

DIE
UNTERSUCHUNG DER ROLLE VON
IRAK-M WÄHREND DER
EXPERIMENTELLEN PANKREATITIS

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Franziska Gisela Thiel geb. Auge

Greifswald, 25.11.2021

Dekan: Prof. Dr. Gerald Kerth
1. Gutachter: Prof. Dr. Sven Hammerschmidt
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus M Lerch
3. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Michl
Tag der Promotion: 23.03.2022

„Bunt ist das Leben und granatenstark“
Bill & Teds verrückte Reise durch die Zeit

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Lerch, für die Möglichkeit im PePPP- Projekt, einem Forschungsprojekt im Rahmen der Landesexzellenzinitiative Mecklenburg-Vorpommern, gefördert von der Europäischen Union (ESF), forschen zu können, bedanken.

Einen herzlichen Dank möchte ich an Prof. Dr. Hammerschmidt richten für die Annahme und Betreuung dieser Arbeit.

Zudem möchte mich bei Dr. Weiss und Dr. Sandler für die Unterstützung während der Promotion bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen Kollegen bedanken, die auf vielerlei Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern. Sie haben immer an ihr „letztes Bündel“ geglaubt und mich bei allem, privat wie beruflich, unterstützt. Ich möchte auch meiner Schwester von Herzen danken. Sie ist ein besonderer Mensch in meinem Leben und immer für mich da.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen beiden „Bonuskindern“ danken. Sie machen mich zur glücklichsten „Bonusmama“ und haben mir schon unzählige Male ein Lächeln auf die Lippen gezaubert.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mann danken. Ohne ihn wäre ich heute nicht, wo ich bin. Gemeinsam haben wir alles Bisherige geschafft und werden alles Weitere meistern.

Ich danke Euch allen. Ihr habt dazu beigetragen, dass ich heute bin, wer ich bin.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Pankreas	5
3.2	Pankreatitis	6
3.2.1	Akute Pankreatitis	8
3.3	Immunsystem	8
3.3.1	Zellen des Immunsystems	9
3.3.2	Immunantwort während der Pankreatitis	13
3.3.3	Toll-like Rezeptoren (TLR) und Signalweiterleitung	14
3.4	IRAK-M	18
4	Zielstellung	23
5	Material	24
5.1	Tierstämme	24
5.2	Primäre Antikörper	24
5.3	Sekundäre Antikörper	24
5.4	Antikörper für Durchflusszytometrie	25
5.5	Chemikalien o.Ä.	26
5.6	Kits	29
5.7	Lösungen, Medien und Puffer	30
5.8	Oligonukleotide	32
5.9	Geräte u.a.	33
5.10	Verbrauchsmaterialien	35
5.11	Software	37
6	Methoden	39
6.1	Tiermodelle	39
6.1.1	IRAK-M ^{-/-} und C57BL/6 Mäuse	39
6.2	Experimentelle Modelle der Pankreatitis	39
6.2.1.1	Caerulein induzierte akute Pankreatitis	39
6.2.1.2	Partielle Gangligatur induzierte akute Pankreatitis	39
6.3	Organentnahme und Präparation	40
6.3.1	Isolation von Stammzellen aus dem Knochenmark	40
6.3.2	Serumgewinnung	40
6.3.3	Herstellung von Gewebehomogenaten	41
6.3.4	Isolation von Azinuszellen aus Pankreasgewebe	41

6.4	Histologische und Immunologische Färbungen.....	41
6.4.1	Anfertigung von Gewebeschnitten	41
6.4.2	Entparaffinierung und Wiederherstellung der Immunreaktivität.....	41
6.4.3	Hämatoxylin- Eosin- Färbung (H&E- Färbung)	42
6.4.4	Immunfluoreszenzfärbung (IF).....	42
6.5	Enzymatische Methoden.....	42
6.5.1	Messung der Serumamylase und Serumlipase.....	42
6.5.2	Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge.....	43
6.5.3	Aktivitätsmessung pankreatischer Enzyme aus Azinuszellen	43
6.6	Durchflusszytometrie	44
6.6.1	Konzentrationsbestimmung spezifischer Entzündungsmarker im Serum.....	44
6.6.2	Durchflusszytometrie von Splenozyten	44
6.6.3	Gating-Strategie	45
6.7	Biochemische Methoden.....	46
6.7.1	Proteinbestimmung mittels BCA	46
6.8	Molekularbiologische Methoden.....	47
6.8.1	RNA Isolation aus Pankreasgewebe.....	47
6.8.2	RNA Konzentrationsmessung.....	47
6.8.3	cDNA Synthese	47
6.8.4	Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	48
6.8.5	Agarose- Gelelektrophorese.....	49
6.8.6	Densitometrische Analyse der PCR- Amplifikate	49
6.8.7	Quantitative Real Time PCR (qPCR).....	49
6.9	Zellkultur	50
6.9.1	Differenzierung isolierter Stammzellen zu Makrophagen	50
6.9.2	Makrophagen- Azini Ko-Inkubation.....	50
6.9.3	Makrophagen Phagozytose Assay	50
6.10	Auswertung.....	50
7	Ergebnisse	52
7.1.1	IRAK-M Expression in Pankreas und isolierten Azinuszellen	52
7.1.2	Genexpressionsanalyse der Toll-like Rezeptoren isolierter Azini	54
7.1.3	Proteaseaktivierung in isolierten Azini	56
7.2	Untersuchung der Caerulein induzierten experimentellen Pankreatitis.....	58
7.2.1	Bestimmung des Schweregrads der Pankreatitis.....	58
7.2.2	Proteaseaktivierung während der Pankreatitis.....	60
7.2.3	Konzentrationsbestimmung von Zytokinen im Serum	62
7.2.4	Durchflusszytometrische Analyse von T-Zellen aus der Milz	64

7.2.5	Untersuchung infiltrierender Zellen im Pankreasgewebe	66
7.2.6	Untersuchung spezifischer Zytokine differenzierter BMDM	68
7.2.7	Phagozytose Assay mit fluoreszenzmarkierten Beads	71
7.2.8	Analyse der Translokation von NF- κ B im Zellkern	71
7.3	Experimentell induzierte schwere akute Pankreatitis durch partielle Gangligatur (PDL)	73
7.3.1	Bestimmung des Schweregrads	73
7.3.2	Konzentrationsbestimmung spezifischer Zytokine im Serum	75
7.3.3	Durchflusszytometrische Analyse nach PDL	76
7.3.4	Färbung infiltrierender Zellen im Pankreas	78
7.4	Vergleich von Caerulein- induzierter und Ligatur- induzierter Pankreatitis	79
8	Diskussion	82
8.1	IRAK-M Signalweiterleitung in der Pankreatitis	84
8.2	Auswirkungen des Verlusts von IRAK-M während der Caerulein induzierten Pankreatitis	86
8.2.1	Protease- und NF- κ B Aktivierung bei IRAK-M ^{-/-} Mäusen	86
8.2.2	Auswirkungen des Verlusts von IRAK-M während der Caerulein induzierten Pankreatitis	88
8.3	Auswirkung des Verlusts von IRAK-M bei der schweren Ligatur- induzierten akuten Pankreatitis (SAP)	90
8.4	Vergleich der milden akuten Pankreatitis (Caeruleinmodell) und der schweren akuten Pankreatitis (Ligaturmodell)	90
9	Literaturverzeichnis	93
	Abkürzungen	104
	Abbildungen	109
	Tabellen	111
	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	CXII
	Lebenslauf	CXIII
	Förderhinweis	CXIV
	Eigenständigkeitserklärung	CXV

Zusammenfassung

1 Zusammenfassung

Die Pankreatitis ist gekennzeichnet durch den Selbstverdau des Organs. Dabei werden pankreatische Proteasen aktiviert und es entstehen lokale Entzündungsherde. Diese aktivieren die Immunantwort durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren und der Rekrutierung von Immunzellen in das geschädigte Gewebe. Als erste Schutzinstanz reagiert das angeborene Immunsystem inklusive der Neutrophilen, Granulozyten und Makrophagen. Es ist bekannt, dass diese Immunzellen Mustererkennungsrezeptoren nutzen, um die Infektion zu erkennen. Zu diesen gehören die Toll-like Rezeptoren, welche u.a. über den MyD88/IRAK Signalweg den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren können. In dieser Signalkaskade existiert ein negativer Feedback Regulator IRAK-M, auch bekannt als IRAK-3. Dieser ist in der Lage die Signalweiterleitung zu inhibieren. In dieser Arbeit wurde untersucht ob und inwieweit IRAK-M Einfluss auf den Verlauf einer experimentell induzierten Pankreatitis in Mäusen hat.

Bisherige Studien zeigten die Expression von IRAK-M in verschiedenen Zelltypen und Geweben, jedoch nicht im Pankreas sowie den Azinuszellen. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass IRAK-M in Pankreasgewebe sowie isolierten Azini von C57BL/6 Mäusen exprimiert wird. Die Stimulation von isolierten C57BL/6-Azinuszellen mit CCK hatte eine Expressionserhöhung von IRAK-M zur Folge. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Toll-like Rezeptoren (TLR), insbesondere 2, 3, 4 und 9, in bzw. auf Azini exprimiert werden. Die TLR1, 2, 3, 7 und 9 zeigten ein höheres Expressionslevel in den Azinuszellen der defizienten Tiere.

Die Caerulein induzierte akute Pankreatitis zeigte einen milderen Verlauf in Bezug auf die Schweregradmarker Amylase und Lipase im Serum der IRAK-M^{-/-} Tiere sowie einen geringen lokalen pankreatischen Schaden. Die Entzündungsreaktion erhöhte die MPO Aktivität in der Lunge der defizienten Tiere. Zudem zeigten die Tiere eine erhöhte T-Zellaktivierung und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL12 sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL10. Tendenziell wanderten mehr Neutrophile, M1- sowie M2- Makrophagen in das Pankreasgewebe während der Entzündung. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B konnte nach 8h akuter Pankreatitis, transloziert im Zellkern, vermehrt in den IRAK-M defizienten Tieren nachgewiesen werden. Die Untersuchung von IRAK-M^{-/-} BMDM zeigte, dass das Zytokin Milieu zur Differenzierung des M1 -Phänotyps dominierend war. Zudem lag eine verstärkte Phagozytose vor und die Makrophagen wiesen eine verstärkte Sekretion und Expression von TNF α , IL6, IL10 und IL12 auf.

Zusammenfassung

Nach 3d schwerer akuter Pankreatitis (SAP) wurde eine höhere Konzentration an Serumlipase sowie ein stärkerer pankreatischer Schaden beobachtet. Die MPO-Aktivität in der Lunge der defizienten Tiere war vermindert. Dennoch konnten vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL6, IL12 und MCP1 im Serum gemessen werden. Die T-Zellen der defizienten Tiere zeigten zudem eine erhöhte Aktivierung. Die Visualisierung von infiltrierten Zellen im Pankreas zeigte keine Unterschiede.

Der Vergleich der beiden experimentellen Pankreatitis-Modelle zeigte, dass die Caerulein induzierte Pankreatitis bei den IRAK-M^{-/-} Tieren zu einer lokal begrenzten Entzündung im Pankreas führte. Wohingegen die Pankreatitis nach Gangligatur einen deutlich stärkeren Schaden aufwies und in einer signifikant erhöhten Zytokinsekretion resultierte. Der Vergleich von IL6 zeigte, dass die defizienten Tieren das 14-fache ins Serum sekretieren nach SAP, während die Kontrolltiere nur einen Anstieg um das 4,5-fache zeigten.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass eine kontrollierte und in Maßen ablaufende Immunantwort protektiv bzw. förderlich für den Krankheitsverlauf ist. Andererseits kann eine überschießende Immunantwort zu systemischen Komplikationen sowie Multiorganversagen führen. IRAK-M nimmt dabei eine regulierende Rolle ein und verhindert u.a., dass die Immunreaktion überschießt.

Summary

2 Summary

Acute pancreatitis is characterized by premature intracellular activation of digestive enzymes which leads to cell death of acinar cells and a systemic inflammation. Therefore, pro-inflammatory mediators are released and immune cells infiltrate the damaged tissue. These immune cells, including neutrophils, granulocytes and macrophages reacts as the first protective instance. The cells recognize the infection by using pattern recognition receptors. One kind of these receptors are the toll-like receptors, which can activate the transcription factor NF- κ B via the MyD88 /IRAK signal pathway. The signal pathway also includes the negative feedback regulator IRAK-M, also known as IRAK-3. The regulator inhibits the signal transduction downstream. We want to investigate whether IRAK-M has an influence during experimental induced pancreatitis in mice.

Previous studies showed the expression of IRAK-M in different cell types and tissues, but not in pancreas nor acinar cells. The expression of IRAK-M in pancreatic tissue and isolated acini from C57BL/6 mice was observed. The stimulation of isolated C57BL/6 acinar cells with CCK led to an increase in IRAK-M expression. IRAK-M is regulated by different receptors, for instance toll- like receptors. Acinar cells showed expression of the toll-like receptors (TLR) 2, 3, 4 and 9. TLR1, 2, 3, 7 and 9 showed a higher expression level in acinar cells of the deficient animals.

The caerulein-induced acute pancreatitis led to a milder progress of the disease. The severity marker amylase and lipase were decreased in the deficient animals. The histology showed a minor local pancreatic damage. During the inflammation the MPO activity increased in the lungs of the deficient animals. In addition, the IRAK-M-/- showed an increased T-cell activation. The secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF α and IL12 as well as the anti-inflammatory cytokine IL10 was increased. The IRAK-M-/- animals tended to have more migrated neutrophils, M1 and M2 macrophages in the pancreatic tissue during inflammation. The transcription factor NF- κ B was increased in the cell nucleus in the deficient animals after 8 hours of inflammation.

The investigation of bone marrow derived macrophages (BMDM) from IRAK-M-/- showed an increased phagocytosis and cytokine release of TNF α , IL6, IL10 and IL12.

The severe acute pancreatitis (SAP) model induced by partial duct ligation (PDL) showed a higher concentration of serum lipase and major pancreatic damage after 3d. The MPO activity in lungs was reduced in the deficient animals. The cytokines TNF α ,

Summary

IL12 as well as IL6 and MCP1 were increased in the serum. The T- cell activation was increased in the deficient animals after 3d of disease. Visualization of infiltrated immune cells showed no differences in the pancreas.

The comparison of the two experimental pancreatitis models showed that caerulein-induced pancreatitis in the IRAK-M ^{-/-} animals leads to a localized inflammation in the pancreas. In contrast, pancreatitis after duct ligation showed significantly more damage and resulted in significantly increased cytokine secretion. The comparison of IL6 between the two pancreatic models showed, a much higher serum concentration of the cytokine after SAP in the deficient animals.

Summarized, on one hand a controlled and moderate immune response is protective or beneficial for the progress of the disease. On the other hand, an excessive immune response can lead to systemic complications and multiple organ failure. IRAK-M acts as a regulator and can prevent that the immune reaction to become excessive.

Einleitung

3 Einleitung

3.1 Pankreas

Das Pankreas, auch Bauchspeicheldrüse genannt, ist ein sekretorisches Drüsenorgan im oberen Bauchraum. Es ist in Pankreaskopf (Caput), -körper (Corpus) sowie -schwanz (Cauda) gegliedert. Alle Abschnitte werden vom Pankreasgang (Ductus pancreaticus) durchzogen, welcher zusammen mit dem Gallengang an der Papilla Vateri im Duodenum mündet. Die Hauptfunktion der Drüse besteht in der Produktion von verschiedenen Hormonen sowie Enzymen, welche dem Nahrungsaufschluss dienen. Verantwortlich für die Synthese dieser Verdauungsenzyme sind die exokrinen Zellen (Azinuszellen) des Pankreas (1). Die Verdauungsenzyme werden in den alkalischen Pankreassaft sekretiert und gelangen über ein komplexes Gangsystem zum Ductus pancreaticus. Neben den exokrinen Zellen befinden sich auch endokrine Zellen im Pankreas. Die endokrinen Zellen, sogenannte Langerhans'sche Inseln, sekretieren u.a. Insulin in den Blutstrom (2). Sie liegen eingebettet im exokrinen Gewebe, welches den Hauptbestandteil der Pankreasmasse ausmacht (mehr als 84%) (3). Das exokrine Gewebe ist in Läppchen (Lobuli) unterteilt. Diese bestehen aus vielen Azini die sich zu Azinus-Komplexen zusammenlagern und die Verdauungsenzyme in den Pankreassaft sezernieren (4). Die meisten Verdauungsenzyme werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert. Eine Ausnahme stellen α -Amylase und Pankreaslipase dar. Beide Enzyme werden bereits aktiv sekretiert (5). α -Amylase und Pankreaslipase werden in der Medizin als sogenannte „Leitenzyme“ betrachtet. Ein Konzentrationsanstieg um das Dreifache im Serum wird als Indikator einer Pankreatitis angesehen (6).

Die Verdauungsenzyme werden nach ihrer Synthese in den Azinuszellen in sekretorische Vakuolen verpackt (Zymogengranula) und in der Zelle gespeichert. Die Sekretion in den Pankreasgang erfolgt als Reaktion auf einen hormonellen Stimulus. Dieser kann durch CCK (Cholecystkinin) oder ACh (Acetylcholin) erfolgen und induziert, über ihre jeweiligen Rezeptoren auf den Azinuszellen, ein oszillierendes Ca^{2+} Signal (7). Infolgedessen werden die Zymogengranula in das Lumen am apikalen Pol der Azinuszelle entleert. Die Proenzyme werden unter physiologischen Bedingungen erst im Darm durch die enzymatische Spaltung anderer Enzyme aktiviert. Eine wichtige Rolle nimmt hierbei die Serinprotease Trypsin ein (5). Sie wird in ihrer inaktiven Form als Trypsinogen von den Azinuszellen sekretiert und erst im Duodenum durch das hier vorliegende Bürstensaumenzym Enterokinase zu Trypsin aktiviert (8).

Einleitung

Trypsin wiederum ist in der Lage weitere Proenzyme wie z.B. Proelastase oder Chymotrypsinogen zu aktivieren, wodurch letztendlich alle für die Verdauung notwendigen Enzyme aktiviert werden (8).

3.2 Pankreatitis

Die Pankreatitis, auch bekannt als Bauchspeicheldrüsenentzündung, ist durch die vorzeitige Aktivierung von Proteasen noch in den Azinuszellen und der damit verbundenen Zell- und Gewebeschädigung charakterisiert. Der Prozess wurde vom deutsch-österreichischen Pathologen Hans Chiari bereits 1896 als Autodigestion des Organs beschrieben. Dabei erkannte er, dass kein Erreger Ursache dieser Entzündung war. Die Entzündungsreaktion war bedingt durch den Selbstverdau der Azinuszellen und den damit verbundenen nekrotischen Zelltod (9). Eine besondere Rolle bei diesem Prozess nimmt die Serinprotease Trypsinogen ein. Wie bereits erwähnt wird Trypsinogen unter physiologischen Bedingungen im Duodenum aktiviert und spaltet dort als aktives Trypsin an den Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R). Trypsin überführt durch proteolytische Spaltung weitere Enzyme in ihre aktive Form (Enzymkaskade) (5). Während der Pankreatitis findet die Aktivierung der Enzymkaskade schon in der Azinuszelle statt und induziert so den Selbstverdau. Dieses Ereignis stellt den pathophysiologischen Beginn der Erkrankung dar (10), (11). Die Synthese inaktiver Zymogene ist somit ein Schutzmechanismus der Zellen. Weitere Schutzmechanismen sind u.a. die Expression des Trypsin-Inhibitors SPINK-1 in Azinuszellen, die Kompartimentierung der Enzyme, die Autodegradation von aktivem Trypsin sowie ein geringes Ca^{2+} Level in den Azini (12).

Physiologisch erfolgt die Sekretion der Enzyme aus der Zymogengranula am apikalen Pol als Folge eines oszillierenden, cytosolischen Ca^{2+} Signals. Pathophysiologisch führt ein langanhaltendes, intrazelluläres Ca^{2+} Signal zu einer Sekretionsblockade. Diese Sekretionsblockade resultiert in einer intrazellulären Aktivierung der Verdauungsenzyme noch in der Azinuszelle selbst und stellt damit das initiale Ereignis im Verlauf der Pankreatitis dar. Wie bereits erwähnt übernimmt Trypsinogen bei diesem Prozess eine wichtige Rolle (13). Im Gegensatz zum Duodenum wird in Azinuszellen keine Enterokinase exprimiert, welche in der Lage ist Trypsinogen zu aktivieren. In den Zellen übernimmt ein anderes Enzym diese Rolle: die lysosomale Hydrolase Cathepsin B (Abb. 1). Anhand von Cathepsin B- defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Trypsinogenaktivierung vollständig von Cathepsin B abhängig ist (14).

Einleitung

Das Enzym ist in der Lage Trypsinogen zu Trypsin zu aktivieren. Es wird jedoch angenommen, dass beide Enzyme in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten vorliegen (8). Während Trypsinogen über den Golgi-Apparat in die sekretorischen Vesikel sortiert wird, erfolgt die Sortierung von Cathepsin B, abhängig vom Mannose-6-P-Rezeptor, in die Lysosomen (15). Damit Cathepsin B in der Lage ist Trypsinogen zu aktivieren müssen beide Enzyme im selben Kompartiment vorliegen. Es gibt verschiedene Theorien wie die Ko-Lokalisation beider Enzyme in der Zelle entsteht.

Als erste Theorie wird eine Fusion von Zymogengranula und Lysosomen angenommen, welche zur Folge hat, dass Cathepsin B Trypsinogen aktivieren kann (16). Eine zweite Möglichkeit ist die Fehlsortierung von Cathepsin B im Golgi-Apparat in das sekretorische Kompartiment (17). Die dritte Theorie besagt, dass Cathepsin B schon in den Zymogengranula vorhanden ist, hier jedoch im Zuge der Sekretionsblockade aktiviert wird und somit Trypsinogen aktivieren kann (14).

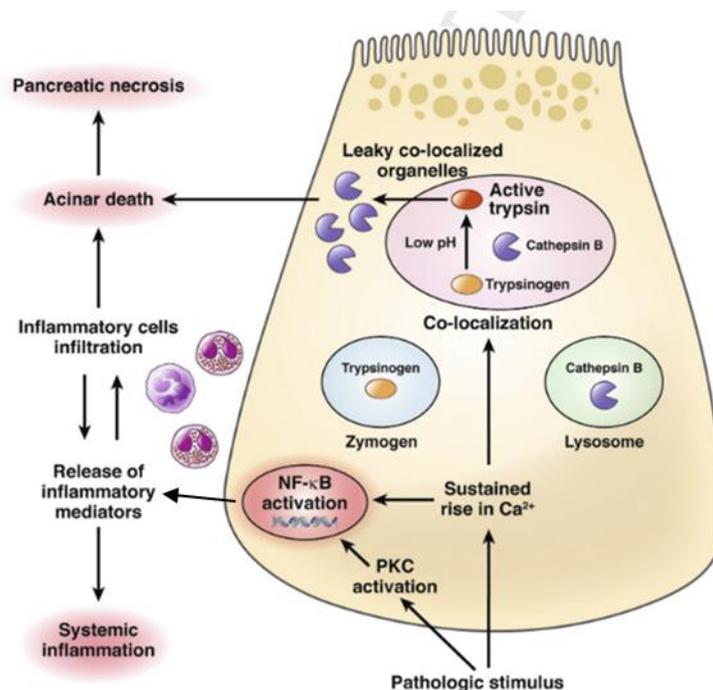


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Autodigestion von Azini mit Aktivierung der Immunantwort.

Durch pathologische Vorgänge wird intrazellulär Trypsinogen aktiviert. Es kommt zum Selbstverdau der Azinuszelle. Freiwerdende Zellbestandteile werden von Immunzellen erkannt und lösen eine Immunantwort aus. (Adaptiert nach: Saluja *et al*, 2019).

Einleitung

Das überschießende intrazelluläre Calciumsignal hat neben der Proteaseaktivierung noch weitere Effekte, die für den Krankheitsverlauf eine entscheidende Rolle spielen. Durch einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Spiegel kommt es zu einer Depolarisation der Mitochondrien (18), (19).

Der damit verbundene mitochondriale Schaden kann zu einer ATP-Depletion (Adenosintriphosphat) der Zelle führen und dadurch Nekrosen auslösen, welche in der Freisetzung von DAMPs (*damage-associated molecular pattern*) resultieren. Weiterhin kann das langanhaltende, cytosolische Ca^{2+} Signal das endoplasmatische Retikulum (ER) schädigen und so ER-Stress auslösen sowie das Immunsystem durch die Translokation von NF- κ B in den Zellkern aktivieren (20). Durch Verabreichung einer supramaximalen Dosis von CCK (Cholecystokinin) bzw. der Injektion von Caerulein (CCK- Analoga) kann eine experimentelle akute Pankreatitis im Zell- bzw. Tiermodell induziert werden (5).

3.2.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine der häufigsten nicht-malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, welche mit einem Krankenhausaufenthalt verbunden ist. Etwa 80% der Fälle weisen einen milden Krankheitsverlauf auf, welcher ohne schwerwiegende Komplikationen vollständig ausheilt (6). In etwa 20% der Fälle kommt es zu einem schweren Verlauf. Dieser ist mit systemischen Komplikationen wie z.B. Organversagen, infizierte Nekrosen und einer starken systemischen Immunantwort assoziiert. Die häufigsten Ursachen der akuten Pankreatitis sind zum einen ein starker Alkoholmissbrauch und zum anderen ein durch Gallensteine verursachter Verschluss des Pankreasganges (21). Wiederkehrende Schübe dieser akuten Entzündung resultieren in einem chronischen Krankheitsbild. Vor allem die hereditäre chronische Pankreatitis ist vermehrt durch Mutation im PRSS1 Gen (kationisches Trypsinogen), im Trypsin Inhibitor SPINK1 sowie im Chymotrypsin C gekennzeichnet (22), (23), (24).

3.3 Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus Zellen und Proteinen, welches in unspezifischer (angeborener) und erworbener (adaptiver) Immunantwort unterteilt wird. Die unspezifische Antwort ist ab Geburt aktiv, und schützt den Organismus vor eindringenden Krankheitserregern. Den ersten Schutzmechanismus stellt dabei die Haut dar. Auch Schleimhäute im Mund-Nasen-Rachenraum sowie im Darm stellen eine Barriere für Erreger dar (25).

Einleitung

Eindringende Keime können durch Bindung ihrer PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), welche an Oberflächenrezeptoren von Immunzellen binden, erkannt werden. Zum angeboren Immunsystem gehören u.a. Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen (DCs), Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK) und *innate lymphoid cells* (ILCs) (26).

Diese Immunzellen senden dann Botenstoffe u.a. Zytokine und Chemokine aus, um die weitere Immunantwort zu regulieren. Das adaptive Immunsystem wird im Laufe des Lebens erworben. Durch Infektionen mit verschiedenen Erregern „lernt“ das Immunsystem und kann bestimmte Strukturen, sogenannte Antigene, bei einer erneuten Infektion wiedererkennen. Das adaptive Immunsystem stellt somit das immunologische Gedächtnis dar. Zu den Immunzellen die diese Strukturen erkennen, gehören B- und T-Zellen. B-Zellen produzieren spezifische Antikörper gegen diese Antigene. T-Zellen sind in der Lage diese Antigene zu erkennen. Bei erneuter Infektion werden die Erreger mittels der Antikörper „markiert“ und so von Immunzellen schneller und effektiver erkannt und beseitigt (27).

3.3.1 Zellen des Immunsystems

Die Immunzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ab und entstehen durch vielfältige Differenzierung. Zunächst differenzieren die Stammzellen zu sogenannten Vorläuferzellen, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben. Es entstehen zwei Vorläuferzellarten (myeloische sowie lymphatische Zellen) aus denen die weiteren Zelltypen differenzieren (Abb. 2). Während der Reifung gehen Eigenschaften und Oberflächenmarker unreifer Zellen verloren und neue Eigenschaften sowie Oberflächenmarker werden erworben und exprimiert. Zur Unterscheidung der verschiedenen Immunzellen werden Oberflächenmarker herangezogen, die spezifisch für den jeweiligen Differenzierungsgrad bzw. Aktivierungszustand sind. Diese Marker werden als *cluster of differentiation* (CD) bezeichnet, mit fortlaufenden Nummern deklariert und verifizieren die spezifische Unterscheidung von Immunzellsubtypen (28).

Einleitung

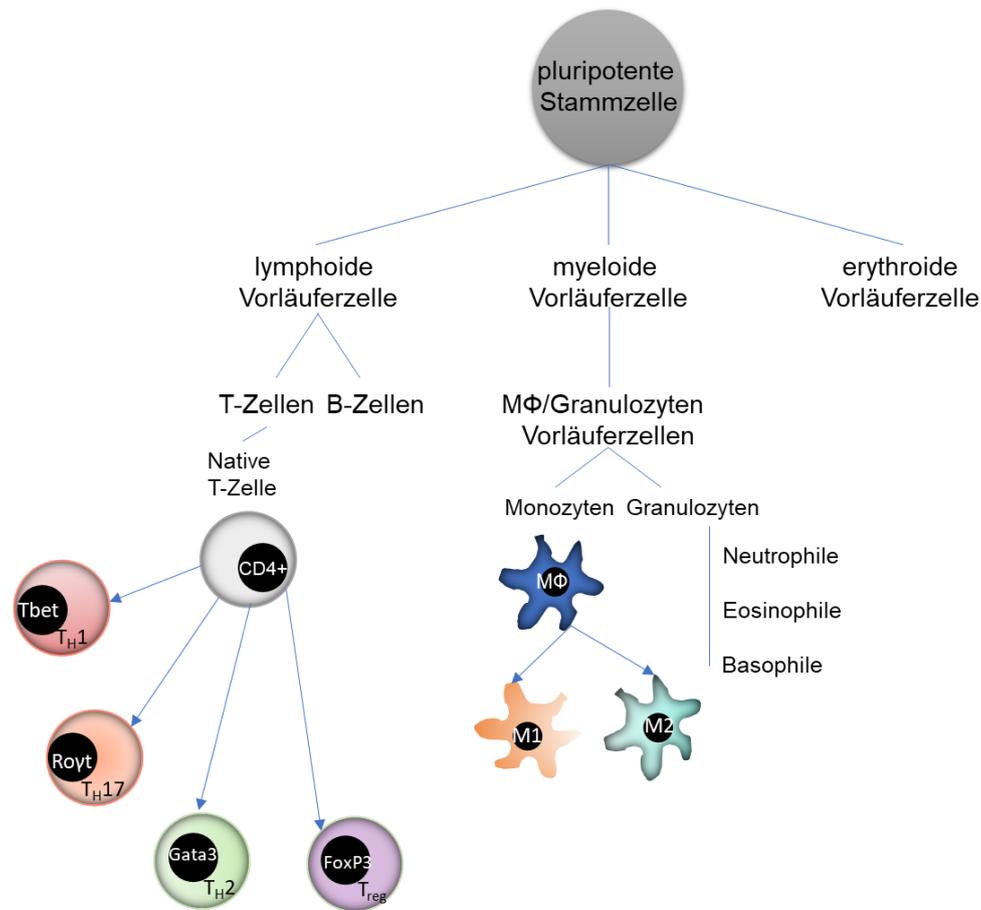


Abbildung 2: Übersichtsdarstellung einiger Zellen des Immunsystems

Vereinfachter Stammbaum der hämatopoetischen Entwicklung einiger Immunzellen (Abbildung adaptiert nach: Kruse *et al*, 2015)

Aus den myeloiden Vorläuferzellen reifen zum einen Monozyten und zum anderen Granulozyten. Monozyten verweilen nur kurze Zeit im Blut, ehe sie ins Gewebe wandern und dort zu Makrophagen differenzieren. Gewebsmakrophagen tragen zur Aufrechterhaltung der Gewebestruktur bei indem sie z.B. apoptotische Zellen phagozytieren. Apoptose ist eine immunologisch „stille“ Form des Zelltods. In diesem Fall erfolgt keine Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (29). Anders ist es bei Entzündungsvorgängen bei denen PAMPs und DAMPs freigesetzt werden. Dies ist z.B. bei Nekrosen der Fall. Hier kommt es zur Aktivierung der Immunzellen und einer vermehrten Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren (30). Infolgedessen wandern weitere Neutrophile und Monozyten in das Gewebe ein. Monozyten können klassisch zu M1- Makrophagen bzw. alternativ zu M2- Makrophagen differenzieren (Abb. 2). Im pro-inflammatorischen Zytokin Milieu dominiert der M1- Phänotyp, welcher ebenfalls pro-inflammatorisch agiert. Im späteren Verlauf der Entzündung differenzieren dann vermehrt alternativ aktivierte M2- Makrophagen aus, die anti-inflammatorisch wirken und zur Wundheilung beitragen (31).

Einleitung

Pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL6, TNF α aber auch DAMPs und PAMPs wie z.B. LPS (Lipopolysaccharide) bewirken die Differenzierung zu M1 Makrophagen. M1-Makrophagen phagozytieren nekrotisierende Zellen und sezernieren ihrerseits TNF α , IL6, IL1 β und NO-Radikale (31). iNOS (induzierbare Stickoxidsynthase) ist ein stickoxidgenerierendes Enzym, welches durch Synthese von NO Radikalen toxisch auf „gefressene“ Bakterien wirkt. M1-Makrophagen fördern zudem die Differenzierung pro-inflammatorischer T-Zellen wie z.B. T_H1- und T_H17-Zellen über die Sekretion von IL12, IL18, IL23 und IL6, welche ebenfalls Entzündungsfördernd wirken. T_H1- und T_H17-Zellen ihrerseits sind wiederum an der Makrophagen Aktivierung beteiligt (32)

Der M2- Phänotyp entwickelt sich im Milieu anti-inflammatorischer Zytokine, wozu die von T_H2 Zellen sekretierten Zytokine IL4 und IL13 zählen. Diese Makrophagen sezernieren anti-inflammatorische Mediatoren wie TGF β und IL10. M2- Makrophagen tragen zur Gewebereparatur und Wundheilung bei (31), (33).

Die polymorphkernigen Granulozyten entwickeln sich ebenfalls aus den myeloiden Vorläuferzellen und werden in drei Typen gegliedert: eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten. Diese Immunzellen werden verstärkt bei Infektionen gebildet und an die Entzündungsorte rekrutiert. Sie sind durch verschiedene Abwehrmechanismen, Bildung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen sowie toxischen Substanzen, maßgeblich an der Bekämpfung der Infektion beteiligt (32). Neben den Monozyten und Granulozyten entwickeln sich auch Mastzellen und dendritische Zellen (DCs). Mastzellen sind große Zellen, vorwiegend in der Haut und den Schleimhäuten, die zeitnah toxische Stoffe abgeben können (34). Dendritische Zellen wandern als unreife Zellen durch das Blut in Gewebe, verästeln dort und pinozytieren Substanzen aus der Umgebung. Die DCs wandern nach Infektionserregerkontakt in die Lymphknoten und präsentieren dort die durch Kontakt generierten Antigene auf ihrer Oberfläche (35). Diese Immunzellen (Leukozyten) sind der größte Teil des innaten Immunsystems und bilden die erste Immunabwehr durch Erkennen molekularer Strukturen von Erregern und geschädigten Zellen über Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptor*) (32).

Die lymphatischen Vorläuferzellen können zu T- oder B- Zellen bzw. natürlichen Killerzellen (NKs) differenzieren. NKs werden dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben, da sie anderes als T- und B- Zellen keine antigenspezifischen Rezeptoren besitzen (36).

Einleitung

T- und B-Zellen sind Zellen des adaptiven Immunsystems mit spezifischen Oberflächenrezeptoren für Antigene. B- Zellen reifen im Knochenmark (*bone marrow*). Die Antigenrezeptoren werden als BCR (*B-cell receptor*) bezeichnet und nach Aktivierung differenzieren sie zu Plasmazellen die große Mengen Antikörpermoleküle sezernieren (37).

T-Zellen reifen im Thymus und werden in zwei Typen untergliedert. Zum einen die T-Helferzellen (CD4+) und zum anderen die zytotoxischen T-Zellen (CTLs, *cytotoxic T-lymphocytes*; CD8+) auch T-Killerzellen genannt (38). Diese eliminieren kranke Zellen durch Antigenerkennung. Beide Zelltypen verfügen über T- Zell- Rezeptoren (TCR, *T-cell receptor*) und beeinflussen durch Interaktion mit B- Zellen die Produktion von Antikörpern. Zudem unterstützen sie Makrophagen bei der Abtötung von Mikroorganismen (32). Die T-Helferzellen werden in weitere Subtypen kategorisiert, den T_H1 , T_H2 , T_H17 -Zellen und den T_{reg} -Zellen (Abb. 3). Die Zellen verfügen über bestimmte Oberflächenrezeptoren, welche spezifische Strukturen erkennen. CD8+ Zellen präsentieren den MHC-I Rezeptor und CD4+ Zellen den MHC-II Rezeptor. CD4+ T-Helferzellen sekretieren Zytokine und rekrutieren weitere Immunzellen in das Gewebe (32).

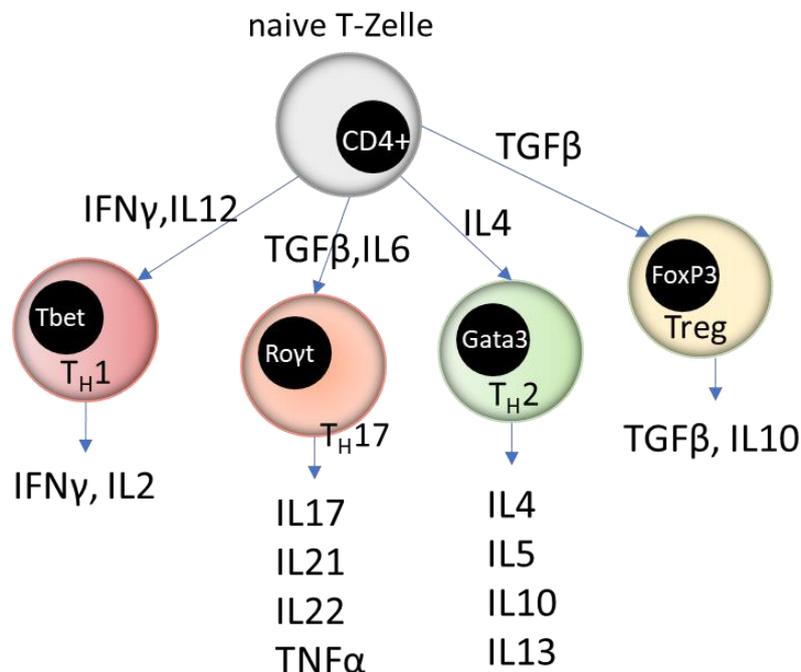


Abbildung 3: Darstellung der T-Zellpopulationen

Die Abbildung zeigt die Zytokine, welche an der Differenzierung beteiligt sind und die von den T-Zellpopulationen sekretieren Zytokine.

Einleitung

Die T- Zellen besitzen spezifische Transkriptionsfaktoren und haben unterschiedliche Entzündungsreaktionen zur Folge (Tab. 1).

Tabelle 1: Subpopulationen der T-Zellen

Subtyp	Zytokinsekretion	Transkriptionsfaktor	Entzündungsreaktion
T _H 1,	IFNγ	Tbet	Typ 1
T _H 2	IL4, IL5, IL13	Gata3	Typ 2
T _H 17	IL17, IL22	Roryt	Typ 3
T _{reg}	TGFβ, IL10	FoxP3	Anti-Inflammation

Die Immunantwort spielt eine entscheidende Rolle im Verlauf der Pankreatitis. So werden u.a. Immunzellen durch nekrotisierende Azini aktiviert und Entzündungsreaktionen in Gang gesetzt (11).

3.3.2 Immunantwort während der Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist in erster Linie eine sterile Entzündung (39). Das bedeutet, dass keine pathogenen Moleküle als Signale für das Immunsystem vorhanden sind. Die Entzündungsreaktion wird einerseits durch die NF- κ B-Aktivierung und Sekretion von Chemokinen und Zytokinen in den Azinuszellen induziert, andererseits steigern infiltrierende Leukozyten die initiale Immunantwort durch Freisetzung weiterer Zytokine und Chemokine (40). Nekrotische Azini setzen DAMPs in Form von zellulären Bestandteilen wie ATP, DNA, Histonen und weiteren Proteinen (pankreatische Enzyme) frei. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen nach Endozytose pankreatischer Enzyme pro- inflammatorische Zytokine sezernieren (41). Somit haben Makrophagen einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf der Entzündung (42). Die freigewordenen Zellkompartimente wirken als DAMPs und werden von den Mustererkennungsrezeptoren (PRR) verschiedener Leukozyten erkannt. Zu den PRRs zählen die NLR (*NOD-like receptors*), die RLR (*RIG-like receptors*) und die TLR (*Toll-like receptors*) (43). TLR befinden sich vor allem auf und in DCs sowie Makrophagen und können unterschiedliche Substanzgruppen spezifisch erkennen und binden (44).

Die Erkennung von DAMPs sowie die Freisetzung von Chemokinen durch die Azinuszellen hat die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten und Neutrophilen in das Gewebe zur Folge. Nach Infiltration werden pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine als Antwort freigesetzt (30).

Einleitung

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Makrophagen als auch neutrophile Granulozyten innerhalb weniger Stunden nach Beginn der Pankreatitis in das Organ einwandern und den lokalen Schaden verstärken. Makrophagen sind in der Lage über die Sekretion von TNF α die intrazelluläre Proteaseaktivierung und den nekrotischen Zelltod in Azinuszellen zu induzieren (45), (46), (47). Diese TNF α vermittelte Form der Nekrose wird als Nekroptose bezeichnet und stellt die häufigste Form des Zelltods in der Pankreatitis dar (48). Neutrophile wiederum setzen große Mengen an ROS (reaktive Sauerstoffspezies) frei, was ebenfalls in der Lage ist Azinuszellen zu schädigen und eine Proteaseaktivierung zu induzieren (49). Weiterhin kommt es zur Ausbildung von NETs (*neutrophil extracellular traps*), welche kleinere Gänge verschließen und somit auch den Pankreasschaden verstärken können (50). Es entsteht ein sich selbst anfeuernder Kreislauf, wobei Immunzellen den pankreatischen Schaden verstärken und damit die Rekrutierung weiterer Immunzellen fördert. Bei einer überschießenden Immunantwort kann es in Folge einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*) zu Multiorganversagen kommen. Um dem entgegenzuwirken, werden immunsuppressive Mediatoren und Zellen aktiviert und es entsteht eine Gegenreaktion (CARS, *compensatory anti-inflammatory response syndrome*) (51). Diese Immunsuppression kann zur Translokation von kommensalen Bakterien aus dem Darm in die Nekrose führen, wodurch infizierte Nekrosen entstehen (52). Es konnte gezeigt werden, dass SIRS und CARS, anders als bisher angenommen, parallel ablaufen (53).

3.3.3 Toll-like Rezeptoren (TLR) und Signalweiterleitung

TLRs sind transmembranständige Proteine auf Zelloberflächen bzw. in Endosomen und stellen einen Teil der angeborenen Immunantwort dar. Es existieren 10 humane TLRs (TLR1-10) und 12 murine (TLR1-9, sowie 11-13). TLR 3, 7, 8 und 9 sind intrazelluläre Rezeptoren, welche Nukleinsäuren als Liganden erkennen (44). TLRs verfügen über einen extrazellulären N-Terminus mit einer Leucin-reichen Region (LRR) sowie einem intrazellulären C-Terminus, welcher als TIR- Domäne (Toll/IL1- Rezeptor) bekannt ist. Die Rezeptoren können Homo- bzw. Heterodimere bilden und nachgeschaltete Moleküle wie MyD88 und TRIF rekrutieren (54). Unterschiedliche TLRs binden unterschiedliche Liganden welche u.a. die Polarisierung von Zellen beeinflussen, die angeborene Immunabwehr initiiert und die spezifische Immunabwehr optimiert. LPS bspw. ist der klassische Ligand für TLR4 und fördert die Polarisierung des M1- Phänotyps (55). Es wird angenommen, dass die Ligandenbindung und

Einleitung

Aktivierung über TLRs entscheidend für die Expression pro-inflammatorischer Zytokine ist (44).

Mögliche TLRs die in der akuten Pankreatitis eine Rolle spielen könnten sind TLR2, TLR4 (56), (57) und TLR9 (58). 2019 konnten Guo & Cui zeigen, dass TLR2, 4 und 9 in isolierten pankreatischen Rattenzellen sowie bei der Ratten- Zelllinie AR42J exprimiert werden (Abb. 4) (59).

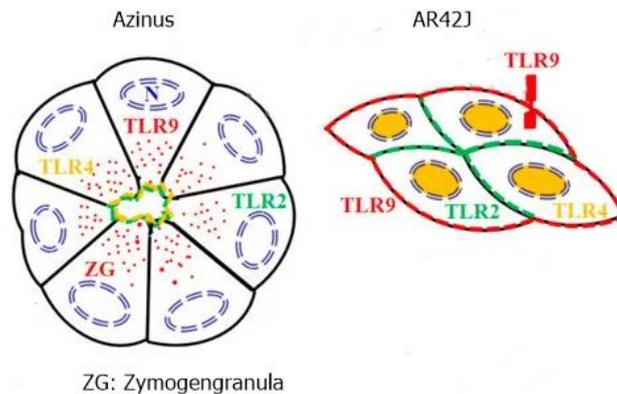


Abbildung 4: Lokalisierung von TLR 2,4 und 9 nach Guo & Cui 2019

Abbildung von Guo & Cui zur Visualisierung der Lage von TLR 2, 4 und 9 in pankreatischen Azinus von Ratten sowie der pankreatischen Ratten- Zelllinie AR42J.

Verschiedenste Moleküle können als Liganden für die TLRs fungieren. Neben PAMPs gehören auch DAMPs, wie z.B. dsDNA, zu möglichen Liganden. So kann z.B. freigesetzte mitochondriale DNA TLR9 aktivieren (60).

Alle Toll-like-Rezeptoren, außer TLR3, aktivieren den MyD88- abhängigen Signalweg, welcher über IRAK, TRAF-6 hin zu NF- κ B verläuft (54). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher in fast allen Zelltypen und Geweben vorkommt, ist in der Lage im Zellkern an die DNA zu binden und so die Transkription verschiedener Gene wie z.B. pro-inflammatorischer Zytokine zu steuern. NF- κ B besteht aus mehreren Untereinheiten, die als Gemeinsamkeit eine Domäne (Rel-Homologie-Domäne) von 300 Aminosäuren aufweist. Die Rel- Domäne ist für die DNA- Bindung verantwortlich. Zu den Untereinheiten gehören: NF- κ B1 (p50 bzw. p105), NF- κ B2 (p52 bzw. p100), RelA (p65), RelB und c-Rel. Diese können in verschiedenen Kombinationen Dimere bilden, wobei meistens ein Rel-Protein mit einer NF- κ B Untereinheit dimerisiert (61). In den meisten Zelltypen liegt NF- κ B inaktiv und gebunden an das inhibitorische κ B- Protein (I κ B) im Zytoplasma vor. Durch Bindung von PAMPs oder DAMPs an PRRs kommt es zur Aktivierung der NF- κ B -Signalwege. Es sind bisher zwei Signalkaskaden bekannt.

Einleitung

Zum einen der klassische Weg, bei welchem RelA/p50 durch die I κ B- Untereinheit des I κ B α -Kinase-Komplexes (IKK) phosphoryliert wird. RelA/p50 kann so in den Kern translozieren (Abb. 5). Das phosphorylierte I κ B wird ubiquitinyliert und über den Proteasomkomplex degradiert.

Zum anderen kann die NF- κ B Aktivierung über den alternativen Weg induziert werden. Dabei spaltet *NF- κ B-inducing kinase* (NIK) p100 am C-Terminus und p52 wird generiert. Dadurch kann der entstandene RelB/p52- Komplex in den Kern translozieren und an das κ B-Motiv regulatorischer DNA binden (62).

Dies resultiert in einer verstärkten Transkription. Regulatorische Gene die durch NF- κ B gesteuert werden sind u.a. Zytokine (TNF α , IL1 β , IL6, Cyclooxygenase2 (COX2)), sowie Adhäsionsmoleküle, die eine wichtige Funktion bei der Regulation der Immunantwort einnehmen (63), (64).

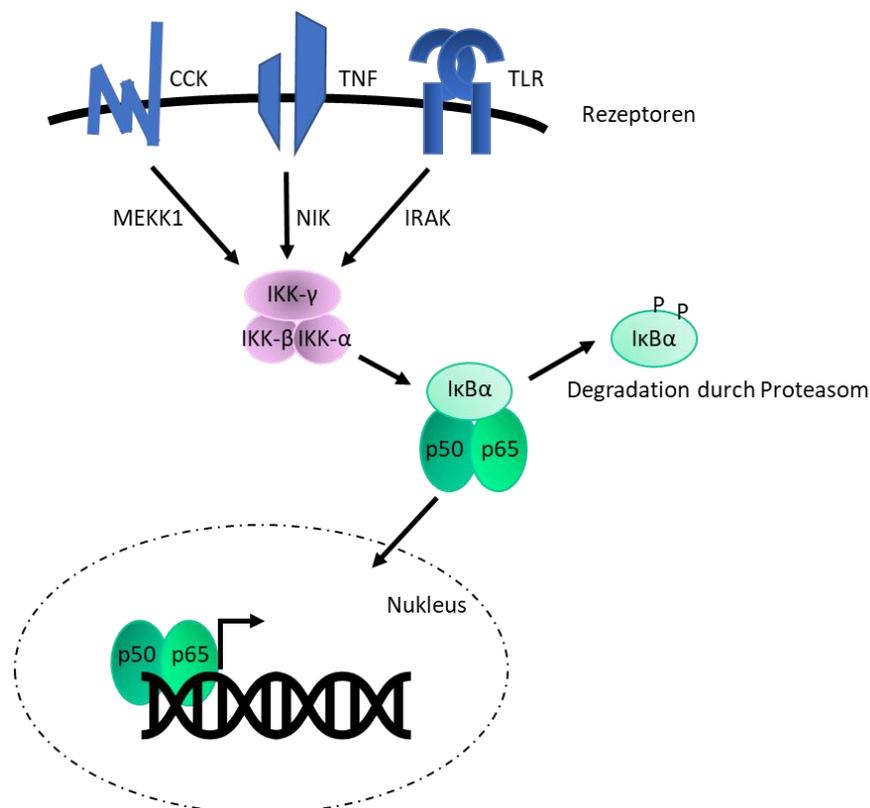


Abbildung 5: Schematische Darstellung des klassischen NF- κ B Signalwegs

Verschiedene Stimuli führen zur Aktivierung des IKK-Komplexes, welcher I κ B α phosphoryliert. Dies führt zur Freisetzung von NF- κ B und Degradation von I κ B α . NF- κ B kann dann in den Kern translozieren, dort an die regulatorische DNA binden und so die Transkription der Zielgene initiieren. (Abbildung erstellt nach: Algül *et al*, 2002)

Einleitung

NF- κ B- Aktivierung als Signalweg der Immunantwort in der Pankreatitis wurde erstmals Ende der 90er Jahre beschrieben. Gukovsky *et al* sowie Steinle *et al* wiesen die Aktivierung von NF- κ B innerhalb der pankreatischen Azinuszelle im Verlauf der Caerulein- induzierten akuten Pankreatitis in Ratten nach (65), (66). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgte in Abhängigkeit des intrazellulären Ca^{2+} Signals parallel zur Trypsinogenaktivierung, innerhalb von wenigen Minuten nach Caerulein bzw. CCK Stimulation (65), (66).

Seitdem konnten weitere Faktoren identifiziert werden, welche NF- κ B in Azinuszellen aktiviert. Dazu zählen z.B. proinflammatorische Mediatoren oder ROS (67). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die pathophysiologische frühzeitige Trypsinaktivierung in vergleichbarer Kinetik aber unabhängig der NF- κ B Aktivierung abläuft (68).

Es konnte gezeigt werden, dass bei T7- defizienten Mäusen eine deutlich geringe pathophysiologische Trypsinaktivierung stattfand. Die lokale und systemische Inflammation verlief aber vergleichbar wie bei den C57BL/6 Kontrolltieren (69). Unterstützt wurde die Theorie durch die vergleichbaren intrazellulären NF- κ B Level in den Azini. Zudem konnte gezeigt werden, dass Gene der Untereinheit p65, die mittels Adenoviren intra-pankreatisch transfiziert wurden, eine Pankreatitis auslösten (70). Andererseits führt eine pankreasspezifische Deletion der p65 (RelA) Untereinheit nicht zu einem milderen Krankheitsverlauf, sondern zu einem deutlich erhöhten Schweregrad. Dies zeigt die komplexe Rolle von NF- κ B. Nicht nur inflammatorische Gene werden reguliert, sondern auch Apoptose, Zellüberleben und die Stressantwort wird gesteuert (Abb. 6).

Die Aktivierung von NF- κ B führt wie bereits erwähnt zur Transkriptionsinitiation von TNF α sowie verschiedener Chemokine wie z.B. MCP1 und auf diesem Weg zur Rekrutierung von weiteren Immunzellen in das Pankreasgewebe (71). Infiltrierende Leukozyten verstärken die Gewebeschädigung durch Ausschüttung von weiteren Zytokinen wie z.B. TNF α oder durch Freisetzung von ROS. Azini verfügen über TNF-Rezeptoren, die TNF α binden und über NF- κ B weitere pro-inflammatorische Gene aktivieren können (45). Eine Übersicht der nachgeschalteten Signalwege und Wirkmechanismen ist in Abbildung 6 veranschaulicht.

Einleitung

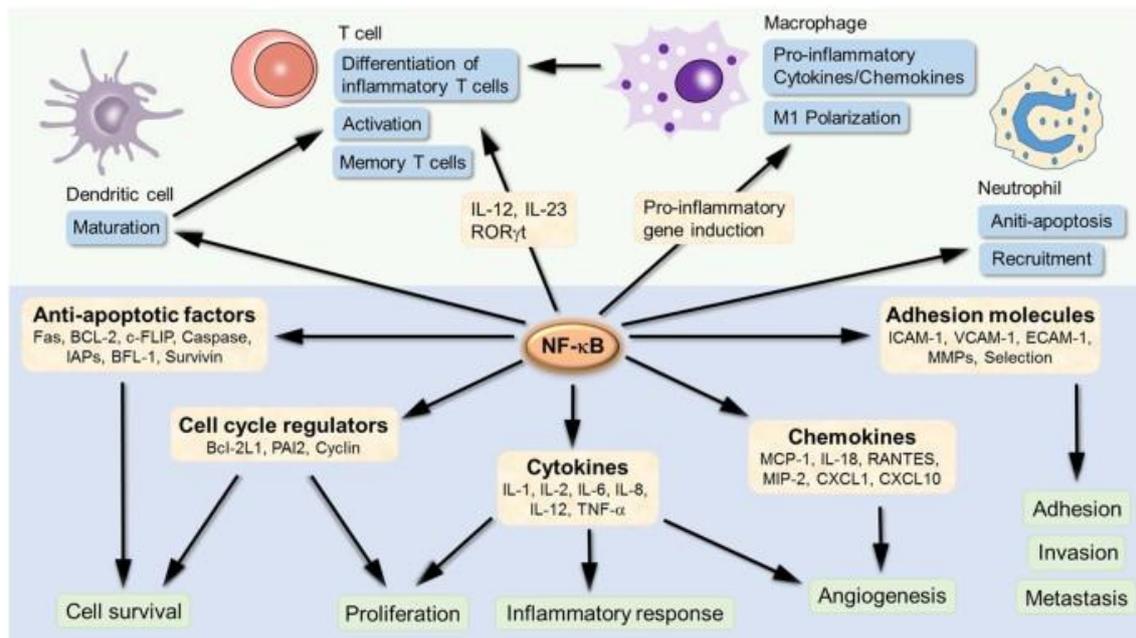


Abbildung 6: Signalwege und Wirkmechanismen nach NF-κB Aktivierung

Die Translokation in den Zellkern und die Bindung an die regulatorische DNA hat die Transkription vielfältiger Zielgene zur Folge. Die Abbildung zeigt verschiedene Möglichkeiten der Signalweiterleitung. (Abbildung aus: Liu et al, NF-κB signaling in inflammation (2017))

Die Signalweiterleitung nach Ligandenbindung an TLR bis zum Transkriptionsfaktor NF-κB verläuft bei allen TLRs, außer TLR3, über die Proteine der *Interleukin-1 receptor (IL1R) associated kinase* (IRAK) Familie (44).

3.4 IRAK-M

Verschiedene Signalmoleküle sind bei der Weiterleitung über den Toll-like Rezeptorweg von Bedeutung. Wie bereits beschrieben führt die Aktivierung von TLR zur Rekrutierung des Adaptermoleküls MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) an die TIR-Domäne des Rezeptors. Die TIR-TIR- Interaktion von MyD88 und TLR führt zur Rekrutierung von IRAK- Proteinen und zur Bildung des Adapterkomplexes MyD88-IRAK (Myddosome) (72). Alle Proteine der IRAK- Familie weisen eine N-terminale Domäne (*death domain*) zur Interaktion mit der TIR-Domäne von MyD88 und eine C-terminale Kinase-Domäne auf. Jedoch verfügen nur IRAK-1 und -4 über eine katalytische Funktion. Zunächst bindet IRAK-4 über die *death domain* an MyD88, was zur Phosphorylierung von IRAK-2 und Rekrutierung von IRAK-1 führt. IRAK-4 phosphoryliert anschließend IRAK-1 (72). IRAK-1 rekrutiert und aktiviert TRAF6 wodurch die Signalweiterleitung über TRAF6, TAB1, -2 und TAK1 zu NF-κB erfolgt (Abb. 7).

Einleitung

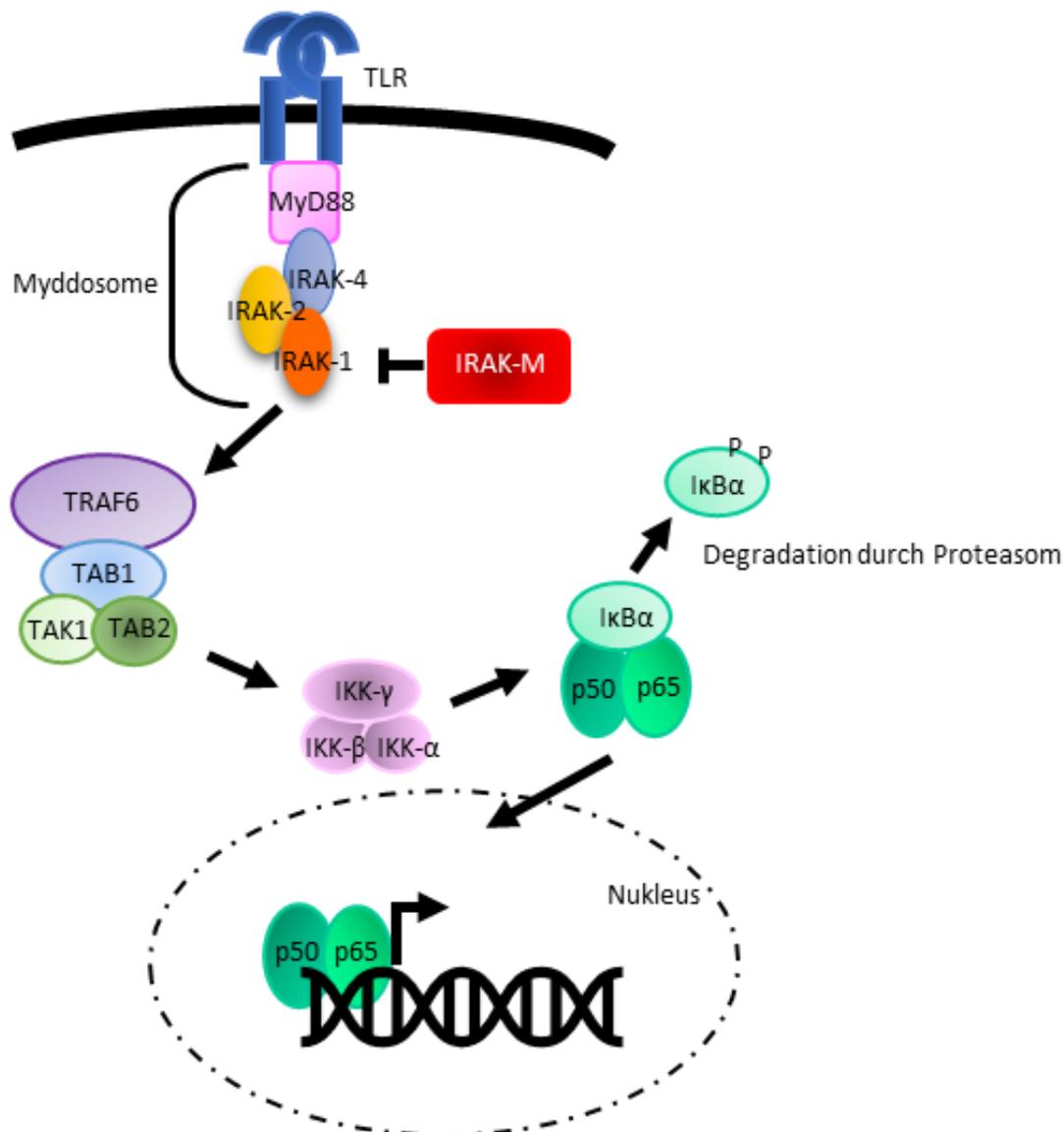


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Regulation des TLR- Signalwegs durch IRAK-M
TLR Stimulation führt zur Rekrutierung von MyD88 und zur Ausbildung des IRAK-MyD88-Komplexes (Myddosome). Durch Phosphorylierung von IRAK-1 und 2 kommt es zur Assoziation mit TRAF6. Die Signalweiterleitung aktiviert dann über den IKK-Komplex, NF-κB. (Adaptiert nach Afonina *et al*,2017).

Ein wichtiger negativer Regulator dieses Signalwegs ist IRAK-M (*Interleukin-1 receptor associated kinase-M*), auch IRAK-3 genannt. IRAK-M wurde erstmals 1999 von Wesche *et al* im Menschen beschrieben. Die murine Variante weist eine 71%ige Homologie zur humanen auf. Die Expression von humanem IRAK-M konnte in Makrophagen und Lungenepithelzellen nachgewiesen werden. Murines IRAK-M wird auch in anderen Immunzellen, Epithelzellen und Geweben exprimiert (73), (74).

In der nachfolgenden Tabelle sind humane sowie murine Zell- und Gewebetypen mit IRAK-M Expression gelistet (Tab. 2).

Einleitung

Tabelle 2: IRAK-M Expression in verschiedenen Zell- & Gewebearten (Hubbard *et al*, 2010)

Zelltyp bzw. Gewebe	Spezies	Quelle
Immunzellen		
<i>Monozyten/Makrophagen</i>	Human/ Mus musculus	Wesche, et al, 1999 Rosati & Martin, 2002
<i>Neutrophile</i>	Mus musculus	Hubbard, et al, 2010
<i>Fibroblasten</i>	Mus musculus	Rosati & Martin, 2002
<i>B- Zellen</i>	Mus musculus	Meyer-Bahlburg, et al, 2007
Epithelzellen		
<i>Lunge</i>	Human/ Mus musculus	Balaci, et al, 2007 Seki, et al, 2010
<i>Darm</i>	Mus musculus	Oshima, et al, 2009
<i>intrahepatischer Gallengang</i>	Mus musculus	Harada & Nakanuma, 2007
Gewebe		
<i>Thymus</i>	Mus musculus	Rosati & Martin, 2002
<i>Leber</i>	Mus musculus	Rosati & Martin, 2002
<i>Herz</i>	Mus musculus	Rosati & Martin, 2002
<i>Hirn</i>	Mus musculus	Rosati & Martin, 2002
<i>Milz</i>	Mus musculus	Rosati & Martin, 2002
<i>Niere</i>	Mus musculus	Rosati & Martin, 2002

Kobayashi *et al* konnte 2002 zeigen, dass IRAK-M als negativer Regulator die Phosphorylierung von IRAK-1 durch IRAK-4 verhindert. Wodurch keine Komplexierung von TRAF6 mit IRAK-1 zustande kommen kann und die Signalweiterleitung somit unterbrochen wird. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass IRAK-M den klassischen NF- κ B Weg über TLR4 und -9 inhibieren kann. In der nachfolgenden Tabelle sind die Toll-like Rezeptoren aufgelistet, die nach Aktivierung die IRAK-M Expression verstärken (Tab. 3).

Einleitung

Tabelle 3: Rezeptoren mit Einfluss auf IRAK-M Expressionen (Hubbard *et al*, 2010)

Rezeptor	Quelle
<i>TLR2</i>	Nakayama, et al, 2004
<i>TLR4</i>	Kobayashi, et al, 2002
<i>TLR5</i>	Oshima, et al, 2009
<i>TLR7</i>	Hassan, et al, 2009
<i>TLR9</i>	Tazi, et al, 2006

Die Expression von IRAK-M wird als Reaktion auf die Bindung verschiedener Moleküle an die TLR reguliert (75). IRAK-M Expression wird als Antwort auf die TLR Aktivierung induziert. So konnte gezeigt werden, dass IRAK-M mRNA und Protein in Makrophagen 3 bis 6h nach LPS Stimulation exprimiert wurden (76), (77). Es konnte ebenfalls belegt werden, dass NF-κB, durch die TLR4- Aktivierung induziert, an den IRAK-M-Promoter binden und diesen aktivieren kann (78). Zudem ist belegt, dass IRAK-M als einziges Protein der IRAK-Familie keine Kinaseaktivität besitzt und suppressiv im TLR4-Signalweg wirkt (76). Eine wichtige Funktion ist die Dämpfung der Entzündungsreaktion nach Erregerlimitation und der Etablierung einer Endotoxintoleranz (79). Mögliche Krankheitsverläufe, die in Verbindung mit einer verstärkten bzw. verminderten IRAK-M Expression stehen, sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Mit IRAK-M Expressionsänderung verknüpfte Krankheiten (Hubbard *et al*, 2010)

Krankheit	Erhöhte IRAK-M Expression	Verminderte IRAK-M Expression
Sepsis	Erhöhte Endotoxintoleranz bei Makrophagen, verminderte pro-inflammatorische Zytokinsekretion (toxischer Schock) (80) (81) (82)	Erhöhte Zytokinproduktion, verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen an den Entzündungsort, verminderte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen (82).
chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	?	Verminderte Toleranz gegen kommensale Magen-Darm-Bakterien (83), (84)

Einleitung

Krankheit	Erhöhte IRAK-M Expression	Verminderte IRAK-M Expression
Transplantat Toleranz	?	Reduzierte Toleranz gegen Hauttransplantate (85)
Influenza Infektion	?	Erhöhte Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge (86)
parodontale Infektion mit <i>P. gingivalis</i>	Induktion der Endotoxintoleranz von Makrophagen, reduzierte Immunantwort (87)	?
Tumorgenese	Monozytendeaktivierung und reduzierte Immunreaktion (88)	Reduziertes Tumorwachstum und verbesserte Anti-Tumor-Immunität (89)

IRAK-M ist eine inaktive Proteinkinase, die die Signalweiterleitung ausgehend von Toll-like- und IL1- Rezeptoren inhibiert. Die Aktivierung von NF-κB wird vermindert und resultiert in einer abgeschwächten Immunantwort nach Erregerkontakt. Während der Pankreatitis wird die Immunantwort aktiviert bei welcher Toll-like Rezeptoren involviert sind. Die verminderte IRAK-M Expression hat verschiedene Auswirkungen (Tab. 4). Welchen Einfluss IRAK-M auf den Verlauf der akuten Pankreatitis hat ist bis heute noch nicht bekannt. Dies bedingt die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit.

Zielstellung

4 Zielstellung

Die Pankreatitis ist durch den Selbstverdau des Pankreas durch seine eigenen Proteasen gekennzeichnet. Im Zuge dieses Prozesses werden Moleküle und Strukturen freigesetzt, welche von Immunzellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Die Immunzellen reagieren auf die Bindung dieser Strukturen an Mustererkennungsrezeptoren mit einer Entzündungsreaktion. Zu diesen Rezeptoren gehören auch die Toll- like Rezeptoren, welche am Ende der Signalkaskade den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren, wodurch u.a. pro- inflammatorische Proteine verstärkt exprimiert werden. Ein wichtiger Suppressor dieser Signalwege ist IRAK-M, auch als IRAK-3 bekannt.

Bisher ist noch nicht vollständig aufgeklärt wie das Zusammenspiel zwischen Zelltod, Aktivierung pro- sowie anti-inflammatorischer Mediatoren und infiltrierenden Zellen in Bezug auf den systemischen Verlauf der Pankreatitis funktioniert. In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Rolle der MyD88/NF- κ B Signalweg sowie dessen Regulation durch IRAK-M auf die experimentell- induzierte Pankreatitis im Mausmodell einnimmt. Dafür werden IRAK-M defiziente Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund und C57BL/6 Mäuse in vergleichenden Studien eingesetzt.

Insbesondere soll untersucht werden, welche Auswirkung die Deletion von IRAK-M auf den Schweregrad der Pankreatitis sowie die generelle Immunantwort hat. Anhand von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen soll geklärt werden, ob die Entzündung z.B. durch erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine verstärkt wird und inwieweit systemische Unterschiede zwischen den IRAK-M^{-/-} Tieren und den C57BL/6 sichtbar werden. Es werden dafür zwei Versuchsmodelle zur Induktion einer Pankreatitis untersucht. Die Caerulein induzierte akute Pankreatitis, die einen milden Verlauf der Entzündung in Patienten widerspiegelt und die partielle Gangligatur (PDL, *partial duct ligation*), welche die schwere nekrotisierende Pankreatitis mit Pankreasinsuffizienz bei Patienten widerspiegelt.

Material

5 Material

5.1 Tierstämme

Stamm	Lieferant
C57BL/6-J (SIMON et al, 2013)	Janvier Labs (Rte du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich))
B6.129S1- <i>Irak3</i> ^{tm1Flv} /J Stock No: 007016 IRAK-M-	Jackson Laboratory

5.2 Primäre Antikörper

Antikörper	Produktname	Spezies	Hersteller
Anti-Amylase	sc-46657	mouse	Santa Cruz
Anti-CD68	ABIN181836	rat	Antibodies-Online
Anti- CD206	OASA05048	rat	Aviva Systems Biology
DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole) dihydrochloride)			Sigma
Anti-Ly6g	ab25377	rat	Abcam
Anti- NF-kB p65 (D14E12)	8242	rabbit	Cell Signaling

5.3 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Goat IgG-Cy3-Conjugated	Jackson Immun Research
Anti-Goat IgG-FITC-Conjugated	Jackson Immun Research
Anti-Mouse IgG-Cy3-Conjugated	Jackson Immun Research
Anti-Mouse IgG-FITC-Conjugated	Jackson Immun Research
Anti-Rabbit IgG-Cy3-Conjugated	Jackson Immun Research

Material

Antikörper	Hersteller
Anti-Rabbit IgG-FITC-Conjugated	Jackson Immun Research
Anti-Rat IgG-Cy3-Conjugated	Jackson Immun Research
Anti-Rat IgG-FITC-Conjugated	Jackson Immun Research

5.4 Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Klon	Hersteller	Konzentration
CD4	PerCP/Cy5.5	GK1.5	BioLegend®	4µg/ml
CD4	BV605	RM4-5	BioLegend®	4 µg/ml
CD4	BV650	RM4-5	BioLegend®	1 µg/ml
CD8a	BV605	53-6.7	BioLegend®	2 µg/ml
CD25	Alexa647	PC61	BioLegend®	10µg/ml
CD25	PE/Cy7	PC61	BioLegend®	4 µg/ml
CD68	APC/Cy7	FA-11	BioLegend®	2µg/ml
CD69	BV510	H1.2F3	BioLegend®	2 µg/ml
CD206	APC	C068C2	BioLegend®	4 µg/ml
CD206	V650	C068C2	BioLegend®	2µg/ml
FoxP3	A488	150D/E4	eBioscience	1µg/ml
Gata3	BV421	16E10A23	BioLegend®	1 µg/ml
Gata3	PE	16E10A23	BioLegend®	0,25µg/ml
Roryt	APC	AFKJS-9	Invitrogen	20 µg/ml
Tbet	BV421	4B10	BioLegend®	8 µg/ml
Tbet	PerCP/Cy5.5	4B10	BioLegend®	10µg/ml

Material

5.5 Chemikalien o.Ä.

Chemikalie	Kennung	Hersteller
Aceton	KK40.1	Roth
Agarose	2267.3	Roth
Auffriermedium (Tissue Freezing Medium)	14020108926	Leica
BSA (Bovine Serum Albumin)	P06-1391500	PAN Biotech
Bromphenolblau Natriumsalz	1.11746.0005	Merck
Cathepsin B Substrat (Z-Arg-Arg-AMC)	I-1135.0250	Bachem
Cetyltrimethylammonium Bromid	9161.1	Roth
Kollagenase	EC.3.4.24.3	Serva
Chloroform	1.02431.2500	Merck
Cholecystinin (CCK)	Fragment 26-33 C2901	Sigma
Chymotrypsin Substrat (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC)		
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	4720.2	Roth
Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Roth
DTT (0,1M)	Y00147	Invitrogen
dNTP 10mM Mix	100004893	Invitrogen
DEPC- treated Water	AM9920	Ambion
Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T. Compound)	4583	Sakura Tissue-Tek®
Ethanol absolut	2246.2500	ChemSolute
Chemikalie	Kennung	Hersteller

Material

Ethidiumbromid Lösung	HP47.1	Roth
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	8040.2	Roth
Eosin	SLBT542	Sigma
Ethanol	2246.2500	ChemSolute
Ethidiumbromid		Merck
Fc-Rezeptor-Block	130-092-575	Miltenyi Biotech
FCS		GIBCO Pan Biotech
Formaldehyd- Lösung 4,5% gepuffert	27279	Fischar
Glucose	49159	Fluka Analytical
Glycerol	17904	Thermo Scientific
Glycin	3908.3	Roth
H ₂ O ₂	1.07209.1000	Merck
Hämatoxylin	MHS32	Sigma
HEPES sodium salt	H7006-500g	Sigma
Isopropanol	16515	Sigma
Kaliumchlorid	HN02.1	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	1.04873.0250
Kaliumhydroxid	P1767-250	Sigma
Ketamin	FSI670044SED	Selectavet
LPS		Sigma
Magnesiumchlorid	M9272-500g	Sigma
M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)		
Chemikalie	Kennung	Hersteller

Material

Methanol	8402	J.T.Baker
M-MLV RT	28025-013	Invitrogen
Natriumchlorid	3957.2	Roth
Natriumfumarat	F1506	Sigma
Natriumglutamat		
Natriumdihydrogenphosphat	1.063.291.000	Merck
Natriumphosphat	Sigma	S-0751
Natriumpyruvat	P8574	Sigma
Oligo (dT) Primer	5730G	Invitrogen
PBS Dulbecco	C188-50	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		
2-Propanol	6752.4	Roth
Propidiumiodide	P4170-500mg	Sigma
Random Hexamer Primer	SO142	Thermo Scientific
Recombinat RNasin® Ribonuclease Inhibitor	N251B	Promega
Salzsäure (HCL)	1.00317.1000	Merck
Sevofluran	4456	Abott Laboratories
Target Retrieval Solution (10x)	S1699	DAKO
Tissue mounting medium	CC/Mount	Sigma
Tramal	95005442	Grünenthal
TRIS	5429.2	Roth
Triton-X-100	X100-1L	Sigma
TRIzol®	15596018	ambion
Chemikalie	Kennung	Hersteller

Material

Trypanblau	CN76.1	Roth
Trypsin Substrat (CBZ-Ile-Pro-Arg) ₂ -R110	R6505	Invitrogen
Trypsin Substrat (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC)	4017019	Bachem
Tween-20	P2287	Sigma
Xylasel (Xylanzin)		Selectavet
Xylene Cyanol FF	9710-25GM	Merck
Xylol	9713.3	Roth
5x First Strand Buffer	Y02321	Invitrogen

5.6 Kits

Kit	Kennung	Hersteller
ApopTag [®] Red <i>In Situ</i> (Apoptosis Detection Kit)	S7165	Merck
Azan Färbekit	12079	Morphisto GmbH
BCA Protein Assay	23225	ThermoFisher
Bradford-Kit		BioRad
CBA mouse inflammation Kit	552364	BD Bioscience
CRP ELISA KIT	DY1829	R&D Systems
DAB Substrate Kit		Vector Laboratories
P-Amyl-Kit (Pankreas- α - Amylase)	03183742	Cobas Integra
P-Lip-Kit (Pankreas Lipase)	03029590	Cobas Integra
Kit	Kennung	Hersteller

Material

Phagocytosis Assay Kit (IgG PE)	600540	Cayman
SYBR™ Green PCR Master Mix	4309155	appliedbiosystems
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	205313	Qiagen

5.7 Lösungen, Medien und Puffer

Lösung/Puffer/Medium	Zusammensetzung
Agarose Gel	1x TAE Puffer Agarose (1- 2,5%) 1,78µM Ethidiumbromid
Azinus-Isolationsmedium	8% 100mM HEPES 73% DMEM GlutaMax 5% BSA, ansäuern (1M HCl), mit Sauerstoff gesättigt
Azinus-Messmedium (5x)	24,5mM HEPES (pH 7,5) 96mM NaCl 6mM KCl 1mM MgCl ₂ 2,5mM Natriumdihydrogenphosphat 500µM CaCl ₂ 11,5mM Glucose 5mM Natrium Pyruvat 5mM Natrium Glutamat 5mM Natrium Fumarat 1% DMEM, 1% BSA, 1% Ethanol pH 7,4, mit Sauerstoff gesättigt
Lösung/Puffer/Medium	Zusammensetzung

Material

Cathepsin B Messpuffer	100mM Natriumacetat 5mM CaCl ₂ 10mM DTT pH 5,5
DACO-Antigen retrieval	DACO/Agilent
DMEM with GlutaMax+	Gibco-Thermo Fischer
DNA-Ladepuffer	H ₂ O 10mM Tris-HCl (pH 7,6) 0,03% Bromphenol Blau 0,03% Xylene Cyanol FF 60% Glycerol 60mM EDTA·2Na
Erythrozyten- Lyse Puffer (10x)	H ₂ O 1,5M NH ₄ Cl 0,1M KHCO ₃ 10mM EDTA·2Na
FACS Puffer	PBS 0,02% Natriumazid 2% FCS 2mM EDTA
FACS cell permeab. Puffer	Miltenyi Biotech
HEPES-Puffer	20mM HEPES, pH 7,4
MPO-Extraktionspuffer	H ₂ O 50mM KH ₂ PO ₄ 0,5%Hexacetyltrimethylammoniumbromid pH 6,0 (eingestellt mit KOH)
Lösung/Puffer/Medium	Zusammensetzung

Material

MPO-Homogenisierungspuffer	H ₂ O 20mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (eingestellt mit KOH)
MPO-Messpuffer	H ₂ O 50mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0 (eingestellt mit KOH) 0,53mM O-dianisidine 0,21% H ₂ O ₂
PBS (10x)	H ₂ O 1,37M NaCl 27mM KCl 81mM Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O pH 7,4
Trypsin-/Chymotrypsin-Messpuffer	100mM Tris 5mM CaCl ₂ pH 8,0
RPMI-Medium	Gibco- Thermo Fischer

5.8 Oligonukleotide

Primer	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
BIP	GGAACCATCCCGTGGCATAA	CTTGGTAGGCACCACTGTGT
IL6	CCAGAGTCCTTCAGAGAGATACA	CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC
IL10	ATAACTGCACCCACTTCCCA	GGGCATCACTTCTACCAGGT
IL12a	CAATCACGCTACCTCCTCTTT	ACCATGTCATCTGTGGTCTTC
IL12b	AGCACGGCAGCAGAATAAA	CTCCACCTGTGAGTTCTTCAA
Primer	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
IL33	TGCCTCCCTGAGTACATACA	CTCTTCATGCTTGGTACCCGAT

Material

iNOS	TTGGAGCGAGTTGTGGATTTG	TAGGTGAGGGCTTGGCTGAG
IRAK-M	GTGATCATGGAGGTTCTAACGG	GAGGACAGGGTGGTATCT
MRC1	GGCGAGCATCAAGAGTAAAGA	CATAGGTCAGTCCCAACCAAA
PRSS1	CAACTACCCTTCACTCCTTCAG	TGCCTGGGTAAGAACTTGTG
TGFβ	ATACGTCAGACATTCGGGAAGCAGT	AATAGTTGGTATCCAGGGCTCTCC
TLR1	GCTGGTGTTAGGAGATGCTTAT	GACGGACACATCCAGAAGAAA
TLR2	TGAAGTCCAGCAGAATCAATACA	CCGAACCAGGAGGAAGATAAAC
TLR3	GTGCATCGGATTCTTGGTTTC	GACCCAGTCTCTGTCTTTATGG
TLR4	GCTTACACCACCTCTCAAAC	ACAGCCACCAGATTCTCTAAAC
TLR5	GAAGACTGCGATGAAGAGGAAG	CAAGGGTGATGACGAGGAATAG
TLR6	GGGTAAATCCTCCACCATTCAG	GCTAACATGAAGCCAGGTAGAG
TLR7	AACCTTTCCAGAGCATAACAG	GGAGCCTCTGATGAGACAAATAA
TLR8	CCTCTCTAAGGCTAGGGTAACT	TGCCCAGAAGACAGCATT
TLR9	TGGACGGGAACTGCTACTA	CAGAGACAGATGGGTGAGATTG
TNFα	GCCTCCCTCTCATCAGTTCTAT	CACTTGGTGGTTTGCTACGA
5S	GCCCGATCTCGTCTGATCTC	GCCTACAGCACCCGGTATTC

5.9 Geräte u.a.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Chemilunineszenz Imager	FluorChem SP	Alpha Innotech Cell Biosciences
Chirurgisches Besteck	Scheren, Pinzetten	Carl ROTH
Cryo-Mikrotom		Leica
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	BD FACSAria™III Cell Sorter	BD Bioscience

Material

	BD™ LSR III flow cytometer	BD Bioscience
Eismaschine	Scotsman AF 100	Scotsman
Elektrophorese	EPS 301	Amersham pharmacia biotech
Fluorometer	FluoStar Optima	BMG Labtech
Heizblock	SEH2000/3 Thermomixer compact	Stuart Eppendorf
Heiz- und Rührplatte	REC-G	IKAMAG
Kühlplatte	EG1150C	Leica
Kryotom	CM3050S	Leica
MACS Geräte	MACS Magnetic separator	Miltenyi Biotech
	gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotech
	MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotech
Magnetrührer	RFT	IKA
Mikroskope	Axophot FLUOVIEW FV1000	Zeiss Olympus
Mikrotom	RM2235	Leica
Mikrowelle	CMC 2895 DS	Candy
Netzgerät	Power Pac 300	BioRad
PCR-Cycler	Mastercycler EP S Thermal Cycler	Eppendorf
	peqSTAR Thermal Cycle	PeqLab
pH/ORP Meter	HI 2211	HANNA instruments
Photometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Photoimager		Alpha Innotech Cell Biosciences

Material

Photometer (Mikroplatte)	SPECTRAmax Plus384	Molecular Devices
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time Instrument	QuantStudio 7 Flex	Applied biosystems
Schüttelwasserbad	1092	GFL
	SW22	Julabo
Slide Scanner		Sysmex Corporation
Spektrophotometer	SpectraMax 190	Molecular Devices
Sterilbank	Herasafe	Thermo Scientific
Tissue Lyser	TissueLyserII	Qiagen
Trans-Blot	SD Semi-Dry	Bio Rad
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin
Vortexer	MS3 Minishaker	IKA
Waagen	AC 120 S ARA520	Satorius OHAUS
Wasser Aufbereitung	Millipore	Merck
Wasserbad	HI1210	Leica
Zellkultur Inkubator		Binder
Zellzählgerät	Casy [®] 1 Modell TT	Roche Innovatis AG
Zentrifugen	5417R, 5415R, 5424R Heraeus Pico 21 Sprout, Microcentrifuge	Eppendorf Thermo Fisher Scientific Heathrow Scientific
Zentrifuge	Perfect Spin P	Peqlab

5.10 Verbrauchsmaterialien

Material	Kennung	Hersteller
Beads	69989	Qiagen

Material

Chirurgisches Nahtmaterial	DSP 16 4/0 USP	Mariderm®
Deckgläser		R. Langenrinck GmbH
Einbettkassetten	4156F	Sakura TissueTek®
FACS Röhrchen		Sarstedt
Kanülen	20G 25G 26G 30G 25G	BD Microlance Braun
Kryoeinbettformen	Cryomold®	Sakura Tissue-Tek®
Kryoröhrchen		Grainer Bio-one
Kapillaren	Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	BRAND
Mullkompressen	31505	Fuhrmann
Objektträger	Super Frost® Plus Polysine® Slides	R. Langenbrinck GmbH Thermo Scientific
Petrischalen		Merck
Pipettenspitzen		Greiner Bio-one
Serologische Pipetten		Sarstedt
Serumröhrchen		
Spritzen	1ml 2ml 5ml	BD Plastipak BD Discardit II
Transferpipetten		Sarstedt
Material	Kennung	Hersteller
Reaktionsgefäße	1,5ml 15ml	Sarstedt Sarstedt

Material

		50ml	Falcon®
MicroAmp™ Adhesive Film	Optical	4311971	appliedbiosystems
Mikroplatte		96-Well 96-Well, Rundboden	Sarstedt Greiner Bio-one
		384-Well	Biozym Scientific GmbH
Serologische Pipetten			Sarstedt
Zellfilter 0,4µm		352340	Falcon®
Zellsiebe (50µm, 70µm, 100µm)			Grainer Bio-one
Zellkulturplatte		6-Well 24-Well	Falcon® Falcon®

5.11 Software

Software	Firma
Alpha Innotech	Alpha Innotech Cell Biosciences
CaseViewer 2.4	Sysmex GmbH
Quant Center 2.3	3DHISTECH
CellSens Software	Olympus
DataAssist	Applied biosystem
FlowJo_V10	BD Biosciences
Fluoview FV10-ASW	Olympus
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software
ImageJ	NIH
Software	Firma
Leica MM AF 1.5	Leica
Microsoft 365 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft Corporation

Material

NanoScope 7.3	Leica
Optima	BMG Labtech
RTCA Software Version 1.2	Roche Diagnostics
Sigma Plot	Systat Software
Soft MaxPro	Molecular Devices

Methoden

6 Methoden

6.1 Tiermodelle

6.1.1 IRAK-M^{-/-} und C57BL/6 Mäuse

Alle Experimente erfolgten nach den Richtlinien des Landesamts für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) in Mecklenburg-Vorpommern unter dem Aktenzeichen 7221.3-1-011/17. Der IRAK-M^{-/-} Stamm mit der Allel Bezeichnung *Irak3^{tm1Flv}* und der Stock Nummer: 007016 wurde vom Jackson Labor bezogen. Der Knockout entstand durch Ersetzen einer 2kb- Sequenz durch eine gefloxt Neomycin-Kassette. Der gelöschte Bereich enthielt 3 Exons, die für zwei Drittel der Kinase-Domäne kodieren. Die Mutation wurde von Dr. Richard Flavell (Yale University School of Medicine) erstellt.

Zur Kontrolle wurden Wildtyp- Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Diese stammten von der Firma Janvier Labs.

Um die Vergleichbarkeit sicherzustellen, waren alle experimentell verwendeten Tiere zwischen 8 bis 12 Wochen alt. Die Haltung erfolgte in offener Käfighaltung bei 23°C ±2°C und 12h Licht- Rhythmus. Die Tiere erhielten einmal wöchentlich frisches, angesäuertes Tränkwasser (2% HCL) und frei zugängliche Futterpellets. Die Versuche erfolgten frühestens eine Woche nach Einstellung der Tiere und einem Mindestalter von 8 Wochen.

6.2 Experimentelle Modelle der Pankreatitis

6.2.1.1 Caerulein induzierte akute Pankreatitis

Die milde akute experimentelle Pankreatitis wurde durch stündliche intraperitoneale (i.p.) Injektion von 50µg/kg/Körpergewicht Caerulein induziert. Die erfolgte bis zu einem Maximum von 8h. Tags zuvor wurden die Tiere nüchtern gesetzt. Die Injektion erfolgte in einem Volumen von 200µl Caerulein in PBS. Die Aufarbeitung erfolgte eine Stunde nach letztmaliger Injektion bzw. am nächsten Tag (24h Zeitpunkt).

6.2.1.2 Partielle Gangligatur induzierte akute Pankreatitis

Die schwere nekrotisierende Pankreatitis wurde mittels Abbindens des Pankreasgangs nach Mooren (2003) und Sendler (2016) durchgeführt. Die Operation erfolgte unter Narkose durch Verwendung von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg i.p.) und Xylazinhydrochlorid (2,5-5 mg/kg i.p.) in PBS.

Methoden

Nach erfolgter Laparotomie wurde der Pankreaskopf freipräpariert und der Ductus pancreaticus mit Hilfe eines chirurgischen Fadens abgebunden. Anschließend wurde der Bauchraum verschlossen und die Tiere bis zum vollständigen Erwachen überwacht. Zur Schmerzlinderung erfolgte der Zusatz von Metamizol in einer Dosis von 2 mg/ml Tränkwasser. Die Tiere wurden im Anschluss engmaschig überwacht und hinsichtlich der zuvor definierten Abbruchkriterien bewertet. Am Tag zwei erfolgte eine einmalige Injektion mit Caerulein (50µg/kg/Körpergewicht). Am Folgetag wurden die Tiere aufgearbeitet.

6.3 Organentnahme und Präparation

Zur Organentnahme (OE) wurden die Tiere mittels Sevofluran narkotisiert und das Blut retroorbital gewonnen. Anschließend erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Nach Eröffnen des Abdomens wurden Lunge, Milz, Niere, Lymphknoten und Pankreas extrahiert, in PBS gespült und fixiert bzw. in Stickstoff gefroren. Die Organe wurden u.a. in Einbettkassetten in Formaldehyd- Lösung (4,5%) oder in Kryoeinbettformen in Tissue Tec®- Medium fixiert. Die Tissue Tec® fixierten Proben wurden anschließend langsam in Stickstoff durchgefroren. Für durchflusszytometrische Analysen wurde die Milz gesondert entnommen.

6.3.1 Isolation von Stammzellen aus dem Knochenmark

Zur Herstellung von Makrophagenkulturen aus dem Knochenmark nach Sandler et al (2018) wurden von einigen Tieren Femur und Tibia entnommen. Femur und Tibia wurden freipräpariert, gesäubert und die Gelenkköpfe auf beiden Seiten abgetrennt. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Kanüle und 2ml eiskaltem PBS ausgespült. Zur Vereinzelung der Zellen wurden diese durch ein Zellfilter (70µm) gesiebt. Nach Zentrifugation (10min, 4°C, 4000rpm) in Medium (RPMI Medium, 5%FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin) resuspendiert sowie gezählt.

6.3.2 Serumgewinnung

Aus dem Augenhintergrund (retroorbital) wurde mittels Glaskapillaren Blut gewonnen, welches in Serumröhrchen überführt und zentrifugiert (5min, 5000rpm) wurde. Das gewonnene Serum wurde aliquotiert. Ein Teil diente der CBA Messung, der andere wurde 1:50 mit A. dest verdünnt und diente zur Amylase- und Lipase-Messung. Die Proben wurden bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert.

Methoden

6.3.3 Herstellung von Gewebehomogenaten

Gewebe wurde in 500µl Homogenisierungspuffer mit einem Dounce-Homogenisator zerrieben. Zur Proteinbestimmung wurden 100µl entnommen, 2x für 10sek geschallt und für 10min bei 4°C und 14000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert und zur BCA-Proteinbestimmung genutzt. Das restliche zerstoßende Gewebe wurde für weitere Untersuchungen bei -80°C gelagert.

6.3.4 Isolation von Azinuszellen aus Pankreasgewebe

Nach Extraktion des Pankreas wurde dieser in Isolationsmedium mit 1mg Kollagenase überführt, zerkleinert und im Schüttelbad (15min, 37°C, 100rpm) inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, das Gewebe erneut mit Kollagenase haltigem Medium versetzt, nochmals zerkleinert und für weitere 15min inkubiert. Die Azinuszellen wurden durch vorsichtiges Resuspendieren aus dem Verband gelöst. Die erhaltene Zellsuspension anschließend filtriert, zentrifugiert (1min, RT, 1800rpm) und die Zellen in frischem Isolationsmedium aufgenommen. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Zellen anschließend in 15ml frischem Isolationsmedium resuspendiert. Die Suspension ruhte liegend für 30min bei 37°C und 45rpm im Wasserbad. Nach der Ruhephase wurden die Zellen für 1min bei 1800rpm zentrifugiert und das Sediment in 10ml Isolationsmedium aufgenommen.

6.4 Histologische und Immunologische Färbungen

6.4.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Es wurden 2µm starke Schnitte des paraffinfixierten Gewebes am Mikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden auf Glasobjektträger aufgezo-gen und getrocknet. Zur Färbung des Gewebes wurden die Schnitte entparaffiniert. Die in Tissue Tec®-Medium kryokonservierten Organe wurden mittels Auffriermedium auf die Präparathalterung ins Kryotom gespannt. Auch hier wurden 2µm starke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezo-gen. Die Fixierung dieser erfolgte dann für 20min bei -20°C in Aceton und anschließender Trocknung. Anschließend konnte sofort gefärbt werden.

6.4.2 Entparaffinierung und Wiederherstellung der Immunreaktivität

Die Entparaffinierung erfolgte 15min in Xylol, anschließend 10min in Methanol. Die Prozedur wurde wiederholt. Danach wurden die Schnitte je 5min in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95% und 70% EtOH und abschließend für 5min in PBS) in ein wässriges Milieu überführt.

Methoden

Um die Immunreaktivität des Gewebes wiederherzustellen, wurden die Schnitte für 30min in 100ml DAKO Target Retrieval Solution (1:10 in A.dest) im Dampfdrucktopf gekocht. Die Schnitte kühlten anschließend in PBS ab.

6.4.3 Hämatoxylin- Eosin- Färbung (H&E- Färbung)

Die entparaffinierten Schnitte wurden 5min in unverdünntem Hämatoxylin gefärbt. Anschließend 2min unter fließendem Wasser gewaschen und für 1min in Eosin (1:10) gefärbt. Zum Entziehen des Wassers verblieben die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe je 30sek (70%, 95%, 100% EtOH) und wurden abschließend 5min in Xylol gebettet. Das Gewebe wurde dann mit Vecta Mount Medium eingedeckelt und konnte gescannt werden. Diese Färbung dient der Visualisierung von basophilen (u.a. Zellkerne) sowie acidophilen (u.a. Zellplasmaproteine) Strukturen im Gewebe, wobei erstere blau und zweitere rot gefärbt werden.

6.4.4 Immunfluoreszenzfärbung (IF)

Entparaffinierte oder in Aceton fixierte Schnitte konnten für die IF genutzt werden. Die Antigendemaskierung des paraffinfixierten Gewebes erfolgte durch Kochen in DACO Antigenretrieval Lösung. Anschließend wurde die Autofluoreszenz durch Inkubation für 20min in 1% Natriumborhydrit geblockt und die Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Nach diesem Schritt erfolgte die Blockierung in 20% FCS- Lösung (Blockierungslösung) für 1h bei 4°C. Bei Aceton-fixierten Kryokonservierten Schnitten konnte sofort mit diesem Schritt begonnen werden. Im Anschluss erfolgte die Bindung des primären Antikörpers in entsprechender Verdünnung (1:100, 1:200, 1:500) in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden dann 3x je 10min mit PBS gewaschen und mit sekundärem Antikörper (siehe 3.3) in Blockierungslösung versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1h unter Lichtausschluss bei RT mit anschließendem Waschen mit PBS. Zur besseren Differenzierung erfolgte eine Färbung der Kerne mit DAPI. Nach diesem Schritt wurde final gewaschen und in Fluorescence Mounting Medium (Dako) eingebettet. Diese Methode ermöglicht es spezifisch Proteine zu färben. Durch Nutzung verschiedener Fluoreszenz konjugierter sekundärer AK ist eine Mehrfachfärbung innerhalb des Gewebes möglich.

6.5 Enzymatische Methoden

6.5.1 Messung der Serumamylase und Serumlipase

Unter Verwendung des Amylase- sowie Lipase Kits der Firma Cobas Integra erfolgte die Messung der jeweiligen Enzymaktivität im Serum.

Methoden

Dafür wurden 10µl einer 1:50 Verdünnung als Triplikat in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Kurz vor der Messung erfolgte die Zugabe von 90µl Substratlösung. Diese bestand aus einem Teil Lösung A und zwei Teilen Lösung B des jeweiligen Amylase- bzw. Lipase-Kits. Die photometrische Messung erfolgte bei 37°C als Kinetik über 30min, für Amylase bei einer Wellenlänge von 405nm und einem Intervall von 30sek und für Lipase bei 570nm und 10sek. Der lineare Anstieg der Aktivität wurde zur Auswertung verwendet.

6.5.2 Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge

Die Myeloperoxidase spielt eine Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen. Es ist ein Marker für die Transmigration von Immunzellen (Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen) in das Organ (90). Zunächst wurde das Gewebehomogenat (siehe 4.3.3) zentrifugiert (10min, 4°C, 14.000rpm), der Überstand verworfen, bzw. zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet, und das Sediment in 500µl eiskaltem MPO- Extraktionspuffer aufgenommen. Die Proben wurden anschließend in Stickstoff schockgefroren und bei 37°C im Heizblock wieder aufgetaut. Die Prozedur wurde 4x wiederholt und das Gewebe nach jedem Auftauen resuspendiert. Auf diese Weise wurden die Zellen vollständig aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung (2x 10sek) sowie eine Zentrifugation (10min, 4°C, 14.000rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte bis zur MPO-Bestimmung bei -80°C gelagert werden. Für die Messung wurden die Proben auf Eis aufgetaut, als Triplikat je 10µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 90µl MPO-Messpuffer versetzt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 460nm als Kinetik über 10min bei 30°C. Zur Vergleichbarkeit wurde aufgereinigte Myeloperoxidase genutzt. Für die Auswertung wurde der lineare Anstieg mit dem Proteingehalt verrechnet.

6.5.3 Aktivitätsmessung pankreatischer Enzyme aus Azinuszellen

Nach Isolation von Azinuszellen (siehe 4.3.4) wurden diese supramaximal mit CCK (1µM) stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Azini. Zur Messung der Proteaseaktivitäten wurde je 1ml Zellsuspension nach 20, 40 und 60min Inkubation entnommen, zentrifugiert (30sek, 500rpm) und das Sediment in 900µl 1x Azinus-Messmedium aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden 200µl Überstand als Leerkontrolle in eine Mikrotiterplatte pipettiert. 400µl Azinus- Messmedium wurden zur Zellsuspension gegeben und 200µl dann zur Aktivitätsmessung genutzt. Die Messung wurde als Kinetik über 1h bei 37°C in Triplikaten durchgeführt.

Methoden

Tabelle 5: Substrate

Substrat	Wellenlänge
Chymotrypsin	Ex 340nm, Em 460nm
Cathepsin B	Ex 340nm, Em 460nm
Trypsin	Ex 485nm, Em 530 nm
Propidiumiodid	Ex 350 nm, Em 630 nm

Zur Gesamt-Nekrose Bestimmung wurden nach der Messung 90µl 3% Triton-x-100 (in PBS) pro Vertiefung gegeben und für 20min bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte als Endpunktbestimmung und spiegelte die Gesamtzellkernmenge pro Vertiefung wider.

6.6 Durchflusszytometrie

6.6.1 Konzentrationsbestimmung spezifischer Entzündungsmarker im Serum

Mittels CBA (Cytometric Bead Array) Kit wurden im Serum verschiedene Zytokine bestimmt. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach Angaben des Herstellers (CBA Mouse Inflammation Kit; BD Biosciences).

6.6.2 Durchflusszytometrie von Splenozyten

Nach Entnahme der Milz wurde diese durch ein Sieb (70µm) mit einem 2ml Spritzenstempel in ein 50ml Reaktionsgefäß gedrückt und mit 1ml PBS nachgespült. Anschließend wurde die Suspension mit PBS auf 20ml aufgefüllt und für 6min bei RT und 1200rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1ml 1x Erythrozyten- Lysepuffer für 5min inkubiert, auf 20ml mit PBS aufgefüllt (Abstoppen der Reaktion) und erneut für 6min bei 1200rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1ml FACS- Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels Casy Zählgerät ermittelt und 1×10^6 Zellen für die Färbung verwendet. Die entsprechende Menge wurde in FACS Röhren überführt, mit FACS Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation geblockt. Dafür wurde 1µl Fc-Block in 25µl FACS Puffer gelöst. Die Blockierung erfolgte für 5min bei 4°C. Die extrazelluläre Färbung (siehe Tab. 6) erfolgte in 25µl Antikörperlösung für 30min bei 4°C.

Methoden

Tabelle 6: Extrazelluläre Färbung T-Zellen

Antikörper	Konjugat	Verdünnung
CD4	PE	1:50
CD25	PE/ Cy7	1:50
CD69	BV510	1:50
CD8a	BV605	1:50

Im Anschluss erfolgte die Permeabilisierung mittels *Transcription Factor Staining Buffer Set* (Miltenyi Biotech) sowie eine erneute Blockierung mit 1µl Fc-Block in 25µl FACS-Puffer. Die intrazelluläre Färbung wurde ebenfalls in 25µl Antikörperlösung (Tab. 7) für 30min bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden letztmalig gewaschen und in 150µl FACS-Puffer für die Messung aufgenommen.

Tabelle 7: Intrazelluläre Färbung T-Zellen

Antikörper	Konjugat	Verdünnung
Gata3	BV421	1:10
Tbet	PerCP/Cy5.5	1:10
FoxP3	APC	1:20
Royt	Vio515	1:10

6.6.3 Gating-Strategie

Als erstes wurden die Einzelzellen (*single cells*) (Abb. 8A) mittels Vorwärtslichtstreuung (*forward scatter*, FSC), welches ein Maß der Zellgröße wiedergibt, betrachtet. Dabei wurde FSC-A (FSC-Area) gegen FSC- H (FSC- high) aufgetragen. Im Anschluss wurden unter Verwendung der Seitwärtslichtstreuung (*side scatter*, SSC) und FSC-H die Lymphozyten (Abb. 8B) bestimmt. Die Seitwärtslichtstreuung gibt die Granularität der Zellen wieder. Zur Bestimmung der T-Helferzellen wurden CD4+ Zellen ausgewählt (Abb. 8C). Anhand dieser wurden dann die Aktivierungsmarker CD69 (Abb. 8D) sowie CD25 (Abb. 8E) festgelegt. Zur Differenzierung der T-Zellsubpopulationen wurden CD4+ Zellen auf Tbet (Th1) (Abb. 8F), Gata3 (Th2) (Abb. 7G) sowie Royt (Th17) (Abb.

Methoden

8H) gegatet. Regulatorische T-Zellen wurden als CD4+CD25+FoxP3+ Zellen dargestellt (Abb. 8I).

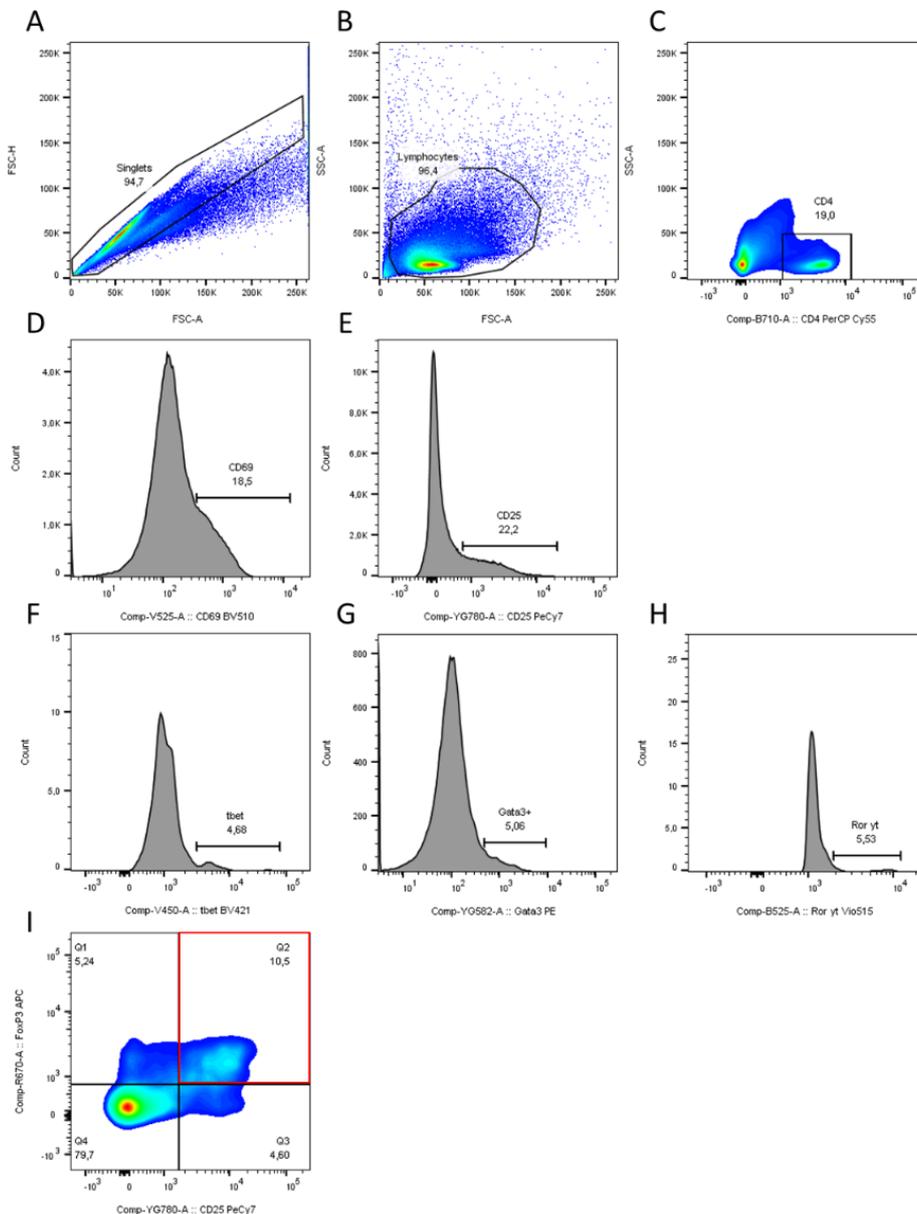


Abbildung 8: Gating Strategie der T-Zellen

Zunächst wurden die Singlets aufgetragen, anschließend die Leukozyten von denen CD4+ Zellen ausgewählt wurden. Anhand welchen dann CD69+ und CD25+ sowie Tbet, Gata3 und Rorγt gated wurden.

6.7 Biochemische Methoden

6.7.1 Proteinbestimmung mittels BCA

Die Proteinkonzentration sämtlicher Proben dieser Arbeit wurde mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher) nach Herstellerangaben gemessen. Dabei wurde die Konzentration quantitativ unter Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA) und einem

Methoden

Albumin- Standard kolorimetrisch durch den sich bildenden blau-violetten Farbkomplex ermittelt. Die Proben wurden als Triplikat in einer Mikrotiterplatte bei 562nm gemessen.

6.8 Molekularbiologische Methoden

6.8.1 RNA Isolation aus Pankreasgewebe

Die Gesamt-RNA wurde mittels TRIzol™ nach Chomczynski & Sacchi (1987) isoliert. In ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß wurde eine autoklavierte Metallkugel vorgelegt. Das tiefgefrorene Gewebe zugefügt und mit 500µl TRIzol™ versetzt. Anschließend erfolgte die Lysierung im Qiagen TissueLyser II 2x für 30sek. Das lysierte Gewebe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mit 100µl Chloroform versetzt, das Gemisch für 15sek gevortext und 3min bei RT inkubiert. Anschließend bei 14.000rpm, 4°C für 15min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und 250µl Isopropanol zugefügt, 5x invertiert und 10min bei RT inkubiert. Um die RNA zu präzipitieren, erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 14.000rpm für 10min. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 250µl 75% EtOH resuspendiert. Zur Reinigung wurde das EtOH- RNA Gemisch bei 4°C, 7500rpm für 5min zentrifugiert und das Sediment anschließend für ca. 5-10min getrocknet. Je nach Größe wurde das Sediment in 20-250µl RNase-freiem Wasser gelöst und konnte bei -80°C gelagert werden

6.8.2 RNA Konzentrationsmessung

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2µl RNA auf eine µCuvette von Eppendorf pipettiert und im BioPhotometer von Eppendorf gemessen. Als Leerwert diente RNase-freies Wasser. Der $A_{260/280}$ - Wert sollte dabei zwischen 1,8-2,0 liegen. So wurde eine optimale Reinheit und saubere Extraktion der RNA verifiziert werden.

6.8.3 cDNA Synthese

Für weitere Analysen musste die extrahierte RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden. Dafür wurden 2µg RNA unter Verwendung von M-MLV reverser Transkriptase, Random Primer sowie Oligo-dT in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 8: PCR- Mix I für reverse Transkription

Substanz	1x	finale Konzentration
Oligo dT (100µM)	1µl	5µM
dNTP Mix (10mM)	1µl	0,5mM

Methoden

Random Primer (0,2µg/µl)	0,25µl	0,05µg
2µg RNA in 9,75µl H ₂ O	2µg RNA-9,75µl H ₂ O	2µg

Es folgte eine Inkubation für 5min bei 65°C. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis gestellt und Mix II zugegeben.

Tabelle 9: PCR-Mix II für reverse Transkription

Substanz	1x	finale Konzentration
First-Strand Puffer (5x)	4µl	1x
DTT(0,1M)	2µl	0,01M
RNasin Inhibitor (40U/µl)	1µl	40units
M-MLV RT (200U/µl)	1µl	200units

Inkubation für 10min bei 25°C, anschließend 50min bei 37°C und final 15min bei 70°C. Die synthetisierte cDNA hatte eine finale Konzentration von 100ng/µl.

6.8.4 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird angewandt, um spezifische Genabschnitte durch repetitive Replikation zu amplifizieren. Die Reaktionslösungen dafür stammten aus dem Taq-DNA-Polymerase- Kit (Qiagen). Die entstandenen Amplifikate konnten mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden. Als interne Kontrolle wurde 5S rRNA (5S ribosomale RNA) bzw. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) genutzt. Die folgenden Tabellen listen das Protokoll sowie das Programm für die PCR auf.

Tabelle 10: PCR Ansatz

Substanz	20µl Ansatz	finale Konzentration
Taq-Polymerase	0,1µl	2.5units/Reaktion
CoralLoad PCR Buffer (10x)	2µl	1x
Q-Solution (5x)	4µl	1x
Primer Fw/ Primer Rv (10µM)	1µl/1µl	0,5µM
dNTP Mix (10mM)	0,5µl	0,25nM

Methoden

cDNA 100ng/ μ l	1 μ l	100ng
H ₂ O	10,4 μ l	

Tabelle 11: PCR Programm

Zeit	Temperatur	Zyklen
3min	94°C	
30sek	94°C	
30sek	57°C	38x
45sek	72°C	
10min	72°C	
	4°C	

6.8.5 Agarose- Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden Agarosegele verschiedener Konzentrationen angefertigt. Als Pufferlösung diente TAE und Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA. Es wurden 15 μ l PCR-Produkt aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 110V für 30min.

6.8.6 Densitometrische Analyse der PCR- Amplifikate

Zur prozentualen Vergleichbarkeit der PCR-Produkte spezifischer Gene mit ihrer internen Kontrolle wurden die TIFF-Aufnahmen der Agarosegele mittels ImageJ ausgewertet. Die gemessenen Areale der Banden wurden ins Verhältnis zu denen der internen Kontrolle gesetzt und als Ratio in Prozent dargestellt.

6.8.7 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Zur quantitativen Expressionsanalyse bestimmter Genabschnitte wurde die qPCR angewandt. Die Reaktion erfolgte mit 20ng cDNA und 150mM real-time PCR geeigneten Primern unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SybrGreen®. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA und das resultierende Fluoreszenzsignal kann gemessen werden. Der 10 μ l Reaktionsansatz beinhaltete 2 μ l 1:10 verdünnte cDNA (100ng/ μ l), 5 μ l SYBR® Green PCR Master Mix (2x), 150nM spezifische qPCR Oligonukleotide (10 μ M) und verlief über 40 Zyklen. Die Reaktion wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Anschließend wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode die relative Genexpression berechnet.

Methoden

6.9 Zellkultur

6.9.1 Differenzierung isolierter Stammzellen zu Makrophagen

Für die Analyse von BMDM (*bone marrow derived macrophages*) wurden isolierte Stammzellen (siehe 4.3.1) aus dem Knochenmark differenziert. Pro Vertiefung einer 6-Well-Platte wurden $2,5 \times 10^6$ isolierte Zellen ausgesät. Die Differenzierung erfolgte nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C mit dem Wechsel des Mediums und dem Zusatz von 20ng/ml MCSF (*macrophage colony-stimulating factor*). Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach fünf bis sieben Tagen Inkubation waren ausreichend differenzierte BMDMs für ein Experiment vorhanden. M1 Makrophagen wurden durch 24-stündige Stimulation mit final 20ng/ml IFN γ und LPS differenziert.

6.9.2 Makrophagen- Azini Ko-Inkubation

Makrophagen (BMDM) wurden mit isolierten und CCK- stimulierten Azini (siehe 4.3.4) inkubiert. Die Azinuszellen wurden erst am Inkubationstag frisch isoliert und anschließend für 6h auf die Makrophagen gegeben. Vor der Ernte wurden die Makrophagen mit PBS gespült.

6.9.3 Makrophagen Phagozytose Assay

Das Phagozytose PE-IgG Kit (Cayman) wurde für die folgenden Phagozytose Assays genutzt. Die Makrophagen wurden nach sechs Tagen Differenzierung geerntet und 10.000 Zellen pro Vertiefung einer 96 Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit 100 μ l PBS gewaschen und mit den Beads in einer Verdünnung von 1:500 für den entsprechenden Zeitraum bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ l Assay Puffer gewaschen und mit 100 μ l PBS versetzt. Die Messung erfolgte am Fluorometer bei einer Emission von 494nm und einer Extinktion von 575nm. Zur Normalisierung erfolgte die Zugabe von 90 μ l 3% Triton-x-100 und Propidiumiodid (150 μ l PI in 10ml 3% T-X-100). Nach einer Inkubation von 30min bei 37°C erfolgte die Endpunktbestimmung (Ex: 340nm, Em: 620nm).

6.10 Auswertung

Die histologische Bewertung (Histoscore) wurde auf Grundlage der Arbeit von Schmidt *et al* (1992) erstellt (91). Zur Quantifizierung der gefärbten Gewebeschnitte wurde die Quant Center 2.3 Software von 3DHISTECH verwendet. Die Berechnungen der experimentell gewonnenen Daten erfolgte unter Verwendung von Excel, GraphPad Prism

Methoden

5.0 sowie SigmaPlot 12.5. Mit diesen Programmen erfolgte auch die Erstellung der Grafiken sowie die statische Auswertung.

Dabei wurde der ungepaarte Student's t-Test (zweiseitig) bzw. Mann-Whitney Test verwendet mit einer statischen Signifikanz von $p < 0,05$.

Ergebnisse

7 Ergebnisse

Der Verlauf und der Schweregrad der Pankreatitis wird durch die Antwort des Immunsystems beeinflusst. Dieses erkennt mit Hilfe von Mustererkennungsrezeptoren PRR (*pattern recognition receptors*) durch Gewebeschädigungen freigesetzte DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). Zu den PRRs gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR), welche je nach Ligandenbindung verschiedene Signalwege aktivieren. Ein wichtiger Regulator der TLR- Signalwege ist IRAK-M, welches die Signalweiterleitung inhibieren kann. Studien zeigten, dass IRAK-M in verschiedenen Gewebetypen (Tab. 2) exprimiert und durch Aktivierung von Toll- like Rezeptoren (Tab. 3) verstärkt exprimiert wird. Bisher konnte nicht gezeigt werden, ob und welche Rolle IRAK-M bei einer Pankreatitis einnimmt.

7.1.1 IRAK-M Expression in Pankreas und isolierten Azinuszellen

Zur Untersuchung des Einflusses von IRAK-M während der Pankreatitis wurden IRAK-M^{-/-} Tiere mit C57BL/6 Hintergrund verwendet. Diese verfügen über einen globalen Knockout, welcher durch Deletion der Exons 9 bis 11 generiert wurde. Zur Verifizierung des Knockouts und Überprüfung der Expression im Pankreas wurde RNA aus dem Gewebe isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und durch Polymerasekettenreaktion (PCR) analysiert. Oligonukleotide der Exons 10 und 11 des IRAK-M- Gens wurden zur Expressionsüberprüfung generiert.

Ergebnisse

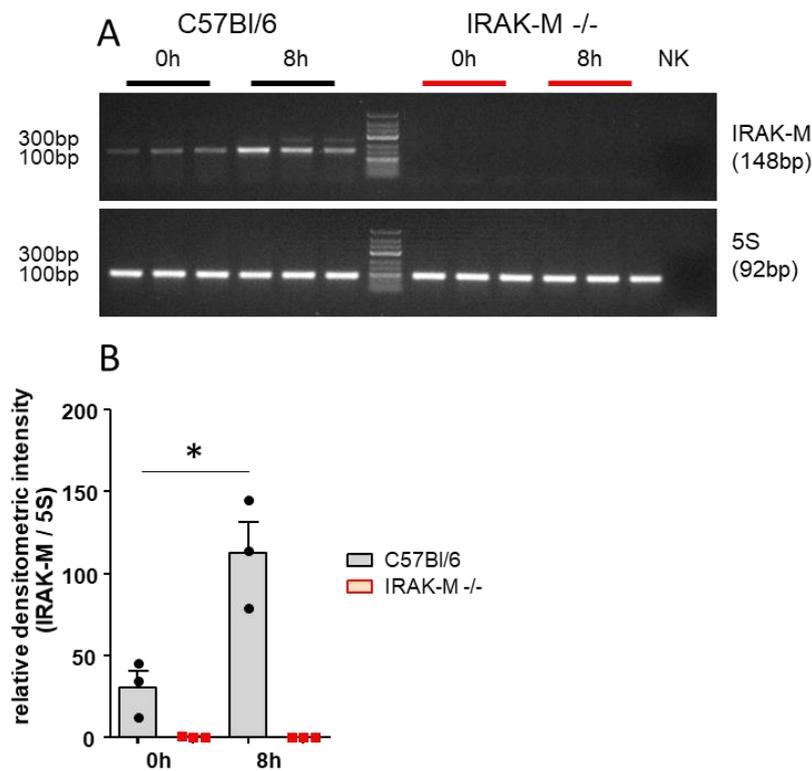


Abbildung 9: Amplifikation von IRAK-M und 5S aus Pankreashomogenat

Expression von IRAK-M und 5S- Genabschnitten, welche mittels Agarose- Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Die 5S- Amplifikation diente als interne Kontrolle zur Qualitäts- und Quantitätssicherung der PCR. Eine Leerprobe (NK) wurde zur Reinheitsverifizierung mitgeführt. **(A)** Darstellung der Amplifikation von IRAK-M und 5S. **(B)** Densitometrische Auswertung drei unabhängiger Experimente. Signifikanter Anstieg der IRAK-M Expression nach 8h Pankreatitis in den C57BL/6 Tieren (t-Test, $p=0,0187$, $n=3$).

Die RT-PCR zeigte keine IRAK-M Expression im Pankreashomogenat der IRAK-M^{-/-} Tiere (Abb. 9A). Zum Vergleich konnte in den C57BL/6 Tieren eine deutliche Transkriptionsrate nachgewiesen werden, welche sich 8h nach Induktion der Pankreatitis etwa verdreifachte (Abb. 9B). Im Verlauf einer Pankreatitis befinden sich im Gesamthomogenat des Organs neben exokrinen und endokrinen Zellen auch Zellen des Immunsystems. Es ist bekannt, dass IRAK-M in Immunzellen exprimiert wird (Tab. 2). Zur Verifizierung der Transkription von IRAK-M in Azinuszellen wurden Azini von C57BL/6 Mäusen isoliert und hinsichtlich ihrer IRAK-M Expression untersucht. Zur Vergleichbarkeit mit einer Pankreatitis wurde mittels 30-minütiger Cholecystokinin (CCK) Stimulation eine Sekretionsblockade *in vitro* induziert. CCK ist homolog zu Caerulein und führt in supraphysiologischer Konzentration zur Sekretionsblockade. Anschließend wurde die cDNA der isolierten Azini mittels PCR analysiert.

Ergebnisse

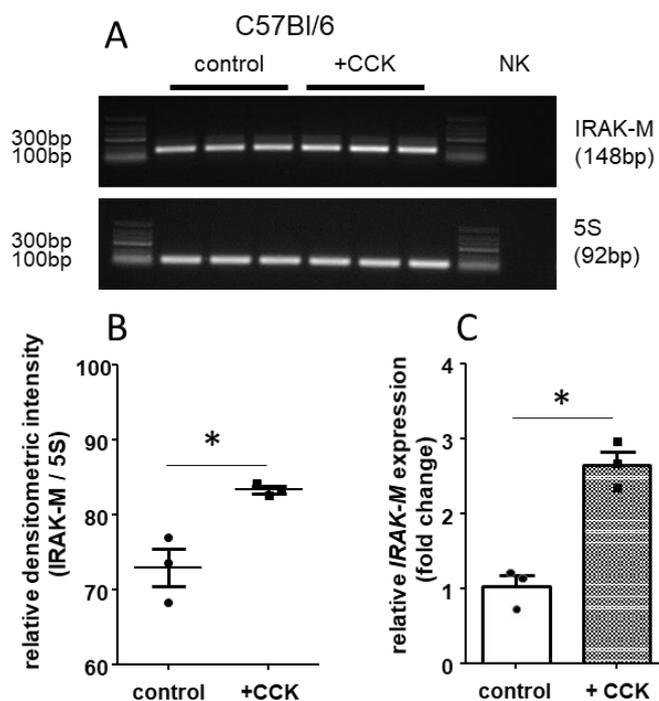


Abbildung 10: Amplifikation von IRAK-M aus isolierten Azini von C57BL/6 Tieren

cDNA von isolierten Azinuszellen aus Wild typ Tieren wurde in Hinblick auf die IRAK-M Expression nach CCK Stimulation untersucht. **(A)** Darstellung der Genamplifikation nach Agarose-Gelelektrophorese. **(B)** Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten aus A. Die CCK Stimulation führte zum signifikanten Anstieg der IRAK-M Expression in den Azini von C57BL/6 (t-Test, $p=0,0152$, $n=3$). **(C)** Die relative Expression von IRAK-M zeigte auch bei der qPCR einen signifikanten Anstieg nach Behandlung mit CCK (t-Test, $p=0,0022$, $n=3$).

Die Stimulation der Azini mit CCK verstärkte die IRAK-M- Transkription (Abb. 10A). Dies wurde mittels Densitometrie der Gelelektrophorese sowie qPCR verifiziert (Abb. 10B, C). Da IRAK-M als negativer Regulator im TLR Signalweg fungiert sollte im Anschluss die Genexpression verschiedener Toll-like Rezeptoren auf bzw. in isolierten Azini untersucht werden.

7.1.2 Genexpressionsanalyse der Toll-like Rezeptoren isolierter Azini

Die Expression von IRAK-M wird reguliert durch Aktivierung verschiedener Toll-like Rezeptoren (TLRs) (Tab. 3). Dabei handelt es sich um die TLR 2, 4, 5, 7 und 9. Eine Aktivierung dieser hat einen Anstieg der IRAK-M Genexpression zur Folge.

Im Anschluss wurden die murinen Toll-like Rezeptoren 1-9 auf ihre Genexpression in Azinuszellen von C57BL/6 Tieren untersucht.

Ergebnisse

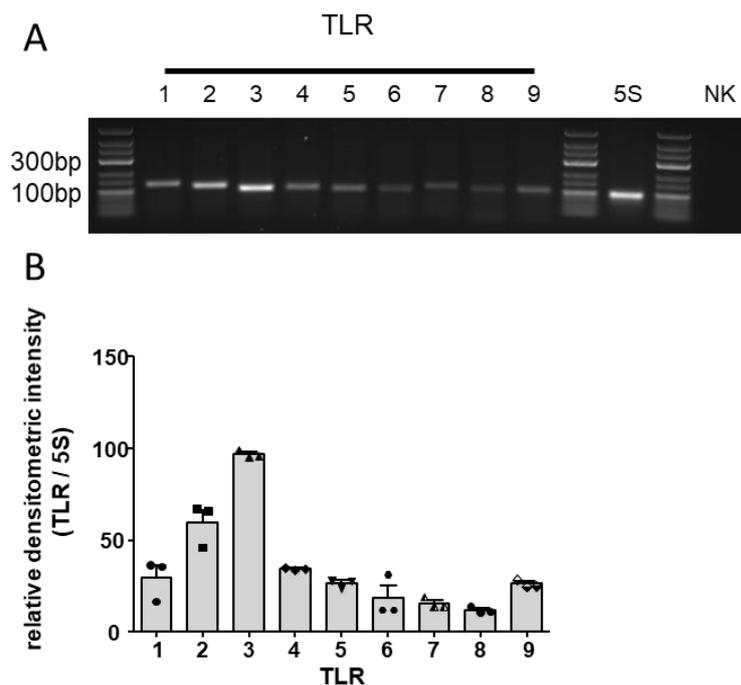


Abbildung 11: TLR- Genexpressionsanalyse isolierter C57BL/6- Azinuszellen

(A) Darstellung der mittels Agarose- Gelelektrophorese aufgetrennten TLR- Amplifikate. 5S wurde als interne Kontrolle genutzt. (B) Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten.

Die PCR Analysen zeigten eine deutliche Expression der Toll-like Rezeptoren 2 und 3, aber auch TLR4, TLR1 und TLR9 zeigten ein Signal im Agarosegel (Abb. 11A). Die densitometrische Auswertung drei voneinander unabhängiger Experimente bestätigte die Annahme (Abb. 11B). Die Signalkaskade des TLR3 verläuft jedoch nicht über den MyD88/IRAK- Weg, wodurch IRAK-M nicht involviert ist. TLR2 ist einer der Rezeptoren, die in der Studie von Guo und Cui 2019 auch bei Azinuszellen von Ratten nachgewiesen wurde und bei welchen nach Ligandenbindung die IRAK-M Expression hochreguliert wird. Neben TLR2 sind auch TLR4 und 9 als Regulatoren von IRAK-M beschrieben. Die quantitative Genanalyse der TLRs in isolierten Azini zeigte eine ähnliche Expression.

Ergebnisse

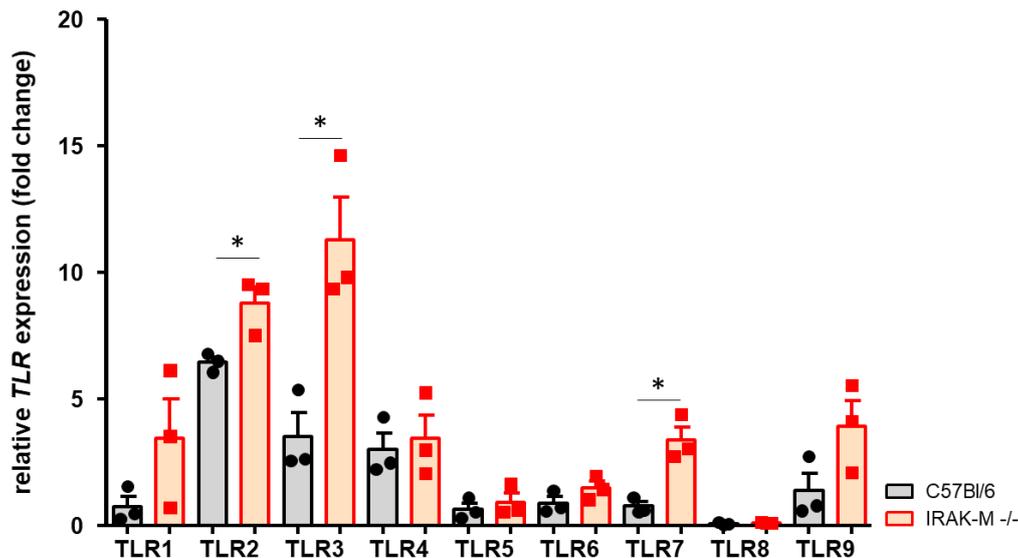


Abbildung 12: Relative Genexpression der TLRs 1-9 im Vergleich zwischen IRAK-M^{-/-} und Wildtyp Azinuszellen

Die relative Expression der TLR zeigte einen Expressionsunterschied bei TLR 2,3 und 7. Bei IRAK-M defizienten Azini konnte eine signifikant erhöhte Expression beobachtet werden (t-Test, (TLR2) $p=0,0251$; (TLR3) $0,0159$; (TLR7) $0,0085$, $n=3$).

Die relative Expression von TLR 2, 3 und 7 war in den Azini der IRAK-M defizienten Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu C57BL/6 (Abb. 12). TLR1 und 9 zeigten eine tendenziell erhöhte relative Genexpression in den Azini der IRAK-M^{-/-} Tiere, erreichten jedoch kein Signifikanzniveau.

IRAK-M wird in Pankreasgewebe sowie isolierten Azini von C57BL/6 Mäusen exprimiert. In den defizienten Mäusen konnte der Knockout im pankreatischen Gewebe verifiziert werden. Die Stimulation von Azinuszellen mit 0,001mM CCK führte zudem zu einer Erhöhung der relativen IRAK-M Expression in Azini. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Toll-like Rezeptoren, insbesondere 1, 2, 3, 4 und 9 sowie TLR7, auf Azinuszellen exprimiert werden. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss der Verlust von IRAK-M auf die Proteaseaktivität hat.

7.1.3 Proteaseaktivierung in isolierten Azini

Die frühzeitige intrazelluläre Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin hat zur Folge, dass weitere Proteasen wie z.B. Chymotrypsin aktiviert werden. Diese Aktivierung von Trypsinogen erfolgt durch das lysosomale Enzym Cathepsin B.

Durch die hohe Konzentration von CCK (0,001mM) kann eine Sekretionsblockade ausgelöst werden, welche in einem langanhaltenden cytosolischen Ca^{2+} Signal resultiert und zu einer Ko-Lokalisation von Trypsinogen und Cathepsin B führt.

Ergebnisse

Um ausschließen zu können, dass die genetische Deletion von IRAK-M einen Einfluss auf die intrazelluläre Proteaseaktivierung und den damit verbundenen Zelltod hat, wurden zunächst die intrazellulären Aktivitäten von Trypsin, Cathepsin B sowie Chymotrypsin in isolierten lebenden Azini von C57BL/6 und IRAK-M^{-/-} untersucht.

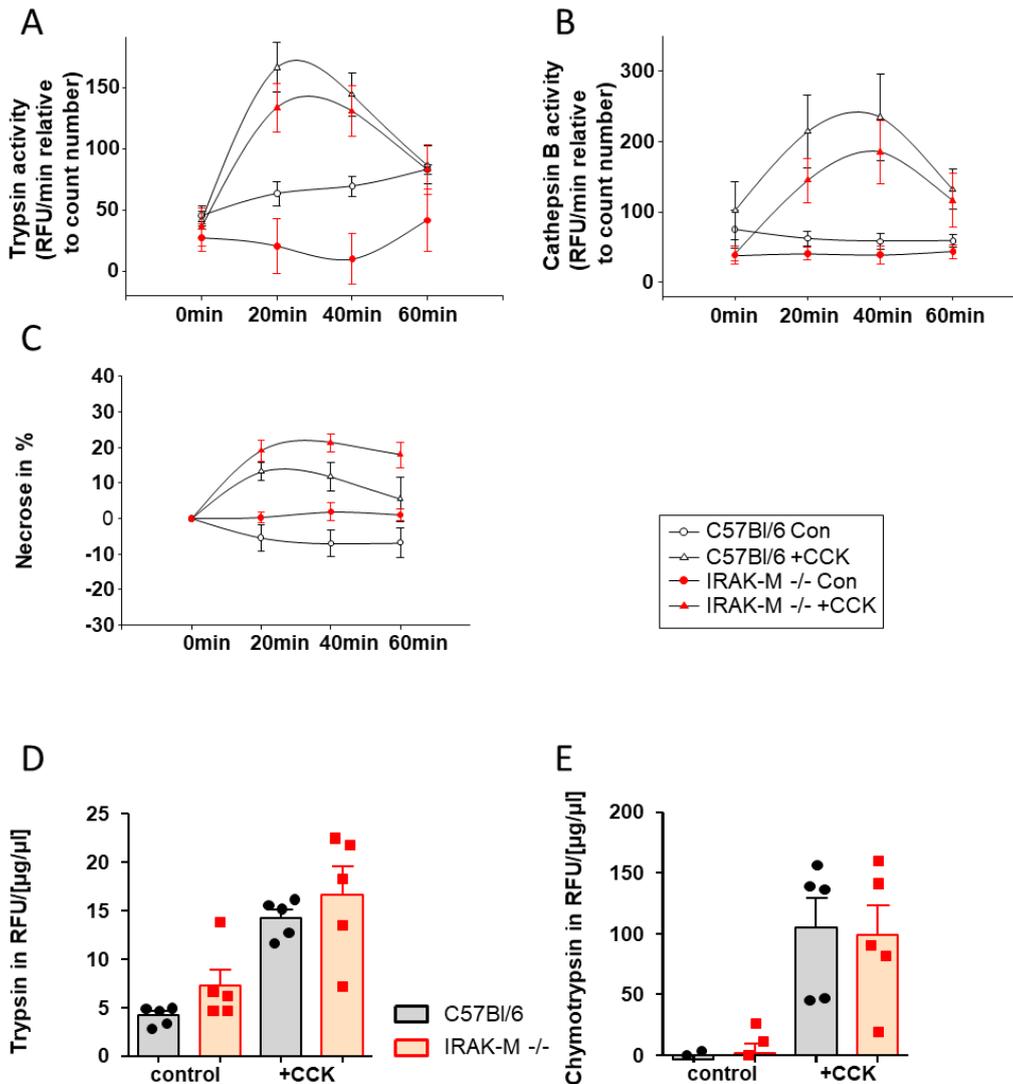


Abbildung 13: Untersuchung der Enzym Aktivierung in isolierten Azinuszellen

Enzymatische Aktivitätsmessung im zeitlichen Verlauf in lebenden, isolierten Azini. **(A)** Die relative Trypsin Aktivität sowie **(B)** die relative Cathepsin B Aktivität zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Modellen. Beide Modelle zeigten eine vergleichbare Aktivierung über die Zeit, welche durch supramaximale Stimulation mit CCK erfolgte (n=5). **(C)** Messung der Nekrose rate über die Zeit. Bestimmung der Gesamtenzym Aktivität in homogenisierten Azini. **(D)** Die Enzymaktivität von Trypsin sowie **(E)** Chymotrypsin stieg in beiden Modellen nach 30min CCK Stimulation an (n>5). Zwischen KO und WT konnte jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Azini von insgesamt fünf Tieren wurden isoliert, mit 0,001mM CCK stimuliert und die Enzymaktivität wurde als Kinetik über 60min in den lebenden Zellen gemessen.

Ergebnisse

Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität der Proteasen bzw. Nekrose beobachtet werden (Abb. 13A, B, C). Sowohl Azini der IRAK-M^{-/-} als auch der WT- Tiere reagierten auf die CCK Stimulation mit einem Anstieg der Aktivität nach ca. 20min bis 40min für Trypsin als auch Cathepsin B. Zur Verifizierung wurde anschließend die Enzymaktivität in den Azinuszellhomogenaten gemessen. Dafür wurden die Zellen 30min mit 0,001mM CCK stimuliert, anschließend lysiert und die Enzymaktivität im Zelllysate bestimmt. Die Messungen (Abb. 13D, E) zeigten, wie auch die Kinetik, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die intrazelluläre Proteaseaktivierung in Azini durch den Verlust von IRAK-M beeinflusst wird. Im Anschluss erfolgten Experimente im Mausmodell der akuten Pankreatitis, um den Einfluss von IRAK-M *in vivo* im Krankheitsmodell zu untersuchen.

7.2 Untersuchung der Caerulein induzierten experimentellen Pankreatitis

IRAK-M defizienten Mäusen sowie C57BL/6 Mäusen wurden stündlich Caerulein Injektionen (50µg/kg/Körpergewicht) i.p. verabreicht, bis zu einem Maximum von 8 Injektionen. Für die Untersuchung der Pankreatitis in Tiermodellen wurden die Zeitpunkte 0h (Kontrolle), 1h, 8h und 24h nach der ersten Injektion gewählt. Die entnommenen Organe und Seren wurden hinsichtlich des Schweregrads der Pankreatitis sowie Immunantwort untersucht.

7.2.1 Bestimmung des Schweregrads der Pankreatitis

Im Mausmodell wird die Serum- Lipase sowie die Serum- Amylase Aktivität als Schweregradmarker der Pankreatitis herangezogen. Dafür wurden verdünnte Seren mit Substratlösung versetzt und die Spaltung des Substrats als Kinetik kolorimetrisch über 30 min bei 37°C gemessen.

Ein weiterer Marker für den Schweregrad ist die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) im Lungengewebe. Die MPO stellt einen Marker für die Transmigration von Immunzellen in das Organ dar. Vor allem neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimieren das Enzym. Somit gibt die MPO- Aktivität in der Lunge einen Hinweis auf die Transmigration von Neutrophilen und Monozyten in das Organ und die systemische Immunantwort. Zusätzlich erfolgte die H&E-Färbung von Pankreasgewebe zu den jeweiligen Zeitpunkten im Verlauf der Pankreatitis.

Durch die H&E-Färbung können morphologische Strukturunterschiede im Organ sichtbar gemacht werden.

Ergebnisse

Hämatoxylin färbt vor allem Zellkerne sowie das raue ER (endoplasmatisches Retikulum) blau, wohingegen Eosin vor allem Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte ER, Kollagen und Kreatin rot färbt. So können pathophysiologische Veränderungen wie Nekrosen und Ödeme sichtbar gemacht werden.

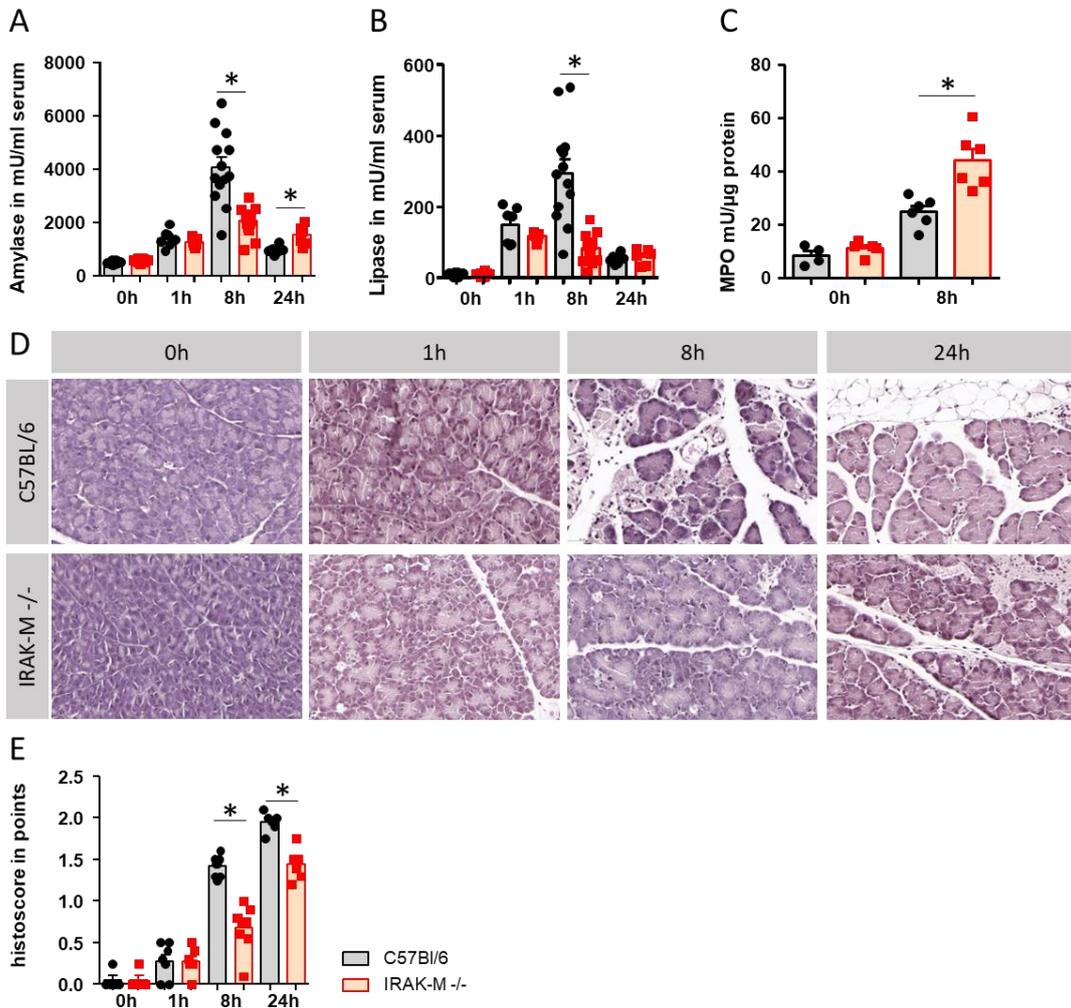


Abbildung 14: Ein verringerter pankreatischer Schaden ist bei IRAK-M^{-/-} während der akuten Pankreatitis zu beobachten

(A) Die Serumamylase Aktivität war signifikant verringert in den defizienten Tieren nach 8h, stieg nach 24h bei IRAK-M^{-/-} jedoch an (t-Test, $p=0,0005$ (8h), $p=0,0083$ (24h), $n>6$). (B) Die Serumlipase war signifikant nach 8h in den IRAK-M^{-/-} verringert. (t-Test, $p=0,004$, $n>6$). (C) Die MPO- Aktivität stieg im Verlauf der Entzündung in beiden Tiermodellen an. Nach 8h zeigten die defizienten Tiere eine signifikante Erhöhung der MPO in der Lunge. (t-Test, $p=0,0025$, $n>4$). (D, E) Das pankreatische Gewebe beider Tiermodelle zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den Zeitpunkten 0h und 1h. Nach 8h sowie 24h wurde ein geringer histologischer Schaden nach Verlust von IRAK-M beobachtet. (Maßstab: 40x Vergrößerung, t-Test, $p=0,0001$ (8h), $p=0,0001$ (24h), $n>5$)

Die Amylase sowie Lipase Aktivität im Serum stieg in beiden Mauslinien nach Induktion der Pankreatitis bis zum 8h Zeitpunkt an.

Dieser Anstieg fällt jedoch in den IRAK-M^{-/-} Tieren signifikant geringer aus (Abb. 14A, B). Die Aktivität beider Enzyme fiel nach 24h ab.

Ergebnisse

Die Aktivität der Serum Amylase lag zu diesem Zeitpunkt bei IRAK-M^{-/-} über dem der C57BL/6 Tiere (Abb. 14A). Gegenläufig verhielt sich die MPO- Aktivität im Lungengewebe. Diese war 8h nach Induktion der Pankreatitis in den Lungen der IRAK-M^{-/-} Tieren signifikant höher als in den C57BL/6 Tieren (Abb. 14C). Dieser Unterschied gibt einen Hinweis auf eine mögliche systemische Immunreaktion. Die H&E- Färbung des Pankreas zeigte keine Unterschiede in den beiden Mausstämmen zum 0h sowie 1h Zeitpunkt (Abb. 14D, E). Nach 8h zeigten die IRAK-M^{-/-} Tiere jedoch weniger nekrotische Azinuszellen und ein geringeres Ödem im Gewebe. Anders in den C57BL/6 Tieren, bei welchen das aufgelockerte Gewebe und nekrotische Bereiche deutlicher sichtbar wurden (Abb. 14D). Eine Auswertung der Histologie zeigte einen signifikant geringeren Pankreasschaden 8h sowie 24h nach Induktion der Pankreatitis in den IRAK-M^{-/-} Tieren (Abb. 14E).

Die Schweregradmarker sowie die Histologie des Pankreas wiesen lokal auf einen milderen Verlauf der Erkrankung bei IRAK-M defizienten Tieren hin. Konträr dazu zeigte die MPO in der Lunge eine höhere Aktivität, was auf eine stärkere systemische Mobilisierung von Immunzellen hindeutet.

Neben den pankreatischen Enzymen Amylase und Lipase ist die Aktivität der pankreatischen Proteasen von besonderer Bedeutung für den Krankheitsverlauf. Bei der Pankreatitis wird angenommen, dass die frühzeitige Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin das initiale Ereignis darstellt. So erfolgte im nächsten Schritt die Analyse der pankreatischen Serinprotease.

7.2.2 Proteaseaktivierung während der Pankreatitis

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Trypsin Aktivität in isolierten Azini nach CCK Stimulation zwischen den Mausstämmen beobachtet werden. Die relative Genexpression zeigte jedoch einen Anstieg von T7 Trypsinogen in den Azini defizienter Tiere über die Zeit nach CCK Stimulation (Abb. 15).

Ergebnisse

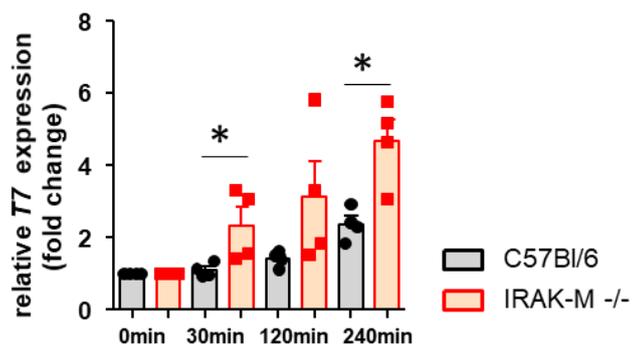


Abbildung 15: Relative T7 Genexpression in isolierten Azini

Vergleich der Genexpression von T7 Trypsinogen in isolierten Azini beider Mauslinien. Die Zellen wurden unterschiedlich lang mit CCK stimuliert. Die Zellen der IRAK-M Tiere zeigten eine signifikant erhöhte Expression nach 30min und 240min und eine tendenzielle nach 120min Stimulation (t-Test, $p=0,028$ (30min, 240min), $n=4$).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob und inwieweit die Enzym Aktivität während der Pankreatitis durch den Verlust von IRAK-M beeinflusst wird. Dafür erfolgte die Messung von Trypsin im Pankreashomogenat zum 1h und 8h Zeitpunkt der Pankreatitis.

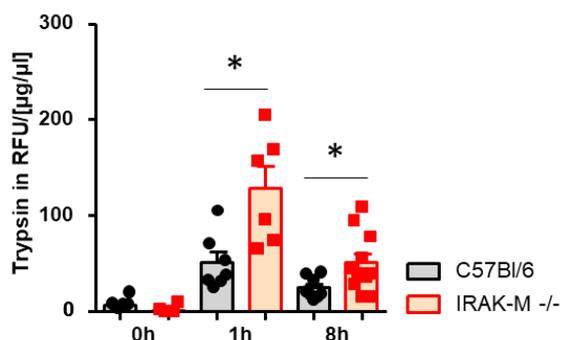


Abbildung 16: Trypsinaktivität in Pankreashomogenat zu verschiedenen Zeitpunkten der Pankreatitis

Die defizienten Tiere wiesen eine signifikant erhöhte Enzymaktivität von Trypsin im Pankreashomogenat nach 1h und 8h Caerulein induzierter Pankreatitis auf (t-Test, $p=0,0094$ (1h), $p=0,0307$ (8h), $n>6$).

Die Aktivität von Trypsin war signifikant erhöht 1h sowie 8h nach Induktion der Pankreatitis in den Pankreashomogenaten der IRAK-M^{-/-} Tiere (Abb. 16).

Die Trypsin Aktivität war bei den IRAK-M^{-/-} Tieren nach experimenteller Pankreatitis erhöht. Der lokale pankreatische Schaden dagegen geringer. Eingangs beschrieben ist die frühzeitige Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin das initiale Ereignis der Pankreatitis, jedoch nicht bestimmend für den Verlauf. Neben den lokalen

Ergebnisse

Entzündungsprozessen spielt die systemische Reaktion eine entscheidende Rolle, da geschädigtes Gewebe Infektionen begünstigt.

Gewebeständige Zellen (Makrophagen, Mastzellen) setzen Zytokine frei, die als „Hilferuf“ die Immunantwort induzieren. Aus diesem Grund erfolgte im Anschluss die Untersuchung freigesetzter Zytokine im Serum.

7.2.3 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen im Serum

Unter Verwendung des CBA Kit (BD Biosciences) wurden Zytokine im Serum mittels Fluoreszenz markierten Beads durchflusszytometrisch analysiert. Zu den Markern gehörten TNF α , IL6, IL10, IL12 und MCP1. TNF α , IL6 und IL12 gehören zu den pro-inflammatorischen Zytokinen, wohingegen IL10 anti-inflammatorisch wirkt. MCP1 ist ein Chemokin, welches die Regulation und Infiltration von Monozyten, T-Zellen sowie natürlichen Killerzellen beeinflusst. Diese Zytokine werden u.a. von Immunzellen sekretiert und können als Differenzierungsmarker fungieren. Monozyten können u.a. bei Anwesenheit von TNF α zu M1 Makrophagen polarisieren.

Ergebnisse

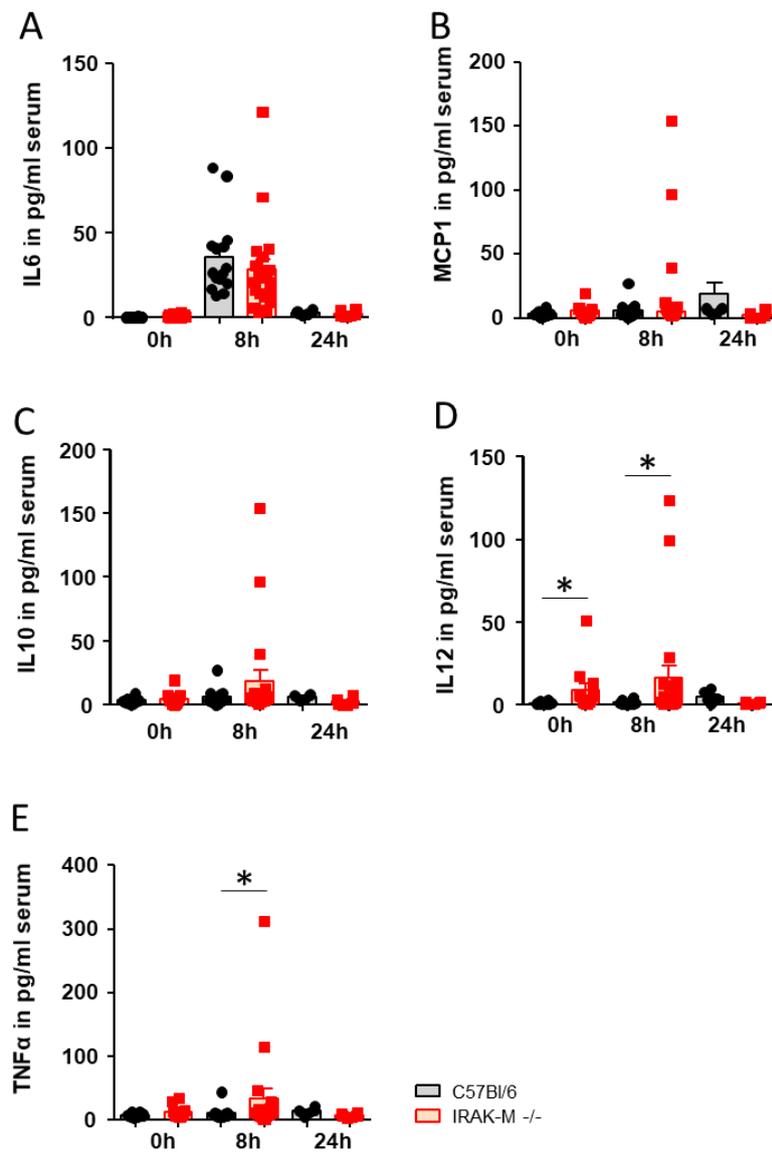


Abbildung 17: Konzentrationsbestimmung verschiedener Zytokine im Serum

Die Konzentration der Zytokine wurde mittels fluoreszierender Beads per Durchflusszytometrie unter Verwendung eines CBA-Kits (BD) gemessen. **(A)** Interleukin-6 (IL6) stieg nach 8h in beiden Mausmodellen an und fiel nach 24h wieder ab. Es konnte kein signifikanter Unterschied beider Modelle beobachtet werden. ($n > 6$). **(B)** MCP1 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiermodellen ($n > 6$). **(C)** IL10 wies eine tendenziell erhöhte Konzentration zum 8h Zeitpunkt auf ($n > 6$). **(D)** IL12 war zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht im Serum (Mann-Whitney-Test, $p = 0,0349$, $n > 6$). **(E)** Der pro-inflammatorisch wirkende Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF α) zeigte eine erhöhte Konzentration im Serum der IRAK-M^{-/-}-Tiere nach 8h (Mann-Whitney-Test, (0h) $p = 0,0187$, (8h) $p = 0,0260$, $n > 6$).

Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine im Serum spiegelt eine Momentaufnahme wider, da die Moleküle eine sehr geringe Halbwertszeit aufweisen.

Die Konzentration des Zytokins IL6 stieg im Verlauf der Entzündung in beiden Tierstämmen gleichermaßen an (Abb. 17A). Für MCP1 konnte keine signifikante

Ergebnisse

Konzentrationsänderung während der Pankreatitis beobachtet werden (Abb. 17B). IL10 zeigte eine tendenzielle Erhöhung nach 8h in den IRAK-M^{-/-} Tieren (Abb. 17C).

IL12 konnte bereits zum 0h Zeitpunkt sowie nach 8h im Serum der KO- Tiere erhöht nachgewiesen werden (Abb. 17D). Auch TNF α , ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin, war signifikant erhöht in den IRAK-M^{-/-} Tieren 8h nach Induktion der Pankreatitis (Abb. 17E).

Zytokine spielen eine große Rolle bei der Differenzierung von Immunzellen. IL6 und TGF β sind bspw. an der Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H17-Zellen beteiligt. Das Zytokin Milieu spielt eine entscheidende Rolle in Bezug auf Zellaktivierung und -differenzierung.

7.2.4 Durchflusszytometrische Analyse von T-Zellen aus der Milz

T-Zellen gehören zum erworbenen Immunsystem und werden als Antwort auf Entzündungsreaktionen ins Blut abgegeben. Zur Unterscheidung der einzelnen Subpopulationen werden spezifische Transkriptionsmarker genutzt. T_H1- Zellen verfügen über den Marker Tbet, T_H2 über Gata3 und T_H17 über Ror γ t. Die Subpopulationen vermitteln die zelluläre (T_H1) sowie humorale (T_H2) Immunantwort. T_H17-Zellen sind bei der Regulierung von Entzündungsprozessen beteiligt. Neben diesen existieren auch noch die regulatorischen T-Zellen (Treg), welche anti-inflammatorisch wirken. Im Folgenden wurden die Leukozyten der Milz 8h nach Induktion der Pankreatitis durchflusszytometrisch untersucht. Unbehandelte Tiere wurden als Kontrollen verwendet.

Ergebnisse

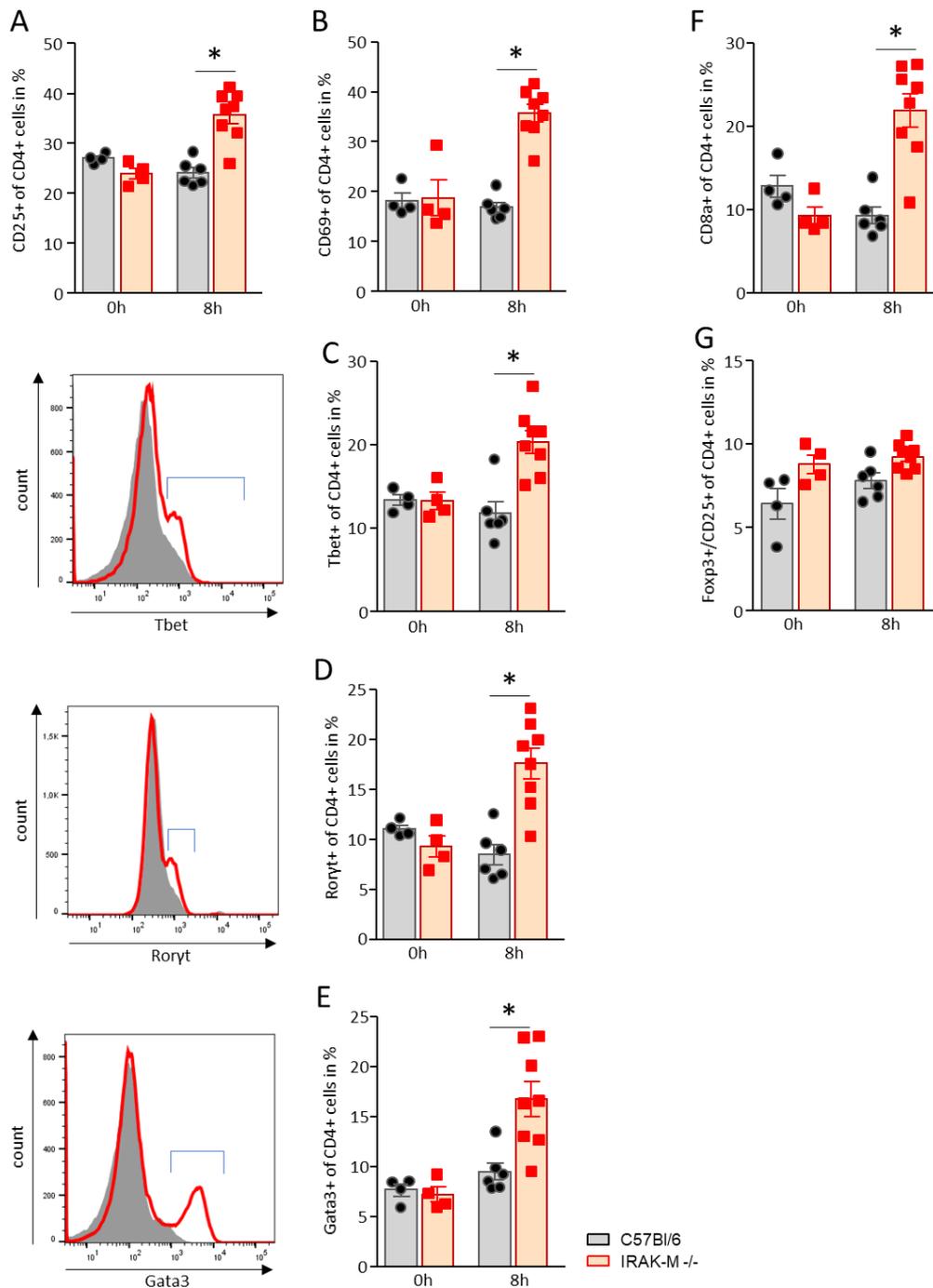


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten

Die Aktivierung von T-Helferzellen (CD4⁺-Zellen) wurde mittels Markierung von CD25 (**A**) und CD69 (**B**) nachgewiesen. In beiden Fällen waren T-Zellen der IRAK-M^{-/-} Tiere nach 8h signifikant stärker aktiviert. (t-Test, (CD25+CD4⁺) p= 0,0002, (CD69+CD4⁺) p=0,0001; n>4). (**C**) Der Transkriptionsfaktor Tbet markiert Th1-Zellen, welche nach 8h Pankreatitis in den IRAK-M defizienten Mäusen signifikant erhöht waren (t-Test, p=0,0009; n>4). (**D**) Untersuchung der Th17-Zellen unter anhand der Expression des Transkriptionsfaktors Roryt. In den IRAK-M Tieren konnten signifikant mehr Roryt⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (t-Test, p=0,0006; n>4). (**E**) Der Transkriptionsfaktor Gata3 markiert Th2-Zellen. Auch hier konnten signifikant mehr Th2-Zellen in den IRAK-M defizienten Mäusen nach 8h Pankreatitis gemessen werden (t-Test, p=0,0008; n>4). (**F**) Zudem waren die zytotoxischen T-Zellen bei den defizienten Tieren ebenfalls signifikant erhöht nach 8h (t-Test, p=0,0003; n>4). (**G**) Die regulatorischen T-Zellen dagegen zeigten keine signifikanten Veränderungen zwischen den Tiermodellen.

Ergebnisse

Zur Überprüfung der T-Zellaktivierung wurden die Oberflächenmarker CD25 und CD69 analysiert. CD25⁺ sowie CD69⁺ T- Zellen waren nach Induktion der Pankreatitis bei IRAK-M^{-/-} signifikant erhöht (Abb. 18A, B). Ebenso stieg die Anzahl T_H1-, T_H2- sowie T_H17- Zellen signifikant nach 8h Pankreatitis (Abb. 18C, D, E). Zytotoxische T-Zellen sind als CD8a⁺ definiert und waren ebenso signifikant erhöht (Abb. 18F). Es konnte jedoch kein Unterschied in der Anzahl der Treg-Zellen (FoxP3⁺/CD25⁺ von CD4⁺) zwischen den Stämmen beobachtet werden (Abb. 18G).

Somit führt die Induktion der Pankreatitis bei IRAK-M defizienten Tieren zu einer verstärkten Aktivierung der Immunantwort und Differenzierung hin zu T_H1-, T_H2- sowie T_H17- Effektorzellen. Wie Eingangs beschrieben sezernieren diese Effektorzellen Zytokine, die an Oberflächenstrukturen binden und weitere Immunzellen rekrutieren können. Rekrutierte Zellen spielen somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Ausbreitung des lokalen Gewebeschadens.

7.2.5 Untersuchung infiltrierender Zellen im Pankreasgewebe

Von besonderem Interesse sind dabei neutrophile Granulozyten sowie Monozyten bzw. Makrophagen. Diese Zellen des angeborenen Immunsystems transmigrieren bereits kurz nach Beginn der Pankreatitis ins Organ und tragen maßgeblich zur Ausprägung des lokalen Gewebeschadens bei. Zu den Markern zählen CD68, CD206 sowie Ly6g. Es wurden Immunfluoreszenz (IF)- Färbungen mit Anti-CD68 als Marker für M1 Makrophagen, Anti-CD206 für M2 Makrophagen und Anti-Ly6g als Oberflächenmarker für Neutrophile durchgeführt.

Ergebnisse

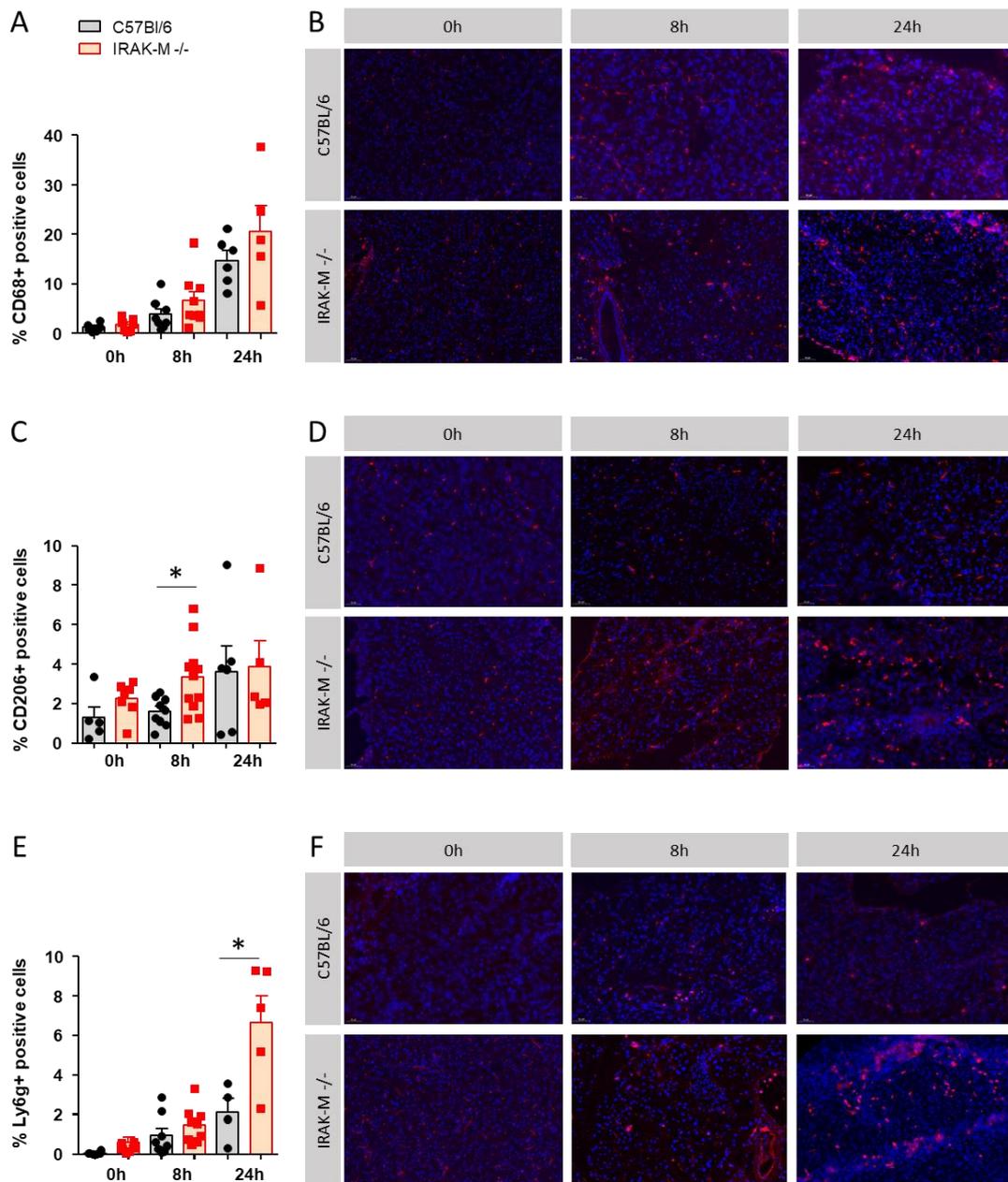


Abbildung 19: Anti-CD68, Anti-CD206 und Anti-Ly6g gefärbte Zellen im Pankreasgewebe
(A) Prozentualer Anteil der CD68+ Zellen zur Gesamtzellzahl. Es konnte ein tendenzieller Anstieg an Makrophagen im Verlauf der Pankreatitis in beiden Tiermodellen beobachtet werden, jedoch war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. (n>5). **(B)** Darstellung von CD68+ (rot) Zellen im pankreatischen Gewebe der Wildtyp- sowie Knockout- Tiere zu den Zeitpunkten 0h, 8h und 24h. (20x Vergrößerung) **(C)** Prozentualer Anteil der CD206+ Zellen zur Gesamtzellzahl. Nach 8h Pankreatitis konnten signifikant mehr CD206+ Zellen im Pankreas der IRAK-M^{-/-} beobachtet werden. Jedoch sind zum 0h Zeitpunkt bereits mehr CD206+ Zellen im Pankreas der KO- vorhanden. (t-Test, p= 0,0146, n>5). **(D)** Abbildung der CD206+ Zellen im pankreatischen Gewebe der Wildtyp- sowie Knockout- Tiere zu den Zeitpunkten 0h, 8h und 24h (20x Vergrößerung). **(E)** Prozentualer Anteil der Ly6g+ Zellen zur Gesamtzellzahl. Es konnte ein Anstieg an Ly6g+ infiltrierten Zellen im Verlauf in beiden Modellen beobachtet werden. Bereits zum 0h Zeitpunkt lagen mehr Ly6g+ Zellen im Pankreasgewebe der KO- Tiere vor (Mann Whitney Test, p= 0,0411, n>4). Nach 24h Pankreatitis konnten in den IRAK-M^{-/-} Tieren signifikant mehr Zellen Ly6g+ beobachtet werden. (t-Test, p= 0,0266, n>4). **(F)** Ly6g+ Zellen (rot) dargestellt. Darstellung von Ly6g+ Zellen im pankreatischen Gewebe der Wildtyp- sowie Knockout- Tiere zu den Zeitpunkten 0h, 8h und 24h (20x Vergrößerung).

Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Pankreatitis vermehrt Zellen des angeborenen Immunsystems ins Gewebe transmigrieren. Dabei war kein signifikanter Unterschied bei den CD68+ Makrophagen zwischen den Mausstämmen zu beobachten (Abb. 19A, B). Jedoch konnten zum 8h Zeitpunkt etwa doppelt so viele CD206+ M2- Makrophagen bei IRAK-M defizienten Tieren beobachtet werden (Abb. 19C, D). Auch bei den Neutrophilen konnte ein Unterschied zwischen den Modellen gezeigt werden. Zum 0h sowie 8h Zeitpunkt waren tendenziell, und zum 24h Zeitpunkt signifikant, mehr Ly6g+ Neutrophile im Pankreas der IRAK-M^{-/-} Tiere zu beobachten (Abb. 19E, F).

Durch die Migration der Immunzellen in das Gewebe kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen, welche wiederum die Sekretion weiterer immunologisch aktiver Botenstoffe wie Zytokine und Chemokine induzieren. Man unterscheidet dabei zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Zu den pro-inflammatorischen zählt IL6 und TNF α . TNF α wird u.a. von Makrophagen und T_H17-Zellen sezerniert. Es kann direkt an TNF α Rezeptoren auf Azini binden. Es wird angenommen, dass eine verstärkte Immunantwort mit einem höheren pankreatischen Schaden einhergeht. Jedoch zeigten die IRAK-M defizienten Tiere einen geringeren pankreatischen Schaden, obwohl eine erhöhte systemische pro-inflammatorische Antwort zu beobachten war. Im weiteren Verlauf sollte daher untersucht werden, inwieweit sich Makrophagen der beiden Tierstämme in Hinblick auf die Zytokinsekretion und -produktion sowie Phagozytose unterscheiden.

7.2.6 Untersuchung spezifischer Zytokine differenzierter BMDM

Stammzellen aus dem Knochenmark von Femur und Tibia wurden isoliert und mittels MC-SF (*macrophage colony-stimulating factor*) zu Makrophagen (*Bone marrow-derived macrophage*, BMDM) ausdifferenziert. BMDM konnten anschließend auf Transkriptionsebene in Hinblick auf das Zytokinverhalten analysiert werden. Makrophagen wurden dann mit isolierten und CCK stimulierten Azini aus C57BL/6 Tieren inkubiert und die relative Genexpression verschiedener Zytokine quantifiziert. CCK stimulierte Azini spiegeln nekrotisierende Zellen im Gewebe wider. Diese setzen DAMPs frei, welche Makrophagen über TLRs aktivieren können. Zudem wird die Phagozytose des nekrotischen Materials induziert.

Ergebnisse

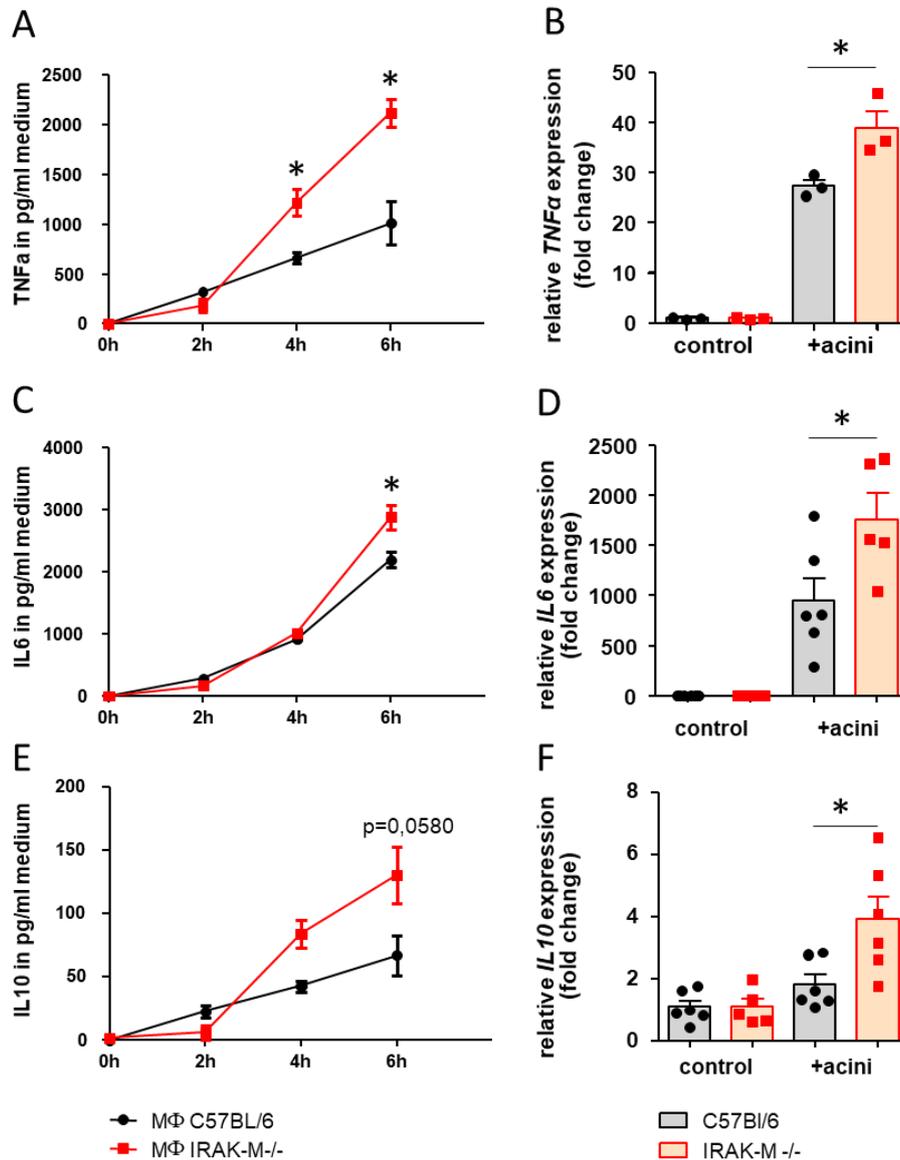


Abbildung 20: Zytokinausschüttung von BMDM im zeitlichen Verlauf sowie nach Inkubation mit Azini

BMDM von C57BL/6 sowie IRAK-M^{-/-} Tieren wurden über einen Zeitraum von 6h kultiviert. Im Verlauf erfolgte die Untersuchung der Sekretion durch Konzentrationsmessung von TNFα, IL6 sowie IL10 im Überstand der Zellen. **(A)** Signifikanter Konzentrationsanstieg von TNF α nach 4h und 6h Inkubation bei IRAK-M^{-/-} (t-Test, (4h) p= 0,0017; (6h) p=0,0054; n=4). **(B)** BMDM wurden mit isolierten Azini inkubiert um anschließend die Zytokinaktivierung auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Die relative Genexpression von TNFα stieg signifikant nach Ko-Inkubation mit Azinus-Zellen in den BMDM von IRAK-M (t-Test, p=0,0359; n=3). **(C)** Signifikanter Konzentrationsanstieg von IL6 nach 6h Inkubation bei IRAK-M^{-/-} (t-Test, p=0,0271; n=4). **(D)** Auch die relative Expression von IL6 war signifikant erhöht nach Inkubation mit Azini. (t-Test, P= 0,038; n=6). **(E)** Ebenso stieg die Konzentration von IL10 im Überstand der BMDM über die Zeit tendenziell bei IRAK-M (t-Test, P= 0,0580, n=4). **(F)** Die Genexpressionsanalyse korrelierte mit diesem Ergebnis. Auch hier stieg die relative Expression nach Ko-Inkubation bei IRAK-M^{-/-} an (t-Test, p=0,0254, n>5).

Die Konzentration von TNFα als auch IL6 stieg im zeitlichen Verlauf im Überstand der kultivierten BMDM von IRAK-M^{-/-} signifikant (Abb. 20A, C). Die Konzentration von IL10 im Medium war nahezu signifikant erhöht nach 6h Kultivierung (Abb. 20E).

Ergebnisse

Die relative Genexpression dieser Zytokine nach Inkubation mit isolierten Azini zeigte einen signifikanten Anstieg bei den IRAK-M defizienten Tieren. (Abb. 20B, D, F).

Makrophagen differenzieren in Abhängigkeit vom Zytokin Milieu zum M1 bzw. M2- Typ. Pro-inflammatorische Zytokine wie IL6, TNF α führen zum M1-Typ, welcher wiederum iNOS exprimiert. IL12 wirkt ebenfalls pro- inflammatorisch und trägt u.a. zur Differenzierung von T-Zellen zum T_H1- Subtyp bei. M2- Makrophagen exprimieren IL10 und TGF β , und wirken immunsuppressiv, da sie pro-inflammatorische Zellen hemmen.

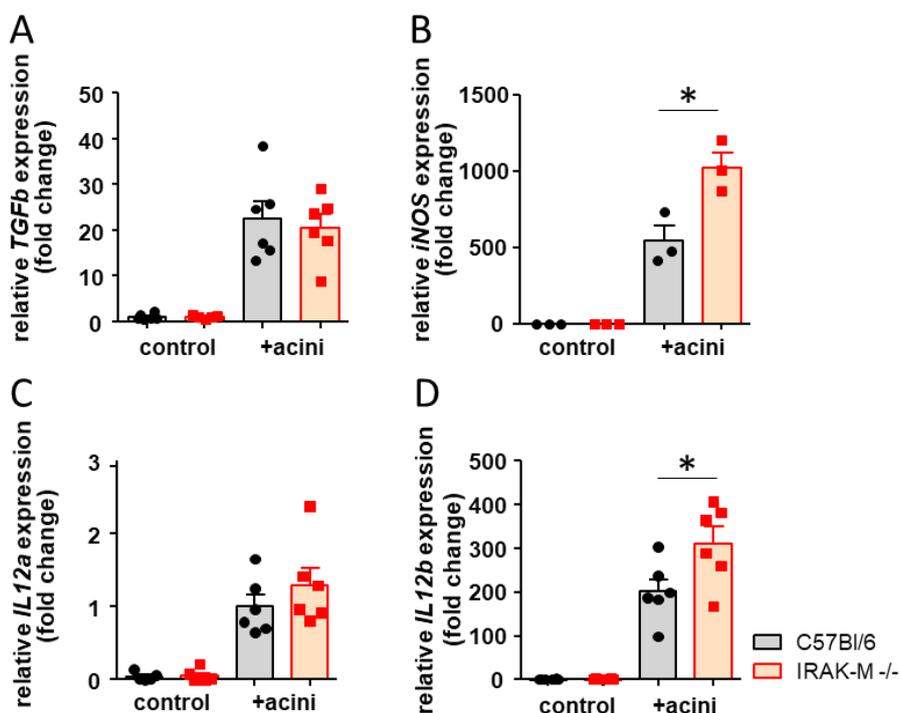


Abbildung 21: Relative Expression der BMDM nach Inkubation mit CCK stimulierten Azini
Untersuchung der relativen Genexpression verschiedener Zytokine in BMDM nach Inkubation mit Azini. **(A)** Die relative Expression von TGF- β zeigte keine Unterschiede (n>5). **(B)** Die Expression von iNOS war bei IRAK-M^{-/-} Makrophagen nach Inkubation mit Azini signifikant erhöht (t-Test, P=0,0242, n=3). **(C)** Die relative Expression von IL12a zeigte keine Unterschiede (n>5). **(D)** Signifikant erhöhte relative Expression von IL12b in den IRAK-M^{-/-} Makrophagen nach Inkubation. (t-Test, P=0,0369, n=6).

Die Inkubation von BMDM mit isolierten Azini führte zur verstärkten Genexpression von iNOS sowie IL12b bei Makrophagen der IRAK-M defizienten Tiere (Abb. 21B, D). Die Expressionen von IL12a und TGF- β zeigten keine Unterschiede (Abb. 21A, C).

Nach Inkubation mit Azinuszellen war bei den IRAK-M^{-/-} Makrophagen die relative Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine verstärkt. Dies deutet auf einen M1-Phänotyp hin, welcher für Immunabwehrmechanismen verantwortlich ist.

Ergebnisse

Im Anschluss sollte untersucht werden, wie die Phagozytose der Makrophagen durch Verlust von IRAK-M beeinflusst wird. Makrophagen von C57BL/6 sowie IRAK-M^{-/-} Tieren wurden 5, 10 bzw. 15min mit Fluoreszenz markierten Latexbeads inkubiert und deren Phagozytose anschließend fluorimetrisch analysiert.

7.2.7 Phagozytose Assay mit fluoreszenzmarkierten Beads

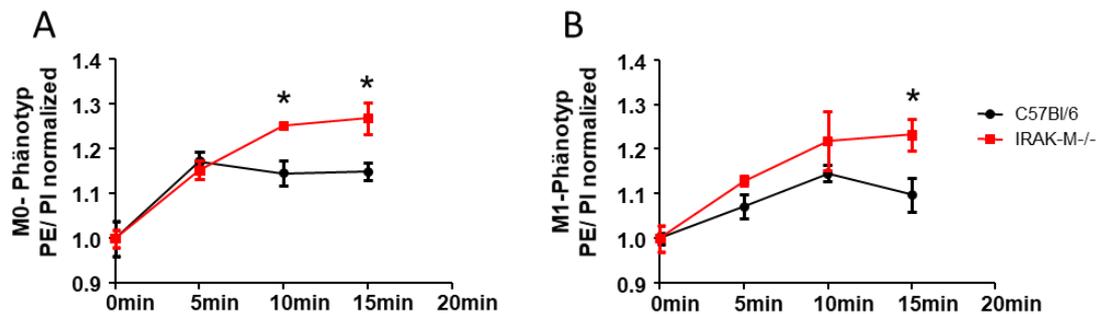


Abbildung 22: Phagozytose Assay mit BMDM

Phagozytose Assay mittels PE (Phycoerythrin)- gekoppelten Latexbeads. Je 10.000 BMDM wurden als Triplikate jeweils 5min, 10min und 15min mit PE- Latexbeads inkubiert. Anschließend erfolgte die fluorimetrische Messung, die unter Verwendung von Propidiumiodid mit dem Gesamtzellwert normiert wurde. **(A)** IRAK-M^{-/-} M0 Makrophagen zeigten eine signifikant erhöhte Phagozytoserate nach 10min und 15min Inkubation (t-Test, (10min) $p=0,0036$, (15min) $p=0,0159$, $n>4$). **(B)** Die M1 Makrophagen der IRAK-M^{-/-} Tiere zeigten eine signifikant erhöhte Phagozytoserate nach 15min Inkubation (t-Test, $p=0,0140$, $n=4$).

Die Makrophagen der defizienten Tiere zeigten im M0 als auch im M1 Phänotyp eine erhöhte Phagozytoserate nach 10min bzw. 15min Inkubation. (Abb. 22A, B). Zur Normalisierung wurde das Signal von PE (Phycoerythrin) mit dem PI (Propidiumiodid) verrechnet und die Werte auf die jeweiligen Kontrollen (0min) normiert. Somit wurde gezeigt, dass IRAK-M^{-/-} Makrophagen bei gleicher Zellzahl, sowie Zeit, eine signifikant erhöhte Phagozytoserate aufwiesen.

Ebenso sekretierten diese Makrophagen verstärkt TNF α , IL6 sowie IL10 in das Medium. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor in Immunzellen zur Aktivierung regulatorischer Gene (Zytokine) ist dabei NF- κ B. Über den TLR/MyD88/IRAK Signalweg wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert, welcher auch im Zuge der Pankreatitis von Bedeutung ist.

7.2.8 Analyse der Translokation von NF- κ B im Zellkern

Die Immunfluoreszenz- Färbung von NF- κ B(p65/RelA) im pankreatischen Gewebe sollte zeigen, ob der Verlust von IRAK-M die Translokation des Transkriptionsfaktors beeinflusst. Dafür wurden NF- κ B(p65/RelA)+ Zellkerne während der Pankreatitis in beiden Mausstämmen analysiert.

Ergebnisse

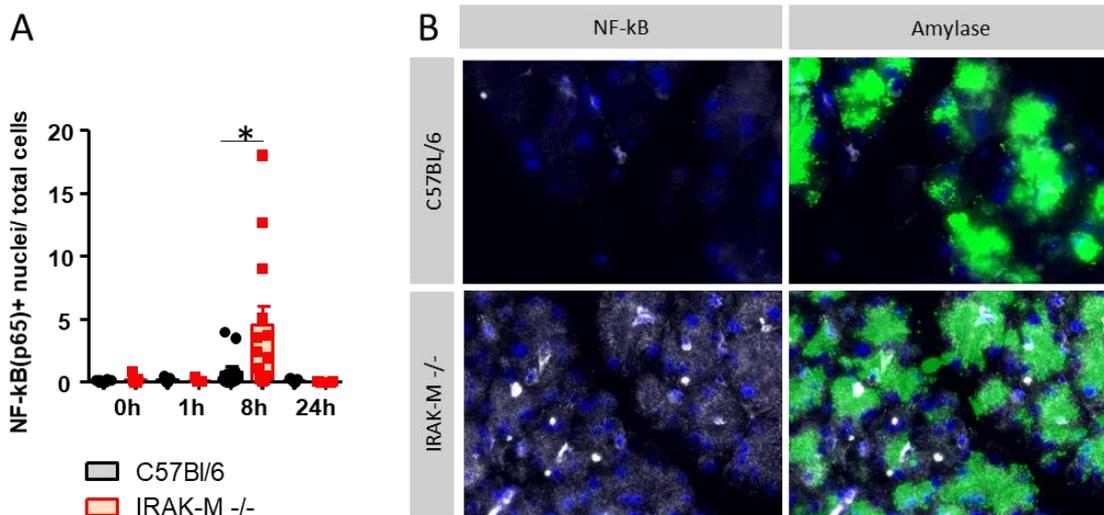


Abbildung 23: NF-κB+ Zellen im Pankreasgewebe

Pankreatisches Gewebe wurde mit Anti- NF-κB IF- gefärbt. **(A)** 8h nach Induktion der Pankreatitis konnten signifikant mehr positive Zellen im Gewebe der defizienten Tiere detektiert werden. (t-Test, $p=0,0347$, $n>5$). **(B)** Darstellung zum 8h-Zeitpunkt von NF-κB (weiß) sowie Amylase (grün) als Referenzwert (60x Vergrößerung).

Die Auswertung der Färbung konnte nachweisen, dass es im Verlauf der experimentellen Pankreatitis nach 8h zu einem signifikanten Anstieg an transloziertem NF-κB(p65/RelA) in den IRAK-M defizienten Tieren kommt (Abb. 23A).

Zusammenfassend ergab das Modell der Caerulein induzierten akuten Pankreatitis einen milderen Verlauf in den IRAK-M^{-/-} Tieren. Trotz des geringen lokalen Schadens zeigten die IRAK-M defizienten Tiere eine signifikant erhöhte systemische Inflamationsreaktion. Eine vermehrte NF-κB Aktivierung, welche durch die Deletion von IRAK-M bedingt ist, resultierte in einer signifikant erhöhten Zytokinexpression und Sekretion. Zudem war die Mobilisierung von Leukozyten verstärkt. NF-κB wird jedoch nicht nur in inflammatorischen Zellen wie BMDM über den TLR/MyD88/IRAK Signalweg gesteuert, sondern auch in Azinuszellen.

Klinisch betrachtet zeigen etwa 20% der Patienten einen schweren Krankheitsverlauf, welcher als schwere nekrotisierende Pankreatitis eingestuft wird und mit systemischen Komplikationen einhergeht. Häufig kommt es bei diesen schweren Verläufen zu einem ausgeprägten SIRS.

In einem zweiten Krankheitsmodell sollte deshalb untersucht werden, welchen Einfluss der Verlust von IRAK-M auf den Verlauf, sowie das SIRS, während einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis hat.

Ergebnisse

7.3 Experimentell induzierte schwere akute Pankreatitis durch partielle Gangligatur (PDL)

Die partielle Gangligatur in Kombination mit einmaliger Caerulein Injektion (50µg/kg/Körpergewicht) 48h nach Ligation, induziert eine schwere nekrotisierende Pankreatitis. Bei einer schweren akuten Pankreatitis kommt es zu einem Anstau des Pankreassafts und zur Nekrose der Azinuszellen. Daraus resultiert eine akute nekrotisierende Pankreatitis.

7.3.1 Bestimmung des Schweregrads

Zur Bestimmung des Schweregrads der Pankreatitis erfolgte die Messung der Amylase- und Lipase Aktivität im Serum 3d nach der partiellen Gangligatur. Weiterhin wurde die kolorimetrische Messung der MPO-Aktivität in der Lunge, sowie die histologische Untersuchung des pankreatischen Gewebes durchgeführt.

Ergebnisse

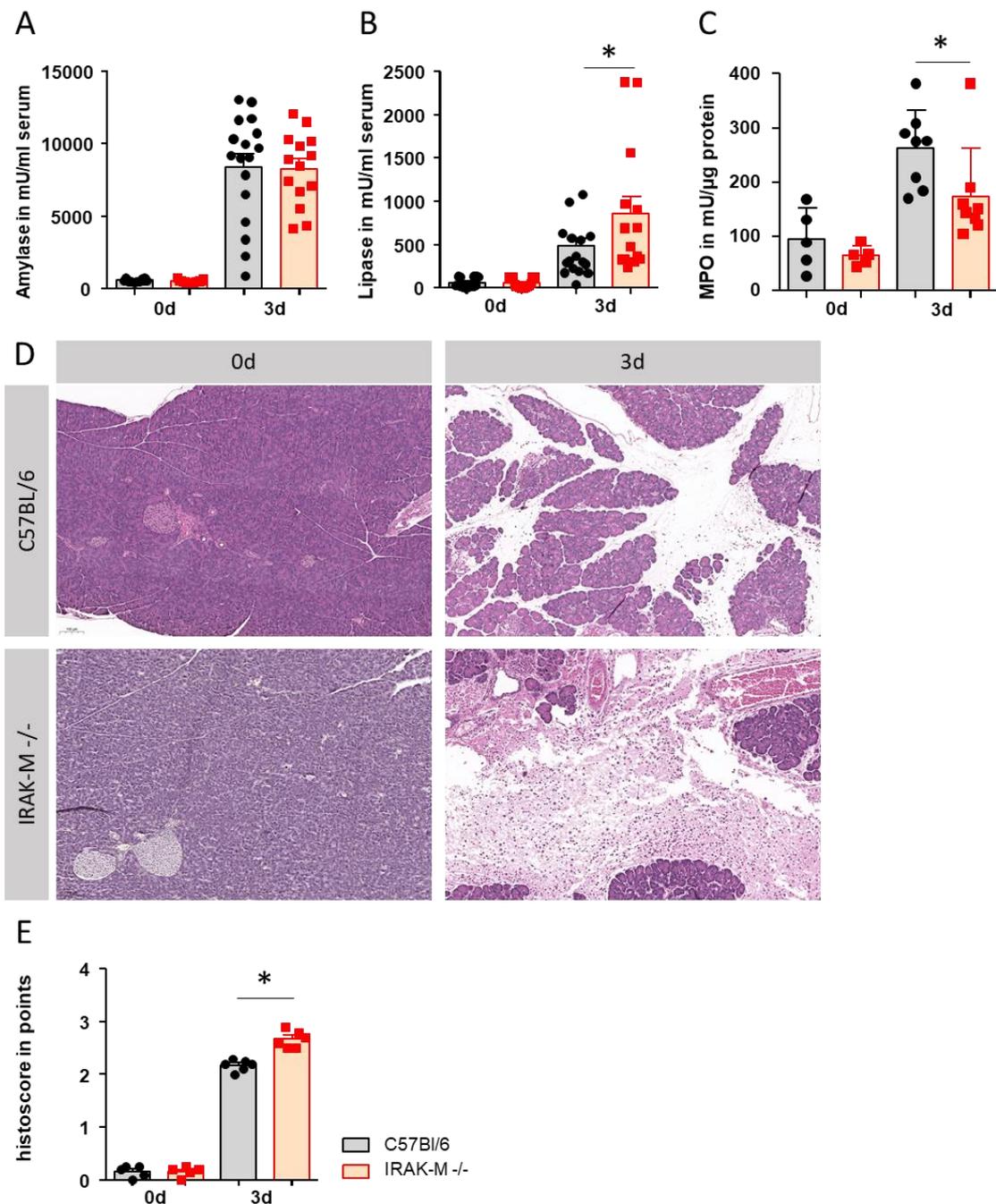


Abbildung 24: Ermittlung des Schweregrads sowie pankreatischen Schadens

(A) Es war kein Konzentrationsunterschied der Amylase im Serum während der schweren Pankreatitis erkennbar ($n > 14$). (B) Die Lipase-Konzentration stieg in den Modellen im Verlauf. Nach 3d konnte ein signifikanter Anstieg in den IRAK-M^{-/-} beobachtet werden. (t-Test, $p = 0,0406$, $n > 14$). (C) Die MPO-Aktivität stieg 3d nach Ligatur-Pankreatitis in beiden Tiermodellen an. Die IRAK-M defizienten Tiere zeigten eine signifikant geringere MPO-Aktivität in der Lunge (t-Test, $p = 0,0433$, $n > 5$). (D, E) HE gefärbte Schnitte pankreatischen Gewebes. Nach 3d wies das Gewebe beider Stämme nekrotische Areale und Ödeme auf. Die defizienten Tiere zeigten signifikant mehr Schaden (10x Vergrößerung, t-Test, $p = 0,0001$, $n > 5$).

Die Ligatur-induzierte Pankreatitis zeigte nach 3d einen Anstieg der Lipase Konzentration im Serum und einen größeren histologischen Schaden (Abb. 24B, D, E).

Ergebnisse

Die Messung der Serumamylase zeigte keine Unterschiede zwischen den Tiermodellen (Abb. 24A). Die MPO-Aktivität war signifikant verringert 3d nach Induktion der Pankreatitis in den IRAK-M^{-/-} Tieren (Abb. 24C). Im Anschluss wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine im Serum bestimmt.

7.3.2 Konzentrationsbestimmung spezifischer Zytokine im Serum

Die schwere akute Pankreatitis ist bei Patienten oftmals durch infizierte Nekrosen gekennzeichnet. Dies führt dann zu einer starken systemischen Immunantwort. Aus diesem Grund wurden die Konzentrationen ausgewählter Zytokine im Serum bestimmt.

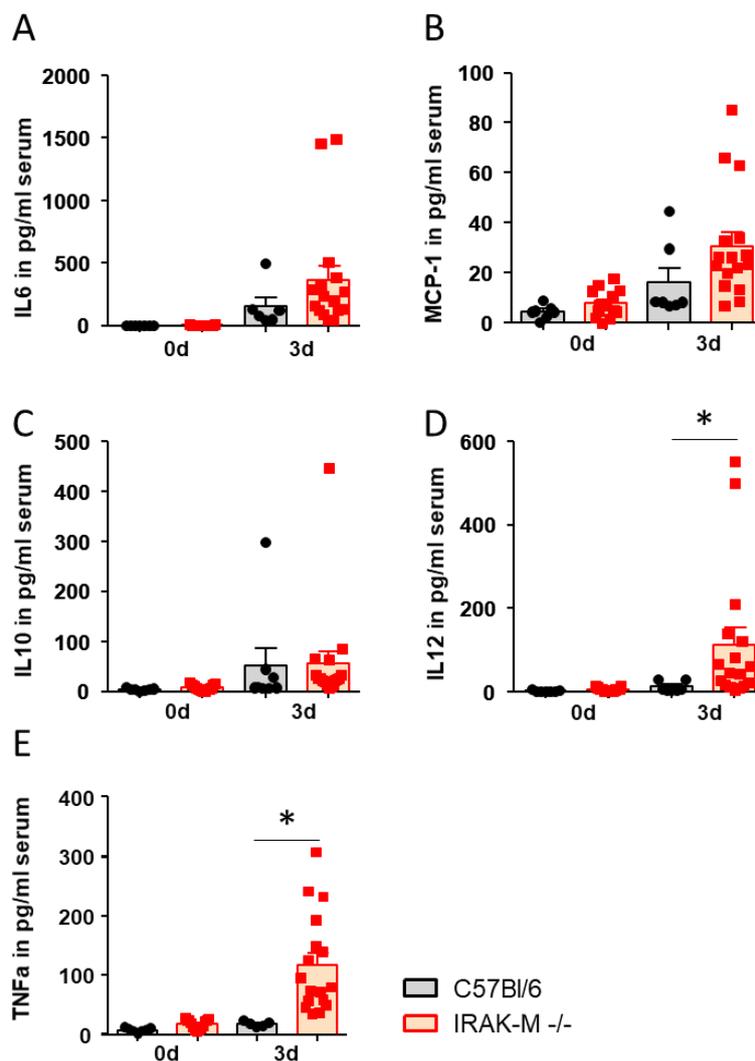


Abbildung 25: Konzentrationsbestimmung von Zytokinen im Serum mittels CBA

Die Konzentrationen wurden unter Verwendung eines CBA-Kits (BD) gemessen. **(A)** Interleukin-6 (IL6) war tendenziell in den IRAK-M^{-/-} Tieren nach 3d Pankreatitis vermehrt (n>7). **(B)** MCP1 zeigte eine tendenziell erhöhte Konzentration im Serum der IRAK-M^{-/-} Tiere nach 3d **(C)** Für IL10 konnten keine Unterschiede beobachtet werden. In beiden Modellen stieg die Konzentration an (n>6). **(D)** IL12 war signifikant erhöht im Serum nach 3d Pankreatitis bei den defizienten Mäusen (Mann-Whitney Test, p= 0,0111, n>6). **(E)** Auch TNFα zeigte einen signifikanten Konzentrationsanstieg nach 3d Pankreatitis (t-Test, p= 0,015, n>5).

Ergebnisse

Es konnte eine tendenziell erhöhte Konzentration von IL6 sowie MCP1 im Serum der defizienten Tiere gemessen werden (Abb. 25A, B). Die Konzentration von TNF α sowie IL12 waren im Serum von IRAK-M^{-/-} 3d nach Induktion der schweren akuten Pankreatitis signifikant erhöht (Abb. 25D, E). Das anti-inflammatorisch wirkende Zytokin IL10 zeigte keinen Unterschied zwischen den Tiermodellen (Abb. 25C). Zytokine sind essenzielle Botenstoffe des Immunsystems und beeinflussen maßgeblich die Immunantwort im Verlauf der Erkrankung.

7.3.3 Durchflusszytometrische Analyse nach PDL

Im Anschluss wurden T-Zellen aus der Milz isoliert und auf Aktivierungsmarker sowie T_H1 und T_H17-Marker durchflusszytometrisch analysiert.

Ergebnisse

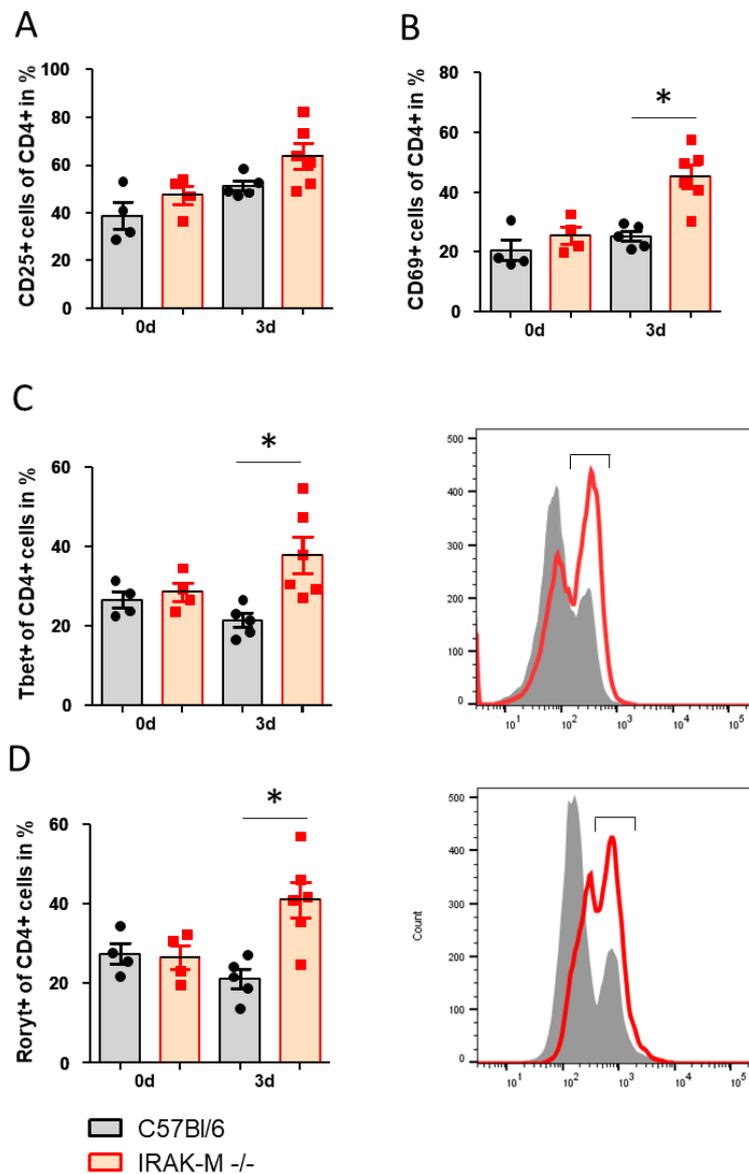


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Messung von T-Zellen aus der Milz nach 3d Gangligatur

CD4⁺ T-Helferzellen wurde mittels Markierung von CD25 (**A**) und CD69 (**B**) nachgewiesen. CD69⁺ CD4⁺ Zellen waren bei den IRAK-M^{-/-} Tiere nach 3d Gangligatur signifikant aktiviert. (t-Test, $p=0,0017$; $n>4$). (**C**) T_H1-Zellen (Tbet) waren nach 3d Gangligatur bei den IRAK-M defizienten Mäusen signifikant erhöht (t-Test, $p=0,0120$; $n>4$). (**D**) Ebenso konnten signifikant mehr aktivierte Th17-Zellen (Roryt) in den IRAK-M^{-/-} Tieren beobachtet werden (t-Test, $p=0,0046$; $n>4$).

Die mittels Gangligatur induzierte Pankreatitis führte zu einem Anstieg aktivierter T-Zellen (CD69⁺ CD4⁺) bei den IRAK-M^{-/-} Tieren (Abb. 26A, B). Zudem konnte ein signifikanter Anstieg an T_H1 sowie T_H17 Zellen bei den IRAK-M defizienten Tieren beobachtet werden (Abb. 26C, D).

Im Anschluss wurden infiltrierende Zellen im pankreatischen Gewebe durch IF-Färbung visualisiert und analysiert.

Ergebnisse

7.3.4 Färbung infiltrierender Zellen im Pankreas

Wie bereits erwähnt befinden sich Makrophagen schon vor Entzündungsprozessen in verschiedensten Geweben. Dort fungieren sie als „Wächterzellen“ und aktivieren bei Erregerkontakt u.a. die Immunantwort als Reaktion auf entzündliche Prozesse.

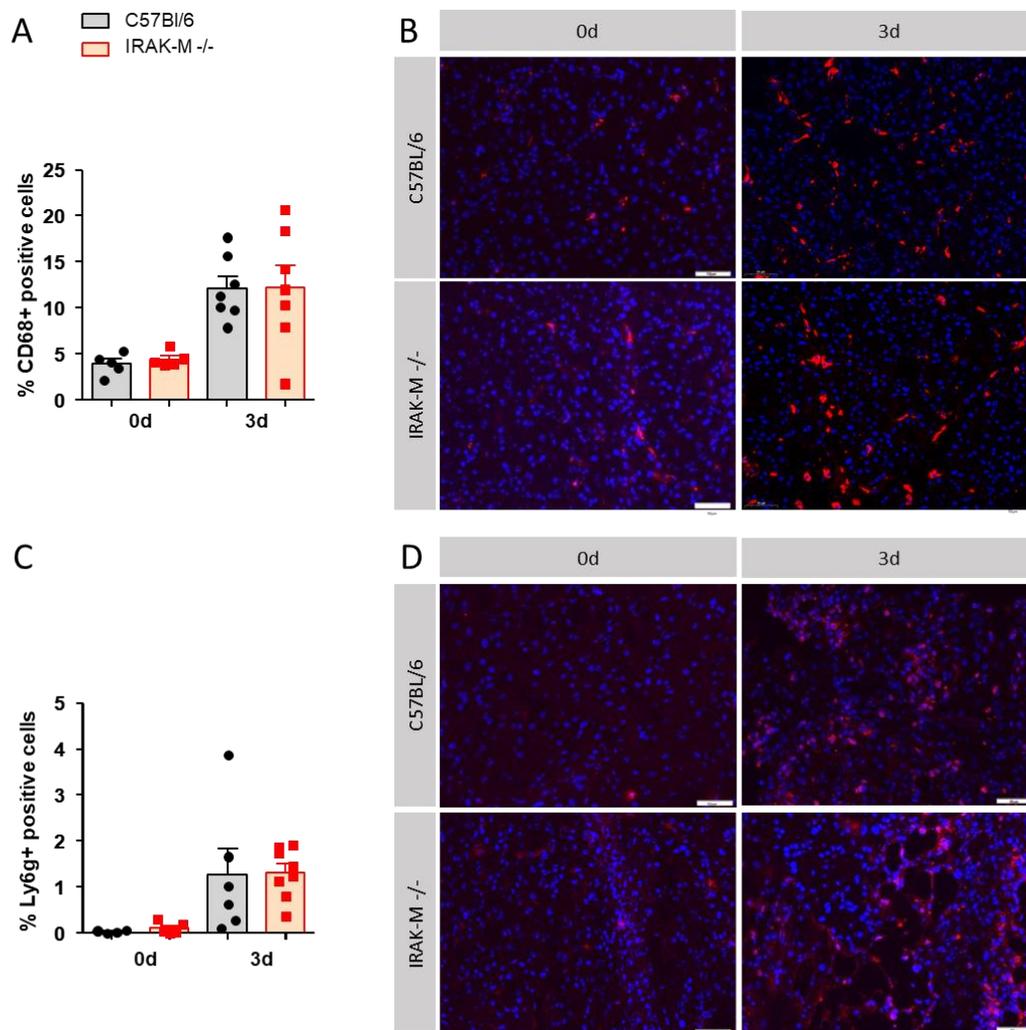


Abbildung 27: CD68+ und Ly6g+ Zellen im Pankreasgewebe nach partieller Gangligatur
(A) Es wurden in beiden Tiermodellen 3d nach Induktion mehr CD68+ Zellen im Pankreas beobachtet (n>5). (B) Darstellung CD68 +Zellen (rot) im Pankreas, sowie der Zellkerne (blau) (30x Vergrößerung). (C) 3d nach partieller Gangligatur konnten mehr Neutrophile (Ly6g) in beiden Tiermodellen beobachtet werden (n>5). (D) Darstellung Ly6g +Zellen (rot) im Pankreas, sowie der Zellkerne (blau) (30x Vergrößerung).

Es konnten keine Unterschiede der prozentualen Verteilung von infiltrierten Makrophagen sowie Neutrophilen zwischen den Modellen beobachtet werden. Bei beiden Modellen stieg die Anzahl der Makrophagen und Neutrophilen nach Induktion der Pankreatitis an (Abb. 27A, B, C, D).

Ergebnisse

Die mittels Gangligatur induzierte schwere Pankreatitis zeigte eine höhere Konzentration an Serumlipase und einen größeren histologischen pankreatischen Schaden, was auf einen höheren lokalen Schaden hindeutet.

Die MPO-Aktivität in der Lunge war vermindert, dennoch konnten vermehrt proinflammatorische Zytokine im Serum der defizienten Tiere gemessen werden. Zudem konnten vermehrt aktivierte T_H1 und T_H17 - Zellen nach 3d Pankreatitis in den IRAK-M^{-/-} Mäusen gemessen werden. Auch in diesem Modell ist eine deutlich erhöhte systemische Immunantwort nachzuweisen, jedoch auch ein erhöhter pankreatischer Schaden.

7.4 Vergleich von Caerulein- induzierter und Ligatur-induzierter Pankreatitis

Die Caerulein induzierte Pankreatitis zeigte eine geringere Lipaseaktivität im Serum der defizienten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Wohingegen die Werte nach der Gangligatur deutlich anstiegen.

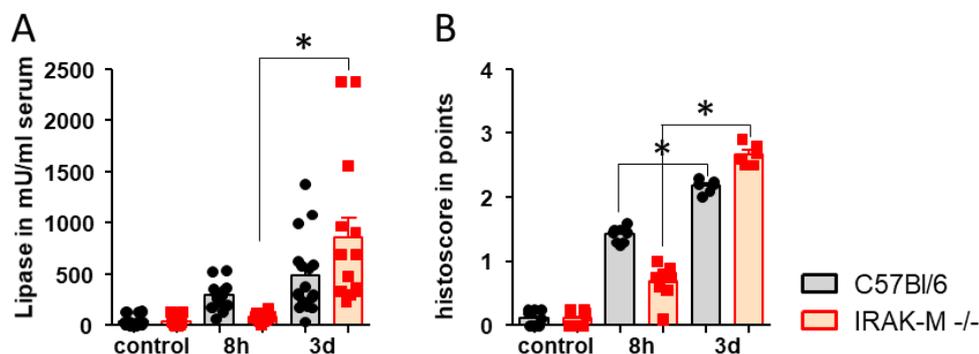


Abbildung 28: Vergleich der Serumlipase und des pankreatischen Schadens

(A) Die Lipasekonzentration im Serum stieg während der Pankreatitis nach Gangligatur in den defizienten Tieren signifikant an. (t-Test, $p=0,0006$, $n>13$). (B) Der pankreatische Schaden als Histocore dargestellt zeigte, einen signifikant größeren Schaden nach 3d Pankreatitis in beiden Tiermodellen (t-Test, $p=0,0001$, $n>6$).

Die erhobenen Werte aus beiden Modellen wurden miteinander verglichen. Für das Modell der Caerulein induzierten Pankreatitis wurden die Werte nach 8h, da dies dem Höhepunkt des Modells entspricht, mit den 3d- Werten nach partieller Gangligatur verglichen. Dies entspricht dem Höhepunkt des schweren Modells. Im Vergleich kann man erkennen, dass sich im milden Modell der Caerulein induzierten Pankreatitis die Deletion von IRAK-M positiv auswirkt. Während sich im schweren Modell die Schadensparameter erhöhen (Abb. 28A). Dazu korreliert der Histocore, welcher den pankreatischen Schaden quantifiziert.

Ergebnisse

Auch hier konnte ein größerer Schaden nach 3d Pankreatitis gezeigt werden. Ebenso war ein deutlicher Anstieg zwischen 8h und 3d Pankreatitis bei den defizienten Tieren zu sehen (Abb. 28B).

Der Vergleich der Konzentrationen verschiedener Zytokine im Serum (IL6, MCP1, IL10, IL12 und TNF α) zeigte, dass die IRAK-M defizienten Tiere ein deutlich höheres Level pro-inflammatorischer Zytokine im schweren Modell der akuten Pankreatitis aufwiesen.

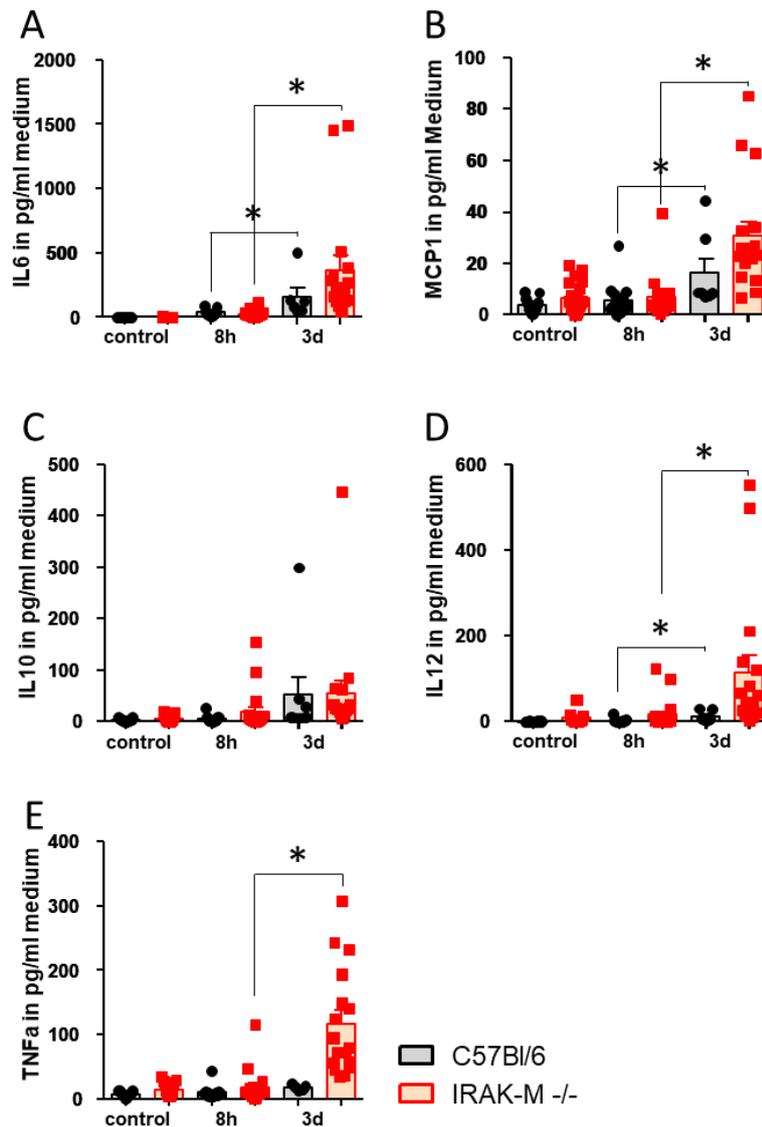


Abbildung 29: Vergleich der Zytokinkonzentration nach Caerulein und Gangligatur Pankreatitis

(A) IL6 stieg bei den Kontrolltieren, als auch bei den IRAK-M defizienten Tieren zwischen 8h und 3d signifikant an. Der Konzentrationsunterschied bei den KO-Tieren lag dabei deutlich über dem der Kontrolltiere (t-Test, $p=0,0130$ (C57BL/6); $p=0,0018$ (IRAK-M^{-/-}), $n>6$). **(B)** MCP1 stieg, genau wie IL6 in beiden Modellen an. (t-Test, $p=0,0279$ (C57BL/6), $p=0,0003$ (IRAK-M^{-/-}), $n>6$). **(C)** Für IL10 konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden, jedoch stieg auch hier die Konzentration im Serum an ($n>6$). **(D)** IL12 stieg signifikant im Serum von 8h auf 3d Pankreatitis (t-Test, $p=0,0109$ (C57BL/6), $p=0,0140$ (IRAK-M^{-/-}), $n>6$). **(E)** TNF α zeigte einen signifikanten Konzentrationsanstieg von 8h auf 3d Pankreatitis bei den defizienten Tieren (t-Test, $p=0,0001$, $n>5$)

Ergebnisse

Die Zytokine IL6, MCP1 sowie IL12 zeigten einen signifikanten Anstieg der Konzentration im Serum zwischen 8h und 3d akuter Pankreatitis bei den defizienten Tieren sowie den Kontrolltieren (Abb. 29A, B, D). Für IL10 konnte nur ein tendenzieller Anstieg beobachtet werden (Abb. 29C), wohingegen TNF α nur bei den defizienten Tieren einen signifikanten Unterschied zeigte (Abb. 29E).

Der Anstieg der Zytokine im Serum zeigt, dass die Antwort auf Entzündung nach Gangligatur bei den IRAK-M defizienten Tieren deutlich ausgeprägter ausfällt, als im Vergleich zur Caerulein induzierten Pankreatitis sowie den C57BL/6 Tieren.

Der Vergleich von Lipasekonzentration, Histoscore sowie Zytokinkonzentrationen zwischen dem Caerulein- und Ligaturmodell zeigte, dass die Entzündungsreaktion bei den IRAK-M^{-/-} Tieren nach einer Ligatur deutlich stärker ausfällt. Wohingegen die Entzündungsreaktion nach einer Caerulein-induzierten Pankreatitis milder ausfällt.

Diskussion

8 Diskussion

Die akute Pankreatitis ist gekennzeichnet durch die Autodigestion des Organs durch seine eigenen Enzyme sowie lokale und systemische Entzündungsreaktionen (92). Diese Reaktionen haben eine Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen zur Folge. Zunächst werden die Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere neutrophile Granulozyten und Makrophagen, rekrutiert und aktiviert (93). Gewebeständige Makrophagen befinden sich in allen Geweben und erkennen meist als Erste Infektionen, indem sie auf einen Gewebeschaden (DAMPs) oder Pathogene (PAMPs) reagieren. Infolgedessen sezernieren sie Chemokine und Zytokine um weitere Zellen, wie z.B. Monozyten und Neutrophile, an den Ort des Geschehens zu rekrutieren. Monozyten infiltrieren in das geschädigte Organ und differenzieren dort zu Makrophagen. Es werden bei dieser Sekretion Zytokine und pro-inflammatorische Mediatoren z.B. TNF α oder ROS freigesetzt (46), (45), (94). In Verbindung mit den Verdauungsproteasen werden so weitere lokale und systemische Schäden verursacht (11). Als Folge kann es zu vermehrten Nekrosen sowie Ödemen und der Infiltration weiterer Immunzellen kommen. Gerät dieser Mechanismus außer Kontrolle, so steigert sich die Immunantwort immer weiter und es kommt zu einer Hyperinflammation (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS). Diese kann in einem systemischen Schock und/oder Multiorganversagen enden. Um einer ausufernden Hyperinflammation entgegenzuwirken, entsteht eine Gegenreaktion das sogenannte CARS (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*). Es dient der Entzündungshemmung führt aber gleichzeitig zu einer abgeschwächten Antwort auf Krankheitserreger. Entsteht eine überschießende Hypoinflammation (CARS), so begünstigt diese Reaktion die Translokation von kommensalen Bakterien aus dem Darm in die bis zu diesem Zeitpunkt noch sterilen Nekrosen. Diese infizierten Nekrosen stellen ein erhebliches Risiko für den Patienten dar und sind mit einer deutlich erhöhten Morbidität als auch Mortalität assoziiert (95). Sie können letztendlich zu einer Sepsis führen.

Patienten mit einem starken SIRS entwickeln oft multiple Organschäden bzw. Organversagen in der frühen Phase der Erkrankung (96). Die Auswirkungen des CARS machen sich erst im Verlauf der Erkrankung, 2-3 Wochen später, bemerkbar. Es resultiert in der bakteriellen Besiedelung der Nekrosen, welche sich bis hin zu einer Sepsis ausdehnen kann (96). Lange Zeit galt die Annahme, dass aus diesem Grund SIRS und CARS als Folge nacheinander ablaufen.

Diskussion

Neuere Studien zeigen jedoch, dass Hyperinflammation und Immunsuppression während der Pankreatitis eher parallel ablaufen (53) (Abb. 30).

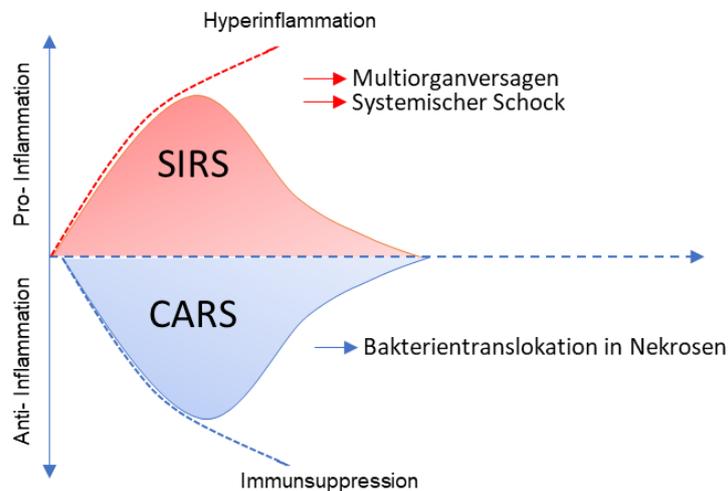


Abbildung 30: Schematische Darstellung von SIRS und CARS

Das Immunsystem reagiert mit pro-inflammatorischen Mediatoren auf die Entzündung. Dies kann aber in einer Hyperinflammation (SIRS) resultieren. Um diese Reaktion zu kompensieren werden anti-inflammatorische Komponenten aktiviert und sekretiert. Nehmen diese Überhand (Immunsuppression), kommt es zum CARS (Abbildung verändert nach Sendler *et al.*, 2020).

Während die Hyperinflammation (SIRS) weitestgehend von pankreatischen Makrophagen ausgeht, die nekrotische Areale phagozytieren, wird die kompensatorische Gegenreaktion von den Zellen des adaptiven Immunsystems (Tregs sowie T_H2 -Zellen) in den lymphatischen Organen gesteuert. Dieser parallele Verlauf von SIRS und CARS ist bereits in der Sepsis sowie schweren Traumata (u.a. bei schweren Verbrennungsverletzungen) beschrieben (97), (98), (99). Zudem konnte die Gruppe von Zhang *et al.* zeigen, dass im Blut von Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis (SAP) eine erhöhte Anzahl an suppressiven Monozyten (*monocytic Myeloid-derived suppressor cells*, mMDSCs) zu beobachten ist (100). Neben den suppressiven Monozyten waren auch pro-inflammatorische Zytokine wie IL6 und anti-inflammatorische Zytokine wie IL10 im Serum der Patienten mit SAP im Vergleich zu Patienten mit einem milden Krankheitsverlauf erhöht.

Immunzellen differenzieren je nach Zytokin Milieu, sodass dies wegführend für die Ausprägung der Entzündungsreaktion ist. Makrophagen spielen bei der Steuerung der Immunantwort im Verlauf der akuten Pankreatitis eine entscheidende Rolle (101). Sie werden hauptsächlich über ihre Toll-like Rezeptoren bzw. über Zytokin/Chemokin Rezeptoren aktiviert und polarisieren je nach Signal und Stärke in M1 bzw. M2-Richtung.

Diskussion

M1 Makrophagen wurden verstärkt, während der frühen pro-inflammatorischen akuten Pankreatitis und M2- Makrophagen im späteren Verlauf während der Regenerationsphase beobachtet (101). M1-Makrophagen können den Phänotyp ändern. So kann ein koordinierter Switch von M1 zu M2- Makrophagen erfolgen, nachdem die nekrotischen Areale beseitigt sind. Diese M2-Makrophagen leiten dann die Wundreparatur ein (102). Ein Regulator, welcher vor allem in angeborenem Immunsystem eine Rolle bei der Inhibierung der Signalweiterleitung spielt, ist IRAK-M. Dieser negative Regulator unterbricht die Signalkaskade in Toll- like Rezeptorsignalwegen als auch im IL1 Rezeptor Signalweg.

8.1 IRAK-M Signalweiterleitung in der Pankreatitis

IRAK-M ist ein Negativregulator verschiedener MyD88 abhängiger Signalwege und ist in verschiedenen Zellen exprimiert sowie an der Steuerung des NF- κ B Signalwegs beteiligt. Bisherige Studien konnten die Expression von IRAK-M in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen zeigen (Tab. 2), jedoch nicht im Pankreas und in isolierten Azini. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IRAK-M im Pankreashomogenat von C57BL/6 Mäusen exprimiert wird (Abb. 9). Zudem konnte gezeigt werden, dass IRAK-M in isolierten Azini exprimiert und die Expression nach CCK Stimulation verstärkt wird (Abb. 10). Die CCK Stimulation hat keinen direkten Einfluss auf die Expression von IRAK-M. Die supramaximale Stimulation mit CCK führt zu einer zytosolischen Ca^{2+} Überladung, wodurch auch NF- κ B aktiviert wird und so die Expression von IRAK-M induziert werden kann (103), (104).

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Mustererkennungsrezeptoren des angeboren Immunsystems, welche vor allem auf Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert werden (105). In dieser Arbeit wurden die TLR1-9 in murinen Azini analysiert. Sie sind im humanen und murinen Genom konserviert. TLR10 ist nicht funktionsfähig und TLR 11-13 im humanen Genom verloren gegangen (105).

Diskussion

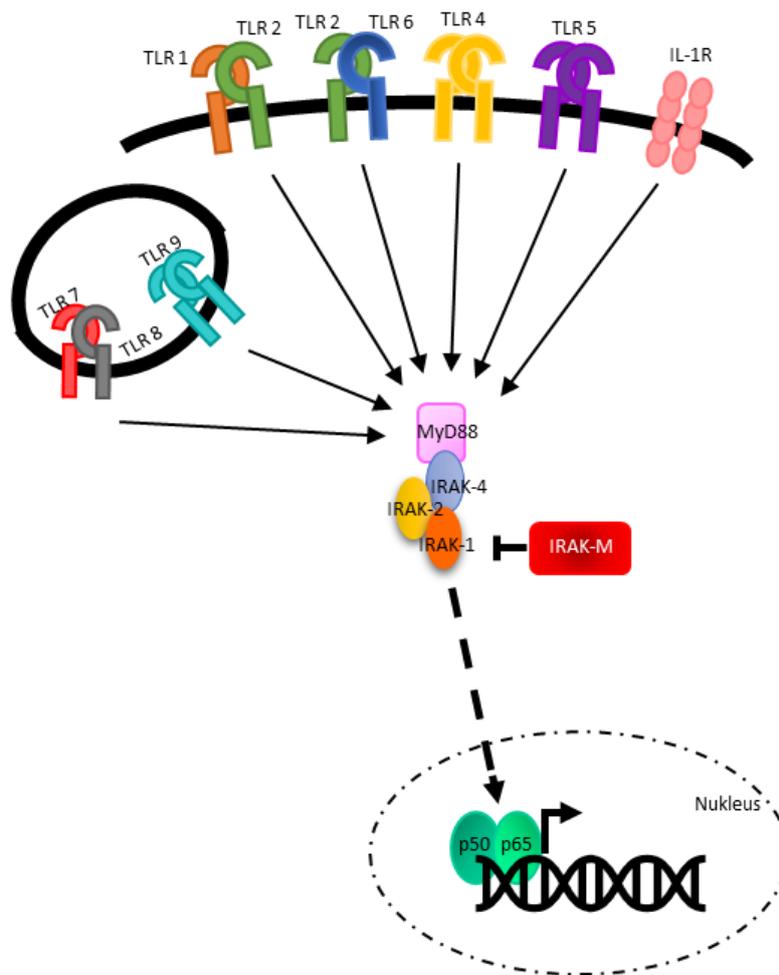


Abbildung 31: Übersichtsdarstellung der TLR die den MyD88/IRAK- Signalweg aktivieren
TLR1,2 sowie TLR4-9 aktivieren nach Ligandenbindung durch Bildung des Mydosoms NF-κB. TLR1/2, 2/6 sowie 7/9 sind heterodimere Rezeptoren. TLR7/8 und 9 sind in Endosomen zu finden.

In Bezug auf die Expression von TLR in Azinuszellen ist bisher bekannt, dass TLR4 in Azinuszellen von Ratten und Patienten mit akuter Pankreatitis verstärkt exprimiert wird (106). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass TLR4 bei der Caerulein- induzierten akuten Pankreatitis in Mäusen eine Rolle zu spielen scheint (107), (108). TLR4-defiziente Mäuse zeigten einen milderen Verlauf der systemischen Entzündung während der akuten Pankreatitis. Es ist zudem bekannt, dass in Azinuszellen von Ratten sowie den Azini-ähnlichen AR42J-Zellen, neben TLR2 und 4, auch der intrazelluläre TLR9 exprimiert wird (59). Außerdem ist gezeigt, dass Azinuszellen von C57BL/6- Mäusen eine hohe Expression von endosomalem TLR3 bei akuter Pankreatitis aufweisen und der Verlust von TLR3 in einer gesteigerten Entzündung resultiert (109). Hoque *et al* zeigten, dass TLR9- defiziente Mäuse eine verminderte IL1 β Expression, geringes Ödem sowie verminderte Inflammation im Pankreas bei einer experimentell induzierten akuten Pankreatitis aufwiesen (39).

Diskussion

TLR2, 3, 4 und 9 werden qualitativ und quantitativ in Azini der C57BL/6 Mäuse exprimiert (Abb. 11). Bei den Azini von IRAK-M^{-/-} konnte zudem gezeigt werden, dass TLR1, 2, 3, 7 und 9 im Vergleich zu den Kontrolltieren eine höhere Expressionsrate aufwiesen (Abb. 12).

Diese Ergebnisse verifizieren vorangegangene Studien und unterstützen die These, dass TLR in Aziniuszellen einen Einfluss auf den Verlauf der Pankreatitis ausüben können.

8.2 Auswirkungen des Verlusts von IRAK-M während der Caerulein induzierten Pankreatitis

Die Deletion von IRAK-M als Gegenregulator der TLR/IL1R Signalwege führt zu einer gesteigerten Pro-Inflammation. Im Zusammenhang mit der akuten Pankreatitis wird angenommen, dass eine gesteigerte Pro-Inflammation auch mit einem gesteigerten Schweregrad der Erkrankung einhergeht (53). Im Tiermodell der milden Caerulein induzierten Pankreatitis konnte in den IRAK-M defizienten Tieren jedoch das Gegenteil beobachtet werden. Sowohl histologisch als auch anhand klassischer Schweregradmarker wie z.B. die Aktivität der Serum-Amylase und -Lipase zeigten bei IRAK-M defizienten Tieren ein signifikant milderes Krankheitsbild (Abb. 14). Gleichzeitig zeigten die Tiere eine gesteigerte Pro-Inflammation (Abb. 17) und eine systemisch erhöhte Immunantwort (Abb. 18). Der beobachtete Effekt ist nicht auf eine einzelne Zellpopulation zurückzuführen, sondern auf eine Vielzahl von Zellen, die an der Ausprägung des Krankheitsbildes beteiligt sind.

8.2.1 Protease- und NF-κB Aktivierung bei IRAK-M^{-/-} Mäusen

Die intrazelluläre Protease- sowie NF-κB- Aktivierung sind frühe Prozesse im Entzündungsgeschehen der Pankreatitis (65), (103). Beide Prozesse verlaufen unabhängig voneinander, sind aber maßgeblich für die Ausbildung des Schweregrads der Entzündung verantwortlich (68). Die Aktivierung von NF-κB kann jedoch einen Einfluss auf die Proteaseaktivität ausüben: z.B. durch Hochregulation von Trypsin Inhibitoren (110). In dieser Arbeit wurde bei IRAK-M defizienten Tieren nach 1h und 8h Caerulein induzierter Pankreatitis eine erhöhte Trypsinaktivität im Pankreashomogenat gemessen (Abb. 16), trotz histologisch geringerem Schaden (Abb. 14).

Die Proteaseaktivität ist nicht zwangsläufig an die Ausbildung einer starken Immunreaktion gekoppelt. Eine Erklärung geben u.a. die Studien von Dawra *et al* und Sah *et al*.

Diskussion

Diese zeigten, dass die Deletion Pankreas-spezifischen Trypsinogens ($T7$, $T7'$) bei Mäusen, zu einer verminderten Proteaseaktivität, aber einer vergleichbaren Immunreaktion während einer experimentellen Pankreatitis führt (65), (69), (68). Die $T7$ -defizienten Tiere zeigten weniger nekrotische Areale und abgestorbene Azinuszellen im pankreatischen Gewebe (69). Im Vergleich dazu zeigten $RelA/p65(rela^{\Delta/\Delta})$ -defiziente Mäuse und $MyD88(MyD88^{-/-})$ -defiziente Mäuse verstärkt pankreatische Nekrosen und eine erhöhte systemische Immunantwort (111), (112).

Eine Studie von Neuhöfer *et al* zeigte, dass die Pankreas-spezifische Deletion von $I\kappa B\alpha(Ikba^{\Delta panc})$ in Mäusen zur Translokation von $RelA(p65)$ in den Kern führt. Die Pankreatitis bei diesen Tieren war infolgedessen gemildert im Vergleich zu den Kontrolltieren (110).

Eine Aktivierung von NF- κ B in den Azinuszellen allein reicht jedoch auch nicht aus, um eine akute Pankreatitis zu induzieren, das Gewebe zu schädigen oder Nekrosen bzw. Apoptosen hervorzurufen (113). Die Rolle von NF- κ B während der Pankreatitis scheint ein komplexes Netzwerk zu sein, welches auf weitere Stimuli angewiesen ist. Je nach Stimulus kann sich die Aktivierung positiv (110), (111) als auch negativ (113), (114) auf den Verlauf der Pankreatitis auswirken und so nachgeschaltete Signalkaskaden regulieren.

Gukovsky *et al* beobachteten zwei Phasen der NF- κ B Aktivierung während der Caerulein induzierten Pankreatitis bei Ratten. Die erste Aktivierungsphase verlief ca. 30min nach Caerulein Induktion, die zweite ca. 3 bis 6h später (65). In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass nach 8h Caerulein induzierter Pankreatitis bei den IRAK-M defizienten Tieren im Pankreasgewebe mehr NF- κ B(p65) im Zellkern transloziert war (Abb. 23). Da die Studie von Gukovsky *et al* nur einen Zeitraum bis zu 6h umfasst kann nicht verglichen werden, ob sich die zweite Phase der NF- κ B Aktivierung länger erstreckt. Nach 24h konnte kein Unterschied in der Translokation von p65 im Zellkern zwischen den Stämmen beobachtet werden. Die Aktivierung von NF- κ B induziert in jedem Fall die Expression regulatorischer Gene, je nach Stimulus.

Nicht nur das Ausmaß der Aktivierung von NF- κ B ist für den Schweregrad der Pankreatitis entscheidend, auch welche Zellen NF- κ B aktivieren ist von Bedeutung. Eine NF- κ B Aktivierung in Azinuszellen induziert nicht nur die Sekretion von Zytokinen zur Induktion und Regulation der Immunantwort, sondern induziert auch eine Anti-Stress Antwort. Diese beeinflusst das Zellüberleben und somit auch den Krankheitsverlauf (110). Andererseits kann eine erhöhte NF- κ B Antwort in Immunzellen

Diskussion

zu einer signifikanten Verstärkung der pro-inflammatorischen Immunreaktion führen und damit ein SIRS begünstigen (113).

Dies ist eine Erklärung, warum im milden Modell der akuten Pankreatitis ein geringerer pankreatischer Schaden beobachtet wurde trotz erhöhter Pro-Inflammation.

8.2.2 Auswirkungen des Verlusts von IRAK-M während der Caerulein induzierten Pankreatitis

Zunächst wurde angenommen, dass der Verlust von IRAK-M in einer überschießenden Immunantwort sowie verstärkten Entzündung resultiert, da IRAK-M physiologisch die Signalweiterung und somit die Expression pro-inflammatorischer Zytokine inhibiert (76).

Die Caerulein induzierte Pankreatitis resultierte in einer erhöhten Pro-Inflammation, jedoch konnte parallel dazu ein geringerer lokaler Pankreasschaden beobachtet werden (Abb. 14).

Andere Studien mit IRAK-M^{-/-} Mäusen zeigten u.a. eine verbesserte Erregerabwehr, höhere Überlebensraten sowie verminderte Krankheitsverläufe im Vergleich mit Kontrolltieren (115). So konnten Rothschild *et al* zeigen, dass das Immunsystem im Gastrointestinaltrakt von IRAK-M^{-/-} Tieren hocheffizient bei der Erregerabwehr arbeitet und die Tiere so vor einer Kolitis geschützt sind. Als Begründung führten Rothschild *et al* an, dass vermehrt gastrointestinal- assoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT) vorlag, eine erhöhte und effizientere Neutrophilenmigration sowie eine verstärkte T-Zellrekrutierung stattfand (115).

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Hinblick auf T-Zellaktivierung sowie Neutrophilenmigration bei IRAK-M defizienten Tieren sind vergleichend mit der Studie von Rothschild *et al*. Nach 8h Pankreatitis wurden bei den defizienten Tieren signifikant mehr aktivierte T-Zellen beobachtet (Abb. 18). Zudem konnten tendenziell mehr Neutrophile im Pankreasgewebe der defizienten Tiere zum 0h und 8h Zeitpunkt und signifikant mehr nach 24h Pankreatitis beobachtet werden (Abb. 19). Die Tiere reagierten mit einer verstärkten Immunantwort auf die Entzündung im Pankreas. Die Entzündung selbst war jedoch lokal begrenzt und verlief milder als bei den C57BL/6 Tieren.

Zudem konnte eine erhöhte Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge der defizienten Tiere nach 8h Pankreatitis gemessen werden (Abb. 14). Die MPO wird vor allem von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen synthetisiert und gibt einen Hinweis auf eine systemische Reaktion. Es reguliert zum einen Entzündungsprozesse

Diskussion

und zum anderen ist es ein Marker für die Transmigration von Immunzellen in das Organ (90).

Eine verstärkte Rekrutierung von Immunzellen in das Lungengewebe der defizienten Tiere in Kombination mit einer erhöhten Pro-Inflammation erklärt die erhöhte MPO Aktivität nach 8h Pankreatitis.

Zudem konnte bei IRAK-M^{-/-} Tieren während einer Pneumokokken-Infektion beobachtet werden, dass ein reduziertes Bakterienwachstum, verringerte Ausbreitung sowie besseres Überleben durch verstärkte, frühere Lungenentzündung vorlagen (116).

Die anschließende Sepsis verlief bei den defizienten Tieren geringer. Sie zeigten eine höhere Überlebensrate und verbesserte bakterielle Abwehr (82). Auch hier konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte Zytokinausschüttung sowie verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen in den alveolaren Raum nach Verlust von IRAK-M stattfand (82).

Ein Grund für den milderen Verlauf während der Caerulein- induzierten Pankreatitis nach Verlust von IRAK-M kann die verstärkte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine sein. In dieser Arbeit wurden die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL12 im Serum der defizienten Tiere nach 8h Pankreatitis signifikant erhöht nachgewiesen (Abb. 17). Außerdem wurde das anti-inflammatorisch wirkende Zytokin IL10 tendenziell erhöht im Serum beobachtet. Zudem zeigten die BMDM eine verstärkte Sekretion über die Zeit von TNF α , IL6 sowie IL10 in das Medium und ein erhöhtes Expressionslevel dieser Zytokine sowie iNOS und IL12b nach Ko-Inkubation mit isolierten Azini (Abb. 20, 21).

Diese Ergebnisse verifizieren vorangegangene Arbeiten in denen ebenfalls gezeigt wurde, dass BMDM von IRAK-M defizienten Mäusen signifikant mehr IL12b (p40), IL6 und TNF α im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen nach Stimulation sekretierten (76), (82), (115), (117).

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass bereits vor und während der Entzündung tendenziell mehr Makrophagen im Pankreasgewebe der defizienten Tiere vorlagen (Abb. 19). Zudem zeigten Makrophagen von IRAK-M^{-/-} eine verbesserte Phagozytose im Vergleich zu den C57BL/6 Makrophagen (Abb. 22). Es konnte gezeigt werden, dass phagozytierende Makrophagen in verschiedenen Modellen der akuten Pankreatitis eine Rolle spielen und für die Reinigung nekrotischer Areale im geschädigten Pankreasgewebe verantwortlich sind (42), (118), (45). Beide Faktoren sowie die erhöhte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine scheinen eine effektive

Diskussion

Reinigung des geschädigten Gewebes zu begünstigen. So bleibt die Entzündung lokal und der Schaden kann schnell beseitigt werden. Die Entzündung kann sich dadurch nicht selbst verstärken.

8.3 Auswirkung des Verlusts von IRAK-M bei der schweren Ligatur- induzierten akuten Pankreatitis (SAP)

Die partielle Gangligatur führt zu einer nekrotisierenden Pankreatitis und spiegelt den geringen Anteil an Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis wider (6).

Die mittels partieller Gangligatur- induzierte Pankreatitis resultierte bei den IRAK-M defizienten Mäusen in einem schwereren Verlauf im Vergleich zu den C57BL/6 Tieren.

Konträr zur Caerulein induzierten Pankreatitis zeigten die Tiere 3d nach Ligatur eine erhöhte Lipaseaktivität im Serum sowie einen stärkeren lokalen Pankreasschaden (Abb. 24). Das pro- inflammatorische Zytokin IL6 sowie das Chemokin MCP1 waren im Serum der IRAK-M^{-/-} nach 3d tendenziell, TNF α und IL12 signifikant erhöht (Abb. 25). Die durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten zeigte eine signifikant erhöhte Zahl aktivierter T-Zellen in den IRAK-M defizienten Tieren 3d nach Induktion der Pankreatitis. Zudem war die Anzahl der T_H1 und T_H17 Zellen signifikant erhöht (Abb.26). Keine Unterschiede waren bei der Makrophagen und Neutrophilen Infiltration nach 3d im Pankreasgewebe zwischen den beiden Mausstämmen zu beobachten (Abb. 27).

8.4 Vergleich der milden akuten Pankreatitis (Caeruleinmodell) und der schweren akuten Pankreatitis (Ligaturmodell)

Der Vergleich der beiden experimentellen Pankreatitis-Modelle zeigte, dass in den IRAK-M^{-/-} Tieren eine moderate Immunantwort zu einer lokal begrenzten und milderen Entzündung im Pankreas führte. Im Gegensatz dazu zeigte die Pankreatitis einen deutlich stärkeren lokalen Schaden nach partieller Gangligatur (Abb. 28). Der Organismus dieser Tiere konnte die überschießende Immunantwort nicht mehr kompensieren. Dies zeigte sich auch anhand der Zytokinlevel im Serum (Abb. 29). Der Konzentrationsanstieg der Zytokine im Serum war bei den defizienten Tieren von 8h zu 3d Pankreatitis stärker. Für TNF α konnte nur bei den IRAK-M^{-/-} Tieren ein signifikanter Konzentrationsanstieg zwischen milder und schwerer Pankreatitis beobachtet werden (Abb. 29). Die Kontrolltiere (C57BL/6) zeigten im Vergleich zu den defizienten Tieren eine stärkere Immunreaktion nach Caerulein induzierter Pankreatitis, welche jedoch nicht so deutlich anstieg nach Gangligatur (Abb. 28).

Diskussion

Eine Erklärung für den Verlauf der Entzündungsreaktion bei den IRAK-M^{-/-} Tieren gibt eventuell die sogenannte „Two-Hit-Theorie“ (119). Diese besagt, dass traumatische Gewebeschädigungen (first Hit) in lokalen Entzündungsreaktionen resultieren. Das Ausmaß der Reaktion hängt dabei stark von der Art der Verletzung ab (120). Als Folge kann ein SIRS entstehen sowie posttraumatisch im Verlauf ein CARS.

Ein „second Hit“ kann dann zu einer weiteren Aktivierung systemischer Entzündungsreaktionen führen. In der Klinik hat sich dabei IL6 als geeigneter Parameter zur Quantifizierung der Entzündung herausgestellt. Ein Zusammenhang zwischen IL6 Konzentration und der Entwicklung der Schwere eines Krankheitsverlaufs ist bekannt (121). Bei IRAK-M^{-/-} konnte ein ca. 14-facher Anstieg der IL6 Konzentration zwischen milder akuter Pankreatitis und schwerer beobachtet werden. Im Gegensatz dazu stieg bei den C57BL/6 Tieren die Konzentration nur ca. 4,5- Fach an (Abb. 29).

Der Knockout in den IRAK-M^{-/-} Tieren führt somit zu einer überschießenden Immunantwort.

Physiologisch sind Entzündungsprozesse essenziell für die Initiierung der schützenden Immunantwort. Unkontrollierte Entzündungsreaktionen können allerdings in stark geschädigtem Gewebe, Multiorganversagen sowie der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen resultieren (104). Eine kontrollierte Immunantwort dagegen begünstigt den Heilungsprozess (Abb. 32).

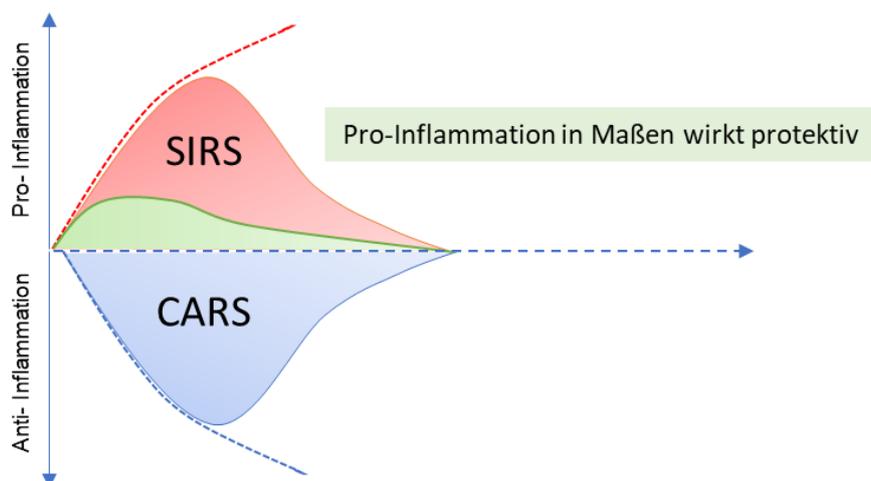


Abbildung 32: Schematische Darstellung kontrollierter und unkontrollierter Immunreaktion
Schematische Darstellung der kontrollierten Immunantwort. (Abbildung adaptiert nach Sendler *et al*, 2020)

Diskussion

Die Abbildung 32 veranschaulicht den Mechanismus bei welchem eine effektive und effiziente Pro-Inflammation zu einer kontrollierten Entzündungsreaktion sowie Immunantwort führt.

Eine geregelte Pro-Inflammation ist von Nutzen, da sie für eine schnelle Beseitigung des Zellschadens sorgt.

Entsteht jedoch eine überschießende Pro-Inflammation (SIRS), so wird die Pankreatitis vom eigentlichen pankreatischen Schaden „entkoppelt“ und eine systemische Immunreaktion baut sich auf. Diese Reaktion ist auch bei Patienten zu beobachten. Letztendlich resultiert die Letalität der Pankreatitis nicht aus dem Pankreasschaden, sondern aus den systemischen Komplikationen wie z.B. Organversagen, systemischer Schock und Sepsis (95), (96).

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die TLR/IL1R-MyD88-IRAK-NF- κ B Achse bei der Letalität der Pankreatitis eine entscheidende Rolle spielt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Pro-Inflammation nicht im Generellen als schädlich einzustufen ist, sondern essentiell für eine geregelte Wundheilung. Andererseits kann die Entzündungsreaktion bei einem zu großen Organschaden schnell in eine systemische Hyperinflammation umkippen, die sich selbst befeuernd den Schweregrad der Pankreatitis weiter steigert.

Literaturverzeichnis

9 Literaturverzeichnis

1. Longnecker, D. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2, 2021, S. 1-24.
2. Voigt, K. Endokrines System. [Buchverf.] Silbernagl S Klinke R. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart : Thieme, 2005.
3. Flay N W, Gorelick F S. Exocrine Pancreas. *Encyclopedia of Gastroenterology*. 2004, S. 769-774.
4. Slack, JMW. Developmental biology of the pancreas. *Development*. 121, 1995, Bd. 6, S. 1569-1580.
5. Witt, H. Physiologie und Embryologie des Pankreas. [Buchverf.] Zimmer K P Rodeck B. *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. Deutschland : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, S. 547-555.
6. Frossard, J L, Steer, M L und Pastor, C M. Acute pancreatitis. *Lancet*. 371, 2008, Bd. 9607, S. 143-152.
7. Williams, JA. Regulation of pancreatic acinar cell function by intracellular calcium. *Am J Physiol*. 1980, Bd. 238, 4, S. 269-79.
8. Rinderknecht, H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci*. 1986, Bd. 31, 3, S. 314-21.
9. Chiari, Hans. Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde*. 1896, Bd. 17, S. 69-96.
10. Lerch, M M, et al. Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology*. 103, 1992, Bd. 1, S. 205-13.
11. Mayerle J, Sendler M, Hegyi E, Beyer G, Lerch M M, Sahin-Tóth M. Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. *Gastroenterology*. 156, 2019, Bd. 7, S. 1951-1968.
12. Riemann, J F, et al. Gastroenterologie in Klinik und Praxis . *Das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Stuttgart, New York, Delhi, Rio : Thieme Verlagsgruppe, 2008.
13. Halangk, W, et al. Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282, 2002, Bd. 2, S. 367-74.
14. Sendler, M, et al. Cathepsin B Activity Initiates Apoptosis via Digestive Protease Activation in Pancreatic Acinar Cells and Experimental Pancreatitis. *Gastroenterology*. vol. 291, 2016, Bd. 291, 28, S. 14717-31.
15. Halangk, W, et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest*. 106, 2000, Bd. 3, S. 773-81.

Literaturverzeichnis

16. Koike, H, Steer, M L und Meldolesi, J. Pancreatic effects of ethionine: blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis. *Am J Physiol.* 242, 1982, S. 297-307.
17. Watanabe, O, et al. Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol.* 246, 1984, S. 457–467.
18. Mukherjee, R, et al. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut.* 65, 2016, S. 1333-1346.
19. Gukovskaya, A S und Gukovsky, I. Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology.* 140, 2011, Bd. 7, S. 1876-80.
20. Krüger, B, Albrecht, E und Lerch, M M. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Physiol.* 2000, Bd. 157, 1, S. 43-50.
21. Beger H G, Büchler M W, Dralle H, Lerch M M, Malfertheiner P, Mössner J, Riemann J F. *Erkrankungen des Pankreas- Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf.* Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2013.
22. Whitcomb, DC, Gorry, Mc und Preston, RA. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 14, 1996, Bd. 2, S. 141-145.
23. Witt, H, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 25, 2000, Bd. 2, S. 213-6.
24. Rosendahl, J, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 40, 2008, Bd. 1, S. 78-82.
25. Rink, L, Kruse, A und Haase, H. Das Immunsystem: Eine Übersicht. *Immunologie für Einsteiger.* Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2012.
26. Chaplin, D D. 1. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2003, Bd. 111, 2.
27. Berg, J M, Tymoczko, J L und Stryer, L. Das Immunsystem. [Hrsg.] Springer Spektrum. *Stryer Biochemie.* Berlin, Heidelberg : Stryer Biochemie, 2013, S. 993-1024.
28. Die lymphatischen Organe: Blutbildung und Konferenzzentren. [Buchverf.] A Kruse. *Immunologie für Einsteiger.* Berlin, Heidelberg : Springer Spektrum, 2015.
29. Kurosaka, K, et al. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol.* 2003, Bd. 171, 9, S. 4672-4679.
30. Chen, G Y und Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010, Bd. 10, 12, S. 826-837.

Literaturverzeichnis

31. Nicholson, S E und Murray, P J. Regulation of Macrophage Polarization by the STAT–SOCS Signaling Axis. [Buchverf.] Mantovani A. Biswas S. *Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases*. New York : Springer, 2014.
32. Bröker, B, Schütt, C und Fleischer, B. Zellen und Organe des Immunsystems. *Grundwissen Immunologie*. s.l. : Springer Spektrum, 2019.
33. Atri, C, Guerfali, F Z und Laouini, D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 19, 2018, Bd. 6, 1801.
34. Krystal-Whittemore, M, Dileepan, KN und Wood, J G. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*. 2015, Bd. 6, S. 620.
35. Liu, K und Nussenzweig, M C. Origin and development of dendritic cells. *Immunol*. 2010, Bd. 234, 1, S. 45-54.
36. Abel A M, Yang C, Thakar M S, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018, Bd. 9, 1869.
37. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M et al. B-cell activation by armed helper T cells. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York, Garland : Science, 2001.
38. Gagliani N, Huber S. Basic Aspects of T Helper Cell Differentiation. [Buchverf.] Lugli E. *T-Cell Differentiation. Methods in Molecular Biology vol 1514*. New York : Humana Press, 2017.
39. Hoque, R, et al. The Sterile Inflammatory Response in Acute Pancreatitis. *Pancreas*. 41, 2012, Bd. 3, S. 353–357.
40. Bonizzi, G und Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004, Bd. 5, 6, S. 280-288.
41. Lundberg AH, Eubanks JW 3rd, Henry J, Sabek O, Kotb M, Gaber L, Norby-Teglund A, Gaber AO. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Pancreas*. 1, 2000, S. 41-51.
42. Sendler, M, et al. Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*. 154, 2018, Bd. 3, S. 704-718.
43. Roth, JS und Sohn, DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 18, 2018, Bd. 4, S. e27.
44. Kawasaki, T und Kawai, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front Immunol*. 2014, 5, S. 461.
45. Sendler, M, et al. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut*. 62, 2013, Bd. 3, S. 430-439.
46. Perides, G, et al. TNF-alpha-dependent regulation of acute pancreatitis severity by Ly-6C(hi) monocytes in mice. *J Biol Chem*. 286, 2011, Bd. 15, S. 13327–13335.

Literaturverzeichnis

47. He, S, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*. 137, 2009, Bd. 6, S. 1100-11.
48. Louhimo, J, Steer, M L und Perides, G. Necroptosis Is an Important Severity Determinant and Potential Therapeutic Target in Experimental Severe Pancreatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2, 2016, Bd. 4, S. 519-535.
49. Gukovskaya, A S, et al. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 122, 2002, Bd. 4, S. 974-84.
50. Leppkes, M, et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nat Commun*. 11, 2016, Bd. 7, S. 10973-86.
51. Windsor JA, Hammodat H. Metabolic Management of Severe Acute Pancreatitis. *World J. Surg*. 24, 200, S. 664–672.
52. Mayerle J, Dummer A, Sendler M, Malla SR, van den Brandt C, Teller S, Aghdassi A, Nitsche C, Lerch MM. Differential roles of inflammatory cells in pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2, 2012, S. 47-51.
53. 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, Bd. 158, S. 253-269.
54. Lee, C C, Avalos, A M und Ploegh, H L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*. 12, 2013, Bd. 3, S. 168–179.
55. Orecchioni, M, et al. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019, 10, S. 1084.
56. Ding, J L, et al. Attenuation of acute pancreatitis by peroxisome proliferator-activated receptor- α in rats: the effect on Toll-like receptor signaling pathways. *Pancreas*. 42, 2013, Bd. 1, S. 114-122.
57. Sharif R, Dawra R, Wasiluk K, et al. Impact of toll-like receptor 4 on the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice. *Gut*. 58, 2009, S. 813-819.
58. Hoque, R, et al. TLR9 and the NLRP3 Inflammasome Link Acinar Cell Death With Inflammation in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. 141, 2011, Bd. 1, S. 358–369.
59. Guo, H Y und Cui, Z J. Extracellular Histones Activate Plasma Membrane Toll-Like Receptor 9 to Trigger Calcium Oscillations in Rat Pancreatic Acinar Tumor Cell AR4-2J. *Cells*. 8, 2019, Bd. 1, S. 3.
60. Zhang, Q, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 464, 2010, Bd. 7285, S. 104-107.

Literaturverzeichnis

61. Gosh, S, May, M J und Kopp, E B. NF- κ B and REL Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 16, 1998, Bd. 1, S. 225-260.
62. Sun, SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 21, 2011, Bd. 1, S. 71-85.
63. Lawrence, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1, 2009, Bd. 6, S. a001651.
64. Algül, H, et al. Acute Experimental Pancreatitis and NF- κ B/Rel Activation. *Pancreatology.* 2, 2002, Bd. 6, S. 503–509.
65. Gukovsky, I, et al. Early NF- κ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol.* 275, 1998, Bd. 6, S. 1402-1414.
66. Steinle, A U, et al. NF- κ B/Rel Activation in Cerulein Pancreatitis. *Gastroenterology.* 116, 1999, Bd. 2, S. 420-430.
67. Rakonczay, Z, et al. The role of NF- κ B activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut.* 2014, Bd. 57, 2, S. 259–267.
68. Sah, R P, et al. Cerulein-induced chronic pancreatitis does not require intra-acinar activation of trypsinogen in mice. *Gastroenterology.* 2013, Bd. 144, 5, S. 1076-1085.
69. Dawra, R, et al. Intra-acinar trypsinogen activation is required for early pancreatic injury but not for inflammation during acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 2011, Bd. 141, 6, S. 2210–2217.
70. Chen X, Ji B, Han B, Ernst S A, Simeone D, Logsdon C D. NF- κ B activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology.* 122, 2002, Bd. 2, S. 448-457.
71. Watanabe, T, Kudo, M und Strober, W. Immunopathogenesis of pancreatitis. *Mucosal Immunol.* 10, 2017, Bd. 2, S. 283–298.
72. Gay, N J, Gangloff, M und O'Neill, L A. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol.* 32, 2011, Bd. 32, S. 104-109.
73. Wesche, H, et al. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem.* 274, 1999, Bd. 27, S. 19403-10.
74. Rosati, O und Martin, M U. Identification and characterization of murine IRAK-M. *Biochem Biophys Res Commun.* 293, 2002, Bd. 5, S. 1472–1477.
75. Hubbard, Leah L.N. und Moore, Bethany B. IRAK-M regulation and function in host defense and immune homeostasis. *Infect Dis Rep.* 2, 2010, Bd. 1.
76. Kobayashi, K, et al. IRAK-M Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor Signaling. *Cell.* 110, 2002, Bd. 2, S. 191-202.
77. Mages J, Dietrich H, Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology.* 2007, Bd. 212, S. 723-37.

Literaturverzeichnis

78. Kim Y I, Park J E, Kwon K H, Hong C Y, Yi A K. Interleukin-1 receptor-associated kinase 2- and protein kinase D1-dependent regulation of IRAK-monocyte expression by CpG DNA. *PLoS One*. 2012, Bd. 7, 8.
79. Lyroni K, Patsalos A, Daskalaki M G, Doxaki C, Soennichsen B, Helms M, Liapis I, Zacharioudaki V, Kampranis S C, Tsatsanis C. Epigenetic and Transcriptional Regulation of IRAK-M Expression in Macrophages. *J Immunol*. 2017, Bd. 198, 3, S. 1297-1307.
80. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009, 30, S. 475-87.
81. Wiersinga WJ, van't Veer C, van den Pangaart PS et al. *Crit Care Med*. 2009, 37, S. 569-76.
82. Deng JC, Cheng G, Newstead MW et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J Clin Invest*. 2006, 116, S. 2532-42.
83. Takebayashi K, Hokari R, Kurihara C et al. *Microcirculation*. 2009, 16, S. 251-64.
84. Weersma RK, Oostenbrug LE, Nolte IM, et al. Association of interleukin-1 receptor-associated kinase M (IRAK-M) and inflammatory bowel diseases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2007, Bd. 42, 7, S. 827-33.
85. Shen H, Goldstein DR. IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance. *J Am Soc Nephrol*. 2009, 20, S. 1032-40.
86. Seki M, Kohno S, Newstead MW, Zeng X, Bhan U, Lukacs NW, Kunkel SL, Standiford TJ. Critical role of IL-1 receptor-associated kinase-M in regulating chemokine-dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia. *J Immunol*. 2010, Bd. 184, 3, S. 1410-18.
87. Domon H, Honda T, Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. Early and preferential induction of IL-1 receptor-associated kinase-M in THP-1 cells by LPS derived from *Porphyromonas gingivalis*. *J Leukoc Biol*. 2008, 83, S. 672-679.
88. del Fresno C, Otero K, Gomez-Garcia L et al. Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *J Immunol*. 2005, 174, S. 3032-40.
89. Xie Q, Gan L, Wang J et al. Loss of the innate immunity negative regulator IRAK-M leads to enhanced host immune defense against tumor growth. *Mol Immunol*. 2007, 44, S. 453-61.
90. Chooklin S, Pereyaslov A, Bihalskyy I. Pathogenic role of myeloperoxidase in acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 8, 2009, Bd. 6, S. 627-31.
91. Schmidt J, Lewandrowsi K, Warsaw AL et al. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol*. 12, 1992, S. 41-51.
92. Krüger, B, Lerch, M M und Tessenow, W. Direct detection of premature protease activation in living pancreatic acinar cells. *Lab Invest*. 78, 1998, Bd. 6, S. 763-4.

Literaturverzeichnis

93. Mayerle, J, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 129, 2005, Bd. 5, S. 1251-67.
94. Blind, P J, et al. Parenteral superoxide dismutase plus catalase diminishes pancreatic edema in sodium taurocholate-induced pancreatitis in the rat. *Pancreas*. 3, 1988, Bd. 5, S. 563-567.
95. van Dijk, S M, et al. Dutch Pancreatitis Study Group. Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials. *Gut*. 66, 2017, Bd. 11, S. 2024-2032.
96. Garg, P K und Singh, V P. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. 159, 2019, Bd. 7, S. 2008-2023.
97. Weiterer S, Uhle F, Siegler B et al. Epigenetische Regulation in der Sepsis. *Anaesthesist*. 64, 2015, S. 42–55.
98. Xiao , W, et al. Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 208, 2011, Bd. 13, S. 2581-90.
99. Hotchkiss, R S, Monneret, G und Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 13, 2013, Bd. 12, S. 862-74.
100. Zhang R, Shi J, Zhang R, Ni J, Habtezion A, Wang X, Hu G, Xue J. Expanded CD14hiCD16- Immunosuppressive Monocytes Predict Disease Severity in Patients with Acute Pancreatitis. *J Immunol*. 202, 2019, Bd. 9, S. 2578-2584.
101. Wu J, Zhang L, Shi J, He R, Yang W, Habtezion A, Niu N, Lu P, Xue J. Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury. *EBioMedicine*. 58, 2020, S. 102920.
102. Wu, J, et al. Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury. *EBioMedicine*. 58, 2020, S. 102920.
103. Steinle A U, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid R M. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. 1999, Bd. 116, S. 420-430.
104. Afonina IS, Zhong Z, Karin M, Beyaert R. Limiting inflammation-the negative regulation of NF-κB and the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 18, 2017, Bd. 8, S. 861-869.
105. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010, Bd. 11, S. 373–384.
106. Gu H, Werner J, Bergmann F et al. Necro-inflammatory response of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of acute alcoholic pancreatitis. *Cell Death Dis*. 4, 2013, e816.
107. Sharif, R, et al. Impact of toll-like receptor 4 on the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice. *Gut*. 58, 2009, Bd. 6, S. 813–819.

Literaturverzeichnis

108. Awla D, Abdulla A, Regnér S et al. TLR4 but not TLR2 regulates inflammation and tissue damage in acute pancreatitis induced by retrograde infusion of taurocholate. *Inflamm Res.* 60, 2011, S. 1093-1098.
109. Regel I, Raulefs S, Benitz S, Mihaljevic C, Rieder S, Leinenkugel G, Steiger K, Schlitter AM, Esposito I, Mayerle J, Kong B, Kleeff J, Michalski CW. Loss of TLR3 and its downstream signaling accelerates acinar cell damage in the acute phase of pancreatitis. *Pancreatology.* 19, 2019, Bd. 1, S. 149-157.
110. Neuhöfer P, Liang S, Einwächter H, Schwerdtfeger C, Wartmann T, Treiber M, Zhang H, Schulz HU, Dlubatz K, Lesina M, Diakopoulos KN, Wörmann S, Halangk W, Witt H, Schmid RM, Algül H. Deletion of I κ B α activates RelA to reduce acute pancreatitis in mice through up-regulation of Spi2A. *Gastroenterology.* 144, 2013, Bd. 1, S. 192-201.
111. Algül H, Treiber M, Lesina M, et al. Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J Clin Invest.* 2007, Bd. 117, S. 1490-1501.
112. Koike Y, Kanai T, Saeki K, Nakamura Y, Nakano M, Mikami Y, Yamagishi Y, Nakamoto N, Ebinuma H, Hibi T. MyD88-dependent interleukin-10 production from regulatory CD11b⁺Gr-1(high) cells suppresses development of acute cerulein pancreatitis in mice. *Immunol Lett.* 148, 2012, Bd. 2, S. 172-7.
113. Aleksic T, Baumann B, Wagner M, Adler G, Wirth T, Weber CK. Cellular immune reaction in the pancreas is induced by constitutively active I κ B kinase-2. *Gut.* 56, 2007, Bd. 2, S. 227-236.
114. Li N, Wu X, Holzer RG, Lee JH et al. Loss of acinar cell IKK α triggers spontaneous pancreatitis in mice. *J Clin Invest.* 123, 2013, Bd. 5, S. 2231-43.
115. Rothschild DE, Zhang Y, Diao N, et al. Enhanced Mucosal Defense and Reduced Tumor Burden in Mice with the Compromised Negative Regulator IRAK-M. *EBioMedicine.* 15, 2017, S. 36-47.
116. van der Windt G J W, Blok D C, Hoogerwerf J J, Lammers A J J, Vos A F, van't Veer C, Florquin S, Kobayashi K, Flavell R A, van der Poll T, . Interleukin 1 Receptor-Associated Kinase M Impairs Host Defense During Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases.* 2012, Bd. 205, 12, S. 1849–1857.
117. Zhou H, Yu M, Fukuda K et al. IRAK-M mediates Toll-like receptor/IL-1R-induced NF κ B activation and cytokine production. *EMBO J.* 32, 2013, Bd. 4, S. 583-96.
118. Diakopoulos KN, Lesina M, Wörmann S, et al. Impaired autophagy induces chronic atrophic pancreatitis in mice via sex- and nutrition-dependent processes. *Gastroenterology.* 2015, Bd. 148, S. 626–638.
119. Hildebrand, F, Frink, M und Mommsen, P et al. Die Damage-control-Strategie. *Trauma Berufskrankh.* 12, 2010, S. 475–479.
120. Pape, H C. Effects of changing strategies of fracture fixation on immunologic changes and systemic complications after multiple trauma: damage control orthopedic surgery. *J Orthop Res.* 28, 2008, S. 1478-1484.

Literaturverzeichnis

121. M, Frink, et al. IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries. *Scand J Trauma Resus Emerg Med* 14:49. 17, 2009, Bd. 49.
122. Sendler , M, Lerch, M M und Mayerle, J. Pathogenese und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis. [Hrsg.] H.G Berger et al. *Erkrankungen des Pankreas*. Berlin- Heidelberg : Springer-Verlag, 2013, S. 3-9.
123. Siewert, J R, et al. *Chirurgie mit integriertem Fallquiz; mit 159 Tabellen*. Berlin Heidelberg : Springer-Medizin, 2012. 978-3-642-11330-7.
124. Gea-Sorlí, S und Closa, D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 1, 2010, Bd. 5, S. 107-111.
125. Chen, J M und Férec, C. Chronic pancreatitis: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 10, 2009, S. 63–87.
126. Masamune, A, et al. Roles of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Inflammation and Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009, Bd. 7, 11, S. 48-54.
127. Lu, G, Zhang, R und Geng, S et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nat Commun.* 2015, Bd. 6, 6676.
128. Nechama M, Kwon J, Wei S, Kyi AT, Welner RS, Ben-Dov IZ, Arredouani MS, Asara JM, Chen CH, Tsai CY, Nelson KF, Kobayashi KS, Israel E, Zhou XZ, Nicholson LK, Lu KP. The IL-33-PIN1-IRAK-M axis is critical for type 2 immunity in IL-33-induced allergic airway inflammation. *Nat Commun.* 23, 2018, Bd. 9, 1603.
129. Fossard, J. Trypsin activation peptide (TAP) in acute pancreatitis: from pathophysiology to clinical usefulness. *JOP.* 2, 2001, S. 69-77.
130. Williams JA, Sans MD, Tashiro M, Schäfer C, Bragado MJ, Dabrowski A. Cholecystokinin Activates a Variety of Intracellular Signal Transduction Mechanisms in Rodent Pancreatic Acinar Cells. *Pharmacol Toxicol.* 2002, Bd. 91, 6, S. 297-303.
131. Willemer S, Elsässer HP, Adler G. Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res.* 1992, Bd. 24, 1, S. 29-39.
132. Balaci, L, et al. IRAK-M Is Involved in the Pathogenesis of Early-Onset Persistent Asthma. *Am J Hum Genet.* 80, 2007, Bd. 6, S. 1103-1114.
133. Chomczynski, P und Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 1987, Bd. 1, S. 156-9.
134. Hassan, F, et al. Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M in toll-like receptor (TLR) 7-mediated tolerance in RAW 264.7 macrophage-like cells. *Cell Immunol.* 256, 2009, Bd. 1, S. 99-103.
135. Oshima, N, et al. A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin Exp Immunol.* 159, 2009, Bd. 12, S. 185-198.

Literaturverzeichnis

136. Nakayama, K, et al. Involvement of IRAK-M in Peptidoglycan-induced Tolerance in Macrophages. *J Biol Chem.* 279, 2004, Bd. 8, S. 6629-34.
137. Han, B, Ji, B und Logsdon, C D. CCK independently activates intracellular trypsinogen and NF-kappaB in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol.* 208, 2001, Bd. 3, S. 465-472.
138. Mooren, F C, et al. Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. *J BioChem.* 278, 2003, Bd. 11, S. 9361-9369.
139. Gukovskaya, A S, et al. Pancreatic Acinar Cells Produce, Release, and Respond to Tumor Necrosis Factor. *J Clin Invest.* 1000, 1997, Bd. 7, S. 1853–1862.
140. Tazi, K A, et al. Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: Possible role of Akt and IRAK-M. *J Hepatol.* 45, 2006, Bd. 2, S. 280–289.
141. Harada, K und Nakanuma, Y. Biliary innate immunity and cholangiopathy. *Hepatology.* 37, 2007, Bd. 3, S. 430–437.
142. Seki, M, et al. Critical Role of IL-1 Receptor-Associated Kinase-M in Regulating Chemokine-Dependent Deleterious Inflammation in Murine Influenza Pneumonia. *J Immunol.* 184, 2010, Bd. 3, S. 1410–1418.
143. Cooley, M M, et al. Pancreatic Acinar Cell Protein Synthesis, Intracellular Transport, and Export. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base.* 2020, 1.
144. Gerasimenko, J V, Gerasimenko, O V und Petersen, O H. The role of Ca²⁺ in the pathophysiology of pancreatitis. *J Physiol.* 592, 2014, S. 269–280.
145. Grady, T, et al. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 113, 1997, Bd. 6, S. 1966-1975.
146. Hubbard, L L, et al. A role for IL-1 receptor-associated kinase-M in prostaglandin E₂-induced immunosuppression post-bone marrow transplantation. *J Immunol.* 184, 2010, S. 6299-6308.
147. Kono, H und Kenneth , R L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 8, 2008, Bd. 4, S. 279–289.
148. Kubisch, C H und Logsdon, C D. Endoplasmic reticulum stress and the pancreatic acinar cell. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2, 2008, Bd. 2, S. 249–260.
149. Liu, T, et al. NF-kB signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther.* 2, 2017.
150. Meyer-Bahlburg, A, Khim, S und Rawlings, D J. B cell – intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J Exp Med.* 204, 2007, Bd. 13, S. 3095-3101.
151. Miggin, SM und O'Neill , LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol.* 80, 2006, Bd. 2, S. 220-226.

Literaturverzeichnis

152. Saluja, A, et al. Early Intra-Acinar Events in Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology*. 156, 2019, Bd. 7, S. 1979-1993.
153. Vaz, J, Akbarshahi, H und Andersson, R. Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 19, 2013, Bd. 5, S. 616-630.
154. Klöppel G, Maillet B. Pathology of Acute and Chronic Pancreatitis. *Pancreas*. 1993, Bd. 8, 6, S. 659- 670.
155. Pandol, S J. Anatomy. [Buchverf.] Pandol S J. *The Exocrine Pancreas*. SAN Rafael (CA) : Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.

Abkürzungen

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampair
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AP	akute Pankreatitis
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>B-cell receptor</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
BV	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CBA	Cytometric Bead Array
CCK	Cholecystokinin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , deutsch: komplementäre DNS
CEL	<i>carboxyl ester lipase</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CP	chronische Pankreatitis
CPA1	<i>carboxypeptidase A1</i>
Crtl	Kontrolle

Abkürzungen

CTL	<i>cytotoxic T-lymphocytes</i> , zytotoxische T-Zellen
CTRC	Chymotrypsin C
Cy	Cyanin-Farbstoff
d	<i>day</i> , Tag
Da	Dalton
DAMP	damage associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al	<i>et alii</i> , und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calf serum
FoxP3	forkhead box protein P3
Fw	<i>forward</i> , vorwärts
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	<i>hour</i> , Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HCl	Salzsäure

Abkürzungen

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) -piperazin-1-ethansulfonsäure
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B α Kinase Komplex
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
ILC	<i>innate lymphoid cells</i>
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine-rich repeat (LRR) receptor
M	Molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MC-SF	Macrophage colony- stimulating factor
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mMDSC	monocytic Myeloid-derived suppressor cells
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
M Φ	Makrophagen
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
n	Nano

Abkürzungen

Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NET	neutrophil extracellular traps
NF-κB	nuclear factor κ of B cells
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NIK	<i>NF-κB inducing kinase</i>
NK	natürliche Killerzellen
NLR	NOD-Like Receptor
nm	Nanometer
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
p	Signifikanzniveau
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pH	pH-Wert, abgeleitet von pondus hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	pattern recognition receptor
RFU	Relative fluorescence units
RLR	RIG-I-like Receptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
RPMI	RPMI-Medium, abgeleitet von: Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur

Abkürzungen

Rv	<i>reverse</i> , rückwärts
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
Tab.	Tabelle
TAB1/2	TAK1 binding proteins
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAK1	transforming growth factor-activated kinase-1
TAP	Trypsin-Aktivierungs-Peptid
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	<i>T-Cell receptor</i>
T _H - Zellen	T-Helferzellen
TIR	Toll/IL1R-Domäne
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	TNF-receptor-associated factor 6
Treg	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
u.a.	unter anderem
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro (Millionstel)

Abbildungen

Abbildungen

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Autodigestion von Azini mit Aktivierung der Immunantwort.	7
Abbildung 2:	Übersichtsdarstellung einiger Zellen des Immunsystems.....	10
Abbildung 3:	Darstellung der T-Zellpopulationen	12
Abbildung 4:	Lokalisierung von TLR 2,4 und 9 nach Guo & Cui 2019.....	15
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des klassischen NF- κ B Signalwegs	16
Abbildung 6:	Signalwege und Wirkmechanismen nach NF- κ B Aktivierung	18
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Regulation des TLR- Signalwegs durch IRAK-M.....	19
Abbildung 8:	Gating Strategie der T-Zellen.....	46
Abbildung 9:	Amplifikation von IRAK-M und 5S aus Pankreashomogenat.....	53
Abbildung 10:	Amplifikation von IRAK-M aus isolierten Azini von C57BL/6 Tieren.....	54
Abbildung 11:	TLR- Genexpressionsanalyse isolierter C57BL/6- Azinuszellen.....	55
Abbildung 12:	Relative Genexpression der TLRs 1-9 im Vergleich zwischen IRAK-M ^{-/-} und Wildtyp Azinuszellen.....	56
Abbildung 13:	Untersuchung der Enzym Aktivierung in isolierten Azinuszellen	57
Abbildung 14:	Ein verringerter pankreatischer Schaden ist bei IRAK-M ^{-/-} während der akuten Pankreatitis zu beobachten	59
Abbildung 15:	Relative T7 Genexpression in isolierten Azini	61
Abbildung 16:	Trypsinaktivität in Pankreashomogenat zu verschiedenen Zeitpunkten der Pankreatitis	61
Abbildung 17:	Konzentrationsbestimmung verschiedener Zytokine im Serum.....	63
Abbildung 18:	Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten	65
Abbildung 19:	Anti-CD68, Anti-CD206 und Anti-Lyg gefärbte Zellen im Pankreasgewebe	67
Abbildung 20:	Zytokinausschüttung von BMDM im zeitlichen Verlauf sowie nach Inkubation mit Azini.....	69
Abbildung 21:	Relative Expression der BMDM nach Inkubation mit CCK stimulierten Azini.....	70
Abbildung 22:	Phagozytose Assay mit BMDM.....	71
Abbildung 23:	NF- κ B+ Zellen im Pankreasgewebe.....	72

Abbildungen

Abbildung 24: Ermittlung des Schweregrads sowie pankreatischen Schadens.....	74
Abbildung 25: Konzentrationsbestimmung von Zytokinen im Serum mittels CBA	75
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Messung von T-Zellen aus der Milz nach 3d Gangligatur	77
Abbildung 27: CD68+ und Ly6g+Zellen im Pankreasgewebe nach partieller Gangligatur	78
Abbildung 28: Vergleich der Serumlipase und des pankreatischen Schadens.....	79
Abbildung 29: Vergleich der Zytokinkonzentration nach Caerulein und Gangligatur Pankreatitis.....	80
Abbildung 30: Schematische Darstellung von SIRS und CARS.....	83
Abbildung 31: Übersichtsdarstellung der TLR die den MyD88/IRAK- Signalweg aktivieren	85
Abbildung 32: Schematische Darstellung kontrollierter und unkontrollierter Immunreaktion	91

Tabellen

Tabellen

	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Subpopulationen der T-Zellen	13
Tabelle 2: IRAK-M Expression in verschiedenen Zell- & Gewebearten (Hubbard <i>et al</i> , 2010)	20
Tabelle 3: Rezeptoren mit Einfluss auf IRAK-M Expressionen (Hubbard <i>et al</i> , 2010)	21
Tabelle 4: Mit IRAK-M Expressionsänderung verknüpfte Krankheiten (Hubbard <i>et al</i> , 2010)	21
Tabelle 5: Substrate	44
Tabelle 6: Extrazelluläre Färbung T-Zellen	45
Tabelle 7: Intrazelluläre Färbung T-Zellen	45
Tabelle 8: PCR- Mix I für reverse Transkription	47
Tabelle 9: PCR-Mix II für reverse Transkription	48
Tabelle 10: PCR Ansatz	48
Tabelle 11: PCR Programm	49

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Congress Reports

07/2021 European Pancreas Club, Verona – e-poster

07/2020 European Pancreas Club, Paris – e-poster

02/2020 German Pancreas club, Halle – oral presentation

02/2019 German Pancreas Club, Göttingen – poster

06/2018 European Pancreas Club, Berlin – poster

Public Relations

06/2019 Verleihung des Werner Creutzfeldt- Promotionsstipendiums 2019, Rostock

11/2018 Forschungscamp, Rostock – Science slam and poster presentation

05/2018 Nationale Branchenkonferenz Gesundheitswirtschaft, Rostock – oral presentation

03/2018 Project presentation to minister Hesse, Greifswald

Publications

Tran QT, Tran VH; Sandler M; Doller J; Wiese M; Bolsmann R; Wilden A; Glaubitz J; Modenbach JM; **Thiel FG**; de Freitas Chama LL; Weiss FU; Lerch MM; Aghdassi AA: Role of Bile Acids and Bile Salts in Acute Pancreatitis. January (2021), *Pancreas*, 50(1); pp. 3-11

Malla SR, Krueger B, Wartmann T, Sandler M, Mahajan UM, Weiss FU, **Thiel FG**, De Boni C, Gorelick FS, Halangk W, Aghdassi AA, Reinheckel T, Gukovskaya AS, Lerch MM, Mayerle J: Early trypsin activation develops independently of autophagy in caerulein-induced pancreatitis in mice. *Cell Mol Life Sci.* 2020 May;77(9):1811-1825

Lukas J, Pospesch J, Oppermann C, Hund C, Iwanov K, Pantoom S, Petters J, Frech M, Seemann S, **Thiel FG**, Modenbach JM, Bolsmann R, de Freitas Chama L, Kraatz F, El-Hage F, Gronbach M, Klein A, Müller R, Salloch S, Weiss FU, Simon P, Wagh P, Klemenz A, Krüger E, Mayerle J, Delcea M, Kragl U, Beller M, Rolfs A, Lerch MM, Sandler M: Role of endoplasmic reticulum stress and protein misfolding in disorders of the liver and pancreas. September (2019), *Advances in Medical Sciences*, 64(2), pp. 315-323

Lebenslauf

Lebenslauf

.

Förderhinweis

Die Promotion wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „PEPPP-Proteinfehlfaltung, ER-Stress und Proteindegradation – Entwicklung einer systematischen Pipeline für individualisierte Therapien bei erblichen Leber- und Pankreaserkrankungen“ angefertigt und durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF) finanziert (ESF/14-BM-A55-0045/16). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbänden – Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern“.



EUROPÄISCHE UNION
Europäischer Sozialfonds

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

Franziska Thiel