

**Untersuchungen zur suppressiven Wirkung regulatorischer T-Zellen auf den Verlauf der
Pankreatitis im Mausmodell**

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Juliane Glaubitz

Greifswald, Februar 2021

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. G. Kerth

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. M. Delcea

2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. M. Lerch

3. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Rosendahl

Tag der Promotion: 03.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Maße und Einheiten.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreas.....	1
1.2 Die Pankreatitis.....	1
1.3 Rolle des Immunsystems im Verlauf der Pankreatitis.....	2
1.3.1 Das angeborene Immunsystem.....	3
1.3.2 Das adaptive Immunsystem.....	5
1.3.3 Regulatorische T-Zellen.....	6
1.3.4 Das Treg/Th17-Gleichgewicht an immunologische Grenzflächen.....	7
1.4 Remodeling des Pankreasgewebes.....	8
1.5 Zielstellung.....	10
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmittel.....	12
2.1.2 Chemikalien und Kits.....	15
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	19
2.1.4 Oligonukleotide.....	21
2.1.5 Primäre Antikörper.....	22
2.1.6 Sekundäre Antikörper.....	23
2.1.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	23
2.1.8 Software.....	24
2.2 Methoden.....	25

2.2.1	Tierexperimentelle Methoden	25
2.2.1.1	Tierhaltung	25
2.2.1.2	Pankreatitis-Modelle	25
2.2.1.3	DEREG ("Depletion of regulatory T cells") Mäuse.....	26
2.2.1.4	Tötung der Tiere und Organentnahme	26
2.2.2	Durchflusszytometrie und FACS.....	27
2.2.2.1	Zellisolation aus der Milz.....	27
2.2.2.2	Zellisolation aus Dünndarmgewebe.....	27
2.2.2.3	Zellfärbung und Durchflusszytometrie.....	27
2.2.2.4	Zellsorting (FACS)	29
2.2.3	Suppressionsassay.....	29
2.2.4	Histologische Färbungen	30
2.2.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.2.4.2	Masson-Goldner-Färbung	30
2.2.4.3	Azan-Färbung	30
2.2.4.4	Immunhistochemische Färbung.....	31
2.2.4.5	Immunfluoreszenzfärbung.....	31
2.2.5	Myeloperoxidase-Bestimmung der Lunge	32
2.2.6	Bestimmung der Serum-Amylase und -Lipase	32
2.2.7	Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum.....	32
2.2.8	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.8.1	RNA Isolation	33
2.2.8.2	cDNA-Synthese.....	33
2.2.8.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.2.8.4	Quantitative Real-time (Echt-Zeit) PCR.....	35
2.2.9	Statistische Auswertung.....	36

3	Ergebnisse	37
3.1	Anstieg der Tregs in Anzahl und ihrer suppressiven Kapazität während der Pankreatitis	37
3.2	Die Rolle der Tregs in der akuten Pankreatitis	40
3.2.1	Caerulein-induzierte Pankreatitis in DEREK Mäusen	40
3.2.2	Induktion einer schweren nekrotisierende Pankreatitis durch partielle Gangligatur in DEREK Mäusen	43
3.2.3	Eine überschießende Treg-induzierte Immunsuppression führt zu einer Dysbalance der Treg/Th17-regulierten Darmbarriere	46
3.3	Die Rolle der Tregs in der chronischen Pankreatitis	49
3.3.1	Tregs supprimieren eine Th2-Immunantwort	49
3.3.2	Die Th2-Immunantwort beeinflusst die Makrophagendifferenzierung	51
3.3.3	Die pankreatische Fibrose und der Verlust der Azinuszellen wird von antiinflammatorischen Makrophagen und pankreatischen Sternzellen moduliert	52
3.3.4	Die Beteiligung der Tregs am pankreatischen Remodeling-Prozess	55
4	Diskussion	59
4.1	Charakterisierung der T-Zell Antwort	59
4.2	Tregs supprimieren die T-Effektor-Immunantwort und beeinflussen den Schweregrad der akuten Pankreatitis	60
4.3	Im chronischen Pankreatitis-Modell beeinflussen Tregs die Makrophagendifferenzierung und regulieren die Gewebeumstrukturierung	63
4.4	Ausblick/Limitationen	67
5	Zusammenfassung	68
	Abbildungsverzeichnis	IX
	Tabellenverzeichnis	X
6	Literatur	XI
	Anhang	XVIII

Eigenständigkeitserklärung	XXI
Lebenslauf.....	XXII
Veröffentlichungen.....	XXIII
Kongressbeiträge	XXIV
Danksagung	XXV

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>aqua destillata</i> ; destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AREG	Amphiregulin
BSA	<i>bovine serum albumine</i> ; Rinderalbumin
BV	Brilliant Violet
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
Cy	Cyanin-Farbstoff
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
engl.	Englisch
et al.	<i>et alii</i> ; und andere
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; Fötales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>forkhead box protein P3</i>
Fw	<i>forward</i>

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IEL	intraepithelialen Lymphozyten
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleukin
ILC	<i>innate lymphoid cells</i>
INF	Interferon
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	messenger RNA
Mφ	Makrophagen
MPO	Myeloperoxidase
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>

PSC	<i>pancreatic stellate cells</i> ; Pankreatische Sternzellen
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (20 °C)
Rv	<i>reverse</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> ; TRIS-gepufferte Salzlösung
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i> ; TRIS-gepufferte Salzlösung mit <i>Tween20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Treg	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
VEGF α	<i>vascular endothelial growth factor alpha</i>
z.B.	zum Beispiel
α SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>

Maße und Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ-	Mikro- (Einheit) (Millionstel; 10^{-6})
bp	Basenpaar
× g	mal Schwerebeschleunigung (9.81 m/s^2)
g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
Min	Minute
m-	Milli- (Einheit) (Tausendstel; 10^{-3})
M	Molar
n-	Nano- (Einheit) (Milliardstel; 10^{-9})
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
V	Volt
c	Stoffmengenkonzentration
m	Meter
U	<i>Units</i> ; Enzymeinheit
Da	Dalton
d	Tag
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> ($-\log_{10}$ der Wasserstoffionenaktivität)

1 Einleitung

1.1 Das Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse, fachlich auch Pankreas (von griech. pan=“alles“; kreas=“Fleisch“), ist ein längliches, quer verlaufendes, retroperitoneal liegendes Organ. Gegliedert wird das Pankreas in Kopf, Körper und Schwanz. Es besteht aus exokrinem und endokrinem Drüsengewebe. Dabei nimmt das exokrine Gewebe mit etwa 95% den größten Anteil ein und ist für die Produktion von Verdauungsenzymen wie z.B. Lipasen, Amylasen, Proteasen aber auch RNasen und DNasen verantwortlich. Dieses Gewebe besteht aus Drüsenzellen, die man Azinuszellen nennt. In den Azinuszellen werden Verdauungsenzyme sowie deren inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert, in Zymogengranula gespeichert und schließlich über den Pankreasgang in das Duodenum abgegeben. Vor allem Proteasen werden als inaktive Vorstufen synthetisiert und sekretiert, um so das Organ vor einem Selbstverdau zu schützen. Erst im Duodenum wird die inaktive Vorstufe Trypsinogen durch eine membrangebundene Enteropeptidase zu Trypsin aktiviert. Trypsin spaltet wiederum weitere inaktive Verdauungsenzyme des Pankreas, wie z.B. die Pro-Elastase oder auch Chymotrypsinogen [1, 2]. Neben der Produktion von Verdauungsenzymen ist eine weitere Funktion des Pankreas die Hormonproduktion zur Regulation des Blutzuckerspiegels. Diese findet im endokrinen Teil des Pankreas, den Langerhans'schen Inseln, statt. Diese endokrinen Zellen liegen, wie der Name sagt, inselartig zwischen den exokrinen Drüsenzellen [1].

1.2 Die Pankreatitis

Die Pankreatitis ist eine der häufigsten gastrointestinale entzündliche Erkrankung, die mit einem Krankenhausaufenthalt einhergehen. Auslöser für eine akute Pankreatitis können Gallenwegserkrankungen wie z.B. die Obstruktion des Gallengangs durch Gallensteine, oder ein starker Alkoholmissbrauch sein. In den meisten Fällen kommt es nach einer akuten Pankreatitis zu einer vollständigen Heilung ohne bleibende Schäden. Häufig verlaufen die Schübe der akuten und chronischen Pankreatitis selbstlimitierend und ohne schwerwiegende Komplikationen. In etwa 10-15 % der Fälle ist der Verlauf der Erkrankung mit erheblichen lokalen und systemischen Komplikationen, sowie erhöhter Mortalität assoziiert [3].

Bereits vor über einem Jahrhundert nahm der österreichische Pathologe Hans Chiari an, dass die Pankreatitis einer proteolytischen Selbstverdauung entspricht [4]. Dabei werden

Verdauungsenzyme intrapankreatisch aktiviert. Diese verfrühte Aktivierung von Enzymen in der Azinuszelle führt zur nekrotischen Zerstörung von Pankreasgewebe [5]. Vor allem die Aktivierung des Verdauungsenzyms Trypsinogen zu Trypsin spielt eine wichtige Rolle, da es weitere proteolytische und lipolytische Enzyme aktiviert [2]. Im Zuge der Proteaseaktivierung kommt es zur Freisetzung von proinflammatorische Zytokinen und Chemokinen, zudem setzen zerstörte Azinuszellen DAMPs (engl. *damage-associated molecular pattern*) frei [6]. Dies führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten. Makrophagen und Neutrophile infiltrieren als erste Zellen das entzündete Gewebe [7, 8]. Diese Leukozyteninfiltration verstärkt den lokalen Gewebeschaden [8, 9].

Die chronische Pankreatitis ist charakterisiert durch sich wiederholende Pankreatitisepisoden, welche schließlich zu einer Zerstörung des exokrinen und endokrinen Pankreasgewebes sowie zu fibrotischer Remodulierung führen [10, 11]. Dies geht mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines Pankreaskarzinom einher [12]. Zu den Ursachen der chronischen Pankreatitis zählen ein starker Alkoholmissbrauch sowie Keimbahnmutationen, die den Schweregrad der Pankreatitis verstärken können. Diese genetischen Risikofaktoren können Mutationen im Gen des Kationischen Trypsinogens (PRSS1) [13] oder auch Mutationen im Gen des Trypsin-degradierenden Enzyms Chymotrypsin-C (CTRC) [14] oder des Serinprotease Inhibitors SPINK1 [15] betreffen.

Die Inzidenz der Neuerkrankungen liegt in Deutschland bei 16:100.000/Jahr [16, 17]. Die Pankreatitis ist somit eine relativ häufige gastroenterologische Erkrankung. Bis heute gibt es jedoch keine kausale Therapiestrategie, es erfolgt lediglich die Behandlung der Symptome. Bei milden Formen der Pankreatitis erfolgt meist eine Flüssigkeitssubstitution sowie analgetische und enterale Ernährungstherapie. Bei schweren Verläufen werden die Patienten zusätzlich intensivmedizinisch überwacht [18].

1.3 Rolle des Immunsystems im Verlauf der Pankreatitis

In der frühen Phase der Pankreatitis setzen zerstörte Azinuszellen DAMPs frei. Diese induzieren die Aktivierung der PRR (engl. *pattern recognition receptors*) des angeborenen Immunsystems [19]. In Abwesenheit von Pathogenen kommt es zur Rekrutierung und Einwanderung von Immunzellen [20]. Makrophagen und Neutrophile infiltrieren das Gewebe als erstes. Diese Zellen gehören zum angeboren Immunsystem und setzen proinflammatorische Mediatoren, wie IL1 β , IL6 und TNF α , frei [21]. Die ausgeschütteten

Mediatoren locken weitere Makrophagen und Neutrophile an, vergrößern im Verlauf den lokalen Gewebeschaden und bestimmen den Schweregrad der Pankreatitis (siehe Abb. 1). Diese Kaskade kann eine überschießende Immunantwort, welche man SIRS (engl. *systemic inflammatory response syndrom*) nennt, auslösen. Als Gegenregulation (CARS, engl. *compensatory anti-inflammatory response syndrome*) wird die Immunantwort durch Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine herunterreguliert [22]. Durch diese systemische Herunterregulation kann es zu sekundären Infektionen kommen, beispielsweise können kommensale Darmbakterien das Pankreas besiedeln und es können sich infizierte Nekrosen ausbilden [23, 24]. Im Zuge der Pankreatitis kann es aufgrund dieser Dysregulation der Immunantwort zu weiteren systemischen Komplikationen bis hin zum Multiorganversagen kommen, welche ursächlich für die erhöhte Mortalität sind.

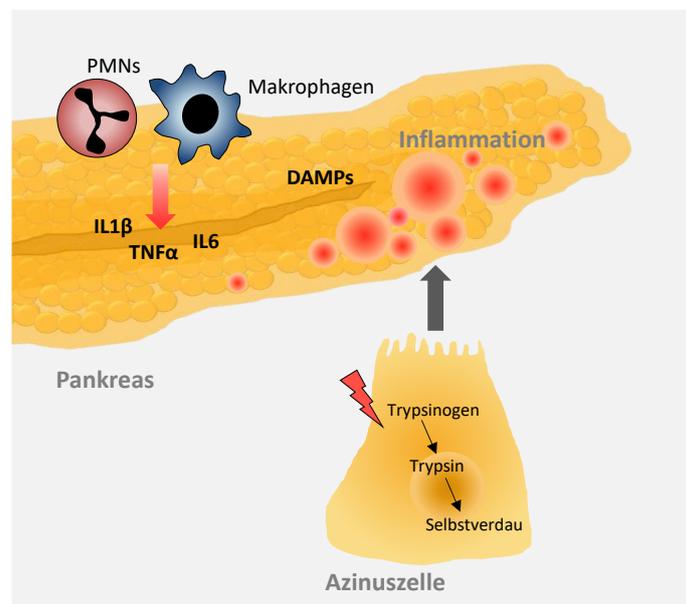


Abb. 1: Infiltration von Zellen des angeborenen Immunsystems als Folge einer verfrühten Aktivierung intrapancreatischer Enzyme.

Die Aktivierung pankreatischer Enzyme in der Azinuszelle führt zur nekrotischen Zerstörung dieser Zellen. In diesem Zusammenhang werden DAMPs freigesetzt und führen zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen. Makrophagen und Neutrophile (PMN: polymorphnukleare Zellen) infiltrieren das Pankreasgewebe und sorgen durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine für die Rekrutierung weiterer Immunzellen. Dieser Prozess verstärkt den lokalen pankreatischen Schaden.

1.3.1 Das angeborene Immunsystem

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems deren Hauptaufgabe die Phagozytose von Pathogenen und Zellschrott ist [25]. Einige Makrophagen entstehen bereits vor der Geburt im Dottersack des Embryos. Diese fötalen Makrophagen wandern in

verschiedene Organe und entwickeln sich dort zu Gewebe-spezifischen Makrophagen, mit unterschiedlichen Namen (Leber – Kupffersche Sternzellen, Gehirn – Mikroglia, Lunge – Alveolarmakrophagen). Diese Gewebe-residenten Makrophagen sind langlebig und können sich selbst erneuern [26, 27]. Auch im gesunden Pankreas findet man diese gewebsständigen Makrophagen [28].

Makrophagen können sich zudem aus myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks entwickeln. Diese Art der Makrophagen sind kurzlebig, können aber schnell gebildet werden. Im Blutstrom differenzieren die myeloiden Vorläuferzellen zu Monozyten, migrieren zum Ort der Entzündung und werden schließlich zu Makrophagen aktiviert [29, 30]. Im Falle der Pankreatitis phagozytieren Makrophagen dort das nekrotische Gewebe [20]. Diese Makrophagen sorgen gemeinsam mit den Gewebe-residenten Makrophagen für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase [27].

Makrophagen können verschiedene Eigenschaften haben. Entsprechend ihrer Zytokinproduktion differenzieren sie zu verschiedenen Subtypen. Proinflammatorische Makrophagen induzieren die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und sind mit einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis assoziiert. Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL6 und IL1 β kann den lokalen Gewebeschaden verstärken und zu einer starken systemischen Immunreaktion (SIRS) führen [8, 31]. Die Polarisation zu antiinflammatorischen Makrophagen findet in späteren Phasen der Erkrankung statt und induziert die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF β oder IL10. Dies führt zu einer Gegenregulation der proinflammatorischen Immunantwort und gleichzeitig zur Induktion der Geweberegeneration bzw. der Wundheilung. Man nimmt an, dass an diesem Prozess vor allem Gewebe-residente Makrophagen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang werden zudem pankreatische Sternzellen aktiviert, welche über die Produktion extrazellulärer Matrixproteine, wie z.B. Kollagene, die nekrotischen Areale durch fibrotisches Gewebe ersetzen [20, 27, 32]. Dies führt letztendlich zum Verlust des exokrinen und endokrinen Pankreasgewebes bis hin zur Pankreasinsuffizienz.

Neutrophile Granulozyten gehören ebenfalls zum angeborenen Immunsystem und infiltrieren, wie auch Makrophagen, zu frühen Zeitpunkten das entzündete Gewebe. Neutrophile setzen reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) und PMN Elastase („Polymorphnuklear-Elastase“) frei um Mikroorganismen zu zerstören. Diese

Freisetzung führt u.a. zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und potenziert somit den pankreatischen Schaden [9, 33, 34].

1.3.2 Das adaptive Immunsystem

Zum adaptiven Immunsystem gehören B- und T-Lymphozyten, deren Rolle im Verlauf der Pankreatitis bisher nur wenig untersucht wurde. Experimente mit T-Zell-defizienten Nacktmäusen zeigten, dass T-Zellen einen direkten Einfluss auf den Schweregrad der Pankreatitis haben [35].

Naive T-Zellen werden im Thymus gebildet und können je nach Stimulus in verschiedene Richtungen differenzieren. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei Formen, T-Helfer Zellen und T-Suppressor Zellen. Beide Zellformen exprimieren unterschiedliche Oberflächenmarker (T-Helfer Zellen CD4+, T-Suppressor Zellen CD8+). Die CD4+ Th-Zellen können wiederum je nach Zytokinstimulation zu verschiedenen Subtypen differenzieren (Th1, Th2, Th17, Treg) [36]. Wie Makrophagen können auch die Th-Zellen pro- oder antiinflammatorische sowie regulatorische Eigenschaften besitzen.

Th1-Zellen (Tbet+/CD4+) sind an der Abwehr intrazellulärer Bakterien beteiligt. Sie produzieren das proinflammatorische Zytokin IFN γ und aktivieren somit Makrophagen. Außerdem werden Th1-Zellen mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [36].

Th2-Zellen (Gata3+/CD4+) interagieren mit B-Lymphozyten über ihre freigesetzten Zytokine und membrangebunden Rezeptoren. Somit vermitteln sie den Klassenwechsel zu IgE. Außerdem rekrutieren Th2-Zellen Eosinophile und sind damit bei der Entstehung von Allergien beteiligt [36].

2005 entdeckte man einen weiteren Subtyp von Th-Zellen, der unabhängig von Th1 und Th2 ist und hauptsächlich auf Zellen außerhalb des Immunsystems wirkt: die Th17-Zellen (R γ t+/CD4+) [37, 38]. Diese Zellen produzieren IL17 und sind vor allem an der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze über Aktivierung neutrophiler Granulozyten beteiligt. Damit induzieren Th17-Zellen eine Gewebeentzündung und haben proinflammatorische Eigenschaften [36]. Aufgrund dieses Zusammenhangs nimmt man auch an, dass Th17-Zellen, wie auch Th1-Zellen, an Autoimmunerkrankungen beteiligt sind [39]. Um Autoimmunerkrankungen zu verhindern, ist ein Gleichgewicht von Th17 und Regulatorischen T-Zellen (Tregs) entscheidend. Kommt es zu einer Verschiebung dieser Balance, kann dies zu

einer Gewebeentzündung mit Entstehung einer Autoimmunerkrankung führen. Das Zusammenspiel von Th17 und Tregs wird im Abschnitt 1.3.4 beschrieben.

Tregs gehören ebenfalls zu den CD4⁺ Th-Zellen. Diese Zellen sind für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz verantwortlich und unterdrücken eine überschießende Immunantwort. Im Abschnitt 1.3.3 werden Tregs genauer beschrieben.

Im Verlauf der Pankreatitis kommt es zu einer Aktivierung von T-Zellen. Dabei beobachtet man, dass T-Zellen das Pankreas nicht infiltrieren. Aus diesem Grund nimmt man an, dass T-Zellen lediglich im Zusammenspiel mit anderen Immunzellen und Zytokinen einen Einfluss auf die Immunantwort während der Pankreatitis haben [40].

1.3.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) gehören zum adaptiven Immunsystem und spielen eine wichtige Rolle bei der Toleranz des Immunsystems gegenüber Selbst- und Fremdanitigenen. Tregs limitieren eine überschießende Immunreaktionen, indem sie die Immunantwort, unabhängig von ihrer Ausrichtung (Typ 1 oder auch Typ 2) supprimieren. Entdeckt wurden diese immunregulatorischen Zellen 1995 [41]. Einige Jahre später identifizierte man FoxP3 als Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor [42, 43]. FoxP3 (Forkhead Box Protein) ist ein Protein mit einer Größe von 47 kDa und besitzt eine Forkhead-Domäne, welche für die Kernlokalisation und DNA-Bindung verantwortlich ist.

Tregs exprimieren auf der Oberfläche die Marker CD4 und CD25. Nach Aktivierung der Zellen werden die Zytokine IL4, IL10 und TGF β freigesetzt [36]. Diese Zytokine supprimieren bzw. induzieren die Differenzierung, Proliferation und Zytokinfreisetzung verschiedener Immunzellen. Neben der Zytokin-vermittelten Suppression können Tregs auch über Zellkontakt-vermittelte Mechanismen auf Immunzellen wirken. Dabei binden die Oberflächenmarker CTLA4 und CD28 auf den Tregs an CD80/CD86 auf Antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. Makrophagen oder Dendritische Zellen [44]. Die Expression der Oberflächenmarker sowie die Interaktion mit Antigenpräsentierenden Zellen ist in Abb. 2 grafisch dargestellt.

Tregs werden im Verlauf der Pankreatitis aktiviert [45]. Der genaue Wirkmechanismus, der dahintersteckt, ist aber bislang noch unerforscht und soll in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

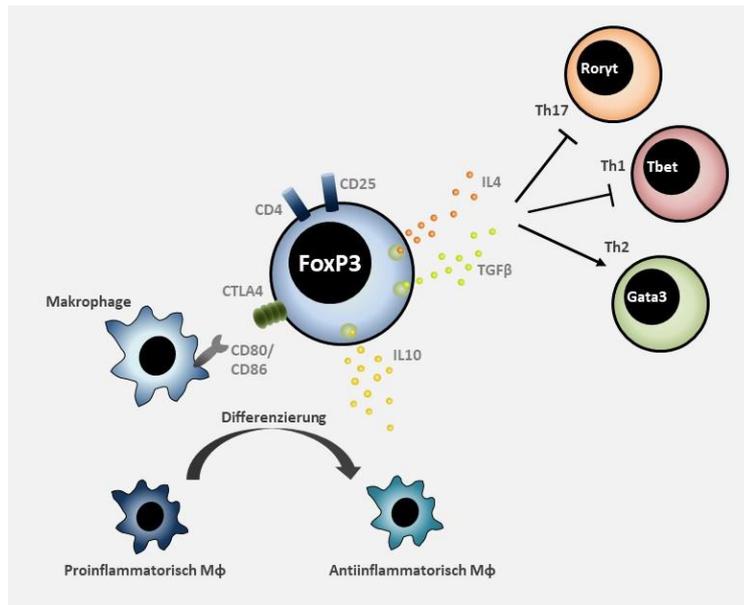


Abb. 2: Charakterisierung von Tregs.

Regulatorische T-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3 sowie die Oberflächenmarker CD4 und CD25. Tregs kontrollieren die Induktion und Proliferation von T-Effektorzellen (Th1, Th2, Th17) über die Freisetzung der Zytokine IL4, TGFβ und IL10. Die Freisetzung von IL10 induziert außerdem die Makrophagendifferenzierung. Die Aktivierung von Makrophagen erfolgt Zellkontakt-vermittelt über den Oberflächenmarker CTLA4.

1.3.4 Das Treg/Th17-Gleichgewicht an immunologische Grenzflächen

Sowohl Tregs als auch Th17-Zellen entwickeln sich auf naiven T-Zellen. Sie haben zwar gegensätzliche Funktionen, werden aber beide durch das Vorhandensein von TGFβ induziert. Dabei ist diese Differenzierung konzentrationsabhängig. Geringe Mengen TGFβ mit gleichzeitigem Vorhandensein von IL6 führt zu einer Entwicklung von Th17-Zellen. Liegt während der T-Zell-Differenzierung viel TGFβ vor, so entstehen vermehrt Tregs. Das Zusammenspiel von Tregs und Th17-Zellen ist besonders an Schleimhautoberflächen wichtig, um eine Gewebemöostase an diesen immunologischen Grenzflächen aufrechtzuerhalten [46].

Beim Menschen bildet der Gastrointestinaltrakt die größte Kontaktfläche zwischen Organismus und Umwelt. Verschiedene Barrieren sorgen für eine Homöostase des intestinalen Immunsystems. Eine mechanische Abgrenzung beider Kompartimente ist durch das Vorhandensein einer Epithelschicht und der schützenden Darmschleimhaut möglich. Epithelzellen werden über adhäsive Zell-Zell Kontakte, so genannte *tight junctions*, miteinander verbunden. Die Darmschleimhaut enthält neben Enzymen zum Nahrungsaufschluss auch das bakterizide Enzym Lysozym. Zu den unspezifischen

Abwehrmechanismen des Darms zählen antimikrobielle Proteine, die von Epithelzellen produziert werden. So werden u.a. Defensine freigesetzt um unerwünschte Mikroorganismen zu eliminieren. Schließlich gibt es noch das darmassoziierte Immunsystem (GALT, engl. *gut associated lymphoid tissue*) welches das größte biologische Abwehrsystem des Menschen ist [47]. Zu den Aufgaben des intestinalen Immunsystem gehört zum einen die Toleranz gegenüber Mikroorganismen und Antigenen, aber zum anderen auch die Kontrolle dieser. Im Gastrointestinaltrakt kommt der Körper mit vielen Nahrungsantigenen und einigen Krankheitserregern in Kontakt. Die Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen wird von Tregs reguliert. Diese Zellen verhindern eine überschießende Immunantwort. Der Körper muss aber ebenfalls auf pathogene Antigene reagieren, um eine systemische Besiedlung zu verhindern. Diese Aufgabe übernehmen Th17-Zellen. Th17-Zellen verstärken die intestinale Immunantwort, indem sie proinflammatorische Zytokine, z.B. IL17, produzieren und somit die Darmschleimhaut vor einer Penetration von Mikroorganismen schützen [47]. Sowohl Th17-Zellen als auch Tregs sind ein Hauptbestandteil des darmassoziierten Immunsystems und sorgen nur im Gleichgewicht für eine Homöostase. Ein Ungleichgewicht in der Treg/Th17-Balance führt zu einer Gewebeentzündung und ist bereits für den Pathomechanismus der entzündlichen Darmerkrankung beschrieben [48].

Auch im Zuge einer Pankreatitis nimmt man an, dass die Darmbarriere beeinflusst wird. Dies ermöglicht kommensalen Darmbakterien eine Translokation zum nekrotischen Pankreasgewebe. Infizierte Nekrosen sind als mögliche Nebenerscheinung einer Pankreatitis bekannt und gehen mit einer deutliche erhöhten Morbidität und Mortalität im klinischen Verlauf einher [24].

1.4 Remodeling des Pankreasgewebes

Zerstörtes Gewebe kann durch ein koordiniertes Zusammenwirken von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen regeneriert werden. Diese Mediatoren werden auch im Zuge der Pankreatitis von zerstörten Pankreaszellen und Immunzellen freigesetzt. Unter anderem werden pankreatische Sternzellen (PSC, engl. *pancreatic stellate cells*) aktiviert [49]. Sternzellen sind in interlobulären und interazinären Bereichen lokalisiert. Aktivierte PSC proliferieren stark und exprimieren das Protein α SMA (engl. *alpha-smooth muscle actin*) [50]. Haber et al. beobachteten eine Ko-Lokalisation von Fibrose und α SMA und nahmen an, dass PSC Kollagenfasern produzieren können. Es ist zudem bekannt, dass PSC von Makrophagen

aktiviert werden können. Makrophagen setzen Mediatoren frei, die die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induzieren [51]. Anhand dieser Beobachtungen nimmt man an, dass auch Makrophagen im Regenerationsprozess involviert sind. Makrophagen sind sehr plastisch. Nach der frühen inflammatorischen Phase, in der Makrophagen eher einen proinflammatorischen Phänotyp annehmen, differenzieren sie in der späten Phase zu antiinflammatorischen Makrophagen. Diese antiinflammatorischen Zellen produzieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF β , IGF-1, VEGF α), die eine Zellproliferation induzieren und somit eine entscheidende Rolle im Wundheilungsprozess spielen [52, 53]. Ein Eingriff in die Makrophagen-Regulation führt zu einem unkontrollierten Regenerationsprozess und schließlich zu einer pathologischen Fibrosierung. Diese Fibrosierung kann zu einer Abnahme des endokrinen und exokrinen Pankreasgewebes sowie einer Einengung kleiner Pankreasgänge bis hin zur Pankreasinsuffizienz führen [54, 55].

Wie bereits erwähnt beeinflusst das Wirken von Wachstumsfaktoren ebenfalls die Regeneration eines Organs. Wachstumsfaktoren wirken über den EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) Signalweg. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der TGF β induzierten Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Persistieren diese Zellen stark im Gewebe führt dies zur Entwicklung einer Fibrose [56, 57]. Eine Überexpression von EGFR ist meist mit der Tumorentstehung assoziiert.

An EGFR binden u.a. EGF (engl. *epidermal growth factor*), TGF α , Epiregulin und Amphiregulin. Amphiregulin gehört zur Typ II Immunantwort [58]. Es wird von antiinflammatorischen Makrophagen und ILC2 (engl. *type 2 innate lymphoid cells*) nach einer Gewebeerstörung synthetisiert und ist vor allem für das Wachstum von Epithelzellen und somit für die Gewebereparatur verantwortlich [59].

Klinische Daten zeigen, dass sich Patienten mit einem akuten Pankreatitisschub von diesem vollständig erholen können. In Tiermodellen konnte zudem gezeigt werden, dass exokrines Pankreasgewebe wiederhergestellt werden kann [60]. Es existieren zwei Modelle, welche die Regeneration des Pankreas beschreiben. Zum einen nimmt man an, dass neue Azinuszellen aus bereits bestehenden Azinuszellen entstehen können. Eine andere Theorie besagt, dass dedifferenzierte Azinuszellen redifferenzieren können [61]. Im Allgemeinen ist die Regeneration des Pankreas bisher wenig untersucht. Man nimmt an, dass der Notch-Signalweg einen Beitrag in diesem Prozess spielt. In Notch-k.o. Mäusen konnte gezeigt werden, dass nach Induktion einer Pankreatitis weniger Azinuszellen vorhanden sind. Somit

scheint der dieser Signalweg an dem Reifungsprozess von Azinuszellen beteiligt zu sein und die exokrine Pankreasregeneration zu beeinflussen [62].

Es wurde außerdem beobachtet, dass während des Regenerationsprozesses vorübergehend weitere Signalwege und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die sonst nur an der embryonalen Pankreasentwicklung beteiligt sind [63]. So werden u.a. die Transkriptionsfaktoren PTF1a und MIST aktiviert, die für die Azinusbildung bzw. Organisation der Zymogengranula verantwortlich sind [64, 65].

Ebenfalls an der Entwicklung des endo- und exokrinem Pankreasgewebes beteiligt sind die Wachstumsfaktoren der Activin-Familie. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass Activine eine wichtige Rolle bei der Induktion von Reparaturvorgängen und Remodeling Prozessen spielen. Activin bildet ein Dimer aus Inhibin- β -Untereinheiten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die gleiche β -Untereinheit kann mit einer Inhibin- α -Untereinheit ein Dimer bilden und so zur Bildung von Inhibin führen [66]. Die Proteine der Inhibin-Familie sind wichtige Gegenregulatoren der Activine. Als weiterer Antagonist ist das Glykoprotein Follistatin bekannt. Dabei neutralisiert Follistatin Activin durch irreversible Bindung und führt schließlich zur Internalisierung von Activin und zur proteolytischen Degranulation [67].

1.5 Zielstellung

Ziel dieser Dissertation ist es die Rolle der regulatorischen T-Zellen auf das Zusammenspiel der Makrophagendifferenzierung und T-Zell-Antwort im Verlauf einer Pankreatitis genauer zu charakterisieren. Dabei soll zunächst untersucht werden inwieweit die T-Zellaktivierung bzw. Differenzierung die Makrophagenpolarisation beeinflusst und somit den Krankheitsverlauf mitbestimmt.

Vor allem soll in dieser Arbeit die suppressive Wirkung der Tregs im akuten und chronischen Pankreatitis Mausmodell genauer untersucht werden. Dazu sollen DREG Mäuse, deren Tregs gezielt depletiert werden können, verwendet werden. Die Regulation der Immunantwort könnte den direkten lokalen Schaden sowie den Verlauf der Erkrankung, sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase beeinflussen. Im akuten Pankreatitis Mausmodell soll die Immunantwort mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen der Milz sowie histologischer Untersuchungen des Pankreas charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang soll auch untersucht werden, inwieweit die Treg/Th17 Balance des intestinalen Immunsystem beeinflusst wird und somit den Krankheitsverlauf mitbestimmt.

Hauptaugenmerk im chronischen Pankreatitis-Mausmodell soll auf der Gewebeumstrukturierung des Pankreas im Verlauf der Erkrankung liegen. Histologische Färbungen sowie Genexpressionsanalysen sollen verwendet werden, um die Gewebeveränderung zu charakterisieren. Anhand dieser Daten soll weiterhin untersucht werden, ob eine therapeutische Steuerung der Immunantwort den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmittel

Laborgeräte und Verbrauchsmittel	Hersteller
384 Well Platten	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)
96-Well Rundbodenplatten	Grainer bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
BD FACSAria™ III <i>Cell Sorter</i>	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD Vacutainer® Serumröhrchen	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD™ LSR II <i>flow cytometer</i>	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BioPhotometer® 6131	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Cryo-Mikrotom	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Cycler	
Mastercycler EP S Thermal Cycler	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
peqSTAR Thermal Cycler	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Deckgläser	R. Langerbrink (Emmendingen, Deutschland)
Eismaschine	Manitowoc Company Inc. (Manitowoc, USA)
Elektrophorese	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
FACS Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
gentleMACS C Tubes	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Heizblock	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Kanülen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Kryoröhrchen	Grainer bio-one (Frickenhausen, Deutschland)

Laborgeräte und Verbrauchsmittel	Hersteller
MACS LS Columns	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MACS Magnetic separator	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Magnetrührgerät RFT	IKA (Staufen, Deutschland)
Micro-Hämatokrit-Kapillaren	BRAND (Wertheim, Deutschland)
Mikroplattenlesegerät SpectraMax 190	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
Mikroskop Olympus FLUOVIEW FV1000	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikrotom	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mikrowelle	Candy (Brugherio, Italien)
Millipore Wasser Aufbereitung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nahtmaterial, Mariderm blau	Catgut GmbH (Markneukirchen, Deutschland)
Nahtmaterial, Polyester, weiß, unbeschichtet	Catgut GmbH (Markneukirchen, Deutschland)
Objektträger	R. Langerbrink (Emmendingen, Deutschland)
OP-Besteck	Carl ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
Petrischalen	Merck (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter HI2211 Basic	Hanna Instruments (Woonsocket, USA)
Photoimager	Alpha Innotech Cell Biosciences (San Leandro, CA, USA)
Photometer, SPECTRAmax Plus384	Molecular Devices
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Laborgeräte und Verbrauchsmittel	Hersteller
Pipettenspitzen	
10 µL	Carl ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
200 µL	Grainer bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
1000 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Qiagen Tissue lyser	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Instrument	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
QuantStudio™ 7 Flex system	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Reaktionsgefäß (0,5 mL/1,5 mL/2,0 mL)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß (15 mL)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäß (50 mL)	Falcon (Amsterdam, Niederlande)
Rotations-Schüttler	UniEquip (Planegg, Deutschland)
Schüttelwasserbad 1092	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Schüttelwasserbad SW22	Julabo (Seelbach, Deutschland)
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Slide Scanner	Sysmex Corporation (Kōbe, Präfektur Hyōgo, Japan)
Sterilwerkbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Tissue-Tec	Sakura (Staufen, Deutschland)
Ultraschallgerät Sonopuls	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Vortexer MS2 Minishaker	IKA (Staufen, Deutschland)
Waagen	
Adventurer® balance Ohaus® ARA520	OHAUS (Greifensee, Schweiz)
Sartorius mc1 AC120S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Zellkultur Inkubator	Binder (Tuttlingen, Deutschland)

Laborgeräte und Verbrauchsmittel	Hersteller
Zellsiebe (50 µm, 70 µm, 100 µm)	Grainer bio-one (Frickenhausen, Deutschland) Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Zellzählgerät Casy®1 Modell TT	Roche Innovatis AG (Bielefeld, Deutschland)
Zentrifugen	
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5402R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Heraeus Pico 21	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Sprout, Microcentrifuge	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)

2.1.2 Chemikalien und Kits

Chemikalien/Kits	Hersteller
Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Amyl-Kit	Roch (Basel, Schweiz)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Azan Färbekit	Morphisto GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)
Bradford-Kit	BioRad (Hercules, CA, USA)
Bromphenol Blau	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Caerulein	Bachem Holding AG (Bubendorf, Schweiz)
CBA Mouse Inflammation Kit	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
DAB Substrate Kit	Vector Laboratories
Dimethyl sulfoxide	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Chemikalien/Kits	Hersteller
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
dNTP mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
DTT (0,1 M)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28	GIBCO®, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
EDTA	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA·2Na	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Eosin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Essigsäure	CHEMSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, Netherlands)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Fast digest green buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Fc-Rezeptor-Block	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
<i>First-Strand Puffer</i> (5 x)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Fluorescence mounting medium	Agilent Dako (Santa Clara, USA)
Formaldehyd 4,5 %; pH7	UniApotheke (Greifswald, Deutschland)
Fötale Kälberserum	GIBCO®, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerol	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
H ₂ O ₂	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Hämatoxylin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

Chemikalien/Kits	Hersteller
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Hexacetyltrimethylammoniumbromid	
High capacity cDNA reverse transcription kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
HPLC Wasser	J.T. Baker (Deventer, Netherlands)
IL2	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Isopropanol	CHEMSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
KCl	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ketamin	Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH (Weyarn, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
KHCO ₃	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Lamina Propria Dissociation Kit, mouse	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
L-glutamine	PAN™ Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Lip-Kit	Roch (Basel, Schweiz)
Masson-Goldner Färbekit	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Medium RPMI 1640 (2 g/L NaHCO ₃)	GIBCO®, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Medium TexMACS™	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Metamizol	MSD Animal Health, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<i>M-MLV Reverse Transcriptase</i> (200 U/μL)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Chemikalien/Kits	Hersteller
Natriumazid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
NH ₄ Cl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
O-dianisidine	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Oligo dT	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Pepton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
peqGold 1 100 bp DNA-ladder	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
peqGold 1 kb DNA-ladder	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ponceau S	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Random Primer	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor</i> (40 U/μL)	Promega (Madison, USA)
Sevofluran	Abbott Laboratories (Chicago, USA)
SYBR™ green PCR master mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Ferak Berlin GmbH (Berlin, Deutschland)
Tween®-20	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Vybrant™ CM-DiI Cell-Labeling Solution	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Xylase	Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH (Weyarn, Deutschland)
Xylene cyanol FF	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
β-mercaptoethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Menge
Agarose Gel	1x TAE-Buffer	
	Agarose	1; 1,5; 2 %
	Ethidiumbromid	1.78 μ M
Blockierlösung (Immunfluoreszenz)	PBS	
	FCS	20 %
DNA-Ladepuffer	H ₂ O	
	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
	Bromphenol Blau	0,03 %
	Xylene cyanol FF	0,03 %
	Glycerol	60 %
	EDTA	60 mM
Erythrozyten-Lyse Puffer (10 x)	H ₂ O	
	NH ₄ Cl	1,5 M
	KHCO ₃	0,1 M
	EDTA·2Na	10 mM
FACS Puffer	PBS	
	Natriumazid	0,02 %
	FCS	2 %
	EDTA	2 mM
HBSS Puffer (1 x)	H ₂ O	
	NaCl	0,14 M
	KCl	5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 mM
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,3 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	D-Glucose (Dextrose)	6 mM
	NaHCO ₃	4 mM

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Menge
LB-Agar (1.5 %)	1x LB-Medium	
	Agar	1,5 g
LB-Medium (10 x)	H ₂ O	
	Pepton	10 %
	Hefeextrakt	5 %
	NaCl	1,71 M
MPO-Extraktionspuffer	H ₂ O	
	KH ₂ PO ₄	50 mM
	Hexacetyltrimethylammoniumbromid	0,5 %
	pH 6,0 (eingestellt mit KOH)	
MPO-Homogenisierungspuffer	H ₂ O	
	KH ₂ PO ₄	20 mM
	pH 7,4 (eingestellt mit KOH)	
MPO-Messpuffer	H ₂ O	
	KH ₂ PO ₄	50 mM
	pH 6,0 (eingestellt mit KOH)	
	O-dianisidine	0,53 mM
	H ₂ O ₂	0,21 %
PBS (10 x)	H ₂ O	
	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	KH ₂ PO ₄	15 mM
	Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	81 mM
	pH 7,4	

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Menge
Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenz)	PBS	
	FCS	20 %
	Triton-X	0,1 %
TAE (10 ×)	H ₂ O	
	Tris	0,4 M
	EDTA (pH 8,0)	10 mM
	Essigsäure	0,2 M

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

Primer	Forward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'
5S	GCCCGATCTCGTCTGATCTC	GCCTACAGCACCCGGTAT TC
Amy2a4	CAAAATGGTTCTCCCAAGGA	ACATCTTCTCGCCATTCCAC
Areg	CTGATCTTTGTCTCTGCCATCA	AGCCTCCTTCTTTCTTCTGTT
Bcl11b	GCAACCCGCAGCACTTGTCCCA	GGCTCCTCTATCTCCAGACCCTC
Claudin1	TCCTTGCTGAATCTGAACA	AGCCATCCACATCTTCTG
Col3a1	ATGGCTCACCAGGACAAAG	CACCAGGACTGCCGTTATT
Defa5	AGGCTGATCCTATCCACAAAACAG	TGAAGAGCAGACCCCTTCTTGGC
EGFP	ACGTAAACGGCCACAAGTTC	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
Fgf1	GATGGCACCGTGGATGGGAC	AAGCCCTTCGGTGTCCATGG
Follistatin	AAAACCTACCGCAACGAATG	TTCAGAAGAGGAGGGCTCTG
IgA	CGTCCAAGAATTGGATGTGA	AGTGACAGGCTGGGATGG
IL10	TTGAATCCCTGGGTGAGAAG	TCCACTGCCTTGCTCTTATTT
IL1β	GAGGACATGAGCACCTTCTTT	GCCTGTAGTGCAGTTGTCTAA
Inhibin βA	GATCATCACCTTTGCCGAGT	TGGTCCTGGTTCTGTTAGCC
Inhibinα	CTCCCAGGCTATCCTTTTCC	TGGCCGGAATACATAAGTGA
Lyz2	ATGGAATGGCTGGCTACTATGG	ACCAGTATCGGCTATTGATCTGA
Mrc1	GCGGAGCATCAAGAGTAAAGA	CATAGGTCAGTCCCAACCAAA
Notch1	GGTGAACAATGTGGATGCTG	GCAACACTTTGGCAGTCTCA
Occludin	ACTCCTCCAATGGCAAAGTG	CCCCACCTGTCGTGTAGTCT
Ptf1a	AGTTATCATCTGCCATCGAG	AGGAAAGAGAGTGCCCTGCAAG

Primer	Forward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'
TGFβ	CGAAGCGGACTACTATGCTAAA	TCCCGAATGTCTGACGTATTG
TRY7	CAACTACCCTTCACTCCTTCAG	TGCCTGGGTAAGAAGCTTGTG
YM1	TCCAGAAGCAATCCTGAAGAC	GTCCTTAGCCCAACTGGTATAG
αSMA	GCCAGTCGCTGTCAGGAACCC	CCAGCGAAGCCGGCCTTACA

2.1.5 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	-	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Anti-Amphiregulin	Ziege	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
Anti-Amylase (sc-46657)	Maus	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
Anti-CD206 (OASA05048)	Ratte	Aviva Systems Biology (San Diego, CA, USA)
Anti-CD3	Ratte	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-CD4 (GK1.5)	Ratte	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-CD8α PE	-	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-CD68 (ABIN181836)	Ratte	Antibodies-online (Aachen, Deutschland)
Anti-CD90.1 (Thy-1.1)	Maus	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Anti-CK19 (ab15463)	Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Collagen (ab34710)	Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-FGFR (D8E4)	Kaninchen	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-FoxP3-PE	-	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Anti-GFP (ab6673)	Ziege	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-InhibinβA (MAK Clone E4)	Maus	Oxford Bio-Innovation (Oxford, UK)
Anti-Ki67	Kaninchen	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
Anti-Ly6g (ab25377)	Ratte	Abcam (Cambridge, UK)

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti- α SMA (1A4)	Maus	Agilent DAKO (Santa Clara, USA)

2.1.6 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Goat IgG-Cy3-Conjugated	Jackson Immun Research (West Grove, PA, USA)
Anti-Goat IgG-FITC-Conjugated	Jackson Immun Research (West Grove, PA, USA)
Anti-Mouse IgG-Cy3-Conjugated	Jackson Immun Research (West Grove, PA, USA)
Anti-Mouse IgG-FITC-Conjugated	Jackson Immun Research (West Grove, PA, USA)
Anti-Rabbit IgG-Cy3-Conjugated	Jackson Immun Research (West Grove, PA, USA)
Anti-Rabbit IgG-FITC-Conjugated	Jackson Immun Research (West Grove, PA, USA)
Anti-Rat IgG-Cy3-Conjugated	Jackson Immun Research (West Grove, PA, USA)
Anti-Rat IgG-FITC-Conjugated	Jackson Immun Research (West Grove, PA, USA)

2.1.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller	Finale Konzentration
CD11b	PerCP/Cy5.5	M1/70	BioLegend®	4 μ g/mL
CD127	BV650	A7R34	BioLegend®	4 μ g/mL
CD163	PE	TNKUPJ	Invitrogen	4 μ g/mL
CD19	BV510	6D5	BioLegend®	2 μ g/mL
CD1d	PE/Cy7	1B1	BioLegend®	4 μ g/mL
CD206	APC	C068C2	BioLegend®	4 μ g/mL
CD25	Alexa647	PC61	BioLegend®	10 μ g/mL
CD25	PE/Cy7	PC61	BioLegend®	4 μ g/mL
CD4	PerCP/Cy5.5	GK1.5	BioLegend®	4 μ g/mL
CD4	BV605	RM4-5	BioLegend®	4 μ g/mL
CD4	BV650	RM4-5	BioLegend®	1 μ g/mL
CD45	PerCP	30-F11	BioLegend®	4 μ g/mL
CD62L	BV510	MEL-14	BioLegend®	10 μ g/mL
CD69	BV510	H1.2F3	BioLegend®	2 μ g/mL
CD8a	BV605	53-6.7	BioLegend®	2 μ g/mL

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller	Finale Konzentration
CD90.2	BV605	30-H12	BioLegend®	4 µg/mL
Gata3	BV421	16E10A23	BioLegend®	1 µg/mL
Gata3	PE	16E10A23	BioLegend®	0,25 µg/mL
Lineage	Alexa647		BioLegend®	
Ly6C	BV605	HK1.4	BioLegend®	1 µg/mL
Ly6G	BV421	1A8	BioLegend®	4 µg/mL
Ly6G	BV421	1A8	BioLegend®	4 µg/mL
Roryt	APC	AFKJS-9	Invitrogen	20 µg/mL
Tbet	BV421	4B10	BioLegend®	8 µg/mL
Tbet	PerCP/Cy5.5	4B10	BioLegend®	10 µg/mL
TCRβ	BV421	H57-597	BioLegend®	1 µg/mL
TCRγδ	PE	GL3	BioLegend®	4 µg/mL

2.1.8 Software

Software	Hersteller
Alpha Innotech	Alpha Innotech Cell Biosciences (San Leandro, CA, USA)
CaseViewer 2.4	Sysmex GmbH (Norderstedt, Deutschland)
CellSens Software	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Citavi 5	Swiss Academic Software (Zürich, Schweiz)
FlowJo_V10	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
ImageJ	NIH (Bethesda, MD, USA)
Inkscape 0.92.1	Free Software (GPL), Inkscape Community
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft PowerPoint 2019	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1.1 Tierhaltung

Für die tierexperimentellen Versuche wurden männliche C57BL/6, sowie männliche und weibliche DREG (genetischer Hintergrund C57BL/6) Mäuse im Alter von 8-16 Wochen verwendet. Diese Tiere stammten von Charles River oder aus eigener Zucht. Die Zucht, Haltung und Durchführung der Experimente erfolgte im Biotechnikum (zentrale Versuchstierkunde) der Universitätsmedizin Greifswald sowie im Forschungscluster III der Universitätsmedizin unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (LALLF 11/17).

2.2.1.2 Pankreatitis-Modelle

Verschiedene Pankreatitis-Modelle für den Organismus Maus sind bereits etabliert. Eine milde akute Pankreatitis wurde durch stündliche intraperitoneale Caerulein-Injektion (50µg/kg Körpergewicht) über acht Stunden induziert. Dafür wurden die Tiere für die vorherige Nacht nüchtern gesetzt, mit Zugang zu Wasser ad libitum. Caerulein ist ein CCK Analogon und führt bei wiederholter Gabe zu einer Überstimulation, verfrühten Freisetzung von Proteasen und somit zu einer Pankreatitis. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte acht Stunden nach der ersten Caerulein-Injektion.

Eine schwere nekrotisierende Pankreatitis wurde durch eine partielle Gangligatur induziert. Unter Vollnarkose wurde der Pankreasgang oberhalb der Mündung des Gallenganges ligiert. Die Narkose erfolgte durch die Kombination von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg i.p.) und Xylazinhydrochlorid (2,5-5 mg/kg i.p.) in PBS. Im Anschluss einer Laparotomie, wurde der Kopf des Pankreas identifiziert und mit Hilfe eines Wattestäbchen freigelegt. Die Ligation des Pankreasganges erfolgte mit einem chirurgischen Faden (4/0 DS19, nicht resorbierbarer PVDF Faden). Anschließend wurde das Abdomen mit einer zweischichtigen Naht (Polyester) verschlossen. Nach der Operation erfolgte eine Schmerzmedikation über das Trinkwasser (Metamizol in einer Dosis von 2 mg/mL Trinkwasser). Die Tiere wurden im weiteren Verlauf hinsichtlich ihres Verhaltens (Körperhaltung, Bewegung und Nahrungsaufnahme) beobachtet. Zwei Tage nach der Operation wurde durch einmalige Gabe von Caerulein (50µg/kg Körpergewicht) die Proteasekaskade aktiviert. Tiere deren Verhalten auf starke Schmerzen

hindeutete, wurden gemäß der Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Am dritten Tag nach Ligatur erfolgte die Aufarbeitung der Tiere.

Eine chronische Pankreatitis wurde durch eine repetitive intraperitoneale Caerulein-Injektion (50µg/kg Körpergewicht) sechs Mal am Tag, drei Tage die Woche und über vier Wochen induziert.

2.2.1.3 DEREK (“Depletion of regulatory T cells”) Mäuse

In DEREK Mäusen wird der Diphtheriatoxinrezeptor unter Kontrolle des Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimiert. Dieser Transkriptionsfaktor kommt hauptsächlich im Zellkern von regulatorischen T-Zellen (Tregs) vor. Bei Gabe des Diphtherietoxins kann dieses Toxin an den Rezeptor auf Tregs binden und diese Zellen spezifisch depletieren [68].

DEREK Mäuse wurden sowohl für das akute Pankreatitis-Modell als auch für das chronische Modell verwendet. Tregs wurden drei Tage vor und am Tag der Operation und im chronischen Modell jeweils eine Stunde vor der ersten Caerulein-Injektion depletiert. Dafür wurde 1 µg Diphtherietoxin in 200 µL i.p. injiziert. Kontrolltiere bekamen stattdessen eine i.p. PBS-Injektion.

2.2.1.4 Tötung der Tiere und Organentnahme

Entsprechend der jeweiligen Zeitpunkte wurden die Tiere mittels Sevofluran in Narkose gesetzt und anschließend das Blut retroorbital entnommen. Das Blut wurde in einem Serumröhrchen abzentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde abgenommen und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert.

Nach der Blutentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Pankreas, Milz, Lunge, Lymphknoten und Darm wurden entnommen und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder für histologische Analysen in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet, bzw. zusätzlich mittels Tissue-Tec cryo-eingebettet.

Außerdem wurden Milz und Dünndarm für durchflusszytometrische sowie FACS Analysen entnommen.

2.2.2 Durchflusszytometrie und FACS

2.2.2.1 Zellisolation aus der Milz

Zur Isolation der Splenozyten wurde die Milz mittels 2 mL Spritzenstempel durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt, welches anschließend mit PBS gespült wurde. Nach der Zentrifugation (1200 rpm, 6 min) erfolgte eine Erythrozytenlyse mit einem Ammoniumchlorid-haltigen Puffer (1 mL/Milz, 5 min bei RT). Die Reaktion wurde durch Zugabe von PBS (auf 20 mL auffüllen) abgestoppt und das Zellpellet durch erneute Zentrifugation gewonnen. Die Bestimmung Splenozyten-Zellzahl erfolgte mit dem Zellzählgerät Casy®1 Model TT.

2.2.2.2 Zellisolation aus Dünndarmgewebe

Zur Isolation von Zellen der Lamina Propria sowie intraepitheliale Lymphozyten wurde ein Dünndarmstück mit einer Länge von 3-5 cm verwendet. Das Gewebe wurde gründlich gewaschen, gespült sowie von Fett und Peyer-Plaques befreit. Anschließend erfolgte die Zellisolation mit Hilfe des *Lamina Propria Dissociation Kit mouse* (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben.

2.2.2.3 Zellfärbung und Durchflusszytometrie

1×10^6 Zellen wurden für Durchflusszytometrische-Analysen in einem FACS Röhrchen gefärbt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit FACS Puffer gewaschen (1200 rpm, 6 min) und das Zellpellet anschließend mit 1 µL Fc-Block in 25 µL FACS Puffer gelöst und 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µL des Antikörpergemischs (in FACS Puffer) für die extrazelluläre Färbung (je nach FACS Panel siehe Tab. 1, Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4) dazugegeben (Inkubation 30 min, 4 °C).

Für eine intrazelluläre Färbung mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden (*Transcription Factor Staining Buffer Set*, Miltenyi Biotec; siehe Angaben des Herstellers). Nach der Permeabilisierung erfolgte erneut eine Inkubation mit 1 µL Fc-Block (in 25 µL FACS Puffer, 5 min, 4 °C) sowie mit 25 µL Antikörpergemisches (in FACS Puffer) für die intrazelluläre Färbung (je nach FACS Panel siehe Tab. 1, Tab. 3, Tab. 4) (30 min, 4 °C).

Nach den Färbeschritten wurden die Zellen in 150 µL FACS-Puffer resuspendiert, im Durchflusszytometer (BD, *LSRII*) analysiert und mit *FlowJo* ausgewertet.

Tab. 1: T-Zell Panel 1

Antikörper	Farbstoff	Verdünnung
Anti-CD4 (extrazellulär)	PerCP/Cy5.5	1:50
Anti- CD25 (extrazellulär)	Alexa647	1:50
Anti-CD69 (extrazellulär)	BV510	1:50
Anti-Gata3 (intrazellulär)	PE	1:10
Anti-Tbet (intrazellulär)	BV421	1:10

Tab. 2: Makrophagen Panel

Antikörper	Farbstoff	Verdünnung
Anti-CD4 (extrazellulär)	BV650	1:50
Anti- CD11b (extrazellulär)	PerCP/Cy5.5	1:50
Anti-Ly6G (extrazellulär)	BV421	1:50
Anti-Ly6C (extrazellulär)	BV605	1:50
Anti-CD206 (extrazellulär)	APC	1:50
Anti-CD163 (extrazellulär)	PE	1:50
Anti-CD62L (extrazellulär)	BV510	1:50

Tab. 3: T-Zell Panel 2

Antikörper	Farbstoff	Verdünnung
Anti-CD4 (extrazellulär)	PerCP/Cy5.5	1:50
Anti- CD8a (extrazellulär)	BV605	1:50
Anti-CD25 (extrazellulär)	PE/Cy7	1:50
Anti-CD69 (extrazellulär)	BV510	1:50
Anti-Gata3 (intrazellulär)	PE	1:10
Anti-Tbet (intrazellulär)	BV421	1:10
Anti-Roryt (intrazellulär)	APC	1:10

Tab. 4: ILC Panel

Antikörper	Farbstoff	Verdünnung
Anti-CD45 (extrazellulär)	PerCP	1:50
Anti- CD90 (extrazellulär)	BV605	1:50
Anti-CD127 (extrazellulär)	BV650	1:50
Lineage (extrazellulär)	Alexa647	1:20
Anti-Gata3 (intrazellulär)	PE	1:10

Anti-Tbet (intrazellulär)	BV421	1:10
Anti-Roryt (intrazellulär)	APC	1:10

Tab. 5: TCR-Panel

Antikörper	Farbstoff	Verdünnung
Anti-CD8 α (extrazellulär)	PE/Cy5	1:50
Anti- CD4 (extrazellulär)	BV605	1:50
Anti-TCR $\gamma\delta$ (extrazellulär)	PE	1:50
Anti-TCR β (extrazellulär)	BV421	1:50
Anti-CD25 (extrazellulär)	Alexa Fluor 647	1:50
Anti-CD19 (extrazellulär)	BV510	1:50
Anti-CD1d (extrazellulär)	Pe/Cy7	1:50

2.2.2.4 Zellsorting (FACS)

Für FACS Analysen wurde die Zellsuspension nach der Splenozyten Isolation auf 10×10^6 Zellen/mL eingestellt und anschließend erneut durch ein 70 μ m Zellsieb gegeben. In einem 15 mL Falcon wurden alle GFP+ Tregs mit Hilfe des Zellsorters (BD, *FACSAria™ III Cell Sorter*) isoliert und in TexMACS Medium aufgefangen.

2.2.3 Suppressionsassay

Mit Hilfe eines Suppressionsassays kann die suppressive Aktivität von Zellen untersucht werden. Zur Bestimmung der suppressiven Aktivität von Tregs wurden diese wie in 2.2.2.4 beschrieben isoliert und mit naiven CD4+ T-Zellen für fünf Tage inkubiert. Dafür wurden naive CD4+ T-Zellen aus der Milz von C57BL/6 Mäusen nach Herstellerangaben isoliert (*Naive CD4+ T Cell Isolation Kit, Mouse*, Miltenyi Biotech). Nach der Isolation wurden 1×10^6 T-Zellen/mL mit dem Farbstoff CM-Dil nach Herstellerangaben gefärbt (*Vybrant™ CM-Dil Cell-Labeling Solution*, Invitrogen). Anschließend wurden die T-Zellen mit CD3/CD28 Beads (2 μ L/Well) und IL2 (100 U/mL) aktiviert. Die Ko-Inkubation der CD4+ Zellen und Tregs erfolgte in verschiedenen Verhältnissen (1:1, 2:1, 4:1, 8:1). Dabei wurden immer 4×10^4 T-Zellen/Well mit der entsprechenden Menge Tregs als Dreifachbestimmung inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen geerntet und jeweils drei Wells vereint. Anschließend wurden die Beads mit Hilfe eines Magneten entfernt. Die Zellen wurden mit anti-CD4 PerCP/Cy5.5 (1:50) und anti-CD25 PE Cy7 (1:50) gefärbt und schließlich im Durchflusszytometer (BD, *LSRII*) analysiert und mit *FlowJo* ausgewertet.

2.2.4 Histologische Färbungen

Von verschiedenen Organen, wie Pankreas, Lunge, Milz und Darm, wurden 1-2 µm dicke Paraffin- und Cryo-Schnitte angefertigt.

2.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung wird in der Histologie eingesetzt, um verschiedene Strukturen eines Gewebes anzufärben. Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen blau (z.B. Zellkerne). Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle acidophilen beziehungsweise basischen (eosinophilen) Strukturen rot. Dies sind vor allem die Zellplasmaproteine.

Paraffinschnitte wurden zunächst mit Xylol und Methanol entparaffiniert und anschließend in absteigender Alkoholreihe durch Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Schließlich wurden die Präparate die Alkoholreihe heraufgeführt, mit Xylol behandelt und mit VectaMount eingedeckelt.

2.2.4.2 Masson-Goldner-Färbung

Mittels Masson-Goldner-Färbung kann man Bindegewebe kontrastiert zur Umgebung (Zytoplasma, Muskelfasern) anfärben.

Die Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Masson-Goldner Färbekit, Merck KGaA). Dafür wurden ebenfalls Paraffinschnitte mit Xylol und Methanol entparaffiniert und anschließend in absteigender Alkoholreihe mit Hämatoxylin nach Weigert gefärbt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Azophloxin (Zytoplasma) und Phosphorwolframsäure (Muskelgewebe, Erythrozyten). Abschließend wurden mit Hilfe von Lichtgrün Bindegewebe angefärbt. Schließlich wurden die Präparate die Alkoholreihe heraufgeführt, mit Xylol behandelt und mit VectaMount eingedeckelt.

2.2.4.3 Azan-Färbung

Mit Hilfe einer Azan-Färbung nach Heidehain können Zellkerne, Kollagenstrukturen und Zytoplasma differenziert werden. Dabei dient der rote Farbstoff Azokarmin zur Kernfärbung und der blaue Farbstoff Anilin zur Färbung von Bindegewebsstrukturen.

Die Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Färbekit: Azan nach Heidenhain, MORPHISTO GmbH) und wurde schließlich mit VectaMount eingedeckelt.

2.2.4.4 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbungen werden eingesetzt um Proteine oder andere Strukturen mit Hilfe von markierten Antikörpern nachzuweisen.

Wie auch in den vorherig beschriebenen Färbemethoden wurden Paraffinschnitte zunächst in Xylol und Methanol entparaffiniert und anschließend in absteigender Alkoholreihe bis PBS geführt. Danach wurden die Schnitte für 30 min in DACO Antigenretrieval Lösung gekocht und in PBS abgekühlt. Anschließend behandelte man die Schnitte für 20 min mit 3% H₂O₂, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurde für 1 h mit 20 % FCS (in PBS) geblockt. Der primäre Antikörper wurde ebenfalls in 20 % FCS gelöst (1:100, 1:200 bzw. 1:500) und über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde ein Peroxidase-gekoppelter, sekundärer Antikörper auf die Schnitte gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde eine DAB-Färbung (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Färbung wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und je nach gewünschtem Färbegrad mit A. dest abgestoppt. Schließlich wurden die Schnitte Hämatoxylin gefärbt und mit VectaMount eingedeckelt.

2.2.4.5 Immunfluoreszenzfärbung

Ebenso wie die Immunhistochemische Färbung werden auch bei der Immunfluoreszenzfärbung markierte Antikörper eingesetzt um bestimmte Strukturen sichtbar zu machen. Hierbei sind die Antikörper fluoreszenzmarkiert.

Paraffinschnitte wurden wie in 2.2.4.4 beschrieben entparaffiniert und in DACO Antigenretrieval Lösung gekocht. Anschließend wurde für 20 min mit 1% Natriumborhydrit inkubiert, um die Autofluoreszenz zu blocken. Nach dreimaligem Waschen mit PBS konnten die Schnitte in 20 % FCS/PBS für 1 h bei 4 °C blockiert werden.

Cryoschnitte wurden zunächst in 20% Aceton bei -20°C für 15 min fixiert und anschließend mit 20 % FCS/PBS für 1 h bei 4 °C blockiert.

Der primäre Antikörper wurde ebenfalls in 20 % FCS gelöst (1:100, 1:200 bzw. 1:500) und über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde ein Fluoreszenz-gekoppelter Sekundär-Antikörper auf die Schnitte gegeben und für 1 h bei RT inkubiert (siehe 2.1.6). Nach drei weiteren Waschschrritten wurde eine Dapi-Färbung durchgeführt und die Schnitte schließlich in *Fluorescence Mounting Medium* (Dako) eingedeckelt.

2.2.5 Myeloperoxidase-Bestimmung der Lunge

Myeloperoxidase ist ein Enzym, das in Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Das Enzym spielt eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen und seine Aktivität kann somit als Indikator für einen Organschaden verwendet werden.

Zur Gewebekomogenisierung wurden die bei -80°C eingelagerten Lungenproben mit 500 µL Homogenisierungspuffer versetzt und mit Hilfe eines Douncers zerkleinert. 100 µL Gewebesuspension wurden für die Proteinbestimmung abgenommen und zweimal für 10 s mit Ultraschall behandelt und anschließend bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Rest (400 µL) wurden ebenfalls zentrifugiert (10.000 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µL Extraktionspuffer aufgenommen. Alle Proben wurden nun viermal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C aufgetaut. Danach wurden die Proben zweimal für 10 s mit Ultraschall behandelt und 10 min bei 10.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die MPO Bestimmung abgenommen und bei -80°C gelagert. Auf 10 µL Probe wurden 90 µL Substratlösung (0,167 mg/mL o-Dianisidin, 0,21 % H₂O₂) gegeben. Direkt im Anschluss erfolgte die photometrische Messung (460 nm) über 10 min, bei 30 °C gegen einen Standard (aufgereinigte Myeloperoxidase). Für die Auswertung wurde der lineare Anstieg der Enzymaktivität gewählt und mit dem jeweiligen Proteingehalt verrechnet.

2.2.6 Bestimmung der Serum-Amylase und -Lipase

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Amylase und Lipase im Serum der Tiere erfolgte mit Hilfe eines Kits der Firma Roche-Hitachi nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde das Serum 1:50 in A. dest verdünnt und je 10 µL dieser Verdünnung mit 90 µL des jeweiligen Substrates versetzt. Die photometrische Messung erfolgte als Dreifachbestimmung bei 37 °C. Die Enzymaktivitäten wurden als Verlaufskinetik über 30 min gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm für Amylase bzw. 570 nm für Lipase. Der lineare Anstieg der Enzymaktivität wurde für die Auswertung genutzt.

2.2.7 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum

Die Konzentrationsmessung verschiedener Zytokine im Serum der Tiere wurde als FACS Analyse über fluoreszierende antikörpergekoppelte Beads durchgeführt. Dazu wurde das *CBA mouse inflammation Kit* nach Hersteller Angaben verwendet.

2.2.8 Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1 RNA Isolation

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden die jeweiligen Organe zunächst mit Hilfe des *TissueLyser II* homogenisiert. Dazu wurde das Gewebe direkt in einem 2 ml-Eppendorfgefäß mit 500-1000 µL TRIzol™ behandelt und anschließend durch Zugabe von Edelstahl-Kugel im *TissueLyser II* zerkleinert. Die Zellsuspension wurde danach mit 200 µL Chloroform (je 1 mL TRIzol™) versetzt und für 2 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 15 min, 4 °C) erfolgte die Trennung der Zellsuspension in drei Phasen: die obere farblose Phase enthält die RNA; die mittlere Phase bezeichnet man als Interphase und enthält die DNA; und die untere Phase ist die Phenol-Chloroform Phase. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues 2 mL Gefäß pipettiert. Durch Zugabe von 500 µL Isopropanol kam es zur Ausfällung der RNA (Inkubation für 10 min bei RT). Nach anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das erhaltene RNA Pellet mit 1 mL 75 % Ethanol (je 1 mL TRIzol™) gewaschen. Schließlich wurde das Pellet bei RT getrocknet und je nach Größe in 30 – 100 µL RNase-freiem Wasser gelöst, für 10 min bei 55 °C und zusätzlich über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die jeweilige RNA Konzentration wurde mittels *Eppendorf BioPhotometer® 6131* gemessen.

2.2.8.2 cDNA-Synthese

Für Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Realtime-PCR muss die RNA in komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA – *complementary DNA*) umgeschrieben werden. Diese Reverse Transkription erfolgte mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase, Random Hexamere und Oligo-dT-Primer. Die Reaktion wurde am *Eppendorf Mastercycler ep Gradient 5341* durchgeführt. Die verwendeten Substanzen sowie das verwendete Temperaturprofil sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Komponenten und Temperaturprofil der cDNA Synthese

Substanz	Volumen je Ansatz	Menge
Gesamt RNA	1 μ L	2 μ g
A. dest	9 μ L	
dNTP-Mix (10 mM)	1 μ L	0,5 mM
Oligo dT (100 μ M)	1 μ L	5 μ M
Random Primer (3 μ g/ μ L)	0,5 μ L	75 ng
Schritt	Temperatur	Zeit
Primer Anlagerung	65 °C	5 min
	Eis	1 min
Substanz	Volumen je Ansatz	Menge
<i>First-Strand Puffer</i> (5 x)	4 μ L	1 x
DTT (0,1 M)	2 μ L	0,01 M
<i>RNaseOUTTM Recombinant Ribonuclease Inhibitor</i> (40 U/ μ L)	1 μ L	40 U
<i>M-MLV Reverse Transcriptase</i> (200 U/ μ L)	1 μ L	200 U
Schritt	Temperatur	Zeit
Primer Anlagerung	25 °C	10 min
Reverse Transkription	37 °C	90 min
Inaktivierung	95 °C	5 min

2.2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) wurde von Mullis *et al.* [69] entwickelt und dient der Amplifikation von DNA Fragmenten spezifischer DNA Sequenzen. Basierend auf sich wiederholenden Temperaturgradienten denaturiert die ursprüngliche DNA, erfolgt die Bindung von Primer an den Einzelstrang und schließlich die enzymatische Replikation der DNA. Dafür verwendet man thermostabile DNA Polymerase. Die eingesetzten Substanzen und deren Zusammensetzung sind in Tab. 7 dargestellt. Die Reaktion wurde am *peqlab Thermalcycler* durchgeführt.

Tab. 7: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches

Substanz	Volume	Menge
10× CoralLoad PCR Buffer	1 µL	1 ×
Template	1 µL	1:10
Primer Forward (10 µM)	0,2 µL	200 nM
Primer Reverse (10 µM)	0,2 µL	200 nM
dNTP (2,5 mM)	0,5 µL	125 nM
5× Q Solution	1,0 µL	2×
<i>taq-DNA-Polymerase</i>	0,125 µL	1 U
A. dest.	ad 10 µL	-

Tab. 8: Temperatur-Zeit-Programm des Thermalcyclers

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1 ×
Denaturierung	94 °C	30 sec	} 35 ×
Annealing	Variable	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Final Elongation	72 °C	10 min	1 ×

2.2.8.4 Quantitative Real-time (Echt-Zeit) PCR

Die Quantifizierung der Genexpression von Zielgenen kann mittels quantitativer *Real-time* PCR untersucht werden. Diese Methode basiert auf einer sequenzspezifischen Amplifikation der cDNA in Echtzeit. Dabei verwendet man einen Farbstoff (SYBR® Green) der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Intensität von SYBR® Green steigt nach jedem PCR Zyklus und wird im Amplifikationplot detektiert [70]. Die Fluoreszenzintensität der Bindung an doppelsträngige DNA ist stärker als die Bindung an einzelsträngige DNA. Spezifische Primer werden verwendet, um gewünschte DNA-Fragmente zu detektieren. Der Ct-Wert definiert den PCR-Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund abhebt.

Für die Durchführung quantitative Real-time PCR verwendete man *SYBR® Green PCR Master Mix* (2 ×), 100 nM der jeweiligen Primer (*reverse* und *forward*) und 1 µL cDNA (1:10 Verdünnung) in einer Zweifachbestimmung (5 µL je Well). Eine NTC Kontrolle, welche statt cDNA Wasser enthält wurde verwendet, um Kontaminationen auszuschließen.

Das *Fast Real-Time PCR System 7900HT* (Applied Biosystems) wurde nach dem Standardtemperaturprofil verwendet, die jeweilige Annealing Temperatur wurde angepasst. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Die mittleren C_t -Werte der Zweifachbestimmung wurden von den mittleren C_t -Werten des Housekeeping Gens 5S subtrahiert (ΔC_t -Wert). Durch erneute Subtraktion der ΔC_t -Wert unbehandelter Kontrolltiere wurde auf die basale Expression normiert ($\Delta\Delta C_t$ -Wert). Schließlich wurde durch die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Berechnung die relative Genexpression ermittelt.

2.2.9 Statistische Auswertung

Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und *GraphPad Prism 5.01* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) wurden zur Berechnung der Daten, zum Erstellen von Diagrammen und für die statistische Auswertung verwendet. Durchflusszytometrische-Analysen wurden mittels *FlowJo V10* (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Zur Evaluierung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der Student's t-Test verwendet. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der Tregs auf den Pathomechanismus der Pankreatitis und der damit verbundenen Immunantwort.

Hierfür wurden verschiedene Pankreatitis-Modelle in C57BL/6 sowie DREG Mäusen induziert. Diese Modelle weisen zum einen Merkmale einer schweren nekrotisierenden akuten Pankreatitis und zum anderen einer fibrotisch chronischen Pankreatitis auf. Mit Hilfe dieser Modelle wurden sowohl die lokale als auch die systemische Immunantwort untersucht. Dabei wurde besonders die Rolle der Tregs und deren Wirkung auf die Makrophagen/Monozyten- sowie der T-Zell-Antwort untersucht und die dadurch entstandene Gewebeveränderung charakterisiert.

3.1 Anstieg der Tregs in Anzahl und ihrer suppressiven Kapazität während der Pankreatitis

Zu Beginn der Arbeit wurde die T-Zell-Antwort während der Pankreatitis im Allgemeinen beschrieben. Dazu wurde eine partielle Gangligatur in C57BL/6 Mäusen induziert. Die Untersuchung der Immunantwort erfolgte nach 2 d, 3 d und 5 d nach Induktion einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde die Milz entnommen, die Splenozyten isoliert und extrazelluläre Oberflächenmarker sowie Transkriptionsfaktoren gefärbt. Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die T-Zell-Antwort charakterisiert. Die Oberflächenexpression von CD25 wurde genutzt, um die T-Zellaktivierung zu quantifizieren. Dabei wurde beobachtet, dass T-Zellen zu allen Zeitpunkten signifikant aktiviert wurden (Abb. 3A). Des Weiteren wurde die T-Zelldifferenzierung untersucht, indem die Transkriptionsfaktoren Tbet, Gata3 und FoxP3 gefärbt wurden. Tbet ist ein typischer Transkriptionsfaktor, der in Th1 Zellen exprimiert wird. Es konnte keine Veränderung in der Th1 Immunantwort während der Pankreatitis beobachtet werden (Abb. 3B). Die Analyse Gata3⁺ T-Zellen zeigte jedoch einen signifikanten Anstieg drei und fünf Tage nach der Induktion einer Pankreatitis (Abb. 3C). Zudem beobachtete man einen Anstieg von FoxP3⁺/CD25⁺ CD4⁺ Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abb. 3D). Diese Zellpopulation bezeichnet man als Tregs. Die genaue Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analyse befindet sich in Anhang 1.

Immunfluoreszenzfärbungen von Lymphknoten zeigten, dass FoxP3⁺ Zellen ebenfalls CD4⁺ sind und in ihrer Anzahl anstiegen (Abb. 3E). Eine Ko-Färbung von FoxP3 und DAPI verdeutlichte die intranukleäre Expression von FoxP3 (Abb. 3F).

Neben einer partiellen Gangligatur wurde ein weiteres Modell genutzt, um eine akute Pankreatitis in C57BL/6 Mäusen zu induzieren. Dazu erfolgte eine stündliche Injektion von 50 µg/kg Caerulein über acht Stunden. Es konnte eine Induktion von Tregs sowohl nach 3 d Ligation als auch nach 8 h Caerulein-Injektion beobachtet werden (Abb. 3G).

Um die Funktionalität von Tregs zu untersuchen, verwendete man einen Suppressionsassay. Dazu wurden Tregs zusammen mit T-Effektorzellen inkubiert und schließlich wurde die Proliferation von T-Effektorzellen analysiert. Um die Proliferation der T-Effektorzellen zu quantifizieren, wurden diese Zellen zuvor mit dem CM-Dil Farbstoff gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich in die Zellmembran ein und verliert nach jeder Zellteilung an Intensität. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität lässt somit Rückschlüsse auf die Teilungsrate der T-Effektorzellen zu. Es wurden sowohl Tregs von Kontrolltieren als auch von Pankreatitistieren isoliert und mit T-Effektorzellen aus gesunden Tieren inkubiert. Man erkennt deutlich, dass eine 1:1 Ko-Inkubation von 3 d Tregs und T-Effektorzellen in einer signifikanten Abnahme der T-Effektorzellproliferation resultiert (Abb. 3H). Die dazu verwendete Gatingstrategie ist im Anhang 2 dargestellt.

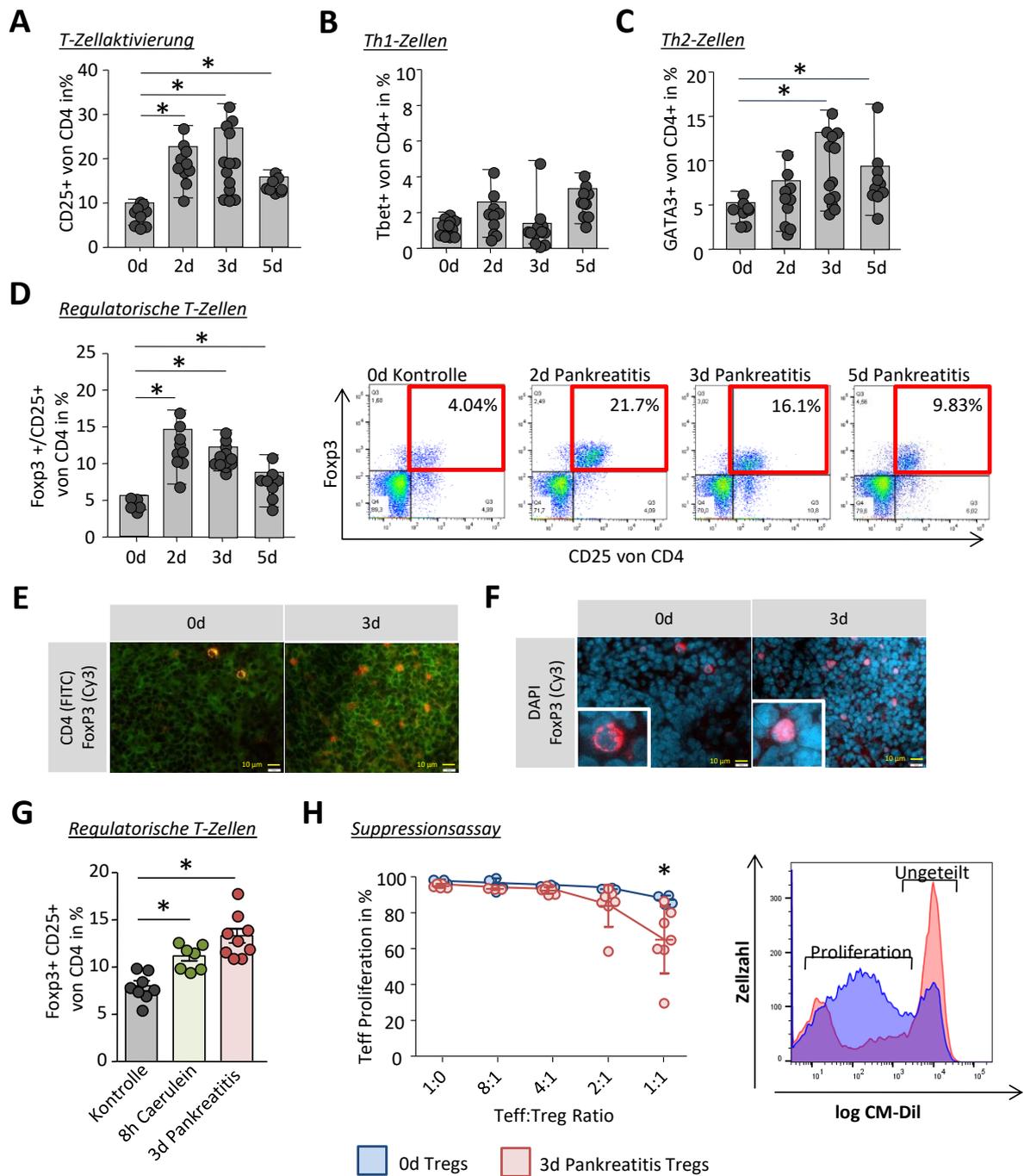


Abb. 3: Im Verlauf der Pankreatitis werden Tregs aktiviert und besitzen eine höhere suppressive Aktivität.

Eine schwere akute Pankreatitis wurde mittels partieller Gangligatur und einer zusätzlichen Caerulein-Injektion (50 µg/kg/Körpergewicht) 48 h nach Ligatur in C57/BL6J Mäusen induziert. Die Immunantwort der Tiere wurde zu den Zeitpunkten 2 d, 3 d und 5 d nach Ligatur untersucht. Kontrolltiere (0 d) sind unbehandelte C57BL/6J Mäuse. Die T-Zellaktivierung von CD4+ Splenozyten wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Messung des Oberflächenmarkers CD25 bestimmt. Zu allen gewählten Zeitpunkten nach der Gangligatur wurden T-Zellen signifikant aktiviert (A). Die T-Zelldifferenzierung wurde durch die Transkriptionsfaktoren Tbet und Gata3 charakterisiert (B, C). Dabei konnte ein deutlicher Anstieg von Th2-Zellen nach 3 d und 5 d beobachtet werden (C). Ebenfalls kommt es zu einem Anstieg von Tregs zu allen Zeitpunkten nach Induktion einer Pankreatitis. Tregs wurden als FoxP3+ und CD25+ identifiziert (D). Eine Ko-Färbung von CD4 und FoxP3 im Lymphknoten bestätigte den Anstieg von Tregs 3 d nach Induktion einer Pankreatitis (E). Dabei wird der

Transkriptionsfaktor FoxP3 intranukleär exprimiert, wie eine Immunfluoreszenzfärbung von FoxP3 und DAPI im Lymphknoten zeigte (F). Sowohl das Modell einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis als auch eine akute Caerulein-induzierte Pankreatitis führte zu einem signifikanten Anstieg der Tregs in der Milz (G). Das Modell einer Caerulein-induzierten Pankreatitis wurde über eine stündliche Caerulein-Injektion (50 µg/kg/Körpergewicht) über 8 h induziert. Mit Hilfe eines Suppressionsassay wurde der Einfluss der Tregs auf die T-Effektorproliferation bestimmt. Dazu wurden Tregs von 3 d Pankreatistieren und Kontrolltieren (0 d) isoliert und mit T-Effektorzellen für fünf Tage ko-inkubiert. Zuvor wurden die T-Effektorzellen mit dem Farbstoff CM-Dil gefärbt, der sich in die Zellmembran einlagert und dessen Intensität nach jeder Zellteilung abnimmt. Über die Bestimmung der Farbintensität wurde die Proliferation der T-Effektorzellen quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass Tregs von Pankreatistieren eine höhere suppressive Kapazität besitzen (H). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau *p < 0,05.

3.2 Die Rolle der Tregs in der akuten Pankreatitis

Die Daten, die in C57/BL6J Mäusen generiert wurden, zeigten, dass Tregs im Verlauf der Pankreatitis ansteigen und eine höhere suppressive Kapazität besitzen. Um den genauen Einfluss von Tregs im Verlauf der Pankreatitis zu charakterisieren, wurden für weitere Untersuchungen DEREK Mäuse verwendet. In DEREK Mäusen können Tregs gezielt depletiert werden. DEREK Mäuse exprimieren auf Tregs, unter Kontrolle von Foxp3, den Diphtheriatoxinrezeptor und können somit durch Diphtherietoxin-Injektion depletiert werden. Zudem bildet der Diphtheriatoxinrezeptor in DEREK Mäusen ein Fusionsprotein mit GFP. Dies ermöglicht zusätzlich eine Detektion von Tregs.

3.2.1 Caerulein-induzierte Pankreatitis in DEREK Mäusen

In DEREK Mäusen wurde mittels repetitiver Caerulein-Injektion (50 µg/kg/Körpergewicht) über 8 h eine akute Pankreatitis induziert. Tregs wurden drei und einen Tag vor der Induktion einer Pankreatitis mittels Diphtherietoxin-Injektion (1 µg in 200 µL PBS) depletiert. Kontrolltiere erhielten zum gleichen Zeitpunkt eine PBS-Injektion. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Immunantwort sowie die Auswirkung auf den pankreatischen Schaden. Immunfluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrische-Analysen bestätigten eine erfolgreiche Depletion von Tregs (Abb. 4A und 4B). Die Oberflächenexpression der T-Zellaktivierungsmarker CD69 und CD25 wurde genutzt, um die Immunantwort in der Milz zu charakterisieren. Unter Abwesenheit von Tregs kam es nach Induktion einer akuten Pankreatitis sowohl zu einem Anstieg CD69+ T-Zellen als auch CD25+ T-Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren (ohne Pankreatitis). Die mit PBS behandelte Gruppe zeigte hingegen nur einen signifikanten Anstieg der CD69+ T-Zellen unter Pankreatitis-Bedingungen (Abb. 4C). Die T-Effektor Differenzierung wurde anhand der Transkriptionsfaktoren Tbet (für Th1-Zellen) und

Gata3 (für Th2-Zellen) charakterisiert. Eine Caerulein induzierte Pankreatitis führte jedoch zu keinem nennenswerten Anstieg der T-Effektor-Immunantwort (Abb. 4D).

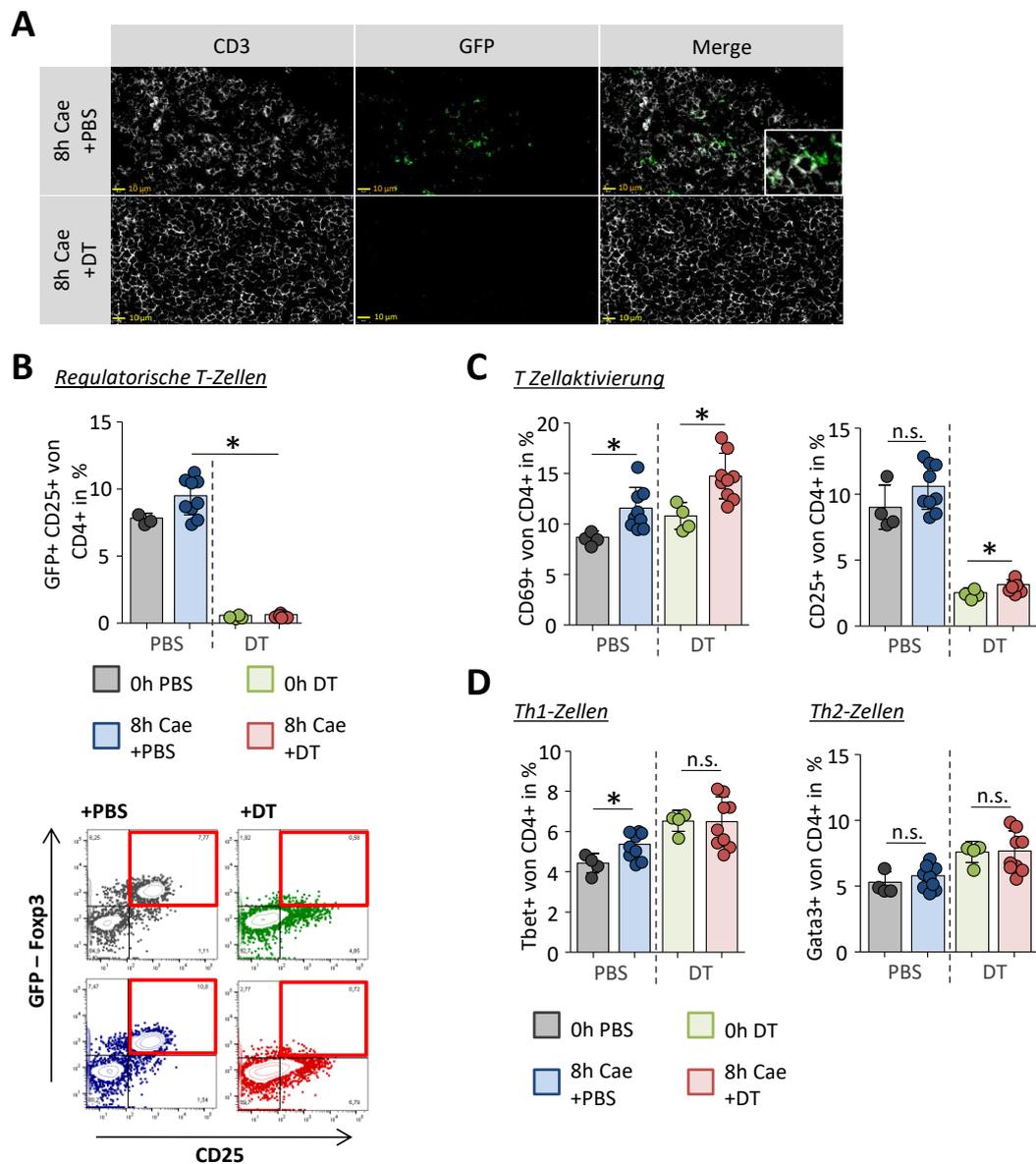


Abb. 4: In Abwesenheit von Tregs werden T-Zellen im akuten Pankreatitis-Mausmodell aktiviert.

Eine akute Pankreatitis wurde mittels repetitiver intraperitonealer Caerulein-Injektion (50 µg/kg/Körpergewicht) über 8 h in DEREK Mäusen induziert. Tregs wurden drei Tage sowie einem Tag vor Caerulein-Injektion durch 1 µg Diphtherietoxin (DT) Injektion depletiert. Kontrolltiere erhielten zum selben Zeitpunkt PBS. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte 8 h nach der ersten Caerulein-Injektion. Immunfluoreszenzfärbungen wurden angefertigt um das Vorhandensein von Tregs im Lymphknoten zu überprüfen. Dabei wurden Tregs (grün) mit einem goat anti-GFP Antikörper und T-Zellen (weiß) mit rat anti-CD3 gefärbt. Man erkennt deutlich die erfolgreiche Depletion von Tregs nach DT-Injektion (A). Die Expression der Tregs in der Milz wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tregs wurden als GFP+ CD25+ von CD4+ Zellen identifiziert. Hierbei wurde ebenfalls die Depletion der Tregs durch DT-Injektion sichtbar (B). Die Oberflächenexpression von CD25 und CD69 wurde genutzt, um die Anzahl der aktiven T-Zellen zu bestimmen. CD69+ Zellen stiegen sowohl in der PBS als auch in der DT-Gruppe signifikant nach Induktion einer akuten Pankreatitis an. Dahingegen beobachtete man nur nach Treg-Depletion einen signifikanten Anstieg in

der CD25 Expression (C). Weiterhin wurde die T-Zelldifferenzierung durch nukleäre Färbung von Tbet, für Th1-Zellen, und Gata3, für Th2-Zellen, charakterisiert. In beiden Fällen führte eine Depletion von Tregs unter Pankreatitis-Bedingungen zu keinem Unterschied in der T-Zell-Antwort (D). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau $*p < 0,05$.

Der Schweregrad der Pankreatitis wird anhand einer Messung der Aktivität von Serum-Amylase und -Lipase bestimmt. Die Abwesenheit von Tregs im akuten Pankreatitis-Modell führte zu einer signifikant niedrigeren Aktivität von Amylase und Lipase (Abb. 5A). Die systemische Immunantwort kann anhand der Myeloperoxidase-Aktivität in der Lunge bestimmt werden. Die Myeloperoxidase-Aktivität in der Lunge stieg während einer akuten Pankreatitis an. Eine Treg-Depletion hatte jedoch keine Auswirkung auf den Aktivitäts-Wert (Abb. 5B). Der direkte lokale Schaden der Pankreatitis wurde zusätzlich durch HE Färbungen des Pankreas veranschaulicht. Eine Depletion von Tregs führte vor allem zu einer Verringerung nekrotisierender Azinuszellen im Vergleich zu mit PBS behandelten Tieren (Abb. 5C).

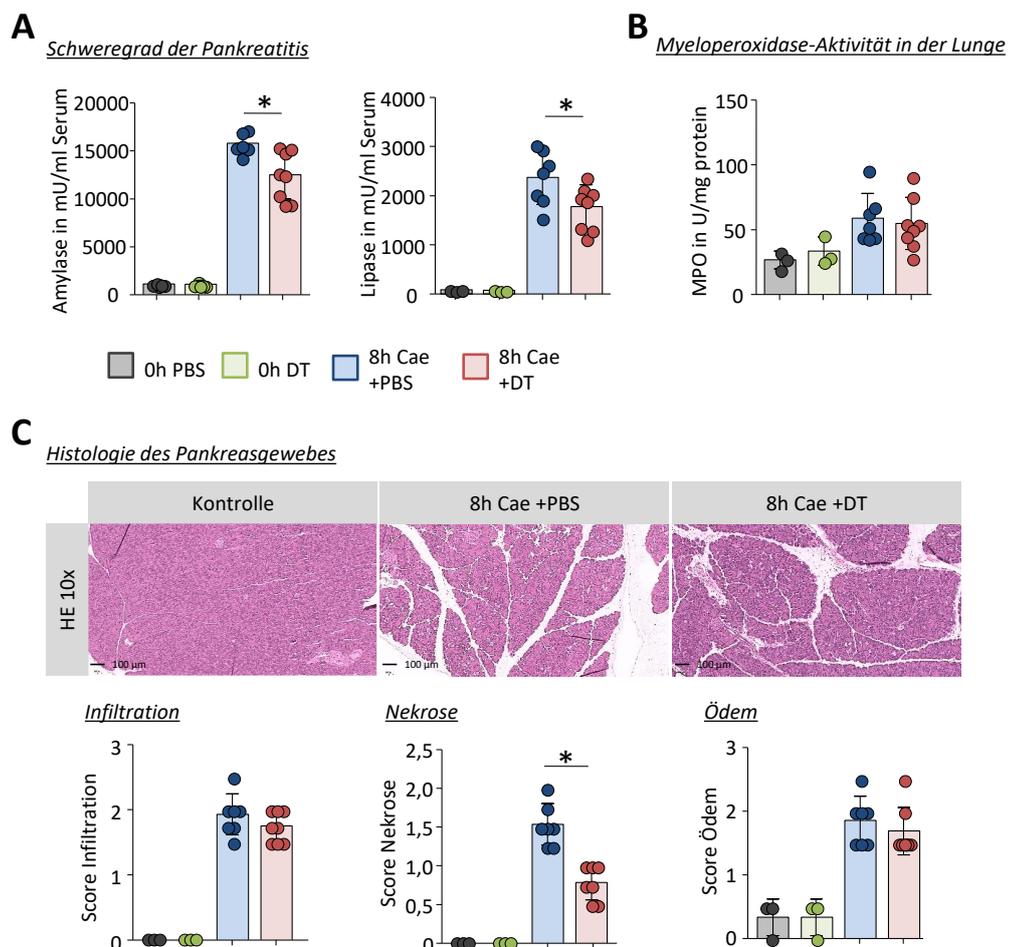


Abb. 5: In Abwesenheit von Tregs sinkt der Schweregrad einer akuten Pankreatitis.

Der Einfluss von Tregs auf den Schweregrad der Pankreatitis wurde in DEREK Mäusen analysiert. Dazu wurde eine akute Pankreatitis mittels repetitiver intraperitonealer Caerulein-Injektion (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Körpergewicht}$) über 8 h in DEREK induziert. Tregs wurden drei und einen Tag vor Induktion einer Pankreatitis durch Diphtherietoxin (DT)-Injektion depletiert.

Kontrolltiere erhielten zum selben Zeitpunkt PBS. Der Schweregrad und der pankreatische Schaden der Pankreatitis wurden anschließend bestimmt. Die Aktivität der Serum-Amylase und -Lipase zeigte einen deutlichen Anstieg nach der Induktion einer Pankreatitis. Dabei führte die Abwesenheit von Tregs zu einer geringeren Konzentration von Amylase und Lipase im Vergleich zu mit PBS behandelten Tieren (A). Die systemische Immunantwort wurde anhand der Myeloperoxidase-Aktivität in der Lunge bestimmt. Diese Aktivität stieg im Zuge einer akuten Pankreatitis an. Treg-depletierte Tiere zeigten jedoch, im Vergleich zu PBS behandelten Tieren, eine ähnliche MPO-Aktivität in der Lunge während einer akuten Pankreatitis (B). HE Färbungen veranschaulichten deutlich den pankreatischen Schaden nach Induktion einer Pankreatitis. Dabei verringert die Depletion von Tregs das Vorhandensein nekrotisierender Azinuszellen (C). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau $*p < 0,05$.

3.2.2 Induktion einer schweren nekrotisierende Pankreatitis durch partielle Gangligatur in DEREK Mäusen

In DEREK Mäusen wurde mittels partieller Gangligatur und zusätzlicher Caerulein-Injektion (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Körpergewicht}$) 48 h nach Ligatur eine akute Pankreatitis induziert. Tregs wurden drei Tage vor und am Tag der Ligatur mittels Diphtherietoxin-Injektion (1 μg in 200 μL PBS) depletiert. Die Kontrolltiere erhielten zum gleichen Zeitpunkt eine PBS-Injektion. Drei Tage nach Ligatur erfolgte die Aufarbeitung der Tiere und die Bestimmung der Immunantwort. Immunfluoreszenzfärbungen von Lymphknoten wurden angefertigt, um den Erfolg der Depletion der Tregs zu überprüfen. Neben Tregs wurden auch CD3⁺ Zellen gefärbt. Diese Immunfluoreszenzfärbungen zeigten deutlich, dass in Diphtherietoxin behandelte Tiere weniger Tregs vorhanden sind (Abb. 6A).

Mittels Durchflusszytometrische-Analysen der Milz wurden diese Ergebnisse bestätigt. Dazu wurden Splenozyten isoliert und gefärbt. Die Detektion von GFP⁺ CD25⁺ CD4⁺ Zellen zeigte auch hier, dass die Diphtherietoxin-Injektion Tregs erfolgreich depletierte (Abb. 6B).

Die Oberflächenexpression von CD69 und CD25 auf CD4⁺ Zellen wurde genutzt, um die T-Zellaktivierung zu quantifizieren. Dabei bestimmen CD69⁺ Zellen eher die Aktivität der T-Effektorzellen und CD25 wird vor allem auf aktiven Tregs exprimiert. Der Aktivierungsmarker CD69 wurde tendenziell vermehrt nach Treg-Depletion exprimiert. Es zeigte sich jedoch deutlich, dass eine Depletion von Tregs die CD25 Expression senkt (Abb. 6C). Zusätzlich wurde die T-Zelldifferenzierung in diesem Modell untersucht. Die Expression der Transkriptionsfaktoren Tbet und Gata3 wurde genutzt, um das Vorhandensein der Th1- und Th2-Immunantwort zu analysieren. Dabei wurde in Treg-depletierten Tieren sowohl eine höhere Tbet als auch höhere Gata3 Expression nach Induktion einer akuten Pankreatitis beobachtet (Abb. 6D).

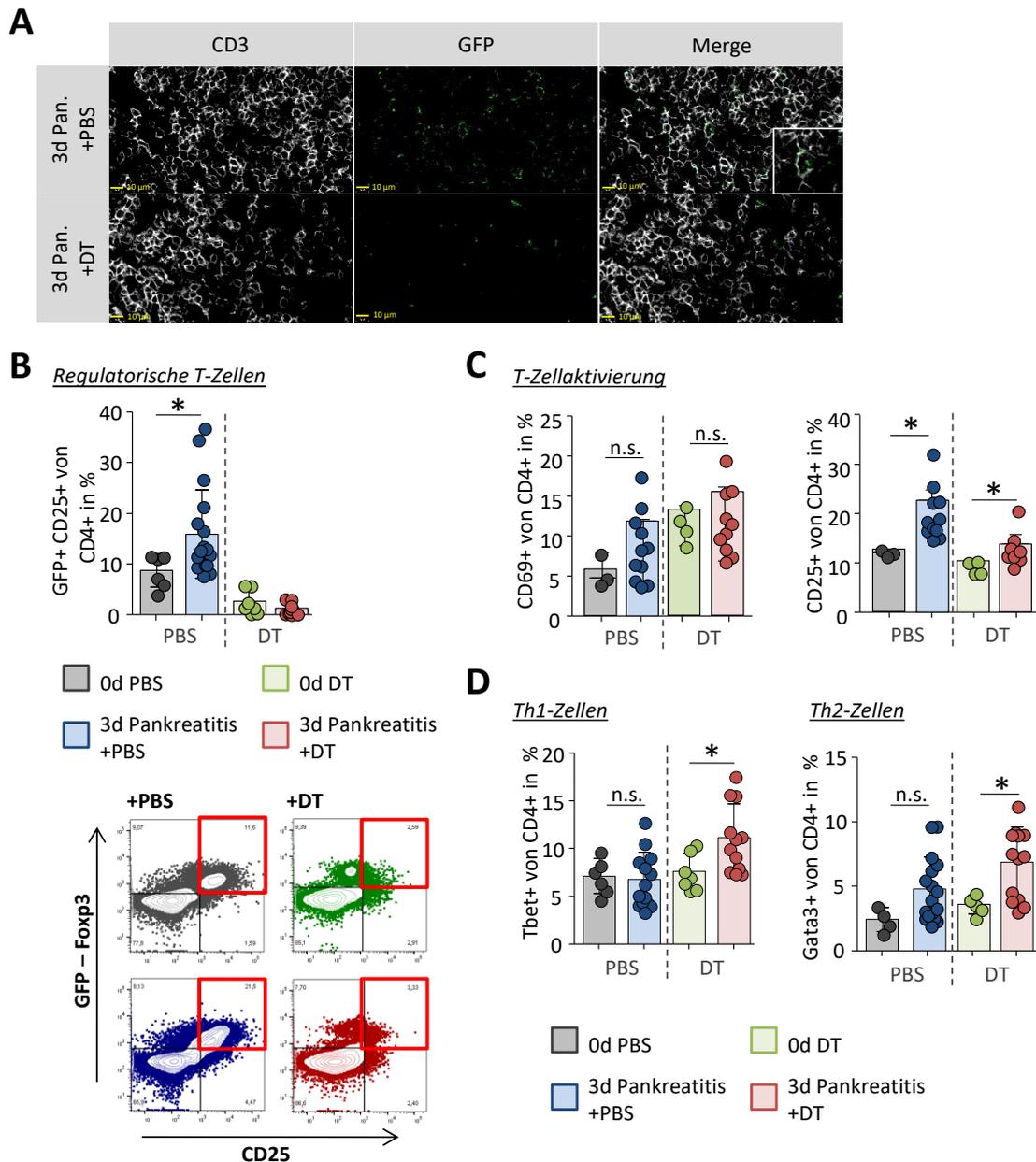


Abb. 6: In der akuten Pankreatitis supprimieren Tregs die T-Effektor-Immunantwort.

Eine schwere akute Pankreatitis wurde mittels partieller Gangligatur und anschließender Caerulein-Injektion (50 µg/kg/Körpergewicht) 48 h nach Ligatur in den DEREK Mäusen induziert. Tregs wurden drei Tage vor und am Tag der Ligatur durch die Injektion von 1 µg Diphtherietoxin (DT) depletiert. Kontrolltiere erhielten zum selben Zeitpunkt PBS. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte 3 d nach Ligatur. Immunfluoreszenzfärbungen wurden angefertigt, um das Vorhandensein von Tregs im Lymphknoten zu überprüfen. Dabei wurden Tregs (grün) mit einem goat anti-GFP Antikörper und T-Zellen (weiß) mit rat anti-CD3 gefärbt. Deutlich erkennbar ist die erfolgreiche Depletion von Tregs nach DT-Injektion (A). Die Expression der Tregs in der Milz wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tregs wurden auf GFP+ CD25+ von CD4+ Zellen gegatet. Hierbei wurde ebenfalls die Depletion der Tregs durch DT-Injektion sichtbar (B). Die Oberflächenexpression von CD25 und CD69 wurde genutzt, um die T-Zellaktivität zu bestimmen. Es zeigte sich, kein signifikanter Unterschied in der CD69 Expression, aber ein Anstieg der CD25 Expression 3 d nach Induktion einer Pankreatitis. Dabei stieg die Expression sowohl in der PBS Gruppe als auch nach Treg-Depletion an (C). Weiterhin wurde die T-Zelldifferenzierung durch nukleäre Färbung von

Tbet, für Th1-Zellen, und Gata3, für Th2-Zellen, charakterisiert. In beiden Fällen führte eine Depletion von Tregs unter Pankreatitis-Bedingungen zu einer höheren Expression von Th1- und Th2-Zellen (D). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau $*p < 0,05$.

Der Schweregrad der Erkrankung wurde durch die Messung der Aktivität von Amylase und Lipase im Serum bestimmt. Nach Induktion einer akuten Pankreatitis zeigte sich deutlich, dass die Treg-depletierten Tiere eine geringere Aktivität von Amylase und Lipase im Serum haben (Abb. 7A). Diese Ergebnisse wurden unterstützt durch die Bestimmung der Aktivität der MPO in der Lunge, welche eine systemische Immunantwort verdeutlicht. Es wurde eine geringere MPO-Aktivität in Treg-depletierten Tieren gemessen (Abb. 7B). Zusätzlich wurde der pankreatische Schaden durch Anfertigung von HE Färbungen des Pankreas charakterisiert. Auch hier zeigte sich, dass eine Treg-Depletion zu einem geringeren pankreatischen Schaden mit einer geringeren Infiltration von Immunzellen führte (Abb. 7C).

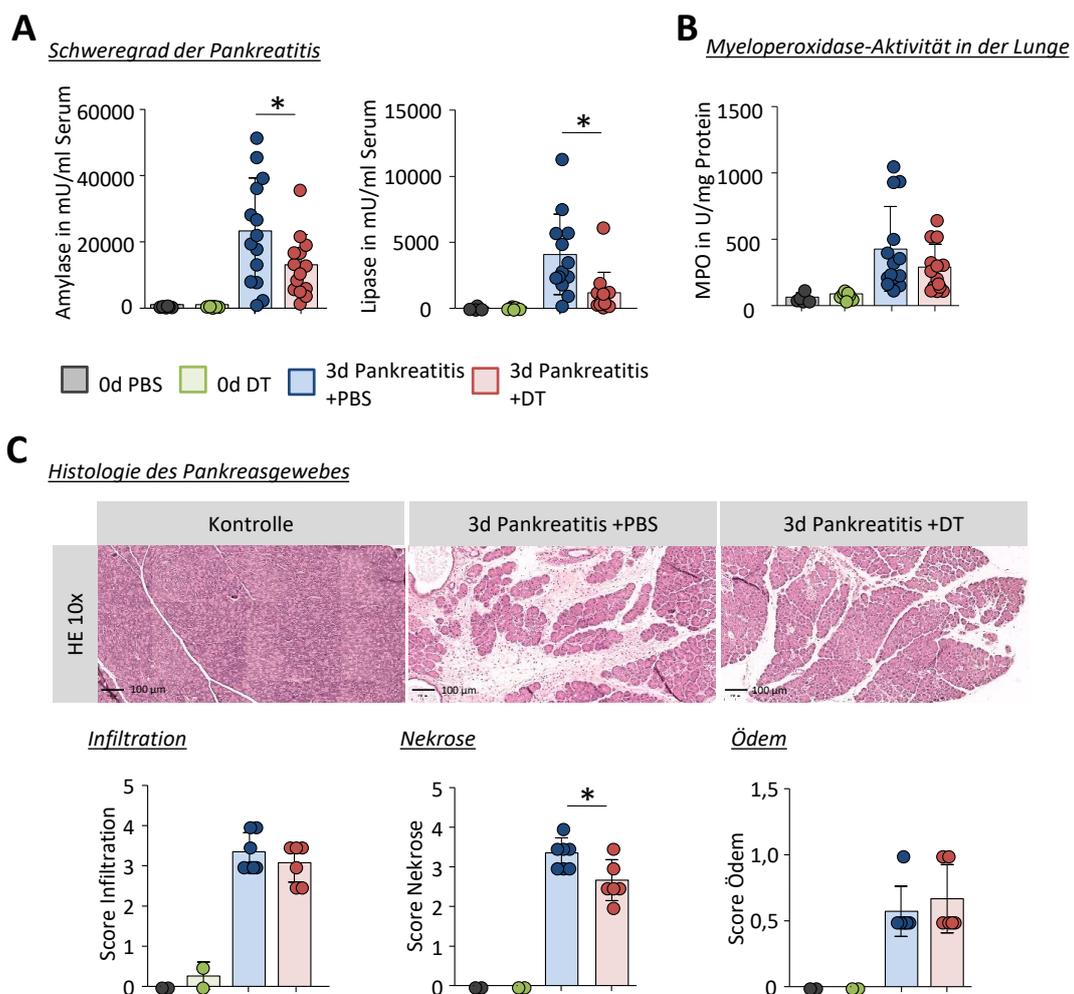


Abb. 7: Eine erhöhte T-Effektor-Immunantwort senkt den Schweregrad der Pankreatitis.

Der Einfluss von Tregs auf den Schweregrad der Pankreatitis wurde in DEREG Mäusen analysiert. Dazu wurde eine akute Pankreatitis mittels partieller Gangligatur mit zusätzlicher Caerulein-Injektion (50 µg/kg/Körpergewicht) 48 h nach Ligatur in

DEREG Mäusen induziert. Tregs wurden drei Tage vor und am Tag der Ligatur durch Diphtherietoxin (DT)-Injektion depletiert. Kontrolltiere erhielten zum selben Zeitpunkt PBS. Drei Tage nach Ligatur wurde der Schweregrad und der pankreatische Schaden der Pankreatitis bestimmt. Die Bestimmung der Aktivität der Serum Amylase und Lipase zeigte deutlich einen Anstieg nach Induktion einer Pankreatitis. Dabei führte eine Depletion von Tregs zu einer geringeren Amylase- und Lipase-Aktivität im Vergleich zu mit PBS behandelten Tieren (A). Die systemische Immunantwort wurde anhand der Myeloperoxidase-Aktivität in der Lunge bestimmt. Tendenziell zeigten Treg-depletierte Tiere eine geringere MPO-Aktivität während einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis (B). HE Färbungen veranschaulichten den pankreatischen Schaden nach Induktion einer Pankreatitis. Dabei verringerte die Depletion von Tregs den pankreatischen Schaden (C). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau * $p < 0,05$.

3.2.3 Eine überschießende Treg-induzierte Immunsuppression führt zu einer Dysbalance der Treg/Th17-regulierten Darmbarriere

Die bereits beschriebenen Ergebnisse zeigten deutlich, dass es in Abwesenheit von Tregs im akuten Mausmodell zu einem geringeren pankreatischen Schaden mit weniger nekrotischem Gewebe kommt. Durch eine Treg-induzierte systemische Hypoinflammation kann es zu einer Dysbalance in der Treg/Th17-regulierten Darmbarriere kommen. Als Folge dessen können kommensale Darmbakterien das Pankreas besiedeln und sich infizierte pankreatische Nekrosen ausbilden.

Um die Rolle der Tregs in diesem Pathomechanismus genauer zu untersuchen, wurde eine schwere nekrotisierende Pankreatitis in DEREG Mäusen induziert (siehe 3.2.2) und die Veränderungen im Darmepithel genauer charakterisiert. Drei Tage nach der partiellen Gangligatur wurde das Dünndarmgewebe entnommen, für Immunfluoreszenzfärbungen Cryo-eingebettet sowie für Durchflusszytometrische-Analysen dissoziiert. DEREG Mäuse deren Tregs durch Diphtherietoxin-Injektion depletiert wurden, exprimierten auch im Dünndarm signifikant weniger Tregs (Abb. 8A). Immunfluoreszenzfärbungen von CD8 α + / CD3+ intraepithelialen Lymphozyten (IEL) zeigten deutlich eine Abnahme nach Induktion einer akuten Pankreatitis. Dabei vermindert eine Depletion von Tregs diese Reduktion (Abb. 8B). Die T-Zelldifferenzierung zu Th17-Zellen wurde mit Hilfe nukleärer Färbung von Ror γ t charakterisiert. In Abwesenheit von Tregs stieg die Th17-Immunantwort (Ror γ t+ IELs) an (Abb. 8C). Eine veränderte Expression der T-Zellrezeptoren kann mit einer gestörten Darmbarriere assoziiert sein. Die Protein-Untereinheiten der T-Zellrezeptoren ($\alpha\beta$, $\gamma\delta$) wurden auf IELs gefärbt und mit Hilfe von Durchflusszytometrischen-Messungen charakterisiert. Im Zuge der Pankreatitis kam es zu einer veränderten Expression der Protein-Untereinheiten. Dabei wurde der $\alpha\beta$ -Komplex vermehrt und der $\gamma\delta$ -Komplex geringer exprimiert. Eine Depletion von Tregs

in diesem Zusammenhang führte dazu, dass diese Veränderungen abgemildert wurden. D.h. im Vergleich zur PBS Gruppe lag der prozentuale Anteil des $\alpha\beta$ -Komplex in der DT-Gruppe signifikant niedriger und der Anteil des $\gamma\delta$ -Komplexes höher (Abb. 8D).

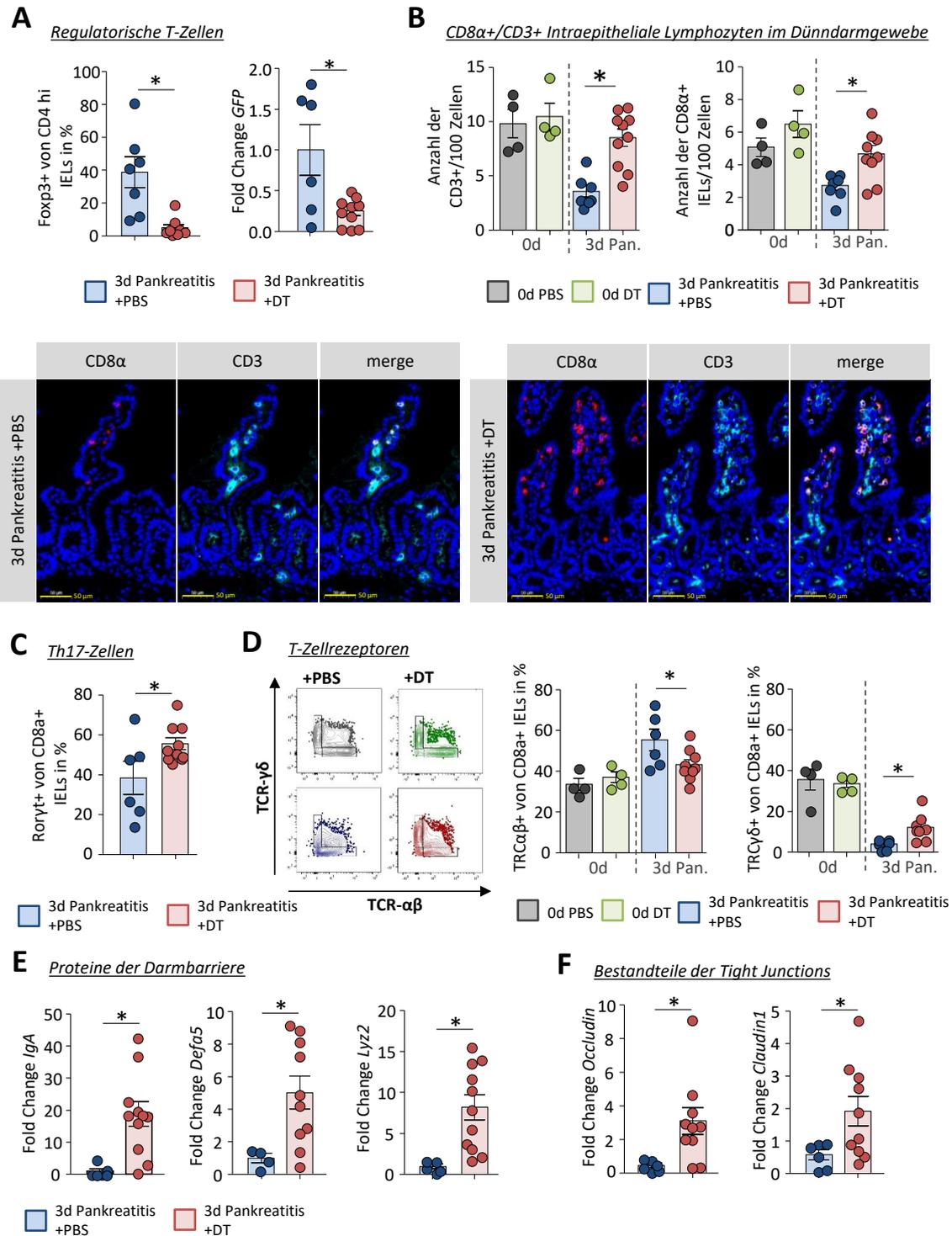


Abb. 8: Eine Dysbalance der Treg/Th17-Immunantwort im Dünndarm führt zu einer gestörten Darmbarriere.

Eine schwere akute Pankreatitis wurde mittels partieller Gangligatur und anschließender Caerulein-Injektion (50 μ g/kg/Körpergewicht) 48 h nach Ligatur in den DEREK Mäusen induziert. Tregs wurden drei Tage vor und am Tag der

Ligatur durch die Injektion von 1 µg Diphtherietoxin (DT) depletiert. Kontrolltiere erhielten unter den gleichen Bedingungen PBS. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte 3 d nach Ligatur. Das Dünndarmgewebe wurde entnommen und die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) isoliert. Durchflusszytometrische-Analysen der IEL sowie Genexpressionsanalysen des Dünndarmgewebes zeigten eine signifikante Abnahme der regulatorischen T-Zellen (Tregs) nach DT-Injektion (**A**). Immunfluoreszenzfärbungen wurde vom Dünndarmgewebe angefertigt. Dabei wurden CD8α⁺ Zellen (rot) mit CD3⁺ Zellen (cyan) gefärbt. Quantifizierungen der positiven Zellen innerhalb einzelner Dünndarmzotten zeigten eine starke Abnahme der CD8α⁺ Zellen sowie der CD3⁺ Zellen im Verlauf der Pankreatitis in Anwesenheit von Tregs (**B**). Die T-Zelldifferenzierung wurde durch nukleäre Färbung von Rorγt für Th17-Zellen charakterisiert. Eine Depletion von Tregs führte zu einem Anstieg der Rorγt⁺ IELs (**C**). Weiterhin wurden die Protein-Untereinheiten des T-Zell Rezeptors αβ sowie γδ auf den IELs gefärbt. Durchflusszytometrische Messungen verdeutlichten eine Zunahme der αβ Untereinheit unter gleichzeitiger Abnahme der γδ Untereinheit im Zuge der Pankreatitis. In Anwesenheit von Tregs lag diese Veränderung im Vergleich zur DT-Gruppe signifikant höher (**D**). Untersuchungen zur Darmbarriere wurden mit Hilfe von Genexpressionsanalysen durchgeführt. IgA, Defensin5 und Lysozym wurden in Abwesenheit von Tregs höher exprimiert (**E**). Das gleiche wurde für die Genexpression von Occludin und Claudin beobachtet (**F**). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau *p < 0,05.

Um die Funktionalität der Darmbarriere genauer zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen von Proteinen, die für eine Aufrechterhaltung der Darmbarriere sorgen, durchgeführt. IgA, Defensine, sowie Lysozym wurden auf Transkriptom Ebene unter Abwesenheit von Tregs signifikant höher exprimiert (Abb. 8E). Das gleiche beobachteten wir für die Bestandteile der *Tight Junctions*. Die Genexpression von Occludin und Claudin lag in der DT-Gruppe signifikant höher als in der PBS Gruppe (Abb. 8F).

Zusammengefasst zeigen die Versuche zur Rolle der Tregs im Verlauf der akuten Pankreatitis einen deutlichen Einfluss der Treg-vermittelten Immunsuppression auf den Schweregrad der Erkrankung. Wir konnten zeigen, dass Tregs nicht nur in ihrer Anzahl zunehmen, sondern dass auch ihre suppressive Fähigkeit steigt. In beiden Tiermodellen der akuten Pankreatitis konnten wir einen erhöhten Anteil an T-Effektorzellen nach der Depletion der Foxp3⁺/CD25⁺ Tregs beobachten. Zudem zeigten Untersuchungen zum Schweregrad der Pankreatitis, dass unter Abwesenheit von Foxp3⁺/CD25⁺ Tregs der lokale pankreatische Schaden sinkt. In diesem Zusammenhang beobachteten wir das eine überschießende Treg-induzierte Hypoinflammation zu einer Dysbalance in der Treg/Th17-regulierten Darmbarriere kommt. Dies ermöglicht kommensalen Darmbakterien eine Besiedlung des Pankreasgewebes. Die daraus mögliche Ausbildung infizierter Nekrosen bestimmen den Krankheitsverlauf stark.

3.3 Die Rolle der Tregs in der chronischen Pankreatitis

Es konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass Tregs ein Einfluss auf den Verlauf der akuten Pankreatitis haben. Dabei konnten wir insbesondere eine gesteigerte Th2 Antwort beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass Tregs eventuell auch den Verlauf einer chronischen Pankreatitis beeinflussen.

Die chronische Pankreatitis ist charakterisiert durch sich wiederholende Episoden akuter Pankreatitisschübe. Zur Charakterisierung dieses Einflusses wurde eine chronische Pankreatitis in DEREK Mäusen mittels repetitiver i.p. Caerulein-Injektion (50µg/kg Körpergewicht) sechs Mal am Tag, drei Tage die Woche und über einen Zeitraum von vier Wochen induziert. Dabei wurden Tregs jeweils eine Stunde vor der ersten Caerulein-Injektion durch i.p. Injektion von Diphtherietoxin (1 µg in 200 µL PBS) depletiert. Kontrolltiere erhielten stattdessen eine PBS-Injektion.

3.3.1 Tregs supprimieren eine Th2-Immunantwort

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen der Lymphknoten und durchflusszytometrischen Analysen der Milz wurden GFP+ T-Zellen gefärbt. Beide Methoden bestätigen eine erfolgreiche Depletion von Tregs über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. 9A und 9B). Weiterhin wurde die T-Zelldifferenzierung untersucht. Es zeigte sich deutlich, dass eine Depletion von Tregs im chronischen Modell keinen Einfluss auf Tbet+ Th1-Zellen hat. Jedoch werden Gata3+ Th2-Zellen signifikant induziert (Abb. 9C). Ebenfalls konnten wir zeigen, dass proinflammatorische Zytokine wie IL6 und TNFα keinen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen der DT- und PBS- behandelten Gruppe zeigten (Abb. 9D). Wohingegen Th2 typische Zytokine, wie IL4 und IL10, ansteigen (Abb. 9E).

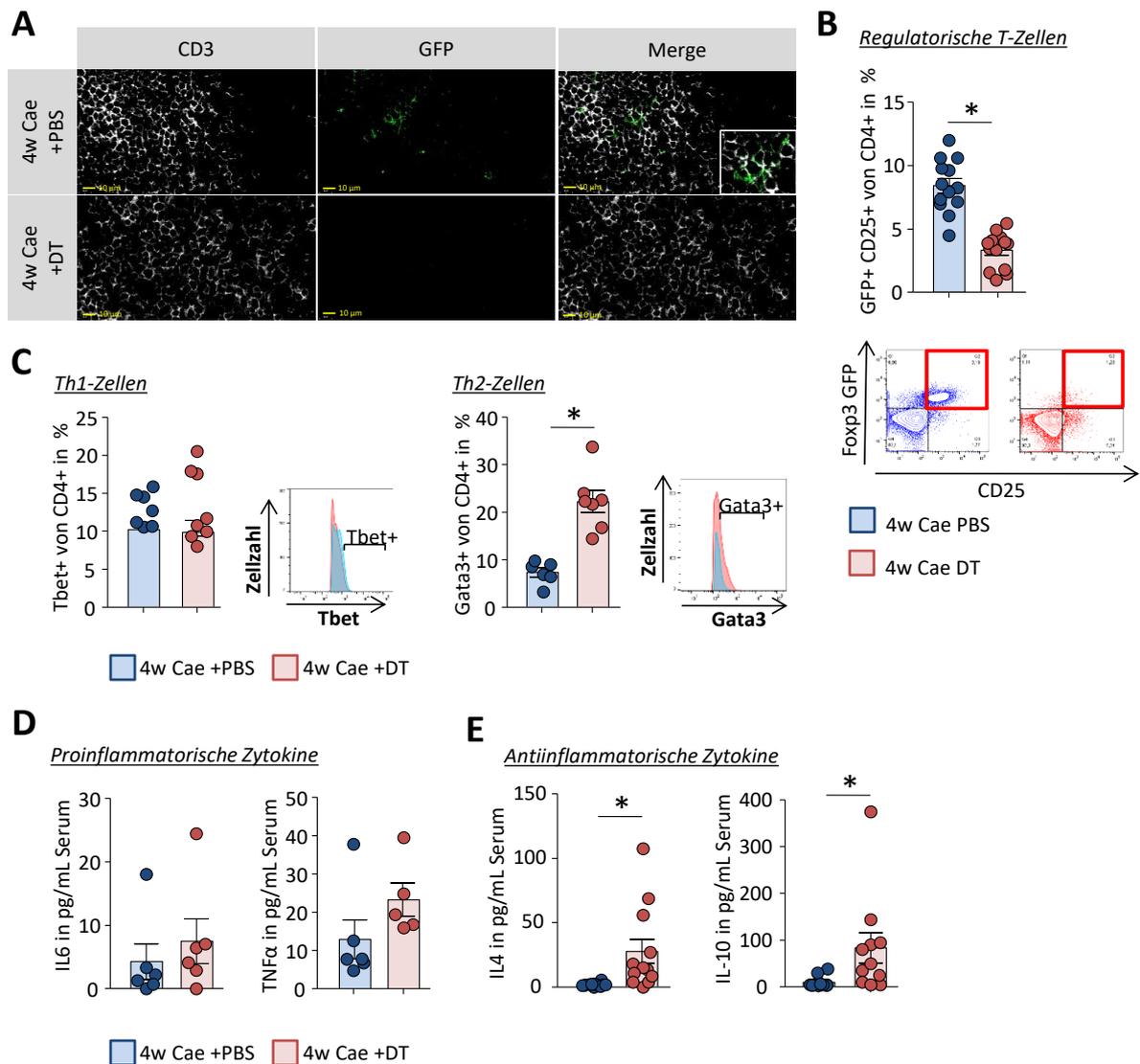


Abb. 9: Die Th2-Immunantwort wird während der chronischen Pankreatitis von Tregs reguliert.

Eine chronische Pankreatitis wurde durch repetitive intraperitoneale Caerulein-Injektion (50 μ g/kg Körpergewicht) sechs Mal am Tag, drei Tage die Woche und über vier Wochen in DEREK Mäusen induziert. Tregs wurden durch Injektion von 1 μ g Diphtherietoxin (DT) eine Stunde vor Caerulein-Gabe depletiert. Kontrolltiere erhielten zum selben Zeitpunkt PBS. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Tregs (grün) mit einem goat anti-GFP Antikörper und T-Zellen (weiß) mit rat anti-CD3 im Lymphknoten gefärbt. Detektiert wurde eine erfolgreiche Depletion von Tregs nach DT-Injektion über den gesamten Versuchszeitraum (A). Auch durchflusszytometrische Färbungen von GFP+ CD25+ CD4+ Zellen in der Milz verdeutlichten eine signifikante Abnahme der Tregs nach DT-Injektion (B). Weiterhin wurde die T-Zelldifferenzierung anhand der Tbet+ und Gata3+ CD4 in der Milz charakterisiert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Th1 Immunantwort (C). Jedoch wurden unter Abwesenheit von Tregs während der chronischen Pankreatitis eine Zunahme der Gata3+ Th2-Zellen beobachtet (C). Proinflammatorische Zytokine (IL6 und TNF α) wurden im Serum gemessen und zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in Abwesenheit von Tregs (D). Die Th2 Zytokine IL4 und IL10 hingegen weisen in den Treg-depletierten Gruppen einen signifikant höheren Wert auf als in den Kontrollgruppen (E). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau *p < 0,05.

3.3.2 Die Th2-Immunantwort beeinflusst die Makrophagendifferenzierung

Th2-Zellen induzieren über die Sekretion von IL4 und IL10 die Polarisierung von Makrophagen hin zu einem alternativ aktivierten, antiinflammatorischen Phänotyp. Es konnte mittels durchflusszytometrischer Analysen der Milz gezeigt werden, dass die Anzahl CD206+ Makrophagen nach Depletion von Tregs während einer chronischen Pankreatitis anstieg (Abb. 10A). Die entsprechende Gatingstrategie zur Bestimmung der Makrophagenpolarisation ist im Anhang 3 dargestellt. Immunfluoreszenzfärbungen des Pankreas zeigten auch hier eine starke Infiltration von CD206+ Makrophagen (Abb. 10B). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Genexpressionsanalysen der Makrophagenmarkern (*Mrc1* und *YM1*), die typisch für alternativ aktivierende Makrophagen sind (Abb. 10C). Auch das antiinflammatorische Zytokin IL10 zeigte eine höhere mRNA-Expression (Abb. 10D). Dahingegen konnte kein Unterschied in der Genexpression des proinflammatorischen Zytokins IL1 β im Pankreas festgestellt werden (Abb. 10D).

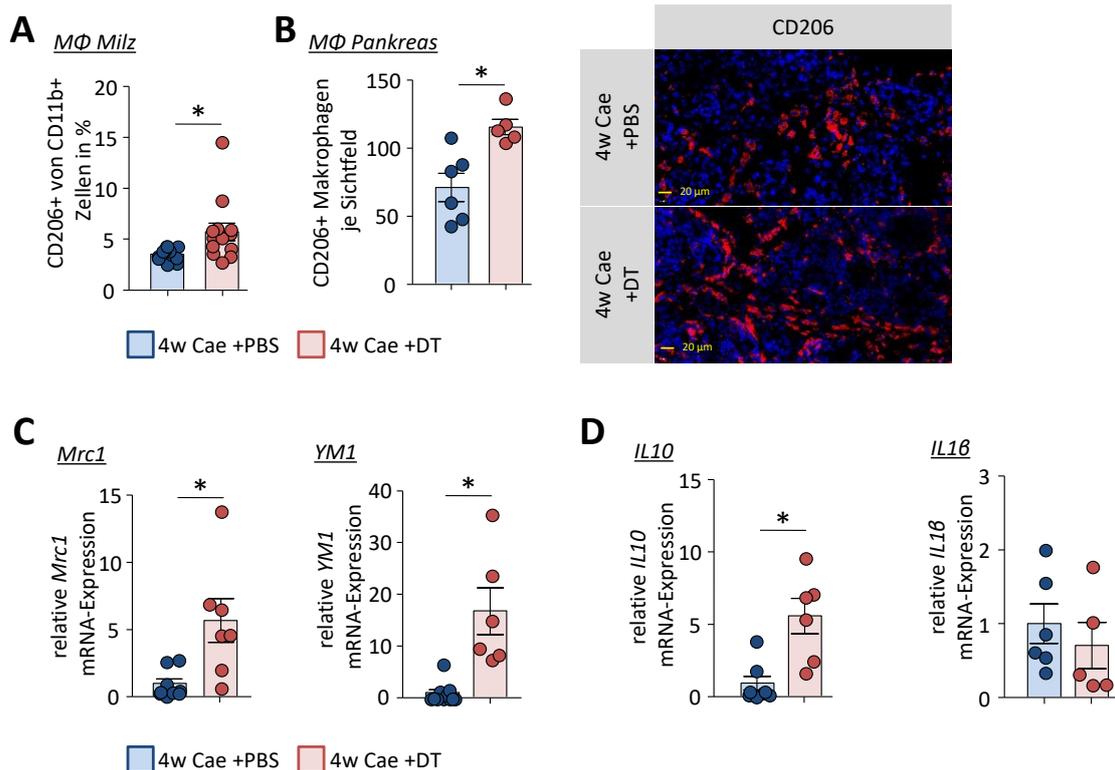


Abb. 10: Die Th2-Immunantwort induziert antiinflammatorische Makrophagen.

Die Makrophagendifferenzierung wurde in DEREK Mäusen in der chronischen Pankreatitis charakterisiert. CD11b+ Zellen der Milz wurden durchflusszytometrisch auf die Expression des Oberflächenmarkers CD206 untersucht. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression nach Depletion von Tregs während einer chronischen Pankreatitis (A). Immunfluoreszenzfärbungen des Pankreas zeigten ebenfalls einen Anstieg CD206+ Makrophagen in Abwesenheit von Tregs (B). Genexpressionsanalysen der Makrophagenmarker *Mrc1* und *YM1* im Pankreas bestätigen die höhere Expression von

antiinflammatorischen Makrophagen nach Depletion von Tregs (C). IL10 als antiinflammatorisches Makrophagenzytokin wurde auf die mRNA-Expression im Pankreas untersucht und zeigte einen signifikant höheren Wert in Abwesenheit von Tregs während einer chronischen Pankreatitis (D). Dahingegen wurde die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL1 β kaum beeinflusst (D). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau * $p < 0,05$.

3.3.3 Die pankreatische Fibrose und der Verlust der Azinuszellen wird von antiinflammatorischen Makrophagen und pankreatischen Sternzellen moduliert

Die bisher vorgestellten Daten zeigten, dass eine Depletion von Tregs im chronischen Pankreatitis-Modell die Immunreaktion in Richtung einer Typ2-Immunantwort drückt. Im Folgenden sollte die Auswirkung dieser Immunantwort auf die lokale Gewebezusammensetzung im Pankreas untersucht werden.

Pankreatische Sternzellen, die Bindegewebszellen des Pankreas, exprimieren nach Aktivierung das Protein α SMA und können Kollagenfasern synthetisieren. Die relative Genexpression wurde für α SMA und Kollagen im Pankreasgewebe bestimmt. Beide Gene wurden im chronischen Pankreatitis-Mausmodell unter Abwesenheit von Treg stärker exprimiert (Abb. 11A). Auch Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine stärkere Expression von α SMA und Kollagen im Pankreas (Abb. 11B). Anhand von Masson-Goldner- sowie Azan-Färbungen wurde die Fläche von fibrotischem Gewebe und Azinuszellen quantifiziert. Die Depletion von Tregs verstärkte während einer chronischen Pankreatitis die Fibrosierung des Organs und führte gleichzeitig zu einer Abnahme exokriner Azinuszellen (Abb. 11C). Repräsentative Beispielbilder der Masson-Goldner- und Azan-Färbung veranschaulichen die lokale pankreatische Gewebeeränderung. Hier zeigte sich auch deutlich mehr fibrotisches Gewebe (Masson-Goldner: grün; Azan: blau) und der Verlust von Azinuszellen in Tieren, deren Tregs depletiert wurden (Abb. 11D). Zusätzlich wurde eine Immunfluoreszenzfärbung angewendet, um den Verlust von Azinuszellen zu bestätigen. Hierfür wurden CK19+ Zellen und Amylase ko-färbt. CK19 zeigte in der depletierten Gruppe eine tendenziell höhere Expression, wobei die Amylase der Azinuszellen signifikant geringer exprimiert wurde (Abb. 11E). Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde in Ko-Immunfluoreszenzfärbungen mit Amylase genutzt, um die Proliferation von Azinuszellen zu veranschaulichen und zu quantifizieren. In Abwesenheit von Tregs kam es im chronischen Pankreatitis-Mausmodell zu einer signifikant geringeren Ki-67 Expression im Pankreas (Abb. 11F). Schließlich wurde die Genexpression der Azinus-Proteasen Amylase und Trypsinogen im Pankreas quantifiziert. Die Gene beider Enzyme

wurden im chronischen Pankreatitis-Modell unter Abwesenheit von Tregs geringer exprimiert (Abb. 11G).

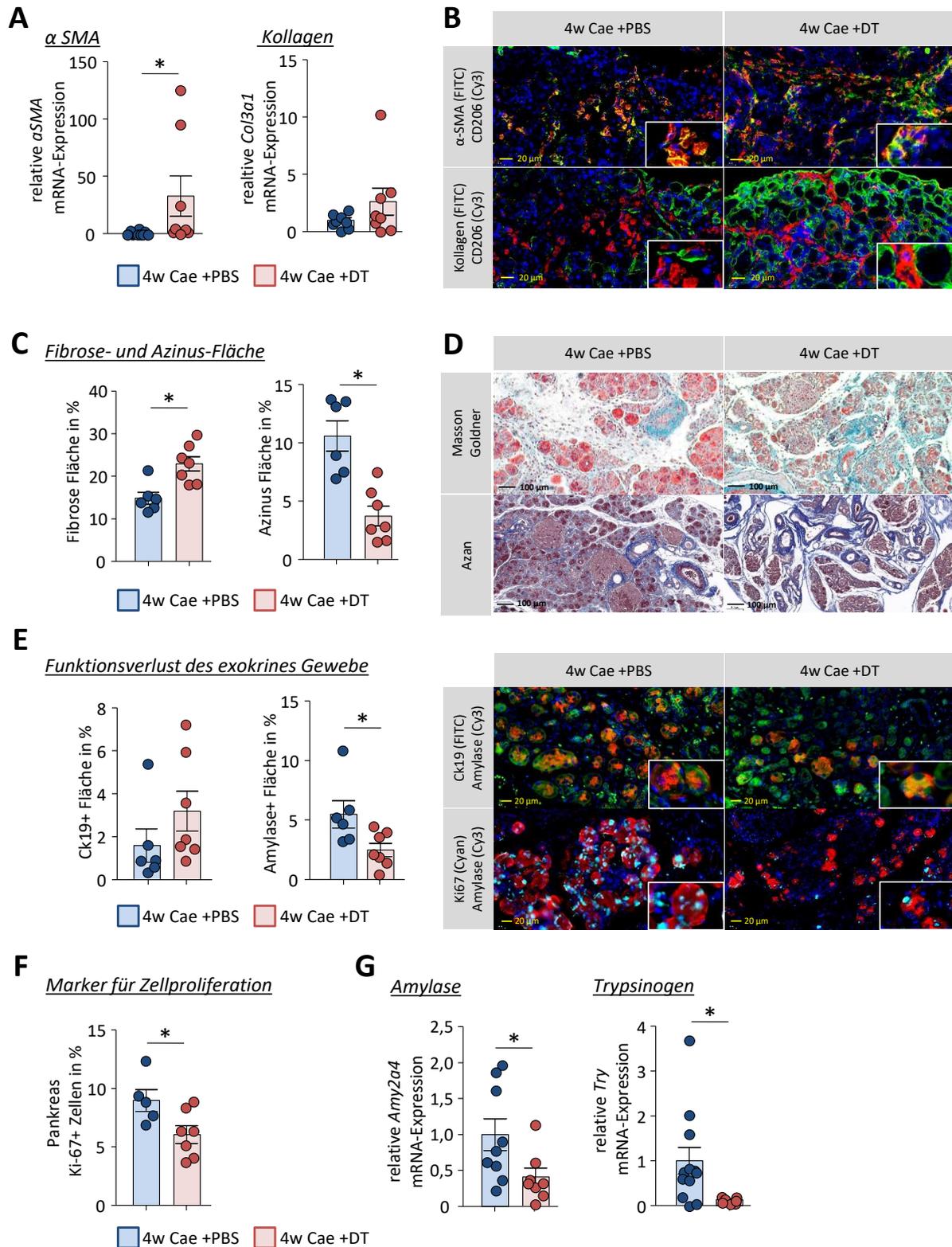


Abb. 11: Die pankreatische Gewebeeränderung wird durch Aktivierung pankreatischer Sternzellen bestimmt.

Basierend auf den Daten zur Makrophagendifferenzierung wurde im Anschluss die Auswirkung auf die lokale Gewebeeränderung im chronischen Mausmodell unter Abwesenheit von Tregs in DEREK Mäusen untersucht. Die

Genexpression von α SMA und Kollagen wurde im Pankreas bestimmt und lag in den Treg-depletierten Tieren signifikant höher als in der Kontrollgruppe (A). Immunfluoreszenzfärbungen wurden genutzt, um die Expression von α SMA und Kollagen zu veranschaulichen. Dafür wurden α SMA und Kollagen (grün) jeweils mit CD206+ Makrophagen (rot) im Pankreas ko-färbt (B). Anhand von Färbungen wurden das fibrotische Gewebe sowie die Azinuszellen quantifiziert. Eine Depletion von Tregs führte im chronischen Pankreatitis-Modell zu einem Anstieg der Fibrose bei gleichzeitiger Abnahme der Azinuszellen (C). Masson-Goldner- und Azan-Färbungen wurden vom Pankreas angefertigt um die pankreatische Gewebeveränderung zu veranschaulichen und zu quantifizieren (D). Der Funktionsverlust von exokrinem Gewebe wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen von CK19 (grün) und Amylase (rot) gezeigt sowie quantifiziert. Dabei kam es zu Zunahme von CK19+ Zellen unter gleichzeitiger Abnahme von Amylase im Pankreas (E). Die Azinus-Proliferation wurde anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 gezeigt und quantifiziert. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Ki67 (cyan) sowie Amylase (rot) als Ko-Färbung angefertigt. Die Abwesenheit von Tregs verringert dabei die Proliferation von Azinuszellen im chronischen Pankreatitis Mausmodells (F). Weiterhin wurde die relative Genexpression der pankreatischen Proteasen Amylase und Trypsinogen im Pankreas bestimmt. Eine Depletion von Tregs während der chronischen Pankreatitis zeigte auch hier einen starken Funktionsverlust von exokrinem Gewebe (F). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau $*p < 0,05$.

Um die Auswirkungen dieser Gewebeveränderungen auf dem Organismus Maus zu untersuchen, wurde während des gesamten Versuchszeitraums das Körpergewicht der Tiere gemessen. In Abb. 12A wurde der prozentuale Gewichtsverlust dargestellt. Es zeigte sich deutlich, dass DEREГ Mäuse, deren Tregs depletiert wurden, nach 14 Tagen signifikant mehr Gewicht verloren, im Vergleich zu mit PBS behandelten DEREГ Mäusen. Die systemische Aktivierung der Immunantwort wurde weiterhin anhand der Bestimmung der Myeloperoxidase-Bestimmung der Lunge charakterisiert. Dabei lag die Aktivität dieses Enzymes in der DT-behandelten Gruppe höher (Abb. 12B).

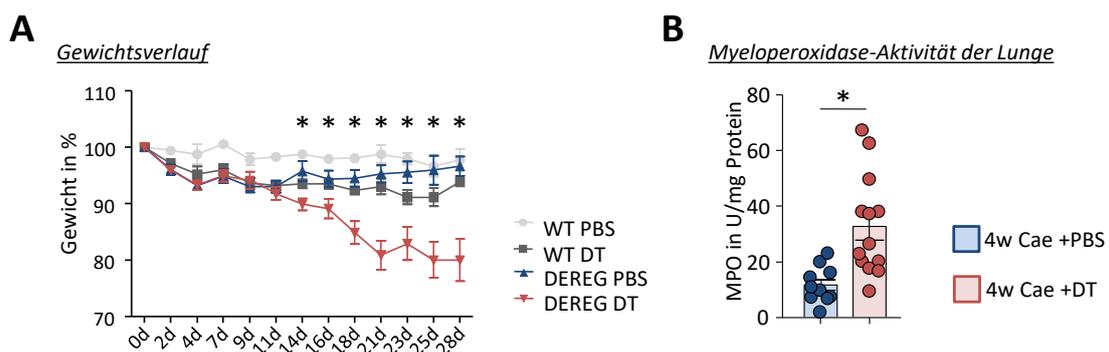


Abb. 12: Die pankreatische Gewebeveränderung beeinflusst den Schweregrad der chronischen Pankreatitis.

Im chronischen Mausmodell der DEREГ Mäuse wurde der Schweregrad der Pankreatitis charakterisiert. Dazu wurde über den gesamten Versuchszeitraum regelmäßig das Körpergewicht der Tiere bestimmt und die relative Gewichtsveränderung aufgetragen. Nach 14 Tagen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen DEREГ Mäusen die mit DT behandelt wurden im Vergleich zu mit PBS behandelten (WT: C57BL/6 Mäuse) (A). Weiterhin wurde die Myeloperoxidase-Aktivität in der Lunge bestimmt. Diese lag in der DT-behandelten Gruppe signifikant höher (B). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau $*p < 0,05$.

3.3.4 Die Beteiligung der Tregs am pankreatischen Remodeling-Prozess

Schließlich wurde der Einfluss der starken Gewebeveränderung auf die Expression typischer Wachstumsfaktoren und derer Mediatoren analysiert.

Wie bisher in der Arbeit beschrieben kommt es unter Abwesenheit von Tregs während einer chronischen Pankreatitis zu einer starken Induktion der Typ2-Immunantwort, vermittelt durch Th2-Zellen und alternativ aktivierte Makrophagen. Es kommt zur Aktivierung von PSC sowie einer exzessiven Bildung von fibrotischem Gewebe. Genexpressionsanalysen des FGF (engl. *fibroblast growth factor*) im Pankreas zeigten eine höhere Expression dieses Wachstumsfaktors unter Abwesenheit von Tregs (Abb. 14A). Der dazugehörige Rezeptor (FGFR) wurde im Pankreasgewebe mit α SMA ko-gefärbt. Auch hier zeigte sich deutliche eine höhere Expression dieses Rezeptors, sowie eine Ko-Lokalisation von FGFR mit α SMA (Abb. 14B).

Eine weitere Gruppe von Wachstumsfaktoren ist die Activin/Inhibin-Familie. Die einzelnen Faktoren dieser Gruppe sind aus einem Dimer von Inhibin-Ketten in verschiedener Zusammensetzung aufgebaut. Die hauptsächlichen Ketten sind Inhibin α und Inhibin β A. Deren relative mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR im Pankreasgewebe quantifiziert. Die Expression der Inhibin α -Kette zeigte keinen Unterschied, wohingegen die Expression der Inhibin β A in der Treg-depletierten Gruppe anstieg (Abb. 14C). Follistatin gehört als Gegenregulator ebenfalls zu dieser Gruppe. Follistatin zeigte in der DT-behandelten Gruppe eine signifikant geringere Genexpression im Pankreasgewebe. Die Wachstumsfaktoren der Activin/Inhibin-Familie gehören zur TGF β -Familie. Die Expression des Zytokins TGF β wurde ebenfalls im Pankreas quantifiziert. Unter Abwesenheit von Tregs kam es zu einem signifikanten Anstieg dieses Wachstumsfaktors (Abb. 14C). Immunfluoreszenzfärbungen von Inhibin β A, Kollagen und CD206+ Makrophagen veranschaulichen das Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Immunzellen. Es wird deutlich, dass CD206+ Zellen die Inhibin β A-Kette ko-lokalisieren (Abb. 14D).

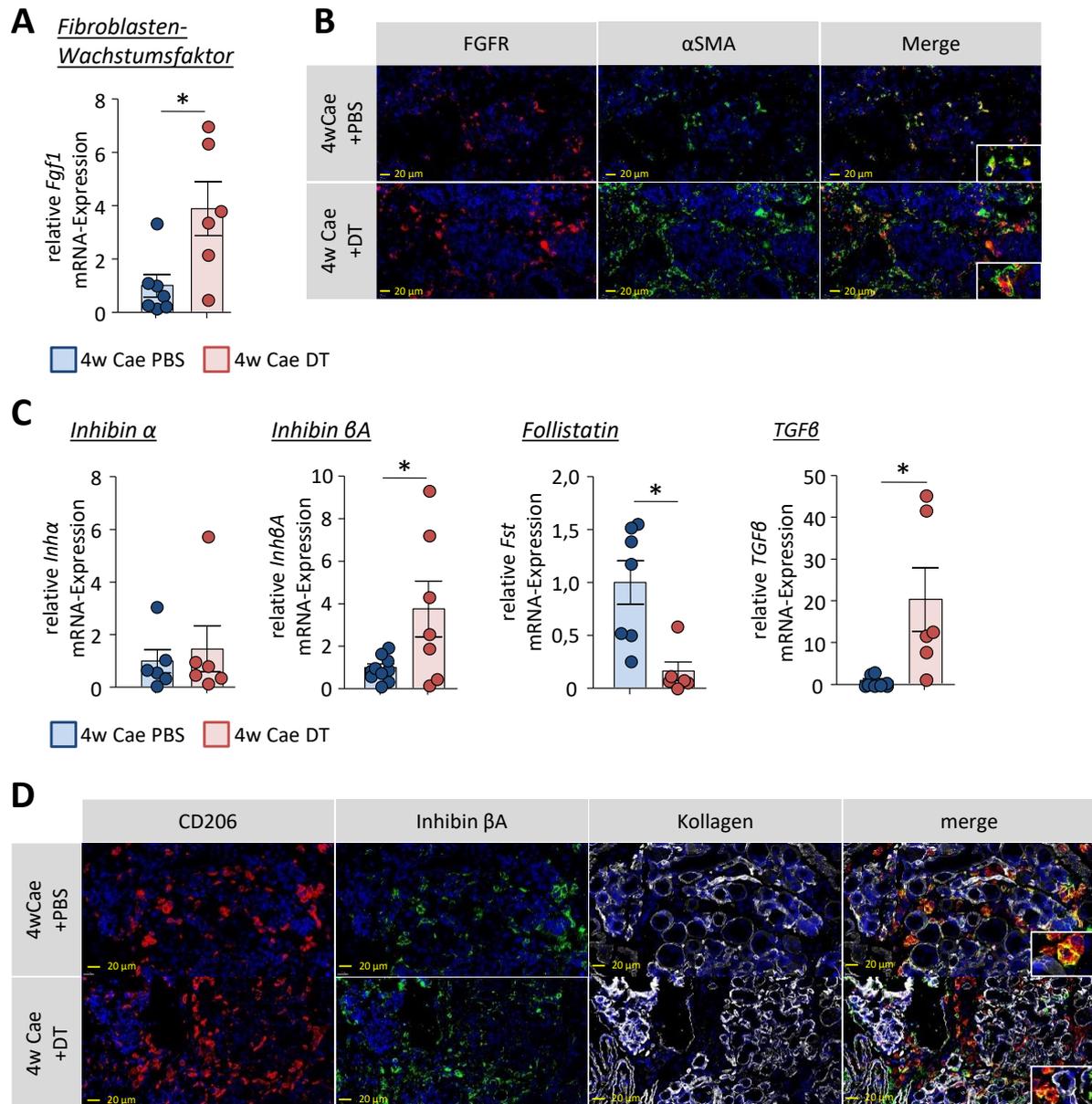


Abb. 13: Tregs regulieren die Aktivierung von Wachstumsfaktoren.

Die lokale Aktivierung bzw. Expression von Wachstumsfaktoren wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen und Genexpressionsanalysen bestimmt. Die mRNA-Expression von FGF (*fibroblast growth factor*) stieg im pankreatischen Gewebe in Abwesenheit von Tregs im chronischen Pankreatitis-Modell an (A). In Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich ebenfalls eine höhere Expression des FGFR (*fibroblast growth factor receptor*). Dabei wurde dieser Rezeptor z.T. auf α SMA+ PSCs (*pancreatic stellate cells*) exprimiert (B). Untersuchungen zur Aktivierung der Activin/Inhibin-Familie zeigten, dass in Abwesenheit von Tregs die Expression der Inhibin βA -Kette ansteigt, wohingegen sich die Expression der Inhibin α Kette nicht veränderte. Gleichzeitig wurde eine Reduktion in der Expression des Gegenregulators Follistatin in der DT depletierten Gruppe im chronischen Pankreatitis-Modell beobachtet (C). Die pankreatische TGF β Expression wurde unter Abwesenheit von Tregs induziert (C). Immunfluoreszenzfärbungen veranschaulichten die Expression von Inhibin βA im Zusammenspiel mit Kollagen und CD206+ Makrophagen. In diesem Zusammenhang zeigte sich auch eine Ko-Lokalisation von CD206+ Makrophagen und der Inhibin βA -Kette (D).

ILCs sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Zusammen mit ihrem freigesetzten Wachstumsfaktor Amphiregulin sind diese Zellen an Entzündungsreaktionen mit anschließendem Regenerationsprozessen beteiligt. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass Gata3⁺ ILCs in der Milz unter Abwesenheit von Tregs im chronischen Pankreatitis-Modell induziert werden (Abb. 14A). Die Gatingstrategie der ILCs befindet sich im Anhang 4. Bcl11b ist ein typischer Marker für ILCs vom Typ 2. Die relative Bcl11b Expression im Pankreas stieg unter Depletion von Tregs an (Abb. 14B). Genexpressionsanalysen zeigten, dass auch Amphiregulin in der DT-Gruppe im Pankreas höher exprimiert wird (Abb. 14C). CD90⁺ ILC (grün) wurden mit Amphiregulin (rot) ko-färbt, um deren Expression im Pankreasgewebe zu veranschaulichen. Hierbei zeigte sich eine Ko-Lokalisation beider Marker, sowie ein Anstieg sowohl von CD90⁺ Zellen als auch Amphiregulin unter Abwesenheit von Treg im chronischen Pankreatitis-Modell (Abb. 14D).

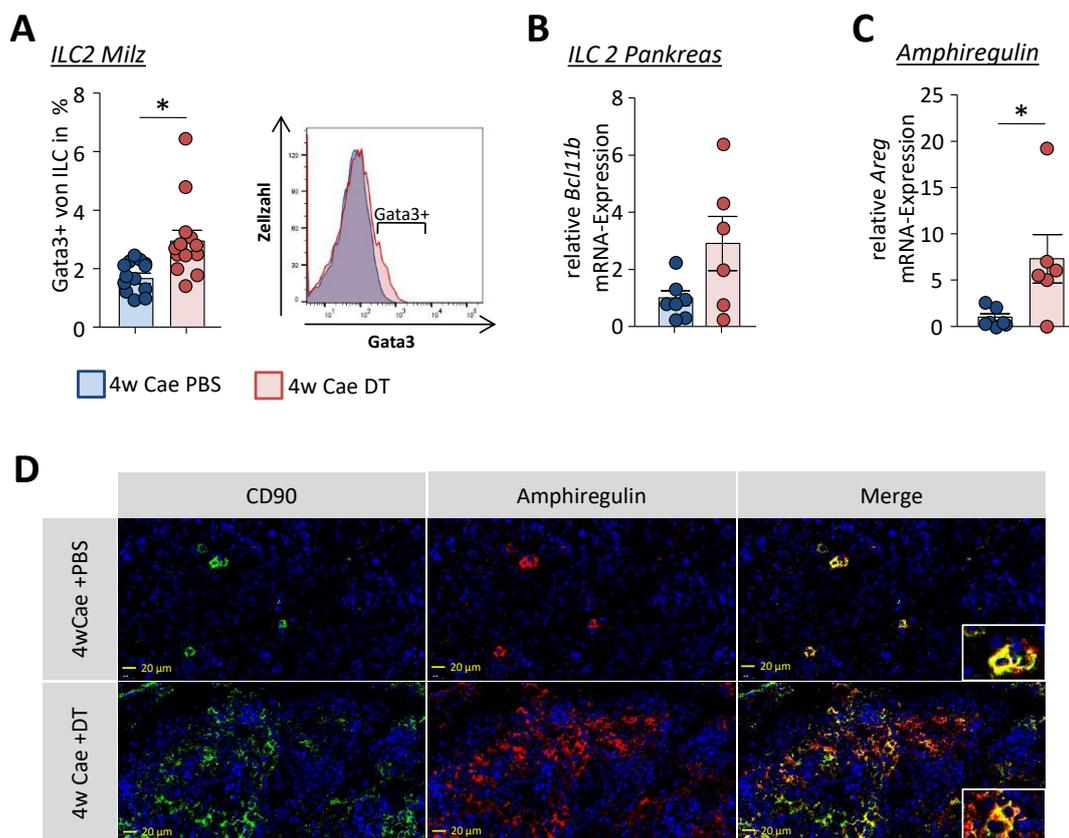


Abb. 14: Tregs regulieren ILCs vom Typ 2.

ILCs (*innate lymphoid cells*) vom Typ 2 (Gata3⁺ ILCs) wurden in der Milz unter Abwesenheit von Tregs im chronischen Pankreatitis-Modell induziert (A). Genexpressionsanalysen des Pankreas zeigten eine höhere BCL11b Expression in der Treg-depletierten Gruppe (B). Der Wachstumsfaktor Amphiregulin, der von ILCs freigesetzt wird, zeigte ebenfalls eine höhere Expression in DT-behandelten DEREK Mäusen im chronischen Modell (C). Immunfluoreszenzfärbungen von CD90⁺ ILCs (grün)

sowie des Wachstumsfaktors Amphiregulin (rot) veranschaulichten eine Ko-Lokalisation im Pankreasgewebe (D). Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau $*p < 0,05$.

Zusammenfassend kann man für die chronische Pankreatitis sagen, dass im Verlauf dieser Erkrankung Tregs vor allem die Typ2-Immunantwort supprimieren. Insbesondere die Regulation alternativ aktivierter Makrophagen scheint für die Aktivierung von PSCs eine wichtige Rolle zu spielen. In Abwesenheit von Tregs wurde eine signifikante Aktivierung von PSCs, eine exzessive Kollagenbildung, sowie eine unkontrollierte Aktivierung von Wachstumsfaktoren beobachtet.

4 Diskussion

Die Pankreatitis ist eine gastrointestinale Erkrankung, die durch eine starke lokale und systemische Immunreaktion charakterisiert ist. Der zugrunde liegende Pathomechanismus wurde bisher nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte bislang gezeigt werden, dass das Immunsystem, insbesondere Zellen des angeborenen Immunsystems, eine wichtige Rolle spielt, indem es den lokalen Gewebeschaden beeinflusst. Die Bedeutung der Zellen des adaptiven Immunsystems im Verlauf der Pankreatitis wurden bisher wenig untersucht. Das Zusammenspiel der Makrophagendifferenzierung und der T-Zell Antwort, im speziellen die Rolle der regulatorischen T-Zellen, sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Mausmodellen der akuten sowie der chronischen Pankreatitis untersucht werden. Anhand dieser Daten wurde weiterhin untersucht, ob eine therapeutische Steuerung der Immunantwort den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann.

4.1 Charakterisierung der T-Zell Antwort

Im Zuge der akuten Pankreatitis kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems. Das Ausmaß dieser Immunantwort wird durch den pankreatischen Schaden bestimmt, andersherum wird der Schweregrad der Pankreatitis auch durch die Intensität der Immunantwort beeinflusst. Zerstörte Azinuszellen setzen Zytokine, Chemokine sowie DAMPs frei und induzieren somit die Rekrutierung und auch Aktivierung von Leukozyten. Hemmt man diese Infiltration, führt dies zu einer reduzierten intrazellulären Protease-Aktivität, einer geringeren Inflammation und mildert letztendlich den Krankheitsverlauf [8]. Hauptsächlich infiltrieren Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen/Monozyten und Neutrophile das geschädigte Organ. Dagegen findet keine Infiltration von T-Lymphozyten in das Pankreasgewebe findet statt [40]. Allerdings zeigten Untersuchungen an T-Zell-deletierten Nacktmäusen sowie Versuche mit CD4-depletierende Antikörper, dass T-Zellen einen direkten Einfluss auf den Schweregrad der Pankreatitis haben [35, 40].

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass T-Zellen in der Milz nach Induktion einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis im Mausmodell aktiviert werden. Dabei werden insbesondere Th2-Zellen induziert (Abb. 3A und 3C). Diese Daten verdeutlichen, dass es im Zuge einer Pankreatitis zu einer systemischen Aktivierung von T-Zellen kommt [45].

Die initiale Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kann zu einem systemischen Schock mit Multiorganversagen führen (SIRS). Diese Hyperinflammation wird durch eine antiinflammatorische Immunantwort (CARS) limitiert [22]. Dabei wurde gezeigt, dass beide Vorgänge parallel verlaufen [45]. Hauptregulator für eine Immunsuppression sind die Tregs. Diese Zellen des adaptiven Immunsystems werden schon sehr früh nach Induktion einer Pankreatitis aktiviert (Abb. 3G). Zudem wurde mit Hilfe eines Suppressionsassays gezeigt, dass diese aktivierten Tregs die Proliferation von T-Effektorzellen stark hemmen können (Abb. 3H). Die erhöhte Treg-Aktivität und gesteigerte suppressive Kapazität wurde bereits für die Pathomechanismen der Sepsis, Trauma und Brandwunden beschrieben [71–73].

Weiterhin wurden Tregs von Pankreatitis-Mäusen isoliert und deren Transkriptom-Profil bestimmt (Anhang 5). In Tregs werden während einer Pankreatitis verschiedene Gene induziert, u.a. Gene antiinflammatorische Zytokine. Dies lässt darauf schließen, dass aufgrund der Induktion verschiedener Gene die suppressive Aktivität der Tregs gesteigert wird.

4.2 Tregs supprimieren die T-Effektor-Immunantwort und beeinflussen den Schweregrad der akuten Pankreatitis

Tregs kontrollieren nicht nur autoreaktive T-Zellen und sorgen somit für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz, sondern limitieren auch andere exzessive Immunantworten, um einer Autoimmunität vorzubeugen. Neben Autoimmunkrankheiten wurde auch für Allergien, Tumorentwicklung und Transplantationen der Einfluss von Tregs beschrieben. Dabei kann dieser Einfluss auf pathologische Prozesse zum einen vorteilhaft aber auch schädlich sein [74]. Die Bedeutung der Tregs für den Pathomechanismus der Pankreatitis wurde bisher kaum untersucht. Eigene bereits publizierte Daten [45] sowie eine Studie indem Tregs als Biomarker für den Schweregrad der Pankreatitis analysiert wurden [75], deuten auf eine wichtige Rolle hin. Die suppressive Wirkung von Tregs sollte in dieser Arbeit mittels gezielter Depletion aller FoxP3+ Zellen im Pankreatitis-Mausmodell untersucht werden. Dazu verwendeten wir das DEREK Mausmodell, welches von Lahl *et al.* entwickelt wurde [68].

Tregs wurden in DEREK Mäusen durch DT-Injektion depletiert. Diese Depletion führt zur Apoptose von FoxP3+ (GFP+)/CD25+ Zellen (Abb. 4A, Abb. 6A). Gleichzeitig kommt es zu einer höheren Expression der T-Effektormarker Tbet und GATA3. Dieser prozentuale Anstieg ist das Resultat einer vollständigen Depletion einer T-Zell Population (Abb. 4D).

Um die Bedeutung der Tregs in der akuten Pankreatitis genauer zu untersuchen, haben wir Tregs während einer milden Pankreatitis (8 h Caerulein-Injektion) und schweren nekrotisierenden Pankreatitis (partielle Gangligatur, 3 d) depletiert. In beiden Modellen kommt es trotz Depletion von Tregs zu einer gesteigerten Expression von T-Zellaktivierungsmarkern (CD69, CD25) (Abb. 4C, Abb. 6C). Diese Aktivierung der T-Zellen wird auch bei mit PBS behandelten Tieren unter Pankreatitis-Bedingungen beobachtet.

Wie zuvor beschrieben führt allein eine Depletion der Tregs in gesunden Tieren zu einem prozentualen Anstieg der T-Effektorpopulationen. Aufgrund der Verschiebung innerhalb der T-Effektorpopulationen werden Unterschiede in der Th-Immunantwort in der PBS- und DT-Gruppe getrennt analysiert. Das milde Pankreatitis-Modell zeigt kaum einer Veränderung der T-Effektor-Immunantwort (Abb. 4D). Jedoch wird nach Induktion einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis deutlich, dass es in Abwesenheit von Tregs zu einem signifikanten Anstieg der Th1- und Th2- Marker (Tbet und Gata3) im Vergleich zu gesunden Tieren (ohne Pankreatitis) kommt (Abb. 6D).

Tregs scheinen nicht nur einen Einfluss auf die systemische Immunreaktion zu haben, sondern auch den direkten Schaden einer Pankreatitis zu beeinflussen. Die Aktivität von Amylase und Lipase im Serum, MPO in der Lunge sowie die histologischen Untersuchungen des Pankreas zeigen eine Verringerung des Schweregrades der Pankreatitis in Abwesenheit von Tregs in beiden Pankreatitis-Modellen (Abb. 5, Abb. 7). Dabei hat die DT-Injektion keinen Einfluss, da die jeweiligen Kontrollen (ohne Pankreatitis) ein ähnliches Niveau zeigen. Es wird deutlich, dass nicht nur, wie lange angenommen, die proinflammatorische Immunreaktion den Schweregrad der Pankreatitis bestimmt, sondern auch die antiinflammatorische, Treg-induzierte Immunantwort [40, 45]. Die proinflammatorische Immunantwort der Pankreatitis ist hauptsächlich durch Zellen des angeborenen Immunsystems, welche das zerstörte Pankreasgewebe infiltrieren, charakterisiert [8]. Im Gegensatz dazu beobachtet man die antiinflammatorische Immunantwort eher in lymphoiden Organen [45]. Eine überschießende Pro-Inflammation wird durch erhöhte Induktion von Tregs unterdrückt. Diese überschießende Reaktion kann wiederum zu einer Hypoinflammation als Folge eines CARS führen. Im Zuge der Pankreatitis beobachten wir nicht nur eine starke Aktivierung von Tregs, sondern auch eine erhöhte suppressive Fähigkeit dieser Zellen. Eine systemische Hypoinflammation kann zu einer Beeinträchtigung der Treg/Th17-regulierten Balance der Darmbarriere führen [76]. In Abwesenheit von Tregs kommt es während einer akuten Pankreatitis im intestinalen

Immunsystems zu einem Anstieg von Ror γ ⁺ Th17-Zellen. Diese Zellen produzieren das proinflammatorische Zytokin IL17 und verstärken somit die intestinale Immunantwort. Dadurch wird die Darmschleimhaut vor einer Penetration von Mikroorganismen geschützt [47]. Genexpressionsanalysen von Proteinen der Darmschleimhaut zeigen deutlich, dass auch unter Abwesenheit von Tregs im Verlauf der Pankreatitis die Zusammensetzung der Darmschleimhaut intakter ist als in Gegenwart von Tregs. U.a. zeigt sich eine signifikant unterschiedliche Expression des sekretorischen Immunglobulin IgA. IgA wird von B-Zellen in der Darmschleimhaut sekretiert, sorgt für eine Neutralisation von Mikroben-Antigenen und schützt somit vor einer Penetration dieser Organismen [36]. Ebenfalls liegt eine geringere Genexpression des bakteriziden Lysozyms sowie der antimikrobiellen Defensine in Gegenwart von Tregs vor. Zusammen mit einer verminderten Expression der *Tight Junctions* Bestandteile Occludin und Claudin lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Treg-induzierte systemische Hypoinflammation während einer akuten Pankreatitis auch die Integrität der Darmbarriere beeinflusst.

Im Zuge der Pankreatitis konnten wir ebenfalls beobachten, dass die Anzahl CD8 α ⁺/CD3⁺ intraepitheliale Lymphozyten (IEL) abnimmt. IELs werden in der Epithelschicht der schützenden Darmschleimhaut exprimiert. Dort sind sie an der initialen Immunabwehr beteiligt, um die Integrität der Darmschleimhaut aufrechtzuerhalten [77]. Die IELs exprimieren im Vergleich zu anderen Lymphozyten Populationen vermehrt den $\gamma\delta$ -T-Zell Rezeptor (25-40 % der IELs) [78]. Diese $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen eine immunsuppressive Funktion, indem sie u.a. antimikrobielle Proteine aktivieren. Zudem ist bekannt, dass diese Zellen in der Darmschleimhaut an Gewebereparatur Mechanismen beteiligt sind [79]. Unsere Ergebnisse zeigen eine Abnahme dieser schützenden $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Darmschleimhaut. Verstärkt wird diese Abnahme durch das Vorhandensein von Tregs.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Treg-induzierte Hypoinflammation zu einer Dysbalance der Treg/Th17-regulierten, intestinalen Immunantwort kommt. Diese Dysbalance beeinflusst die Darmbarriere und ermöglicht die Translokationen von kommensalen Mikroorganismen, welche infizierte Nekrosen als eine mögliche Nebenerscheinung einer Pankreatitis auslösen [24]. Dabei gehen infizierte Nekrosen mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität im klinischen Verlauf einher [24]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für den Krankheitsverlauf der Sepsis beschrieben [80, 81]. Diese Erkenntnisse könnten

erklären, warum eine Treg-Depletion die die Bildung nekrotischem Pankreasgewebes verringert und dadurch den pankreatischen Schaden während der Pankreatitis reduziert.

4.3 Im chronischen Pankreatitis-Modell beeinflussen Tregs die Makrophagendifferenzierung und regulieren die Gewebeumstrukturierung

Die chronische Pankreatitis wird durch sich wiederholende akute Entzündungen des Pankreas charakterisiert, im Zuge dessen kann es zu einer irreversiblen Zerstörung des Pankreasgewebes kommen. Das exokrine Gewebe wird im Verlauf der akuten Entzündung zerstört und über die Zeit durch fibrotisches Gewebe ersetzt, diesen Prozess nennt man Nekrose-Fibrose Sequenz. Die Patienten entwickeln als Folge dieser Gewebeerstörung eine exokrine sowie auch endokrine Pankreasinsuffizienz [82]. Bisher werden diese Patienten nur symptomatisch behandelt, da es bislang keine effektive Strategie gibt, um die Progression der chronischen Pankreatitis zu begrenzen [83]. Bei der Entstehung einer chronischen Pankreatitis spielen pankreatische Sternzellen (PSC) eine zentrale Rolle [84, 85]. Aktiviert werden PSCs durch toxische Faktoren (z.B. Alkohol) oder durch Zytokine zerstörter Azinuszellen bzw. infiltrierender Leukozyten [86]. Die dominierende Population an Leukozyten während der chronischen Pankreatitis sind alternativ aktivierte Makrophagen [87]. Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen Makrophagen zählen, werden nach einem Gewebeschaden aktiviert und dabei auch von Tregs reguliert [88]. Für den Pathomechanismus der chronischen Pankreatitis wurde der Einfluss von Tregs bislang kaum untersucht. Die suppressive Wirkung von Tregs wurde in dieser Arbeit an Hand eines chronischen Pankreatitis-Mausmodells in DEREK Mäusen genauer analysiert. Eine Depletion von Tregs führt im chronischen Pankreatitis-Modell zu einer ungebremsten Th2-Immunantwort. Diese Induktion zeigt sich deutlich anhand der Zunahme von Gata3⁺ T-Zellen in der Milz und einer höheren Expression antiinflammatorischer Zytokine (IL4, IL10) (Abb. 9). Dahingegen wird eine Th1 (Tbet⁺/CD4⁺) - Immunantwort kaum beeinflusst.

Wie von Xue *et al.* bereits beschrieben, ist auch in den DEREK Mäusen nach Induktion einer chronischen Pankreatitis eine Infiltration von CD206⁺ Makrophagen zu beobachten [87]. Eine Depletion der Tregs verstärkt dabei die Aktivierung von CD206⁺ Makrophagen in der Milz und führt zu einer stärkeren Infiltration von CD206⁺ Makrophagen ins das Pankreasgewebe. Wahrscheinlich wird diese Makrophagendifferenzierung durch Tregs indirekt beeinflusst. Durch eine erhöhte Anzahl an Gata3⁺ Th2-Zellen kommt es zu einer gesteigerten Freisetzung

antiinflammatorischer Zytokine wie IL4 und IL10. Diese Zytokine wiederum aktivieren CD206+ Makrophagen. Wir beobachten außerdem eine erhöhte Expression typischer Makrophagenzytokine wie IL10 und TGF β (Abb. 10D, Abb. 14C). Diese antiinflammatorischen Zytokine führen zu einer Rekrutierung und Aktivierung von PSCs [87]. PSCs induzieren die Differenzierung von Fibroblasten, die wiederum Kollagen produzieren und somit die Entstehung von fibrotischem Gewebes induzieren [57]. Dieser Pathomechanismus ist in Abb. 15 grafisch dargestellt. Für unser Mausmodell können wir sowohl eine erhöhte Expression des PSC Protein α SMA als auch von Kollagen im Pankreas unter Abwesenheit von Tregs beobachten (Abb. 11A). Ebenfalls zeigt sich eine starke Ausbildung fibrotischem Gewebes unter gleichzeitiger Abnahme pankreatischer Azinuszellen (Abb. 11C+D). Diese exzessive Gewebeumstrukturierung führt auch zu einem Funktionsverlust des exokrinen Gewebes (Abb. 11E). In diesem Zusammenhang beobachten wir auch eine Abnahme der relativen Expression von Amylase und Trypsinogen im Pankreas (Abb. 11G). Diese massive Abnahme der exokrinen Funktion wird auch im Gewichtsverlauf der Mäuse deutlich, da die Verdauungsenzyme für den Nahrungsaufschluss nicht mehr zur Verfügung stehen. Tiere, deren Tregs durch DT-Injektion depletiert wurden, verlieren bereits nach 14 Tagen signifikant mehr Gewicht als mit PBS behandelten DEREGs.

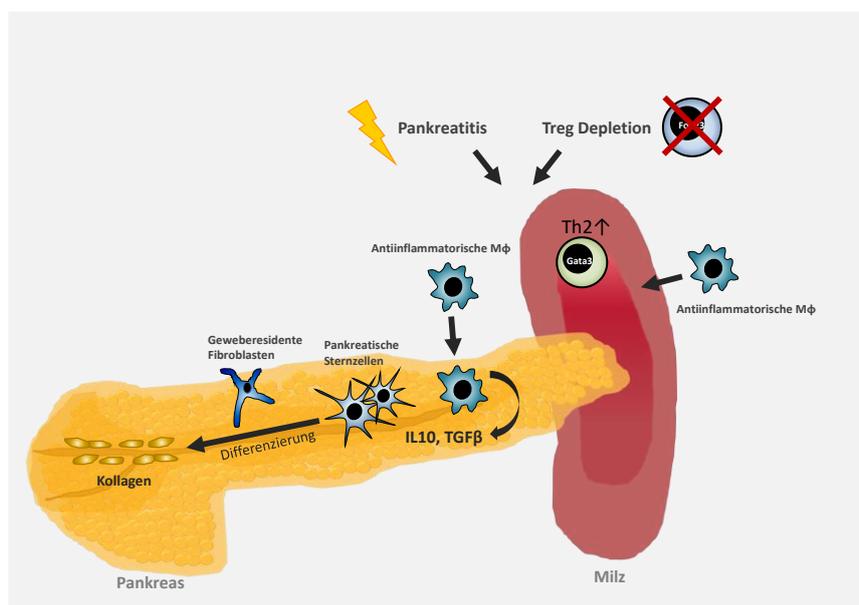


Abb. 15: Tregs beeinflussen die Makrophagenpolarisierung und regulieren über die Aktivierung von PSCs und Fibroblasten die Gewebeumstrukturierung.

Unter Abwesenheit von Tregs kommt es im chronischen Pankreatitis-Mausmodell zu einem Anstieg von antiinflammatorischen Makrophagen (M ϕ). Diese Zellen des angeborenen Immunsystems setzen u.a. IL10 und TGF β frei und

induzieren somit die Aktivierung von PSC, die wiederum eine Differenzierung geweberesidente Fibroblasten induzieren. Das Resultat dieser Dysregulation ist eine exzessive Vermehrung von Kollagenfasern, die schließlich zur Fibrosierung führen.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es aufgrund der Depletion von Tregs im chronischen Pankreatitis-Mausmodell nicht nur zu einer gesteigerten Gewebsfibrose, sondern auch zu einer Dysregulation im Regenerationsprozess kommt. Makrophagen dirigieren u.a. den Regenerationsprozess, indem sie auf lokale Signale reagieren und daraufhin ihren Phänotyp verändern [89, 90]. Damit kann gezeigt werden, dass Makrophagen am komplexen Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren und Zytokinen während des Regenerationsprozesses beteiligt sind. Der Einfluss der Tregs auf diesen Regenerationsprozess wurde im Zuge dieser Arbeit genauer untersucht, indem die Expression von Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren sowie das Vorhandensein von Zytokinen im pankreatischen Gewebe charakterisiert wurde. Wie bereits beschrieben führt eine chronische Pankreatitis zu einer gesteigerten Expression von Kollagenen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch FGF sowie der dazugehörige Rezeptor (FGFR) vermehrt exprimiert werden. Dabei führt eine Depletion von Tregs zu einem signifikanten Anstieg dieses Wachstumsfaktors im Vergleich zu den mit PBS behandelten Tieren (Abb. 14A und B).

Neben dem FGFR, kann die Differenzierung der Fibroblasten auch über den EGFR Signalweg erfolgen. Eine Überexpression dieses Rezeptors ist mit der Entstehung von Tumoren assoziiert [91]. Verschiedene Wachstumsfaktoren wirken über den EGFR-Signalweg. Dazu zählen EGF, TGF α , Epiregulin und Amphiregulin [92]. Amphiregulin gehört zur Typ 2-Immunantwort [58]. Dieser Wachstumsfaktor wird von antiinflammatorischen Makrophagen und ILC2s nach einer Gewebeerstörung gebildet. Eine Ko-Lokalisation von CD90+ ILCs und Amphiregulin konnte im Pankreasgewebe während einer chronischen Pankreatitis beobachtet werden. Amphiregulin induziert das Wachstum von Epithelzellen und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Gewebeerneuerung. Eine entscheidende Rolle dieses Wachstumsfaktors wurde bereits für die Lungenfibrose sowie für Regenerationsprozesse der Leber beschrieben [59, 93]. Unsere Daten zeigen einen Anstieg von ILCs Typ 2 sowie des Wachstumsfaktors Amphiregulin in Abwesenheit von Tregs während der chronischen Pankreatitis (Abb. 14E und F). Dies lässt vermuten, dass Tregs auch einen Einfluss auf die Regulation von ILCs sowie dessen Mediator haben.

Ein weiterer Wachstumsfaktor ist Activin A. Proteine der Activin/Inhibin-Familie gehören zur TGF β -Familie. Sie sind neben der Induktion von Regenerationsprozessen auch an der Entwicklung des endo- und exokrinen Pankreas beteiligt. Activin A bildet ein Homodimer aus zwei β A-Untereinheiten. Der Gegenregulator Inhibin A setzt sich aus einer β A- und α -Untereinheit zusammen [94]. Innerhalb der Activin/Inhibin-Familie gibt es noch weitere Mitglieder deren Zusammensetzung in Abb. 16 genauer veranschaulicht wird.

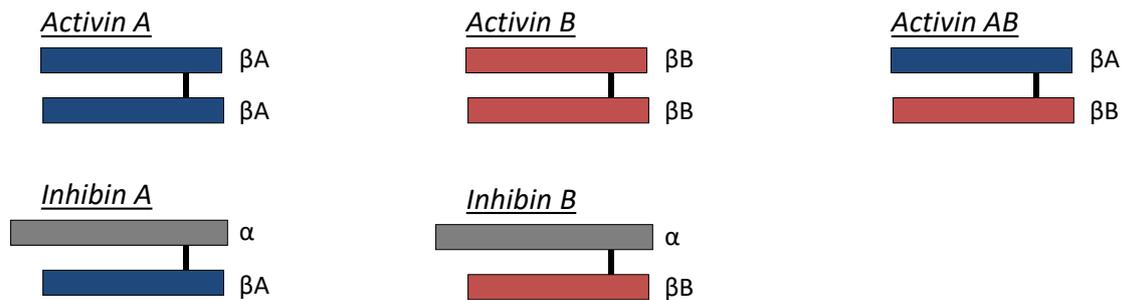


Abb. 16: Zusammensetzung der Activine und Inhibine.

Activine setzen sich aus zwei β -Untereinheiten zusammen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Inhibine bestehen aus einer α -Kette und einer β -Kette, welche ebenfalls über eine Disulfidbrücke verknüpft sind.

Genexpressionsanalysen zeigen, dass die Expression der α -Kette durch eine Depletion von Tregs nicht beeinflusst wird. Jedoch beobachteten wir eine gesteigerte Expression der β A-Untereinheit (Abb. 14C). Daraus lässt sich schließen, dass eine Depletion von Tregs im chronischen Pankreatitis-Mausmodell zu einer höheren Expression von Activin A führt. Activin A kann PSCs und Fibroblasten aktivieren [95]. Dieser Prozess wird durch das Zytokin TGF β gesteigert. Genexpressionsanalysen bestätigten eine signifikant höhere TGF β -Expression im Pankreas in der Treg-depletierten Gruppe. Ein weiterer Inhibitor von Activin A ist Follistatin. Follistatin zeigt in unserem chronischen Pankreatitis-Modell eine geringere Expression im Pankreas in Abwesenheit von Tregs (Abb. 14C). Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass CD206+ Makrophagen die Inhibin β A-Untereinheit exprimieren. Eine gesteigerte antiinflammatorische Makrophagenpolarisation in Abwesenheit von Tregs während einer chronischen Pankreatitis kann somit zu einer unzureichenden Regulierung in der Activin A-Aktivität führen. Dieser Prozess verursacht eine unkontrollierten Aktivierung und im Folgenden eine Überaktivierung von PSCs und einer gesteigerten Kollagenbildung.

Zusammenfassend kann über die Wirkung der Tregs im chronischen Pankreatitis-Mausmodell gesagt werden, dass Tregs nicht nur die T-Effektor-Immunantwort regulieren, sondern auch

die Makrophagenpolarisation beeinflussen, sowie einen starken Einfluss auf Regenerationsprozesse haben.

4.4 Ausblick/Limitationen

In dieser Arbeit konnte anhand des DREG-Mausmodells die suppressive Wirkung der Tregs während einer Pankreatitis gut charakterisiert werden. Tregs konnten durch die Gabe von DT gezielt depletiert werden. Doch nicht nur Tregs wurden depletiert, sondern auch die von Tregs freigesetzten Mediatoren. Transkriptomdaten von Tregs, isoliert aus Mäusen mit einer Pankreatitis, zeigten dass vor allem die Gene von IL10 und TGF β induziert werden. Jedoch konnten wir zeigen, dass unter Abwesenheit von Tregs diese antiinflammatorischen Zytokine während einer Pankreatitis sogar ansteigen. Somit lässt sich vermuten, dass durch die Depletion von Tregs kompensatorisch andere Zellen zu einer gesteigerten Synthese dieser antiinflammatorischen Zytokine getrieben werden. IL10 und TGF β könnten in dem Pathomechanismus der Pankreatitis jedoch eine noch viel entscheidendere Rolle spielen als Tregs. Mit Hilfe von k.o. Mäusen oder deletierenden Antikörpern könnte die Wirkung dieser antiinflammatorischen Zytokine auf die Pankreatitis genauer charakterisiert werden.

Weiterhin ist nicht ausreichend geklärt wie T-Zellen und im Besonderen Tregs sehr schnell nach der Induktion einer Pankreatitis aktiviert werden können. Normalerweise benötigt eine T-Zell-Antwort einige Tage, um auf einen Stimulus zu reagieren. Wir beobachten hingegen bei einer Caerulein induzierten Pankreatitis bereits nach 8 h eine Aktivierung von Tregs. Daher kann nur vermutet werden, dass neben einer Zell-vermittelten Aktivierung lösliche Mediatoren, wie Zytokine, viel schneller reagieren können und somit den Verlauf der Pankreatitis entscheidend mitbestimmen.

5 Zusammenfassung

Die Pankreatitis ist eine relativ häufige gastrointestinale Erkrankung deren Pathomechanismus bisher nicht vollständig geklärt wurde. Besonders die Rolle des Immunsystems scheint einen wichtigen Einfluss auf den Verlauf dieser Erkrankung zu haben. Gut charakterisiert ist bereits die initiale lokale Immunantwort. Zerstörte Azinuszellen setzen DAMPs (engl. *damage-associated molecular pattern*) frei, die wiederum eine Infiltration von Zellen des angeborenen Immunsystems in das Pankreasgewebe induzieren und aktivieren. Zu diesen Zellen gehören Makrophagen und Neutrophile. T-Zellen, welche zum adaptiven Immunsystem gehören, wandern nicht in das Pankreas ein, sie werden jedoch systemisch aktiviert. Vor allem Th2-Zellen (T-Helferzellen Typ2) und Tregs (regulatorische T-Zellen) werden im Verlauf einer Pankreatitis induziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tregs während einer Pankreatitis nicht nur aktiviert werden, sondern ebenfalls eine höhere suppressive Kapazität besitzen.

Die genaue Rolle dieser antiinflammatorischen Immunantwort und im speziellen der Einfluss von Tregs sollte in dieser Arbeit mit Hilfe von DREG Mäusen (engl. *depletion of regulatory T cells*) genauer charakterisiert werden. Durch gezielte Depletion von Tregs mittels DT (Diphtheria Toxin) kann die Auswirkung der Abwesenheit von Tregs im Pankreatitis-Mausmodell untersucht werden. Im akuten Modell kommt es zu einem systemischen Anstieg der T-Effektor-Immunantwort. Die Depletion von Tregs hat zudem eine Auswirkung auf den Schweregrad der Erkrankung. Unter Abwesenheit von Tregs sinkt im akuten Pankreatitis-Modell der pankreatische Schaden. Als eine mögliche Ursache konnte die Dysbalance der Treg/Th17 regulierten intestinalen Immunantwort identifiziert werden, welche zu einer Zerstörung der Darmbarriere führt und eine Translokation kommensaler Mikroorganismen ins nekrotische Pankreasgewebe initiiert.

Im chronischen Pankreatitis-Modell konnte gezeigt werden, dass die T-Zelldifferenzierung einen wichtigen Einfluss auf die Makrophagenpolarisation hat und dadurch den Verlauf der Chronifizierung der Pankreatitis mitbestimmt. Eine Depletion von Tregs in der chronischen Pankreatitis führt zu einer ungebremsten Th2-Antwort. Über die freigesetzten Zytokine, wie z.B. IL4, wird die Makrophagenpolarisation in Richtung der antiinflammatorischen Makrophagen verschoben. Diese Makrophagen induzieren über IL10 und TGF β die Aktivierung ruhender PSCs (pankreatische Sternzelle) und regulieren somit Regenerationsprozesse.

Kommt es zu einer Dysregulation dieser Makrophagenpolarisation, kann dieser Regenerationsprozess unkontrolliert erfolgen. Als Folge dessen kommt es nicht nur zu einer gesteigerten Aktivierung von PSCs, sondern auch zu einer exzessiven Kollagenproduktion, welche zu einer pathologischen Fibrose führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass Tregs einen entscheidenden Einfluss auf die Gewebeumstrukturierung des Pankreas haben. Eine Depletion von Tregs im chronischen Pankreatitis-Modell induziert über die Aktivierung antiinflammatorischer Makrophagen eine Expression von PSCs. Diese unkontrollierte Induktion führt zu einer gesteigerten Kollagenproduktion und Bildung von fibrotischem Pankreasgewebe unter gleichzeitigem Verlust von Azinuszellen. Diese exzessive Gewebeumstrukturierung resultiert in einem Funktionsverlust des exokrinen Gewebes. Mäuse deren Tregs depletiert wurden verloren im chronischen Pankreatitis-Modell bereits nach 14 Tagen signifikant an Gewicht.

Weitere wichtige Faktoren, die im Regenerationsprozess eine Rolle spielen, sind Wachstumsfaktoren. Genexpressionsanalysen und histologische Färbungen verdeutlichen, dass Tregs die Induktion von Wachstumsfaktoren mitbestimmen.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass Tregs im akuten Pankreatitis-Modell die T-Effektor-Immunantwort supprimieren und dadurch den Verlauf der Pankreatitis verschlechtern. Im chronischen Pankreatitis-Modell sorgen Tregs dahingegen für eine Balance der Makrophagenpolarisation, und regulieren den Remodeling-Prozess, indem sie z.B. die Bildung fibrotischem Gewebes limitieren.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Infiltration von Zellen des angeborenen Immunsystem als Folge einer verfrühten Aktivierung intrapankreatischer Enzyme.	3
Abb. 2: Charakterisierung von Tregs.	7
Abb. 3: Im Verlauf der Pankreatitis werden Tregs aktiviert und besitzen eine höhere suppressive Aktivität.	39
Abb. 4: In Abwesenheit von Tregs werden T-Zellen im akuten Pankreatitis-Mausmodell aktiviert.	41
Abb. 5: In Abwesenheit von Tregs sinkt der Schweregrad einer akuten Pankreatitis.	42
Abb. 6: In der akuten Pankreatitis supprimieren Tregs die T-Effektor-Immunantwort.	44
Abb. 7: Eine erhöhte T-Effektor-Immunantwort senkt den Schweregrad der Pankreatitis. ...	45
Abb. 8: Eine Dysbalance der Treg/Th17-Immunantwort im Dünndarm führt zur einer gestörten Darmbarriere.	47
Abb. 9: Die Th2-Immunantwort wird während der chronischen Pankreatitis von Tregs reguliert.	50
Abb. 10: Die Th2-Immunantwort induziert antiinflammatorische Makrophagen.	51
Abb. 11: Die pankreatische Gewebeveränderung wird durch Aktivierung pankreatischer Sternzellen bestimmt.	53
Abb. 12: Die pankreatische Gewebeveränderung beeinflusst den Schweregrad der chronischen Pankreatitis.	54
Abb. 13: Tregs regulieren die Aktivierung von Wachstumsfaktoren.	56
Abb. 14: Tregs regulieren ILCs vom Typ 2.	57
Abb. 15: Tregs beeinflussen die Makrophagenpolarisierung und regulieren über die Aktivierung von PSCs und Fibroblasten die Gewebeumstrukturierung.	64
Abb. 16: Zusammensetzung der Active und Inhibine.	66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: T-Zell Panel 1	28
Tab. 2: Makrophagen Panel	28
Tab. 3: T-Zell Panel 2	28
Tab. 4: ILC Panel	28
Tab. 5: TCR-Panel.....	29
Tab. 6: Komponenten und Temperaturprofil der cDNA Synthese.....	34
Tab. 7: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches.....	35
Tab. 8: Temperatur-Zeit-Programm des Thermalcyclers	35

6 Literatur

- [1] Amboss. Fokus Physikum. Im Internet: <https://www.amboss.com/de/wissen/Pankreas>; Stand: 11.08.2020
- [2] Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, et al. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G352-62. doi:10.1152/ajpgi.1998.275.2.G352
- [3] Bank S, Singh P, Pooran N, et al. Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 50–60. doi:10.1097/00004836-200207000-00012
- [4] Chiari H. Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde*: 69–96
- [5] Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, et al. Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology* 1992; 103: 205–213. doi:10.1016/0016-5085(92)91114-j
- [6] Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA, et al. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? *Annu Rev Physiol* 2007; 69: 249–269. doi:10.1146/annurev.physiol.69.031905.161253
- [7] Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, et al. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1081–1091. doi:10.1016/s0016-5085(96)70077-x
- [8] Sandler M, Dummer A, Weiss FU, et al. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut* 2013; 62: 430–439. doi:10.1136/gutjnl-2011-300771
- [9] Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, et al. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 974–984. doi:10.1053/gast.2002.32409
- [10] Ammann RW, Akovbiantz A, Largiader F, et al. Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients. *Gastroenterology* 1984; 86: 820–828
- [11] Sarles H, Bernard JP, Gullo L. Pathogenesis of chronic pancreatitis. *Gut* 1990; 31: 629–632. doi:10.1136/gut.31.6.629
- [12] Maisonneuve P, Lowenfels AB. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis* 2002; 20: 32–37. doi:10.1159/000063165
- [13] Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14: 141–145. doi:10.1038/ng1096-141
- [14] Rosendahl J, Witt H, Szmola R, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2008; 40: 78–82. doi:10.1038/ng.2007.44

- [15] Witt H, Luck W, Hennies HC, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000; 25: 213–216. doi:10.1038/76088
- [16] Koop I, Hrsg. *Gastroenterologie compact*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009. doi:10.1055/b-002-11373
- [17] 6.4 Akute Pankreatitis. In: Koop I, Hrsg. *Gastroenterologie compact*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009. doi:10.1055/b-0034-59602
- [18] Aghdassi AA, Mayerle J. Volumenmanagement, enterale Ernährung und Schmerztherapie bei akuter Pankreatitis. In: Beger HG, Büchler MW, Dralle H, Lerch MM, Malfertheiner P, Mössner J, Riemann JF, Hrsg. *Erkrankungen des Pankreas*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013: 32–38. doi:10.1007/978-3-642-37964-2_6
- [19] Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279–289. doi:10.1038/nri2215
- [20] Sendler M, Weiss F-U, Golchert J, et al. Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* 2018; 154: 704–718.e10. doi:10.1053/j.gastro.2017.10.018
- [21] Shrivastava P, Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3995–4002. doi:10.3748/wjg.v16.i32.3995
- [22] Mayerle J. A novel role for leucocytes in determining the severity of acute pancreatitis. *Gut* 2009; 58: 1440–1441. doi:10.1136/gut.2009.186692
- [23] Foitzik T. The enteral factor in pancreatic infection. *Pancreatology* 2001; 1: 217–223. doi:10.1159/000055814
- [24] van Dijk SM, Hallensleben ND, van Santvoort HC, et al. Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials. *Gut* 2017; 66: 2024–2032. doi:10.1136/gutjnl-2016-313595
- [25] Aderem A, Underhill DM. MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. *Annual Review of Immunology* 1999; 17: 593–623. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593
- [26] Naito M, Umeda S, Yamamoto T, et al. Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 133–138. doi:10.1002/jlb.59.2.133
- [27] Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, et al. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 2013; 14: 986–995. doi:10.1038/ni.2705
- [28] Calderon B, Carrero JA, Ferris ST, et al. The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. *J Exp Med* 2015; 212: 1497–1512. doi:10.1084/jem.20150496
- [29] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953–964. doi:10.1038/nri1733
- [30] Stefater JA, Ren S, Lang RA, et al. Metchnikoff's Policemen—Macrophages in Development, Homeostasis and Regeneration. *Trends Mol Med* 2011; 17: 743–752. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.009

- [31] Perides G, Weiss ER, Michael ES, et al. TNF-alpha-dependent regulation of acute pancreatitis severity by Ly-6C(hi) monocytes in mice. *J Biol Chem* 2011; 286: 13327–13335. doi:10.1074/jbc.M111.218388
- [32] Arora S, Dev K, Agarwal B, et al. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* 2017; 223: 383–396. doi:10.1016/j.imbio.2017.11.001
- [33] Aghdassi AA, Storck C, Sendler M, et al. Die PMN-Elastase beeinflusst den Schweregrad der akuten Pankreatitis über eine direkte Wirkung auf die Azinuszelle. *Z Gastroenterol* 2012; 50. doi:10.1055/s-0032-1324148
- [34] Mayerle J, Schnekenburger J, Krüger B, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 2005; 129: 1251–1267. doi:10.1053/j.gastro.2005.08.002
- [35] Demols A, Le Moine O, Desalle F, et al. CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 2000; 118: 582–590. doi:10.1016/s0016-5085(00)70265-4
- [36] Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011. doi:10.1007/978-3-8274-2647-5
- [37] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6: 1123–1132. doi:10.1038/ni1254
- [38] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 652–657. doi:10.1016/j.coi.2007.07.020
- [39] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 177: 566–573. doi:10.4049/jimmunol.177.1.566
- [40] Glaubitz J, Wilden A, van den Brandt C, et al. Experimental pancreatitis is characterized by rapid T cell activation, Th2 differentiation that parallels disease severity, and improvement after CD4+ T cell depletion. *Pancreatology* 2020. doi:10.1016/j.pan.2020.10.044
- [41] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–1164
- [42] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330–336. doi:10.1038/ni904
- [43] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057–1061. doi:10.1126/science.1079490
- [44] Walker LSK. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun* 2013; 45: 49–57. doi:10.1016/j.jaut.2013.06.006
- [45] Sendler M, van den Brandt C, Glaubitz J, et al. NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Response and Compensatory Anti-

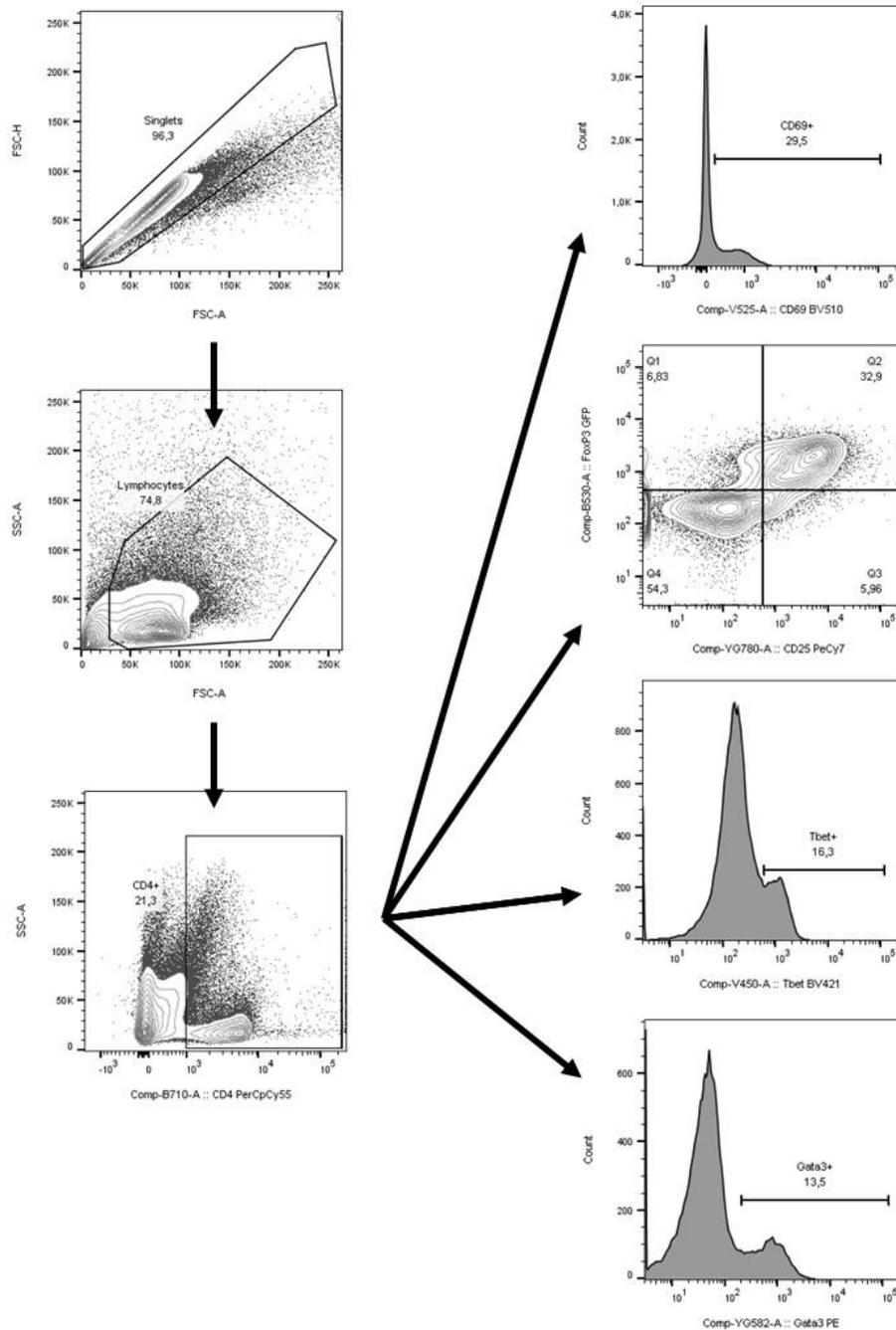
- Inflammatory Response Syndromes in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2020; 158: 253-269.e14. doi:10.1053/j.gastro.2019.09.040
- [46] Eisenstein EM, Williams CB. The T(reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatr Res* 2009; 65: 26R-31R. doi:10.1203/PDR.0b013e31819e76c7
- [47] Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. doi:10.1007/978-3-662-56004-4
- [48] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427–434. doi:10.1038/nature06005
- [49] Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, et al. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: S48-S54. doi:10.1016/j.cgh.2009.07.038
- [50] Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115: 421–432. doi:10.1016/s0016-5085(98)70209-4
- [51] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 723–737. doi:10.1038/nri3073
- [52] Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, et al. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988; 241: 708–712. doi:10.1126/science.3041594
- [53] Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 2016; 44: 450–462. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.015
- [54] Witt H. Pathogenese der chronischen Pankreatitis. *Gastroenterologe* 2014; 9: 6–13. doi:10.1007/s11377-013-0818-7
- [55] Strobel O. Ätiologie und Pathogenese der chronischen Pankreatitis. In: Beger HG, Büchler MW, Dralle H, Lerch MM, Malfertheiner P, Mössner J, Riemann JF, Hrsg. *Erkrankungen des Pankreas*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013: 81–85. doi:10.1007/978-3-642-37964-2_15
- [56] Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, et al. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *J Biol Chem* 2013; 288: 14824–14838. doi:10.1074/jbc.M113.451336
- [57] Haber PS, Keogh GW, Apte MV, et al. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1087–1095. doi:10.1016/S0002-9440(10)65211-X
- [58] Zaiss DM, Yang L, Shah PR, et al. Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes. *Science* 2006; 314: 1746. doi:10.1126/science.1133715
- [59] Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, et al. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 2005; 128: 424–432. doi:10.1053/j.gastro.2004.11.006
- [60] Bockman DE. Morphology of the exocrine pancreas related to pancreatitis. *Microsc. Res. Tech.* 1997; 37: 509–519. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19970601)37:5/6<509::AID-JEMT13>3.0.CO;2-U

- [61] Desai BM, Oliver-Krasinski J, Leon DD de, et al. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration. *J Clin Invest* 2007; 117: 971–977. doi:10.1172/JCI29988
- [62] Siveke JT, Lubeseder-Martellato C, Lee M, et al. Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2008; 134: 544–555. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.003
- [63] Morris JP, Cano DA, Sekine S, et al. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 508–520. doi:10.1172/JCI40045
- [64] Jakubison BL, Schweickert PG, Moser SE, et al. Induced PTF1a expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cells activates acinar gene networks, reduces tumorigenic properties, and sensitizes cells to gemcitabine treatment. *Mol Oncol* 2018; 12: 1104–1124. doi:10.1002/1878-0261.12314
- [65] Zhou Q, Melton DA. Pancreas regeneration. *Nature* 2018; 557: 351–358. doi:10.1038/s41586-018-0088-0
- [66] Burger HG, Igarashi M. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 885–886
- [67] Nakamura T, Sugino K, Titani K, et al. Follistatin, an activin-binding protein, associates with heparan sulfate chains of proteoglycans on follicular granulosa cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 19432–19437
- [68] Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 2007; 204: 57–63. doi:10.1084/jem.20061852
- [69] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263–273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
- [70] Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* 2003; 3: 18. doi:10.1186/1472-6750-3-18
- [71] Monneret G, Debard A-L, Venet F, et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* 2003; 31: 2068–2071. doi:10.1097/01.CCM.0000069345.78884.0F
- [72] MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, et al. Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg* 2006; 244: 514–523. doi:10.1097/01.sla.0000239031.06906.1f
- [73] Ni Choileain N, MacConmara M, Zang Y, et al. Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J Immunol* 2006; 176: 225–236. doi:10.4049/jimmunol.176.1.225
- [74] Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353–360. doi:10.1038/ni1181

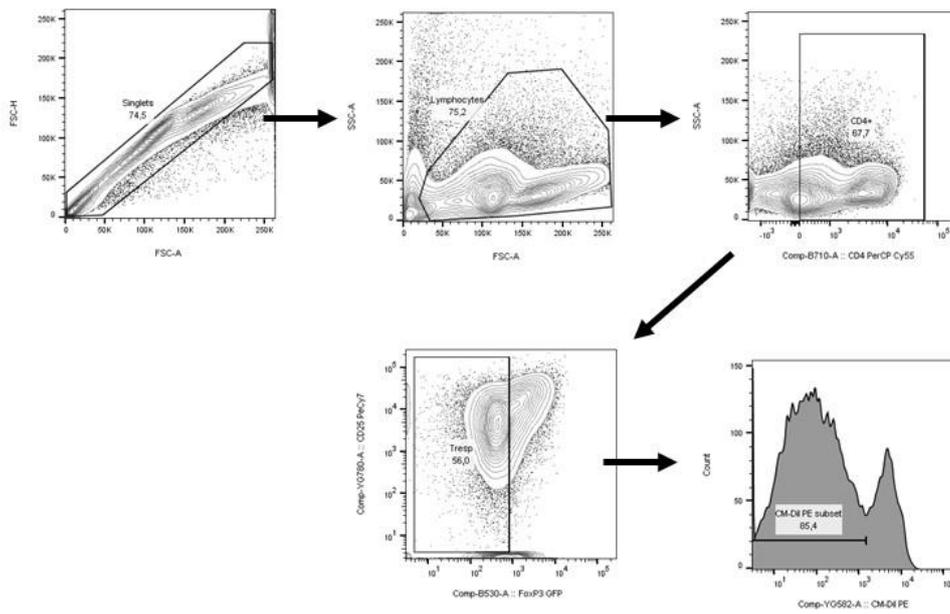
- [75] Minkov GA, Yovtchev YP, Halacheva KS. Increased Circulating CD4+CD25+CD127low/neg Regulatory T-cells as a Prognostic Biomarker in Acute Pancreatitis. *Pancreas* 2017; 46: 1003–1010. doi:10.1097/MPA.0000000000000894
- [76] Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol* 2015; 6: 639. doi:10.3389/fimmu.2015.00639
- [77] Taguchi T, Aicher WK, Fujihashi K, et al. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3+, gamma/delta TCR+ T cells produce IFN-gamma and IL-5. *J Immunol* 1991; 147: 3736–3744
- [78] Hoffmann JC, Autschbach F, Hrsg. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis. Stuttgart: Thieme; 2004
- [79] Holtmeier W, Kabelitz D. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 2005; 86: 151–183. doi:10.1159/000086659
- [80] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 862–874. doi:10.1038/nri3552
- [81] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 260–268. doi:10.1016/S1473-3099(13)70001-X
- [82] Klöppel G, Maillet B. Die Entwicklung der chronischen Pankreatitis aus der akuten Pankreatitis: Ein pathogenetisches Konzept. *Zentralbl Chir* 1995; 120: 274–277
- [83] Witt H, Apte MV, Keim V, et al. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* 2007; 132: 1557–1573. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.001
- [84] Apte M, Pirola R, Wilson J. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2711–2722. doi:10.1089/ars.2011.4079
- [85] Omary MB, Lugea A, Lowe AW, et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 50–59. doi:10.1172/JCI30082
- [86] Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Molecular mechanisms of alcoholic pancreatitis. *Dig Dis* 2005; 23: 232–240. doi:10.1159/000090170
- [87] Xue J, Sharma V, Hsieh MH, et al. Alternatively activated macrophages promote pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis. *Nat Commun* 2015; 6: 7158. doi:10.1038/ncomms8158
- [88] Murphy TJ, Ni Choileain N, Zang Y, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury. *J Immunol* 2005; 174: 2957–2963. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2957
- [89] Wu J, Zhang L, Shi J, et al. Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury. *EBioMedicine* 2020; 58: 102920. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102920
- [90] DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2019; 19: 369–382. doi:10.1038/s41577-019-0127-6

- [91] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183–232. doi:10.1016/1040-8428(94)00144-i
- [92] Boyles JS, Atwell S, Druzina Z, et al. Structural basis of selectivity and neutralizing activity of a TGF α /epiregulin specific antibody. *Protein Sci* 2016; 25: 2028–2036. doi:10.1002/pro.3023
- [93] Zhou Y, Lee J-Y, Lee C-M, et al. Amphiregulin, an epidermal growth factor receptor ligand, plays an essential role in the pathogenesis of transforming growth factor- β -induced pulmonary fibrosis. *J Biol Chem* 2012; 287: 41991–42000. doi:10.1074/jbc.M112.356824
- [94] Burger HG, Igarashi M. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *Endocrinology* 1988; 122: 1701–1702. doi:10.1210/endo-122-4-1701
- [95] Ohnishi N, Miyata T, Ohnishi H, et al. Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis. *Gut* 2003; 52: 1487–1493. doi:10.1136/gut.52.10.1487

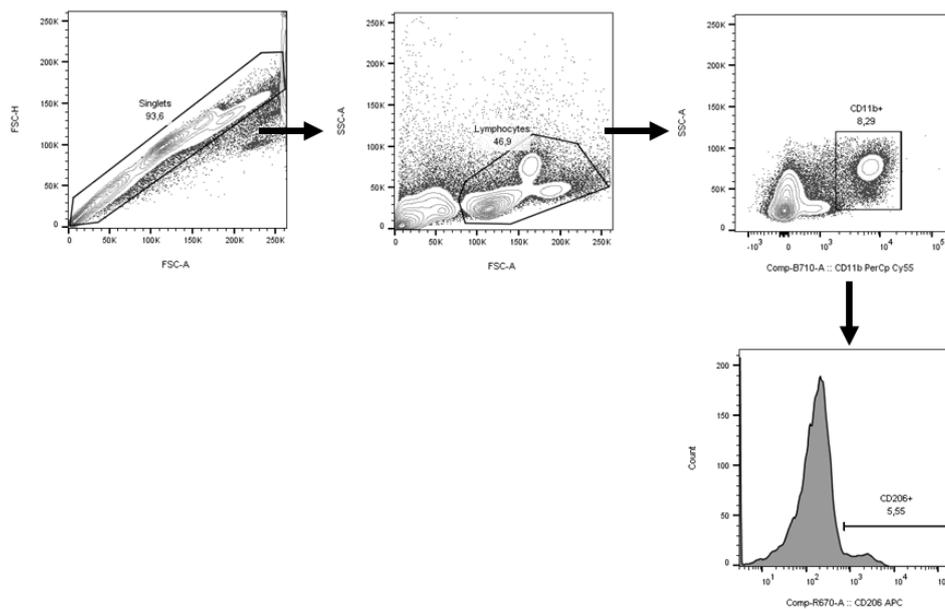
Anhang

Gatingstrategie T-Zell-Antwort**Anhang 1: Gatingstrategie der T-Zell-Antwort.**

CD4+ Zellen wurden anhand Aktivierungsmarkern CD69 und CD25 untersucht. Die entsprechenden T-Zellpopulationen wurden entsprechend der Transkriptionsfaktoren (Tbet, Gata3 und FoxP3) bestimmt.

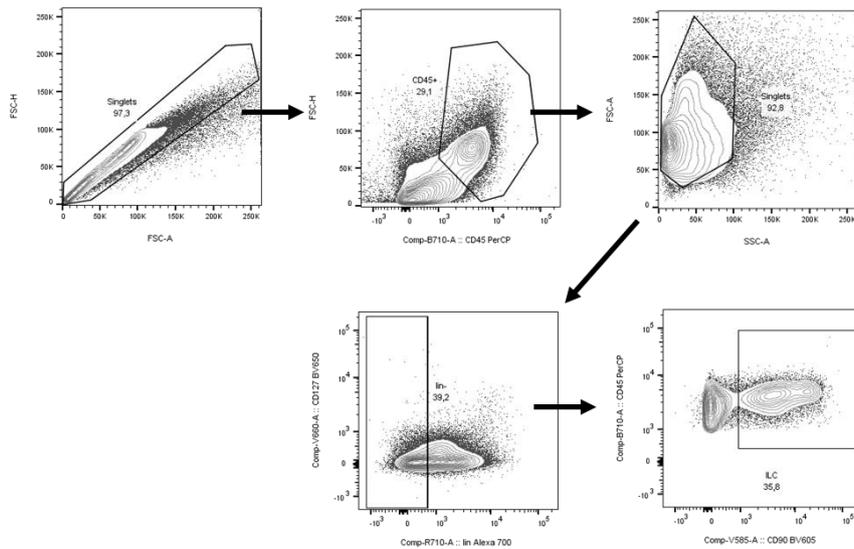
Gatingstrategie Suppressionsassay**Anhang 2: Gatingstrategie des Suppressionsassays.**

Zur Quantifizierung des Suppressionsassays wurden CD4+ T-Zellen auf FoxP3- negative Zellen gated, um Tregs aus der Quantifizierung auszuschließen. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der T-Zellproliferation anhand des Farbstoffes CM-Dil.

Gatingstrategie Makrophagen**Anhang 3: Gatingstrategie CD206+ Makrophagen.**

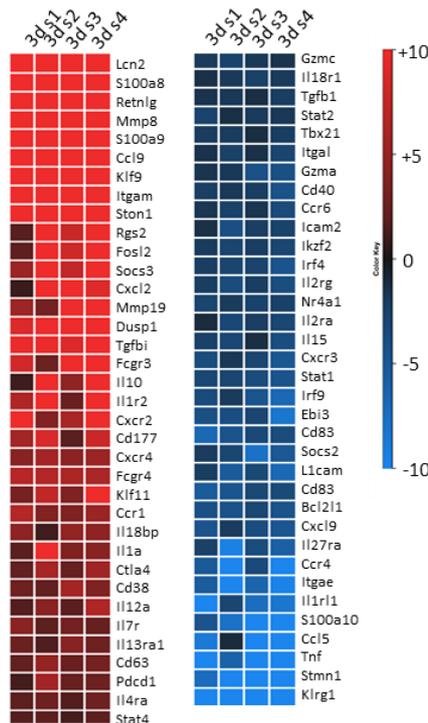
CD206+ Makrophagen wurden anhand CD11b+ Zellen bestimmt.

Gatingstrategie ILC



Anhang 4: Gatingstrategie der ILCs.

CD45+ Zellen werden auf den *Lineage* Marker untersucht. ILCs werden anschließend anhand der *Lineage* negative Population als CD45+ und CD90+ bestimmt.



Anhang 5: Transkriptomanalysen von Tregs isoliert aus Mäusen mit einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis.

In DEREG Mäusen wurde eine akute nekrotisierende Pankreatitis induziert. Nach drei Tagen wurden aus der Milz alle GFP+ Tregs Zellen mit Hilfe eines FACS sortiert. Anschließend wurde die RNA der Tregs isoliert und Transkriptomanalysen mit Hilfe von *Affymetrix Arrays* durchgeführt. Die Induktion (rot) bzw. Repression (blau) verschiedener Gene wurde anhand von Tregs un behandelter Kontrolltiere untersucht. Die Transkriptomanalysen wurden von der Arbeitsgruppe Funktionelle Genomforschung, der Unimedizin Greifswald durchgeführt.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Greifswald, _____

Glaubitz, Juliane

Lebenslauf

Veröffentlichungen

Sendler M, van den Brandt C, **Glaubitz J**, Wilden A, Golchert J, Weiss FU, Homuth G, De Freitas Chama LL, Mishra N, Mahajan UM, Bossaller L, Völker U, Bröker B., Mayerle J, Lerch MM: *NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Response and Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndromes in Mice With Acute Pancreatitis*. Gastroenterology 2020; 158: 253-269.e14.

Glaubitz J*, Wilden A*, van den Brandt C, Weiss FU, Bröker BM, Mayerle J, Lerch MM, Sendler M: *Experimental pancreatitis is characterized by rapid T cell activation, Th2 differentiation that parallels disease severity, and improvement after CD4+ T cell depletion*. Pancreatology 2020; 20 (8): 1637-1647. *geteilte Autorenschaft

Kongressbeiträge

50th European Pancreatic Club 2018, Berlin

"Depletion of CD4+ T-helper cells reduces pancreatic damage in two models of acute pancreatitis." (Poster)

39. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e. V., Göttingen

"Foxp3+/CD25+ regulatory T cells influence the T-cell response and systemic inflammation in a mouse model of acute pancreatitis." (Vortrag)

"Young investigator award" für den besten Vortrag

51th European Pancreatic Club 2019, Bergen

"The depletion of Foxp3+/CD25+ regulatory T cells drives a Th2 immune response and reduces severity in a mouse model of acute pancreatitis." (Poster)

40. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e. V., Halle

"The two faces of regulatory T cells: Depletion of Foxp3+/CD25+ regulatory T cells reduces severity in acute pancreatitis but increases fibrosis in chronic pancreatitis. (Vortrag)

Abstract-Preis

52th European Pancreatic Club 2019, online

"Depletion of CD25+/FoxP3+ regulatory T cells increases fibrosis in a chronic model of pancreatitis." (Poster)

52nd Annual Meeting of the American Pancreatic Association, online

"Pancreatic Remodeling and Fibrosis are Modulated by CD25+/FoxP3+ Regulatory T-cells in a Chronic Model of Pancreatitis." (Vortrag)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet haben.

Als erstes danke ich meinen Betreuern Frau Prof. Dr. Mihaela Delcea und Herrn Prof. Dr. Markus M. Lerch für die Übernahme sowie Anerkennung meiner Arbeit. Vor allem für die freundliche und kompetente Betreuung möchte ich mich bei Ihnen bedanken.

Weiterhin danke ich unserem Laborleiter Herrn Dr. F. Ulrich Weiss, der mir bei jeder molekularbiologischen Frage immer hilfsbereit zur Seite stand.

Mein größter Dank gilt Dr. Matthias Sendler. Ich bedanke mich nicht nur für die großartige fachliche Betreuung, sondern auch für die immerwährende Hilfsbereitschaft sowie für viele konstruktive Diskussionen.

Auch auf die Hilfe von Anika Wilden und Kathrin Gladrow konnte ich immer zählen. Vor allem die gemeinsame Zusammenarbeit bei den Tierexperimenten machte ein effektives und zugleich zügiges Arbeiten möglich.

Bei Dr. Cindy van den Brandt bedanke ich mich für die kompetente Einarbeitung in die durchflusszytometrischen Analysen.

Doreen Biedenweg danke ich für ihre Unterstützung bei den *Cellsorting*-Versuchen.

Nicht unerwähnt lassen möchte alle weiteren KollegInnen der Arbeitsgruppe „Innere Medizin A“. Ich bedanke mich bei jedem einzelnen für die Hilfe und Unterstützung sowie für das fast immer harmonische Arbeitsklima. Besonderer Dank geht in diesem Zusammenhang an Kathrin Gladrow, Diana Krüger und Jana Marielle Modenbach.

Schließlich möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden für eure grenzenlose Unterstützung und Hilfe, sowie jede erholsame Ablenkung bedanken.