiert, sondern abgebaut wird (Kumar, 2003).

Während der letzten fünfzehn Jahre wurden zahlreiche p38 MAPK Inhibitoren mit unterschiedlichsten chemischen Strukturen und Hemmmechanismen entwickelt. Die meisten Substanzen hemmen die Isoformen p38 α und p38 β kompetitiv. Hierbei lagert sich der Inhibitor an einen hydrophoben Bereich der ATP-Bindetasche und verhindert die Bindung von ATP (Tong, 1997). BIRB 796 ist bislang der einzige Wirkstoff, der alle Isoformen spezifisch hemmt. Dieses Diaryl-Harnstoff Derivat wirkt allosterisch, indem durch die Bindung des Inhibitors eine Konformationsänderung des Enzyms erfolgt, die die Bindung von ATP verhindert oder erschwert (Kuma, 2005; Pargellis, 2002).

Etliche p38 MAPK Inhibitoren wurden bei *in vitro* Studien, sowie in Tierversuchen mit Mäusen und Ratten erfolgreich getestet. Alle präklinischen Forschungsergebnisse wiesen darauf hin, dass p38 MAPK Inhibitoren bei Entzündungskrankheiten selektiv und potent wirken könnten (Medicherla, 2006; Wätzig, 2003; Hill, 2008). Tabelle 1-2 zeigt eine Auswahl an p38 MAPK Inhibitoren, die in klinischen Studien für verschiedene Indikationen auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit bisher getestet wurden. Bis heute erreichte kein Hemmstoff die klinische Phase III. Alle Untersuchungen wurden aufgrund von mangelnder Wirksamkeit und starken Nebenwirkungen, wie z.B. Hepatotoxizität, eingestellt (Coulthard, 2009; Hammakar, 2010). Da die Wirkstoffe der ersten Generation noch eine hohe Affinität für andere Kinasen aufwiesen, wurde die Spezifität und Wirkstärke der Substanzen seither immer weiter optimiert (Dominguez, 2005; Zhang, 2007).

Tabelle 1-2: Auswahl einiger p38 MAPK Inhibitoren, die die klinische Phase erreicht haben (www.clinicaltrials.gov). (RA=Rheumatoide Arthritis, COPD= chronisch obstruktive Lungenerkrankung, MC= Morbus Crohn, CVD= Kardiovaskuläre Krankheiten).

Wirkstoff Entwicklung	Status Indikation
ARRY-797 Array Biopharma	Klinische Phase I/II Zahnschmerzen, RA
Pamapimod Roche Pharmaceuticals	Klinische Phase II RA
BIRB 796/ Doramapimod Boehringer Ingelheim	Klinische Phase II MC, Psoriasis, RA
SB 681323 GlaxoSmithKline	Klinische Phase I COPD, neuropath. Schmerz, CVD, RA
GW 856553/ Losmapimod GlaxoSmithKline	Klinische Phase II Arteriosklerose, COPD, CVD, Depressionen
PH-797804 Pfizer	Klinische Phase II COPD, neuropath. Schmerz, RA
RJW-67657 Johnson & Johnson	Klinische Phase I Entzündungskrankheiten
VX-745 Vertex	Klinische Phase II RA

1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und die p38 MAPK

1.3.1 Definition und Behandlung von Morbus Crohn (MC)

Der Morbus Crohn (MC) gehört neben der Colitis Ulcerosa (CU) zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Die Krankheit zeichnet sich durch akute und chronische, in Schüben verlaufende, destruierende Entzündungen der intestinalen Schleimhaut aus (Podolsky, 1991). Während die Colitis Ulcerosa auf den Dickdarm beschränkt bleibt, kann Morbus Crohn alle Bereiche des Gastrointestinaltraktes transmural befallen. Trotz intensiver Untersuchungen sind die ätiologischen und immunpathologischen Hintergründe dieser Krankheit weitgehend ungeklärt. Neben genetischen Einflüssen und exogenen Umweltfaktoren (wie bakterielle Antigene), wird vor allem der unkontrollierten Aktivierung des lokalen intestinalen Immunsystems und von CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zugewiesen (Cho, 2008). Durch die erhöhte Aktivierung der T-Zellen kommt es auch zu einer pathologischen Veränderung der Expression pro- und anti-inflammatorisch wirkender Zytokine in der Darmmukosa (Atreya & Neurath, 2008). Bei der Behandlung von Morbus Crohn unterscheidet man zwischen einer Therapie bei einem akuten Entzündungsschub und einer remissionserhaltenden Therapie. Das primäre Ziel bei einem akuten Schub ist zunächst die Linderung der Symptome, später jedoch auch eine Verlangsamung bzw. bestenfalls ein Ausbleiben der Krankheitsprogression. Dazu werden entzündungshemmende Glukokortikoide oder 5-Aminosalizylsäure (Mesalazin) eingesetzt. In Folge eines akuten Schubs wird der Patient entweder mit Immunsuppressiva (z.B. Azathioprin) oder sogenannten TNF α -Blockern (Adalimumab, Infliximab) in Remission gehalten. Bei TNF α -Blockern handelt es sich um monoklonale Antikörper, die gegen TNF α gerichtet sind. Obwohl die Antikörpertherapie ein wertvolles Mittel darstellt, um Morbus Crohn Patienten in die Remission zu führen, hat diese Therapie auch potenzielle folgenschwere Nachteile (Kopf, 2010). Abgesehen von den hohen Kosten, besteht eine erhöhte Infektionsgefahr, die zu lebensbedrohlichen Situationen führen kann. Die Behandlung mit TNF α Blockern wird deshalb nur nach einer sorgfältigen Nutzen-Risiko Abwägung durchgeführt. Zum anderen hat sich gezeigt, dass die Remissionsrate ein Jahr nach Behandlung sehr variabel ist (Sandborn, 2002). Da auch IL-6,

IL-8 oder IL-10 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Morbus Crohn spielen, besteht nach wie vor Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten mit z.B. dem Ziel auch andere wichtige Zytokine regulieren zu können (McNamee, 2010).

1.3.2 Erfahrungen mit p38 MAPK Inhibitoren in MC

Das Ziel bei der Therapie von Morbus Crohn (MC) ist das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im Darmtrakt wieder herzustellen. p38 MAPK Inhibitoren könnten dabei sehr wertvoll sein, denn als niedermolekulare Wirkstoffe sind sie nicht nur preiswert, sondern auch oral zu verabreichen (Gaestel, 2009). Bislang ist allerdings nicht vollständig geklärt, welche Rolle MAP Kinasen bei Entzündungen im Darm spielen (Sandborn, 2004; Broom, 2009).

Wätzig et al. (2003) haben im Gewebe von Patienten mit CED die TNF α Produktion auf die Aktivierung von p38 α zurückgeführt. Die Arbeitsgruppe Colombel hingegen fand keine Beteiligung der p38 MAPK und der JNK in CED (Malamut, 2006). Bisher gab es nur eine erfolgreiche klinische Studie mit 12 Morbus Crohn Patienten. Mit dem Inhibitor CNI-1493, der JNK und die p38 MAPK hemmt, wurde nach acht Wochen bei 58% der Patienten ein therapeutischer Effekt festgestellt und nach vier Monaten waren noch immer 50% der Patienten in Remission. Allerdings konnte keine verminderte Phosphorylierung der p38 MAPK in Darmbiopsien beobachtet werden. Der therapeutische Effekt wurde deshalb der JNK Hemmung zugesprochen (Hommes, 2002). Eine weitere Studie wurde mit dem Inhibitor BIRB 796, der alle p38 MAPK Isoformen hemmt, durchgeführt. Bei 284 Patienten mit akutem und moderatem Morbus Crohn konnte kein therapeutischer Effekt gegenüber dem Placebo festgestellt werden. Zwar sank das C-reaktive Protein, was als unspezifischer Entzündungsmarker gilt, schon nach einer Woche, stieg aber im Zeitverlauf wieder zum Ausgangswert an. Mit Ausnahme eines leichten Transaminaseanstiegs in der mit BIRB 796 behandelten Gruppe, gab es in keiner Gruppe nennenswerte Nebenwirkungen (Schreiber, 2006).

Einen neuen Ansatz stellt die zellspezifische Hemmung von p38 α dar. Gezielte p38 α Hemmung in Makrophagen zeigte eine anti-inflammatorische Wirkung, indem die Reaktion auf eine Stimulation mit LPS, gemessen anhand der TNF α Ausschüttung, vermindert war (Kang, 2008). Ähnliches war bei Mäusen mit einer p38 α Deletion zu beobachten. Nachdem bei diesen Mäusen mit LPS ein septischer Schock ausgelöst wurde, wurden verminderte TNF α Plasmalevel und höhere Überlebensraten gemessen (Otsuka, 2010). Die Erklärung dieser unterschiedlichen Beobachtungen zeigt die bipolare Rolle von p38 α im Darm. Die

p38 α MAPK reguliert nicht nur die Zytokinproduktion, indem sie Entzündungssignale weiterleitet, sondern sie hat auch eine wichtige Bedeutung bei der Differenzierung von Becherzellen (Abbildung 1-4, A). Der von den Becherzellen produzierte Schleim bildet im Darm eine Barriere gegen Epithelschäden, Bakterieninvasion und falsch regulierte Immunreaktionen (Bell, 1967). Wird die p38 α MAPK im Epithel gehemmt (Abbildung 1-4, B), so ist die Barrierefunktion gestört und es kommt erst recht zu einer Entzündung. Hemmt man hingegen selektiv die p38 α nur in myeloiden Zellen (Abbildung 1-4, C), wird der erwünschte Effekt, nämlich eine reduzierte Entzündungsreaktion, erreicht.

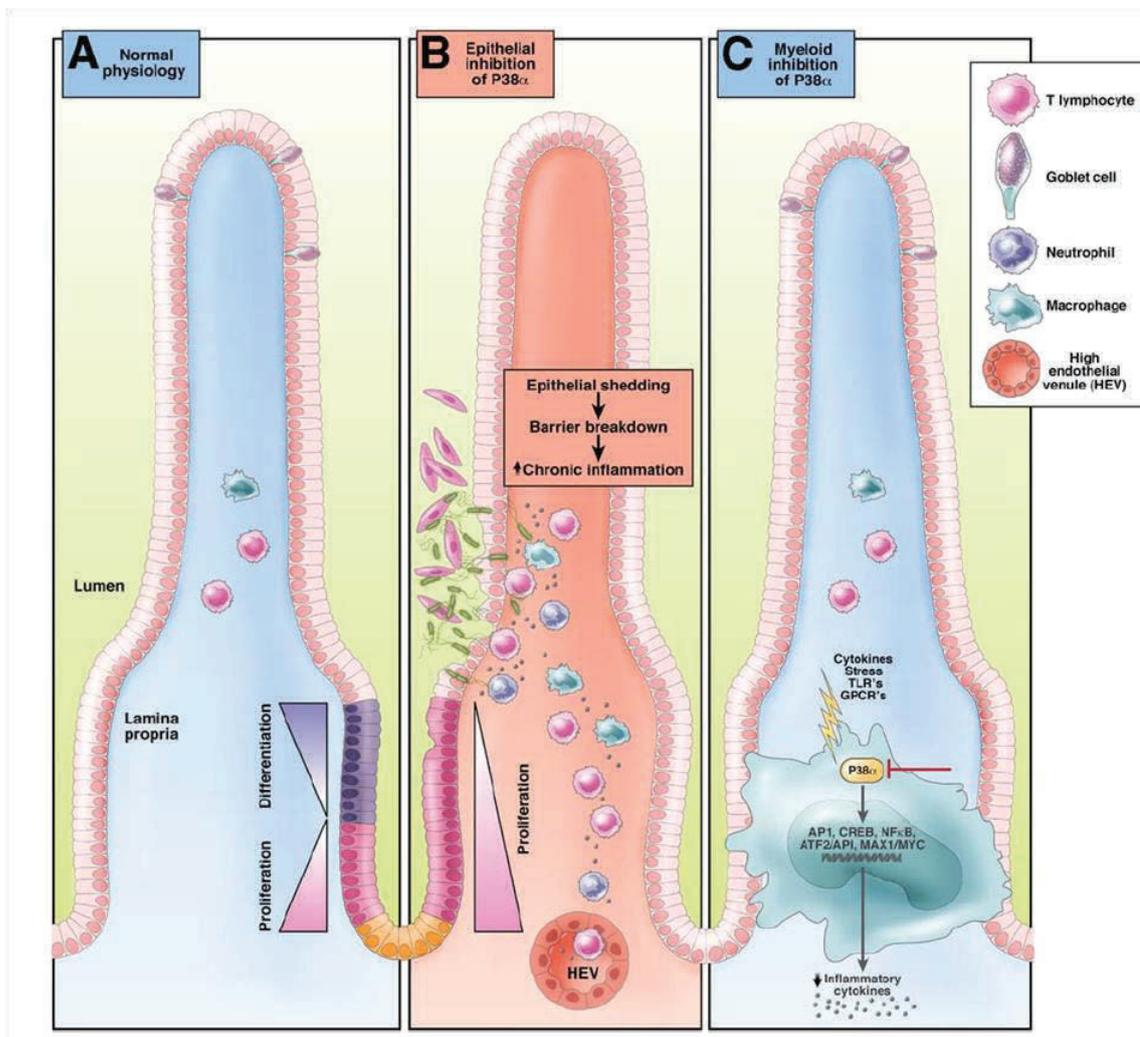


Abbildung 1-4: Effekt selektiver p38 α Hemmung auf die Homöostase im Darm. (A) Unter normalen physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung von epithelialen Vorläuferzellen und der Regulation der Leukozytenrekretierung. Becherzellen spielen eine protektive Rolle, da sie durch Schleimsekretion die Barrierefunktion im Darm erhalten. (B) Wird p38 α selektiv im Epithel gehemmt, führt dies zu Hyperproliferation und mangelhafter Becherzellendifferenzierung. In Folge der gestörten Schutzbarriere kommt es zu chronischer Entzündung und Gewebeschaden. (C) Selektive p38 α Hemmung der myeloiden Zellen führt zu reduziertem Entzündungsgeschehen und weniger Zytokinproduktion (Mc Namee, 2010).

1.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war neue *in vitro* Modelle zur Charakterisierung anti-entzündlich wirkender p38 MAPK Inhibitoren zu entwickeln, diese zu etablieren und bei verschiedenen Spezies (Tiere, Mensch) anzuwenden.

Zunächst sollte ein routinemäßig durchgeführter Enzymassay zur Bewertung potenzieller p38 MAPK Inhibitoren in neuen Laborräumen etabliert und optimiert werden.

Weiter sollte für verschiedene p38 MAPK Inhibitoren die Hemmung der TNF α Ausschüttung bei den Spezies Maus, Ratte, Schwein und Mensch unter gleichen Bedingungen untersucht werden, um mögliche Unterschiede zwischen den Spezies aufzuklären.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte eines p38 MAPK Inhibitors *ex vivo* unter Verwendung von primärem, biologischem Gewebe von gesunden Freiwilligen und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen. Berücksichtigt werden sollte die Expression von neu identifizierten entzündungsrelevanten Genen und die Aktivierung der p38 MAPK Isoformen auf RNA- und Proteinebene. Ein wünschenswertes Ziel dieser Untersuchung war, dass das verwendete *in vitro* Modell auch eine Aussagekraft für entzündetes Darmgewebe hat.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Computergestützte Arbeiten

2.1.1 Internetseiten

Gene Cards - The human gene compendium: <http://www.genecards.org/>

(Genannotationen)

Entrez-Pub Med: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

(Literaturrecherche)

Uni Prot: <http://www.uniprot.org/>

ExPASy Proteomics Server: <http://www.expasy.org/>

(Analyse von Proteinsequenzen und -strukturen)

<http://clinicaltrials.gov/>

(Datenbank des amerikanischen Gesundheitsinstituts über international angemeldete klinische Studien)

2.1.2 Computerprogramme

Microsoft Office XP (Word, Excel, Powerpoint)

Sigma Plot und Sigma Stat (Graphikprogramm, Statistikprogramm)

GraphPad Prism Version 4.0 und 5.0 (Graphikprogramm, Statistikprogramm)

Softmax Pro (Auswertung von Elisadaten)

Aida Image Analyzer 3.21 (Analyse von Western Blots)

Odyssey Software (Analyse von Western Blots)

TaqMan® SDS 2.3 und RQ Study Manager von Applied Biosystems

(Analyse von qRT-PCR Daten)

Jabref (Zitierprogramm)

MDL® ISIS 2.2 (Datenbank für chemische Strukturen)

2.2 Material

2.2.1 Versuchstiere

Für die in Kapitel 3.2 beschriebenen Versuche wurde Vollblut und Gewebe von verschiedenen Versuchstieren gewonnen. Das Rattenvollblut stammte von zwei männlichen und zwei weiblichen Lewis Ratten (Synovo GmbH), die sechs Wochen alt waren. Bei drei männlichen und einem weiblichen Landrasse Schwein (Universität Ulm, Körpergewicht ca. 40 kg) wurden ca. 30 ml Vollblut gewonnen. Für die Versuche mit primären Maussplenozyten wurden eine männliche und zwei weibliche C57BL/6 Mäuse im Alter von acht Wochen getötet und die Milz entfernt. Die Tierhaltung und die Durchführung der Tierversuche wurden unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und entsprechende Genehmigungen durch die Tierschutzkammer lagen vor.

2.2.2 Patientenkollektiv und Probengewinnung

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit humanen PBMCs (Kapitel 3.3) wurden am Institut für klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart Blutproben (K-EDTA) von freiwilligen Spendern (N=18), deren Gesundheitszustand klinisch, sowie mittels Blutuntersuchung bestätigt war, zur Verfügung gestellt. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Studienteilnehmer lag vor.

Für die Untersuchung der p38 MAPK Isoformen in verschiedenen Geweben (Abschnitt 3.3.1.3) wurde von der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie (Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart) bei verschiedenen Eingriffen gesundes Darmgewebe (kein Tumor, keine Entzündung) von Patienten (N =17 Dickdarm, N=14 Dünndarm) asserviert. Ein Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen und eine schriftliche Einverständniserklärung der Studienteilnehmer lag vor.

Weiter wurde von Morbus Crohn Patienten 20 ml Blut, 20 Haare und Biopsien aus entzündetem und nicht entzündetem Kolongewebe (Sigmaabschnitt) gesammelt. Die Diagnose des Morbus Crohn erfolgte entsprechend internationaler/ nationaler Kriterien und aufgrund klinischer, endoskopischer und histopathologischer Befunde. Mittels einer persönlichen Befragung der Patienten wurde der klinische Aktivitätsindex bei Morbus Crohn (CDAI) erhoben. Für die Berechnung des CDAI werden 8 Faktoren (Anzahl der

Stuhlgänge, Gewichtsverlust, Allgemeinbefinden, Bauchschmerzen, Hautbeteiligung, Analfissuren, Hämatokrit, andere Komplikationen) berücksichtigt, die jeweils mit einem eigenen Wertungsfaktor multipliziert werden. Anschließend werden diese Werte zum CDAI summiert. Ab einem Wert von 150 liegt eine Krankheitsaktivität vor. Bei einem berechneten CDAI unter 150 hingegen befindet sich der Patient in Remission (Best, 1976). Zusätzlich wurden Blut, Haare und Biopsien aus nicht entzündetem Kolongewebe von sieben 'Nicht Morbus Crohn' Patienten gesammelt, bei denen eine Koloskopie durchgeführt wurde. Bei diesen Patienten bestand entweder eine andere Erkrankung, oder die Koloskopie wurde im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung vorgenommen (Tabelle 2-1, genaue Auflistung siehe Kapitel 6.3.2). Alle Studienteilnehmer wurden aufgeklärt und haben vor ihrer Teilnahme eingewilligt. Ein entsprechendes Ethikvotum der Universität Tübingen (Studie IKP229, Prüfplan Version 2.0 vom 11.6.2008, Amendment 1: „Identifizierung von Biomarkern zu Krankheitsentstehung und –Progression bzw. Therapieoptimierung bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen“) lag vor. Eine Übersicht über die in die Studie aufgenommenen Patientengruppen liefert Tabelle 2-1, genauere Informationen befinden sich in den Tabellen in Abschnitt 6.3.

Tabelle 2-1: Information über die in der Studie eingesetzten Patientengruppen. Dargestellt sind Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer und Entzündungsaktivität.

	Nicht Morbus Crohn	Morbus Crohn CDAI >150	Morbus Crohn CDAI <150
PBMCs N=15	N=7	N=4	N=3
Gewebe N=11	N=5	N=3	N=3
Alter (Jahre)	48-81	22-54	17-60
Geschlecht (weiblich/männlich)	(2/5)	(2/2)	(0/3)
Krankheitsdauer (Jahre)	-	0-34	0-38
Entzündungsaktivität	keine	hoch	leicht oder keine
Darmbereich	Kolon/Sigma	Kolon/Sigma	Kolon/Sigma
andere Krankheiten	JA (Tabelle 6-3)	-	-
Medikation/ Antibiotika	-	JA (Tabelle 6-2)	JA (Tabelle 6-2)

2.2.3 Technische Ausstattung

Die verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 2-2 aufgelistet.

Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen,
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Thermo Scientific, Hanau
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Emax Precision Microplate Reader	Molecular Devices, Ismaning
Fast Prep®-24	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
FastBlot, Semi-Dry Blotter	Biometra, Göttingen
Feinwaage AC100	Mettler Toledo, Giessen
Image Reader LAS-1000	Fuji Film, Düsseldorf
Invers-Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, München
Multifuge 3SR+	Heraeus, Thermo Scientific, Hanau
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Promega, Mannheim
Netzgerät Power Pac Universal™	Bio-Rad Laboratories, München
Odyssey® Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
pH Meter Seven Easy S20	Mettler Toledo, Giessen
8-Kanallpipette 10µl	Mettler Toledo/Rainin, Giessen
8-Kanallpipette 20-200µl	VWR International, Darmstadt
Pipette 0,5-10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 20-200ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 2-20µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus®-akku	HIRSCHMANN® Laborgeräte, Eberstadt
Plattformschüttler TITRAMAX 100	Heidolph Instruments, Schwabach
PTC-225 Thermocycler	MJ Research, Waltham, USA

Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Sterilbank HS 12/2	Heraeus, Thermo Scientific, Hanau
TaqMan® 7900HT Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Transferringpipette 20-200µl	Brand, Wertheim
Vortex-Schüttler REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage Excellence XS 4002S Delta Range®	Mettler Toledo, Giessen
Wallac 1420 Victor Microplate Reader	Perkin Elmer, Pfaffenhofen
Zentrifuge 5417C/5417R/5415R	Eppendorf AG, Hamburg

2.2.4 Enzyme, Kits und andere Produkte

Die in dieser Arbeit benutzten Produkte zeigt Tabelle 2-3.

Tabelle 2-3: Liste der benutzten Enzyme, Kits und sonstigen Produkte.

Produkt	Hersteller
Acrylamid/Bis [30%]	Bio-Rad, München
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Beta-Glycerophosphat	Fluka, Buchs
Bichinonsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Albumin from Bovine Serum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
FCS (Fetal Calf Serum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, München
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kupfer-II-Sulfat [4%]	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipopolysaccharid <i>E.coli</i> 0111:B4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipopolysaccharid <i>E.coli</i> 026:B6	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipopolysaccharid <i>Salmonella enterica</i> abortus equi	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Liquid Plate Sealer™	Candor Biosciences, Wangen
Lysing Matrix D	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Milchpulver	Fluka, Taufkirchen

<i>mirVana</i> [™] Paris	Ambion®, Darmstadt
<i>mirVana</i> [™] RNA Isolation Kit	Ambion®, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
®Pefabloc SC (AEBSF)	Biomol GmbH, Hamburg
Penicillin-Streptomycin-Mix (100x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteome Profiler Human Phospho MAPK Array	R&D Systems®, Wiesbaden
PVDF Western Blotting Membranes	Roche Diagnostics, Grenzach
rATP	Fluka, Buchs
Restore [™] Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockford, USA
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen
RNAqueous®-Micro Kit	Ambion®, Darmstadt
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
StemPro® Accutase® (Cell Dissociation Reagent)	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TEMED	Roth GmbH, Karlsruhe
Thrombin	GE Healthcare, München
TMB One Component HRP Microwell Substrate	NatuTec, Frankfurt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma Aldrich, Taufkirchen

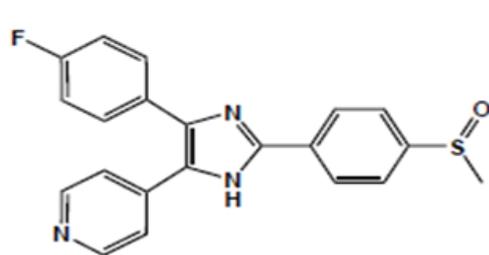
2.2.5 Hemmstoffe/ p38 MAPK Inhibitoren

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen wurden von der Firma c-a-i-r biosciences GmbH (Tübingen) zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 2-4 aufgelistet.

Tabelle 2-4: Übersicht der untersuchten Hemmstoffe mit Molekulargewicht, Summenformel, Spezifität und aktuellem Entwicklungsstatus.

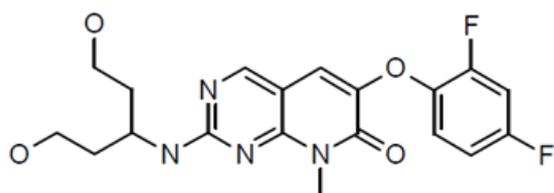
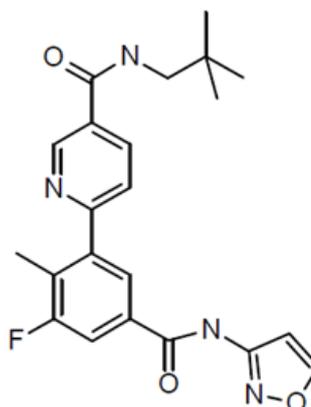
Wirkstoff Entwicklung	Molekulargewicht	Summenformel	Spezifität	Status
SB 203580 Lee et al., 1994	377,44 g/mol	C ₂₁ H ₁₉ FN ₃ O ₅	p38 JNK 2/3	
SB neu (Analog von Losmapimod) GlaxoSmithKline	410,45 g/mol	C ₂₂ H ₂₃ FN ₄ O ₃	p38	Entwicklung
Pamapimod Roche Pharmaceuticals	406,39 g/mol	C ₁₉ H ₂₀ F ₂ N ₄ O ₄	p38 JNK ₃	klinische Phase II beendet
BIRB 796/ Doramapimod Boehringer Ingelheim	527,67 g/mol	C ₃₁ H ₃₇ N ₅ O ₃	p38 JNK _{2/3}	klinische Phase II Entw. eingestellt
CBS 3825 c-a-i-r biosciences	400,48 g/mol	C ₂₀ H ₂₁ FN ₄ O ₂ S	p38	Entwicklung
CBS 3736 c-a-i-r biosciences	358,44 g/mol	C ₁₈ H ₁₉ FN ₄ O ₅	p38	Entwicklung
CBS 3830 c-a-i-r biosciences	374,44 g/mol	C ₁₈ H ₁₉ FN ₄ O ₂ S	p38	Entwicklung
CBS 3835 c-a-i-r biosciences	416,48 g/mol	C ₂₀ H ₂₁ FN ₄ O ₃ S	p38	Entwicklung
ML 3595 c-a-i-r biosciences	372,42 g/mol	C ₁₈ H ₁₇ FN ₄ O ₂ S	p38 PDE4	klinische Phase

Da von manchen Substanzen die Struktur nicht bekannt ist oder nicht offen gelegt werden darf, sind die bekannten Strukturen in Abbildung 2-1 dargestellt.

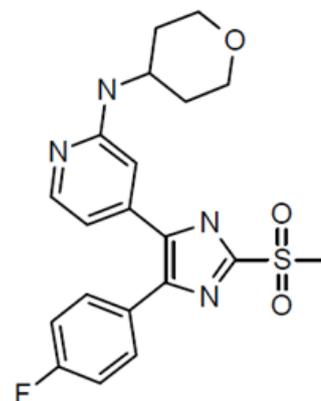


SB 203580
Prototyp der imidazolbasierten
p38 MAPK Inhibitoren

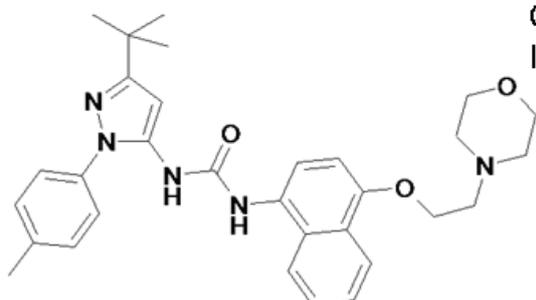
SB neu
Analog von Losmapimod (GW856553),
aktueller klinischer Kandidat
von GlaxoSmithKline



Pamapimod
Inhibitor von Roche Pharmaceuticals
Phase II Studien in RA abgeschlossen



CBS 3835
Inhibitor von c-a-i-r biosciences GmbH



BIRB 796
Inhibitor von Boehringer Ingelheim
Phase II Studien in MC abgeschlossen

Abbildung 2-1: Bekannte Strukturformeln von in dieser Arbeit untersuchten p38 MAPK Inhibitoren.

2.2.6 TaqMan® Custom Array/ Gene Expression Assays

Der TaqMan® Custom Array besteht aus 95 individuell ausgewählten Genen und dem Haushaltsgen 18S ribosomale RNA. Die für weitere Versuche als Markergene identifizierten Gene sind in Tabelle 2-5 grau hervorgehoben.

Tabelle 2-5: Übersicht der im TaqMan® Custom Array (Low Density Array) enthaltenen 96 Gene. Die für weitere Versuche ausgewählten Markergene sind grau markiert.

Gen Symbol	Assay ID	Gen Symbol	Assay ID
CREB1	Hs00231713_m1	IL1RAP	Hs00158057_m1
ATF2	Hs00153179_m1	IL1RN	Hs00893626_m1
CREBBP	Hs00231733_m1	IL6	Hs00985639_m1
HSPB1	Hs03044127_g1	IL6R	Hs01075667_m1
MKKN1	Hs00177610_m1	IL8	Hs00174103_m1
MAPKAPK2	Hs01114281_g1	CXCR1	Hs00174146_m1
RPS6KA5	Hs00178054_m1	CXCR2	Hs01891184_s1
RPS6KA4	Hs00177670_m1	IL9	Hs00914237_m1
MAPK10	Hs00373461_m1	IL10	Hs00174086_m1
MAPK11	Hs00177101_m1	IL10RB	Hs00175123_m1
MAPK12	Hs00268060_m1	IL18	Hs01038788_m1
MAPK13	Hs00234085_m1	IL18RAP	Hs00977695_m1
MAPK14	Hs00176247_m1	IL22	Hs01574154_m1
DUSP1	Hs00610257_g1	IL22RA2	Hs00364814_m1
DUSP4	Hs00154826_m1	IL23A	Hs00900828_g1
CCL2	Hs00234140_m1	IL23R	Hs00332759_m1
CCL3	Hs00234142_m1	ITGB2	Hs00164957_m1
CCL4	Hs00605740_g1	TNF	Hs01113624_g1
CCL5	Hs00174575_m1	TNFSF14	Hs00542477_m1
CCL7	Hs00171147_m1	TOLLIP	Hs01553188_m1
CCL8	Hs00428422_g1	TLR1	Hs00413978_m1
CCL11	Hs00237013_m1	TLR2	Hs01872448_s1
CCL13	Hs00234646_m1	TLR4	Hs00152939_m1
CCL16	Hs00171123_m1	TLR5	Hs00152825_m1
CCL17	Hs00171074_m1	TIRAP	Hs00364644_m1

CCL19	Hs00171149_m1	NFKB1	Hs00765730_m1
CCL21	Hs00171076_m1	NFATC3	Hs00190046_m1
CCL22	Hs00171080_m1	NOS2	Hs01075529_m1
CCL23	Hs00270756_m1	CRP	Hs00265044_m1
CCL24	Hs00171082_m1	CSF1	Hs99999084_m1
CCR1	Hs00174298_m1	CSF2	Hs00929873_m1
CCR2	Hs00174150_m1	HDAC4	Hs01041648_m1
CCR3	Hs99999027_s1	FOS	Hs01119267_g1
CCR4	Hs99999919_m1	NR3C1	Hs00353740_m1
CCR7	Hs99999080_m1	RIPK2	Hs01572690_m1
CXCL1	Hs00236937_m1	LTA	Hs00608020_g1
CXCL2	Hs00601975_m1	LTB	Hs00242739_m1
CXCL3	Hs00171061_m1	LTB4R	Hs00609525_m1
CXCL5	Hs00171085_m1	BCL6	Hs00277037_m1
CXCL6	Hs00605742_g1	FASLG	Hs00181225_m1
CXCL9	Hs00171065_m1	CD40	Hs99999100_s1
CXCL10	Hs00171042_m1	CD40LG	Hs00163934_m1
CXCR4	Hs00607978_s1	CEBPB	Hs00270923_s1
IFNG	Hs00174143_m1	C3	Hs01100917_g1
IL1A	Hs00174092_m1	C3AR1	Hs00377780_m1
IL1B	Hs00174097_m1	C4A	Hs00167147_m1
IL1R1	Hs00991010_m1	GAPDH	Hs02758991_g1
18S	Hs99999901_s1	TBP	Hs00920497_m1

2.2.7 Antikörper

2.2.7.1 Antikörper im p38 MAPK Enzymassay

Tabelle 2-6 zeigt die nach altem (Kaninchen-Antikörper) und neuem (Maus-Antikörper) Protokoll im p38 MAPK Enzymassay eingesetzten Antikörper. Die Antikörper wurden in Blocking Puffer (Puffer TBS-T mit 5% BSA) verdünnt.

Tabelle 2-6: Übersicht der im p38 MAPK Enzymassay eingesetzten Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Isotyp	Spezies	Hersteller
phospho ATF-2 (THR 69/71)	1:500		Kaninchen	Cell Signalling, Boston, USA
phospho ATF-2 (THR 69/71)	1:2000	IgG	Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Mouse IgG-HRP	1:2000	IgG	Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Rabbit IgG-AP	1:4000	IgG	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Rabbit IgG-HRP	1:2000	IgG	Ziege	Bio-Rad, München

2.2.7.2 Antikörper im Western Blot

Die im Western Blot verwendeten Antikörper (Tabelle 2-7) wurden in Blocking Puffer (Puffer TBS-T mit 5% BSA) verdünnt.

Tabelle 2-7: Übersicht der im Western Blot verwendeten Antikörper.

Antikörper	Verdünnung/ Inkubationszeit	Isotyp	Spezies	Hersteller
p38 MAPK	1:1000/üN		Kaninchen	
Phospho-p38 MAPK	1:1000/üN		Kaninchen	Cell Signaling
p38 α MAPK	1:1000/üN		Kaninchen	Technology, Boston,
p38 β (C28C2) MAPK	1:1000/üN	IgG	Kaninchen	USA
p38 δ (10A8) MAPK	1:1000/üN	IgG	Kaninchen	
p38 γ (212464) MAPK	1:1000/üN	IgG	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
β -Actin	1:5000/1h		Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Rabbit IgG-HRP	1:2000/1h	IgG	Ziege	Santa Cruz,
Anti-Mouse IgG-HRP	1:4000/1h	IgG	Ziege	Heidelberg
Anti-Rabbit IRDye®680LT	1:10000/1h	IgG	Ziege	
Anti-Mouse IRDye®800CW	1:10000/1h	IgG	Ziege	LI-COR Biosciences,
Anti-Mouse IRDye®680LT	1:10000/1h	IgG	Ziege	Bad Homburg

2.2.7.3 ELISA Antikörperpaare

Die in Tabelle 2-8 aufgeführten Kits wurden für ELISA Auswertungen verwendet.

Tabelle 2-8: Liste der benutzten ELISA Kits.

ELISA Kit	Hersteller
Human TNF- α DuoSet Elisa Development Kit	R&D Systems®, Wiesbaden
Human IL-1 β DuoSet Elisa Development Kit	R&D Systems®, Wiesbaden
Human IL-6 DuoSet Elisa Development Kit	R&D Systems®, Wiesbaden
Rat TNF- α ELISA Kit	Biosource, Darmstadt
Porcine TNF-alpha Quantikine ELISA Kit	R&D Systems®, Wiesbaden

2.2.8 Rekombinante Proteine

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2-9 aufgelisteten rekombinanten Proteine verwendet.

Tabelle 2-9: Liste der rekombinanten Proteine.

Rekombinantes Protein	Hersteller	Konzentration
P38 α MAP Kinase/MAPK14	CellSignalling, Boston, USA	100 μ g/ml
P38 β MAP Kinase/MAPK11	CellSignalling, Boston, USA	100 μ g/ml
P38 δ MAP Kinase/MAPK13	CellSignalling, Boston, USA	100 μ g/ml
P38 γ MAP Kinase/MAPK12	CellSignalling, Boston, USA	100 μ g/ml
Human recombinant TNF- α (E.coli expressed)	R&D Systems®, Wiesbaden	100 ng/ml
p38 MAPK aktiviert	Universität Tübingen	1,35 mg/ml
ATF-2 (amino acids 19-96)	Millipore, Schwalbach	5 mg/ml
ATF-2 neu	Proquinase, Freiburg	1,924 mg/ml

2.2.9 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (H_2O_d)/ Milliporwasser angesetzt und soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur aufbewahrt. Alle mit einem ☼ gekennzeichneten Lösungen wurden 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

p38 MAPK Enzymassay

Blocking-Lösung	1% BSA in TBS-T
0,1 M Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,5) (Coating Puffer)	0,84 g NaHCO_3 0,36 g Na_2CO_3 ad 100 ml H_2O
1 M DTT [154,2 g/mol] [-20°C] (Antioxidant)	15,42 g ad 100 ml H_2O
1 M β-Glycerophosphat [306,12 g/mol] [-20°C] (Phosphataseinhibitor)	30,61 g ad 100 ml H_2O
Kinase-Puffer (eiskalt)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM MgCl_2 10 mM β -Glycerophosphat 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA 1 mM DTT 100 μM rATP 100 μM Na_3VO_4
1 M $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ [M=203,31 g/mol] (Komplexbildner)	20,33 g ad 100 ml H_2O
100 mM Na_3VO_4 [M=183,9 g/mol]	0,18 g ad 10 ml H_2O

1,5 M Natriumchlorid (NaCl) ☼ [58,442 g/mol]	8,76 g ad 100 ml H ₂ O
250 mM Natriumpyrophosphat [265,9 g/mol] (Emulgator)	0,66 g ad 10 ml H ₂ O
100 mM rATP-Stammlösung [-20°C] (Cosubstrat)	56,9 mg rATP-Na ₂ 1 ml H ₂ O
TBS (10x) ☼	400 g NaCl 10 g KCl 150 g Tris-Base pH 7,4 mit HCl (~100 ml) ad 5 L H ₂ O
TBS-T (Waschpuffer für p38 Enzymassay)	0,1% Tween20 in 1x TBS (v/v)
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	15,76 g Tris-HCl (Hydrochlorid) ad 100 ml pH-Wert einstellen durch Zugabe von Tris-Base (Aminomethan)

Stimulationsversuche

DMSO-Lösung (1%)	1% in PBS
DPBS-Puffer (zur Verdünnung des Vollblutes)	4,0 g NaCl 0,1 g KCl 0,1 g KH ₂ PO ₄ 0,575 g Na ₂ HPO ₄ 0,5 g D-Glucose ad 500 ml H ₂ O
10 µg/ml LPS Stimulationslösung	100 µg in 10 ml PBS

PBS (10x) ☼	160 g NaCl (137 mM) 23,2 g Na ₂ HPO ₄ (8,1 mM) 4 g KH ₂ PO ₄ (1,5 mM) 4 g mM KCl (2,7) ad 2 L H ₂ O pH 7,2 – 7,4
100 ng/ml TNF Stimulationslösung	10ng in 100 µl PBS + BSA (0,1%)

ELISA

Blocking-Lösung und Reagent Diluent	1% BSA in 1x PBS pH 7,2 - 7,4
PBS (10x) ☼	160 g NaCl (137 mM) 23,2 g Na ₂ HPO ₄ (8,1 mM) 4 g KH ₂ PO ₄ (1,5 mM) 4 g mM KCl (2,7) ad 2 L H ₂ O pH 7,2 – 7,4
PBS (1x) ☼	8 g NaCl (137 mM) 1,16 g Na ₂ HPO ₄ (8,1 mM) 0,2 g KH ₂ PO ₄ (1,5 mM) 0,2 g KCl (2,7 mM) ad 1 L H ₂ O pH 7,2 – 7,4
PBS-T (Waschpuffer für Elisa)	0,05% Tween20 in 1x PBS (v/v) pH 7,2 – 7,4
Stopp-Lösung	10% H ₂ SO ₄ in H ₂ O
Tween20-Lösung	10% in H ₂ O

SDS-PAGE und WESTERN BLOT

10% APS (Ammoniumpersulfat) [4°C]	100 mg in 1 ml H ₂ O
Blocking-Lösung	5% Magermilchpulver in 1x TBS-T 5% BSA in 1x TBS-T
250mM EDTA [292,24 g/mol]	7,3 g ad 100 ml H ₂ O
Elektrophoresepuffer (10x)	150 g Tris Base 720 g Glycin 250 ml 20% SDS ad 5 L H ₂ O
Elektrophoresepuffer (1x)	100 ml 10x Elektrophoresepuffer 900 ml H ₂ O
1 M β-Glycerophosphat [306,12 g/mol] [-20°C] (Phosphataseinhibitor)	30,61 g ad 100 ml H ₂ O
Proteinextraktionspuffer [4°C] (für PBMCs)	20 mM Tris HCl (pH 7,5) 1% TritonX 100 150 mM NaCl 1 mM EDTA 25 mM Sodiumpyrophosphat 1 mM Glycerolphosphat 1 mM Na ₃ VO ₄ 6 M Urea + Sigma PIC (1%) + Pefablock SC (1 mM) + Phosphataseinhibitor II (1%) frisch vor Gebrauch hinzufügen

100 mM Na₃VO₄ [183,9 g/mol]	0,18 g ad 10 ml H ₂ O
1,5 M Natriumchlorid (NaCl) [58,442 g/mol]	8,76 g ad 100 ml H ₂ O
250 mM Natriumpyrophosphat [265,9 g/mol] (Emulgator)	0,66 g ad 10 ml H ₂ O
10% SDS-Lösung	10 g ad 100 ml H ₂ O
SDS-Ladepuffer (5x) [4°C]	250 mM Tris HCl (pH 6,8) 0,01% Bromphenolblau 5% SDS 5% β-Mercaptoethanol 40% Glycerin
TBS (10x)	400 g NaCl 10 g KCl 150 g Tris-Base pH 7,4 mit HCl (~100 ml) ad 5 L H ₂ O
TBS-T (Waschpuffer für Western Blot)	0,1% Tween20 in 1x TBS (v/v)
Transferpuffer (für Semi-dry Western Blotting)	29 g Tris-Base 14,6 g Glycin 9,25 ml 20% SDS 1 L Methanol ad 5L H ₂ O

1 M Tris-HCl (pH 7,5)	15,76 g Tris-HCl (Hydrochlorid) ad 100 ml pH-Wert einstellen durch Zugabe von Tris-Base (Aminomethan)
0,5 M Tris (pH 6,8) Sammelgel	6,06 g ad 100 ml H ₂ O
1,5 M Tris (pH 8,8) Trenngel	18,17 g ad 100 ml H ₂ O
10% Triton X-100 (Detergens)	1 ml ad 10 ml H ₂ O

2.2.10 Kulturmedien

- Kulturmedium für Milzzellen der Maus
50% RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
50% DMEM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
10% FBS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
β-Mercaptoethanol [50 µM]
Penicillin [50 U/ml]/ Streptomycin [100 µg/ml]/ Amphotericin B [0,2 µg/ml]
- Kulturmedium für humane PBMCs
RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

2.3 Methoden

2.3.1 *In vitro* Untersuchung mittels p38 MAPK Enzymassay

Die quantitative Bestimmung der Hemmwirkung von neu synthetisierten Substanzen auf die p38 α MAP Kinase erfolgte mit einem standardisierten Enzymassay. Das Messprinzip und die experimentelle vorgehensweise sind in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt. Die Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität erfolgt indirekt durch einen ELISA, bei dem die Phosphorylierung von ATF-2 (Aktivierender Transkriptionsfaktor 2) durch die p38 MAP Kinase in Anwesenheit verschiedener Hemmstoffkonzentrationen quantifiziert wird. Der Transkriptionsfaktor ATF-2 ist ein Zinkfingerprotein, das in Stressreaktionen von der p38 MAP Kinase aktiviert wird, um die Transkription anderer wichtiger Gene zu regulieren (CRE, H2B, H4). Die Aktivierung von ATF-2 erfolgt durch Phosphorylierung der beiden Aminosäuren Threonin 69 und Threonin 71 (Ouwens, 2002).

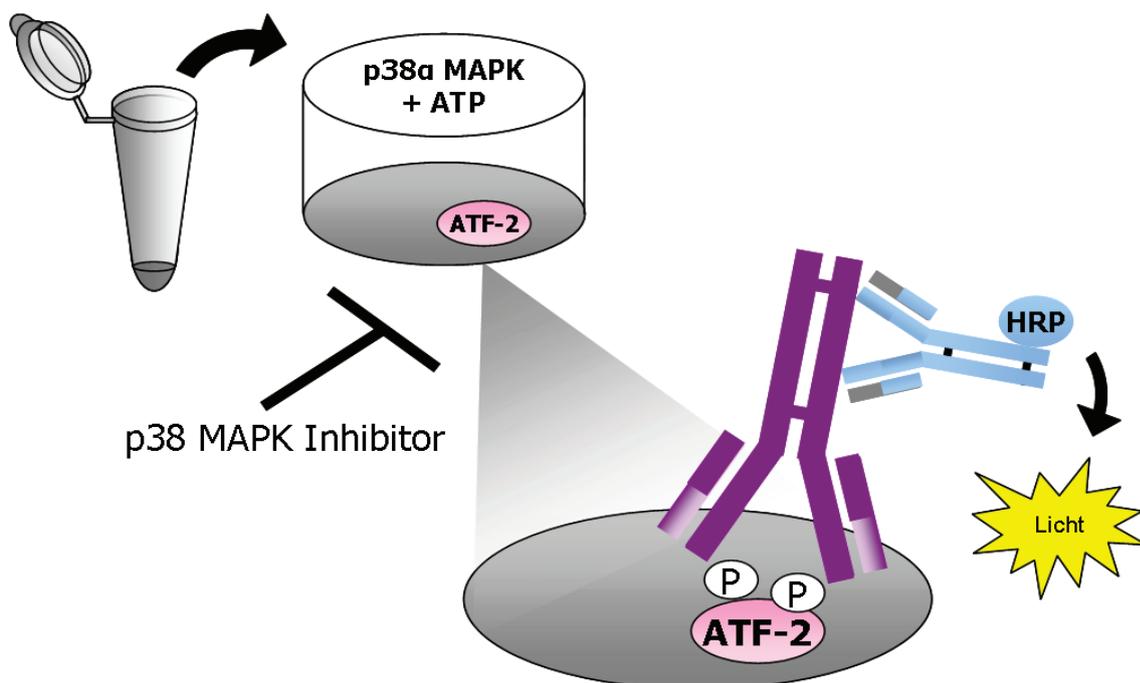


Abbildung 2-2: Der p38 MAPK Enzymassay. Beim p38 Enzymassay wird ein Reaktionsmix (aktive p38 α MAPK und ATP) in die Vertiefung einer mit dem p38 Substrat ATF-2 beschichteten Mikrotiterplatte gegeben. Die Aktivität der p38 Kinase wird über einen phospho-spezifischen ATF-2 ELISA quantifiziert. Die Hemmwirkung eines p38 MAPK Inhibitors wird bestimmt, indem man dem Reaktionsmix den Inhibitor zusetzt und das Messergebnis zum Ansatz ohne Inhibitor in Relation setzt.

Der Versuch wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Pro Vertiefung wurden 50 µl des p38 MAPK Substrats ATF-2 [6,4 µg/ml] verteilt und über Nacht bei 4°C an die Platte gebunden. Am Versuchstag wurden die Platten für 2 Stunden mit einer Rinderserumalbumin-Lösung [1% BSA in TBS-T] behandelt, um freie Bindungsstellen zu blockieren und eine unspezifische Bindung der später eingesetzten Antikörper zu vermeiden. Während der Wartezeit wurde der Reaktionsansatz aus Kinasepuffer [50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM β-Glycerphosphat, 100 µg/ml BSA, 1 mM DTT, 100 µM rATP, 100 µM Na₃VO₄], aktivierter p38α MAP Kinase [241 ng/ml] und der Hemmstoff-Lösung auf Eis vorbereitet. Aus einer 10 mM Stammlösung des Hemmstoffes in DMSO wurden vier Verdünnungen hergestellt, die ein möglichst breites Wirkspektrum (meistens 10 µM - 0,01 µM) abdecken. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit TBS-T Puffer wurden 50 µl der Reaktionsansätze in die Vertiefungen gegeben und die Enzymreaktion durch Inkubation bei 37°C gestartet. Während der 60 minütigen Reaktion konkurrieren das Co-Substrat ATP und der Hemmstoff um die Bindung in der ATP-Bindungsstelle der p38 MAP Kinase. Bindet ATP, wird das Substrat ATF-2 durch die p38 MAP Kinase an den Aminosäuren Threonin 69 und Threonin 71 phosphoryliert. Bindet der Hemmstoff, so wird das Enzym reversibel blockiert. Je stärker die Hemmaktivität der Testverbindungen ist, desto weniger ATF-2 wird phosphoryliert. Die Enzymreaktion wurde durch dreifaches Waschen mit TBS-T gestoppt. Zur Quantifizierung des phosphorylierten ATF-2 wurde ein ELISA mit einer zweistufigen Antigen-Antikörper-Reaktion durchgeführt. Der erste Antikörper ist gegen das doppelt phosphorylierte ATF-2 gerichtet [Maus anti-phospho-ATF-2 (THR 69/71)] und wurde in Blocking-Lösung verdünnt 1,5 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurde ein mit Peroxidase konjugierter zweiter Antikörper, der spezifisch an den primären Antikörper bindet [Ziege anti-Maus IgG-HRP], eingesetzt. Er wurde ebenfalls in Blocking-Lösung verdünnt und für 40 Minuten auf die Platte pipettiert. Zur visuellen Detektion wurde die Platte nach fünf Waschgängen mit 100 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) beladen. Dieses Chromogen und Wasserstoffperoxid enthaltende Flüssigsubstrat entwickelt durch die Peroxidasereaktion (Wasserstoffperoxid wird zu Wasser reduziert, TMB wird oxidiert) ein blaues Endprodukt. Nach 10 - 15 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µl Schwefelsäure [10%] abgestoppt, was zu einem Farbumschlag von blau zu leuchtend gelb führt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm Absorption eingelesen wird. Für die Berechnung der Hemmwirkung der getesteten Verbindungen wurden Kontrollansätze mitgeführt. In der Negativkontrolle wurde Kinasepuffer ohne p38α MAP Kinase angesetzt und als Wert für nicht spezifische Bindung (NSB) an der

Polystyroloberfläche der Platte erfasst. Dies entspricht dem Hintergrund, der für die Auswertung von allen Proben und Stimulationskontrollen abgezogen wurde. Die maximale Phosphorylierung bzw. Aktivierung wurde in der Stimulationskontrolle gemessen, die nur Kinasepuffer (+ATP) und die aktivierte p38 α MAP Kinase enthielt.

Alle neu synthetisierten Verbindungen wurden in vier verschiedenen Konzentrationen in Triplikaten getestet und für jeden potentiellen Inhibitor wurde der IC₅₀ Wert bestimmt. Dieser stellt die halbe maximale (50%) hemmende Konzentration einer Substanz dar, also die Konzentration, bei der 50% der Aktivität eines Enzyms gehemmt ist.

2.3.2 Ex vivo Untersuchung der Zytokinausschüttung in Vollblut

Eine weitere Standard-Screeningmethode für potentielle p38 MAPK Hemmstoffe ist die Stimulation der Zytokinausschüttung in humanem Vollblut. Testverbindungen, die *in vitro* ein gutes Hemmpotential gezeigt haben, werden so weiter klassifiziert. Dabei wird untersucht, wie gut die Testverbindungen eine mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Zytokinausschüttung in menschlichem Vollblut hemmen können. In diesem *ex vivo* Versuch spielen Löslichkeit, Plasmaproteinbindung, Membranpermeabilität und Metabolismus der Verbindungen, sowie die physiologischen Bedingungen im Blut eine Rolle.

2.3.2.1 Verdünnung der Hemmstoff-Lösungen

Die Inhibitoren werden als 10 mM Stammlösung in DMSO gelagert. Aus den Stammlösungen wurden mit PBS und 1% DMSO-Lösung Hemmstoff-Lösungen (10x) in vier verschiedenen Konzentrationen (meist 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M und 0,1 μ M) hergestellt, die alle 1% DMSO enthalten. Die eingesetzten Lösungen wurden immer 10-fach konzentriert angesetzt, da im Versuch selbst nochmals eine zehnfache Verdünnung stattfindet. So liegt DMSO im Versuch in einer Endkonzentration von 0,1% vor (Tabelle 2-10).

Tabelle 2-10: Verdünnung der Hemmstoffe (Stamm: 10 mM in 100% DMSO).

Hemmstoff (10x)	Verdünnung	Zielkonzentration
100 µM [1:100]	990 µl PBS + 10 µl [10 mM/100% DMSO]	10 µM
10 µM [1:10]	900 µl 1%DMSO+ 100 µl [100 µM]	1 µM
1 µM [1:10]	900 µl 1%DMSO+ 100 µl [10 µM]	0,1 µM
0,1 µM [1:10]	900 µl 1%DMSO+ 100 µl [1 µM]	0,01 µM

Neben den eigentlichen Hemmstoffproben wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Der nicht stimulierte Basalwert (Negativkontrolle) sollte eine möglichst geringe bzw. keine TNF α Ausschüttung zeigen. Der Stimulationswert wurde ohne Hemmstoff stimuliert und dient als Positivkontrolle. Die im Stimulationswert gemessene TNF α Konzentration wird als 100% Ausschüttung bzw. 0% Hemmung definiert und dient als Bezugspunkt für die Berechnung des Hemmpotenzials der Testverbindungen.

2.3.2.2 Untersuchung der Zytokinausschüttung in humanem Vollblut

Das Blut wurde in Kalium-EDTA-Röhrchen abgenommen und zu gleichen Teilen mit DPBS vermischt. 400 µl des verdünnten Blutes wurden dann mit den 10x Hemmstoff-Lösungen bzw. 1% DMSO-Lösung (Basal- und Stimulationswert) für 15 Minuten im CO₂-Schrank (37°C, 5% CO₂-Sättigung) vorinkubiert. Danach wurde die stimulierende LPS-Lösung [10 µg/ml] in die Hemmstoffproben und in die Stimulationswerte gegeben, sodass die LPS Endkonzentration 1 µg/ml betrug. Die Proben wurden für 4 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂) und die Reaktion anschließend durch Zugabe von je 500 µl eiskaltem DPBS-Puffer gestoppt (Tabelle 2-11). Durch Zentrifugation (6 Minuten, 800 x g, 4°C) wurden die zellulären Bestandteile vom Plasma abgetrennt. Im abgenommenen Überstand (50 µl) wurde die Zytokinausschüttung dann mit einem humanen TNF α ELISA nach Vorschrift des Herstellers bestimmt (Kapitel 2.3.6).

Tabelle 2-11: Untersuchung der TNF α Ausschüttung in humanem Vollblut.

	Basalwert	Stimulationswert	Hemmstoffprobe
1% DMSO in PBS	50 μ l	50 μ l	---
10x Hemmstoff in 1% DMSO	---	---	50 μ l
Vollblut (1:2 in DPBS)	400 μ l	400 μ l	400 μ l
15 min Präinkubation bei 37°C und 5% CO ₂			
PBS	50 μ l	---	---
LPS E.coli o26:B6 (10 μ g/ml)	---	50 μ l	50 μ l
Gesamtvolumen	500 μ l	500 μ l	500 μ l
4 h Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂			
Reaktionsstopp mit 500 μ l eiskaltem DPBS-Puffer			
Zentrifugieren (800 x g, 6 min, 4°C)			
Überstand abnehmen und mittels Elisa (human TNF α ELISA) auswerten			

2.3.2.3 Untersuchung der TNF α Ausschüttung in Vollblut von Schweinen

Vollblut von einem Schwein wurde in Lithium-Heparin Röhren gesammelt und unverdünnt eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie die Stimulation von menschlichem Vollblut (Tabelle 2-11), allerdings wurde hier eine LPS-Lösung in höherer Konzentration eingesetzt. Um vergleichbare Stimulationswerte wie in menschlichem Blut zu erreichen, wurde das Schweineblut mit 25 μ g/ml LPS (Serotyp E.coli o111: B4) stimuliert. Anschließend wurden 50 μ l des Überstandes mit einem spezifischen TNF α ELISA für Schweine von R&D Systems® (Quantikine porcine TNF α ELISA) ausgewertet.

2.3.2.4 Untersuchung der TNF α Ausschüttung in Vollblut von Ratten

Rattenvollblut wurde in mit Lithium-Heparin behandelten Röhrchen gesammelt und für den Versuch mit DPBS (1:2) verdünnt. Die Durchführung erfolgte wie in Tabelle 2-12 aufgelistet. Das Rattenblut konnte nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS Salmonella enterica Serotyp abortus equi stimuliert werden. Mit 50 μl Plasma wurde die TNF α Ausschüttung in einem Ratten TNF α ELISA Kit von BioSource™ ausgewertet.

Tabelle 2-12: Untersuchung der TNF α Ausschüttung in Rattenvollblut.

	Basalwert	Stimulationswert	Hemmstoffprobe
1% DMSO in PBS	25 μl	25 μl	---
10x Hemmstoff in 1% DMSO	---	---	25 μl
Vollblut (1:2 in DPBS)	200 μl	200 μl	200 μl
15 min Präinkubation bei 37°C und 5% CO ₂			
PBS	25 μl	---	---
LPS Salmonella enterica Serotyp abortus equi (100 $\mu\text{g/ml}$)	---	25 μl	25 μl
Gesamtvolumen	250 μl	250 μl	250 μl
2 h Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂			
Reaktionsstopp mit 250 μl eiskaltem DPBS-Puffer			
Zentrifugieren (800 x g, 6 min, 4°C)			
Überstand abnehmen und mittels Elisa (rat TNF α ELISA) auswerten			

2.3.3 Untersuchung der Zytokinausschüttung in PBMCs

2.3.3.1 Isolierung von PBMCs aus humanem Vollblut

PBMCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Vollblut isoliert. In ein 50 ml konisches Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml HISTOPAQUE®-1077 von Sigma-Aldrich gegeben und auf RT gebracht. Das HISTOPAQUE®-1077 wurde dann vorsichtig mit 25 ml verdünntem Vollblut (1:2 mit PBS-Puffer) überschichtet und exakt 30 Minuten bei RT zentrifugiert (400 x g, Bremse und Beschleunigung bei 1 - 2). Nach dem Zentrifugieren wurde die obere gelbliche Plasmaschicht bis 0,5 cm oberhalb der mononukleären Zellschicht (Grenzschicht zwischen Plasma und Histopaque, Abbildung 2-3) abgenommen und bei -20°C eingefroren. Mittels ELISA wurde später die basale Zytokinausschüttung im Plasma bestimmt. Bei gesunden Spendern ist eine Zytokinausschüttung im Plasma nicht detektierbar. Falls Zytokine nachgewiesen wurden, war das ein Hinweis, dass die Zellen möglicherweise bei der Blutentnahme durch den Rotationsdruck in der Kanüle oder durch die Isolationsmethode Stress ausgesetzt wurden.

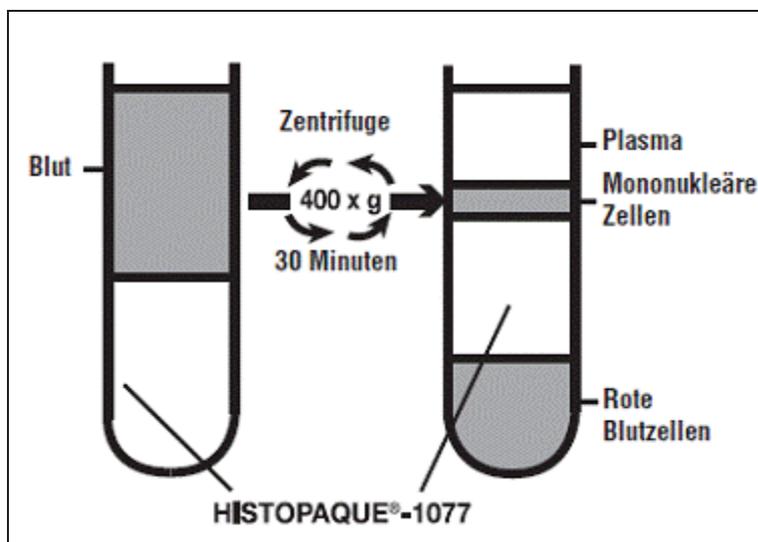


Abbildung 2-3: Isolierung von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation (Quelle: Sigma-Aldrich). Während der Zentrifugation wurden die Blutzellen nach ihrer Dichte aufgetrennt. In der obersten Schicht lagerten sich Plasma und die mononukleären Zellen des Blutes an. HISTOPAQUE®-1077 trennte davon die roten Blutzellen, die sich in der untersten Schicht sammelten.

Im Weiteren wurde die weiße mononukleäre Zellschicht mit maximal der Hälfte der darunter liegenden Histopaqueschicht abgenommen. Dabei wurde die mononukleäre

Zellschicht aus jeweils zwei Zentrifugenröhrchen eines Spenders in einem neuen Röhrchen vereint und mit PBS-Puffer auf 50 ml verdünnt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (250 x g, 10 Minuten, RT) pelletiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden die Zellen mit PBS resuspendiert und abzentrifugiert (250 x g, 10 Minuten). Nach zwei Waschschrritten wurde das Zellpellet in RPMI-Medium aufgenommen und die Zellen gezählt.

2.3.3.2 Zellzählung und Vitalitätstest im Hämozytometer

Um die Anzahl und Vitalität der Zellen nach der Isolierung zu bestimmen, wurden 20 µl Zellsuspension und 20 µl Trypanblau [0,4 %] (Verdünnungsfaktor 2) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Vitale Zellen können Trypanblau nicht aufnehmen. Bei geschädigten Zellen ist die Membrandurchlässigkeit erhöht, weshalb der Farbstoff in die Zelle eindringt und deren Zellkern und Zytoplasma blau färbt. Unterm Mikroskop wurden die ungefärbten Zellen in zwei Großquadraten (mit 16 kleinen Quadraten) der Zählkammer ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde dann mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellen je Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnung}$$

2.3.3.3 Messung der Zellvitalität über den MTT-Umsatz

Zusätzlich wurde überprüft, ob die verschiedenen Behandlungen und die Stimulationsdauer Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben. MTT (Methylthiazoltetrazoliumbromid) ist ein gelbes, wasserlösliches Salz, welches von mitochondrialen Dehydrogenasen gesunder Zellen zu einem blauen Formazankomplex reduziert werden kann. Der Grad des MTT-Umsatzes ist ein Maß für die Lebensfähigkeit der Zelle. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl MTT-Lösung (0,5 mg/ml in RPMI Medium) resuspendiert, in eine 96-well Platte überführt und für 1 - 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die sich bildenden blauen Formazankristallen zu lösen, wurden 100 µl Isopropanol mit 0,02 M Salzsäure in jede Vertiefung gegeben und die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die optische Dichte verhält sich bei der Auswertung proportional zur Zellvitalität.

2.3.3.4 Untersuchung der Zytokinausschüttung in PBMCs

Die PBMCs wurden auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und 200 μ l pro Ansatz auf Reaktionsgefäße verteilt. Die Zellen wurden zunächst mit den verschiedenen Hemmstoff-Lösungen für 15 Minuten vorinkubiert und anschließend mit 1 μ g/ml LPS (Serotyp E.coli o26:B6) für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank stimuliert (Tabelle 2-13). Zum Reaktionsende wurde der Überstand abgenommen und für die spätere Auswertung eingefroren. Mit humanen ELISA Kits wurde die Freisetzung von TNF α , IL-1 β und IL-6 quantitativ bestimmt.

Tabelle 2-13: Untersuchung der Zytokinausschüttung in PBMCs.

	Basalwert	Stimulationswert	Hemmstoffprobe
1% DMSO in PBS	25 μ l	25 μ l	---
10x Hemmstoff in 1% DMSO	---	---	25 μ l
PBMCs (1×10^6 /well)	200 μ l	200 μ l	200 μ l
15 min Präinkubation bei 37°C und 5% CO ₂			
PBS	25 μ l	---	---
LPS E.coli o26:B6 (10 μ g/ml)	---	25 μ l	25 μ l
Gesamtvolumen	250 μ l	250 μ l	250 μ l
4 h Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂			
Reaktionsstopp durch Zentrifugation (800 x g, 6 min, 4°C)			
Überstand abnehmen und mittels Elisa (human TNF α ELISA) auswerten			

2.3.4 Untersuchung der TNF α Ausschüttung in Splenozyten

2.3.4.1 Isolation von Splenozyten/ Milzzellen der Maus

Die Milzzellen bzw. Splenozyten wurden in Anlehnung an das Protokoll von Coligan und Mitarbeitern isoliert (Ezquera, 1990). Hierzu wurde einer Maus die Milz entfernt und in eiskaltem PBS-Puffer auf Eis bis zur Weiterverarbeitung (spätestens nach 6 Stunden) aufbewahrt. Die Milz wurde anschließend mit einem Skalpell unter sterilen Bedingungen aufgeschlitzt, 2 - 3 ml PBS + Penicillin [50 U/ml]/ Streptomycin [100 μ g/ml]/ Amphotericin B [0,2 μ g/ml] zugegeben und mit einer sterilen Pipettenspitze ausgequetscht. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in einer 5 ml Einwegspritze wurden die Zellen suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben (~5 Minuten), sodass sich große Teile am Boden absetzen. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 Minuten zentrifugiert (300 x g). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet ohne Vortexen vorsichtig in Kulturmedium (50% RPMI, 50% DMEM, 10% FBS, β -Mercaptoethanol [50 μ M], Penicillin [50 U/ml]/ Streptomycin [100 μ g/ml]/ Amphotericin B [0,2 μ g/ml]) aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (bei 300 x g, 10 Minuten) wurde das Pellet erneut in Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl nach Trypanblau-Färbung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Kapitel 2.3.3.2).

2.3.4.2 Stimulation der Splenozyten

Die Splenozytensuspension wurde auf eine Konzentration von ungefähr 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und 200 μ l pro Ansatz wurden in eine Zellkulturplatte mit Rundboden (96 Vertiefungen) gegeben. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Splenozyten zunächst mit Hemmstoff-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen (Endkonzentration: 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M und 0,01 μ M) für 15 Minuten vorinkubiert und anschließend mit 100 ng/ml LPS (Serotyp E.coli o26:B6) für 18 Stunden bei 37°C/ 5% CO₂ im Brutschrank stimuliert (Tabelle 2-14). Zum Reaktionsende wurde der Überstand abgenommen und eingefroren. Die TNF α Ausschüttung wurde in 50 μ l Zellkulturüberstand mit einem ELISA Kit, der einen Ratte-TNF α -spezifischen Antikörper enthielt, aber auch für die Messung von Maus-TNF α geeignet ist, nach Vorschrift des Herstellers bestimmt (Kapitel 2.3.6).

Tabelle 2-14: Untersuchung der TNF α Ausschüttung in Milzzellen der Maus.

	Basalwert	Stimulationswert	Hemmstoffprobe
1% DMSO in PBS	25 μ l	25 μ l	---
10x Hemmstoff in 1% DMSO	---	---	25 μ l
Splenozyten (1×10^6 /Ansatz)	200 μ l	200 μ l	200 μ l
15 min Präinkubation bei 37°C und 5% CO ₂			
PBS	25 μ l	---	---
LPS E.coli o26:B6 (1 μ g/ml)	---	25 μ l	25 μ l
Gesamtvolumen	250 μ l	250 μ l	250 μ l
18 h Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂			
Reaktionsstopp durch Zentrifugation (800 x g, 6 min, 4°C)			
Überstand abnehmen und mittels Elisa (rat TNF α ELISA) auswerten			

2.3.5 Untersuchung der Transkription

2.3.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus PBMCs

Die Isolierung von RNA aus PBMCs mit integriertem DNase Verdau erfolgte mit dem RNeasy® Plus Mini Kit der Firma Qiagen. Bei diesem Verfahren wurden die selektive Bindungseigenschaft einer Silikagel-Membran und die Mikrosäulenzentrifugations-technik in Kombination ausgenutzt.

4 x 10⁶ Zellen wurden in 350 µl RLTplus Puffer (+10 µl/ml β-Mercaptoethanol) lysiert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Suspension wurde aufgetaut und auf eine gDNA Eliminatorsäule zum DNase Verdau geladen. Nach 30 Sekunden Zentrifugation auf höchster Stufe wurde der Durchfluss mit einfachem Volumen (350 µl) 70% Ethanol vermischt und auf eine RNA-Bindesäule geladen. Die RNA wird durch die Zugabe von Ethanol, welches Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den RNA-Molekülen und OH-Silikat-Atomen ausbildet, selektiv an die Säule gebunden. Nachdem 15 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert wurde, wurde die Säule mit 700 µl Waschpuffer RW1 gewaschen und wieder 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen. Abschließend wurde die Säule für eine weitere Minute auf höchster Stufe zentrifugiert und die RNA mit 30 µl nukleasefreiem H₂O von der Säule eluiert. Die erhaltene Gesamt-RNA wurde bei -80°C eingefroren.

2.3.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Kolongewebe und PBMCs

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Kolongewebe erfolgte unter Verwendung des *mirVana*[™] miRNA Isolation Kits von der Firma Ambion®. Mit diesem Kit können zusätzlich zur Gesamt-RNA auch kleine RNAs (< 200 Nukleotide) isoliert werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls, die im Folgenden kurz zusammengefasst sind:

Die pelletierten Zellen wurden in 300µl Lysepuffer resuspendiert und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Eine Kolonbiopsie wurde in 100µl Lysepuffer mit einem Fast Prep® Homogenisationssystem mechanisch aufgeschlossen. Die Homogenisation erfolgte mit 'Lysing Matrix Beads' bei einer Geschwindigkeit von 5,5 m/s (zweimal für 30 Sekunden). Dabei entwickelt die dreidimensionale Bewegung der Kügelchen Scherkräfte, die das Gewebe homogenisieren.

Zur Aufarbeitung wurde dem Lysat 1/10 Volumen des miRNA Homogenat-Puffers hinzugefügt und auf Eis für 10 min inkubiert. Für die folgende organische Extraktion wurde ein Volumen saures Phenol:Chloroform (pH 4,5) hinzugegeben und der Ansatz 1 min durch Vortexen gut gemischt. Die Phenol-Fällung erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 10000 x g). Danach wurde die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthält, abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolation der Gesamt-RNA wurde der wässrigen Phase das 1,25-fache Volumen 100% Ethanol hinzugefügt und diese Mischung auf eine Glasfaser-Säule aufgetragen. Nach drei Waschschritten wurde die RNA mit 30 µl nukleasefreiem Wasser von der Säule eluiert. Für miRNA Analysen können aus der Gesamt-RNA mit einer zweiten Säule auch die kleinen RNAs isoliert werden.

2.3.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Haarfollikelzellen

Die Isolierung von RNA aus Haarfollikelzellen mit anschließendem DNase Verdau erfolgte mit dem RNAqueous® -Micro Kit der Firma Ambion®. Ungefähr 20 Augenbrauen wurden in 100 µl Lysepuffer eingesammelt und bei -20°C eingefroren oder für die direkte Weiterverarbeitung 30 Minuten bei RT im Lysepuffer inkubiert. Je 100 µl Lysat wurden mit 125 µl Ethanol (100%) vermischt. Mit dieser Protokollvariante können auch kleine RNAs (z.B. miRNAs) isoliert werden. Die Lysat/Ethanol-Mischung wurde auf eine RNA-Bindesäule geladen und für 10 Sekunden auf höchster Stufe zentrifugiert. Die Säule wurde dann einmal mit 180 µl Waschlösung 1 und zweimal mit 180 µl Waschlösung 2/3 gewaschen. Nach Entfernen des Durchflusses, wurde die Säule für eine weitere Minute auf höchster Stufe zentrifugiert. Die RNA wurde schließlich mit auf 75°C erhitzter Elutionslösung in zwei Schritten (je 7 µl) von der Säule eluiert. Um die isolierte Gesamt-RNA von DNA zu reinigen, wurde ein DNase-Verdau mit folgenden Bestandteilen für 20 - 30 Minuten bei 37°C durchgeführt:

Eluierte RNA

1/10 Volumen DNaseI Puffer (10x)

1 µl DNaseI

Die DNaseI wurde mit 2 µl oder 1/10 Volumen Inaktivierungsreagenz für 2 Minuten bei RT inaktiviert und der Ansatz anschließend 1,5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die RNA (Überstand) wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.3.5.4 Quantitative RNA-Analyse (Nanodrop)

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben erfolgte mit dem NanoDrop™-ND-1000-Spektrophotometer von Thermo Scientific. Für eine Messung genügen bereits 2 µl einer Lösung. Die RNA-Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 µg ssRNA/ml. Daraus folgt:

$$c \left[\frac{\mu\text{gRNA}}{\text{ml}} \right] = A_{260} \times 40$$

Um die Verunreinigung der Präparation durch Proteine, Phenol oder andere Substanzen auszuschließen, wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Absorptionsquotient A_{260} / A_{280} sollte für reine RNA etwa 1,9 - 2,1 sein.

2.3.5.5 Qualitative RNA-Analyse (RNA 6000 Nano Chip)

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde mit einem RNA 6000 Nano Chip Kit am 2100-Bioanalyzer von Agilent ermittelt. Diese Technik ermöglicht, basierend auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese, eine automatisierte, parallele Bestimmung von zwölf RNA-Proben hinsichtlich ihrer Größe und Konzentration. Die Proben und ein mitgeführter Standard werden in die Vertiefungen des Chips pipettiert und bewegen sich über in Glas eingezogene Mikrokapillaren im elektrischen Feld fort. Automatisch werden sie in eine Trennkapillare weitergeleitet, um dort entsprechend ihrer Fragmentgröße durch den Molekularsiebeffekt aufgetrennt zu werden. Über einen Fluoreszenzdetektor werden die RNA-Fragmente und deren Laufzeiten registriert. Aus dem Verhältnis von 18S rRNA (Peak bei ca. 42 Sekunden) und 28S rRNA (Peak bei ca. 47 Sekunden) können Rückschlüsse auf den Grad der Degradierung der RNA geschlossen werden. Der rRNA Quotient (28S/18S) muss zwischen 1,8 und 2,0 liegen, damit die RNA eine ausreichend gute Qualität hat, um in der RT-PCR eingesetzt zu werden. Der Bioanalyzer charakterisiert die RNA außerdem bezüglich ihrer Integrität von RNA Integrity Number (RIN) 1 für komplett degradierte RNA bis RIN 10 (ohne Degradation). Für die RT-PCR wurde nur RNA mit RIN-Werten > 8 eingesetzt.

2.3.5.6 cDNA Synthese durch Reverse Transkription

Da RNA sehr instabil ist, wurde sie mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Komponenten aus dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems wurden zu einem 2x Master Mix zusammen pipettiert und mit der RNA (250 ng für die qRT-PCR, 100 ng für den TaqMan® Custom Array) mit 20 µl Endvolumen im Thermocycler für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (Tabelle 2-15). Nach der Reversen Transkription wurde die cDNA mit nukleasefreiem H₂O auf ein Endvolumen von 200 µl zehnfach verdünnt.

Tabelle 2-15: Zusammensetzung und Durchführung der cDNA Synthese.

	MM (2x)	Inkubation
2 µl	Random Primer (10x)	25°C für 10 Minuten
2 µl	10x RT-Puffer	37°C für 120 Minuten
0,8 µl	25x dNTPmix [100 mM]	85°C für 5 Minuten
1 µl	RNase Inhibitor	4°C
3,2 µl	H ₂ O	
1 µl	MultiScribe™ Reverse Transkriptase	
10 µl	mind. 100 ng RNA	
Σ 20 µl		

2.3.5.7 Semiquantitative 'Real-Time' PCR

Bei der Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) kann der Ablauf der PCR-Reaktion in Echtzeit verfolgt werden. Je mehr Kopien eines Gens in der Probe vorliegen, desto schneller ist ein signifikanter Zuwachs an Fluoreszenz zu beobachten. Da die Fluoreszenz in jedem Amplifikationszyklus aufgezeichnet wird, können die Produktmengen im Zusammenhang mit der Zyklusanzahl zwischen verschiedenen Proben verglichen werden und so auch die Expressionsstärke.

Die synthetisierte cDNA wurde mit der TaqMan®-Methode im 384 well Format vervielfältigt. TaqMan® Assays bestehen aus spezifischen Primern und einer fluorogen markierten Sonde, die es ermöglicht, ein spezifisches PCR-Produkt zu detektieren. Eine qRT-PCR mit TaqMan® Assays läuft wie in Abbildung 2-4 dargestellt ab:

- Eine TaqMan® Sonde besteht aus Oligonukleotiden mit einer Reporterfluoreszenz am 5´ Ende und einem Quencher (Fluoreszenzlöscher) am 3´ Ende, der bei ausreichender räumlicher Nähe das Fluoreszenzsignal unterdrückt.
- Die Sonde lagert sich der Primersequenz nachgelagert (downstream) an der Zielsequenz an. Wird der Primer verlängert wird die Sonde durch die 5´ Nukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase gespalten.
- Die Spaltung der Sonde führt zu einer räumlichen Trennung von Reporterfluoreszenz und Quencher, wodurch das Fluoreszenzsignal messbar wird. Durch die Sondenspaltung werden die Primer bis zum Ende des Matrizenstrangs verlängert. Die Sonde beeinflusst also nicht den PCR-Ablauf.
- Mit jedem Zyklus werden weitere Sonden gespalten, was zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt, wobei die Intensität des Signals proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

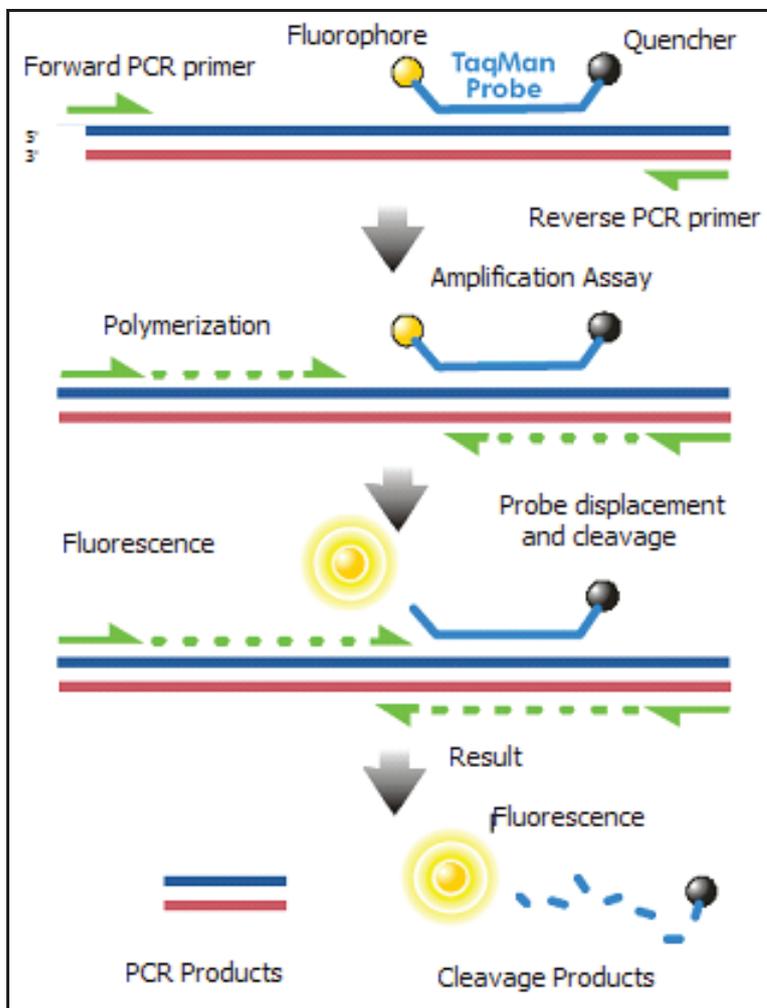


Abbildung 2-4: Ablauf einer Real-Time PCR mit der TaqMan®-Methode (Quelle: Applied Biosystems). Ein Fluoreszenzsignal entsteht während der PCR Reaktion, wenn die Reporterfluoreszenz und der Quencher (Fluoreszenzlöscher) räumlich getrennt werden, weil der neu polymerisierte DNA Strang die komplementär zum Matrizenstrang gebundene Sonde spaltet.

Tabelle 2-16 führt auf, welche Komponenten für eine Reaktion eingesetzt wurden und unter welchen Bedingungen die Reaktion durchgeführt wurde.

Tabelle 2-16: Übersicht der in der qRT-PCR benutzten Komponenten und Bedingungen.

Komponenten/ Ansatz	PCR Programm
5,0 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	50°C für 2 Minuten
4,5 µl cDNA [5,6 ng RNA/Reaktion]	95°C für 10 Minuten
0,5 µl TaqMan® Assay (20x)	95°C für 15 Sekunden
Σ 10 µl	60°C für 1 Minute für 40 Zyklen

Die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal der entstandenen PCR Produkte die Hintergrundmessung übersteigt, korreliert mit der eingesetzten cDNA Menge. Die in der Messung gewonnenen CT-Werte jeder Probe wurden gegen das Haushaltsgen 18S ribosomale RNA und gegen eine unbehandelte Kontrolle normiert. Für die Berechnung der mRNA-Expressionsstärke wurde folgende Formel zugrunde gelegt:

$$\text{Expressionslevel} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

CT = beschreibt die Anzahl der Zyklen in der PCR Reaktion bis die Produktmenge bzw. das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert (Hintergrundmessung) übertritt

ΔCT = Differenz zwischen der Zykluszahl des Zielgens und des Referenzgens (z.B. 18S rRNA)

$\Delta\Delta CT$ = ΔCT bezogen auf die unbehandelte Kontrollprobe

2.3.5.8 TaqMan® Custom Array/Low Density Array

Der TaqMan® Custom Array ist eine PCR-Mikrofluid-Array-Karte zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung der Genexpression von 12-384 individuell gewählten Genen. Die in dieser Arbeit verwendete Arraykarte wurde mit 95 für das Entzündungsgeschehen spezifischen TaqMan® Assays und einem Haushaltsgen (18S rRNA) belegt, sodass pro Karte vier Proben geladen werden konnten (Abbildung 2-5).

tory control

Replicates																									Port		
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A	1	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	B		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	C	2	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	D		
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E	3	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	F		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	G	4	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	H		
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I	5	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	J		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	K	6	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	L		
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M	7	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	O	8	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		

Abbildung 2-5: PCR-Mikrofluid-Array-Karte zur gleichzeitigen quantitativen Erfassung der Genexpression von 95 Zielgenen und eines Kontrollgens (18SrRNA) in 4 unabhängigen Proben (Quelle: Applied Biosystems).

Die TaqMan® Assays sind vom Hersteller auf der Karte vorgelegt. Über kleine Kanälchen (Ports) wurden die Proben mit dem PCR Master Mix auf die Karte geladen und durch Zentrifugation (1200 rpm, 1 Minuten) gleichmäßig verteilt. Eine Probe wurde aus den in Tabelle 2-17 aufgelisteten Komponenten präpariert und im 7900HT Fast Real-Time PCR System analysiert. Die Auswertung erfolgte durch relative Quantifizierung ($\Delta\Delta CT$) mit der Software RQ Manager von Applied Biosystems.

Tabelle 2-17: Übersicht über Probenzusammensetzung und Reaktionsbedingungen eines TaqMan® Custom Arrays.

Komponenten (1 Probe)	PCR Programm
100 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	50°C für 2 Minuten
100 µl cDNA [100 ng RNA/ 96 Reaktionen]	94,5°C für 10 Minuten
Σ 200 µl	97°C für 30 Sekunden
1 Probe/2 Ports à 100 µl	59,7°C für 1 Minuten für 40 Zyklen

2.3.6 Untersuchung der Zytokinausschüttung mittels ELISA

In Zellkulturüberständen wurde die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine mittels eines ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) quantifiziert. DuoSet Elisa Development Kits für humanes TNF- α , IL-1 β und IL-6 und ein Quantikine Schweine-TNF- α ELISA Kit wurden von R&D Systems® bezogen. Zellkulturüberstände von Ratten- und Mäusezellen wurden mit einem Ratten TNF- α ELISA Kit von BioSource™ ausgewertet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, wie im Folgenden kurz aufgeführt (Abbildung 2-6):

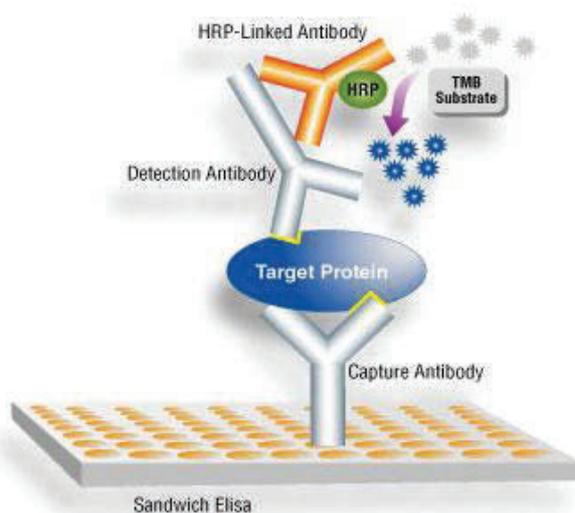


Abbildung 2-6: Aufbau eines Sandwich-ELISAs (Quelle: R&D Systems®). Der an die Mikrotiterplatte gebundene Fängerantikörper (Capture Antibody) bindet spezifisch an das Antigen, das anschließend mit einem ebenfalls spezifischen, biotinyliertem Detektionsantikörper reagiert. Für die Detektion wird ein Peroxidase konjugierter Streptavidinantikörper an das Biotin gebunden und mit TMB Substrat die Peroxidasereaktion ausgelöst.

- Bindung des Fängerantikörpers (Coating) an die Elisaplatte (96 Vertiefungen) ün
- Blocken unspezifischer Bindungen (2 Stunden, Blockinglösung PBS + 1% BSA)
- Bindung des verdünnten Antigens und Standards an den Fangantikörper (2 Stunden)
- Bindung des Detektionsantikörpers an das Antigen (2 Stunden)
- Bindung eines peroxidase-gekoppelten (HRP), zweiten Antikörpers an den Komplex (30 Minuten), der die enzymatische Farbreaktion katalysiert
- Start der enzymatischen Farbreaktion durch Zugabe von TMB-Substratlösung =>blau
- Reaktionsstopp durch Schwefelsäure => Farbumschlag nach gelb

Zwischen den Arbeitsschritten werden je 3 Waschschrte mit PBS-T durchgeführt. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Antigen-Konzentration in der Probe und

wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines im Kit mitgelieferten Standards mit bekannter Konzentration. Die Standardkurve wurde im 4-Fit Parameter Format für die Quantifizierung ausgewertet.

2.3.7 Untersuchung der p38 MAP Kinase Proteinexpression

2.3.7.1 Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen

Als Kontrolle für die Detektion der p38 MAP Kinase Isoformen im Western Blot wurden rekombinante Proteine von p38 α , p38 β , p38 δ , p38 γ von R&D Systems® bezogen. Die Proteine wurden als Gluthation-S-Transferase (GST) Fusionsproteine mit Thrombinspaltstelle geliefert. Damit das rekombinante Protein das gleiche Molekulargewicht wie die nativen p38 MAP Kinase Isoformen aufwies, wurde der GST-Anhang (~26 kDa) mit Thrombin abgespalten. Dazu wurden 500 ng des rekombinanten Proteins mit 2 Einheiten Thrombin 16 Stunden bei Raumtemperatur verdaut (Lebendiker, 2002). Der Ansatz wurde dann auf 10 ng/ μ l mit Lämmli-Puffer verdünnt und 5 Minuten aufgeköcht. Im Western Blot wurde bei 60 - 100 ng geladenem Protein das beste Signal detektiert.

2.3.7.2 Proteinextraktion aus PBMCs und Kolongewebe

Zur Proteingewinnung aus PBMCs wurden 4×10^6 Zellen zuerst mit PBS gewaschen und dann mit 50 μ l Proteinextraktionspuffer 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Lyse wurden die Zellen alle 10 Minuten gevortext und abschließend 30 Minuten (14000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

Eine Kolonbiopsie wurde in 100 μ l Proteinextraktionspuffer mit einem Fast Prep® Homogenisationssystem mechanisch aufgeschlossen. Die Homogenisation erfolgte mit 'Lysing Matrix D Beads' bei einer Geschwindigkeit von 5,5 m/s (zweimal für 30 Sekunden). Dabei entwickelt die dreidimensionale Bewegung der Kügelchen Scherkräfte, die das Gewebe homogenisieren. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteinlysate wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Proteinbestimmung wurde die Bicinchoninsäure (BCA) -Methode verwendet (Smith, 1985). In der Biuret-Reaktion werden Cu^{2+} Ionen im alkalischen Medium durch Proteine zu Cu^{2+} reduziert. Bicinchoninsäure reagiert mit Cu^{2+} zu einem purpurfarbenen Komplex, dessen Farbintensität der Proteinkonzentration proportional ist und bei einer Wellenlänge von 562 nm spektralphotometrisch gemessen wird. Rinderserumalbumin (0 - 1000 $\mu\text{g/ml}$) diente als Standard zur Erstellung einer Eichkurve. Zur Proteinbestimmung wurden 2 - 10 μl Proteinlysate mit 200 μl Reagenzlösung (Bicinchoninsäure+ Kupfer-II-sulfat [1:50]) versetzt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung.

2.3.7.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ein Polyacrylamidgel setzt sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammen. Für die Untersuchung der p38 MAP Kinase im Western Blot wurden 12% Polyacrylamidgele mit der in Tabelle 2-18 gezeigten Zusammensetzung hergestellt.

Tabelle 2-18: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels (12%).

Sammelgel	Trenngel
2,2 ml H ₂ O	2,25 ml H ₂ O
400 μl 1 M Tris, pH 6,8	650 μl 3 M Tris, pH 8,8
30 μl SDS Stammlösung (10%)	50 μl SDS Stammlösung (10%)
500 μl Acrylamid (30%)	2 ml Acrylamid (30%)
30 μl APS Stammlösung (10%)	50 μl APS Stammlösung (10%)
4,5 μl TEMED	2 μl TEMED

Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Proteinextrakt mit SDS-Ladepuffer (5x) versetzt und für 5 Minuten aufgeköcht. Pro Tasche wurden 20 μg Protein geladen. Als Größenstandard diente die PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas. Je nach Größe des zu erwartenden Proteins wurde in der Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophoresekammer von Biorad (160 Volt, 50 - 70mA) für 80 - 100 Minuten aufgetrennt.

2.3.7.5 Western Blot und Immundetektion

Durch einen Western Blot wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld (18 V, 400 mA, 15 Minuten) auf eine mit Methanol aktivierte PVDF Membran übertragen. Der Transfer wurde in kaltem Transferpuffer mit einem Fastblot Semi-Dry Blotter von Biometra nach folgendem Schema durchgeführt:

negativer Pol

Whatman 3MM Papier

Acrylamid-Trenngel

PVDF Membran mit Methanol befeuchtet

Whatman 3MM Papier

positiver Pol

Nach dem Transfer wurde die Membran für mindestens 2 Stunden oder über Nacht in 5% Milchpulver in 1x TBS-T geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach drei Waschschritten von 10 Minuten in 1x TBS-T wurde der erste Antikörper (in 5% BSA in 1x TBS-T) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrritte à 10 Minuten in 1x TBS-T, bevor der zweite Antikörper (in 5% BSA in 1x TBS-T) auf die Membran gegeben wurde. Je nach Detektionsverfahren wurde wie beschrieben vorgegangen:

- Chemilumineszenzdetektion mit CCD Kamerasystem

Der zweite Peroxidase gekoppelte Antikörper wurde für 30 - 60 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgten wieder 3 Waschschrritte à 10 Minuten in 1x TBS-T. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrat von Pierce benutzt, bei dem zwei Reagenzien in gleichen Teilen gemischt und 5 Minuten auf der Membran inkubiert wurden. Dieses Detektionsverfahren beruht auf Chemilumineszenz. Luminol wird als Enzymsubstrat durch die Peroxidase energetisiert und sendet bei seinem Zerfall Licht aus. Die Lichtemission wird durch chemische Verstärker amplifiziert und mit einer LAS-1000 CCD-Kamera von FUJIFILM festgehalten.

- Infrarot-Fluoreszenzdetektion mit dem Li-Cor Odyssey® System

Der zweite mit einem Infrarot-Fluorophor gekoppelte Antikörper wurde für 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen wurde die Membran mit dem Odyssey® Infrarotscanner eingelesen. Diese alternative Detektionsmethode hat den Vorteil, dass zwei Immundetektionen gleichzeitig auf einer Membran durchgeführt werden können. Außerdem weisen Membrane und Biomoleküle im langwelligen Nah-Infrarotbereich (700 –

1000 nm) des Spektrums weniger Autofluoreszenz auf, was ein sensitives Signal mit wenig Hintergrund ermöglicht (Sowell, 2002)

2.3.7.6 Proteome Profiler™ Human Phospho MAPK Array

Dieser Array ermöglicht es, den Phosphorylierungsstatus von 26 Serin-/Threoninkinasen (in der alten Version 21 Kinasen) der MAPK Signalwege gleichzeitig zu untersuchen (Tabelle 2-19). Unter den Kinasen auf dem Array sind alle Mitglieder der drei MAPK Familien ERK, JNK und p38 MAPK.

Tabelle 2-19: Übersicht der im Phospho MAPK Array enthaltenen Kinasen und ihrer Phosphorylierungsstellen (Quelle: R&D Systems®).

Ziel/Kontrolle	Phosphorylierungsstellen
ERK1	T202/Y204
ERK2	T185/Y187
JNK1	T183/Y185
JNK2	T183/Y185
JNK3	T221/Y223
JNK pan	T183/Y185, T221/Y223
TOR	S2448
RSK1	S380
RSK2	S386
GSK-3 α/β	S21/S9
Akt1	S473
Akt2	S474
Akt3	S472
Akt pan	S473, S474, S472
p38 δ	T180/Y182
p38 γ	T183/Y185
p38 α	T180/Y182
p38 β	T180/Y182
GSK-3 β	S9
MKK3	S218/T222
MKK6	S207/T211
CREB	S133
MSK2	S360
HSP27	S78/S82
p70 S6 Kinase	T421/S424
P53	S46

Nachdem das Protokoll für die benötigte Anwendung modifiziert wurde, konnten aktive p38 MAPK Isoformen in PBMCs und Darmgewebe identifiziert werden. Der Phospho-Array wurde von R&D Systems® bezogen. Die Durchführung war wie unten beschrieben (Abbildung 2-7):

- Die Nitrozellulosemembran wurde mit der im Kit mitgelieferten Lösung geblockt (1 Stunde).
- PBMCs oder Biopsien wurden mit einem 6 M Harnstoffpuffer aufgelöst. 300 µg Protein pro Membran und 20 µl des Detektionsantikörpermixes (phospho-spezifisch) wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
- Der Antigen/ Antikörpermix wurde auf die Membran gegeben und über Nacht inkubiert.
- Auf der Nitrozellulosemembran sind Total-Antikörper (in Duplikaten) punktförmig fixiert, die die phosphorylierte und unphosphorylierte Form der entsprechenden Kinase binden.
- Zur späteren Detektion wurde ein Streptavidin-Peroxidase (HRP) gekoppelter Antikörper an den Komplex gebunden (30 Minuten).
- Die Visualisierung der Peroxidase-reaktion erfolgte mit dem SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrat von Pierce über Chemilumineszenz.

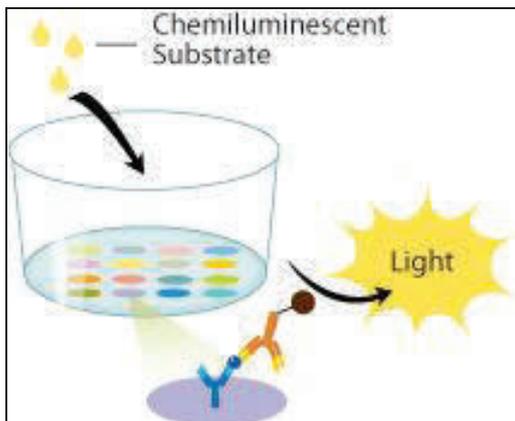


Abbildung 2-7: Schematischer Aufbau des humanen Phospho MAP Kinase Arrays (Quelle: R&D Systems®). Der Array bestand aus einer Nitrozellulosemembran, auf die Total-Antikörper gegen 26 verschiedene Zielgene/Kinasen in Duplikaten punktförmig gebunden waren. Das in einer Vorinkubation an phospho-spezifische Antikörper gebundene Antigen wurde mit der Membran inkubiert. Anschließend wurden die Signale mit einem peroxidasekonjugierten Antikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

Die Arrayauswertung erfolgte mit der Software AIDA, mit der die punktförmigen Signale der aktivierten Kinasen über die Pixeldichte quantifiziert wurden. Die Quantifizierung erfolgte relativ zum Hintergrund (Negativkontrolle) oder zu der Positivkontrolle und zur unbehandelten Kontrolle.

2.3.8 Datenauswertung und Statistik

2.3.8.1 Berechnung von Hemmung und IC₅₀-Werten

Um die Wirkung von Hemmstoffen untereinander vergleichbar zu machen, wurde sowohl für die Messwerte des p38 MAPK Enzymassays als auch für die Messung der Zytokinausschüttung (ELISA) und der RT-PCR die prozentual normierte Hemmung bestimmt. Die Berechnung wurde mit folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Hemmung} = 100 \times \left(1 - \frac{qI - qK}{qStim - qK} \right)$$

qI : Messwert des Hemmstoffansatzes

qK : Messwert des Kontrollansatzes (unbehandelte Probe)

qStim : Messwert des Stimulationsansatzes (Positivkontrolle)

Eine weitere Möglichkeit die Hemmwirkung verschiedener Testsubstanzen zu vergleichen ist die Konzentration zu berechnen, bei der 50% Hemmung erreicht wurden. Dazu wurden Konzentrationen herangezogen, die Hemmwerte oberhalb und unterhalb von 50% erreichten. Mit Hilfe der Auswertungssoftware Excel wurde eine Geradengleichung aus den beiden Meßpunkten erstellt und die Konzentration zum interessierenden Hemmwert ermittelt. Lagen alle gemessenen Hemmwerte einer Substanz ober- oder unterhalb der 50% bzw. 75%-Schwelle, wurde kein IC-Wert berechnet sondern der Konzentrationsbereich unter- oder oberhalb der eingesetzten Grenzkonzentration angegeben.

2.3.8.2 Statistik

Die Ergebnisse der RT-PCRs und ELISA-Bestimmungen wurden entweder als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Standardfehler im Balkendiagramm dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen verschiedenen experimentellen Ansätzen wurde mit Hilfe eines zweiseitigen, gepaarten Student'schen T-Tests beurteilt, wobei ein Wert von $p < 0.05$ als statistisch signifikant (*) und $p < 0.01$ als statistisch hochsignifikant (**) eingestuft wurde.

3 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1 Etablierung eines modifizierten Enzymassays zur Testung von p38 MAPK Inhibitoren

3.1.1 Grundlagen (oder Messprinzip)

Valide und schnelle *in vitro* Testverfahren sind essentiell, um neue Wirkstoffe zu identifizieren und ihre Wirksamkeit zu bewerten. Zur ersten Einschätzung einer Substanz werden häufig Enzymassays als Routinetests durchgeführt. Für neu synthetisierte p38 MAPK Hemmstoffe wurde ein Enzymassay entwickelt, der es ermöglicht, die Aktivität der p38 α MAP Kinase zu quantifizieren (Abbildung 3-1).

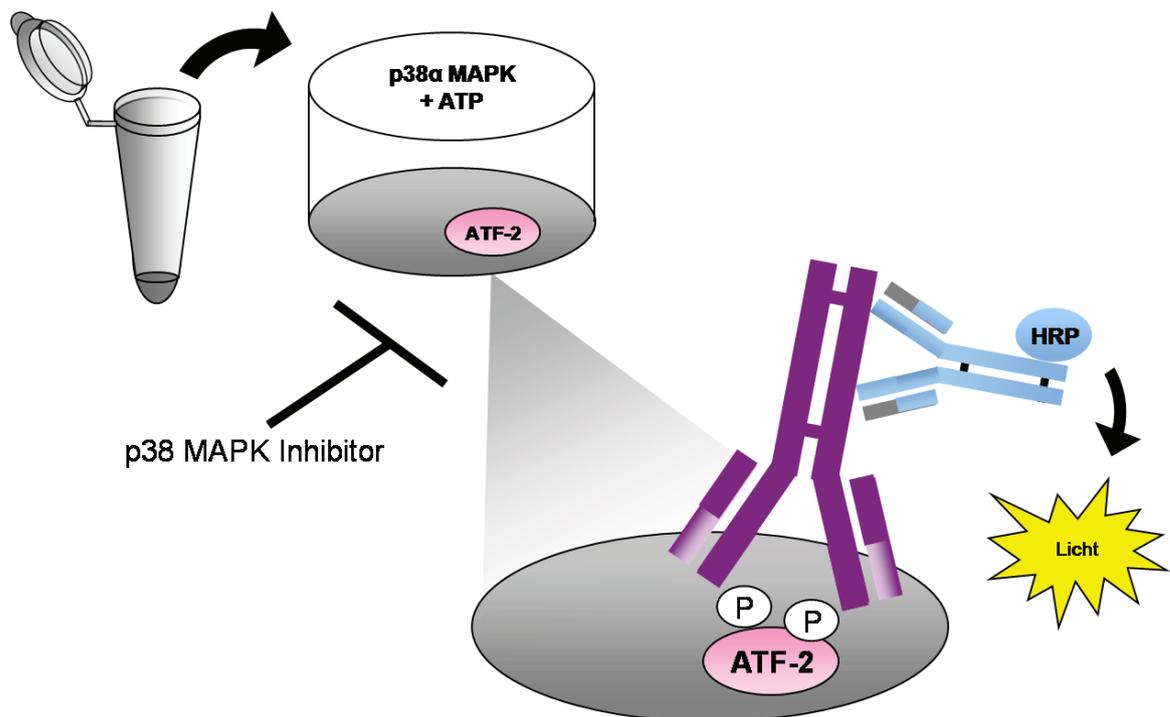


Abbildung 3-1: Der p38 MAPK Enzymassay. Beim p38 Enzymassay wird ein Reaktionsmisch (aktive p38 α MAPK und ATP) in die Vertiefung einer mit dem p38 Substrat ATF-2 beschichteten Mikrotiterplatte gegeben. Die Aktivität der p38 Kinase wird über einen phospho-spezifischen ATF-2 ELISA quantifiziert. Die Hemmwirkung eines p38 MAPK Inhibitors wird bestimmt, indem man dem Reaktionsmisch den Inhibitor zusetzt und das Ergebnis zum Ansatz ohne Inhibitor in Relation setzt.

In einer Phosphorylierungsreaktion werden aktive rekombinante p38 α MAPK und Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen auf einer mit dem p38 MAPK Substrat ATF-2 beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Die Quantifizierung erfolgt indirekt über einen ELISA für phosphoryliertes ATF-2. Der Transkriptionsfaktor ATF-2 ist ein Zinkfingerprotein, das in Stressreaktionen von der p38 MAP Kinase aktiviert wird, um die Transkription anderer Gene zu regulieren. Die Aktivierung von ATF-2 erfolgt durch Phosphorylierung der beiden Aminosäuren Threonin 69 und 71 (Ouwens, 2002). Mit den Ergebnissen aus diesem Enzymassay wird die Hemmstoffkonzentration ermittelt, bei der das Enzym zu 50% gehemmt ist (IC₅₀ Wert). Ein Vergleich der IC₅₀ Werte dient dazu, diejenigen Wirkstoffe zu identifizieren, die für die kostspielige Weiterentwicklung geeignet sind.

3.1.2 Modifizierung des p38 MAPK Enzymassays

Das zu Beginn dieser Arbeit vorliegende Protokoll zur quantitativen Erfassung der p38 MAPK -Hemmung basierte auf einem ursprünglich von Forrer et al. (1998) entwickelten und später von Laufer et al. (2005) modifizierten Verfahren. Nach dieser Vorschrift erfolgt die Detektion von phosphoryliertem ATF-2 mit einem Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die Umsetzung eines Substrates zu einem Chromophor ermöglicht eine photometrische Quantifizierung. Beobachtungen zeigten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Alkalischen Phosphatase mit 1 - 3 Stunden nicht nur relativ langsam, sondern auch sehr variabel ist. Dies erschwert nicht nur die Vergleichbarkeit nacheinander durchgeführter Experimente, sondern verlängert unter Umständen die Dauer des gesamten Versuches erheblich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch Verwendung eines Antikörpers, der anstatt mit alkalischer Phosphatase mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, die Entwicklungszeit zur Messung von Phospho-ATF-2 verkürzt werden kann. Daher wurde das im vorliegenden Protokoll verwendete ELISA-Antikörperpaar gegen zwei neue Antikörper ausgetauscht. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler Mausantikörper gegen dual phosphoryliertes ATF-2 (Thr69/Thr71) gewählt. Der sekundäre Antikörper (anti-Maus) war mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Die Substratumsetzung der Peroxidase konnte reproduzierbar nach 10 Minuten mittels Schwefelsäure abgestoppt und photometrisch ausgelesen werden. Zur Konzentrationsbestimmung des neuen Antikörperpaars wurden Verdünnungsreihen im Sättigungsbereich der Antikörper durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen von erstem Antikörper (1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000) und zweitem

Antikörper (1/2000, 1/4000, 1/8000) wurden miteinander kombiniert. Für jede Kombination wurde eine Dreifachbestimmung von Positivkontrolle (Stimulationswert) und Negativkontrolle (NSB) durchgeführt (Tabelle 3-1). Die Negativkontrolle sollte einen Wert nahe null haben, um unspezifische Bindungen der Antikörper, einerseits an die Mikrotiterplatte und andererseits an das Substrat (unphosphoryliertes ATF-2), gering zu halten. Der Stimulationswert hingegen sollte eine ausreichende Signalintensität aufweisen, eine Absorption von 1,5 aber nicht überschreiten, da die Messungen sonst ungenauer wurden. Als optimale Konzentration für die neuen Antikörper wurde eine Verdünnung von 1/2000 für jeden Antikörper festgesetzt (grau unterlegt).

Tabelle 3-1: Feinabstimmung der Antikörperverdünnung. Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von Positivkontrollen (Stim) und Negativkontrollen (NSB) in verschiedenen Antikörperverdünnungen, Reaktionszeit 8 Minuten.

	Verdünnung	Probe	monoklonaler phospho-ATF-2 (Thr69/71) Mausantikörper				
			1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000
Ziege anti-Maus-HRP	1/2000	Stim	1,227	1,166	1,049	0,985	0,956
		NSB	0,179	0,080	0,044	0,026	0,013
	1/4000	Stim	0,756	0,714	0,640	0,602	0,572
		NSB	0,098	0,042	0,022	0,010	0,005
	1/8000	Stim	0,449	0,397	0,388	0,385	0,322
		NSB	0,050	0,018	0,013	0,005	0,003

Mit einer Dauer von weniger als 10 Minuten für die Peroxidasereaktion konnte nicht nur eine Vereinfachung des Protokolls, sondern auch eine erhebliche Zeiteinsparung pro Versuch erreicht werden. Die Versuchsdauer wurde mit dem neuen Protokoll von 8 Stunden auf 5 Stunden reduziert. Da die neuen Antikörper deutlich günstiger waren und auch in geringeren Konzentrationen eingesetzt wurden, ergab sich außerdem eine erhebliche Kostensenkung. Die Materialkosten wurden von 25€ pro Mikrotiterplatte auf 5€ pro Mikrotiterplatte gesenkt.

3.1.3 Vergleich von p38 MAPK Hemmstoffen im Enzymassay

Für gut charakterisierte p38 MAPK Inhibitoren wurden IC₅₀ Werte nach neuem Protokoll generiert und Literaturwerten gegenüber gestellt (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Vergleich der IC₅₀ Werte von ausgewählten p38 MAPK Hemmstoffen.

	Enzymassay mit HRP		Literatur	
	IC ₅₀ ± SEM	N	IC ₅₀ ± SEM	
SB 203580	0,033 ± 0,004	8	0,03 - 0,05	Young1997/Davies2000
BIRB 796	0,007 ± 0,005	2	0,070	Pargellis2002/Kuma2005
Pamapimod	0,017 ± 0,002	4	0,014 ± 0,002	Hill2008
SB neu	0,008 ± 0,003	7	0,003 ± 0,001	Universität Tübingen

Bei der Version des p38 MAPK Enzymassays, der mit Alkalischer Phosphatase durchgeführt wurde, wurde in jedem Versuch der weit verbreitete p38 MAPK Inhibitor SB 203580 als Referenz mitgeführt. Der durchschnittliche IC₅₀ Wert lag in diesen Versuchen konstant bei 0,035 µM. Bei der Signaldetektion mit HRP betrug der IC₅₀ Wert von SB 203580 0,03 µM, vergleichbar mit den Literaturwerten. Ähnliches gilt für den Inhibitor Pamapimod, dessen IC₅₀ Wert mit 0,017 µM im Rahmen der Standardabweichung des Literaturwertes lag. In den weiteren Experimenten wurde Pamapimod als Referenz herangezogen. Für den in dieser Arbeit ebenfalls als interne Referenz benutzten Hemmstoff SB neu konnten übereinstimmende Ergebnisse mit der Universität Tübingen festgestellt werden (mündliche Absprache Frau Goettert, Universität Tübingen). Lediglich der IC₅₀ Wert des p38 Hemmstoffs BIRB 796 wich um eine Zehnerpotenz vom Literaturwert ab.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich durch die Optimierung die Spezifität und Stabilität des Enzymassays im Vergleich zu bereits veröffentlichten Daten nicht signifikant verändert.

Mit dem modifizierten p38 MAPK Enzymassay wurden bei c-a-i-r biosciences GmbH mittlerweile mehr als 30 Substanzen untersucht. Bei diesen Routinemessungen erwies sich dieser Assay als zuverlässige und gut handzuhabende Methode.

3.2 Ex vivo Untersuchungen mit Vollblut verschiedener Spezies

In der präklinischen Entwicklung werden potentielle neue Arzneimittel auch in Tierexperimenten untersucht. Bevor ein neuer Arzneistoff am Menschen geprüft werden darf, muss die Wirksamkeit und Sicherheit der Substanz in einer Reihe von Tierexperimenten ausgiebig untersucht werden. In ausgewählten pharmakologischen (Krankheits-) Modellen wird die Wirksamkeit des Kandidaten in der Zielindikation ermittelt. Zusätzlich müssen an zwei Tierspezies, einem Nagetier und einem Nicht-Nager, Untersuchungen zur Toxizität durchgeführt werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird für den Arzneistoffkandidaten ein Sicherheitsprofil erstellt.

Die meisten chemisch synthetisierten Wirkstoffe, sogenannte 'small molecules', werden zur oralen Verabreichung entwickelt. Für die Weiterentwicklung eines Wirkstoffs, der in *in vitro*-Tests überzeugende Eigenschaften aufweist, muss daher gezeigt werden, dass die Wirksamkeit auch dann vorhanden ist, wenn die Substanz oral verabreicht wird. Die erwünschte Wirkung wird nur dann eintreten, wenn der Wirkstoff aus dem Gastrointestinaltrakt absorbiert wird, in ausreichender Konzentration in den Blutkreislauf gelangt, um von dort an das Zielmolekül zu diffundieren, hieran zu binden und dessen Aktivität zu modulieren. Inhibitoren der p38 MAPK werden zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen entwickelt. Als erster Test zur Untersuchung der Wirksamkeit nach oraler Verabreichung hat sich das sogenannte Endotoxin-Schock-Modell in der Maus oder Ratte als Standardmodell etabliert. Hierzu wird den Tieren mittels einer Schlundsonde die Testsubstanz, die zuvor in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert wurde, verabreicht. Nach 30 Minuten erfolgt eine Injektion von in Puffer gelöstem LPS in die Bauchhöhle und nach weiteren 90 Minuten wird das Tier mittels Herzpunktion entblutet. Über die Bestimmung des TNF α Spiegels im Plasma wird die Wirkung des Hemmstoffes quantifiziert. Obwohl p38 MAPK Inhibitoren gute Wirksamkeit in verschiedenen präklinischen Entzündungsmodellen zeigten, erreichte bisher keine Substanz die Phase III der klinischen Entwicklung. Im menschlichen Organismus konnte entweder keine Wirkung festgestellt werden oder es wurden starke Nebenwirkungen, wie Lebertoxizität, beschrieben.

Eine wichtige Frage ist deshalb, inwieweit die Ergebnisse aus Tierexperimenten verwertbar sind und auf den Menschen übertragen werden können. Im Folgenden wurde untersucht,

ob Speziesunterschiede schon in einem direkten Vergleich der Hemmstoffe unter Verwendung des gleichen *in vitro* Modells zu erkennen sind. Unterschiede zwischen Schwein, Ratte, Maus und Mensch sollten ermittelt werden, indem der Einfluss verschiedener p38 MAPK Inhibitoren auf die TNF α Ausschüttung in Vollblut und Primärzellen als Reaktion auf eine Stimulation mit LPS verglichen wurde.

3.2.1 Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen

Zunächst wurde untersucht, ob die in Vollblut vorliegenden, immunkompetenten Zellen der verschiedenen Spezies mit LPS stimuliert werden können und TNF α als Entzündungsmarker ausscheiden. Neben humanem Vollblut wurden Testsysteme von Maus und Ratte gewählt, da beide Tierspezies für *in vivo* Pharmakologie- und Toxikologie-Studien verwendet werden. Zusätzlich wurden Untersuchungen am Vollblut vom Schwein aufgenommen, da Blut von dieser Spezies im Rahmen eines pharmakologischen Versuchs zur Wirksamkeit eines p38 MAPK Inhibitors bei Ischämie/Reperfusionsschaden bereitgestellt wurde. Da das für Untersuchungen zur Verfügung stehende Blutvolumen einer Maus limitiert ist, war die Durchführung des Stimulationsversuchs mit Mäusevollblut schwierig, auch wenn das Blut mehrerer Tiere vereinigt wurde. Als Testsystem wurden deshalb Splenozyten gewählt, die aus der Milz einer Maus isoliert und in analoger Weise mit LPS stimuliert wurden. Für jedes Testsystem wurden der geeignete LPS Subtyp und die optimalen Bedingungen ermittelt. Die als ideal ermittelten Versuchsbedingungen sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3: Bedingungen für die Stimulation von Vollblut und Primärzellen in verschiedenen Spezies. Mit diesen Konditionen wurde eine optimale TNF α Ausschüttung zur Charakterisierung von p38 MAPK Inhibitoren erzielt.

Vollblut aus/ Primärzellen	LPS Subtyp	LPS Konzentration	Stimulationsdauer
Mensch	<i>E.coli</i> Serotyp 026:B6	1 μ g/ml	4 Stunden
Schwein	<i>E.coli</i> Serotyp 0111:B4	25 μ g/ml	4 Stunden
Ratte	<i>Salmonella enterica</i> Serotyp abortus equi	10 μ g/ml	2 Stunden
Humane PBMCs	<i>E.coli</i> Serotyp 026:B6	1 μ g/ml	4 Stunden
Maussplenozyten	<i>E.coli</i> Serotyp 026:B6	100 ng/ml	18 Stunden

Bereits bei der Bestimmung der Versuchsbedingungen fiel auf, dass sich Vollblut von Ratten und Schweinen schlechter stimulieren ließ. Es mussten deutlich höhere LPS Konzentrationen (10 µg/ml bzw. 25 µg/ml) eingesetzt werden, um eine entsprechende TNF α Ausschüttung zu erzielen.

3.2.2 Vergleich von p38 MAPK Hemmstoffen zwischen Schwein, Ratte, Maus und Mensch

Unter den oben aufgeführten Versuchsbedingungen wurde Vollblut von Schweinen, Ratten und Menschen, sowie Splenozyten von Mäusen und humane PBMCs zusammen mit verschiedenen p38 MAPK Hemmstoffen inkubiert und anschließend mit LPS stimuliert. Untersucht wurden die Referenzinhibitoren Pamapimod, SB neu, BIRB 796 und SB 203580 sowie eine Reihe von Testsubstanzen der Firma c-a-i-r biosciences GmbH (CBS 3736, CBS 3825, CBS 3830, CBS 3835 und CBS 3595). Für alle Substanzen wurde die prozentuale Hemmung der TNF α Ausschüttung für mindestens vier Konzentrationen bestimmt (Abbildung 3-2, Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4).

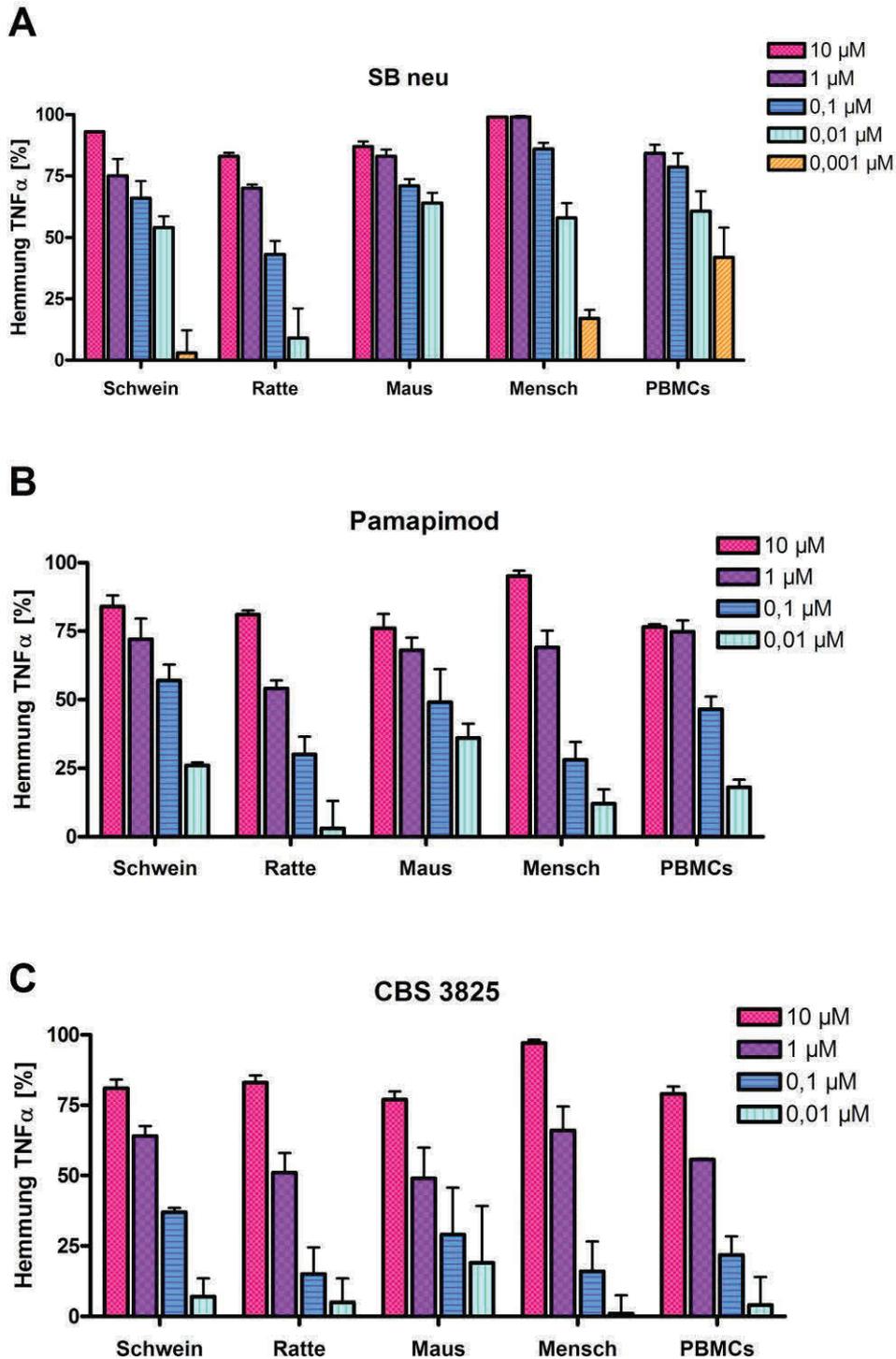


Abbildung 3-2: Vergleich von SB neu, Pamapimod und CBS 3825 in verschiedenen Spezies. Für die p38 Inhibitoren SB neu (A), Pamapimod (B) und CBS 3825 (C) wurde die Hemmung der TNF α Ausschüttung in Vollblut von Schweinen, Ratten und Menschen, sowie in Splenozyten der Maus und humanen PBMCs gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (N=3-5) der prozentualen Hemmung.

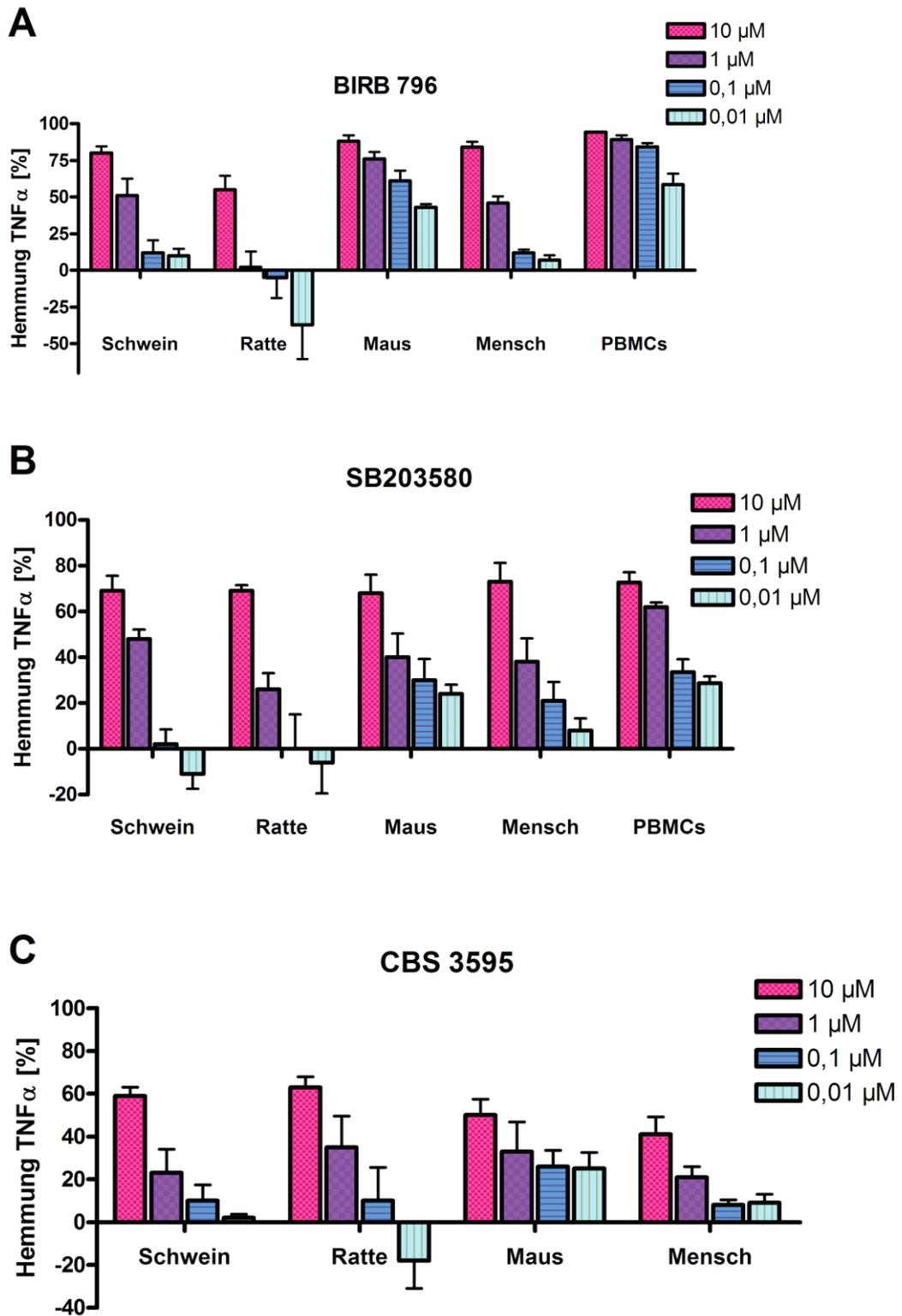


Abbildung 3-3: Vergleich von BIRB 796, SB 203580 und CBS 3595 in verschiedenen Spezies. Für die p38 Inhibitoren BIRB 796 (A), SB 203580 (B) und CBS 3595 (C) wurde die Hemmung der TNF α Ausschüttung in Vollblut von Schweinen, Ratten und Menschen, sowie in Splenozyten der Maus und humanen PBMCs gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (N=3-5) der prozentualen Hemmung.

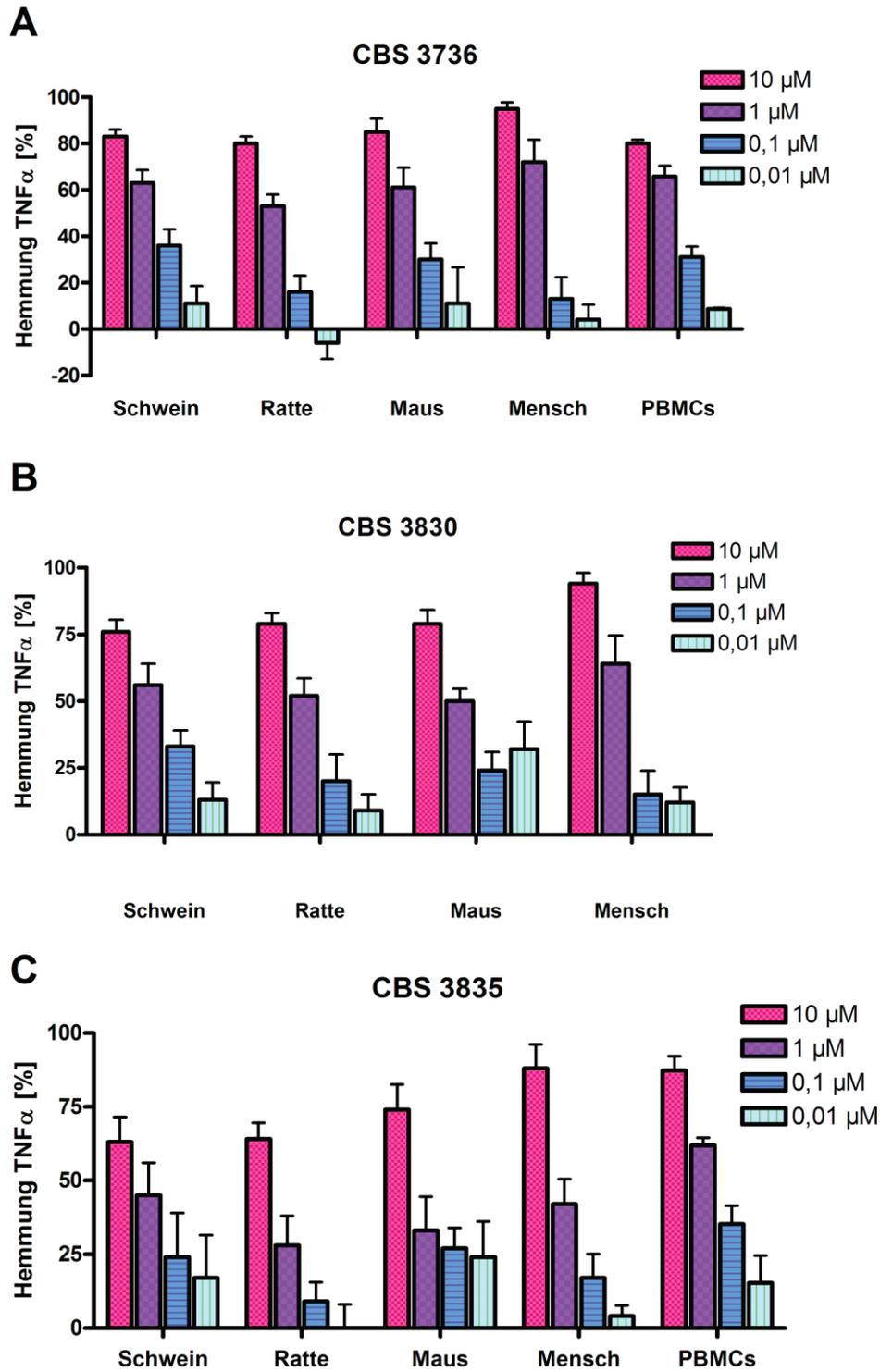


Abbildung 3-4: Vergleich von CBS 3736, CBS 3830 und CBS 3835 in verschiedenen Spezies. Für die p38 Inhibitoren CBS 3736 (A), CBS 3830 (B) und CBS 3835 (C) wurde die Hemmung der TNF α Ausschüttung in Vollblut von Schweinen, Ratten und Menschen, sowie in Splenozyten der Maus und humanen PBMCs gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (N=3-5) der prozentualen Hemmung.

Tabelle 3-4 zeigt eine Zusammenfassung des durchschnittlichen Hemmpotenzials der Substanzen bei einer Konzentration von 10 µM und die durchschnittliche Konzentration, bei der 50% der maximalen TNFα Ausschüttung (IC₅₀ Wert) gehemmt wurde.

Tabelle 3-4: Vergleich von p38 MAPK Hemmstoffen in Schwein, Ratte, Maus und Mensch anhand von IC₅₀ Werten und der prozentualen Hemmung der TNFα Ausschüttung bei einer Konzentration von 10 µM Hemmstoff. Dargestellt sind Mittelwert aus 3-5 unabhängigen Versuchen.

		Schwein	Ratte	Maus	Mensch	PBMCs
SB 203580	IC ₅₀ TNFα [µM]	2,29	3,54	2,22	0,35	0,43
	Hemmung bei 10 µM	69%	69%	68%	73%	80%
CBS 3736	IC ₅₀ TNFα [µM]	0,42	0,98	0,63	0,88	0,37
	Hemmung bei 10 µM	83%	80%	85%	95%	80%
CBS 3825	IC ₅₀ TNFα [µM]	0,33	1,09	1,91	0,39	0,68
	Hemmung bei 10 µM	81%	83%	77%	97%	79%
CBS 3830	IC ₅₀ TNFα [µM]	0,97	1,18	0,92	1,11	
	Hemmung bei 10 µM	76%	79%	79%	94%	
CBS 3835	IC ₅₀ TNFα [µM]	4,75	2,44	3,24	0,47	0,37
	Hemmung bei 10 µM	63%	64%	74%	88%	87%
BIRB 796	IC ₅₀ TNFα [µM]	1,21	3,22	0,03	1,92	0,01
	Hemmung bei 10 µM	80%	55%	88%	84%	94%
CBS 3595	IC ₅₀ TNFα [µM]	6,02	3,39	6,89	>5	
	Hemmung bei 10 µM	59%	63%	50%	41%	
Pamapimod	IC ₅₀ TNFα [µM]	0,07	0,7	0,21	0,11	0,19
	Hemmung bei 10 µM	84%	81%	76%	95%	77%
SB neu	IC ₅₀ TNFα [µM]	0,02	0,15	<0,01	0,007	0,006
	Hemmung bei 10 µM	93%	86%	87%	99%	88%

In den verschiedenen Spezies wurde die TNFα Ausschüttung durch die Testsubstanzen unterschiedlich gehemmt. Wie in Tabelle 3-4 zu sehen, fand sich der niedrigste IC₅₀ Wert von 0,007 µM in menschlichem Vollblut für SB neu, gefolgt von den Wirkstoffen Pamapimod (0,11 µM), SB 203580 (0,35 µM) und CBS 3825 (0,39 µM), sowie CBS 3835, CBS 3736, CBS 3830, BIRB 796 und CBS 3595. Für Schweinevollblut (SB neu < Pamapimod < CBS 3825 < CBS 3736 < SB 203580 < CBS 3830 < BIRB 796 < CBS 3835 < CBS 3595) und Rattenvollblut (SB neu < Pamapimod < CBS 3736 < CBS 3825 < CBS 3830 < CBS 3835 < BIRB 796 < CBS 3595 < SB 203580) ergaben sich ähnliche Reihenfolgen. Auffällig war, dass die in

Standardversuchen am häufigsten als Referenz beschriebene SB 203580 in menschlichem Vollblut (0,35 μM) und PBMCs (0,43 μM) hochpotent war, in den anderen Spezies aber zu den wenig wirksamen Substanzen zählte. Auch in Milzzellen der Maus zeigte SB 203580 zusammen mit CBS 3835 wenig Wirksamkeit. Die Hemmstoffe BIRB 796 und CBS 3595, die insgesamt am schlechtesten abschnitten, erreichten in den Mauszellen den niedrigsten IC₅₀ Wert. Das gleiche Wirksamkeitsmuster wurde auch in humanen PBMCs beobachtet, was zu dem Schluss führt, dass neben Speziesunterschieden auch ein deutlicher Unterschied zwischen dem Analysematerial, Vollblut oder Primärzellen, besteht.

Zusammenfassend hemmten SB neu, Pamapimod und CBS 3825 in allen Spezies die TNF α Ausschüttung am besten (Abbildung 3-2). SB neu war mit Abstand in allen Spezies die wirkungsstärkste aller getesteten Substanzen (Abbildung 3-2, A). Es war möglich den Hemmstoff zehnfach niedriger, mit einer Konzentration von 1 nM, verglichen mit den anderen Substanzen in den Versuchen einzusetzen. Trotzdem wurde in den Nagern eine maximale Hemmung von etwa 80% nicht überschritten. Pamapimod erbrachte in allen Spezies vergleichbare IC₅₀ Werte, lediglich in Rattenvollblut war die Substanz wenig potent (Abbildung 3-2, B). Für CBS 3825 zeigte sich der deutlichste Speziesunterschied mit einer mindestens dreifach schlechteren Wirksamkeit der Substanzen in Nagern (Abbildung 3-2, C). BIRB 796 schnitt in Rattenblut schlecht ab und für geringe Hemmstoffkonzentrationen wurde sogar ein stimulierender Effekt auf die TNF α Ausschüttung gemessen. In Primärzellen schnitt BIRB 796 hingegen überdurchschnittlich gut ab (Abbildung 3-3, A).

Insgesamt waren beim direkten Vergleich der Substanzen deutliche Wirksamkeitsunterschiede zwischen den verschiedenen Spezies zu erkennen. Nennenswert war eine größere Übereinstimmung der Ergebnisse von Mensch und Schwein im Vergleich zu Nagern. Außerdem scheint die Wirksamkeit unterschiedlich auszufallen, je nachdem ob Vollblut oder Primärzellen (z.B. PBMCs) untersucht werden. Aufgrund der in jeder Spezies unterschiedlichen Wirkung der Hemmstoffe ist von erheblichen Speziesunterschieden auszugehen. Dieses Ergebnis belegt, dass Tierexperimentdaten nur bedingt aussagekräftig für die Wirksamkeit einer Substanz beim Menschen sind.

3.3 Untersuchungen zur Zytokinausschüttung, Genexpression und Kinase-Aktivierung in stimulierten humanen PBMCs

Als eine Methode zur pharmakologischen Charakterisierung von p38 MAPK Inhibitoren wird in stimulierten PBMCs die Wirkung der Substanzen auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie TNF α , IL-1 β oder IL-6, gemessen. Die Wirkung von p38 MAPK Inhibitoren auf Transkriptionsebene wurde bisher nicht systematisch untersucht.

Deshalb wurde an der Entwicklung eines Testsystems gearbeitet, das möglichst umfassend ein *in vivo* Entzündungsgeschehen abbildet und außerdem die unterschiedliche Sensitivität von Individuen gegenüber p38 Inhibitoren widerspiegelt. Da die Hauptproduzenten von Zytokinen Monozyten und Makrophagen sind, eigneten sich primäre Immunzellen am besten. Aus Vollblut lassen sich die mononukleären Zellen des peripheren Blut (PBMCs) isolieren, die ein Gemisch verschiedener Zellen, wie z.B. Lymphozyten (20-40%), Monozyten (3-7%) und Granulozyten (50 - 70%), darstellen. Monozyten zirkulieren 1-3 Tage im Blut, bevor sie in Gewebe einwandern und zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren (Gonzalez-Mejia, 2009).

3.3.1 Etablierung der Versuchsbedingungen

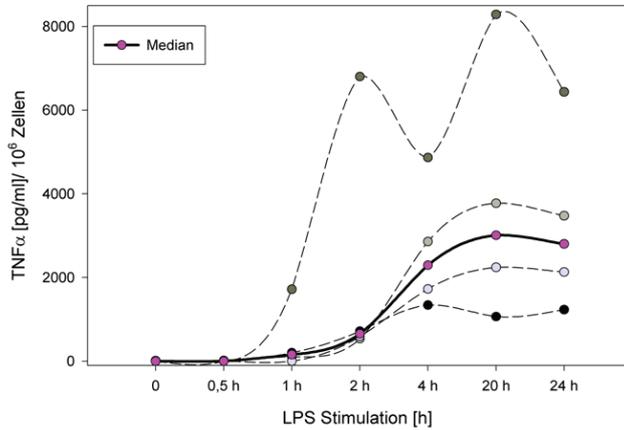
Da in diesem Entzündungsmodell gleichzeitig die RNA- und Proteinebene betrachtet werden sollte, mussten zunächst die optimalen Versuchsbedingungen (wie Stimulationsreagenz und Stimulationsdauer, sowie die geeigneten Analyseparameter und –methoden) identifiziert und etabliert werden.

3.3.1.1 Kinetik der Zytokinausschüttung nach Stimulation

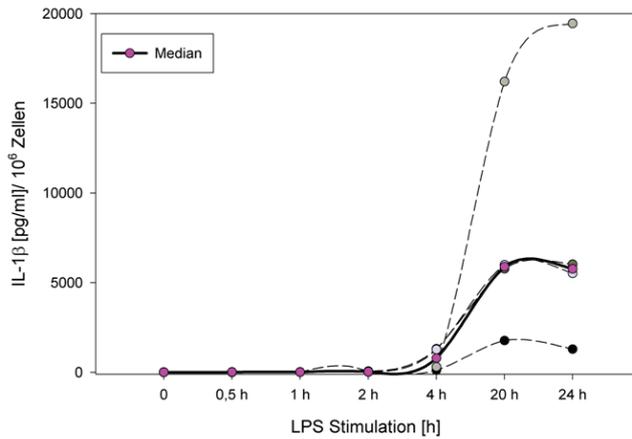
Neben dem Standardstimulans LPS (1 μ g/ml), das mehrere MAPK Signalwege über den Rezeptor TLR4 aktiviert, wurde mit TNF α (10 ng/ml) der Versuch unternommen den p38 MAPK Signalweg in PBMCs spezifischer zu stimulieren. Die Ausschüttung der Zytokine nach Stimulation mit LPS wurde in vier Versuchsreihen über einen Zeitraum von 24 Stunden mittels ELISA gemessen und graphisch dargestellt. Abbildung 3-5 zeigt den Verlauf der

Konzentrationen von TNF α , IL-1 β und von IL-6 über den Beobachtungszeitraum von 24 Stunden.

A



B



C

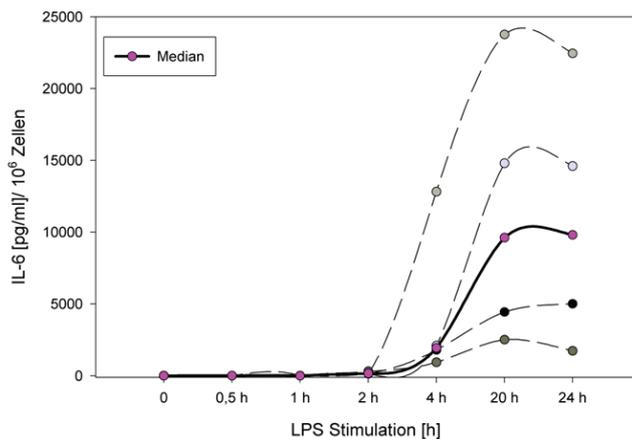


Abbildung 3-5: Zeitverlauf der Zytokinausschüttung nach Stimulation mit LPS. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde die Zytokinausschüttung von PBMCs nach Stimulation mit 1 μ g/ml LPS von vier Spendern gemessen. Dargestellt ist der Median (N=4) der Zytokinausschüttung von TNF α (A), IL-1 β (B) und IL-6 (C) in pg/ml pro 10⁶ Zellen.

Die Ausschüttung aller untersuchter Zytokine stieg in den ersten 20 Stunden nach LPS Stimulation kontinuierlich bis zu einem Maximum (TNF α : 4000 - 8000 pg/ml, IL-1 β : 2000 - 20000 pg/ml, IL-6: 4000 - 25000 pg/ml) an und fiel anschließend wieder ab. Ab einer Stimulationsdauer von vier Stunden konnte eine signifikante Zytokinausschüttung gemessen werden.

Die ersten Stimulationsversuche mit TNF α ergaben eine hohe Zytokinausschüttung in den unbehandelten Proben (Daten nicht gezeigt). Dies war auf das Lösungsmittel von TNF α zurückzuführen. Das darin enthaltene BSA, wirkte stimulierend. Nachdem das Problem durch die Verwendung eines anderen BSAs gelöst wurde, konnte die reine TNF α Stimulation anhand der Messung von IL-1 β und IL-6 untersucht werden (Abbildung 3-6).

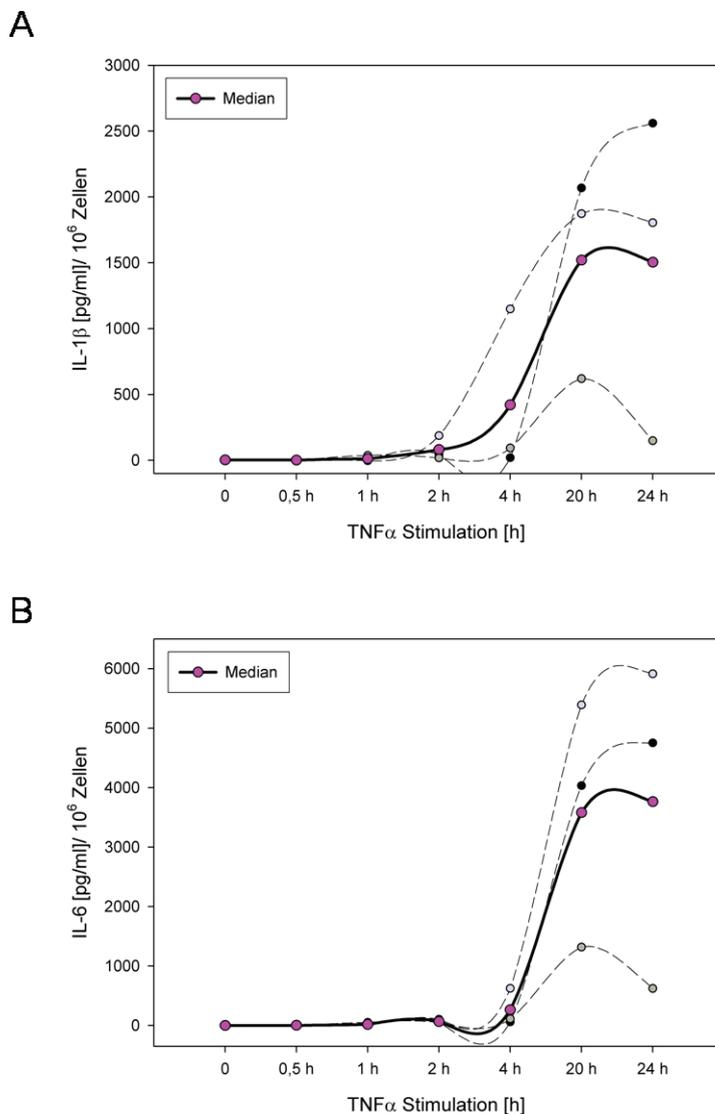


Abbildung 3-6: Zeitverlauf der Zytokinausschüttung nach Stimulation mit TNF α . Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde die Zytokinausschüttung von PBMCs nach Stimulation mit 10ng/ml TNF α von drei Spendern gemessen. Dargestellt ist der Median (N=3) der Zytokinausschüttung von IL-1 β (A) und IL-6 (B) in pg/ml pro 10⁶ Zellen.

Auch hier war ein kontinuierlicher Anstieg der Zytokinlevel in den ersten 20 Stunden zu beobachten, wobei diese, verglichen mit der Stimulation durch LPS, auf deutlich niedrigerem Niveau abliefen (maximale IL-1 β Ausschüttung: 500 – 2500 pg/ml, maximale IL-6 Ausschüttung: 1000 - 6000 pg/ml). Eine signifikante Proteinausschüttung war erst nach mindestens acht Stunden Stimulation messbar. Als optimaler Zeitpunkt wurde deshalb eine Stimulationsdauer von acht Stunden gewählt, da nach zwanzig Stunden auch unbehandelte Zellen Zytokine ausschütteten. Ein Zytotoxizitätstest mit MTT bestätigte, dass sich mit zunehmender Stimulationsdauer der Zellstress erhöht und ein Absterben der Zellen zunimmt (Daten nicht gezeigt).

Die isolierten PBMCs jedes Spenders reagierten unterschiedlich stark auf eine Stimulation mit LPS oder TNF α . Der Schwankungsbereich des IL-6 Spiegels nach LPS Stimulation beispielsweise lag zwischen 1000 pg/ml und 25000 pg/ml. Trotz gleicher Bedingungen bei der Blutabnahme, fand sich wiederholt eine ausgeprägte Variabilität. Bei genauerer Untersuchung stellte sich heraus, dass diese Variabilität sowohl interindividuell als auch intraindividuell auftrat (Abbildung 3-7).

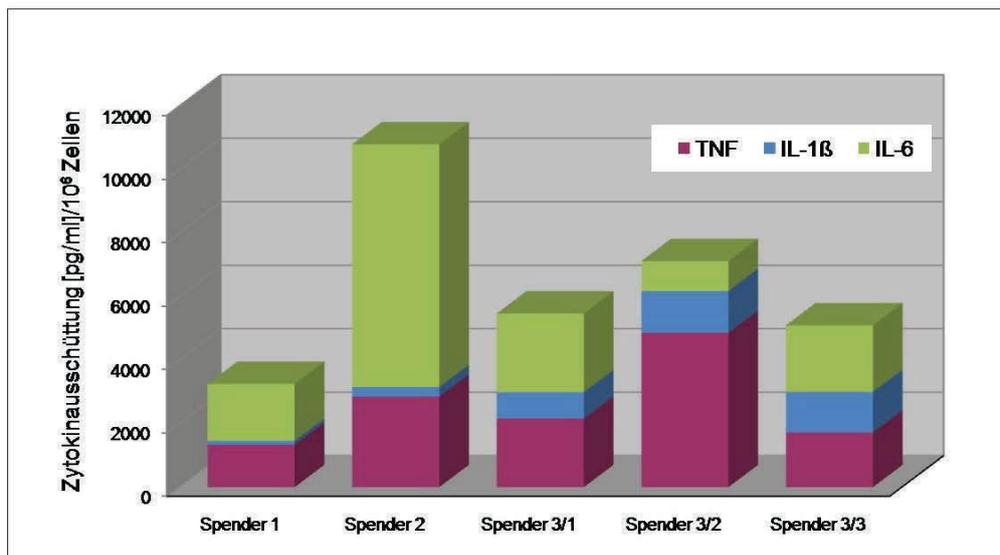


Abbildung 3-7: Variabilität der Zytokinausschüttung nach Stimulation mit LPS. PBMCs von drei verschiedenen Spendern wurden für 240 Minuten mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert und die Ausschüttung der Zytokine TNF α (rot), IL-1 β (blau) und IL-6 (grün) mittels ELISA gemessen. Eine Variabilität in der Zytokinausschüttung trat sowohl zwischen den drei verschiedenen Spendern, als auch innerhalb eines Spenders (Spender 3) auf, dessen Blut dreimal untersucht wurde.

Der Kurvenverlauf war für jede Stimulation ähnlich und unterschied sich nur in der Höhe der Absolutwerte. Diese Beobachtung wurde bereits für Vollblut und PBMCs beschrieben (de Groot, 1992).

Die festgelegte Stimulationsdauer von 8 Stunden wurde in einem separaten Versuch mit einem p38 MAPK Inhibitor noch einmal überprüft. Der Hemmstoff SB neu wurde in den zwei Konzentrationen 1 μ M und 1 nM eingesetzt (Abbildung 3-8).

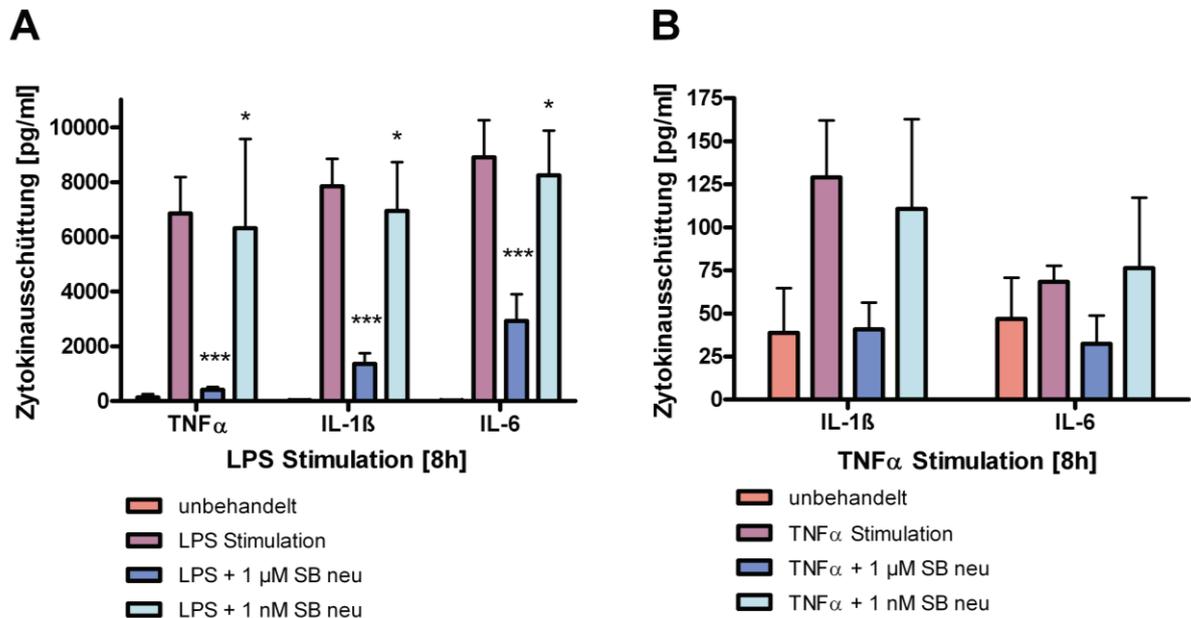


Abbildung 3-8: Effekt des p38 MAPK Inhibitors SB neu auf die Zytokinausschüttung in PBMCs. SB neu (1 μ M und 1 nM) hemmt in LPS (A) und TNF α (B) stimulierten PBMCs (8 Stunden) die Zytokinausschüttung (pg/ml). Dargestellt sind Mittelwerte (N=3), Standardfehler (SEM) und statistische Signifikanz von $p < 0.05$ (*) und $p < 0.001$ (***) gegenüber der LPS stimulierten Kontrolle.

Auch hier war eine verminderte TNF α Stimulation gegenüber der LPS Stimulation zu erkennen. Statistisch fand sich für die Stimulation mit TNF α keine Signifikanz, wohl aber ein Trend. Sowohl in LPS stimulierten Zellen als auch in TNF α stimulierten Zellen hemmt die hohe Konzentration von 1 μ M SB neu die Ausschüttung aller Zytokine (75 - 100%). Bei einer Konzentration von 1 nM SB neu wurden die Zytokinlevel nur minimal beeinträchtigt. Dieses Ergebnis bestätigte sowohl die bisherigen Daten für SB neu (Kapitel 3.2.2) als auch den gewählten Messzeitpunkt für die Stimulation der Zytokinausschüttung von acht Stunden.

3.3.1.2 Untersuchung zur Expression entzündungsrelevanter Gene

Um geeignete Zielgene für die Expressionsanalyse zu identifizieren, wurde ein *TaqMan*[®] *Custom Array* entworfen, der mit einer Probe die Expression von 96 individuell ausgewählten Genen messen kann. Für den Array wurden für das Entzündungsgeschehen wichtige Gene identifiziert, wie zum Beispiel Zytokine, Chemokine und ihre Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Phosphatasen (Genliste siehe Kapitel 2.2.6).

PBMCs wurden in einer Zeitreihe (30 - 240 Minuten) mit 1 µg/ml LPS und 10 ng/ml TNFα für 30, 60, 120 und 240 Minuten stimuliert, die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese Proben wurden dann mit dem *TaqMan*[®] *Custom Array* untersucht, um zunächst den richtigen Messzeitpunkt zu identifizieren (Abbildung 3-9). In der Auswertung wurde die Genexpression zum 'housekeeping' Gen 18SrRNA und zur unbehandelten Kontrolle in Relation gesetzt. Ein signifikanter Unterschied nach erfolgter Stimulation und gemessener Expression ausgewählter Zielgene konnte erst nach 120 Minuten gemessen werden und wurde deswegen als Messzeitpunkt für die RNA Analyse in weiteren Versuchen gewählt.

Für die Stimulation mit LPS und TNFα ergab sich ein ähnliches Profil (Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11). Ähnlich wie im Falle der Zytokinausschüttung, war die TNFα Stimulation mindestens um ein zehnfaches schwächer verglichen mit der LPS Stimulation.

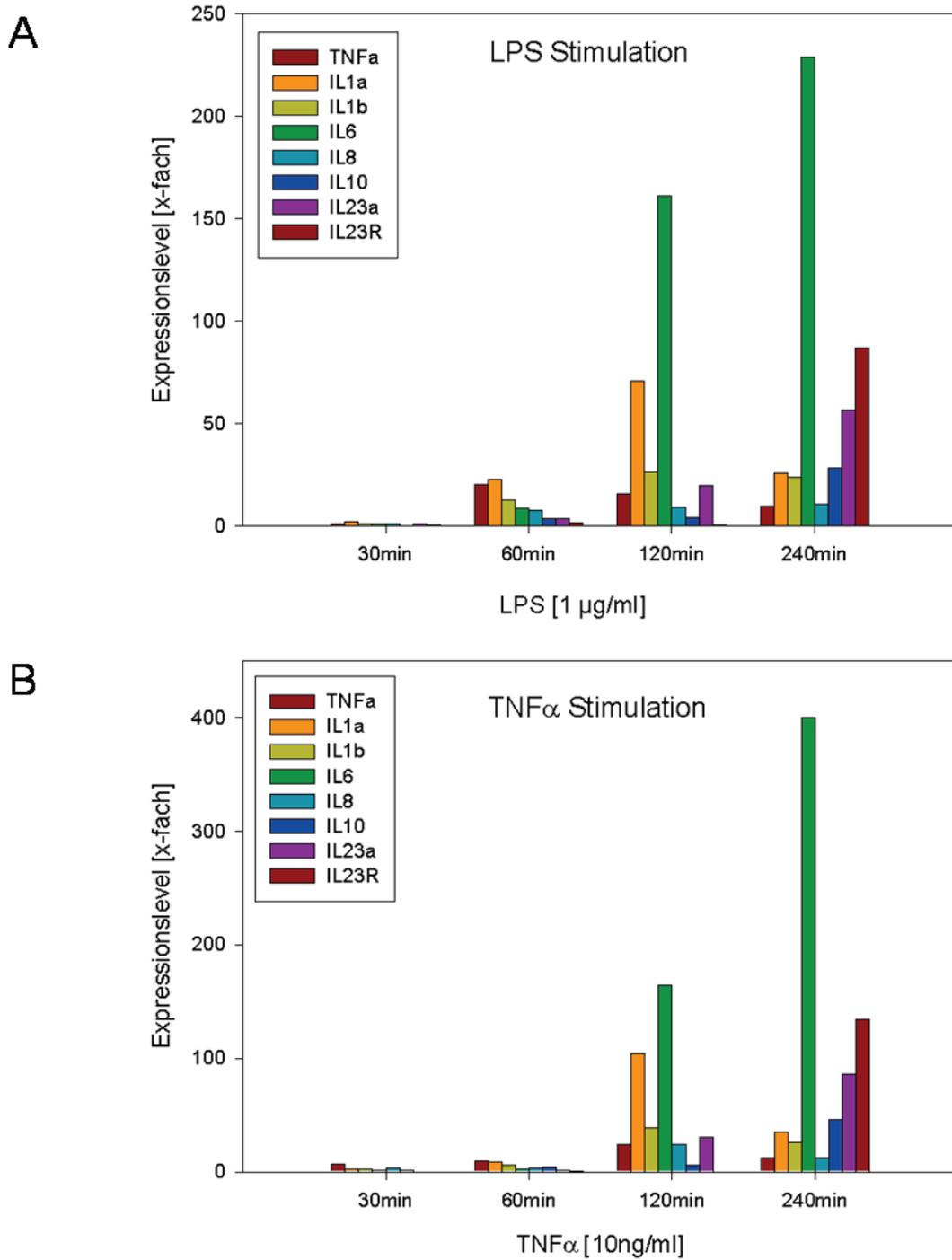


Abbildung 3-9: Zeitverlauf der mRNA Expression von entzündungsrelevanten Genen nach Stimulation von humanen PBMCs mit LPS (1 µg/ml) oder TNF α (10 ng/ml). Dargestellt ist die Reaktion von TNF α , IL1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-23 α und IL-23R relativ zur unbehandelten Kontrolle und zum Haushaltsgen 18SrRNA nach 30, 60, 120 und 240 Minuten Stimulation (N=3).

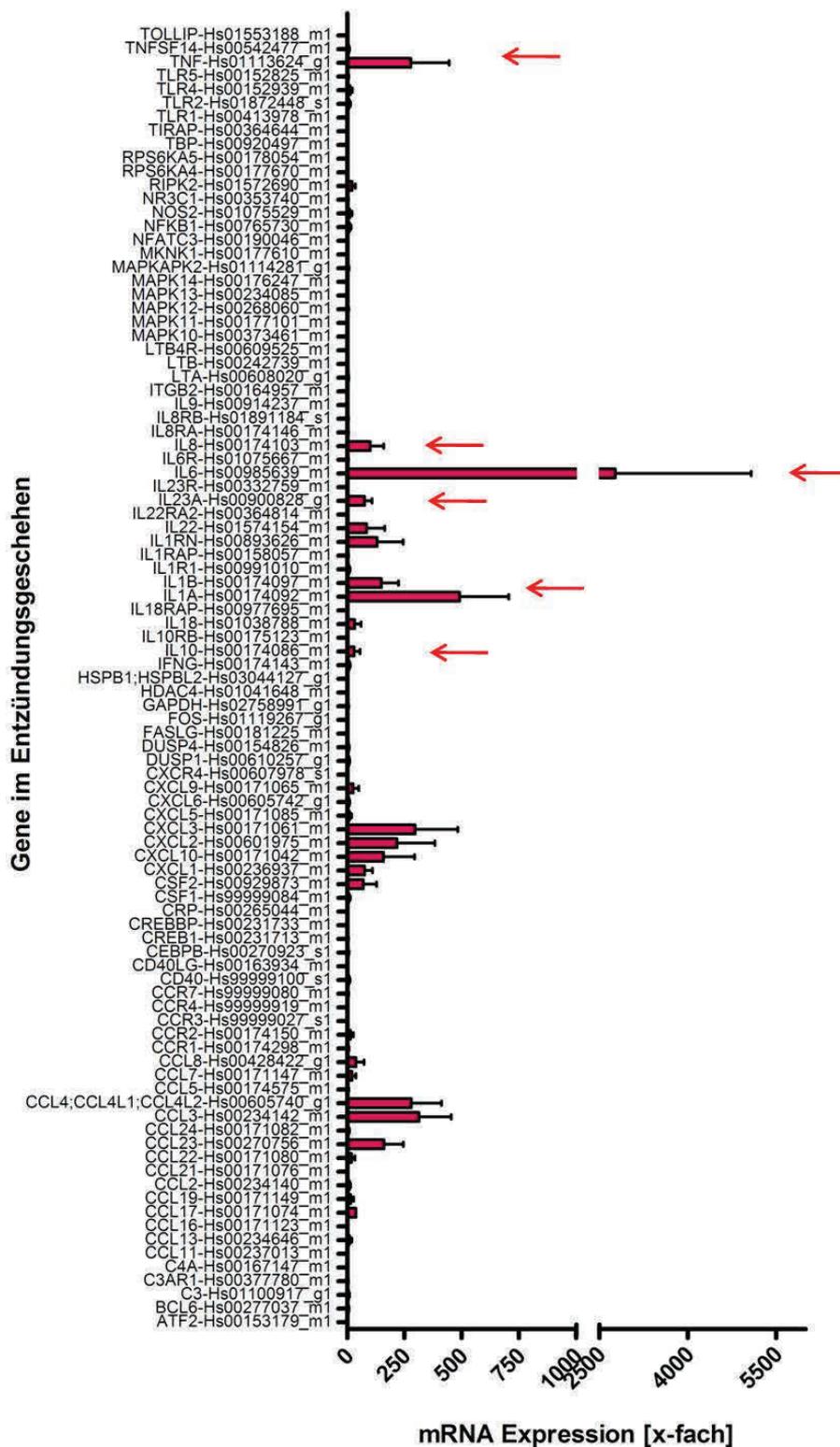


Abbildung 3-10: Identifizierung von entzündungsrelevanten Genen in LPS stimulierten PBMCs. PBMCs wurden für 120 min mit 1 µg/ml LPS stimuliert und einer Expressionsanalyse unterzogen. Gezeigt wird die relative Expression bezogen auf 18SrRNA und unbehandelte Kontrolle von drei verschiedenen Versuchen mit Standardfehler. Die mit rotem Pfeil markierten Gene wurden als Marker für weitere Untersuchungen definiert.

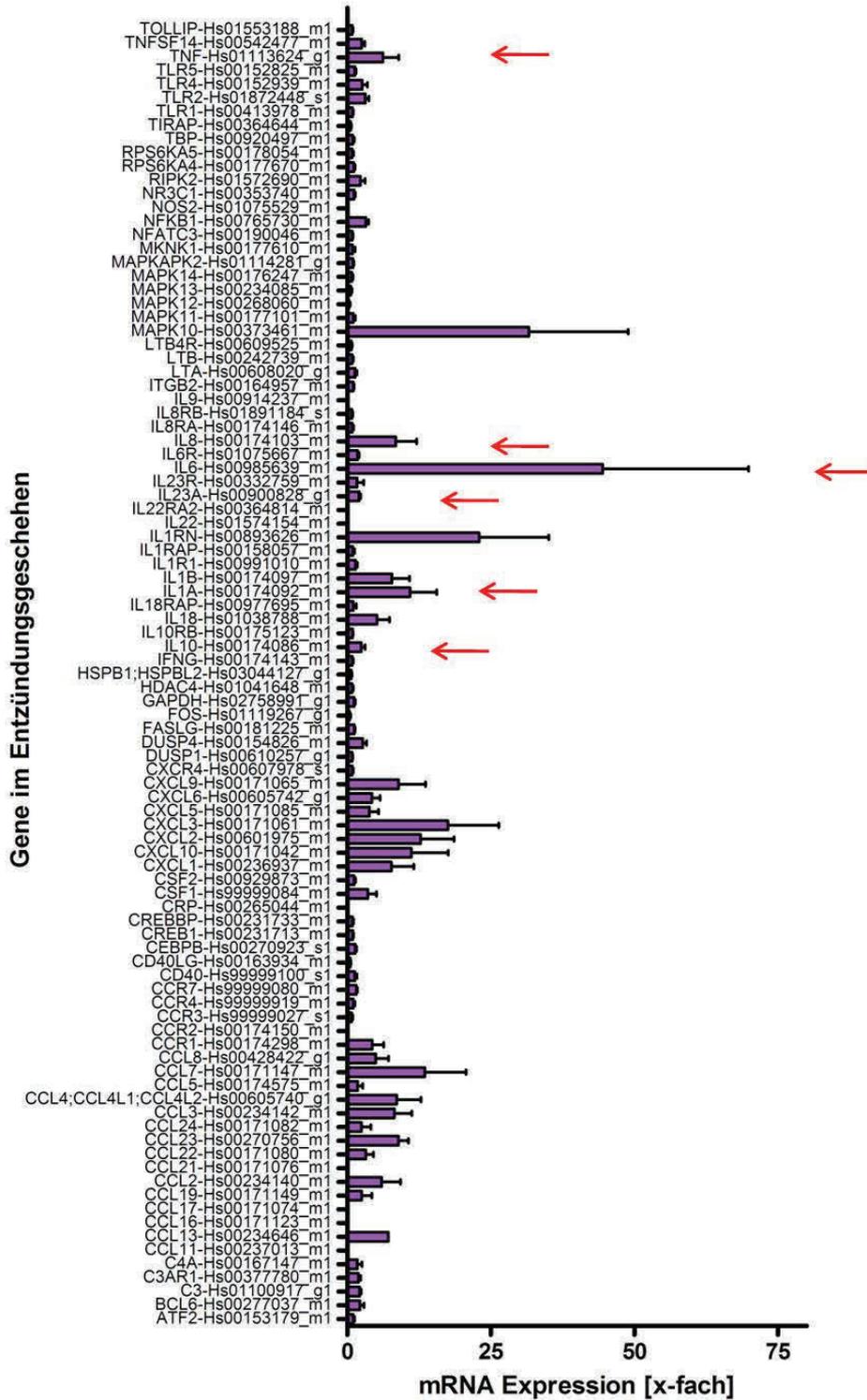


Abbildung 3-11: Identifizierung von entzündungsrelevanten Genen in TNF α stimulierten PBMCs. PBMCs wurden für 120 min mit 10 ng/ml TNF α stimuliert und einer Expressionsanalyse unterzogen. Gezeigt wird die relative Expression bezogen auf 18SrRNA und unbehandelte Kontrolle von drei verschiedenen Versuchen mit Standardfehler. Die mit rotem Pfeil markierten Gene wurden als Marker für weitere Untersuchungen definiert.

Tabelle 3-5 listet alle mittels TaqMan® Custom Array identifizierten Gene auf, deren Expression durch die LPS oder TNF α Stimulation relativ zur unbehandelten Kontrolle aktiviert wurden. Durch die Stimulation wurde besonders stark die Expression von verschiedenen Chemokinen vom Typ CCL und CXCL, Interleukinen und Zytokinen erhöht. Neben den im ELISA analysierten Zytokinen TNF α , IL-1 β und IL-6, deren Expression durch LPS (TNF α : 277-fach, IL-1 β : 149-fach und IL-6: 2769-fach) und durch TNF α (TNF α : 6-fach, IL-1 β : 8-fach und IL-6: 44-fach) aktiviert wurde, konnten als weitere wichtige proinflammatorische Zytokine IL-1 α , IL-8, IL-23 α identifiziert werden. Auch deren Expression wurde durch LPS (IL-1 α : 490-fach, IL-8: 100-fach, IL-23 α : 76-fach) stärker aktiviert als durch TNF α (IL-1 α : 11-fach, IL-8: 8-fach, IL-23 α : 2-fach). Außerdem wurde das antiinflammatorisch wirkende IL-10 (30-fach durch LPS, 2-fach durch TNF α aktiviert), sowie die bereits aus Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) für die p38 MAPK Regulation als wichtig erscheinenden Gene CSF2 und DUSP1/MKP1 auf RNA Ebene untersucht.

Schließlich wurde die Expression von Mitgliedern der Entzündungskaskade, wie z.B. die p38 MAPK Isoformen p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12), p38 δ (MAPK13) und deren Substratkinasen MAPKAPK2 und MNK1, sowie JNK3 (MAPK10) untersucht. Diese Gene waren nach Stimulation auf Expressionsebene gering (maximal 3-fache Aktivierung) verändert. Eine Ausnahme fand sich mit einer 30-fachen Aktivierung für die JNK3 Expression nach Stimulation mit TNF α .

Zusammenfassend wurden folgende entzündungsrelevanten Gene für die weiteren Untersuchungen ausgewählt:

TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2 und DUSP1/MKP1

Tabelle 3-5: mRNA Expression von entzündungsrelevanten Genen nach Stimulation (120 Minuten) mit LPS (1 µg/ml) oder TNFα (10 ng/ml). Aufgeführt sind die Mittelwerte und der Standardfehler der x-fachen Expression relativ zur unbehandelten Kontrolle und zum Haushaltsgen 18SrRNA (N=3). Die für weitere Untersuchungen ausgewählten Gene sind hervorgehoben.

Regulierte Gene mRNA Expression (x-fach)	LPS Stimulation (120 min)		TNFα Stimulation (120 min)	
	MW	SEM	MW	SEM
CCL19-Hs00171149_m1	15,3	18,7	2,5	2,5
CCL2-Hs00234140_m1	9,6	6,6	6,0	4,7
CCL22-Hs00171080_m1	18,5	21,8	3,2	1,9
CCL23-Hs00270756_m1	160,8	118,6	8,9	2,4
CCL3-Hs00234142_m1	312,5	199,3	8,2	4,3
CCL4;CCL4L1;CCL4L2-Hs00605740_g1	279,8	187,3	8,6	6,0
CCL7-Hs00171147_m1	20,4	25,7	13,5	10,2
CCL8-Hs00428422_g1	38,5	50,6	4,9	3,2
CCR2-Hs00174150_m1	13,5	18,8	0,1	0,0
CSF1-Hs99999084_m1	7,5	6,8	3,6	2,1
CSF2-Hs00929873_m1	70,7	82,1	1,2	0,4
CXCL1-Hs00236937_m1	76,2	48,4	7,7	5,6
CXCL10-Hs00171042_m1	158,1	191,7	11,1	9,1
CXCL2-Hs00601975_m1	216,7	234,2	12,7	8,3
CXCL3-Hs00171061_m1	295,8	264,5	17,5	12,5
CXCL9-Hs00171065_m1	26,2	35,1	8,9	6,7
DUSP1-Hs00610257_g1	7,3	4,9	0,8	0,2
DUSP4-Hs00154826_m1	5,1	4,2	2,7	0,9
IFNG-Hs00174143_m1	8,3	6,3	0,9	0,3
IL10-Hs00174086_m1	30,3	36,1	2,4	0,9
IL18-Hs01038788_m1	32,9	39,4	5,2	3,1
IL1A-Hs00174092_m1	490,4	303,2	10,9	6,7
IL1B-Hs00174097_m1	149,4	105,7	7,7	4,4
IL1R1-Hs00991010_m1	6,8	7,0	1,4	0,5
IL1RN-Hs00893626_m1	130,9	159,7	23,0	17,2
IL23A-Hs00900828_g1	76,0	45,6	2,1	0,4
IL23R-Hs00332759_m1	1,2	1,0	1,7	1,6
IL6-Hs00985639_m1	2769,4	3266,3	44,4	36,0

IL6R-Hs01075667_m1	3,3	2,9	1,8	0,4
IL8-Hs00174103_m1	100,2	84,3	8,4	5,2
MAPK10-Hs00373461_m1	0,7	0,5	31,6	17,3
MAPK11-Hs00177101_m1	1,5	0,5	1,0	0,5
MAPK12-Hs00268060_m1	3,0	3,6	0,3	0,3
MAPK13-Hs00234085_m1	2,1	1,4	0,6	0,3
MAPK14-Hs00176247_m1	1,5	0,5	0,8	0,3
MAPKAPK2-Hs01114281_g1	4,3	3,9	1,0	0,2
MKNK1-Hs00177610_m1	1,5	1,0	0,9	0,6
TNF-Hs01113624_g1	277,4	237,0	6,2	3,9

Um den festgelegten Messzeitpunkt von 120 Minuten zu validieren, wurde ein Versuch mit dem p38 Inhibitor SB neu (1 μ M und 1 nM) durchgeführt (Abbildung 3-12). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von zwei verschiedenen Spendern. Eine Behandlung der PBMCs mit 1 μ M SB neu führte bei allen untersuchten Genen zu einer signifikant niedrigeren Expression auf RNA Ebene. Mit diesem Ergebnis bestätigte sich der Stimulationszeitpunkt von 120 Minuten für die Detektion von signifikanten Unterschieden auf Transkriptionsebene.

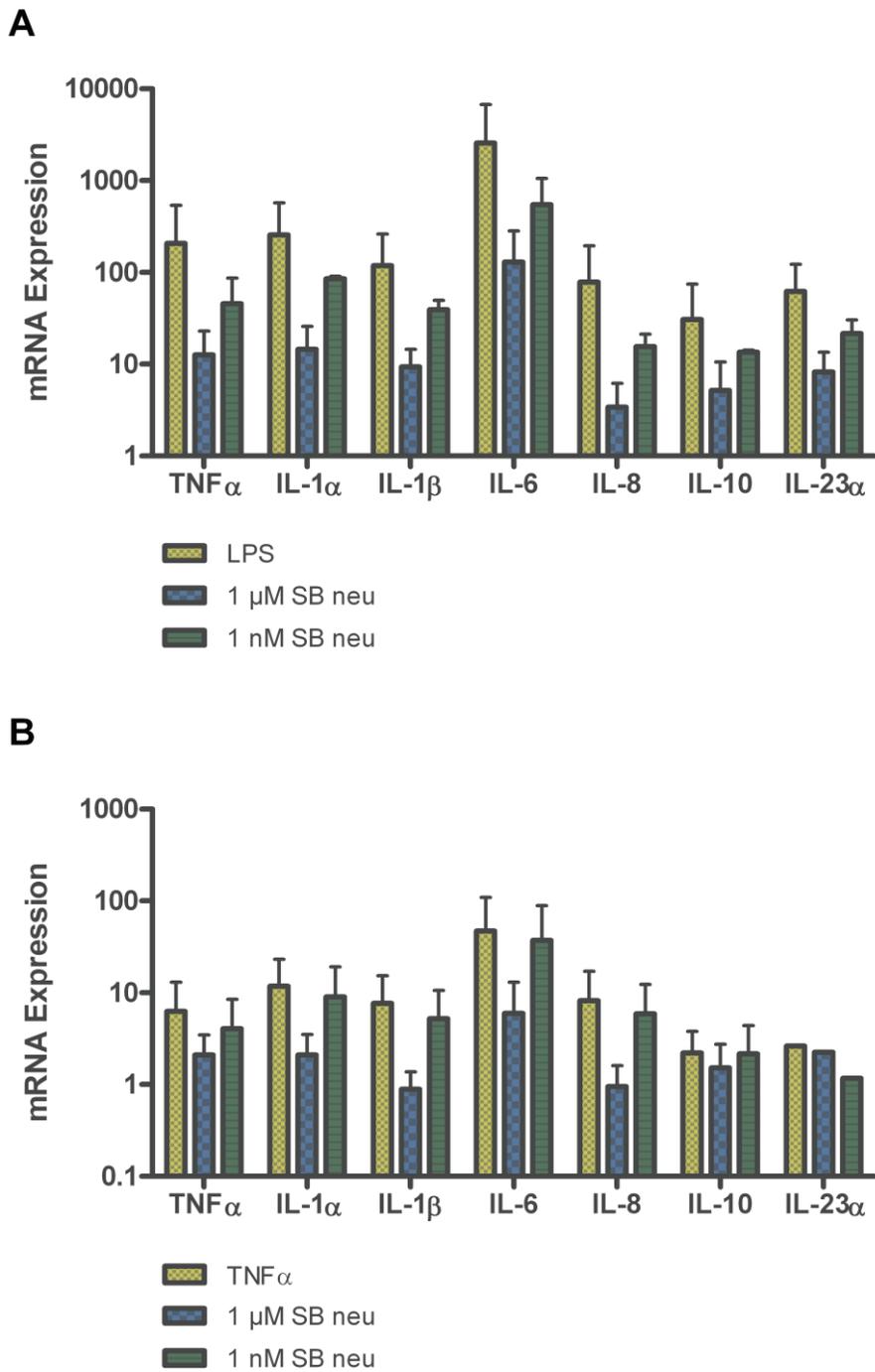


Abbildung 3-12: Effekt des p38 MAPK Inhibitors SB neu auf die Genexpression in PBMCs. SB neu (1 μ M und 1 nM) hemmt in LPS (A) und TNF α (B) stimulierten PBMCs (2 Stunden) die Expression von ausgewählten Markergenen. Dargestellt sind Mittelwerte (N=2) und die Standardabweichung der Expressionslevel bezogen auf das Haushaltsgen 18SrRNA und auf die unbehandelte Kontrolle.

und Dickdarmgewebe kein Unterschied erkennbar war, wurden die beiden Gewebe für spätere Analysen zusammengefasst.

Insgesamt zeigten PBMCs, normales Darmgewebe und Haarfollikel ein ähnliches Expressionsmuster für die p38 MAPK Isoformen. Die vorliegenden Daten waren Anlass dazu in einem Testversuch PBMCs als Surrogat für Darmgewebe für die Expression von p38 MAPK Isoform einzusetzen.

3.3.1.4 Aktivierung der p38 MAP Kinase in stimulierten PBMCs

Bei MAPK Signaltransduktionswegen werden Informationen durch Phosphorylierungskaskaden in die Zelle geleitet. Die Aktivierung der p38 MAPK Isoformen erfolgt durch eine Doppelphosphorylierung an den Aminosäuren Threonin 180 und Tyrosin 182. Die MAPK Aktivierung wurde mittels Western Blot mit einem phospho-spezifischen Antikörper (T180/Y182) untersucht. PBMCs wurden mit 1 µg/ml LPS oder 10 ng/ml TNFα in einer Zeitreihe bis zu 4 Stunden stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Zellpellet lysiert und für jede Probe 20 µg Protein auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 3-14).

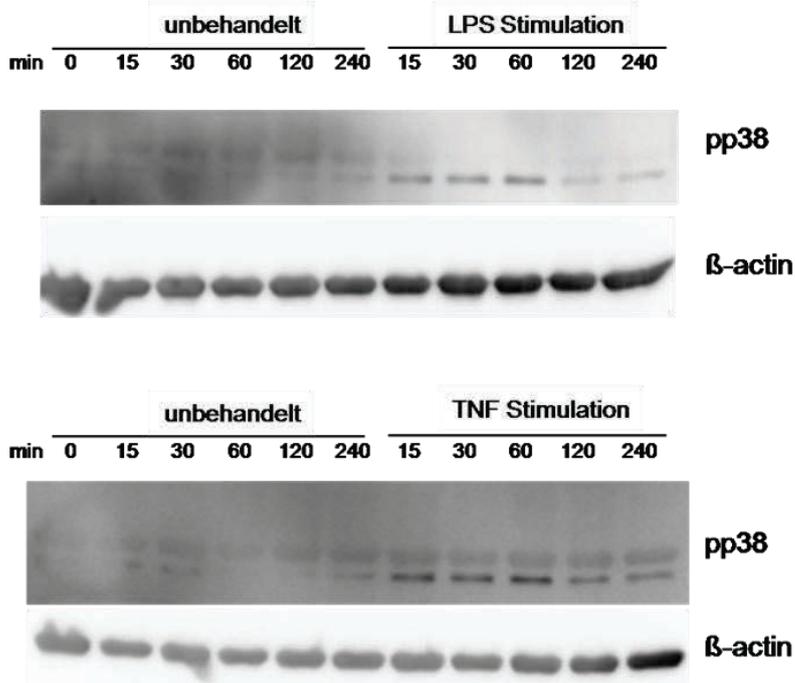


Abbildung 3-14: Zeitverlauf der p38 MAPK Aktivierung in PBMCs. PBMCs wurden für 15-240 Minuten mit LPS (1 µg/ml) oder TNF (10 ng/ml) stimuliert. Die Aktivierung/Phosphorylierung der p38 MAPK wurde mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Dargestellt wurde je ein Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen, beta-Actin diente als Ladekontrolle.

Für die Stimulation mit LPS und TNF α wurde nach 15 Minuten im Western Blot eine spezifische Bande für das phosphorylierte Protein nachgewiesen. Die Proteinbande war bis 60 Minuten nach Stimulation gut erkennbar und wurde dann deutlich schwächer. Der Messzeitpunkt für die Proteinanalytik wurde auf 30 Minuten festgelegt. Der beschriebene phospho-spezifische Antikörper bindet an Position Threonin 180 und Tyrosin 182 phosphorylierte Kinasen. p38 α , p38 β und p38 δ werden an diesen Positionen phosphoryliert, nicht aber p38 γ .

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Inhibitoren BIRB 796 und SB neu einen Einfluss auf die Aktivierung der p38 MAPK haben. Bei einer Konzentration von 1 μ M konnte sowohl für BIRB 796 als auch für SB neu eine verminderte Phosphorylierung gezeigt werden (Abbildung 3-15). Der Effekt von p38 Inhibitoren auf die Aktivierung von p38 MAPK wurde so für BIRB 796 bestätigt (Kuma, 2005) und bei SB neu erstmals gezeigt. Sowohl ein allosterischer (BIRB 796) als auch kompetitiver Inhibitor (SB neu) scheinen somit nicht nur die Enzymaktivität zu inhibieren, sondern auch auf die Aktivierung der Kinase selbst einen Einfluss zu haben.

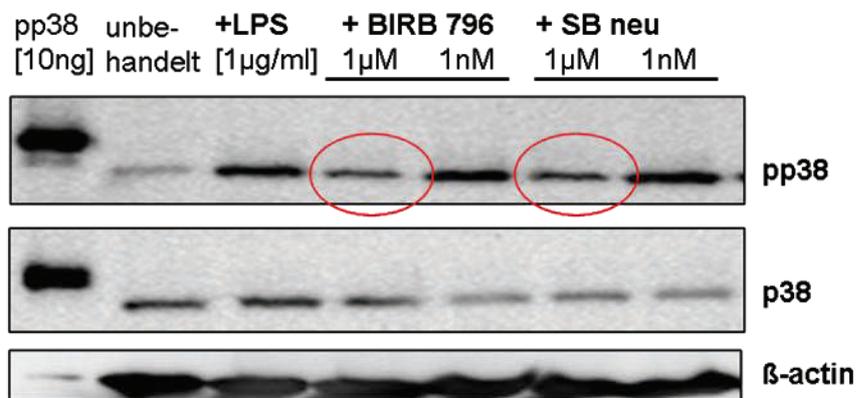


Abbildung 3-15: Effekt von p38 MAPK Inhibitoren auf die Aktivierung von p38 MAPK in PBMCs. PBMCs wurden für 30 Minuten mit LPS (1 μ g/ml) und einem p38 Inhibitor inkubiert. Sowohl bei einem allosterischen (BIRB 796) als auch kompetitiven (SB neu) Inhibitor konnte bei einer Konzentration von 1 μ M eine verminderte Aktivierung der p38 MAPK nachgewiesen werden (rot). Die Aktivierung/Phosphorylierung der p38 MAPK wurde mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Dargestellt wurde je ein Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen, beta-Actin und Gesamt-p38 dienten als Ladekontrolle.

Um die jeweiligen Isoformen einzeln zu identifizieren, wurden isoformspezifische Antikörper kommerziell erworben und deren Spezifität mit rekombinanten Proteinen überprüft. Da diese aber als Fusionsprotein mit einer Glutathion S-Transferase (GST) vorlagen, erschien die spezifische Bande im Western Blot bei 70 kDa. Um das gleiche

Molekulargewicht wie das native Protein und somit eine geeignete Größenkontrolle für die spezifische Proteinbande (~40 kDa) zu bekommen, wurde die GST Konjugation mit Thrombin abgespalten.

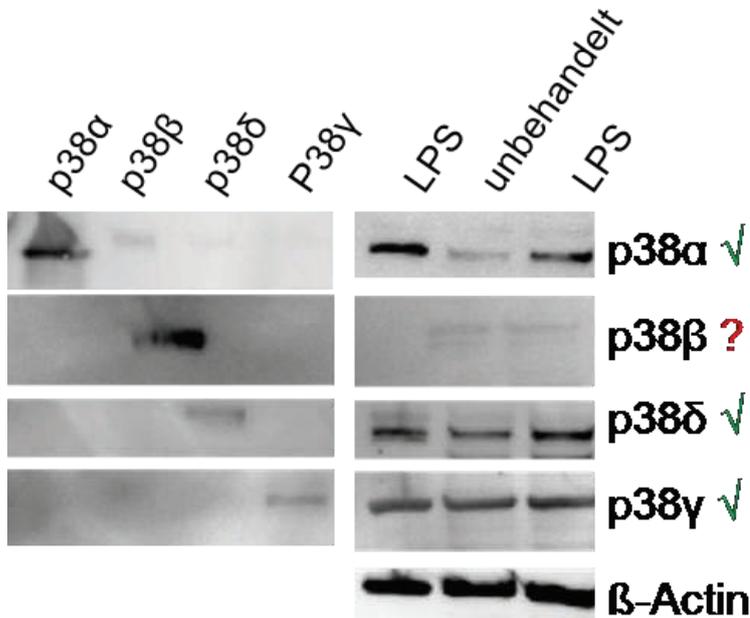


Abbildung 3-16: Nachweis der p38 MAPK Isoformen mittels Western Blot. Die Spezifität der p38 MAPK Isoform-Antikörper wurde mit rekombinatem Protein nachgewiesen. Bei der Detektion traten keine Wechselwirkungen mit den anderen Isoformen auf. Weiter konnten die Isoformen p38 α , p38 δ und p38 γ auch in Zelllysaten von PBMCs (20 μ g Protein) im Größenbereich von 40kDa nachgewiesen werden.

Im linken Teil von Abbildung 3-16 ist zu erkennen, dass die Isoform-Antikörper spezifisch sind, da keine Kreuzreaktionen auftreten. Anschließend wurden die Antikörper in Lysaten von PBMCs getestet. Unbehandelte und stimulierte Proben zeigten eine eindeutige Proteinbande (~40 kDa) für p38 α , p38 δ und p38 γ . Lediglich für p38 β konnte in PBMCs kein sicheres Signal detektiert werden. Diese Datenlage ist im Einklang mit den Expressionsanalysen. Es ist davon auszugehen, dass p38 β , wenn dann nur in ganz geringem Maß exprimiert wird.

Zusammenfassend erkennen die Antikörper wohl spezifisch die jeweilige p38 MAPK Isoform, aber sie unterscheiden nicht zwischen phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Protein. Da es ein Ziel dieser Arbeit war, die aktiven von den inaktiven Isoformen zu differenzieren, wurde intensiv nach weiteren Lösungen gesucht. Zwei wichtige Faktoren mussten dabei berücksichtigt werden. Erstens war die Proteinausbeute aus PBMCs so gering, dass Untersuchungen mittels Western Blot Analysen bzw. Immunpräzipitation nicht möglich waren. Zweitens funktionierte ein 'Strippen und Reproben' der Antikörper, d.h. ein Ablösen der bereits gebundenen Antikörper und

anschließendes Binden eines neuen Antikörpers, in diesem Fall nicht sauber. Schließlich wurde ein kommerziell verfügbarer *Phospho MAPK Array* angewendet, mit dem der relative Phosphorylierungsstatus von 21 bzw. 26 Kinasen parallel analysiert werden kann. Alle Mitglieder der drei MAPK Familien JNK, ERK und p38 MAPK und somit auch alle vier p38 MAPK Isoformen konnten damit untersucht werden. Der Array war nur für die Untersuchung von Zelllinien etabliert und funktionierte zunächst für PBMCs und Gewebelysate nicht nach dem Herstellerprotokoll. Nach Modifikation und der Umstellung der Proteinextraktion auf einen spezifischen Harnstoffpuffer, konnte die Anwendung des Arrays auf die gewünschten Gewebe (PBMCs, Darm) ausgedehnt werden. Abbildung 3-17 zeigt oben die Ergebnisse für unbehandelte PBMCs und stimulierte PBMCs (30 Minuten Stimulation mit 1 µg/ml LPS oder 10 ng/ml TNFα) unter Verwendung des Phospho-MAPK Arrays. Im unteren Teil des Schaubilds wurden die durch die Behandlung aktivierten Kinasen grafisch dargestellt. Die Stimulation mit LPS führte neben p38α auch zur Aktivierung von ERK 1 und ERK 2, sowie den ERK und p38 nachgeordneten Kinasen MSK 2 und RSK 2 und JNK 2. Die TNFα Stimulation führte zu einer insgesamt schwächeren Reaktion als die LPS Stimulation mit einem spezifischen Muster. Nur die p38α MAPK und RSK 1 wurden als Antwort auf TNFα Stimulation phosphoryliert.

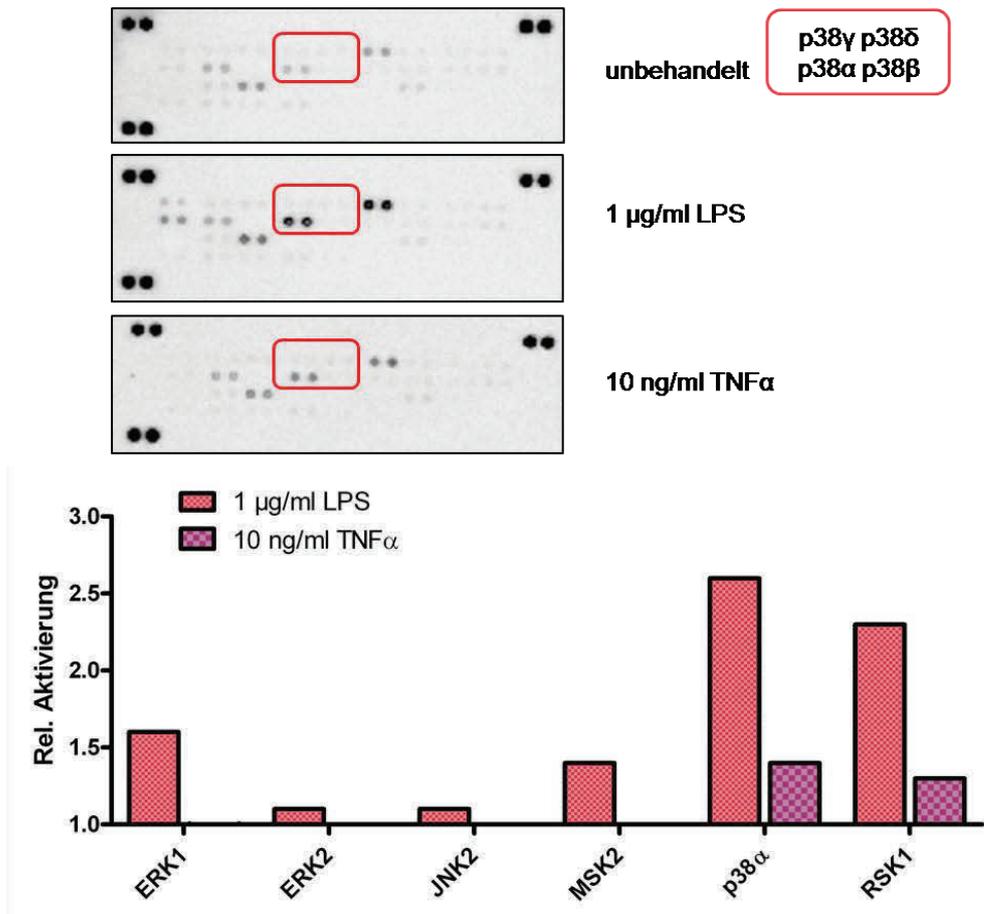


Abbildung 3-17: Relative Quantifizierung von Phospho-Proteinen (in Duplikaten) in PBMCs mit dem humanen Phospho MAPK Array. PBMCs wurden für 30 Minuten mit LPS (1 µg/ml) oder TNF (10 ng/ml) stimuliert und 300 µg Protein pro Array aufgetragen. Die relative Quantifizierung erfolgte über die Messung der Pixeldichte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

3.3.1.5 Versuchsprotokoll zur gleichzeitigen Bestimmung der Zytokinausschüttung, Genexpression und Kinase-Aktivität

Mit Hilfe der Ergebnisse aus den Voruntersuchungen wurde das nachfolgende Versuchsprotokoll ermittelt, das in Abbildung 3-18 mit den entsprechenden Messzeitpunkten dargestellt ist:

Messung der Zytokinausschüttung nach 8 Stunden für TNF α , IL-1 β und IL-6

Messung der Genexpression nach 2 Stunden für die Gene TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2, DUSP1/MKP1, MAPK11, MAPK12, MAPK13, MAPK14

Untersuchung der Phosphorylierung der p38 MAPK Isoformen nach 30 Minuten mit dem Phospho-MAPK Array

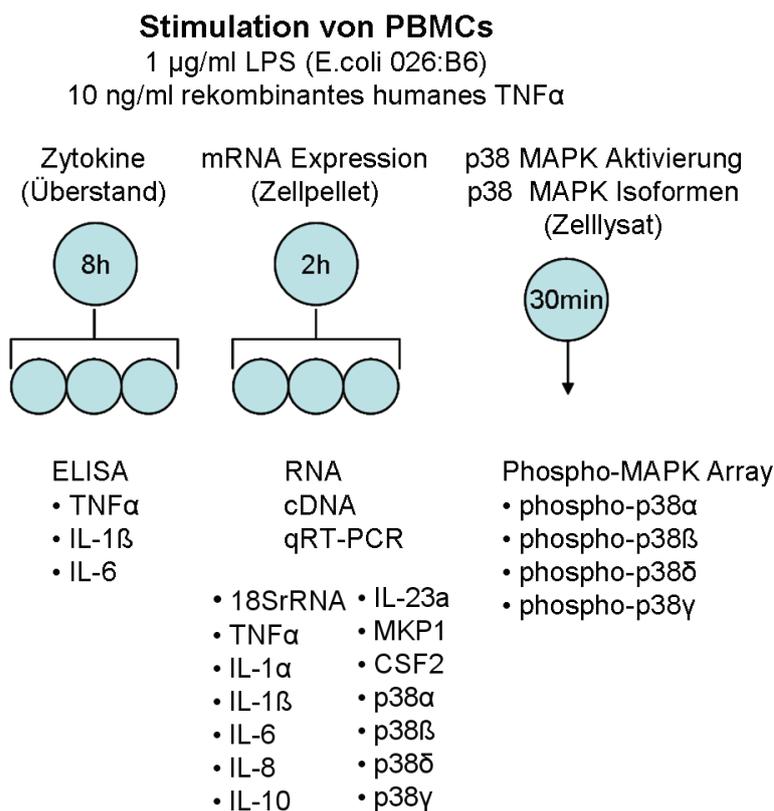


Abbildung 3-18: Übersicht über den Versuchsaufbau. Als Ergebnis der Voruntersuchungen wurde folgende Stimulationszeitpunkte festgelegt: Zytokinmessung nach 8 Stunden, mRNA Messung nach 2 Stunden und Western Blot nach 30 Minuten.

Im Weiteren wurde das ex vivo Modell zuerst für vier gesunde Freiwillige angewendet, um verschiedene p38 MAPK Inhibitoren zu charakterisieren. Anschließend wurden PBMCs von Patienten mit Morbus Crohn (N=7) und Nicht Morbus Crohn Patienten (N=7) ausgewertet.

3.3.2 Effekte von p38 MAPK Inhibitoren in stimulierten PBMCs von gesunden Spendern

Nachdem im vorhergehenden Kapitel die optimalen Bedingungen und Methoden für die *in vitro* Analyse mit PBMCs ermittelt wurden, sollten die p38 MAPK Inhibitoren SB neu (1 μ M und 1 nM), Pamapimod (10 μ M und 10 nM) und CBS 3825 (10 μ M und 10 nM) unter Verwendung von PBMCs von gesunden Freiwilligen charakterisiert werden. Aus Blut von drei Männern und einer Frau wurden PBMCs isoliert und nach dem in Abbildung 3-18 dargestellten Schema stimuliert.

3.3.2.1 Zytokinausschüttung und Genexpression nach Stimulation mit LPS

Tabelle 3-6 zeigt die Wirkung der untersuchten Substanzen auf die LPS stimulierte Zytokinausschüttung (TNF α , IL-1 β und IL-6) bzw. mRNA Expression (TNF α , IL-1 β und IL-6, sowie IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2, MKP1) anhand der mittleren prozentualen Hemmung. Für die mit einem Inhibitor behandelten Proben errechnet sich die Hemmung relativ zur Stimulationskontrolle (0% Hemmung, 100% Stimulation).

Tabelle 3-6: Hemmwirkung verschiedener p38 MAPK Inhibitoren nach LPS Stimulation. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Zytokinausschüttung (grau) und mRNA Expression von Markergenen nach Behandlung mit p38 Hemmstoffen in verschiedenen Konzentrationen (N=4).

1 µg/ml LPS	SB neu		Pamapimod		CBS 3825	
	1 µM	1 nM	10 µM	10 nM	10 µM	10 nM
Hemmung der Zytokinausschüttung [%]						
TNFα	89,8	18,4	92,5	16,5	96,5	14,1
IL-1β	87,6	8,9	89,3	24,4	94,2	42,6
IL-6	61,2	10,9	68,8	6,0	72,7	9,5
Hemmung der mRNA Expression [%]						
TNFα	49,1	8,5	64,1	36,3	77,5	-14,7
IL-1β	65,5	4,2	69,1	24,3	73,5	-20,7
IL-6	77,3	-0,4	80,5	22,8	76,9	-33,2
IL-1α	74,9	-0,3	80,0	23,7	84,1	-35,2
IL-8	85,5	24,8	87,8	49,6	89,5	23,5
IL-10	55,0	1,1	58,0	27,4	64,5	2,6
IL-23α	72,9	10,3	72,0	28,2	55,8	-20,0
CSF2	85,3	12,9	86,0	33,9	87,3	16,4
MKP1	74,9	-0,1	75,0	31,3	74,7	9,5

Für die höchsten Wirkstoffkonzentrationen (1 µM SB neu bzw. 10 µM für Pamapimod und CBS 3825) zeigten die getesteten Substanzen ein sehr ähnliches Hemmprofil auf die Zytokinausschüttung und auf die Hemmung der mRNA Expression der untersuchten Zielgene. Für die niedrigeren Konzentrationen fand sich eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität in der Reaktion der untersuchten PBMCs.

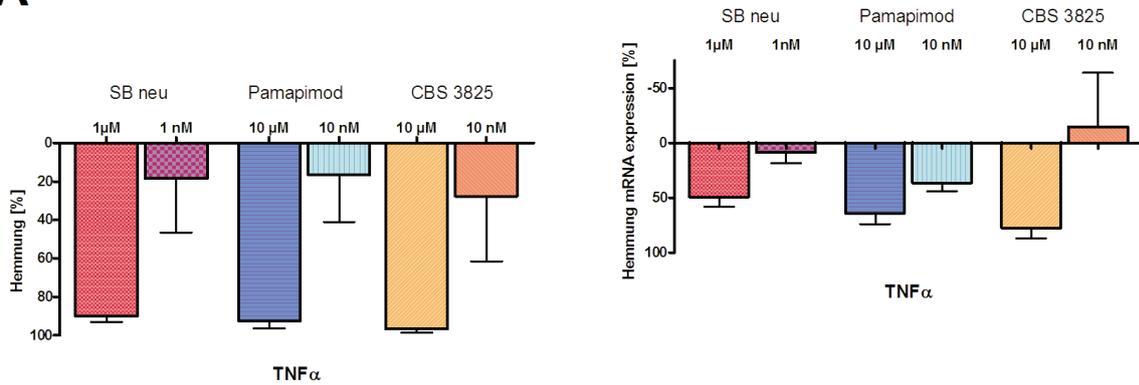
Für die Zytokine TNFα, IL-1β und IL-6 wurden die Proteindaten den mRNA Expressionsdaten in Abbildung 3-19 gegenüber gestellt. Die maximale Hemmung der Zytokinausschüttung schwankte für TNFα und IL-1β zwischen 88 und 100%, für IL-6 lag das Maximum zwischen 60 und 70% Hemmung. Die Hemmung der mRNA Expression war weniger stark (50 – 88%). Bei der niedrigeren Wirkstoffkonzentration (1 nM SB neu bzw. 10 nM für Pamapimod und CBS 3825) zeigte sich wieder eine deutliche interindividuelle Variabilität der Reaktion auf p38 MAPK Inhibitoren, was sich in einem hohen Standardfehler widerspiegelt. Die Reaktionen der Spender waren sowohl auf Ebene der Zytokinausschüttung als auch auf Transkriptionsebene variabel und in Ausnahmefällen konnte sogar eine Aktivierung der

Expression detektiert werden (Abbildung 3-19 (A-C); siehe negative Inhibition bei CBS 3825). Die durchschnittliche Hemmwirkung für die verschiedenen Inhibitoren unter Verwendung von PBMCs war bei den vier Spendern vergleichbar. Dabei ist zu beachten, dass SB neu im Versuchsansatz immer in einer zehnfach niedrigeren Konzentration eingesetzt wurde, d.h. auch um diesen Faktor potenter wirkt. Insgesamt wurde die Wirkstärke von SB neu zehnfach höher eingestuft als die von CBS 3825 und Pamapimod. Zum Vergleich dazu wurde bei den Untersuchungen unter Verwendung von humanem Vollblut (Kapitel 3.2.2) mittels TNF α Hemmung folgende IC₅₀ Werte für die Wirkstoffe ermittelt: SB neu (0,007 μ M) < Pamapimod (0,11 μ M) < CBS 3825 (0,39 μ M).

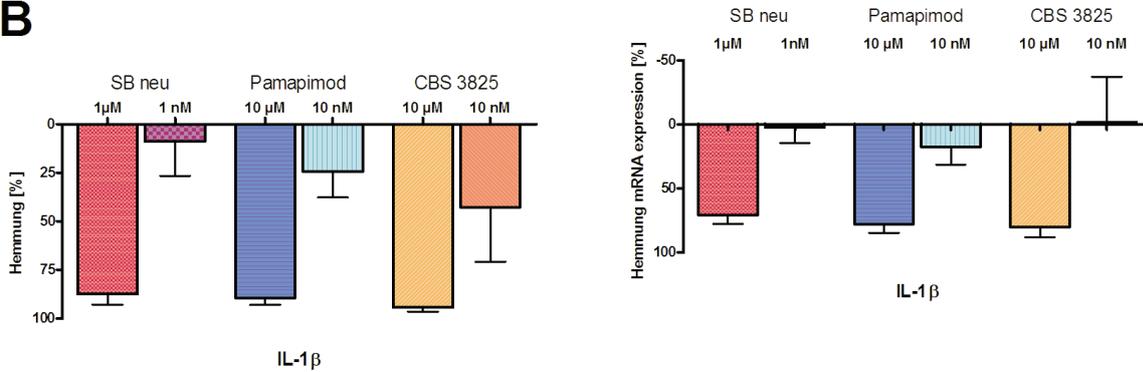
Zur genaueren Untersuchung der Substanzwirkungen wurden für TNF α , IL-1 β und IL-6 Korrelationen zwischen der Hemmung der Zytokinausschüttung und der Hemmung der mRNA Produktion berechnet, wie in Abbildung 3-20 dargestellt. Protein- und mRNA Ebene korrelierten für alle untersuchten Zytokine signifikant. Dies belegt, dass die getesteten Substanzen nicht nur die Zytokinausschüttung hemmen, sondern auch einen Einfluss auf Transkriptionsebene für die untersuchten Zielgene haben.

Das für die Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 beschriebene Muster fand sich auch weitgehend auf mRNA Expressionsebene für weiter untersuchte entzündungsrelevante Gene (Abbildung 3-21). Lediglich IL-10 reagierte mit ca. 50% Maximalhemmung nur sehr schwach auf die p38 MAPK Inhibitoren.

A



B



C

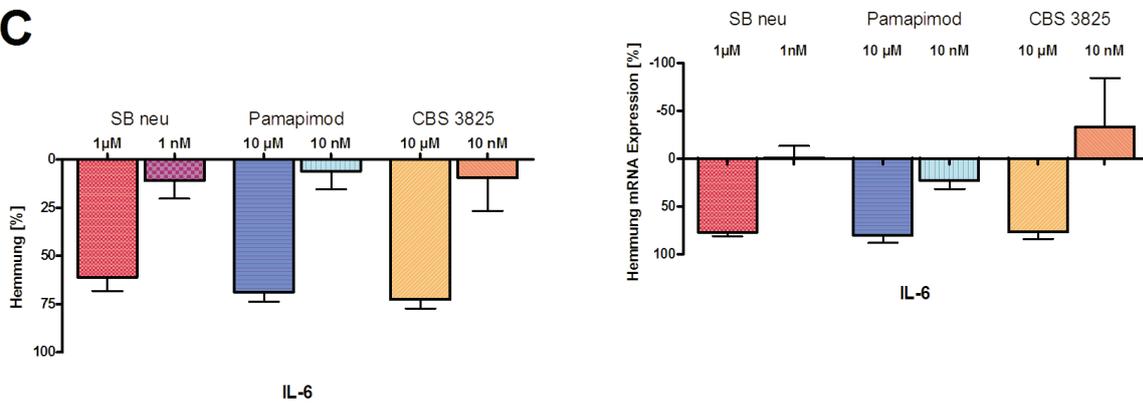


Abbildung 3-19: Hemmwirkung von p38 MAPK Inhibitoren auf die Zytokinausschüttung und mRNA Expression von PBMCs nach Stimulation mit LPS. PBMCs von Gesunden (N=4) wurden mit LPS (1 μ g/ml) und den p38 MAPK Inhibitoren SB neu (1 μ M und 1 nM), Pamapimod (10 μ M und 10 nM) und CBS 3825 (10 μ M und 10 nM) inkubiert. Dargestellt sind die mittlere prozentuale Hemmung und der Standardfehler (SEM) für die Freisetzung bzw. mRNA Expression der Zytokine TNF α (A), IL-1 β (B) und IL-6 (C) von 4 Spendern (N=4).

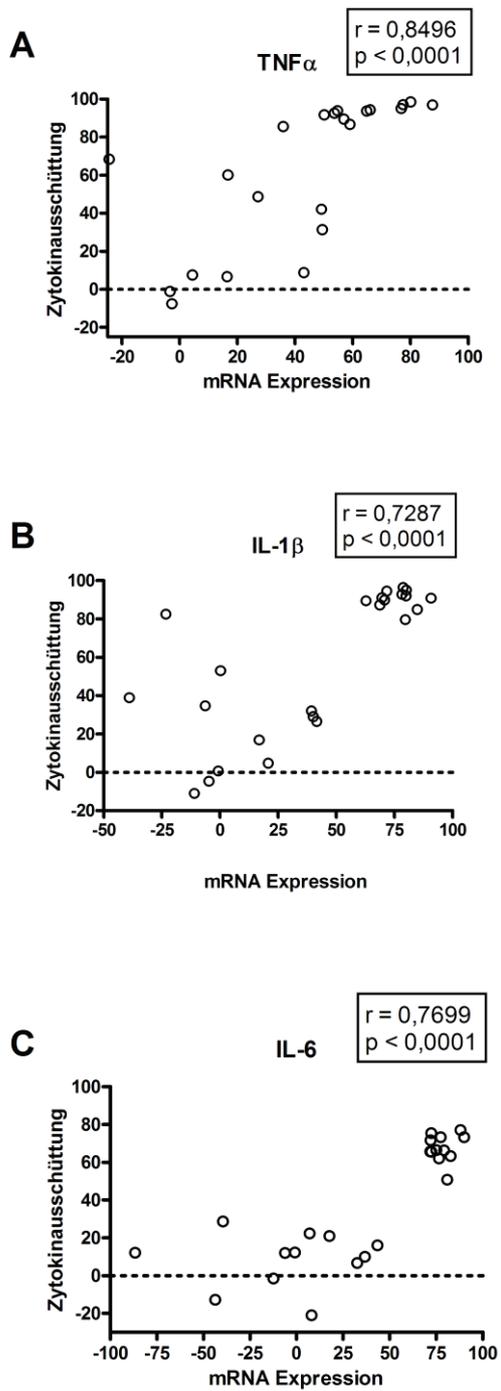


Abbildung 3-20: Korrelation der Hemmwirkung von p38 Inhibitoren auf die Zytokinausschüttung und mRNA Expression nach LPS Stimulation. Für die Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 korrelieren die Hemmwirkungen der p38 Inhibitoren auf Protein- und auf mRNA Ebene stark (> 70%). Es wurde eine Spearman Korrelation für nicht normalverteilte Daten berechnet.

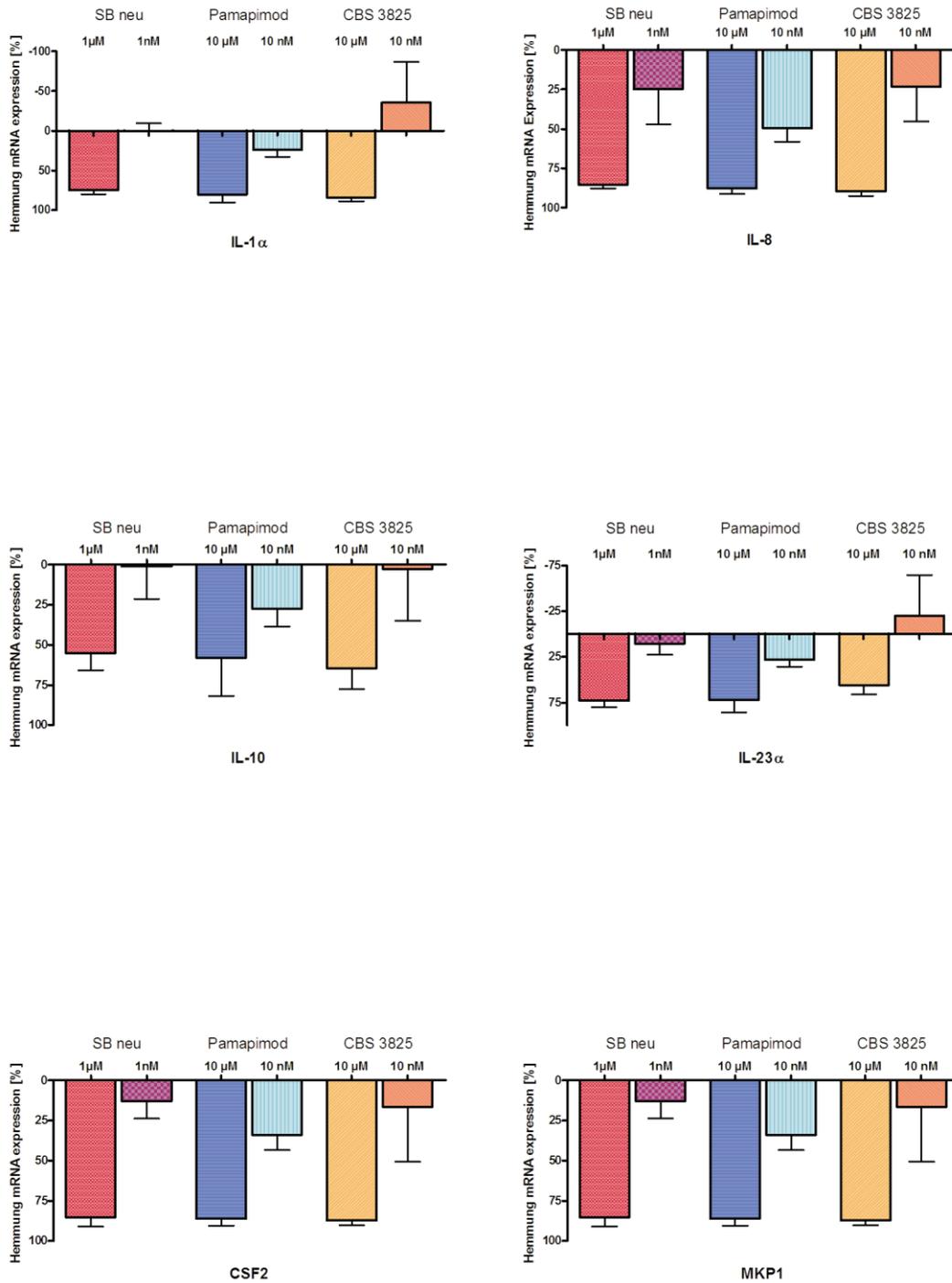


Abbildung 3-21: Effekt von p38 Inhibitoren auf die mRNA Expression in PBMCs nach LPS Stimulation. PBMCs von Gesunden (N=4) wurden mit LPS (1 μ g/ml) und den p38 MAPK Inhibitoren SB neu (1 μ M und 1 nM), Pamapimod (10 μ M und 10 nM) und CBS 3825 (10 μ M und 10 nM) inkubiert. Dargestellt sind die mittlere prozentuale Hemmung der mRNA Expression und der Standardfehler (SEM) von 4 Spendern (N=4) für die Gene IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2 und MKP1.

3.3.2.2 Zytokinausschüttung und Genexpression nach Stimulation mit TNF α

Tabelle 3-7 veranschaulicht die Wirkung der untersuchten Substanzen auf die mit TNF α stimulierte Zytokinausschüttung (IL-1 β und IL-6) bzw. mRNA Expression (IL-1 β und IL-6, sowie IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2, MKP1), wieder dargestellt als mittlere prozentuale Hemmung. Für die mit einem Inhibitor behandelten Proben errechnet sich die Hemmung relativ zur Stimulationskontrolle (0% Hemmung, 100% Stimulation).

Tabelle 3-7: Hemmwirkung verschiedener p38 MAPK Inhibitoren nach TNF α Stimulation. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Zytokinausschüttung (grau) und mRNA Expression von Markergenen nach Behandlung mit p38 Hemmstoffen in verschiedenen Konzentrationen (N=4).

	SB neu		Pamapimod		CBS 3825	
	1 μ M	1 nM	10 μ M	10 nM	10 μ M	10 nM
	Hemmung der Zytokinausschüttung [%]					
IL-1 β	76,8	32,8	74,2	12,1	80,0	19,5
IL-6	83,3	13,8	84,3	24,9	79,7	37,8
	Hemmung der mRNA Expression [%]					
IL-1 β	68,4	1,3	70,5	19,3	66,2	28,5
IL-6	41,9	-56,9	36,2	-30,2	-4,0	-3,6
IL-1 α	74,5	-7,6	79,9	15,3	80,4	21,5
IL-8	77,4	11,5	79,3	25,5	77,0	22,8
IL-10	34,4	-16,8	33,3	-13,7	17,3	13,3
IL-23 α	19,0	-2,4	30,7	13,2	-14,2	6,5
CSF2	35,6	-29,1	38,4	13,4	35,4	5,9
MKP1	65,8	-4,7	72,8	24,1	64,6	30,3

Die Proteindaten und die RNA Expressionsdaten von IL-1 β und IL-6 wurden in Abbildung 3-22 zusammengestellt und entsprechende Korrelationen berechnet. Insgesamt führte die Stimulation mit TNF α zu einer ähnlichen Hemmwirkung auf die Zytokinausschüttung wie die Stimulation mit LPS. Auch hier zeigte sich für die höchste Inhibitorkonzentration eine recht einheitliche Hemmung der Zytokinausschüttung, maximal aber nur 85%. Für IL-1 β spiegelte sich das auch auf RNA Ebene wieder, nicht aber für IL-6. Hier wirkten niedrigere Konzentrationen des Inhibitors stimulierend auf die IL-6 Expression. Sowohl für IL-1 β als

auch für IL-6 fand sich eine signifikante Korrelation für die Hemmwirkung der Inhibitoren zwischen Protein- und RNA-Ebene, die allerdings im Vergleich mit den Daten für die LPS Stimulation deutlich geringer ausfiel.

Während die Inhibitoren die Transkription von IL-1 α , IL-8 und MKP1 sehr gut (in der höchsten Konzentration etwa 70-80%) hemmten, war die Hemmwirkung der p38 Inhibitoren auf IL-23 α , CSF2 und IL-10 auf maximal 30-40% beschränkt (Abbildung 3-23). Vor allem bei SB neu konnte bei einer Konzentration von 1 nM für die Gene IL-6, IL-1 α , IL-10, IL-23 α , CSF2 und MKP1 eine Aktivierung der Expression festgestellt werden. Welche Bedeutung diese Beobachtung hat ist bisher unklar.

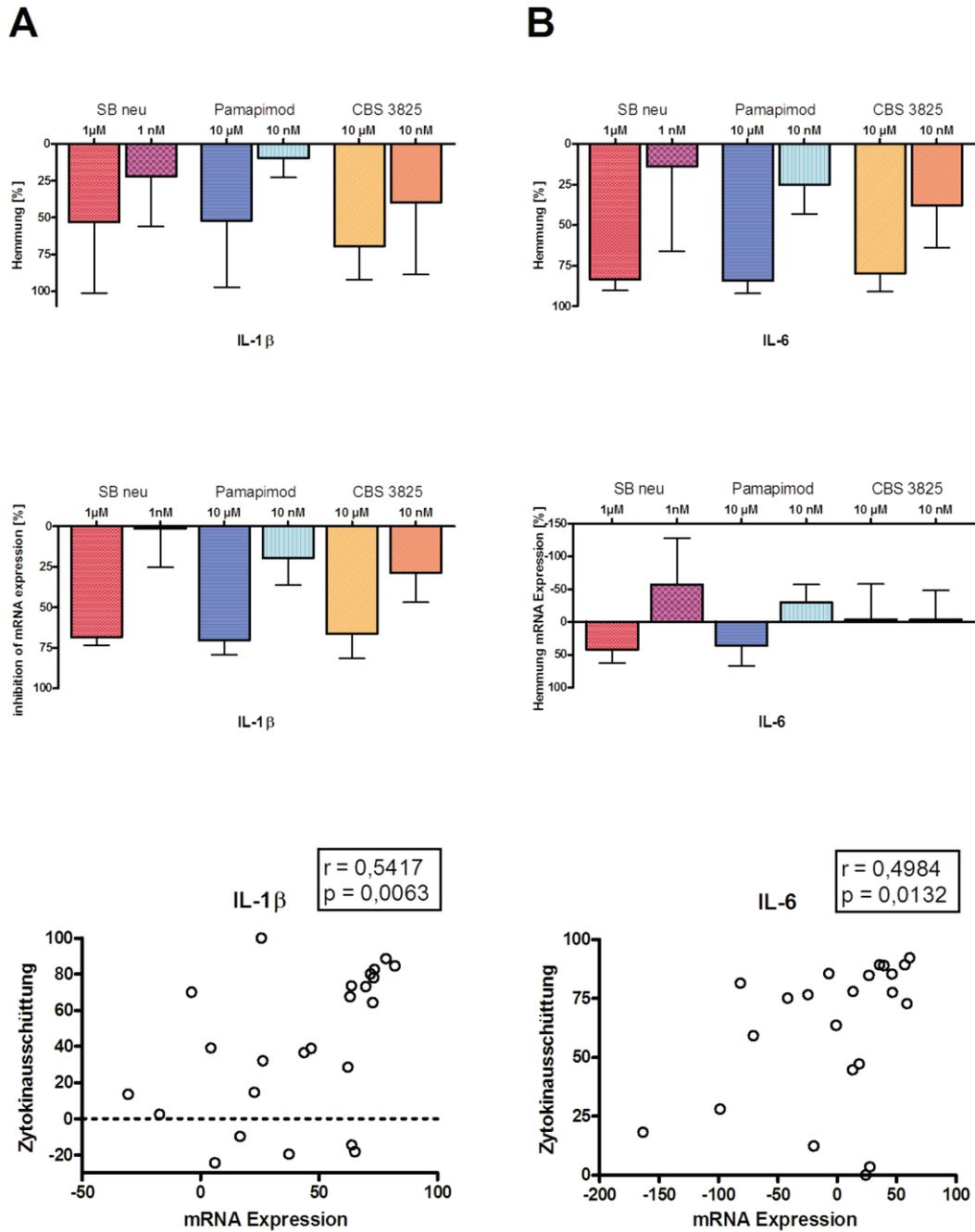


Abbildung 3-22: Hemmwirkung von p38 Inhibitoren auf die Zytokinausschüttung und mRNA Expression nach Stimulation von PBMCs mit TNF α . Dargestellt sind die mittlere prozentuale Hemmung und der Standardfehler (SEM) der Zytokinausschüttung und der mRNA Expression der Zytokine IL-1 β (A) und IL-6 (B) von 4 Spendern (N=4). Außerdem wurde die Korrelation der Hemmung zwischen Protein- und mRNA Daten für nicht normalverteilte Daten nach Spearman berechnet.

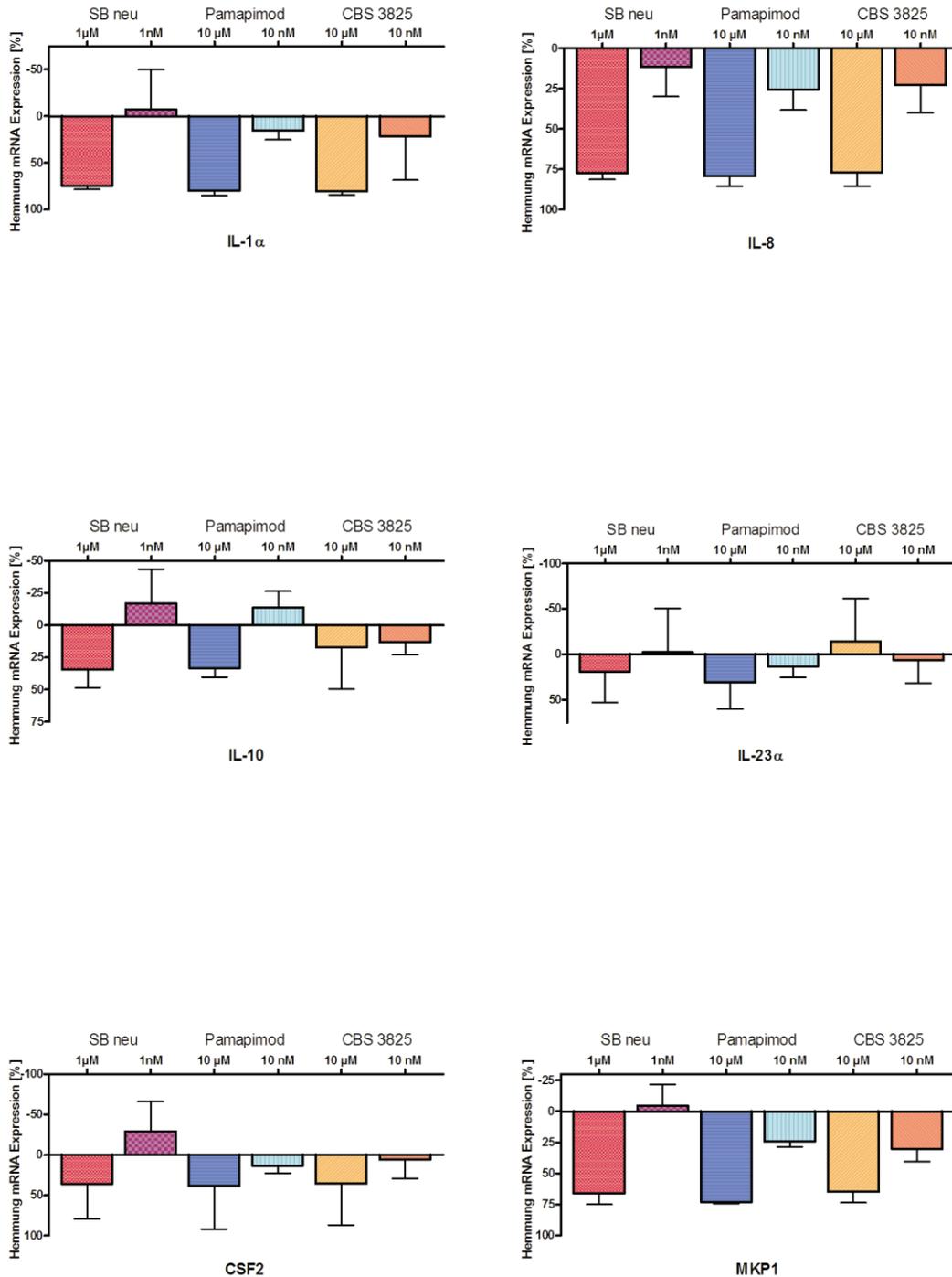


Abbildung 3-23: Effekt von p38 Inhibitoren auf die mRNA Expression in PBMCs nach Stimulation mit TNF α . PBMCs von Gesunden (N=4) wurden mit TNF α (10 ng/ml) und den p38 MAPK Inhibitoren SB neu (1 μ M und 1 nM), Pamapimod (10 μ M und 10 nM) und CBS 3825 (10 μ M und 10 nM) inkubiert. Dargestellt sind die mittlere prozentuale Hemmung der mRNA Expression und der Standardfehler (SEM) von 4 Spendern (N=4) für die Gene IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2 und MKP1.

3.3.2.3 Effekte von p38 MAPK Inhibitoren auf die Expression der p38 MAPK Isoformen

Unter Verwendung von PBMCs gesunder Spender wurde untersucht, ob die p38 MAPK Hemmstoffe einen Einfluss auf die mRNA Expression der verschiedenen p38 MAPK Isoformen haben. Hier konnte lediglich für p38 α eine konzentrationsabhängige Expressionsänderung als Reaktion auf p38 MAPK Inhibitoren gemessen werden (Abbildung 3-24). Bei einer Wirkstoffkonzentration von 1 μ M bzw. 10 μ M wurde die p38 α Expression induziert, während bei niedrigerer Hemmstoffkonzentration, genauso wie bei der Stimulationskontrolle, kein Effekt sichtbar wurde. Diese Regulierung könnte über einen Rückkopplungsmechanismus zustande kommen. Insgesamt bestätigte diese Untersuchung die beschriebene Spezifität der Wirkstoffe für die Isoform p38 α .

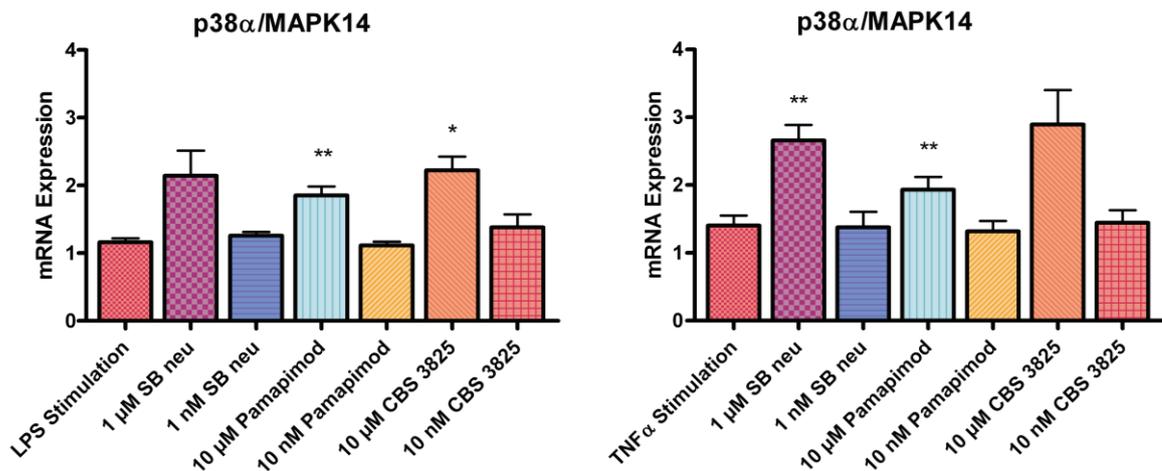


Abbildung 3-24: Effekt von p38 MAPK Hemmstoffen auf die Expression der p38 α Isoform in PBMCs. In LPS und TNF α stimulierten PBMCs wurde eine konzentrationsabhängige Reaktion der p38 α Expression auf p38 Inhibitoren beobachtet. Bei hohen Konzentrationen (1 μ M SB neu, 10 μ M Pamapimod oder CBS 3825) des p38 MAPK Inhibitors wurde die Expression von p38 α induziert, während bei niedrigen Konzentrationen (1 nM SB neu, 10 nM Pamapimod oder CBS 3825) und in der Stimulationskontrolle keine Reaktion messbar war (Mittelwert und SEM von N=4, statistische Signifikanz von $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**)) gegenüber der Stimulationskontrolle).

3.3.2.4 Aktivierung der p38 MAPK Isoformen in stimulierten PBMCs von gesunden Spendern

Nachdem der Einfluss der p38 Hemmstoffe auf die mRNA Expression von p38 α nachgewiesen wurde, wurde auf Proteinebene untersucht, welche Isoformen durch die LPS und TNF α Stimulation aktiviert wurden. Dafür wurde wieder der Phospho MAPK Array verwendet, der inzwischen vom Hersteller mit fünf weiteren Kinasen ausgestattet wurde. Die neue Variante des Arrays wurde mit 300 μ g Protein, gepoolt aus Proteinextrakten der eingeschlossenen vier Spender, angewendet. Abbildung 3-25 bestätigte, dass p38 α die am stärksten aktivierte p38 MAPK Isoform in PBMCs ist.

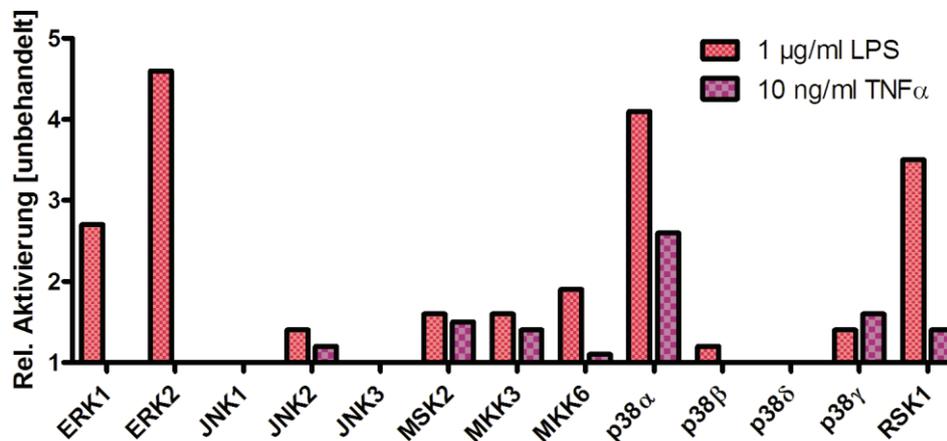


Abbildung 3-25: Relativer Aktivierungsstatus nach Stimulation von PBMCs in Gesunden (N=2). PBMCs wurden für 30 Minuten mit LPS (1 μ g/ml) oder TNF (10 ng/ml) stimuliert, 300 μ g vereinigtes Protein von vier Spendern wurde pro Array aufgetragen. Die relative Quantifizierung erfolgte über die Messung der Pixeldichte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Da die neue Version des angewendeten Phospho MAPK Arrays eine sensitivere Detektion der p38 MAPK Isoformen zuließ, konnte mit diesem Array die Aktivierung von p38 γ und für die LPS Stimulation auch eine schwache p38 β Aktivierung nachgewiesen werden. Durch beide Stimulationen (LPS/TNF α) wurde sowohl die p38 MAPK als auch der JNK Signaltransduktionsweg (besonders JNK2) aktiviert, sowie p38 aktivierende Kinasen (MKK3 und MKK6) und p38 nachgeschaltete Kinasen (MSK2, RSK1 und Akt). Ein Unterschied zwischen den beiden Stimulationen war, dass LPS nicht nur zu einem höheren Signal führte, sondern auch den ERK Signaltransduktionsweg (ERK1 und ERK 2) stark aktivierte. Da sich aber die Zytokinlevel nach TNF α Stimulation am Detektionslimit bewegten (Kapitel 3.3.1.1 und 3.3.1.2) und statistisch nicht signifikant waren, wurde für die folgenden Untersuchungen nur noch eine Stimulation mit LPS durchgeführt.

3.3.3 Effekte von p38 MAPK Inhibitoren in stimulierten PBMCs von Morbus Crohn Patienten

Im letzten Teil der Arbeit wurde das mit PBMCs von gesunden Testpersonen etablierte *in vitro* Testverfahren für p38 MAPK Hemmstoffe auf Proben von Spendern mit der entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn (MC) übertragen. Die Diagnose des Morbus Crohn erfolgte nach klinischen Kriterien, basierend auf endoskopischen und histopathologischen Befunden. Darüberhinaus wurde eine persönliche Befragung der Patienten (Anzahl der Stuhlgänge, Gewichtsverlust, Befinden) durchgeführt, um den Aktivitätsindex für die MC-Erkrankung (CDAI) zu erheben. Dieser Index dient dazu, die Aktivität der Krankheit quantitativ einzuschätzen. Bei einem berechneten CDAI unter 150 wird von einer Remission der Erkrankung gesprochen. Von Patienten mit Morbus Crohn und einer hohen Krankheitsaktivität (Aktivitätsindex CDAI >150) bzw. von Patienten in Remission (Aktivitätsindex CDAI <150) wurden Vollblut und Kolonbiopsien prospektiv asserviert. Aus dem Vollblut wurden unmittelbar PBMCs isoliert und mit LPS (1 µg/ml) stimuliert. Für 1 µM des p38 MAPK Inhibitors SB neu wurde die Hemmwirkung in den PBMCs der Patienten untersucht. Fast alle Patienten standen unter Medikation (Kortikosteroide, Immunsuppressiva, Biologika), sodass eine grundsätzliche Frage zu beantworten war, inwieweit PBMCs überhaupt auf eine Stimulation reagiert. Bei den Kolonbiopsien wurde entzündetes und nicht entzündetes Kolongewebe der gleichen Patientengruppe einer Expressionsanalyse unterzogen und die in der Entzündung aktivierten p38 MAPK Isoformen untersucht.

3.3.3.1 Zytokinausschüttung und Genexpression nach Inkubation von PBMCs mit `SB neu´ und Stimulation mit LPS

In Tabelle 3-8 wurde die Hemmwirkung von 1 µM SB neu auf die LPS stimulierte Zytokinausschüttung (TNF α , IL-1 β und IL-6) bzw. mRNA Expression (TNF α , IL-1 β und IL-6, sowie IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2, MKP1) dargestellt. Die mittlere prozentuale Hemmung bezieht sich auf die stimulierte Positivkontrolle (0% Hemmung, 100% Stimulation). Die Morbus Crohn Patienten wurden nach Krankheitsaktivität (CDAI >150 und CDAI <150) stratifiziert. Zusätzlich wurde eine Patientengruppe (`Nicht Morbus Crohn´), bei denen kein Morbus Crohn diagnostiziert aber eine Darmspiegelung durchgeführt wurde, untersucht.

Als weitere Kontrollgruppe wurden die Daten von gesunden Testpersonen (Gesunde) aus Abschnitt 3.3.2 hinzugefügt.

Tabelle 3-8: Effekt des p38 Inhibitors SB neu in LPS stimulierten PBMCs von Morbus Crohn Patienten. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Zytokinausschüttung (grau) und mRNA Expression von entzündungsrelevanten Genen nach Behandlung mit 1 µM SB neu. Als Vergleich diente die prozentuale Hemmung bei gesunden Testpersonen (Gesunde), sowie bei `Nicht Morbus Crohn` Patienten.

	Morbus Crohn >150	Morbus Crohn <150	Gesunde	Nicht Morbus Crohn
1 µM SB neu	N=4	N=3	N=4	N=7
	Hemmung der Zytokinausschüttung [%]			
TNFα	89,0	87,7	89,8	87,7
IL-1β	67,0	43,5	87,6	66,4
IL-6	51,0	53,0	61,2	51,0
	Hemmung der mRNA Expression [%]			
TNFα	19,2	12,9	49,1	-136,7
IL-1β	75,3	69,8	65,5	25,1
IL-6	88,8	82,5	77,3	66,0
IL-1α	81,1	77,7	74,9	40,7
IL-8	89,5	85,0	85,5	64,4
IL-10	81,2	77,8	55,0	68,5
IL-23α	75,2	75,3	72,9	34,2
CSF2	80,2	82,0	85,3	47,1
MKP1	79,7	73,7	74,9	40,5

Für die Zytokine TNFα (A), IL-1β (B) und IL-6 (C) wurden die Proteindaten den RNA Expressionsdaten in Abbildung 3-26 gegenüber gestellt. Hier wurden alle Morbus Crohn Patienten (N=7) als eine Gruppe zusammengefasst, die Patienten mit hohem Aktivitätsindex (N=4) allerdings rot hervorgehoben. Während die TNFα Ausschüttung in allen untersuchten Gruppen durch den Inhibitor ähnlich gehemmt wurde, zeigten sich bei der TNFα mRNA Expression deutliche Unterschiede. Bei Morbus Crohn Patienten hatte der Inhibitor auf RNA Ebene fast keine Wirkung, während bei Gesunden ungefähr 50% Hemmung messbar war. In der `Nicht Morbus Crohn` Gruppe stimulierte der Hemmstoff hingegen die TNFα Expression sehr stark (137%). Bezüglich IL-1β hemmte SB neu die mRNA Expression in allen Gruppen ähnlich, abgesehen von den Schwankungen in der `Nicht Morbus Crohn` Gruppe. Die IL-1β Ausschüttung wurde in Morbus Crohn Patienten von dem

Inhibitor deutlich schwächer gehemmt (44 - 67%) als bei gesunden Testpersonen (88%). Die Wirkung des Inhibitors auf die Freisetzung von IL-6 war in Morbus Crohn Patienten viel variabler als in gesunden Personen. Dies zeigte sich auch in der mittleren Hemmung von 50% gegenüber 60% Hemmung bei gesunden Personen. Die Hemmung der IL-6 mRNA Expression war hingegen in PBMCs von Morbus Crohn Patienten um ca. 10% höher als bei gesunden Spendern.

Abbildung 3-27 illustriert die Hemmung der mRNA Expression durch SB neu in PBMCs von Morbus Crohn Patienten für die Markergene IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2 und MKP1. Vor allem die `Nicht Morbus Crohn` Kontrollgruppe fiel hier durch eine sehr starke Variabilität auf. Alle anderen Gruppen reagierten ähnlich auf den Wirkstoff. Lediglich die IL-10 Expression wurde in Morbus Crohn Patienten (~80%) durch den Wirkstoff signifikant stärker gehemmt als in Gesunden (55%).

Insgesamt hatte der p38 MAPK Inhibitor SB neu den gleichen Effekt auf *in vitro* analysiertes Probenmaterial von Morbus Crohn Patienten mit hohem und niedrigem Aktivitätsindex. Besonders auffällig war, wie unzuverlässig der Inhibitor die IL-1 β und IL-6 Freisetzung in PBMCs von Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern hemmte. In dem untersuchten Kollektiv konnten für die IL-1 β Ausschüttung ($p = 0,024$), die IL-6 Ausschüttung ($p = 0,6480$) und die IL-10 Expression ($p = 0,006$) signifikante und nicht signifikante Unterschiede zwischen Morbus Crohn Patienten und gesunden Testpersonen festgestellt werden. Insbesondere stach auch die `Nicht Morbus Crohn` Gruppe hervor, die eine starke Variabilität besaß. Dass diese Gruppe Patienten beinhaltet, die teilweise ebenfalls Entzündungen aufweisen, könnte diese Variabilität erklären (siehe Tabelle 6-3 im Anhang).

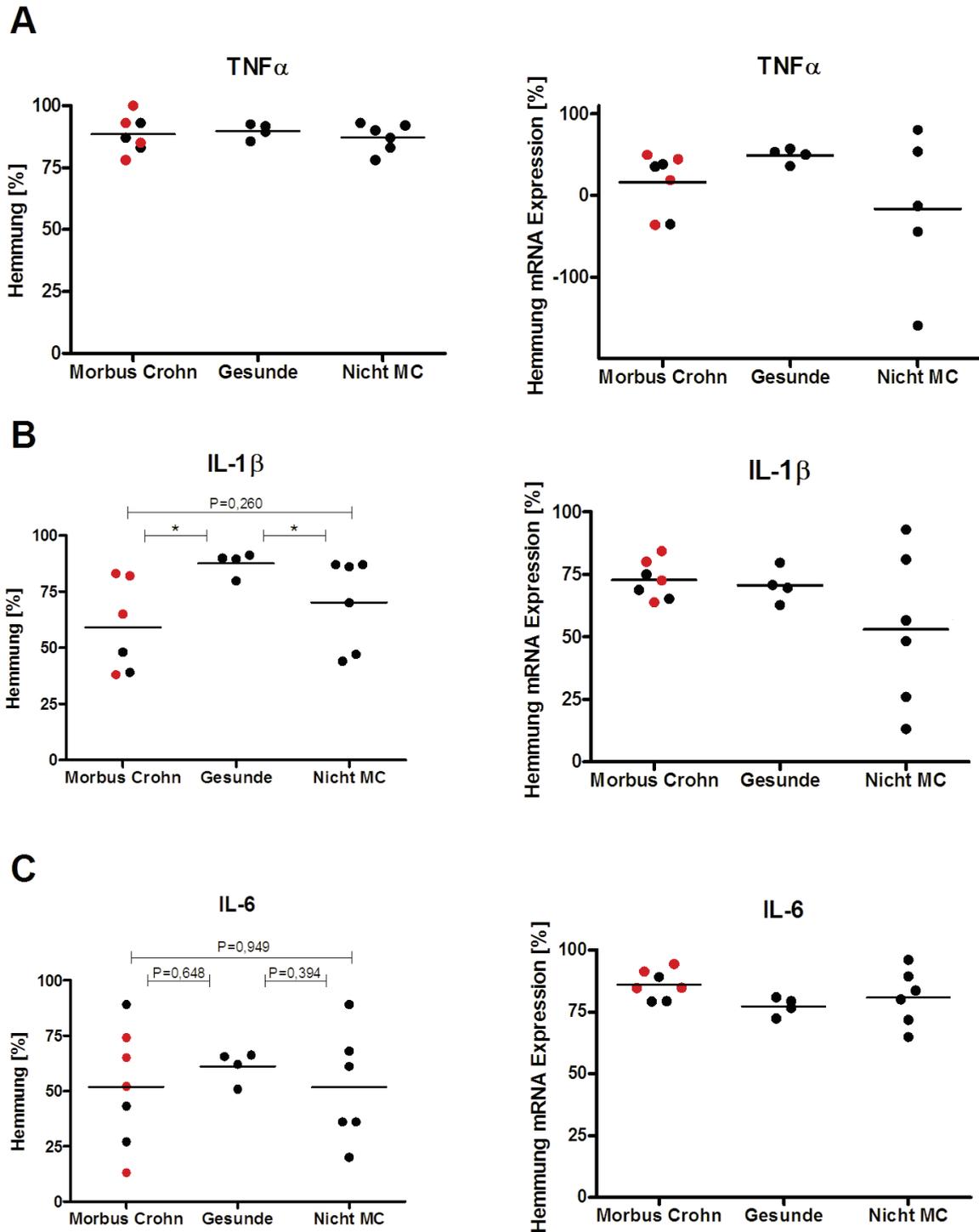


Abbildung 3-26: Effekt des p38 MAPK Inhibitors SB neu in PBMCs von Morbus Crohn Patienten. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Freisetzung (links) bzw. mRNA Expression (rechts) der Zytokine TNF α (A), IL-1 β (B) und IL-6 (C). Zur Gruppe Morbus Crohn gehören Patienten mit hohem Aktivitätsindex (rot, N=4) und Patienten in Remission (schwarz, N=3). Als Kontrollgruppen dienten 'Nicht Morbus Crohn' Patienten (Nicht MC, N=7) und gesunde Testpersonen (Gesunde, N=4). Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden auf statistische Signifikanz von $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**) untersucht (Mann-Whitney-Test).

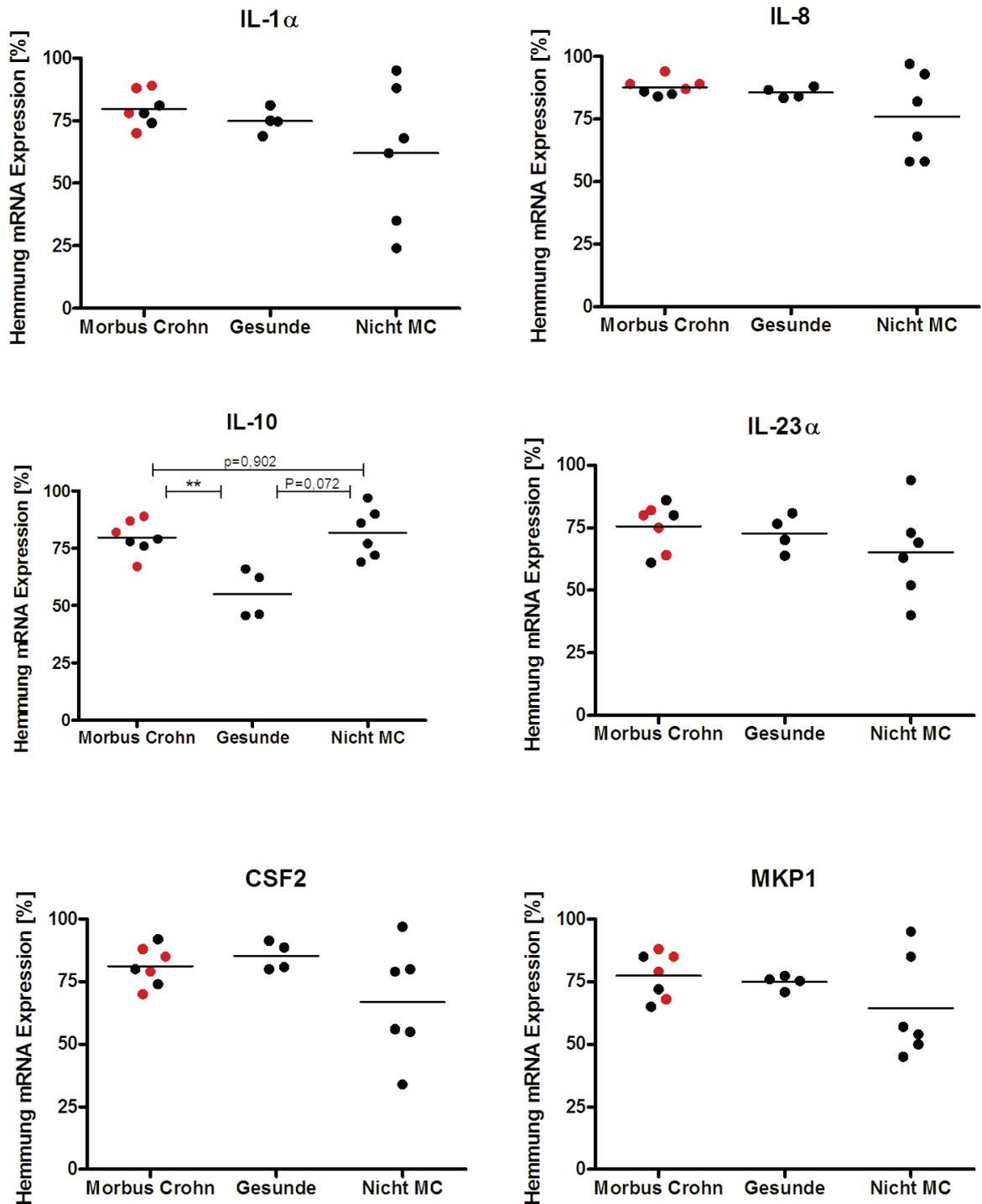


Abbildung 3-27: Effekt des p38 MAPK Inhibitors SB neu auf die mRNA Expression von Markergenen in PBMCs von Morbus Crohn Patienten. Dargestellt ist die Hemmung der mRNA Expression der Gene IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2 und MKP1. Folgende Gruppen wurden verglichen: Morbus Crohn Patienten mit hohem Aktivitätsindex (rot, N=4) und Patienten in Remission (schwarz, N=3), ebenso wie 'Nicht Morbus Crohn' Patienten (Nicht MC, N=7) und gesunde Testpersonen (Gesunde, N=4). Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden auf statistische Signifikanz von $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**) untersucht (Mann-Whitney-Test).

3.3.3.2 Untersuchung der p38 MAPK Isoformen nach Inkubation von PBMCs mit 'SB neu' und Stimulation mit LPS

Neben den entzündungsrelevanten Genen wurde auch die mRNA Expression der p38 MAPK Isoformen untersucht. In allen Gruppen wurden in PBMCs nur die p38 α MAPK stark exprimiert (Abbildung 3-28, A).

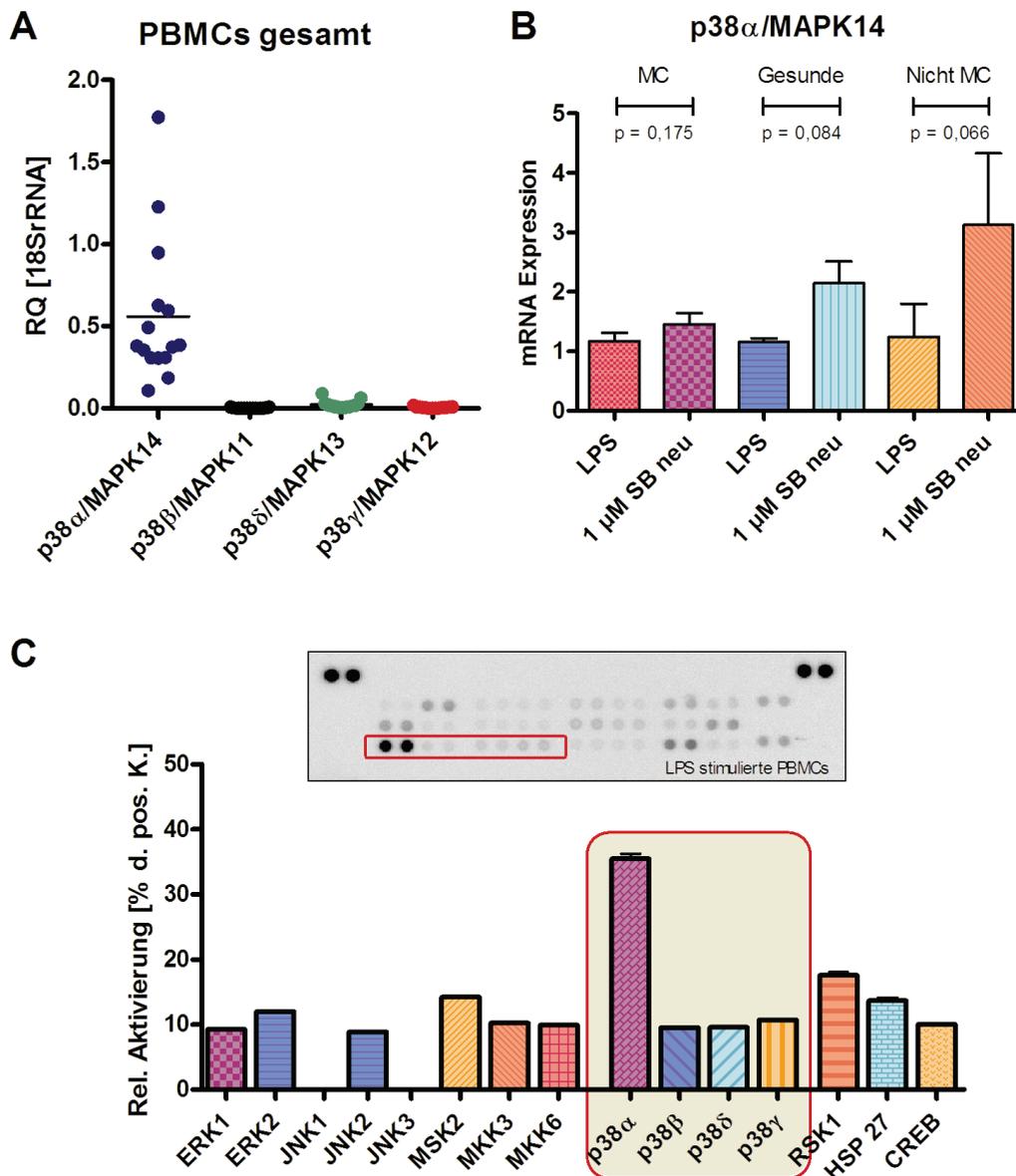


Abbildung 3-28: Expression der p38 MAPK Isoformen in Morbus Crohn Patienten und Kontrollen. (A) In PBMCs wurde in allen untersuchten Gruppen hauptsächlich die Isoform p38 α exprimiert. (B) In PBMCs von Morbus Crohn Patienten hatte der Inhibitor SB neu auf die mRNA Expression von p38 α MAPK keinen signifikanten Effekt (Mittelwert und SEM, Morbus Crohn und 'Nicht MC' N=7, Gesunde N=4, Effekt signifikant bei $p < 0,05$ nach t-Test). (C) Für die 'Nicht MC' Gruppe konnte mit gepooltem Proteinlysate von drei Spendern (im Duplikat) nachgewiesen werden, dass in PBMCs vorwiegend p38 α aktiviert wird.

Der Effekt des Inhibitors SB neu auf die Expression der p38 α MAPK wurde in Abbildung 3-28 (B) detailliert veranschaulicht. Für alle drei untersuchten Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den stimulierten und den mit SB neu behandelten Proben errechnet. Das Balkendiagramm zeigt jedoch, dass in den Kontrollgruppen der Inhibitor die p38 α Expression stimulierte, während bei den Morbus Crohn Patienten nahezu kein Effekt erkennbar war.

In Abschnitt 3.3.2.4 wurde für PBMCs von gesunden Testpersonen gezeigt, dass die MAPK Isoform p38 α am stärksten phosphoryliert wird. Die Isoformen p38 β und p38 γ wurden ebenfalls leicht aktiviert. Dieses Ergebnis konnte für die 'Nicht Morbus Crohn' Gruppe reproduziert werden (Abbildung 3-28, C). Für die Morbus Crohn Patienten konnte mit dem Phospho-MAPK Array keine aktivierten MAPK in PBMCs nachgewiesen werden. In den lysierten PBMCs wurde aber mittels Bicinchoninsäure (BCA) -Methode ausreichend Gesamtprotein nachgewiesen. Auch in einem SDS-Polyacrylamidgel konnte mit dem Farbstoff Coomassie in den Proben Protein nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass im Gesamtprotein der Patientenproben anteilig weniger p38 MAPK Protein vorhanden ist und diese Menge für den Nachweis mittels des Phospho-MAPK Arrays nicht ausreicht.

3.3.4 Untersuchungen in Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten

Die von Morbus Crohn Patienten gesammelten Kolonbiopsien aus entzündetem und nicht entzündetem Gewebe wurden analysiert, um die Relevanz des entwickelten *in vitro* Testverfahrens mit PBMCs für eine Entzündung im Darm zu prüfen. Bei der Auswertung wurde entzündetes Gewebe auf das jeweilige nicht entzündete Gewebe des gleichen Spenders relativ quantifiziert.

3.3.4.1 Expressionsanalyse mit dem *Taqman Custom Array*

Die aus den Biopsien isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit dem gleichen *Taqman Custom Array* analysiert, wie es in Kapitel 3.3.1.2 für stimulierte PBMCs beschrieben wurde.

Abbildung 3-29 gibt das Expressionsmuster in entzündetem Dickdarmgewebe von Morbus Crohn Patienten mit hoher Entzündungsaktivität (CDAI >150) wieder. Hier wurden einige wenige Gene etwa 50- bis 100-fach aktiviert. Dagegen waren in entzündetem Dickdarmgewebe von Patienten mit geringer Krankheitsaktivität (CDAI <150) zahlreiche Gene etwa 10-fach stärker reguliert als in nicht entzündetem Gewebe (Abbildung 3-30).

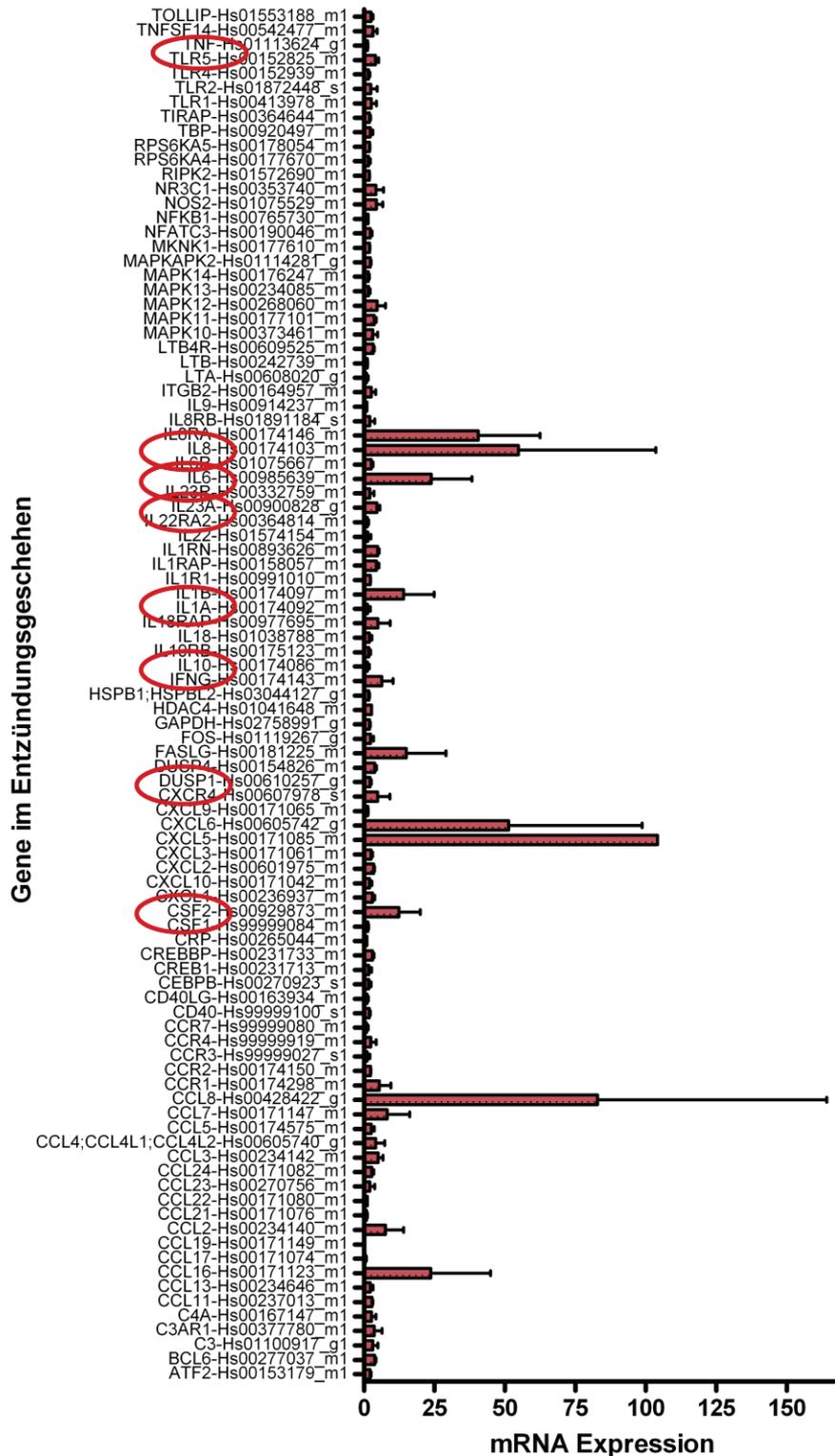


Abbildung 3-29: Relative Expression von entzündungsrelevanten Genen in Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten mit einem hohen Aktivitätsindex (CDAI >150, N=2). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM der mRNA Expression für zwei Morbus Crohn Patienten bezogen auf nicht entzündetes Gewebe. Die in PBMCs untersuchten Gene wurden mit rot markiert.

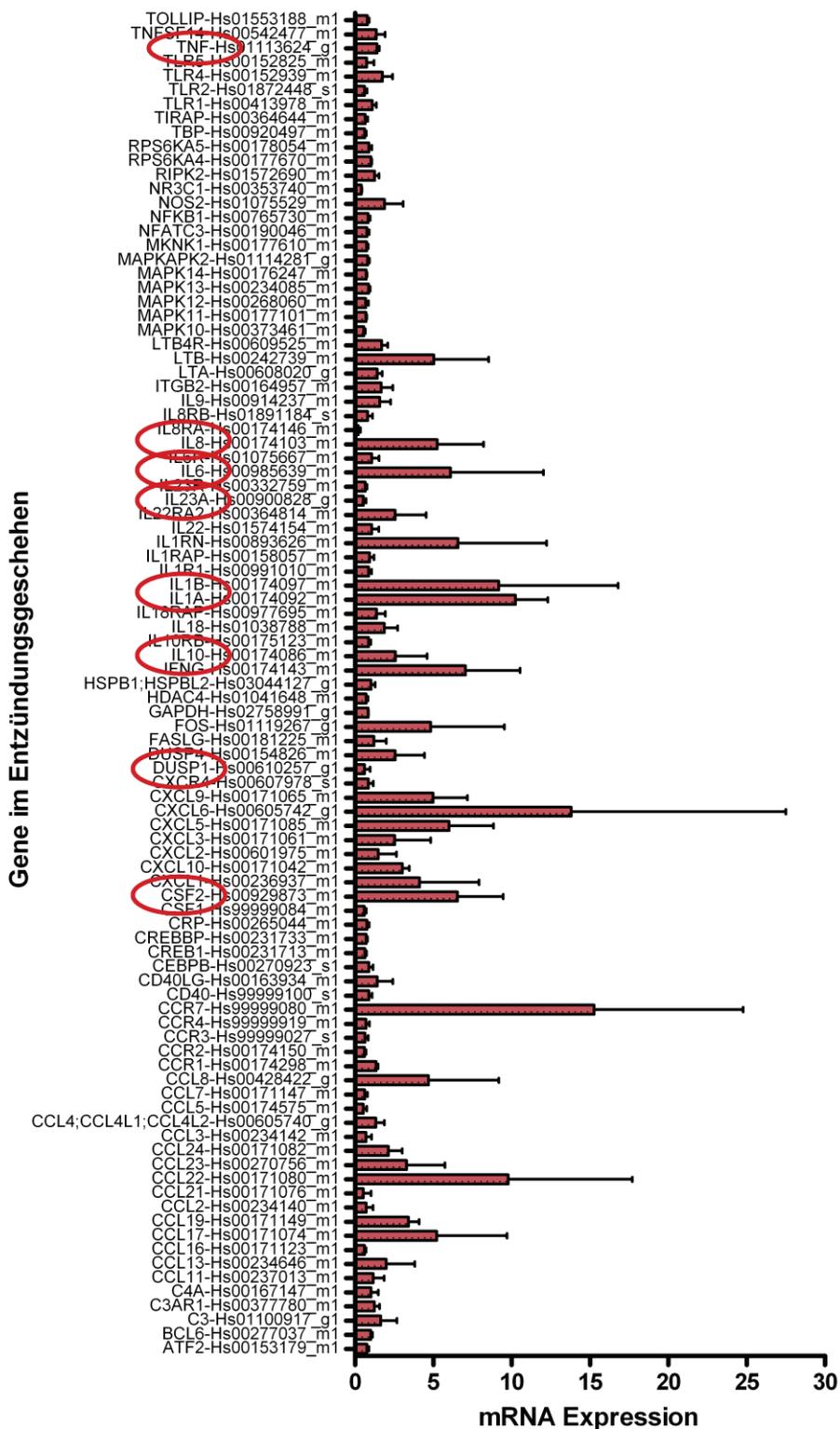


Abbildung 3-30: Relative Expression von entzündungsrelevanten Genen in Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten mit einer niedrigen Entzündungsaktivität (CDAI <150, N=3). Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM der mRNA Expression für drei Morbus Crohn Patienten bezogen auf nicht entzündetes Gewebe. Die in PBMCs untersuchten Gene wurden mit rot markiert.

In Tabelle 3-9 sind die am auffälligsten regulierten Gene in entzündetem Dickdarmgewebe der beiden Morbus Crohn Patientengruppen aufgelistet. Wie auch schon in den Abbildung 3-29 und Abbildung 3-30 (rot markiert), sind die für die Untersuchung von PBMCs definierten Gene zum Vergleich grau hervorgehoben.

Tabelle 3-9: Regulierte Gene im entzündeten Dickdarmgewebe von Morbus Crohn Patienten. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM der mRNA Expression von Patienten mit hoher Entzündungsaktivität (CDAI >150, N=2) und Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (CDAI <150, N=3). Die relative mRNA Expression in entzündetem Gewebe wurde bezogen auf das jeweilige nicht entzündete Gewebe des gleichen Spenders.

Regulierte Gene mRNA Expression (x-fach)	CDAI >150 (N=2)		CDAI <150 (N=3)	
	MW	SEM	MW	SEM
ATF2-Hs00153179_m1	2,2	0,3	0,8	0,2
BCL6-Hs00277037_m1	3,9	0,3	1,0	0,2
C3-Hs01100917_g1	3,1	1,9	1,6	1,5
C3AR1-Hs00377780_m1	3,7	2,7	1,2	0,5
C4A-Hs00167147_m1	2,7	1,5	1,0	0,7
CCL11-Hs00237013_m1	2,9	0,2	1,2	1,0
CCL13-Hs00234646_m1	2,2	0,9	2,0	2,6
CCL16-Hs00171123_m1	23,7	21,3	0,6	0,1
CCL17-Hs00171074_m1	0,5	0,4	5,2	6,3
CCL19-Hs00171149_m1	0,2	0,1	3,4	0,9
CCL2-Hs00234140_m1	7,6	6,5	0,7	0,6
CCL22-Hs00171080_m1	1,2	0,0	9,8	11,2
CCL23-Hs00270756_m1	2,0	1,8	3,3	3,5
CCL24-Hs00171082_m1	2,8	0,7	2,1	1,2
CCL3-Hs00234142_m1	5,0	1,8	0,7	0,5
CCL4;CCL4L1;CCL4L2-Hs00605740_g1	4,1	3,2	1,3	0,8
CCL5-Hs00174575_m1	2,6	1,0	0,5	0,3
CCL7-Hs00171147_m1	8,3	7,9	0,6	0,2
CCL8-Hs00428422_g1	82,9	81,2	4,7	6,4
CCR1-Hs00174298_m1	5,5	4,0	1,4	0,2
CCR2-Hs00174150_m1	2,3	0,1	0,6	0,1
CCR4-Hs99999919_m1	2,4	1,9	0,7	0,3
CCR7-Hs999999080_m1	0,9	0,5	15,3	13,4
CSF2-Hs00929873_m1	12,4	7,5	6,5	4,1

Experimente und Ergebnisse

CXCL1-Hs00236937_m1	2,9	0,9	4,1	5,4
CXCL10-Hs00171042_m1	1,9	0,9	3,1	0,6
CXCL2-Hs00601975_m1	3,5	0,3	1,5	1,6
CXCL3-Hs00171061_m1	2,5	0,5	2,5	3,2
CXCL6-Hs00605742_g1	51,3	47,3	13,8	19,4
CXCL9-Hs00171065_m1	1,4	0,1	5,0	3,1
CXCR4-Hs00607978_s1	4,9	4,4	0,9	0,5
DUSP1-Hs00610257_g1	2,1	0,5	0,6	0,5
DUSP4-Hs00154826_m1	3,8	0,6	2,6	2,6
FASLG-Hs00181225_m1	15,0	14,1	1,2	1,1
FOS-Hs01119267_g1	2,3	1,0	4,8	6,7
IFNG-Hs00174143_m1	6,3	4,1	7,1	4,9
IL10-Hs00174086_m1	1,2	0,6	2,6	2,9
IL1A-Hs00174092_m1	1,3	0,9	10,2	2,9
IL1B-Hs00174097_m1	14,0	10,8	9,2	10,8
IL1RN-Hs00893626_m1	4,9	0,5	6,6	8,0
IL23A-Hs00900828_g1	4,6	1,0	0,5	0,2
IL23R-Hs00332759_m1	2,0	1,5	0,7	0,2
IL6-Hs00985639_m1	23,9	14,4	6,1	8,4
IL8-Hs00174103_m1	54,8	48,7	5,3	4,2
IL8RA-Hs00174146_m1	40,6	21,9	0,2	0,2
IL8RB-Hs01891184_s1	2,1	1,8	0,8	0,4
ITGB2-Hs00164957_m1	2,6	1,6	1,7	1,0
LTB-Hs00242739_m1	1,2	0,1	5,0	4,9
LTB4R-Hs00609525_m1	3,3	0,4	1,7	0,6
MAPK10-Hs00373461_m1	3,0	1,8	0,6	0,1
MAPK11-Hs00177101_m1	3,7	0,6	0,7	0,1
MAPK12-Hs00268060_m1	4,6	2,9	0,7	0,2
MAPK13-Hs00234085_m1	1,7	0,5	0,9	0,1
MAPK14-Hs00176247_m1	1,6	0,2	0,7	0,1
MAPKAPK2-Hs01114281_g1	2,3	0,2	0,8	0,2
MKMK1-Hs00177610_m1	2,0	0,0	0,8	0,1
NOS2-Hs01075529_m1	4,4	2,3	1,9	1,7
TLR1-Hs00413978_m1	2,6	1,8	1,1	0,4

TLR2-Hs01872448_s1	2,4	2,3	0,6	0,2
TLR4-Hs00152939_m1	1,7	0,4	1,8	0,9
TLR5-Hs00152825_m1	4,0	1,1	0,8	0,6
TNF-Hs01113624_g1	1,3	0,1	1,4	0,2

Zu den in entzündetem (CDAI >150) Kolongewebe am stärksten aktivierten Genen zählten IL-8 (55-fach aktiviert), IL-6 (24-fach aktiviert), IL-1 β (14-fach aktiviert) und CSF2 (12-fach aktiviert). IL-8 wurde dabei als eindeutiger Marker für eine Entzündung im Darm identifiziert. Die mit dem CDAI errechnete Entzündungsaktivität war proportional zur gemessenen IL-8 Expression. Obwohl auch IL-6 ein Markergen für Entzündungen ist, korrelierte die mRNA Expression weniger gut mit dem Grad der Entzündung. Neben den bereits genannten Genen wurden in entzündetem Dickdarmgewebe auch IL-23 α (5-fach) und IL-1 α (1,3-fach) aktiviert. Aufgrund der Ergebnisse aus PBMCs, wo die Stimulation mit LPS die Expression von IL-23 α (76-fach) und IL-1 α (490-fach) sehr stark induzierte (Tabelle 3-5), wurde für diese beiden Gene eine vergleichbare bzw. deutlich stärkere Regulation in Darmgewebe erwartet. Weiter wurden TNF α , IL-10 und DUSP1/MKP1 in entzündetem Dickdarmgewebe kaum aktiviert. Besonders für TNF α war das überraschend, da in fast allen *in vitro* Testverfahren zur Bewertung von Substanzen, die die Zytokinausschüttung hemmen, TNF α als wichtigster Entzündungsmarker ausgewertet wird. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in PBMCs identifizierten Gene weitgehend mit den in entzündetem Dickdarmgewebe aktivierten Genen übereinstimmen, allerdings das Ausmaß im Einzelfall unterschiedlich ist.

3.3.4.2 p38 MAPK Isoformen in Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten

Der eingesetzte *Taqman Custom Array* beinhaltet auch die Gene für die p38 MAPK Isoformen (siehe MAPK11-14). Die Auswertung der Expressionsdaten zeigte, dass die Isoformen im Entzündungsgeschehen auf Transkriptionsebene kaum reguliert werden (Tabelle 3-9). Dies ist im Einklang mit den Beobachtungen in PBMCs, wo nur der p38 MAPK Inhibitor eine Reaktion hervorrief nicht aber die Stimulationskontrolle (3.3.2.3).

In Abbildung 3-31 wurden die relativen Expressionslevel der p38 MAPK Isoformen in entzündetem und nicht entzündetem Kolongewebe im Verhältnis zum Haushaltsgen 18SrRNA graphisch dargestellt. Deutlich zu sehen war, dass sowohl in entzündetem als auch in nicht entzündetem Darmgewebe p38 α und p38 δ exprimiert werden, p38 δ sogar am stärksten. Im Gegensatz dazu wurde bei der Expressionsanalyse von gesundem Darmgewebe (Kapitel 3.3.1.3) p38 α als die dominante p38 MAPK Isoform identifiziert.

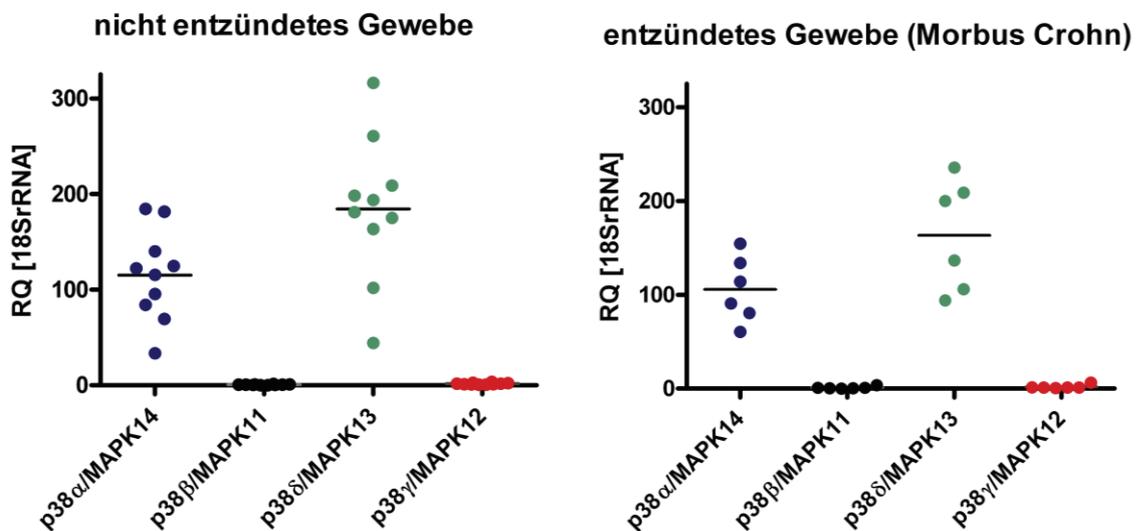


Abbildung 3-31: Relative mRNA Expression der p38 MAPK Isoformen in entzündetem (N=6) und nicht entzündetem (N=10) Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten, bezogen auf das Haushaltsgen 18SrRNA.

Die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von MAP Kinasen, sowie vor- und nachgeschalteter Kinasen oder Proteine wurde in entzündetem Kolongewebe von drei Morbus Crohn Patienten mit dem MAPK Phospho Array untersucht. Abbildung 3-32 zeigt, dass neben den p38 MAP Kinasen auch JNK 2, ERK 1 und ERK 2 aktiviert sind. Die am stärksten aktivierte p38

MAPK Isoform war p38 δ , neben p38 α und p38 γ . Diese Beobachtung bestätigte die Expressionsdaten (Abbildung 3-31). Allerdings wurde p38 δ bisher nicht im Zusammenhang mit Entzündungen oder bei der Regulation der Zytokinsynthese beschrieben. Dieses Ergebnis zeigt aber, dass p38 δ zumindest eine wichtige Rolle im Darm spielt und weist darauf hin, dass bei einer Entzündung im Darm neben p38 α auch die anderen Isoformen aktiviert werden können.

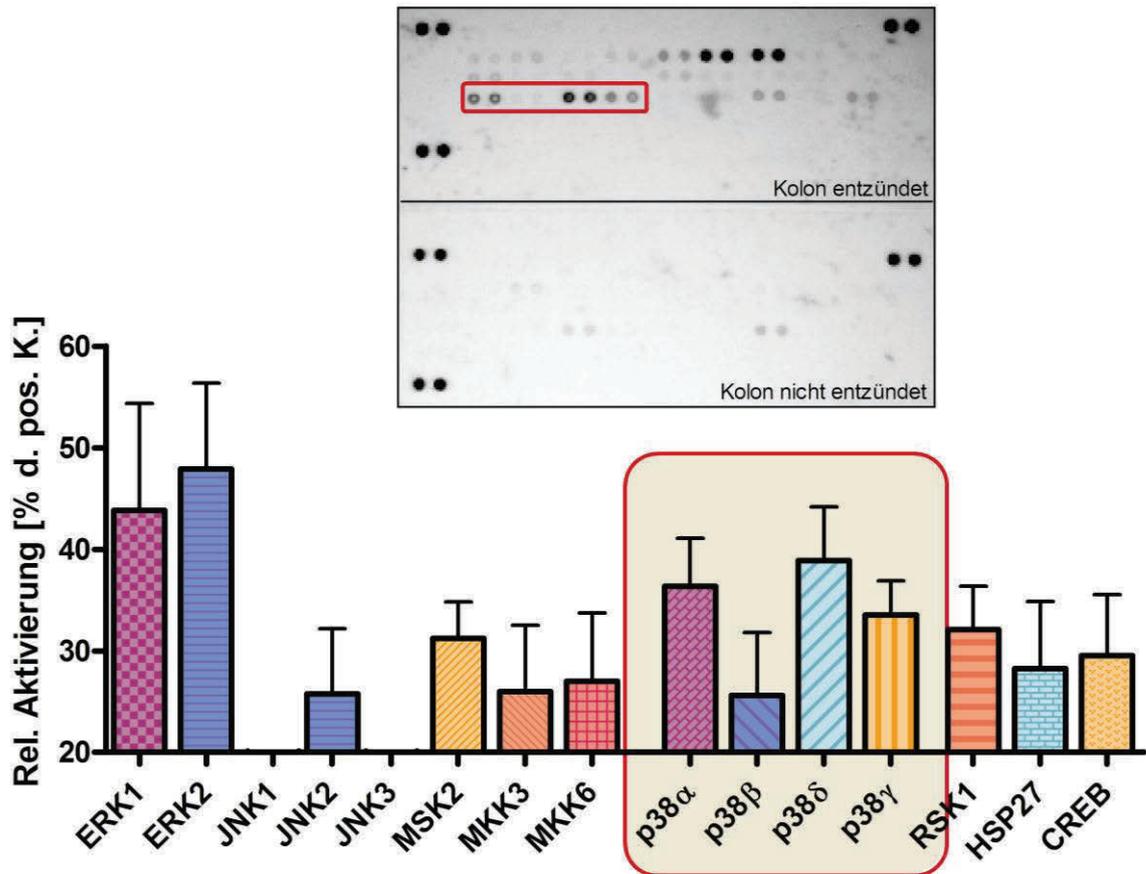


Abbildung 3-32: Aktivierte Kinasen in entzündetem Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten (N=3). Dargestellt ist die relative Aktivierung anhand der Phosphorylierung in entzündetem Gewebe von drei Morbus Crohn Patienten mit starker Entzündungsaktivität (CDAI >150). Die p38 MAPK Isoformen (Duplikate) sind rot umrandet. Die Quantifizierung der Proben erfolgte über die Messung der Signalstärke über die Pixeldichte relativ zur Positivkontrolle.

4 DISKUSSION

Den p38 MAPK Inhibitoren wurde seit ihrer Entdeckung vor 15 Jahren ein großes Potenzial für die Therapie von chronischen Entzündungskrankheiten zugeschrieben. Seither wurden über zwanzig p38 MAPK Inhibitoren mit unterschiedlichen chemischen Strukturen, Bindemechanismen und Bindespezifitäten in klinischen Studien untersucht. Bis heute erreichte aber kein Inhibitor die Marktreife. Dass p38 MAPK Inhibitoren nach wie vor als potentielle therapeutische Targets angesehen werden, zeigen die momentan durchgeführten klinischen Studien, die auf der internationalen Webseite des amerikanischen Gesundheitsinstituts (NIH) aufgelistet werden (www.clinicaltrials.gov). Die Firma Pfizer untersucht beispielsweise einen inhalativ zu verabreichenden p38 MAPK Inhibitor in COPD Patienten in der klinischen Phase II. Außerdem weisen weitere Veröffentlichungen auf das Potenzial von p38 MAPK Inhibitoren in der Behandlung von koronaren Herzkrankheiten, neuropathischem Schmerz oder Depressionen hin (Sarav-Blat, 2010; Anand, 2011; Akbarian, 2010; Duric, 2010).

Auch bei Morbus Crohn, einer entzündlichen Darmerkrankung, wurde eine große klinische Studie durchgeführt, die im Ergebnis leider keine therapeutische Wirkung für p38 MAPK Inhibitoren zeigen konnte (Schreiber, 2006). Um die gewünschte Wirkung zu erzielen, musste die Dosis erhöht werden, was aber wiederum zu unerwünschten Nebenwirkungen führte. Die Gründe für die fehlende Wirksamkeit der bislang getesteten p38 MAPK Inhibitoren sind rein spekulativ und bislang nicht gut verstanden. Für die Weiterentwicklung von p38 MAPK Inhibitoren ist es aber von grundlegender Bedeutung ursächliche Faktoren zu identifizieren (Genovese, 2009; Sweeney, 2009; Hammakar, 2010).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollen deswegen dazu beitragen, systematisch Daten zur Wirkung von p38 MAPK Inhibitoren in verschiedenen Spezies und bei Patienten mit einer entzündlichen Erkrankung zu generieren.

4.1 *In vitro* Modelle für p38 MAPK Inhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der antientzündliche Effekt von p38 MAPK Inhibitoren mit verschiedenen, dafür speziell entwickelten und optimierten *in vitro* Modellen untersucht. Neben der Bewertung von Entwicklungskandidaten der Firma c-a-i-r biosciences GmbH, wurden als Referenzsubstanzen klinische Kandidaten anderer Firmen getestet.

Ein klassischer Referenzinhibitor ist SB 203580 (Smith-Kline-Beecham), der einer der ersten auf Pyridinylimidazol basierenden p38 α MAPK Inhibitoren ist und häufig als ATP kompetitiver Referenzinhibitor bezeichnet wird (Davis, 2000; Lee, 1996; Lee, 2005, Badger, 1996). Aus der Pyridinylimidazol basierten Substanzserie sind die Biphenylamide SB neu und Losmapimod (GW-856553) entstanden. Losmapimod ist der aktuellste klinische Kandidat der Firma Glaxo Smith Kline, der sich momentan in klinischen Studien der Phase II für RA, COPD, kardiovaskuläre Krankheiten und neuropathische Schmerzen befindet (www.ncbi.gov.). SB neu wurde von der Firma c-a-i-r biosciences GmbH als hochpotent eingestuft und deshalb in dieser Arbeit als Referenzinhibitor benutzt. Der Inhibitor Pamapimod, dessen Struktur auf Pyridopyrimidon basiert, wurde von der Firma Roche entwickelt. Nachdem dieser klinische Kandidat in einer Phase II Studie für die Indikation RA scheiterte, wurde seine Entwicklung eingestellt (Hill, 2008; Cohen, 2009; Zhang, 2010; Alten, 2010; Goldstein, 2011). Der von der Firma Boehringer Ingelheim entwickelte duale Inhibitor BIRB 796 hemmt alle p38 MAPK Isoformen [3-7% p38 α/β Aktivität @1 μ M; 29% p38 γ Aktivität @1 μ M; 47% p38 δ Aktivität @1 μ M] und JNK2. BIRB 796 basiert strukturell auf Pyrazolharnstoff (Kuma, 2005; Grünbaum, 2009). Außerdem hemmt diese Verbindung die p38 MAPK allosterisch, was im Vergleich zu ATP kompetitiven Inhibitoren mit einer langsameren Bindekinetik verbunden ist (Pargellis, 2002). BIRB 796 wurde in mehreren klinischen Studien, darunter auch Morbus Crohn, als nicht wirksam getestet, weshalb seine Entwicklung mittlerweile eingestellt wurde.

Tabelle 4-1 zeigt eine Gegenüberstellung der IC₅₀ Werte, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden (Enzymassay, Untersuchung von Vollblut und PBMCs), für SB neu, SB 203580, Pamapimod und BIRB 796 mit den Literaturdaten. Alle untersuchten Substanzen hemmten die p38 α MAP Kinase Aktivität im nanomolaren Bereich. Früher veröffentlichte IC₅₀ Werte für SB 203580 (0,03 μ M), Pamapimod (0,014 μ M) und BIRB 796 (0,07 μ M) stimmen mit den erzielten Ergebnissen überein, was die Validität des in dieser Arbeit optimierten Enzymassays unterstreicht.

Um die Wirkung antientzündlicher Substanzen auf die Zytokinausschüttung zu untersuchen, werden *in vitro* Versuche mit Monozyten, die vorwiegend für die TNF α Produktion im Blut verantwortlich sind, als valides Testsystem angesehen. Obwohl PBMCs häufig benutzt werden, gilt humanes Vollblut als die physiologischere Variante (Desch, 1989; Damsgaard, 2009). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl PBMCs als auch Vollblut untersucht. Die ermittelten IC₅₀ Werte für die TNF α Hemmung in Vollblut entsprachen nahezu den Literaturwerten für SB 203580 (0,216 μ M) und Pamapimod (0,4 μ M). Die Konzentrationen, mit denen 50% TNF α Ausschüttung in PBMCs gehemmt wurde, korrelierten sowohl für SB 203580 (0,2 μ M) als auch BIRB 796 (0,024 μ M) mit den Vollblutdaten. Da den veröffentlichten Daten meist unterschiedliche Versuchsbedingungen (Antikoagulanzen, LPS Serotyp und Konzentration, Stimulationsdauer) zugrunde liegen, kann ein Vergleich nur bedingt durchgeführt werden.

Tabelle 4-1: Vergleich der IC₅₀ Werte von Referenzinhibitoren. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC₅₀ Werte sind den Ergebnissen aus der Literatur gegenüber gestellt.

	SB neu	SB 203580	Pamapimod	BIRB 796
	ENZYM ASSAY			
IC 50 p38 α (μ M)	0,008 \pm 0,003 N = 7	0,033 \pm 0,004 N = 8	0,017 \pm 0,002 N = 4	0,007 \pm 0,005 N = 2
Literatur	0,003 \pm 0,001 (Universität TÜ)	0,03 – 0,05 (Young, 1997)	0,014 \pm 0,002 (Hill, 2008)	0,07 (Pargellis, 2002)
	VOLLBLUT			
IC 50 TNF α (μ M) Vollblut	0,007 N = 4	0,35 N = 4	0,11 N = 4	1,92 N = 2
Literatur		0,216 (Pont-Giralt, 2010)	0,4 \pm 0,16 (Hill, 2008)	0,78 (Lee, 2005) 0,126 (Pont-Giralt, 2010)
	PBMCs			
IC 50 TNF α (μ M) PBMCs	0,006 N = 4	0,43 N = 4	0,19 N = 5	0,01 N = 2
Literatur		0,20 (Dean, 1999)		0,024 (Grünbaum, 2009)

Für BIRB 796 unterschieden sich die IC₅₀ Werte sowohl für die Hemmung der p38 α Aktivität (0,007 μ M), als auch die Hemmung der TNF α Ausschüttung (1,92 μ M in Vollblut, 0,01 μ M in PBMCs) von der Literatur. Allerdings schwanken auch die veröffentlichten IC₅₀ Werte für die TNF α Hemmung in Vollblut (0,78 μ M (Lee, 2005) und 0,13 μ M (Pont-Giralt, 2010)). Ob die variablen Ergebnisse für BIRB 796 mit dem allosterischen Hemmmechanismus zu begründen sind oder damit, dass dieser Wirkstoff alle p38 Isoformen hemmt, ist unklar und kann abschließend nicht beantwortet werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die IC₅₀ Werte der Referenzinhibitoren mit den Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die in dieser Arbeit etablierten Testsysteme valide sind und zukünftig zur Charakterisierung von p38 MAPK Inhibitoren genutzt werden können. Der Vorteil des optimierten Testsystems liegt in der schnelleren, einfacheren Durchführung, die zudem noch kostengünstiger ist.

4.2 Speziesspezifische Effekte von p38 MAPK Inhibitoren

In Kapitel 3.2 wurde der Einfluss von strukturell unterschiedlichen p38 MAPK Inhibitoren auf die TNF α Ausschüttung in Vollblutproben von Mensch, Ratte und Schwein, sowie in primären murinen Splenozyten und humanen PBMCs untersucht. Bei der Ermittlung der optimalen Stimulationsbedingungen zeigte sich, dass für die Stimulation der Vollblutproben bei Ratte, Maus und Schwein höhere LPS Konzentrationen notwendig sind. Eine geringere Sensitivität von Nagetieren gegenüber LPS wurde bereits früher beschrieben (Redl, 1993; Foster, 1993). Ähnliches gilt für die Stimulation von Vollblutproben vom Schwein, für die ebenfalls höhere LPS Konzentrationen notwendig waren und erwartet wurden (Carstensen, 2005).

Die Untersuchung von p38 MAPK Inhibitoren in LPS stimulierten humanen Vollblutproben oder PBMCs gilt als Standardversuch, allerdings ist wenig darüber bekannt, wie potent die Inhibitoren in Vollblut oder Zellen anderer Spezies sind. Besonders über die in Entzündungsmodellen häufig untersuchten Labortiere Mäuse und Ratten ist hierzu kaum etwas bekannt. Trotz optimierter Stimulationsbedingungen konnten dennoch deutliche Speziesunterschiede bei den Hemmeffekten der Inhibitoren festgestellt werden. Während sich die Wirkung der Inhibitoren in Schweinevollblutproben und menschlichen Vollblutproben nicht stark unterschieden, zeigten stimulierte Proben von Rattenvollblut

eine deutlich geringere Sensitivität auf die Hemmung der p38 MAPK. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für den p38 Inhibitor SB 203580 beschrieben, dessen Hemmeffekt auf die TNF α Ausschüttung in LPS stimulierten PBMCs von Ratten ungefähr 90-fach schlechter war als in humanen PBMCs (Wadsworth, 1999). Dem entgegen stehen die Ergebnisse von Pont-Giralt et al. (2010), die zeigen, dass die p38 MAPK Inhibitoren SB 203580 und BIRB 796 in stimuliertem Rattenvollblut (50 μ g/ml LPS 0111:B4) keinen Hemmeffekt haben und andere p38 Inhibitoren sogar stimulierend wirken. Während eine TNF α stimulierende Wirkung von p38 Inhibitoren in Rattenvollblut im Rahmen dieser Arbeit zum Teil auch beobachtet wurde, zeigten alle untersuchten Inhibitoren eine Wirkung. Entzündungsmodelle mit Mäusen oder Ratten, die für p38 MAPK Inhibitoren positive Ergebnisse lieferten, bestätigen die erzielten Resultate (Medicherla, 2006; Escott, 2000; Mihara, 2008). Eine Erklärung für den geringeren Effekt der Inhibitoren in Rattenvollblut ist vermutlich, dass der p38 MAPK Signaltransduktionsweg bei der Ratte andere Funktionen hat und somit auch einer anderen Regulation als beim Menschen unterliegt (Pont-Giralt, 2010). Eine Bestätigung dafür sind die Speziesunterschiede, die bei Untersuchungen von Inhibitoren der Phosphodiesterase 4 (PDE4) entdeckt wurden. Diese Inhibitoren zeigten bei *in vitro* Versuchen in Rattenvollblut die beste Wirkung im Vergleich zu Vollblut von Affen und Mensch (Bian, 2004). Diese *in vitro* Ergebnisse wurden letztendlich auch im Tiermodell *in vivo* bestätigt (Dietsch, 2006). Unterschiede in der Proteinsequenz der p38 MAPK selbst erscheint als Erklärung für die unterschiedlichen Speziesreaktionen unwahrscheinlich, da das Enzym über alle Spezies hinweg hochkonserviert ist. Ein Vergleich von Maus, Ratte und Mensch zeigte, dass die Aminosäuresequenzen der p38 MAPK über 98% identisch sind (Nemeth, 1998).

Die p38 MAPK Inhibitoren, die in murinen und humanen Primärzellen bewertet wurden, zeigten insgesamt ein recht ähnliches Ergebnis. Der Speziesunterschied zwischen Mensch und Maus scheint somit geringer zu sein als zwischen Ratte und Mensch (Tabelle 3-4). Gleiches wurde auch schon für einen Metalloproteinase Inhibitor, der in humanem und murinem Vollblut untersucht wurde, beschrieben (Murakami, 1998). Dem entgegen stehen die Schlussfolgerungen nach der Sequenzierung des Mausgenoms. Es wurde erkannt, dass nur ca. 75% der Gene von Maus und Mensch funktionell verwandt sind (Church, 2009). Auch bezüglich der angeborenen und adaptiven Immunantwort wurden mehr Unterschiede zwischen Maus und Mensch aufgedeckt als bisher angenommen. So setzt sich das Blut bei Mäusen z.B. aus 75 - 90% Lymphozyten zusammen, während beim Menschen nur 30 - 50% Lymphozyten im Blut sind. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Mensch und Maus besteht für das in der Entzündungsantwort wichtige Gen Interleukin-8, das bei Mäusen

nicht existiert (Mestas, 2004; Haley, 2003). Aufgrund dieser Erkenntnisse sind Speziesunterschiede bezüglich der Wirkung von p38 MAPK Inhibitoren durchaus zu erwarten.

Als Erklärung für die unterschiedlichen Hemmwirkungen in Ratte bzw. Maus versus Mensch scheinen voneinander abweichende Expressionsstärken der p38 MAPK in der jeweiligen Spezies und verschiedene funktionelle Sensitivitäten gegenüber den Inhibitoren plausibel. Außerdem untersuchten Goldstein et al. (2011) die Halbwertszeiten für die Verstoffwechslung des p38 MAPK Inhibitors Pamapimod in verschiedenen Spezies. Während die Hälfte der Substanz in Wistar Ratten nach 4 Stunden abgebaut war, wurde in Affen eine Halbwertszeit von 14 Stunden und in Hunden eine Halbwertszeit von 9 Stunden gemessen. Weiter band Pamapimod in Ratten (82,9%) und Affen (85,4%) nur schwach an Plasmaproteine, im Mensch hingegen stark (94,6%). Insgesamt deckten auch die Ergebnisse von Goldstein et al. (2011) die größten Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch auf. Folglich sollte bei der Auswahl von Tiermodellen und der Interpretation von tierexperimentell gewonnenen Daten mit p38 MAPK Inhibitoren besonders die Unterschiede zwischen Mensch und Nager beachtet werden. Aufgrund von Unterschieden in der Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik scheint die Übertragung von positiven Tierexperimentdaten, hier besonders aus Ratten, auf den Mensch problematisch.

4.3 Etablierung eines *in vitro* Modells mit PBMCs

In Abschnitt 3.3.1 wurden PBMCs sowohl mit LPS (1 µg/ml) als auch mit TNFα (10 ng/ml) stimuliert, um ein neues *in vitro* Testsystem zu etablieren, das neben der Zytokinausschüttung auch die mRNA Expression von definierten Genen und die Aktivierung der p38 MAPK Isoformen untersucht. Eine *in vitro* Entzündungsreaktion konnte mit LPS und TNFα angeregt werden, wenn auch die TNFα Stimulation eine viel schwächere Reaktion hervorrief. Dies ist im Einklang mit der Literatur, wo die Stimulation von Chondrozyten mit TNFα und IL-1β getestet wurde, IL-1β aber letztendlich der potentere Stimulus war (Kojima, 2004; Joos, 2009). Mit dem rekombinanten in *E.coli* produzierten TNFα sollte eine physiologische Situation nachgebildet werden. Es ist allerdings nicht nachgewiesen, ob dieses rekombinante Protein die gleiche Aktivität wie das native Protein, das als Trimer vorliegt, hat (Tang, 1996). Eine gleichzeitige Stimulation mit IL-1β und TNFα, die synergistische Effekte erzielt (Kuldo, 2005), wurde nicht in Erwägung gezogen.

In Vorversuchen wurden die optimalen Zeitpunkte festgelegt und entzündungsrelevante Gene mit einem Taqman® Custom Array identifiziert. Schließlich wurde festgelegt, dass die Effekte auf die Zytokinausschüttung (TNFα, IL-1β, IL-6) nach 8 Stunden, auf die mRNA Expression (TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-23α, MKP1, CSF2, p38α, p38β, p38δ, p38γ) nach 2 Stunden und auf die p38 MAPK Isoformaktivierung nach 30 Minuten gemessen werden sollten. Die ermittelten Zielgene, sowie die Messzeitpunkte für die Zytokinausschüttung und die mRNA Analyse stimmen mit einer von Prabhakar et al. (2005) durchgeführten Analyse in LPS stimulierten PBMCs weitgehend überein. Auch der mittels Western Blot ermittelte Zeitpunkt für die maximale p38 MAPK Phosphorylierung wird von Diks et al. (2004) beschrieben, der mit einem Peptid Array die Aktivierung von verschiedenen Kinasen in LPS stimulierten PBMCs betrachtete. Diks et al. (2004) untersuchte allerdings nicht die verschiedenen p38 MAPK Isoformen. Um die Aktivierung der Isoformen durch Phosphorylierung zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Phospho MAPK Array für die Anwendung mit PBMCs etabliert. Während die Behandlung mit LPS die MAP Kinasen p38α, p38γ (schwach), JNK 1, JNK 2, ERK 1 und ERK 2 aktivierte, stimulierte TNFα nur p38α, p38γ, sowie JNK 1 und JNK 2. Auch Suzuki et al. (1999) beschrieb für TNFα eine spezifische Aktivierung des p38 MAPK Signaltransduktionswegs und eine nur schwache Aktivierung von ERK in humanen Neutrophilen. Eine Stimulation mit TNFα scheint also spezifischer die p38 und JNK MAPK Signaltransduktionswege zu aktivieren.

Da selbst für eine schwache Stimulation mit rekombinantem humanen TNF α sehr große Mengen benötigt wurden, und die Resultate mit den Ergebnissen nach LPS Stimulation nahezu vergleichbar waren, wurde in den weiteren Versuchen nur noch mit LPS stimuliert. Bei der Stimulation von PBMCs wurde trotz gleicher Bedingungen und gesunder Spender eine deutliche interindividuelle Variabilität bei der Zytokinausschüttung und in der mRNA Expression der definierten Zielgene festgestellt. Zum einen reagierten die Spender insgesamt auf eine Stimulation unterschiedlich stark. Zum anderen schien die Reaktion jedes Zytokins individuell reguliert zu sein. Selbst bei einem gesunden Spender, der an drei verschiedenen Tagen untersucht wurde, konnte eine signifikante intraindividuelle Variabilität festgestellt werden (Abbildung 3-7). Dass Vollblut, PBMCs und Monozyten von verschiedenen Spendern variabel reagieren, wurde bereits häufig beschrieben (Damsgaard, 2009; de Groote, 1992). Trotz bekannter Einflussfaktoren ist dieses Phänomen aber nicht eindeutig geklärt. Oft wird ein Geschlechterunterschied abhängig vom Östrogenspiegel beobachtet (Aulock, 2006; Asai, 2001), aber auch Faktoren wie Rauchen, Ernährung, Training oder Alter spielen für die Zytokinausschüttung eine Rolle (Yaqoo, 1998). Außerdem tragen Polymorphismen in den Zytokingenen und deren Rezeptoren zu unterschiedlichen Reaktionen auf einen Stimulus bei (Danis, 1995; Louis, 1998; Imahara, 2005). Für RA Patienten wurde darüber hinaus beschrieben, dass Polymorphismen in Genen des p38 MAPK Netzwerks den Erfolg einer anti-TNF α Therapie (mit Infliximab oder Adalimumab) beeinflussen (Coulthard, 2011). Ein weiterer wichtiger Aspekt sind Netzwerke oder Wechselwirkungen zwischen Zytokinen. Espelin et al. (2010) beschrieben die Reaktion auf verschiedene Behandlungen (Stimulationen oder Inhibitoren) in der Monozyten Zelllinie U937. Durch die gleichzeitige Untersuchung von 50 Zytokinen und 23 Phosphoproteinen konnten komplexe sich bedingende Interaktionen zwischen Zytokinen und Phosphoproteinen erstmals beobachtet werden.

Schlussendlich blieb der Versuch, einen Zusammenhang zwischen der beschriebenen Variabilität und der Wirkung eines p38 MAPK Inhibitors aufzuklären, erfolglos. Die Vermutung, dass die Wirkung eines p38 MAPK Inhibitors besonders gut oder schlecht ausfällt, weil Individuen auffällig schwach oder stark auf eine Stimulation reagieren, konnte bislang nicht bestätigt werden.

4.4 P38 MAPK Inhibitoren wirken auf RNA- und Proteinebene

In Abschnitt 3.3.2 wurde mit Proben von gesunden Spendern die Effekte der bekannten Referenzinhibitoren SB neu und Pamapimod, sowie der Substanz CBS 3825 (c-a-i-r biosciences GmbH) auf die Zytokinausschüttung und die Genexpression der ausgewählten Gene untersucht, um das neu etablierte *in vitro* Testverfahren zu validieren. Die konzentrationsabhängigen Hemmeffekte der drei Substanzen auf die Ausschüttung der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 konnten für die Stimulation mit LPS und mit TNF α auch auf mRNA Expressionsebene nachgewiesen werden. Eine hohe Korrelation der Hemmeffekte (>50%) auf Protein- und RNA-Ebene bestätigte, dass die Inhibitoren die mRNA Produktion von Zytokinen in PBMCs ebenso beeinflussen. Auch bei weiteren entzündungsrelevanten Genen, wie IL1 α , IL-8, IL-10, IL23 α , MKP1 und CSF2, hemmten die Inhibitoren die mRNA Expression signifikant. In früheren Untersuchungen wurde beschrieben, dass Wirkstoffe auf Basis eines Pyridinylimidazols die Translation von Zytokinen hemmen, aber nur geringe Effekte auf die Transkription haben (Young, 1993; Prichett, 1995). Seither wird besonders die post-transkriptionelle Funktion der p38 MAPK bei der Regulation der mRNA Stabilität von Zytokingenen betont (Winzen, 1999; Brook, 2006; Birell, 2006; Anderson, 2008). Newton und Holden (2003) postulierten jedoch, dass die p38 MAPK transkriptionell, post-transkriptionell, translational und post-translational agieren könnte, abhängig vom jeweiligen Zytokin, dem untersuchten Zelltyp und dem Stimulationsreagenz. Dean et al. (1999) zeigten schließlich in Monozyten, dass der p38 MAPK Inhibitor SB 203580 die TNF α Produktion auf Transkriptions- und Translationsebene gleichermaßen hemmt, was im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit steht.

Über einen Einfluss von p38 MAPK Inhibitoren auf die Expression der p38 Isoformen ist bislang nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Expression der p38 MAPK Isoformen in unbehandelten, stimulierten und mit einem Inhibitor behandelten Proben verglichen. In stimulierten und unbehandelten PBMCs, sowie bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen war kein Expressionsunterschied zu sehen, wohingegen hohe Inhibitorkonzentrationen (1 μ M für SB neu, und 10 μ M für Pamapimod und CBS 3825) eine zweifache Induktion der p38 α Expression in den LPS stimulierten PBMCs bewirkten. Dies bekräftigt einerseits die Selektivität der Inhibitoren für die Isoform p38 α , andererseits

könnte es auf einen Rückkopplungsmechanismus hindeuten. Clark et al. (2009) beschrieben die Komplexität der p38 MAPK Regulation, indem sie auf mindesten vier negative Rückkopplungsmechanismen verwiesen, in die die p38 MAPK involviert sein könnte. In ergänzenden Experimenten muss diesem Phänomen noch einmal genauer nachgegangen werden.

Zusammenfassend kann für das neue *in vitro* Testverfahren festgehalten werden, dass sowohl in LPS als auch TNF α stimulierten PBMCs die untersuchten Inhibitoren einen vergleichbaren Effekt auf die Zytokinausschüttung und die mRNA Expression von entzündungsrelevanten Genen haben. Desweiteren konnte bestätigt werden, dass p38 MAPK Inhibitoren auf RNA- und Proteinebene ihre Zielgene beeinflussen.

4.5 Effekte des p38 MAPK Inhibitors 'SB neu' in stimulierten PBMCs von Morbus Crohn Patienten

Mit dem etablierten *in vitro* Testverfahren wurden die Effekte des Referenzinhibitors SB neu (1 μ M) in PBMCs von 7 Morbus Crohn Patienten untersucht (Kapitel 3.3.3). Obwohl für Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen immer wieder eine erhöhte Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 in mononukleären Zellen des Darms und auch des peripheren Blutes beschrieben wurde (Gross, 1991; Reinecker, 1993; Weisz, 1997; Docena, 2010), konnte dieser Effekt bei den verwendeten Proben in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Auch erhöhte Zytokinlevel im Blutplasma der Patienten, die in anderen Veröffentlichungen oft gemessen wurden, konnten nicht nachgewiesen werden (Atreya & Neurath, 2008; Kohut, 2010). Im Vergleich zu gesunden Spendern wurden trotzdem deutliche Unterschiede gefunden. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Ergebnisse bei Morbus Crohn Patienten mit hoher und niedriger Krankheitsaktivität nicht. Der Inhibitor SB neu hemmte in Proben von Morbus Crohn Patienten die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 schwächer als in Proben von Gesunden. Die mRNA Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde allerdings durch den Inhibitor stärker gehemmt. Die auffälligste Beobachtung war die variable Wirkung des Inhibitors auf die Ausschüttung von IL-6 in PBMCs von Morbus Crohn Patienten (Abbildung 3-26). Der gemessene Hemmeffekt von 1 μ M SB neu auf die Ausschüttung von IL-6 bewegte sich in einer Bandbreite von 13 bis 89 Prozent. Eine ähnliche Beobachtung machten Page et al. (2010) in kultivierten Zellen aus der Synovialmembran von Patienten mit Rheumatoider

Arthritis. Hier hemmte ein p38 MAPK Inhibitor zwar die Ausschüttung von TNF α und IL-1 β , nicht aber die IL-6 Ausschüttung. Wie bei den Untersuchungen in dieser Arbeit wurde die IL-6 mRNA Expression aber durch den Inhibitor konstant gehemmt. Der Effekt wurde mit der unterschiedlichen Wirkung der Inhibitoren auf die in der Synovialmembran enthaltenen Zelltypen (Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen) begründet. So führten p38 MAPK Inhibitoren in Makrophagen sogar zu einer Stimulation der Ausschüttung von IL-6. Dieser Effekt wurde auch an anderer Stelle beschrieben (van den Blink, 2001), reicht aber nicht als Erklärung für die variable Hemmwirkung von p38 MAPK Inhibitoren auf die Ausschüttung von IL-6. Da für IL-6, das von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen produziert wird, erhöhte Werte in Morbus Crohn Patienten beschrieben werden, ist IL-6 ein charakteristischer Entzündungsmarker für diese Krankheit (Gabay, 2006; Ishihara, 2002). Der variable Hemmeffekt der p38 Inhibitoren auf die Ausschüttung von IL-6 ist damit ein wichtiges Ergebnis. In klinischen Studien sollte weiter untersucht werden, ob dieser Effekt möglicherweise eine Erklärung für die transiente antiinflammatorische Wirkung der Inhibitoren in bereits durchgeführten klinischen Studien sein könnte.

Zusätzlich zu der Untersuchung der PBMCs wurde im entzündeten Darmgewebe der Morbus Crohn Patienten eine Expressionsanalyse durchgeführt. Die Expression der in PBMCs als induziert identifizierten Gene wurde auch in entzündetem Kolongewebe von Morbus Crohn Patienten aktiviert. Im untersuchten Darmgewebe stach IL-8, nicht wie beschrieben IL-6, als Entzündungsmarker hervor, der mit der für die Patienten berechneten Entzündungsaktivität korrelierte (Reinisch, 1999). IL-8 ist ein Chemokin, das Leukozyten bzw. Neutrophile aktiviert und auch eine wichtige Funktion in der Angiogenese spielt (Stallmach, 2004).

Zusammenfassend kann für das *in vitro* Testverfahren mit PBMCs festgehalten werden, dass es eine Aussage über die Wirkung eines p38 MAPK Inhibitors auf die mononukleären Zellen der Lamina propria im Darm ermöglicht. Dies wird dadurch bestätigt, dass Zytokine, die bei Morbus Crohn eine Rolle spielen, bei der Genexpressionsanalyse in PBMCs ebenfalls nachgewiesen werden konnten. Neben TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und IL-8 ist hier auch IL-23 zu nennen, das als wichtiges proinflammatorisches Zytokin in der Pathogenese von Rheumatoider Arthritis (Brennan, 2008; McInnes & Schett, 2007) und Morbus Crohn (Oppmann, 2000; Duerr 2006; Neurath, 2007) identifiziert wurde. Weitere im Zusammenhang mit Morbus Crohn beschriebene Gene, wie IL-17, IL-12 und IL-22 (Kopf, 2010; Mac Donald, 2010; Andoh, 2008), waren entweder unauffällig oder wurden nicht untersucht.

Bislang war die Kultivierung von Darmbiopsien nötig, um Aussagen über die Wirkung von p38 MAPK Inhibitoren auf das Darmgewebe, welches aus Immunzellen und Epithelzellen besteht, *in vivo* zu ermöglichen. Bei dieser Untersuchung sind pro Patient mindestens 10 Biopsien notwendig (Yi, 2007). Diese große Anzahl an Biopsien ist medizinisch oftmals nicht zu rechtfertigen und auch aus ethischen Gesichtspunkten (Nutzen-Risiko) problematisch. Aus diesem Grund ist das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* Modell mit PBMCs eine innovative Alternative und für weitere Untersuchungen bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen hilfreich.

4.6 Aktivierte/Phosphorylierte p38 MAPK Isoformen in PBMCs und entzündetem Dickdarmgewebe

Mit der Expressionsanalyse und der Etablierung des Phospho MAPK Arrays konnte die Expression und Aktivierung aller p38 MAPK Isoformen erstmals umfassend in PBMCs und Dickdarmgewebe analysiert werden. Während in LPS stimulierten PBMCs hauptsächlich p38 α exprimiert und aktiviert wurde, konnte in entzündetem Dickdarmgewebe von Morbus Crohn Patienten neben p38 α stark phosphoryliertes p38 δ nachgewiesen werden. Außerdem waren in entzündetem Darmgewebe auch weitere MAPK Familien, wie ERK und JNK, aktiviert. Unter den JNK Isoformen wurde JNK 2 am stärksten phosphoryliert und aktiviert, für JNK 3 hingegen konnte keine Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Die Aktivierung und Funktion der p38 MAPK Isoformen *in vivo* wurde bisher immer mit einem Fokus auf p38 α charakterisiert, da es methodisch schwierig war die Phosphorylierung für die einzelnen Isoformen zu untersuchen. Die einzige Möglichkeit war bisher eine Immunopräzipitation, die aber in dieser Arbeit aufgrund der geringen Mengen an entzündetem Gewebe nicht durchführbar war. Wätzig et al. (2002) fand in der entzündeten Kolonmucosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmkrankheiten (also MC und CU) aktive p38 α , JNK 1, JNK 2, ERK 1 und ERK 2. Er konzentrierte sich auf p38 α , da diese das stärkste Signal zeigte. Während er die Isoformen p38 β und p38 γ im Darm gar nicht nachweisen konnte, waren p38 α und p38 δ ungefähr gleich stark exprimiert. Die Aktivierung von p38 wurde allein p38 α proportional zur Entzündungsstärke zugeordnet. Aktivierte p38 α wurde von Wätzig et al. (2002) mittels Immunhistochemie in Makrophagen und Neutrophilen der Lamina propria lokalisiert. Für p38 δ beobachtete er in entzündeten Proben sogar eine Verminderung des Proteins. Tatsächlich war damals eine Untersuchung

des phosphorylierten p38 δ nicht möglich, da nur phosphoryliertes p38 α methodisch erfasst werden konnte. In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass neben p38 α auch die anderen p38 MAPK Isoformen, vor allem aber p38 δ , im Entzündungsgeschehen im Dickdarm aktiviert vorliegen. Ausgehend von den jetzt vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit wäre es interessant für zukünftige Untersuchungen immunhistologisch zu klären, in welchem Zelltyp p38 δ lokalisiert und aktiviert wird. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich dabei um Makrophagen handelt. Smith et al. (2006) beobachteten unterschiedliche Effekte von p38 MAPK Inhibitoren auf die mit LPS stimulierte Zytokinausschüttung in Lungenmakrophagen und Monozyten und machten dafür eine unterschiedliche Verteilung der p38 MAPK Isoformen verantwortlich. Tatsächlich konnte in Lungenmakrophagen eine deutlich höhere Expression von p38 δ gemessen werden als in Monozyten. Allerdings wurde nicht untersucht, welche Isoform durch die Stimulation mit LPS aktiviert wurde. Bisher wurde nur in entzündetem Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis analysiert, welche p38 MAPK Isoformen während der Entzündung aktiv sind. Hier wurde eine von Spender zu Spender individuelle Expression der Isoformen, hauptsächlich aber aktive p38 α und p38 γ nachgewiesen (Korb, 2006). Wie bereits für Rheumatoide Arthritis gezeigt, konnte im Rahmen dieser Arbeit in Dickdarmgewebe von Morbus Crohn Patienten erstmals eine Rolle für eine weitere Isoform, nämlich p38 δ , im Entzündungsgeschehen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die meisten p38 MAPK Inhibitoren die Isoformen p38 α und p38 β spezifisch hemmen, könnte eine Erklärung für das Scheitern der Inhibitoren bei der Behandlung von Morbus Crohn sein. Zu berücksichtigen ist allerdings auch die Beobachtung, dass nicht allein der p38 MAPK Signaltransduktionsweg im entzündeten Gewebe aktiviert wird, sondern auch ERK und JNK. Bekannt ist, dass die MAPK Regulation sehr komplex ist und die verschiedenen MAPK Familien ERK, JNK und p38 auch miteinander in Wechselwirkung treten können (Roux, 2004; Johnson, 2002). Wahrscheinlich sind sowohl ERK als auch p38 MAPK für die Zytokinproduktion verantwortlich (Liu, 2008; Carter, 1999), was auch im Einklang mit den Beobachtungen dieser Arbeit ist, dass beide Signalwege in entzündetem Gewebe aktiviert wurden. Ein Zusammenspiel zwischen den Signalwegen bezüglich der p38 MAPK Hemmung wurde schon einmal beobachtet. Die Hemmwirkung eines p38 Inhibitors auf die TNF α Ausschüttung in PBMCs verschlechterte sich, je stärker der ERK Signalweg aktiv war (Hua, 2010). Die effektivste Hemmung der Zytokinausschüttung konnte durch die Kombination von ERK und p38 Inhibitoren erreicht werden (Rutault, 2001). *In vivo* scheinen im Entzündungsgeschehen komplexe Zusammenhänge zwischen den verschiedenen MAP Kinasen zu bestehen. Es ist nicht

bekannt, ob bei einer Hemmung der p38 MAPK das Signal auf andere MAP Kinasen umgeleitet wird. Das würde bedeuten, dass die alleinige Hemmung der p38 MAPK nur wenig Erfolg hätte. Desweiteren wäre es interessant mit dem Phospho MAPK Array auch in anderen entzündeten Geweben, wie z.B. in COPD und RA, genau zu untersuchen, welche MAPK und welche p38 Isoformen aktiviert werden.

4.7 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die systematische Untersuchung von p38 MAPK Inhibitoren mit Hilfe verschiedener *in vitro* Modelle mögliche Ursachen für das bisherige Scheitern der Inhibitoren in klinischen Studien aufgedeckt.

Die Bewertung neuer Substanzen bezüglich ihrer Wirksamkeit und Toxizität erfolgt mittels Tiermodellen. Die in dieser Arbeit aufgedeckten Speziesunterschiede zeigen, dass Tierexperimente die Komplexität des menschlichen Organismus nur unzureichend abbilden und eine Übertragung der Daten, insbesondere aus Nagern, auf den Menschen problematisch ist. Das wird unterstützt durch die Beobachtung, dass p38 MAPK Inhibitoren in Mausmodellen eine Wirkung zeigten und in klinischen Studien beim Menschen keinen Erfolg hatten. Besonders in diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass das in Morbus Crohn Patienten als Entzündungsmarker identifizierte IL-8 in Mäusen gar nicht vorhanden ist (Haley, 2003). Untersuchungen mit menschlichem Krankheitsgewebe, wie Biopsien von MC Patienten sind aufwändig, da solche Gewebe nur schwer zugänglich sind und umfangreiche logistische, infrastrukturelle Voraussetzungen notwendig sind. In dieser Arbeit wurde an einem *in vitro* Testverfahren gearbeitet, welches die Bewertung der Wirkung von p38 MAPK Inhibitoren in biologischen Proben von Morbus Crohn Patienten ermöglicht. Dieses Verfahren wurde angewendet, um Blut (PBMCs) und entzündetes Darmgewebe von Morbus Crohn Patienten zu vergleichen. Da in einer Genexpressionsanalyse die gleichen entzündungsrelevanten Gene identifiziert werden konnten, ist davon auszugehen, dass mit Hilfe des *in vitro* Modells Vorhersagen über die Effekte eines p38 MAPK Inhibitors auf die mononukleären Zellen im Darm gemacht werden können. In Morbus Crohn Patienten hatte der untersuchte Inhibitor SB neu (1 μM) nur eine sehr variable Hemmwirkung auf die Ausschüttung von IL-6. Die unzuverlässige Hemmung des für Morbus Crohn charakteristischen Entzündungsmarkers könnte darauf hindeuten, dass p38 MAPK Inhibitoren für die Behandlung von entzündlichen Darmkrankheiten nicht oder nur bedingt geeignet sind.

Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt um die Aktivierung der p38 MAPK Isoformen p38 α , p38 β , p38 δ und p38 γ genauer zu untersuchen. Während in PBMCs hauptsächlich p38 α exprimiert und aktiviert wurde, konnte in entzündetem Dickdarmgewebe neben p38 α die stärkste Aktivierung für p38 δ nachgewiesen werden. Somit muss neben der p38 α Isoform (Wätzig, 2002) auch für p38 δ eine Funktion im Entzündungsgeschehen im Darm angenommen werden. Dass die meisten p38 MAPK Inhibitoren spezifisch p38 α /p38 β hemmen, nicht aber p38 δ , könnte eine weitere Erklärung für das Scheitern der Inhibitoren bei der Behandlung von Morbus Crohn sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Inhibitoren der p38 MAP Kinase sind seit Jahren vielversprechende Wirkstoffkandidaten für die Behandlung chronischer Entzündungskrankheiten, wie Rheumatoide Arthritis, entzündliche Darm- und Lungenerkrankungen oder die Psoriasis. Alle bisherigen klinischen Kandidaten zeigten überzeugende Ergebnisse in zellbasierten *in vitro* Versuchen und Entzündungsmodellen von Versuchstieren, scheiterten dann aber in klinischen Studien der Phase I oder II beim Mensch. Gründe für mangelnde Wirksamkeit und toxische Nebenwirkungen (z.B. Hepatotoxizität) sind bisher unbekannt. Da die p38 MAPK Inhibitoren spezifisch p38 α und p38 β hemmen, könnte eine mögliche Erklärung in der Tatsache liegen, dass auch anderen p38 MAPK Isoformen (p38 γ und p38 δ) im Krankheits- bzw. Entzündungsgeschehen und anderen komplexen Prozessen eine zentrale Rolle spielen. Aus diesem Grund ist es wichtig den Effekt der Inhibitoren direkt an menschlichem Gewebe zu untersuchen. Gegenstand dieser Arbeit war es, geeignete *in vitro* Modelle zu entwickeln, um die Wirkung von p38 MAPK Inhibitoren bei Patienten mit Entzündungskrankheiten besser abschätzen zu können.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein *in vitro* p38 α MAPK Aktivitätsassay optimiert, indem die Durchführung stark verkürzt und damit die Kosten erheblich gesenkt wurden. Über die Bestimmung der Hemmwirkung auf die p38 α MAPK können zukünftig aus einer Vielzahl von Substanzen schnell und kostengünstig potenzielle, vielversprechende Kandidaten für die Weiterentwicklung identifiziert werden.

Im nächsten Schritt wurde ein *in vitro* Testmodell entwickelt, das in Vollblut von Ratten, Schweinen und Menschen, sowie mit Milzzellen der Maus durchgeführt werden kann. Mit Hilfe des Modells wurden für verschiedene p38 MAPK Inhibitoren Speziesunterschiede herausgearbeitet. Die Wirkung der Inhibitoren in Nagern, besonders in Ratten, mit denen viele Tiermodelle durchgeführt werden, war deutlich schlechter als in Mensch oder Schwein. Damit konnte gezeigt werden, dass ein p38 MAPK Inhibitor beim Menschen im Vergleich zu anderen Spezies unterschiedliche Reaktionen bewirkt. Eine Übertragung von Tierexperimentdaten auf den Menschen ist basierend auf den Ergebnissen als problematisch anzusehen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde ein neues *in vitro* Modell mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) entwickelt, das die Wirkung von p38 MAPK Inhibitoren auf die Ausschüttung von Zytokinen bzw. deren mRNA Expression untersucht und zusätzlich den Aktivitätsstatus der p38 MAPK Isoformen berücksichtigt. Das Ziel war über die

Untersuchungen in Blut von Patienten mit der entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn das Wirkungspotenzial der p38 MAPK Inhibitoren im Darmgewebe vorherzusagen. In Vorversuchen wurden zunächst die optimalen Bedingungen und Methoden definiert und mittels einer Genexpressionsanalyse die entzündungsrelevanten Gene TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-23 α identifiziert. Schließlich folgten die Untersuchungen in PBMCs und entzündetem Darmgewebe von Morbus Crohn Patienten, sowie ein Vergleich der gewonnenen Datensätze. Als wesentlicher Befund konnte gezeigt werden, dass in PBMCs hochexprimierte Gene in entzündetem Darmgewebe von Patienten mit Morbus Crohn auch hoch reguliert waren. Diese Beobachtung unterstreicht die Aussagekraft von PBMCs als Testsystem. Mit diesem Modell konnte einerseits gezeigt werden, dass p38 MAPK Inhibitoren auf Protein- und RNA Ebene eine Wirkung zeigen. Andererseits hatte der p38 Inhibitor SB neu in PBMCs von Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern eine variable Wirkung auf die Hemmung der IL-6 Ausschüttung. Da bei Morbus Crohn Patienten erhöhte Werte des Entzündungsmarkers IL-6 in Blutplasma und Darm gefunden werden, könnte die variable Hemmung der IL-6 Ausschüttung eine Erklärung dafür sein, warum p38 MAPK Inhibitoren für die Indikation Morbus Crohn bisher nicht erfolgreich waren. Außerdem wurde für die exprimierten p38 MAPK Isoformen in PBMCs und Dickdarmgewebe ein wichtiger Unterschied beobachtet. Während in PBMCs vor allem p38 α exprimiert und aktiviert wurde, konnte in entzündetem Dickdarmgewebe neben p38 α auch eine Aktivierung von p38 δ und p38 γ nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass p38 MAPK Inhibitoren für die Behandlung von chronisch entzündlichen Darmkrankheiten weniger gut geeignet sind. Einerseits konnte der zentrale Entzündungsmarker IL-6 mit p38 MAPK Inhibitoren nur variabel gehemmt werden. Andererseits spielt wahrscheinlich nicht nur p38 α eine wichtige Rolle beim Entzündungsgeschehen im Dickdarm, sondern auch andere MAP Kinasen wie p38 δ . Jedoch werden durch die p38 MAPK Inhibitoren nur die Isoformen p38 α und p38 β spezifisch gehemmt.

6 ANHANG

6.1 Ergänzung zu Abschnitt 3.3.2.1

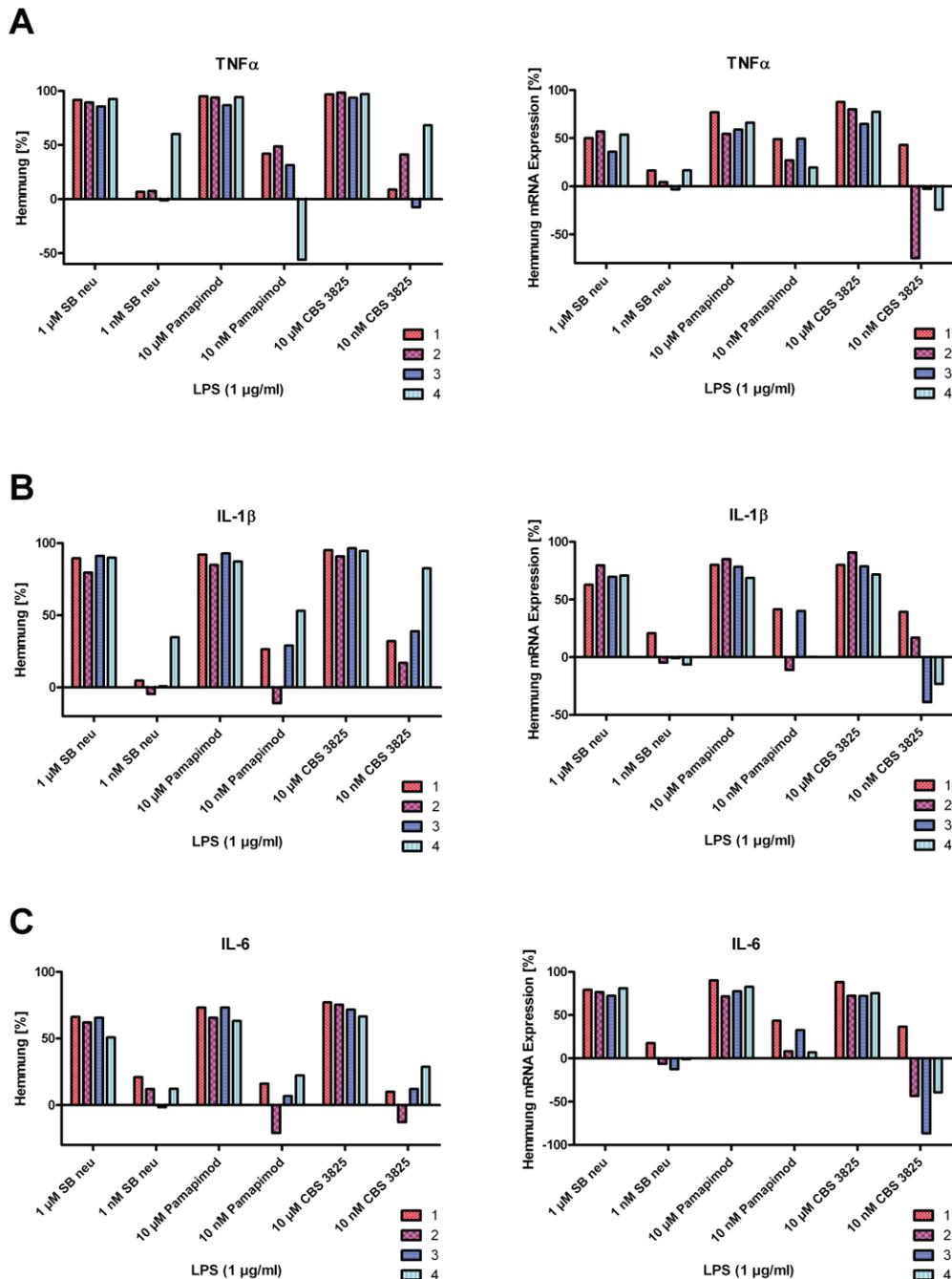


Abbildung 6-1: Hemmwirkung von p38 MAPK Inhibitoren auf die Zytokinausschüttung und mRNA Expression von PBMCs nach Stimulation mit LPS. PBMCs von Gesunden (N=4) wurden mit LPS (1 µg/ml) und den p38 MAPK Inhibitoren SB neu (1 µM und 1 nM), Pamapimod (10 µM und 10 nM) und CBS 3825 (10 µM und 10 nM) inkubiert. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Freisetzung bzw. mRNA Expression der Zytokine TNF α (A), IL-1 β (B) und IL-6 (C) pro Spender (1-4).

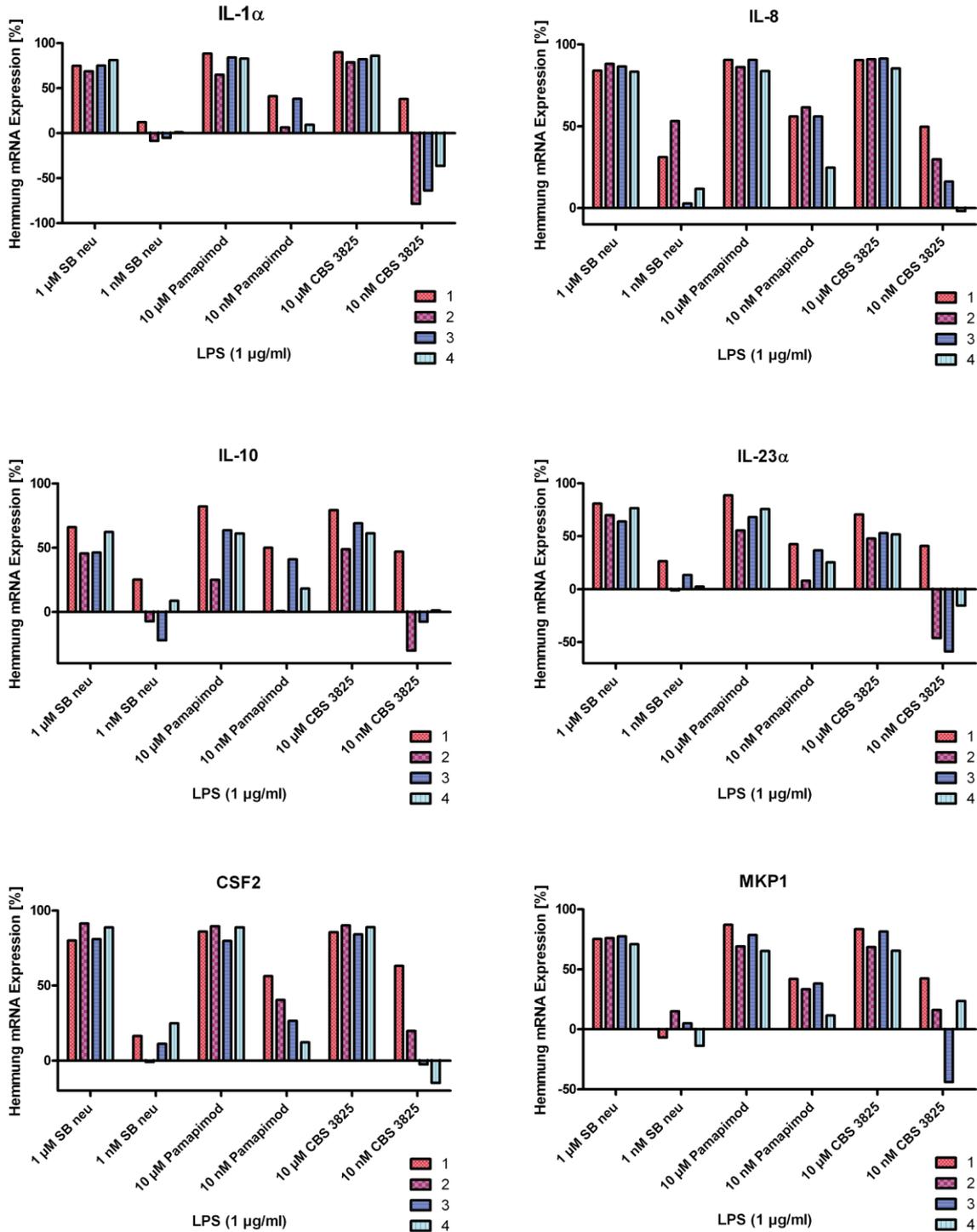


Abbildung 6-2: Effekt von p38 Inhibitoren auf die mRNA Expression in PBMCs nach LPS Stimulation. PBMCs von Gesunden (N=4) wurden mit LPS (1 µg/ml) und den p38 MAPK Inhibitoren SB neu (1 µM und 1 nM), Pamapimod (10 µM und 10 nM) und CBS 3825 (10 µM und 10 nM) inkubiert. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der mRNA Expression pro Spender (1-4) für die Gene IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2 und MPK2.

6.2 Ergänzung zu Abschnitt 3.3.2.2

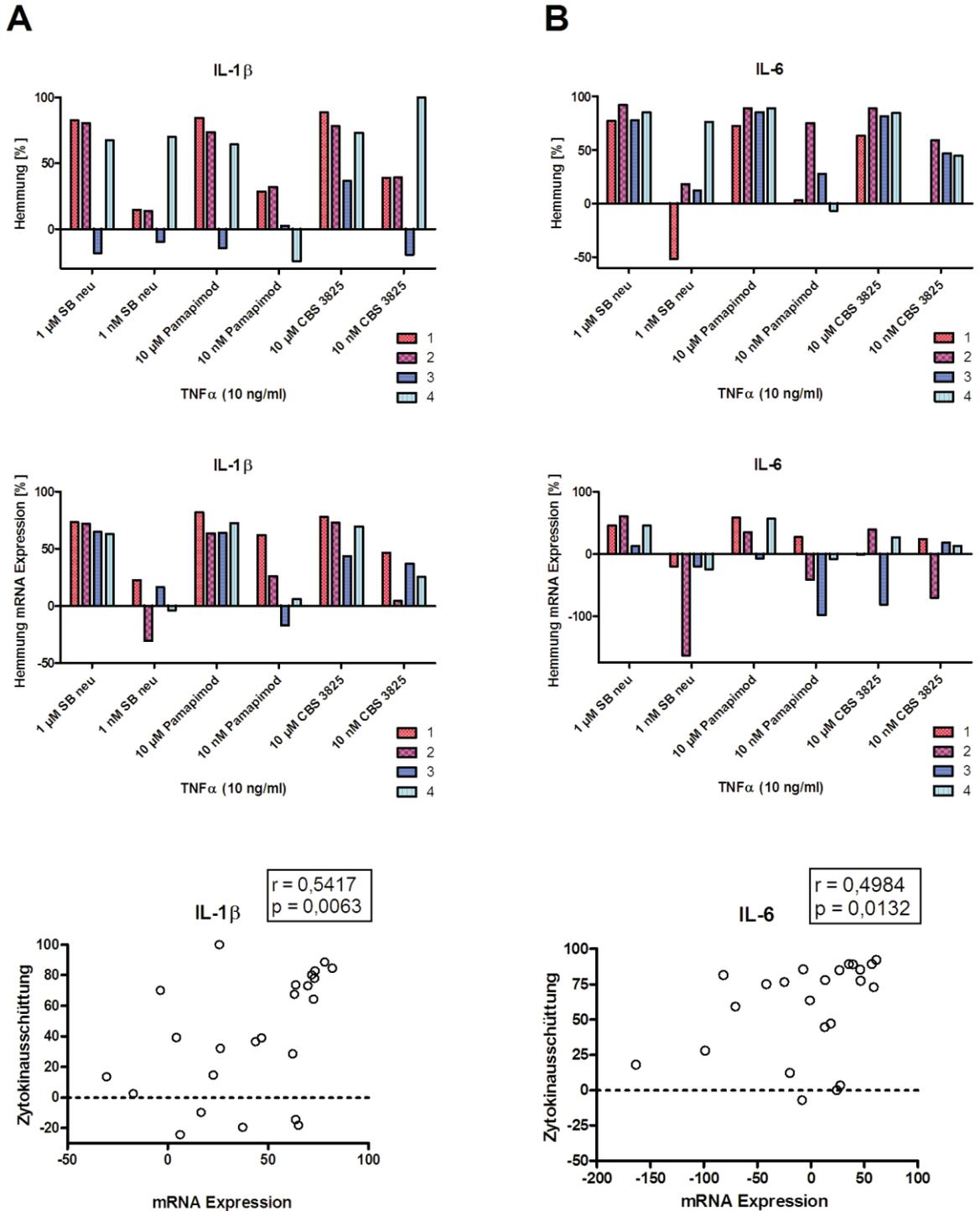


Abbildung 6-3: Hemmwirkung von p38 Inhibitoren auf die Zytokinausschüttung und mRNA Expression nach Stimulation von PBMCs mit TNFα. Dargestellt ist die Hemmung der Zytokinausschüttung und mRNA Expression der Zytokine IL-1β (A) und IL-6 (B), sowie die Korrelation der Hemmwirkung zwischen beiden untersuchten Bereiche. Es wurde eine Spearman Korrelation für nicht normalverteilte Daten berechnet.

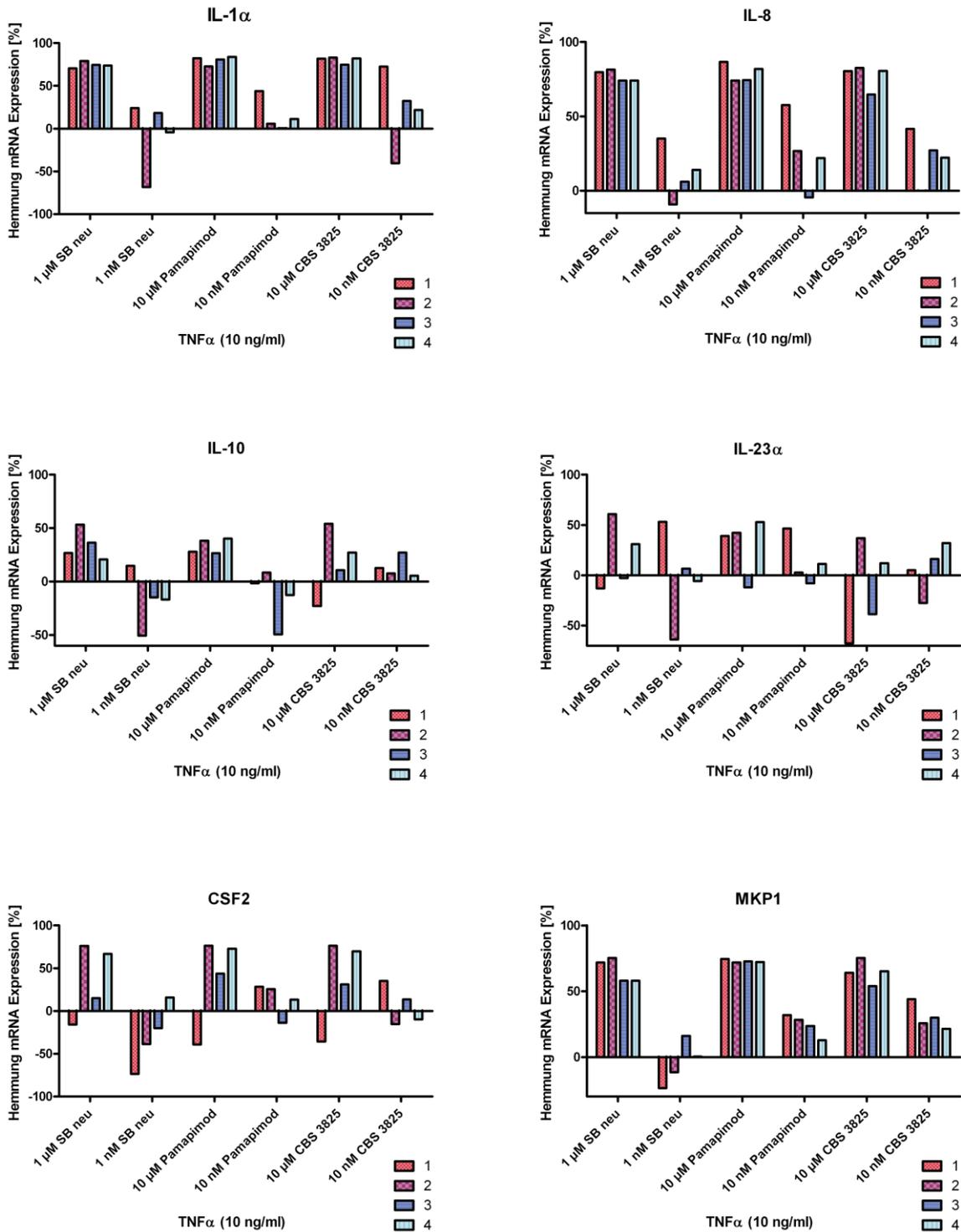


Abbildung 6-4: Effekt von p38 Inhibitoren auf die mRNA Expression in PBMCs nach Stimulation mit TNF α . PBMCs von Gesunden (N=4) wurden mit TNF α (10 ng/ml) und den p38 MAPK Inhibitoren SB neu (1 μ M und 1 nM), Pamapimod (10 μ M und 10 nM) und CBS 3825 (10 μ M und 10 nM) inkubiert. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der mRNA Expression pro Spender (1-4) für die Gene IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-23 α , CSF2 und MPK2.

6.3 Patienteninformationen

6.3.1 Morbus Crohn Patienten

Tabelle 6-1: Liste der untersuchten Morbus Crohn Patienten (Geschlecht, Alter, Krankheitsaktivität CDAI) und der zur Verfügung gestellten Proben.

Probe	Geschlecht	Alter	CDAI	Biopsien verfügbar	PBMCs verfügbar
1195/2	weiblich	23	475,3	entzündet/nicht entzündet	JA
1197	männlich	25	>150	entzündet	JA
1199	männlich	37	76,6	X	JA
1201	weiblich	55	152,9	entzündet/nicht entzündet	JA
1244	weiblich	25	248,4	entzündet/nicht entzündet	X
1269	männlich	51	218,0	entzündet/nicht entzündet	X
1204	männlich	18	132,1	entzündet/nicht entzündet	JA
1208	männlich	38	109,5	entzündet/nicht entzündet	JA
1209	männlich	61	106,5	entzündet/nicht entzündet	JA
1231	männlich	58	138,0	nicht entzündet	X
1234	weiblich	25	19,8	nicht entzündet	X

Tabelle 6-2: Auflistung der Krankheitsaktivität (CDAI), des Krankheitsbeginns und der Medikation der Morbus Crohn Patienten.

Probe	CDAI	Krankheitsbeginn	Medikation zum Zeitpunkt der Blutentnahme
1195/2	475,3	2007	anti-TNF (Sept2010/3.Woche), Steroide, Antibiose
1197	>150	2010	keine Anamnese, da als Kontrolle geplant
1199	76,6	X	Pantoprazol, Steroide
1201	152,9	1977	Prednisolon 10 mg, AZA 100 mg
1244	248,4	2009	Aza 100mg, Budesonid 9mg, Mesalazin 3mg
1269	218,0	1996	Antibiose seit 1 Woche, 5-Asa
1204	132,1	2008	Mesalazin, 175mg Azathioprin (~1 Monat)
1208	109,5	2003	Mesalazin, 6-Merkaptopurin, Steroide
1209	106,5	1972	Steroide oral (Budenofalk 3mg 4x/d)
1231	138,0	1985	X
1234	19,8	2008	X

6.3.2 `Nicht Morbus Crohn` Gruppe

Tabelle 6-3: Auflistung der biografischen Eigenschaften (Geschlecht/Alter) und der Erkrankungen der Patienten, die in der `Nicht Morbus Crohn` Gruppe untersucht wurden.

Probe	Geschlecht	Alter	Erkrankung/ Indikation für Darmspiegelung
1191	männlich	81	Dickdarmadenoma vor 2 Jahren, Kontrolluntersuchung
1195	männlich	48	Stuhlnregelmäßigkeiten, Kolon-Polyp
1196	weiblich	56	Schilddrüsen-OP vor 10 Jahren, Kontrolluntersuchung Histologie: tubuläres Dickdarmschleimhautadenoma
1206	weiblich	50	Reizdarmsyndrom, Polypen Histologie: Adenocarcinoma der Kolonschleimhaut
1210	männlich	68	Krebsvorsorge, gesund
1212	männlich	52	Sigmadivertikulose, Kontrolluntersuchung
1215	männlich	48	Kontrolluntersuchung Histologie: Kolonschleimhaut mit Anteilen eines tubulären Adenoms

6.4 Gesamtdaten des Taqman Custom Arrays

6.4.1 Genexpression in PBMCs von gesunden Spendern

Tabelle 6-4: Übersicht der mit dem Taqman® Custom Array untersuchten Gene in PBMCs von gesunden Spendern. Die Genexpression wurde analysiert nachdem PBMCs für 120 Minuten mit LPS (1 µg/ml) oder TNFα (10 ng/ml) stimuliert wurden. Aufgeführt ist die x-fache Regulation (Mittelwert von drei Spendern und SEM) des jeweiligen Gens in stimulierten PBMCs relativ zur entsprechenden unbehandelten Probe.

Reguliertes Gen (x-fach)	LPS (120 min) (N=3)		TNFα (120 min) (N=3)	
	MW	SEM	MW	SEM
ATF2-Hs00153179_m1	2,6	1,4	1,0	0,4
BCL6-Hs00277037_m1	4,6	4,1	2,2	1,0
C3-Hs01100917_g1	5,8	5,3	2,2	0,3
C3AR1-Hs00377780_m1	3,3	2,5	1,9	0,6
C4A-Hs00167147_m1	1,9	0,8	1,7	1,2
CCL11-Hs00237013_m1	X	X	X	X
CCL13-Hs00234646_m1	9,8	9,8	7,1	0,0
CCL16-Hs00171123_m1	X	X	X	X
CCL17-Hs00171074_m1	38,8	0,0	X	X
CCL19-Hs00171149_m1	15,3	18,7	2,5	2,5
CCL2-Hs00234140_m1	9,6	6,6	6,0	4,7
CCL21-Hs00171076_m1	X	X	X	X
CCL22-Hs00171080_m1	18,5	21,8	3,2	1,9
CCL23-Hs00270756_m1	160,8	118,6	8,9	2,4
CCL24-Hs00171082_m1	5,1	5,9	2,4	2,3
CCL3-Hs00234142_m1	312,5	199,3	8,2	4,3
CCL4;CCL4L1;CCL4L2-Hs00605740_g1	279,8	187,3	8,6	6,0
CCL5-Hs00174575_m1	3,9	2,7	1,8	1,3
CCL7-Hs00171147_m1	20,4	25,7	13,5	10,2
CCL8-Hs00428422_g1	38,5	50,6	4,9	3,2
CCR1-Hs00174298_m1	3,9	4,7	4,3	2,8
CCR2-Hs00174150_m1	13,5	18,8	0,1	0,0
CCR3-Hs99999027_s1	1,3	0,8	0,7	0,3
CCR4-Hs99999919_m1	2,4	1,1	1,0	0,4
CCR7-Hs99999080_m1	4,0	2,5	1,6	0,3
CD40-Hs99999100_s1	7,1	6,2	1,3	0,5
CD40LG-Hs00163934_m1	2,1	1,0	0,5	0,1
CEBPB-Hs00270923_s1	4,0	3,8	1,4	0,3
CREB1-Hs00231713_m1	3,1	2,6	1,0	0,2
CREBBP-Hs00231733_m1	2,7	1,6	0,9	0,3
CRP-Hs00265044_m1	X	X	X	X
CSF1-Hs99999084_m1	7,5	6,8	3,6	2,1
CSF2-Hs00929873_m1	70,7	82,1	1,2	0,4
CXCL1-Hs00236937_m1	76,2	48,4	7,7	5,6
CXCL10-Hs00171042_m1	158,1	191,7	11,1	9,1

CXCL2-Hs00601975_m1	216,7	234,2	12,7	8,3
CXCL3-Hs00171061_m1	295,8	264,5	17,5	12,5
CXCL5-Hs00171085_m1	9,9	11,8	3,8	2,2
CXCL6-Hs00605742_g1	6,7	5,6	4,3	2,0
CXCL9-Hs00171065_m1	26,2	35,1	8,9	6,7
CXCR4-Hs00607978_s1	2,8	1,8	0,9	0,3
DUSP1-Hs00610257_g1	7,3	4,9	0,8	0,2
DUSP4-Hs00154826_m1	5,1	4,2	2,7	0,9
FASLG-Hs00181225_m1	3,1	1,8	1,2	0,2
FOS-Hs01119267_g1	1,6	0,6	0,4	0,3
GAPDH-Hs02758991_g1	3,3	3,2	1,2	0,3
HDAC4-Hs01041648_m1	1,8	1,0	0,8	0,3
HSPB1;HSPBL2-Hs03044127_g1	1,9	1,4	0,6	0,2
IFNG-Hs00174143_m1	8,3	6,3	0,9	0,3
IL10-Hs00174086_m1	30,3	36,1	2,4	0,9
IL10RB-Hs00175123_m1	2,3	1,6	0,9	0,1
IL18-Hs01038788_m1	32,9	39,4	5,2	3,1
IL18RAP-Hs00977695_m1	2,4	1,0	1,1	0,8
IL1A-Hs00174092_m1	490,4	303,2	10,9	6,7
IL1B-Hs00174097_m1	149,4	105,7	7,7	4,4
IL1R1-Hs00991010_m1	6,8	7,0	1,4	0,5
IL1RAP-Hs00158057_m1	3,1	3,3	0,9	0,5
IL1RN-Hs00893626_m1	130,9	159,7	23,0	17,2
IL22-Hs01574154_m1	84,9	111,9	X	X
IL22RA2-Hs00364814_m1	X	X	X	X
IL23A-Hs00900828_g1	76,0	45,6	2,1	0,4
IL23R-Hs00332759_m1	1,2	1,0	1,7	1,6
IL6-Hs00985639_m1	2769,4	3266,3	44,4	36,0
IL6R-Hs01075667_m1	3,3	2,9	1,8	0,4
IL8-Hs00174103_m1	100,2	84,3	8,4	5,2
IL8RA-Hs00174146_m1	3,0	3,3	0,9	0,3
IL8RB-Hs01891184_s1	2,6	2,8	0,8	0,2
IL9-Hs00914237_m1	X	X	X	X
ITGB2-Hs00164957_m1	2,8	2,0	1,1	0,2
LTA-Hs00608020_g1	4,6	2,4	1,4	0,5
LTB-Hs00242739_m1	2,7	1,4	0,8	0,4
LTB4R-Hs00609525_m1	1,7	1,2	0,7	0,2
MAPK10-Hs00373461_m1	0,7	0,5	31,6	17,3
MAPK11-Hs00177101_m1	1,5	0,5	1,0	0,5
MAPK12-Hs00268060_m1	3,0	3,6	0,3	0,3
MAPK13-Hs00234085_m1	2,1	1,4	0,6	0,3
MAPK14-Hs00176247_m1	1,5	0,5	0,8	0,3
MAPKAPK2-Hs01114281_g1	4,3	3,9	1,0	0,2
MKNK1-Hs00177610_m1	1,5	1,0	0,9	0,6
NFATC3-Hs00190046_m1	2,8	1,8	0,9	0,2
NFKB1-Hs00765730_m1	9,9	9,3	3,2	0,7
NOS2-Hs01075529_m1	10,1	14,1	0,1	0,0
NR3C1-Hs00353740_m1	3,4	3,0	1,2	0,3
RIPK2-Hs01572690_m1	21,6	20,6	2,3	1,2

RPS6KA4-Hs00177670_m1	1,8	0,8	1,1	0,3
RPS6KA5-Hs00178054_m1	2,3	1,1	0,8	0,4
TBP-Hs00920497_m1	2,5	1,3	1,0	0,4
TIRAP-Hs00364644_m1	1,6	0,6	0,5	0,2
TLR1-Hs00413978_m1	0,9	0,8	0,9	0,2
TLR2-Hs01872448_s1	8,4	7,3	3,2	0,9
TLR4-Hs00152939_m1	13,0	13,4	2,6	1,3
TLR5-Hs00152825_m1	3,3	3,1	1,3	0,3
TNF-Hs01113624_g1	277,4	237,0	6,2	3,9
TNFSF14-Hs00542477_m1	5,7	5,0	2,5	0,8
TOLLIP-Hs01553188_m1	1,7	0,9	0,9	0,2

6.4.2 Genexpression in Dickdarmgewebe von MC Patienten

Tabelle 6-5: Übersicht der mit dem Taqman® Custom Array untersuchten Gene in entzündetem Dickdarmgewebe von MC Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (CDAI >150) und von Patienten in Remission (CDAI <150). Aufgeführt ist die x-fache Regulation (Mittelwert von 2-3 Spendern und SEM) des jeweiligen Gens in entzündetem Gewebe relativ zum entsprechenden nicht entzündeten Gewebe des gleichen Patienten.

Reguliertes Gen (x-fach)	MC >150 (N=2)		MC <150 (N=3)	
	MW	SEM	MW	SEM
ATF2-Hs00153179_m1	2,2	0,3	0,8	0,2
BCL6-Hs00277037_m1	3,9	0,3	1,0	0,2
C3-Hs01100917_g1	3,1	1,9	1,6	1,5
C3AR1-Hs00377780_m1	3,7	2,7	1,2	0,5
C4A-Hs00167147_m1	2,7	1,5	1,0	0,7
CCL11-Hs00237013_m1	2,9	0,2	1,2	1,0
CCL13-Hs00234646_m1	2,2	0,9	2,0	2,6
CCL16-Hs00171123_m1	23,7	21,3	0,6	0,1
CCL17-Hs00171074_m1	0,5	0,4	5,2	6,3
CCL19-Hs00171149_m1	0,2	0,1	3,4	0,9
CCL2-Hs00234140_m1	7,6	6,5	0,7	0,6
CCL21-Hs00171076_m1	0,9	0,3	0,5	0,7
CCL22-Hs00171080_m1	1,2	0,0	9,8	11,2
CCL23-Hs00270756_m1	2,0	1,8	3,3	3,5
CCL24-Hs00171082_m1	2,8	0,7	2,1	1,2
CCL3-Hs00234142_m1	5,0	1,8	0,7	0,5
CCL4;CCL4L1;CCL4L2-Hs00605740_g1	4,1	3,2	1,3	0,8
CCL5-Hs00174575_m1	2,6	1,0	0,5	0,3
CCL7-Hs00171147_m1	8,3	7,9	0,6	0,2
CCL8-Hs00428422_g1	82,9	81,2	4,7	6,4
CCR1-Hs00174298_m1	5,5	4,0	1,4	0,2
CCR2-Hs00174150_m1	2,3	0,1	0,6	0,1
CCR3-Hs99999027_s1	1,1	0,9	0,6	0,3
CCR4-Hs99999919_m1	2,4	1,9	0,7	0,3
CCR7-Hs99999080_m1	0,9	0,5	15,3	13,4

CD40-Hs99999100_s1	1,8	0,4	0,9	0,3
CD40LG-Hs00163934_m1	1,1	0,5	1,4	1,4
CEBPB-Hs00270923_s1	1,8	0,8	0,9	0,4
CREB1-Hs00231713_m1	1,8	0,9	0,6	0,2
CREBBP-Hs00231733_m1	3,0	0,5	0,7	0,1
CRP-Hs00265044_m1	1,0	0,0	0,8	0,2
CSF1-Hs99999084_m1	1,4	0,3	0,6	0,2
CSF2-Hs00929873_m1	12,4	7,5	6,5	4,1
CXCL1-Hs00236937_m1	2,9	0,9	4,1	5,4
CXCL10-Hs00171042_m1	1,9	0,9	3,1	0,6
CXCL2-Hs00601975_m1	3,5	0,3	1,5	1,6
CXCL3-Hs00171061_m1	2,5	0,5	2,5	3,2
CXCL5-Hs00171085_m1	10595,1	10491,0	6,0	4,0
CXCL6-Hs00605742_g1	51,3	47,3	13,8	19,4
CXCL9-Hs00171065_m1	1,4	0,1	5,0	3,1
CXCR4-Hs00607978_s1	4,9	4,4	0,9	0,5
DUSP1-Hs00610257_g1	2,1	0,5	0,6	0,5
DUSP4-Hs00154826_m1	3,8	0,6	2,6	2,6
FASLG-Hs00181225_m1	15,0	14,1	1,2	1,1
FOS-Hs01119267_g1	2,3	1,0	4,8	6,7
GAPDH-Hs02758991_g1	1,9	0,3	0,8	0,0
HDAC4-Hs01041648_m1	2,7	0,0	0,7	0,1
HSPB1;HSPBL2-Hs03044127_g1	1,8	0,1	1,0	0,4
IFNG-Hs00174143_m1	6,3	4,1	7,1	4,9
IL10-Hs00174086_m1	1,2	0,6	2,6	2,9
IL10RB-Hs00175123_m1	1,8	0,5	0,9	0,2
IL18-Hs01038788_m1	1,9	0,9	1,9	1,2
IL18RAP-Hs00977695_m1	5,0	4,4	1,4	0,8
IL1A-Hs00174092_m1	1,3	0,9	10,2	2,9
IL1B-Hs00174097_m1	14,0	10,8	9,2	10,8
IL1R1-Hs00991010_m1	2,2	0,2	0,9	0,3
IL1RAP-Hs00158057_m1	4,4	0,8	0,9	0,4
IL1RN-Hs00893626_m1	4,9	0,5	6,6	8,0
IL22-Hs01574154_m1	1,4	1,0	1,1	0,6
IL22RA2-Hs00364814_m1	1,2	0,4	2,6	2,8
IL23A-Hs00900828_g1	4,6	1,0	0,5	0,2
IL23R-Hs00332759_m1	2,0	1,5	0,7	0,2
IL6-Hs00985639_m1	23,9	14,4	6,1	8,4
IL6R-Hs01075667_m1	2,6	0,6	1,1	0,7
IL8-Hs00174103_m1	54,8	48,7	5,3	4,2
IL8RA-Hs00174146_m1	40,6	21,9	0,2	0,2
IL8RB-Hs01891184_s1	2,1	1,8	0,8	0,4
IL9-Hs00914237_m1	1,0	0,0	1,6	1,0
ITGB2-Hs00164957_m1	2,6	1,6	1,7	1,0
LTA-Hs00608020_g1	0,9	0,6	1,4	0,4
LTB-Hs00242739_m1	1,2	0,1	5,0	4,9
LTB4R-Hs00609525_m1	3,3	0,4	1,7	0,6
MAPK10-Hs00373461_m1	3,0	1,8	0,6	0,1
MAPK11-Hs00177101_m1	3,7	0,6	0,7	0,1

Anhang

MAPK12-Hs00268060_m1	4,6	2,9	0,7	0,2
MAPK13-Hs00234085_m1	1,7	0,5	0,9	0,1
MAPK14-Hs00176247_m1	1,6	0,2	0,7	0,1
MAPKAPK2-Hs01114281_g1	2,3	0,2	0,8	0,2
MKNK1-Hs00177610_m1	2,0	0,0	0,8	0,1
NFATC3-Hs00190046_m1	2,2	0,6	0,8	0,2
NFKB1-Hs00765730_m1	1,5	0,0	0,8	0,2
NOS2-Hs01075529_m1	4,4	2,3	1,9	1,7
NR3C1-Hs00353740_m1	4,2	2,8	0,4	0,1
RIPK2-Hs01572690_m1	1,9	0,1	1,3	0,4
RPS6KA4-Hs00177670_m1	1,7	0,5	1,0	0,1
RPS6KA5-Hs00178054_m1	1,9	0,1	0,9	0,3
TBP-Hs00920497_m1	2,2	0,8	0,6	0,1
TIRAP-Hs00364644_m1	2,0	0,4	0,7	0,2
TLR1-Hs00413978_m1	2,6	1,8	1,1	0,4
TLR2-Hs01872448_s1	2,4	2,3	0,6	0,2
TLR4-Hs00152939_m1	1,7	0,4	1,8	0,9
TLR5-Hs00152825_m1	4,0	1,1	0,8	0,6
TNF-Hs01113624_g1	1,3	0,1	1,4	0,2
TNFSF14-Hs00542477_m1	3,1	1,5	1,4	0,8
TOLLIP-Hs01553188_m1	2,5	0,7	0,8	0,2

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J. L., A. M. Badger, et al. (2001). "p38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines." Prog Med Chem **38**: 1-60.
- Akbarian, S. and R. J. Davis (2010). "Keep the 'phospho' on MAPK, be happy." Nat Med **16**(11): 1187-1188.
- Alten, R. E., C. Zerbini, et al. (2010). "Efficacy and safety of pamapimod in patients with active rheumatoid arthritis receiving stable methotrexate therapy." Ann Rheum Dis **69**(2): 364-367.
- Anand, P., R. Shenoy, et al. (2011). "Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor dilmapiomod in neuropathic pain following nerve injury." Eur J Pain (Epub ahead of print, PMID: 21576029).
- Anderson, P. (2008). "Post-transcriptional control of cytokine production." Nat Immunol **9**(4): 353-359.
- Andoh, A., Y. Yagi, et al. (2008). "Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(33): 5154-5161.
- Asai, K., N. Hiki, et al. (2001). "Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model." Shock **16**(5): 340-343.
- Ashwell, J. D. (2006). "The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system." Nat Rev Immunol **6**(7): 532-540.
- Atreya, R. and M. F. Neurath (2008). "Signaling molecules: the pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer." Curr Drug Targets **9**(5): 369-374.
- Atreya, R. and M. F. Neurath (2008). "New therapeutic strategies for treatment of inflammatory bowel disease." Mucosal Immunol **1**(3): 175-182.
- Aulock, S. V., S. Deininger, et al. (2006). "Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA." J Interferon Cytokine Res **26**(12): 887-892.

- Badger, A. M., J. N. Bradbeer, et al. (1996). "Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function." *J Pharmacol Exp Ther* **279**(3): 1453-1461.
- Bell, B., E. Deschner, et al. (1967). "Patterns of cell proliferation in gastrointestinal disease." *Dis Colon Rectum* **10**(2): 107-111.
- Best, W.R., J.M. Beckett, et al. (1976). "Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study." *Gastroenterology* **70** (3): 439-444.
- Bian, H., J. Zhang, et al. (2004). "Differential type 4 cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4) expression and functional sensitivity to PDE4 inhibitors among rats, monkeys and humans." *Biochem Pharmacol* **68**(11): 2229-2236.
- Birrell, M. A., S. Wong, et al. (2006). "Second-generation inhibitors demonstrate the involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in post-transcriptional modulation of inflammatory mediator production in human and rodent airways." *J Pharmacol Exp Ther* **316**(3): 1318-1327.
- Boutros, T., E. Chevet, et al. (2008). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer." *Pharmacol Rev* **60**(3): 261-310.
- Branger, J., B. van den Blink, et al. (2002). "Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia." *J Immunol* **168**(8): 4070-4077.
- Brennan, F. M. and I. B. McInnes (2008). "Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis." *J Clin Invest* **118**(11): 3537-3545.
- Brook, M., C. R. Tchen, et al. (2006). "Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2408-2418.
- Broom, O. J., B. Widjaya, et al. (2009). "Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease?" *Clin Exp Immunol* **158**(3): 272-280.
- Cano, E. and L. C. Mahadevan (1995). "Parallel signal processing among mammalian MAPKs." *Trends Biochem Sci* **20**(3): 117-122.

- Carstensen, L., C. M. Rontved, et al. (2005). "Determination of tumor necrosis factor-alpha responsiveness in piglets around weaning using an ex vivo whole blood stimulation assay." *Vet Immunol Immunopathol* **105**: 59-66.
- Carter, A. B., M. M. Monick, et al. (1999). "Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription." *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**(4): 751-758.
- Cho, J. H. (2008). "Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations." *World J Gastroenterol* **14**(3): 338-347.
- Cho, J. H. (2008). "The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nat Rev Immunol* **8**(6): 458-466.
- Church, D. M., L. Goodstadt, et al. (1995). "Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse." *PLoS Biol* **7**: e1000112.
- Clark, A. R., J. L. E. Dean, et al. (2009). "The p38 MAPK pathway mediates both antiinflammatory and proinflammatory processes: comment on the article by Damjanov and the editorial by Genovese." *Arthritis Rheum* **60**(11): 3513-3514.
- Cobb, M. H. and E. J. Goldsmith (1995). "How MAP kinases are regulated." *J Biol Chem* **270**(25): 14843-14846.
- Cohen, S. B., T.-T. Cheng, et al. (2009). "Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **60**(2): 335-344.
- Coulthard, L. R., J. C. Taylor, et al. (2011). "Genetic variants within the MAP kinase signalling network and anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis patients." *Ann Rheum Dis* **70**(1): 98-103.
- Coulthard, L. R., D. E. White, et al. (2009). "p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics." *Trends Mol Med* **15**(8): 369-379.
- Court, N. W., C. G. dos Remedios, et al. (2002). "Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3)." *J Mol Cell Cardiol* **34**(4): 413-426.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1358-1375.

- Damsgaard, C. T., L. Lauritzen, et al. (2009). "Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - a comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes." J Immunol Methods **340**: 95-101.
- Danis, V. A., M. Millington, et al. (1995). "Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism." Clin Exp Immunol **99**(2): 303-310.
- Davies, S. P., H. Reddy, et al. (2000). "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors." Biochem J **351**(Pt 1): 95-105.
- Dean, J. L., M. Brook, et al. (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes." J Biol Chem **274**(1): 264-269.
- Desch, C. E., N. L. Kovach, et al. (1989). "Production of human tumor necrosis factor from whole blood ex vivo." Lymphokine Res **8**(2): 141-146.
- Dietsch, G. N., C. R. Dipalma, et al. (2006). "Characterization of the inflammatory response to a highly selective PDE4 inhibitor in the rat and the identification of biomarkers that correlate with toxicity." Toxicol Pathol **34**(1): 39-51.
- Diks, S. H., K. Kok, et al. (2004). "Kinome profiling for studying lipopolysaccharide signal transduction in human peripheral blood mononuclear cells." J Biol Chem **279**(47): 49206-49213.
- Docena, G., L. Rovedatti, et al. (2010). "Down-regulation of p38 mitogen-activated protein kinase activation and proinflammatory cytokine production by mitogen-activated protein kinase inhibitors in inflammatory bowel disease." Clin Exp Immunol **162**(1): 108-115.
- Dominguez, C., D. A. Powers, et al. (2005). "p38 MAP kinase inhibitors: many are made, but few are chosen." Curr Opin Drug Discov Devel **8**(4): 421-430.
- Duerr, R. H., K. D. Taylor, et al. (2006). "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene." Science **314**(5804): 1461-1463.
- Duric, V., M. Banasr, et al. (2010). "A negative regulator of MAP kinase causes depressive behavior." Nat Med **16**(11): 1328-1332.

- Eckert, R. L., T. Efimova, et al. (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface-a function for p38 delta." *J Invest Dermatol* **120**(5): 823-828.
- Escott, K. J., M. G. Belvisi, et al. (2000). "Effect of the p38 kinase inhibitor, SB 203580, on allergic airway inflammation in the rat." *Br J Pharmacol* **131**(2): 173-176.
- Espelin, C. W., A. Goldsipe, et al. (2010). "Elevated GM-CSF and IL-1beta levels compromise the ability of p38 MAPK inhibitors to modulate TNFalpha levels in the human monocytic/macrophage U937 cell line." *Mol Biosyst* **6**(10): 1956-1972.
- Ezquerra, A., R. Q. Cron, et al. (1990). "T cell receptor delta-gene expression and diversity in the mouse spleen." *J Immunol* **145**(5): 1311-1317.
- Fabian, M. A., W. H. Biggs, et al. (2005). "A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors." *Nat Biotechnol* **23**, 329-336.
- Forrer, P., R. Tamaskovic, et al. (1998). "Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of JNK, ERK, and p38 kinase activities." *Biol Chem*.
- Foster, M. L., F. Halley, et al. (2000). "Potential of p38 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis." *Drug News Perspect* **13**(8): 488-497.
- Foster, S. J. and L. M. McCormick (1993). "Tumour necrosis factor alpha production by rat blood and its ex vivo pharmacological modulation." *Agents Actions* **39 Spec No: C61-C63**.
- Foster, S. J., L. M. McCormick, et al. (1993). "Production of TNF alpha by LPS-stimulated murine, rat and human blood and its pharmacological modulation." *Agents Actions* **38 Spec No: C77-C79**.
- Gabay, C. (2006). "Interleukin-6 and chronic inflammation." *Arthritis Res Ther* **8 Suppl 2: S3**.
- Gaestel, M., A. Kotlyarov, et al. (2009). "Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation." *Nat Rev Drug Discov* **8**(6): 480-499.
- Genovese, M. C. (2009). "Inhibition of p38: has the fat lady sung?" *Arthritis Rheum* **60**(2): 317-320.
- Godl, K., J. Wissing, et al. (2003). "An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15434-15439.

- Goedert, M., A. Cuenda, et al. (1997). "Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases." *EMBO J* **16**(12): 3563-3571.
- Goldstein, D. M., M. Soth, et al. (2011). "Discovery of 6-(2,4-Difluorophenoxy)-2-[3-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)propylamino]-8-methyl-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Pamapimod) and 6-(2,4-Difluorophenoxy)-8-methyl-2-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylamino)pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one (R1487) as Orally Bioavailable and Highly Selective Inhibitors of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase." *J Med Chem*.
- Goldstein, D. M., N. S. Gray, et al. (2008). "High-throughput kinase profiling as a platform for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov*. **7**(5): 391-397.
- Gonzalez-Mejia, M. E., A. I. Doseff (2009). "Regulation of monocytes and macrophages cell fate." *Front Biosci*. **1**(14): 2413-2431.
- Gray, N. S., L. Wodicka, et al. (1998). "Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors." *Science* **281**(5376): 533-538.
- Groote, D. D., P. F. Zangerle, et al. (1992). "Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation." *Cytokine*.
- Gross, V, T. Andus, et al. (1991). "Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases." *Klin Wochenschr* **69**: 981-987.
- Gruenbaum, L. M., R. Schwartz, et al. (2009). "Inhibition of pro-inflammatory cytokine production by the dual p38/JNK2 inhibitor BIRB796 correlates with the inhibition of p38 signaling." *Biochem Pharmacol* **77**(3): 422-432.
- Habenberger, P., A. Choidas, et al. (2009). "Unterstützung der Identifizierung von Leitstrukturen mit PBMCs." *Laborwelt* **10**(4): 4-6.
- Hale, K. K., D. Trollinger, et al. (1999). "Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages." *J Immunol* **162**(7): 4246-4252.
- Haley, P. J. (2003). "Species differences in the structure and function of the immune system." *Toxicology* **188**(1): 49-71.

- Hammaker, D. and G. S. Firestein (2010). "'Go upstream, young man": lessons learned from the p38 saga." *Ann Rheum Dis* **69 Suppl 1**: i77-i82.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." *Science* **265**(5173): 808-811.
- Hanks, S. K. & T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." *FASEB J* **9**: 576-596.
- Herlaar, E. and Z. Brown (1999). "p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease." *Mol Med Today* **5**(10): 439-447.
- Hill, R. J., K. Dabbagh, et al. (2008). "Pamapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor: preclinical analysis of efficacy and selectivity." *J Pharmacol Exp Ther* **327**(3): 610-619.
- Hommel, D., B. van den Blink, et al. (2002). "Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease." *Gastroenterology* **122**(1): 7-14.
- <http://www.clinicaltrials.gov>, Homepage des "U.S. National Institutes of Health" (Stand: 02/2011)
- Hua, F., P. V. Henstock, et al. (2010). "ERK activation by GM-CSF reduces effectiveness of p38 inhibitor on inhibiting TNF α release." *Int Immunopharmacol* **10**(7): 730-737.
- Imahara, S. D., S. Jelacic, et al. (2005). "The TLR4 +896 polymorphism is not associated with lipopolysaccharide hypo-responsiveness in leukocytes." *Genes Immun* **6**(1): 37-43.
- Ishihara, K. and T. Hirano (2002). "IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(4-5): 357-368.
- Jiang, Y., C. Chen, et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β)." *J Biol Chem* **271**(30): 17920-17926.
- Johansen, C., K. Kragballe, et al. (2005). "The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin." *Br J Dermatol* **152**(1): 37-42.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-1912.

- Joos, H., W. Albrecht, et al. (2009). "Influence of p38MAPK inhibition on IL-1beta-stimulated human chondrocytes: a microarray approach." *Int J Mol Med* **23**(5): 685-693.
- Joos, H. (2009). "Etablierung eines Chondrozyten-basierten In-vitro-Modells zur Testung anti-inflammatorischer Substanzen für die Arthrosetherapie". Dissertation Universität Ulm
- Kaminska, B. (2005). "MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits." *Biochim Biophys Acta* **1754**(1-2): 253-262.
- Kang, Y. J., J. Chen, et al. (2008). "Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation." *J Immunol* **180**(7): 5075-5082.
- Karaman, M. W., S. Herrgard, et al. (2008). "A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity." *Nat Biotechnol* **26**(1): 127-132.
- Kim, C., Y. Sano, et al. (2008). "The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression." *Nat Immunol* **9**(9): 1019-1027.
- Kohut, M., M. Hartleb, et al. (2010). "[Significance of serum concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in identification of patients with Crohn's disease]." *Pol Merkur Lekarski* **29**(171): 169-172.
- Kojima, F., H. Naraba, et al. (2004). "Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis." *Arthritis Res Ther* **6**(4): R355-R365.
- Kopf, M., M. F. Bachmann, et al. (2010). "Averting inflammation by targeting the cytokine environment." *Nat Rev Drug Discov.*
- Korb, A., M. Tohidast-Akrad, et al. (2006). "Differential tissue expression and activation of p38 MAPK alpha, beta, gamma, and delta isoforms in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **54**(9): 2745-2756.
- Kuldo, J. M., J. Westra, et al. (2005). "Differential effects of NF-kappaB and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF-alpha- and IL-1beta-induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro." *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C1229-C1239.

- Kuma, Y., G. Sabio, et al. (2005). "BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **280**: 19472-19479.
- Kumar, S., J. Boehm, et al. (2003). "p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases." *Nat Rev Drug Discov* **2**(9): 717-726.
- Kumar, S., P. C. McDonnell, et al. (1997). "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." *Biochem Biophys Res Commun* **235**(3): 533-538.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* **81**(2): 807-869.
- Laufer, S., C. Greim, et al. (2002). "An in-vitro screening assay for the detection of inhibitors of proinflammatory cytokine synthesis: a useful tool for the development of new antiarthritic and disease modifying drugs." *Osteoarthritis Cartilage*.
- Laufer, S., C. Greim, et al. (2008). "Human whole blood assay for rapid and routine testing of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on cyclo-oxygenase-2 activity." *Inflammopharmacology*.
- Laufer, S. and S. Linsenmaier (2006). "Development of a microsphere-based p38alpha kinase no-wash assay." *J Biomol Screen*.
- Laufer, S., S. Thuma, et al. (2005). "An immunosorbent, nonradioactive p38 MAP kinase assay comparable to standard radioactive liquid-phase assays." *Anal Biochem*.
- Laufer, S. A. and G. K. Wagner (2002). "From imidazoles to pyrimidines: new inhibitors of cytokine release." *J Med Chem*.
- Lebendiker, M. (2002). "Thrombin Cleavage of a GST fusion protein." The Protein Purification Facility at the Wolfson Centre of Applied Structural Biology, <http://wolfson.huji.ac.il/purification/TagProteinPurif/CleavTombin.html>
- Lee, J. C., S. Kumar, et al. (2000). "Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy." *Immunopharmacology* **47**(2-3): 185-201.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." *Nature* **372**(6508): 739-746.
- Lee, J. C. and P. R. Young (1996). "Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms." *J Leukoc Biol* **59**(2): 152-157.

- Lee, M. R. and C. Dominguez (2005). "MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein." *Curr Med Chem* **12**(25): 2979-2994.
- Li, Z., Y. Jiang, et al. (1996). "The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases." *Biochem Biophys Res Commun* **228**(2): 334-340.
- Liu, W., Q. Liang, et al. (2008). "Cell-specific activation profile of extracellular signal-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinases in asthmatic airways." *J Allergy Clin Immunol* **121**(4): 893-902.e2.
- Louis, E., D. Franchimont, et al. (1998). "Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans." *Clin Exp Immunol*.
- Macdonald, T. T. (2010). "Inside the microbial and immune labyrinth: totally gutted." *Nat Med* **16**(11): 1194-1195.
- Malamut, G., C. Cabane, et al. (2006). "No evidence for an involvement of the p38 and JNK mitogen-activated protein in inflammatory bowel diseases." *Dig Dis Sci* **51**: 1443-1453.
- McInnes, I. B. and G. Schett (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Nat Rev Immunol* **7**(6): 429-442.
- McNamee, E. N., C. B. Collins, et al. (2010). "Cell-specific inhibition of p38alpha as a therapeutic strategy for inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **2010** (138): 1237-1239.
- Medicherla, S., J. Y. Ma, et al. (2006). "A selective p38 alpha mitogen-activated protein kinase inhibitor reverses cartilage and bone destruction in mice with collagen-induced arthritis." *J Pharmacol Exp Ther* **318**(1): 132-141.
- Mestas, J. and C. C. W. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." *J Immunol* **172**(5): 2731-2738.
- Mihara, K., C. Almansa, et al. (2008). "A potent and selective p38 inhibitor protects against bone damage in murine collagen-induced arthritis: a comparison with neutralization of mouse TNFalpha." *Br J Pharmacol* **154**(1): 153-164.
- Murakami, K., A. Ueno, et al. (1995). "Thrombin induces GRO alpha/MGSA production in human umbilical vein endothelial cells." *Thromb Res* **79**(4): 387-394.

- Mullard, A. (2011). "2010 FDA drug approvals." *Nat Rev Drug Discov* **10** (2): 82-85.
- Nemeth, E., C. Bole-Feysot, et al. (1998). "Suppression subtractive hybridization (SSH) identifies prolactin stimulation of p38 MAP kinase gene expression in Nb2 T lymphoma cells: molecular cloning of rat p38 MAP kinase." *J Mol Endocrinol* **20**(1): 151-156.
- Neurath, M. F. (2007). "IL-23: a master regulator in Crohn disease." *Nat Med* **13**(1): 26-28.
- Newton, R. and N. Holden (2003). "Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase: potential as anti-inflammatory agents in asthma?" *BioDrugs* **17**(2): 113-129.
- Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." *Cell Signal* **12**(1): 1-13.
- Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* **13**(5): 715-725.
- Otsuka, M., Y. J. Kang, et al. (2010). "Distinct effects of p38alpha deletion in myeloid lineage and gut epithelia in mouse models of inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **138**(4): 1255-65, 1265.e1-9.
- Ouwens, D. M., N. D. de Ruiter, et al. (2002). "Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38." *EMBO J* **21**(14): 3782-3793.
- Page, T. H., A. Brown, et al. (2010). "Inhibitors of p38 suppress cytokine production in rheumatoid arthritis synovial membranes: does variable inhibition of interleukin-6 production limit effectiveness in vivo?" *Arthritis Rheum* **62**(11): 3221-3231.
- Pargellis, C., L. Tong, et al. (2002). "Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site." *Nat Struct Biol* **9**(4): 268-272.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-183.
- Podolsky, D. K. (1991). "Inflammatory bowel disease (1)." *N Engl J Med* **325**(13): 928-937.
- Podolsky, D. K. (1991). "Inflammatory bowel disease (2)." *N Engl J Med* **325**(14): 1008-1016.

- Pont-Giralt, M., N. Godessart, et al. (2010). „Differential Pharmacological Behaviour of p38 Inhibitors in Regulating the LPS-Induced TNF-alpha Production in Human and Rat Whole Blood In Vitro." Inflammation.
- Prabhakar, U., T. M. Conway, et al. (2005). "Correlation of protein and gene expression profiles of inflammatory proteins after endotoxin challenge in human subjects." DNA Cell Biol **24**(7): 410-431.
- Prichett, W., A. Hand, et al. (1995). "Mechanism of action of bicyclic imidazoles defines a translational regulatory pathway for tumor necrosis factor alpha." J Inflamm **45**(2): 97-105.
- Redl, H., S. Bahrami, et al. (1993). "Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia." Immunobiology **187**(3-5): 330-345.
- Reinecker, H. C., M. Steffen, et al. (1993). "Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease." Clin Exp Immunol **94**(1): 174-181.
- Reinisch, W., C. Gasché, et al. (1999). "Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse." Am J Gastroenterol **94**: 2156-2164.
- Renda, T., S. Baraldo, et al. (2008). "Increased activation of p38 MAPK in COPD." Eur Respir J **31**(1): 62-69.
- Ross, J. (1995). "mRNA stability in mammalian cells." Microbiol Rev **59**(3): 423-450.
- Ross, S., T. Chen, et al. (2006). "High-content screening analysis of the p38 pathway: profiling of structurally related p38alpha kinase inhibitors using cell-based assays." Assay Drug Dev Technol **4**(4): 397-409.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-344.
- Rutault, K., C. A. Hazzalin, et al. (2001). "Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF-alpha transcripts." J Biol Chem **276**(9): 6666-6674.

- Sandborn, W. J. (2004). "How future tumor necrosis factor antagonists and other compounds will meet the remaining challenges in Crohn's disease." Rev Gastroenterol Disord **4 Suppl 3**: S25-S33.
- Sandborn, W. J. and S. B. Hanauer (2002). "Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians." Am J Gastroenterol **97**(12): 2962-2972.
- Sarov-Blat, L., J. M. Morgan, et al. (2010). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase reduces inflammation after coronary vascular injury in humans." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(11): 2256-2263.
- Schett, G., J. Zwerina, et al. (2008). "The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **67**(7): 909-916.
- Schreiber, S., B. Feagan, et al. (2006). "Oral p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with BIRB 796 for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Clin Gastroenterol Hepatol **4**: 325-334.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem. **150**(1): 76-85.
- Smith, S. J., P. S. Fenwick, et al. (2006). "Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages." Br J Pharmacol **149**(4): 393-404.
- Sowell, J., L. Strekowski, et al. (2002). "DNA and protein applications of near-infrared dyes." J Biomed Opt **7**(4): 571-575.
- Stallmach, A., T. Giese, et al. (2004). "Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease." Int J Colorectal Dis **19**(4): 308-315.
- Suzuki, K., M. Hino, et al. (1999). "Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha." Blood **93**(1): 341-349.
- Sweeney, S. E. (2009). "The as-yet unfulfilled promise of p38 MAPK inhibitors." Nat Rev Rheumatol **5**(9): 475-477.
- Tang, P., H. M-C, et al. (1996). "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer." Biochemistry **35**(25): 8216-8225.

- Tong, L., S. Pav, et al. (1997). "A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket." *Nat Struct Biol* **4**(4): 311-316.
- Uddin, S., J. Ah-Kang, et al. (2004). "Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 147-152.
- Vacchon, P. H., C. Harnois, et al. (2002). "Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis." *Gastroenterology* **123**: 1980-1991.
- van den Blink, B., N. P. Juffermans, et al. (2001). "p38 mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo." *J Immunol* **166**(1): 582-587.
- van der Bruggen, T., S. Nijenhuis, et al. (1999). "Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway." *Infect Immun* **67**(8): 3824-3829.
- Vfa: Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V., <http://www.vfa.de> (Stand: 02/2011)
- Villiger, P. M., M. T. Cronin, et al. (1991). "IL-6 production by human T lymphocytes. Expression in HTLV-1-infected but not in normal T cells." *J Immunol* **146**(2): 550-559.
- Wadsworth, S. A., D. E. Cavender, et al. (1999). "RWJ 67657, a potent, orally active inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase." *J Pharmacol Exp Ther* **291**(2): 680-687.
- Waetzig, G. H. and S. Schreiber (2003). "Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases." *Aliment Pharmacol Ther* **18**(1): 17-32.
- Waetzig, G. H., D. Seegert, et al. (2002). "p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease." *J Immunol* **168**(10): 5342-5351.
- Wang, Y., S. Huang, et al. (1998). "Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family." *J Biol Chem* **273**(4): 2161-2168.
- Weisz, G., A. Lavy, et al. (1997). "Modification of in vivo and in vitro TNF-alpha, IL-1, and IL-6 secretion by circulating monocytes during hyperbaric oxygen treatment in patients with perianal Crohn's disease." *J Clin Immunol* **17**(2): 154-159.

- Winzen, R., M. Kracht, et al. (1999). "The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism." *EMBO J* **18**: 4969-4980.
- Yaqoob, P., E. A. Newsholme, et al. (1999). "Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells." *Cytokine* **11**(8): 600-605.
- Yi, W.-Q., H.-T. Gan, et al. (2007). "[The effects of p38 mitogen activated protein kinase inhibitor SB203580 on colonic mucosa tumor necrosis factor alpha expression in ulcerative colitis]." *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **46**(9): 747-750.
- Young, P., P. McDonnell, et al. (1993). "Pyridinyl imidazoles inhibit IL-1 and TNF production at the protein level." *Agents Actions* **39 Spec No**: C67-C69.
- Young, P. R., M. M. McLaughlin, et al. (1997). "Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site." *J Biol Chem* **272**(18): 12116-12121.
- Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." *Cell Res* **15**(1): 11-18.
- Zhang, J., B. Shen, et al. (2007). "Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway." *Trends Pharmacol Sci* **28**(6): 286-295.
- Zhang, X., Y. Huang, et al. (2010). "A proof-of-concept and drug-drug interaction study of pamapimod, a novel p38 MAP kinase inhibitor, with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis." *J Clin Pharmacol* **50**(9): 1031-1038.

Lebenslauf

SARAH NICOLE FEHR, geboren am 05.01.1979 in Rottweil

AUSBILDUNG

- 09/2007 – heute **Doktorarbeit** an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität in Tübingen, Doktorvater: Prof. Dr. Stefan Laufer
- 10/2001 – 04/2007 **Biologie Diplomstudium** an der Eberhard Karls Universität in Tübingen
Schwerpunkte: Entwicklungsgenetik, Zellbiologie und Pharmakologie
Diplomarbeit am Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen
Thema: *AtFAF3 als potentielles Substrat einer AtCUL3-AtBPM E3 Ubiquitinligase*
- 09/1998 – 09/2001 **BWL Studium** an der Berufsakademie in Villingen-Schwenningen
Diplom-Betriebswirtin (BA); Bachelor of Arts (B.A.)
Schwerpunkt: Banken und Bausparkassen, Finanzdienstleistungen
- 09/1989 – 06/1998 **Abitur** am Droste-Hülshoff Gymnasium in Rottweil

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

- 03/2009 – 06/2011 **Doktorarbeit** am Dr. Margarete Fischer Bosch Institut für klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart
Arbeitsgruppe Pharmakogenetik (Prof. Dr. Matthias Schwab)
- 09/2007 – 02/2009 **Doktorarbeit** bei c-a-i-r biosciences GmbH in Tübingen
- 04/2005 – 04/2007 **Diplomarbeit und wissenschaftlicher Assistent** am Max Planck Institut (MPI) für Entwicklungsbiologie in Tübingen
Abteilung Molekularbiologie (Prof. Dr. Detlef Weigel)
Arbeitsgruppe: Dr. Markus Schmid (Flowering Time)
- 12/2003 – 06/2004 **wissenschaftlicher Assistent** am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP), Universität in Tübingen
Lehrstuhl Entwicklungsgenetik (Prof. Dr. Gerd Jürgens)
- 2002 – 2003 **Personalreserve** bei der Kreissparkasse in Rottweil
(*Urlaubsvertretung in Zweigstellen, Führung Hauptkasse, Geldtransporte*)
- 09/1998 – 09/2001 **BA-Student** bei der Kreissparkasse Rottweil
Einsatz in allen relevanten innerbetrieblichen Abteilungen mit dem Schwerpunkt Kreditgeschäft