



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Chirurgische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar
(Direktor Univ.-Prof. Dr. H. Friess)

**T-Zellantwort bei der Autoimmunpankreatitis:
Vergleichende Analyse der T-Zellsubpopulationen unter besonderer
Berücksichtigung der Th17-Zellantwort**

Felix Josef Lauffer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Kleeff

2. Priv.-Doz. Dr. H. Algül

Die Dissertation wurde am 18.12.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.07.2014 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

AIP	Autoimmunpankreatitis
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines serum albumin
C	Celsius
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxiribonucleic acid
CP	chronische Pankreatitis
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	fragment antigen binding
Fc	fragment crystallizable
For	forward primer
g	Gramm
GEL	granulozytäre epitheliale Läsionen
HCl	Hydrogenchlorid
HPF	High-Power-Field (400 x Vergrößerung)
ICOS	inducible T cell costimulator
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin(e)
IgA	Immunglobulin der Klasse A

IgD	Immunglobulin der Klasse D
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgG4	Immunglobulin der Klasse G4
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
M	Mol
mg	Milligramm
MHC-I	major-histocompatibility-complex der Klasse I
MHC-II	major-histocompatibility-complex der Klasse II
ml	Milliliter
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	natural Killer-Zellen
NP	normales Pankreasgewebe
Nt	Nukleotid
p.o.	per os (orale Zufuhr)
PCR	polymerase-chain-reaction
q-RT-PCR	quantitative real-time Polymerase-Chain-Reaction
rev	reverse primer
RNA	ribonucleic acid

rRNA	ribosomale RNA
S	Svedberg
SA	Standardabweichung
T-bet	T-box expressed in T-cells
TBS	Tris buffered saline
T-reg	regulatorische T-Zellen
TGF- β	transforming growth factor- β
vs	versus
W	Watt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis.....	6
I. Einleitung.....	9
1. 1. Autoimmunpankreatitis	9
1.1.1. Definition	9
1.1.2. Epidemiologie	9
1.1.3. Pathogenese.....	10
1.1.4. Histologie	12
1.1.5. Diagnostik	12
1.1.6. Therapie und Prognose.....	14
1.2. Neue Erkenntnisse.....	15
1.2.1. Subtypen Autoimmunpankreatitis Typ I und II	15
1.3. Immunsystem	17
1.3.1. Definition	17
1.3.2. Angeborenes Immunsystem	18
1.3.2.1. Natürliche Barrieren	18
1.3.2.2. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen	18
1.3.2.3. Antigenpräsentierende Zellen.....	19
1.3.2.4. Eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten und Mastzellen.....	20
1.3.2.5. Natural Killer-Zellen	20
1.3.2.6. Komplementsystem	21
1.3.3. Adaptives Immunsystem	22
1.3.3.1. B-Lymphozyten.....	22
1.3.3.2. T-Lymphozyten.....	24
II. Ziel der Untersuchung	30
III. Material und Methoden	31
3.1. Material	31

3.1.1. Geräte	31
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3. Reagenzien	32
3.1.4. Antikörper	33
3.1.5. Kits	33
3.1.6. Lösungen und Puffer	34
3.2. Methoden.....	35
3.2.1. Gewebesammlung und Patientencharakteristika.....	35
3.2.2. Quantitative real-time Polymerase-Chain-Reaction.....	38
3.2.3. Immunhistochemische Färbung	41
IV. Ergebnisse	44
4.1. Genexpressionsanalyse.....	44
4.1.1. Vergleich der T-Zellpopulationen zwischen der Autoimmunpankreatitis, chronischer Pankreatitis und normalem Pankreasgewebe anhand charakteristischer Transkriptionsfaktoren und Zytokine	44
4.1.1.1. T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen	44
4.1.1.2. Th1- und Th2-Zellen	46
4.1.1.3. Th17-Zellen.....	48
4.1.1.4. Regulatorische T-Zellen.....	52
4.1.1.5. Zusammenfassung.....	54
4.1.2. Vergleich der T-Zellpopulationen zwischen der Autoimmunpankreatitis Typ I und II. 55	
4.1.2.1. T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen	55
4.1.2.2. Th1- und Th2-Zellen	57
4.1.2.3. Th17-Zellen.....	59
4.1.2.4. Regulatorische T-Zellen.....	62
4.1.2.5. Zusammenfassung.....	64
4.2. Proteinnachweis	65
4.2.1. Immunhistochemische IL-17A/CD4 Färbung.....	65
4.2.1.1. Nachweis IL-17A/CD4-positiver Zellen.....	65

4.2.1.2. Vergleich der IL-17A/CD4-positiven Zellen zwischen der Autoimmunpankreatitis Typ I und II	67
4.2.1.3. Vergleich der neutrophilen Granulozyten zwischen der Autoimmunpankreatitis Typ I und II.....	69
4.2.1.4. Zusammenfassung.....	69
V. Diskussion.....	70
VI. Zusammenfassung.....	81
VII. Quellenverzeichnis	82
Danksagung.....	88

I. Einleitung

1. 1. Autoimmunpankreatitis

1.1.1. Definition

Die Autoimmunpankreatitis (AIP) ist eine seltene, chronisch-entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse (Sarles et al. 1961; Yoshida et al. 1995). Sie betrifft häufig Patienten mittleren Lebensalters und äußert sich in vielen Fällen durch Schmerzen im Oberbauch, Ikterus, Gewichtsverlust und Malabsorption. Die Diagnostik gestaltet sich in der Regel sehr schwierig. Es existieren keine spezifischen serologischen oder radiologischen Marker. Dies erschwert vor allem die Abgrenzung zum Pankreaskarzinom. Einzig durch die histologische Beurteilung einer Gewebeprobe kann die Diagnose zweifelsfrei gesichert werden, wobei jedoch eine Resektion vermieden werden sollte, da die Therapie in der Regel medikamentös ist. Histopathologisch lassen sich typischerweise eine ausgedehnte Fibrose, entzündliche Infiltrate und Gangobstruktionen nachweisen (Detlefsen et al. 2009; Kloppel et al. 2010). Unter einer Steroidtherapie kommt es in der Regel zu einem schnellen und oft dauerhaften Rückgang der Symptomatik. Die Krankheitsursache ist bis heute unklar. Eine gegen den eigenen Körper gerichtete Immunreaktion im Sinne einer Autoimmunerkrankung wird angenommen und führte zum Namen Autoimmunpankreatitis (Frulloni et al. 2011; Zhang and Smyrk 2010; Park et al. 2009; Sugumar and Chari 2011).

1.1.2. Epidemiologie

AIP ist eine sehr seltene Erkrankung und es liegen wenige epidemiologische Daten vor. Eine Studie aus Japan gibt für das Jahr 2002 eine Prävalenz von 0,82/100 000 Einwohner an (Nishimori et al. 2007). Die Erkrankung tritt meistens in einem Alter um die 50 Jahre auf (Sah et al. 2010a).

1.1.3. Pathogenese

Die Ursache der AIP ist noch nicht vollständig erforscht und es existieren unterschiedliche, teilweise konträre Hypothesen zur Krankheitsentstehung. Auf Grund der Seltenheit der Erkrankung sind Untersuchungen mit großen Fallzahlen schwer durchzuführen. Es gibt jedoch viele Hinweise darauf, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handeln könnte. Darunter versteht man eine fehlgeleitete Entzündungsreaktion, bei der sich Abwehrzellen nicht gegen körperfremde Erreger, sondern gegen körpereigene Strukturen richten.

Ein weit verbreitetes Konzept zur Pathogenese der AIP unterscheidet zwischen zwei Phasen der Erkrankung. Während der Induktion kommt es durch noch größtenteils unbekannte Auslöser zu einem Ausbruch der Krankheit. Im Laufe der Progression entwickeln sich Folgereaktionen, die das Fortbestehen und die Ausbreitung der Erkrankung unterhalten. Dazu zählt man unter anderem die Einwanderung von Immunzellen, vor allem T-Lymphozyten und antikörperproduzierende Plasmazellen. Dies führt zu einer Schwellung, Fibrose und progredienter Funktionseinschränkung des Pankreas (Okazaki et al. 2008; Park et al. 2009).

Ein möglicher Trigger für die Entwicklung einer AIP könnte eine Infektion mit *Helicobacter pylori* sein, einem Bakterium, das bei vielen Menschen die Magenschleimhaut besiedelt. Es wurde gezeigt, dass bei genetisch prädisponierten Individuen eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen bakteriellen Proteinen (α -Carboanhydrase, plasminogen-binding Protein) und Strukturen der menschlichen Bauchspeicheldrüse (Carboanhydrase II, Ubiquitin-Protein-Ligase-E3-Component-N-Recognin-2) bestehen. Im Rahmen eines molekularen Mimikri könnte sich eine Immunantwort gegen das bakterielle Antigen entwickeln, wodurch dann auch pankreatische Strukturen angegriffen würden (Guarneri et al. 2005; Kountouras et al. 2005;

Kountouras et al. 2007). Dieser Mechanismus ist jedoch nur ein möglicher Erklärungsansatz für die Entstehung der AIP, der noch nicht abschließend bewiesen werden konnte.

Im Vergleich zu gesunden Menschen wurden bei vielen Patienten mit AIP Autoantikörper nachgewiesen. Diese richten sich gegen Strukturen, die auch im Pankreasgewebe ausgebildet werden, wie zum Beispiel Carboanhydrase II, Laktoferrin, Pancreatic-Secretory-Trypsin-Inhibitor und spezifische Subtypen des Trypsins (Okazaki et al. 2000; Okazaki et al. 2011; Lohr et al. 2010; Frulloni et al. 2009; Asada et al. 2006). Inwieweit diese Autoantikörper krankheitsfördernd sind oder, ob sie sich als Reaktion auf die Zerstörung pankreatischer Strukturen entwickeln, ist bislang unklar.

Es wurde eine Assoziation zwischen der AIP und Entzündungen der Speicheldrüsen oder Nieren beschrieben. Histologisch fand man in allen betroffenen Organen erhöhte Anzahlen von spezifischen, Immunglobulin-G4-(IgG4)-produzierenden Plasmazellen, sodass der Oberbegriff IgG4-related-sclerosing-disease etabliert wurde. In diesem Konzept wird die AIP als Teil einer entzündlichen Systemerkrankung gesehen (Narula et al. 2010).

Eine andere Hypothese ist, dass sich die AIP nicht als autoimmune, sondern als Teil einer allergischen Erkrankung entwickelt. Dies stützt sich auf die Erkenntnisse, dass erkrankte Patienten häufiger an allergischen Erkrankungen leiden als Kontrollgruppen, erhöhte IgE-Serumspiegel aufweisen und man vermehrt eosinophile Granulozyten in histologischen Gewebeproben nachweisen kann (Sah et al. 2010b). Inwieweit diese Beobachtungen mit der Pathogenese zusammenhängen ist jedoch noch nicht bekannt.

1.1.4. Histologie

Die AIP zeichnet sich durch eine charakteristische Histologie aus und lässt sich so von anderen Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse unterscheiden. Typischerweise lassen sich im Bereich der kleinen interlobulären Gänge und zwischen den Drüsenzellen Infiltrate von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten nachweisen. Dabei ist insbesondere die Ansammlung von IgG4-positiven Plasmazellen charakteristisch und von großer diagnostischer Bedeutung. Auch um die Blutgefäße herum, besonders im Bereich der Venolen, befinden sich viele Lymphozyten, die zu einer obliterativen Venulitis führen. Ebenso lassen sich Infiltrate von neutrophilen Granulozyten nachweisen. Diese wandern in das Epithel der Pankreasgänge und bilden so die charakteristischen granulozytären epithelialen Läsionen (GEL) aus. Man beobachtet zudem eine Einwanderung von Myofibroblasten, die zur Fibrose der interlobulären Septen und Einengung der kleinen Pankreasgänge führt (Detlefsen et al. 2009; Kloppel et al. 2010).

1.1.5. Diagnostik

Die Diagnostik der AIP ist eine große Herausforderung, da differenzialdiagnostisch viele verschiedene Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse und der intrapankreatischen Gänge in Frage kommen. Insbesondere die Abgrenzung zu malignen Erkrankungen, wie dem Pankreaskarzinom und dem distalen cholangiozellulären Karzinom, gestaltet sich schwierig.

Um die Diagnostik zu standardisieren wurden bestimmte Charakteristika der AIP in Klassifikationssystemen zusammengefasst. Die „HISORT“ Klassifikation beispielsweise legt die Histologische Untersuchung, bildgebende Befunde (imaging), Serologie, Befall anderer Organe (other organs) und Therapieansprechen (response to therapy) als Kriterien fest (Chari 2007).

Klinisch präsentieren sich die Patienten meist mit unspezifischen Beschwerden, wie Schmerzen im Oberbauch, Ikterus, Fettstühlen, Abgeschlagenheit oder Gewichtsverlust. In einigen Fällen findet sich eine Beteiligung anderer Organe, wie der Speicheldrüsen, Tränendrüsen oder der Nieren (Frulloni et al. 2011; Sugumar and Chari 2011; Zhang and Smyrk 2010).

Serologisch lassen sich häufig erhöhte Spiegel der Immunglobuline, insbesondere des IgG4 nachweisen (Sensitivität 75%, Spezifität 93%). Die differenzialdiagnostische Aussagekraft von IgG4 als alleinigem Marker ist jedoch begrenzt, da auch beim Pankreaskarzinom erhöhte IgG4-Spiegel nachgewiesen werden können (Park et al. 2009).

Die Befunde der bildgebenden Untersuchungen sind oft unspezifisch und erlauben keine sichere diagnostische Aussage. So stellt sich in der Computer- und der Magnetresonanztomographie oft eine Vergrößerung des Pankreas dar, die sowohl fokal als auch diffus auftreten kann. Charakteristisch für die AIP, aber nicht in allen Fällen vorhanden, ist eine homogene Kontrastmittelaufnahme und eine diffuse Einengung des Pankreasganges mit fokalen Dilatationen (Rehnitz et al. 2011; Muhi et al. 2011). In der endoskopischen Ultraschalluntersuchung lassen sich eine hypoechogene Vergrößerung der Drüse und eventuell vorhandene Einengungen des Pankreasganges nachweisen und mit Hilfe der farbkodierten Doppler-Untersuchung zeigt sich meist eine netzartige Hypervaskularisation des betroffenen Gewebes (Hocke et al. 2011; De Lisi et al. 2010).

Der diagnostische Goldstandard ist die histologische Untersuchung des betroffenen Gewebes. Dies erfordert jedoch einen invasiven Eingriff. Eine Biopsie per ultraschallgesteuerter Feinnadelpunktion ermöglicht nur die Untersuchung einer kleinen Gewebeprobe, sodass die diagnostische Aussagekraft gering bleibt. Die operative Teilresektion des Pankreas ermöglicht die histologische Untersuchung einer größeren

Gewebeprobe. Die bessere histologische Beurteilbarkeit würde in diesem Fall allerdings auf Kosten einer großen und belastenden Operation gewonnen werden, die für die Therapie dieser Erkrankung unnötig wäre.

1.1.6. Therapie und Prognose

AIP und Pankreaskarzinom können sich in der Diagnostik sehr ähnlich präsentieren. Für die Therapieentscheidung ist eine sichere Diagnose jedoch unerlässlich. Einen Patienten mit Pankreaskarzinom nicht zu operieren und immunsuppressiv zu therapieren wäre ein grober Behandlungsfehler. Andererseits reicht bei Patienten mit AIP eine medikamentöse Therapie aus und man kann ihnen einen großen chirurgischen Eingriff ersparen.

Die Standardtherapie der AIP ist eine mehrwöchige Behandlung mit oralen Steroiden. Es konnten in Untersuchungen keine Vorteile einer hochdosierten Steroid-Stoß-Therapie gezeigt werden. Sollte es unter dieser Behandlung zu einem Rezidiv kommen, kann ein Therapieversuch mit 2 – 2,5mg Azathioprin/kg Körpergewicht p.o. - eventuell in Kombination mit oralen Steroiden - unternommen werden (Tomiyama et al. 2011; Novotny et al. 2010; Sugumar and Chari 2011). Die Symptomatik bessert sich unter dieser Therapie in der Regel deutlich. Nach 1 – 2 Wochen nimmt die Schwellung des Pankreas ab und Stenosen des Pankreasganges bilden sich zurück. Es kann jedoch zu einer bleibenden exokrinen oder endokrinen Insuffizienz kommen. Ein Rezidiv wird bei 27 – 47% der Patienten beobachtet, insbesondere bei Patienten mit anfänglich hohen IgG4-Serumwerten, Schmerzen, diffuser Schwellung des Pankreas und Gelbsucht. Nach chirurgischer Resektion kommt es deutlich seltener zu Rezidiven. Das mittlere 5-Jahres-Überleben weicht unabhängig von konservativer oder chirurgischer Therapie nicht von dem der Normalbevölkerung ab (Maire et al. 2011; Sah et al. 2010a; Kubota et al. 2011; Uchida et al. 2009).

1.2. Neue Erkenntnisse

1.2.1. Subtypen Autoimmunpankreatitis Typ I und II

Nach neusten Erkenntnissen existieren mindestens zwei Subtypen der AIP. Lange gab es hierfür keine einheitliche Nomenklatur. Auf der „Honolulu Consensus Konferenz“ der „International Association of Pancreatology“ wurden histologische und klinische Kriterien festgelegt, die eine Zuordnung der Subtypen ermöglichen. Man unterscheidet demnach die AIP Typ I (ehemals lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis) von der AIP Typ II (ehemals idiopathic duct centric pancreatitis). Inwieweit sich die beiden Typen hinsichtlich der Ursache und Pathogenese unterscheiden ist noch nicht geklärt (Chari et al. 2010b; Uomo 2011).

Man unterscheidet die beiden Subtypen vor allem anhand der Histologie. So findet man bei der AIP Typ I typischerweise deutlich mehr IgG4-positive Plasmazellen als bei der AIP Typ II. Ein Wert von >10 IgG4-positiven Plasmazellen/ High-Power-Field (HPF, 400 x Vergrößerung) ist diagnostisch wegweisend für den Subtyp I. Analog dazu finden sich insbesondere bei der AIP Typ I erhöhte IgG4-Serumspiegel, wohingegen für die AIP Typ II bisher kein serologischer Marker beschrieben wurde (Kloppel et al. 2010; Zhang et al. 2007).

Bei der AIP Typ I sind teilweise auch andere Organe, wie die Speicheldrüsen oder die Nieren, befallen. Die AIP Typ II hingegen beschränkt sich in der Regel auf das Pankreas. Von daher gibt es die Hypothese, dass die AIP Typ I Teil einer systemischen IgG4-vermittelten Erkrankung ist, wohingegen die AIP Typ II eine eigene Krankheitsentität darstellt (Zhang and Smyrk 2010).

Charakteristisch für die AIP Typ II ist die Zerstörung der Gangepithelien durch neutrophile Granulozyten (GEL), die teilweise kleine Mikroabszesse ausbilden. Außerdem ist die Infiltration von Abwehrzellen bei der AIP Typ II in der Regel geringer ausgeprägt als bei der AIP Typ I (Levy et al. 2011).

Auch klinisch unterscheiden sich die beiden Subtypen. An der AIP Typ I erkranken zu etwa 80% männliche Patienten. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 62 ± 14 Jahren. Im Gegensatz dazu ist das Patientenkollektiv bei der AIP Typ II jünger (48 ± 19 Jahre) und verfügt über ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis. Außerdem scheint es bei der AIP II seltener zu Krankheitsrezidiven zu kommen (Sah et al. 2010a; Frulloni et al. 2011). Insgesamt ist die Datenlage gerade hinsichtlich der AIP Typ II noch sehr begrenzt, sodass genauere Angaben auf Grund der niedrigen Fallzahlen nicht möglich sind.

1.3. Immunsystem

1.3.1. Definition

Das Immunsystem ist für das Überleben des menschlichen Körpers unabdingbar. Seine Aufgaben sind der Schutz vor Erregern, die Bekämpfung von Infektionen und die Beseitigung überalterter oder entarteter körpereigener Zellen. Es setzt sich aus den natürlichen Körperbarrieren, Effektormolekülen und Abwehrzellen zusammen. Über Botenstoffe (Zytokine) oder durch direkten Kontakt können die Zellen miteinander kommunizieren und sich so gegenseitig aktivieren, anlocken oder hemmen.

Man unterscheidet zwei Komponenten des Immunsystems: Das angeborene und das adaptive Immunsystem. Beide Immunantworten laufen nicht streng getrennt voneinander ab, sondern sind funktionell miteinander verknüpft. Das angeborene Immunsystem reagiert schnell auf eingedrungene Erreger, verfügt aber nur über begrenzte Möglichkeiten Pathogene spezifisch zu identifizieren und zu bekämpfen. Es bildet in der Regel die erste Abwehrlinie gegen Krankheitserreger aus, jedoch laufen die Abwehrreaktionen stets nach dem gleichen Muster ab. Das adaptive Immunsystem hingegen kann aus durchgemachten Infektionen lernen. Es benötigt bei einer erstmaligen Infektion mehrere Tage bis zur vollständigen Aktivierung, allerdings wird eine sehr spezifische und effektive Immunantwort generiert. Nach Beendigung der Infektion bleiben Gedächtniszellen zurück. Kommt es zu einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger, entwickelt sich dadurch eine schnelle und wirksame Immunreaktion. Im Laufe des Lebens erweitern und verbessern sich so die Fähigkeiten, Erreger abzuwehren und es bildet sich das sogenannte immunologische Gedächtnis aus (Murphy et al. 2009).

1.3.2. Angeborenes Immunsystem

1.3.2.1. Natürliche Barrieren

Einen ersten Schutz vor Erregern bilden die natürlichen Barrieren des Körpers, wie die Haut, Schleimhäute und Epithelien. Das Eindringen von Bakterien oder Viren wird durch enge Zell-Zell-Verbindungen erschwert. Zusätzliche Mechanismen, wie Schleimproduktion und Zilienschlag im Bereich des Bronchialsystems sorgen für einen Abtransport eingeatmeter Pathogene. Chemische Barrieren, wie der saure pH-Wert im Magensaft, bieten ebenso Schutz vor Erregern. Zusätzlich werden Peptide mit antimikrobieller Wirkung sezerniert. Epithelzellen der Haut und Panethzellen des Darms bilden Defensine. Diese cysteinreichen Proteine wirken schädigend auf Bakterien, Viren und Pilze. In Speichel- und Tränendrüsen ist das antibiotisch wirksame Enzym Lysozym enthalten (Murphy et al. 2009).

1.3.2.2. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen

Durchdringt ein Erreger diese Barrieren trifft er in der Regel zunächst auf gewebeansässige Makrophagen. Diese erkennen die pathogenen Erreger anhand von Mustererkennungsrezeptoren, wobei die Toll-Like-Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Makrophagen zählen neben neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen zu den phagozytierenden Abwehrzellen; das heißt, dass sie Erreger in ihr Zytosol aufnehmen und in den Lysosomen abtöten können. Zusätzlich schädigen sie Erreger durch die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale.

Nach der Aktivierung lösen sie durch die Ausschüttung von Zytokinen (Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor-Nekrose-Faktor- α) eine Entzündungsreaktion aus. Dadurch steigt die Gefäßwandpermeabilität der Kapillaren und das Gewebe wird stärker durchblutet. Außerdem erhöht sich die Körpertemperatur und es werden vermehrt Akute-Phase-

Proteine in der Leber synthetisiert. Weitere Abwehrzellen, vor allem neutrophile Granulozyten, können an den Ort der Entzündung einwandern. Im Gegensatz zu Makrophagen befinden sich neutrophile Granulozyten vorwiegend im Blut und haben eine Lebensdauer von nur wenigen Tagen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Phagozytose, wonach sie in der Regel rasch absterben. Die Zellüberreste bilden den makroskopisch sichtbaren Eiter aus (Murphy et al. 2009).

1.3.2.3. Antigenpräsentierende Zellen

Eine zentrale Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem stellt die Präsentation von Erregerbestandteilen dar. Nach der Phagozytose werden die Antigene an die Zelloberfläche transportiert und mit Hilfe vom major-histocompatibility-complex der Klasse II (MHC-II) präsentiert. Diese Fähigkeit besitzen Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems. Man fasst sie daher auch als antigenpräsentierende Zellen zusammen.

Dendritische Zellen ruhen im Gewebe und bilden mit ihrer Zelloberfläche lange, fingerförmige Ausläufer. Ihre phagozytische Aktivität dient im Vergleich zu Makrophagen weniger der Beseitigung von Erregern, sondern vor allem der späteren Antigenpräsentation. Nach der Aufnahme eines Erregerbestandteils wandern sie in den nächstgelegenen Lymphknoten. Dort kommen sie in Kontakt mit zahlreichen naiven T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems. Diese benötigen die Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen zwingend zur Aktivierung und Reifung. Durch die Expression von kostimulatorischen Molekülen können dendritische Zellen beeinflussen zu welchem Subtyp sich naive T-Lymphozyten entwickeln (Kang 2012; Murphy et al. 2009).

1.3.2.4. Eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten und Mastzellen

Weitere Zelltypen des angeborenen Immunsystems sind eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten und Mastzellen. Ihre vornehmliche Aufgabe liegt vermutlich in der Abwehr großer, parasitärer Erreger, die nicht phagozytiert werden können. Sie spielen allerdings auch im Rahmen allergischer Erkrankungen eine zentrale Rolle.

Basophile Granulozyten und Mastzellen sind sich in ihrer Funktion sehr ähnlich. Beide ruhen in Geweben und fungieren als Wächterzellen. Sie enthalten in ihrem Zytosol zahlreiche Granula, in denen sich Histamin, Serotonin und Heparin befindet. Aktiviert werden sie über klassische Mustererkennungsrezeptoren und Immunglobuline der Klasse E (IgE). Dies führt zur Freisetzung der Botenstoffe, wodurch sich unter anderem die Permeabilität der Gefäßwände erhöht und eosinophile Granulozyten angelockt werden.

Eosinophile Granulozyten machen nur 2 – 4% der Abwehrzellen im Blut aus und haben eine Lebensdauer von einigen Tagen. Durch bestimmte Zytokine kann diese jedoch auf mehrere Wochen verlängert werden. Sie sezernieren Enzyme, die die Plasmamembran von Erregern schädigen können (Peroxidase, Major-Basisches-Protein) (Murphy et al. 2009).

1.3.2.5. Natural Killer-Zellen

Funktionell kann man auch Natural Killer-Zellen (NK-Zellen) zum angeborenen Immunsystem zählen, obwohl sie sich aus einer Vorläuferzelle des adaptiven Immunsystems entwickeln. Ihre Hauptfunktion ist die Beseitigung virusinfizierter oder entarteter Körperzellen. Dazu erkennen sie körpereigene Zellen, die keine MHC-I Moleküle auf ihrer Oberfläche ausbilden. Diese sind auf allen gesunden Zellen vorhanden, können allerdings im Rahmen einer Entartung oder einer Virusinfektion verloren gehen. Binden sie an eine pathologisch veränderte Zelle, induzieren sie die Apoptose, also den

programmierten Selbsttod der Zelle. Intakte Körperzellen werden nicht attackiert, da NK-Zellen durch MHC-I gehemmt werden (Murphy et al. 2009).

1.3.2.6. Komplementsystem

Neben den verschiedenen Zelltypen zählen auch die Moleküle des Komplementsystems zum angeborenen Immunsystem. Es handelt sich dabei um mehrere Proteasen (Faktor C1 bis C9), die in der Leber gebildet und an das Blut abgegeben werden. Erregerzellen können mit Komplementfaktoren bedeckt werden, wodurch die Zellen zur Phagozytose markiert oder durch eine Pore in der Zellmembran (Membran-Angriff-Komplex) abgetötet werden. Des Weiteren wirken einige Komplementfaktoren (C3a, C4a, C5a) stark chemotaktisch, sodass Entzündungszellen angelockt werden. Das Komplementsystem kann über drei Wege aktiviert werden. Beim klassischen Weg erfolgt die Aktivierung durch Immunglobuline, die an pathogene Strukturen binden. Beim Lektin-Weg bindet das Mannose-bindende Lektin an eine körperfremde Struktur und aktiviert dadurch das Komplementsystem. Ein dritter Mechanismus ist der alternative Weg, bei dem der zufällige Zerfall des Faktors C3 in Anwesenheit von Bakterien die Enzymkaskade in Gang setzt (Murphy et al. 2009).

1.3.3. Adaptives Immunsystem

1.3.3.1. B-Lymphozyten

B-Lymphozyten (B-Zellen) entwickeln sich im Knochenmark und wandern nach der Reifung als naive B-Zellen in die peripheren lymphatischen Organe, wie Lymphknoten oder Milz. An ihrer Zellmembran befinden sich die B-Zell-Rezeptoren, mit denen körperfremde Antigene erkannt werden können. Während der Reifung lagern sich die DNA-Abschnitte, die für die Antigenbindungsstelle des Rezeptors kodieren, zufällig um, sodass jede einzelne B-Zelle einen einzigartigen B-Zell-Rezeptor erhält. Durch die große Anzahl an B-Zellen findet sich folglich für nahezu jedes körperfremde Antigen eine B-Zelle, die über einen passenden Rezeptor verfügt. Kommt es zu einer Infektion, wird nach Antigenerkennung und Aktivierung die passende B-Zelle zur Teilung angeregt und es kommt zur sogenannten klonalen Expansion. Das bedeutet, dass sich viele gleichartige Tochterzellen entwickeln, die eine effektive Immunantwort gegen diesen speziellen Erreger generieren können.

Die Aktivierung von B-Lymphozyten läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst wird ein pathogenes Antigen durch den B-Zell-Rezeptor gebunden und über die Plasmamembran in den intrazellulären Raum aufgenommen. Dort wird es in Lysosomen zerkleinert und dann, wie von Makrophagen und dendritischen Zellen, mit Hilfe von MHC-II Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert. Dies allein genügt jedoch nicht zur Aktivierung der B-Zelle, denn es wird zwingend eine Interaktion mit T-Lymphozyten (T-Zellen) benötigt. Diese können an das MHC-II Molekül andocken, wenn die präsentierten Antigenfragmente zu ihrem T-Zell-Rezeptor passen. Es bildet sich eine immunologische Synapse aus, eine Zell-Zell-Interaktion, bei der kostimulatorische Moleküle ausgetauscht werden. Dies führt dann dazu, dass die B-Zelle expandieren und zur Plasmazelle reifen kann.

Plasmazellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Antikörperproduktion aus. Antikörper binden an Erreger und Erregerprodukte, wie Toxine oder Viruspartikel. Dadurch schränken sie sie in ihrer Mobilität ein, markieren sie zur Phagozytose und lösen die Aktivierung des Komplementsystems aus. Ihre typische Struktur ist in Abbildung 1 dargestellt. Antikörper binden jeweils dasselbe Antigen wie der B-Zell-Rezeptor, der in seinem Aufbau einem in der Zellmembran verankerten Antikörper entspricht. Das bedeutet, dass sich die Immunantwort der Plasmazellen gegen dasselbe Antigen richtet, das ursprünglich zur Aktivierung der naiven B-Zelle geführt hat.

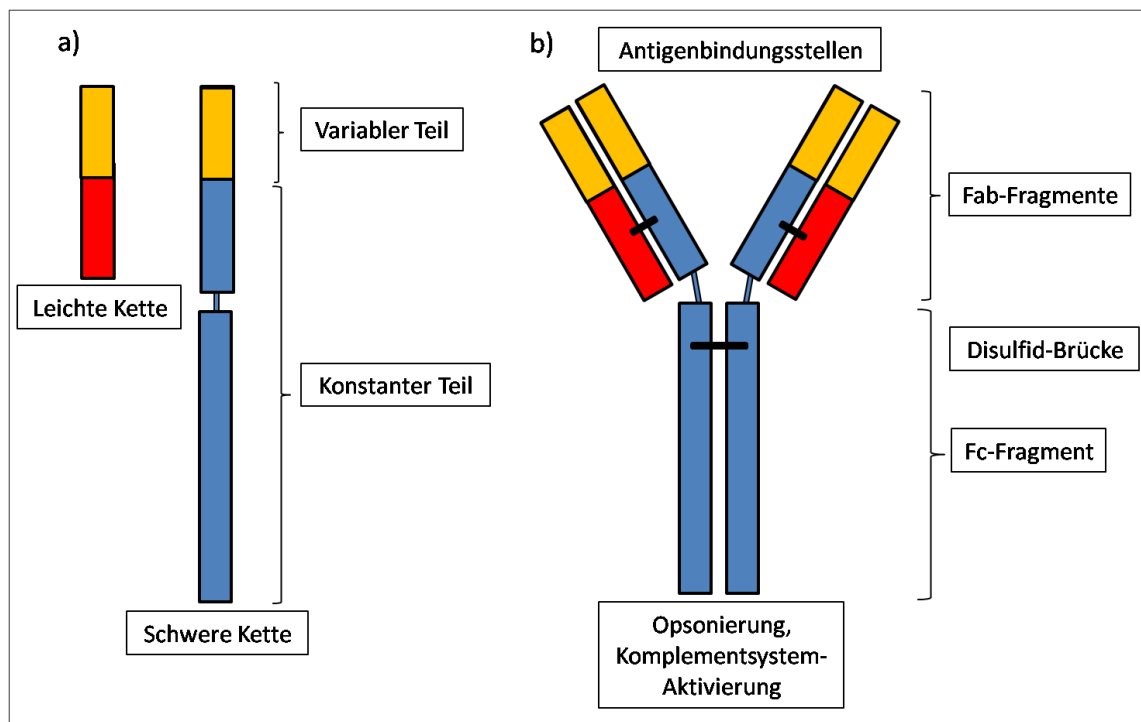


Abbildung 1
Strukturschema eines Antikörpers

Die größte Gruppe der Antikörper bilden die Immunglobuline der Klasse G (IgG), deren Aufbau hier schematisch gezeigt wird. **a)** Die Grundbausteine der Antikörper sind leichte und schwere Ketten. Diese bestehen aus einem konstanten und einem variablen Teil. Die schweren Ketten bestimmen den Subtyp des Antikörpers. **b)** Disulfid-Brücken verbinden leichte und schwere Ketten und bilden so das Grundgerüst der typischen Y-Struktur der Antikörper. Aus den leichten Ketten und Teilen der schweren Ketten bilden sich die Fab-Fragmente (fragment antigen binding), an deren Enden die spezifischen Antigenbindungsstellen liegen. Ist ein Antigen gebunden, ragt das Fc-Fragment (fragment crystallizable) nach außen. Dadurch wird die fremde Struktur unter anderem zur Phagozytose markiert (Opsonierung) oder das Komplementsystem aktiviert.

Es gibt 5 Klassen von Antikörpern (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM). Jeder Antikörpertyp besitzt eine bevorzugte Funktion. Bei einer Erstinfektion produzieren Plasmazellen in der Regel zunächst IgM und, in weit geringerem Ausmaß, auch IgD. Nach einigen Tagen kommt es dann zu einem Wechsel des Antikörpertyps, meist zu IgG (Immunglobulin-Switch). Dabei ändert sich nur die Klasse des Antikörpers, während die Bindungsstelle unverändert bleibt. IgA befindet sich vor allem in Schleimhäuten und Sekreten und unterstützt die Funktion der natürlichen Barrieren. IgE spielt bei der Abwehr von Würmern und Parasiten und im Rahmen von allergischen Erkrankungen eine Rolle.

Einige B-Lymphozyten bleiben nach Abschluss der Infektion als Gedächtniszellen zurück. Im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem gleichen Erreger, können sie rasch aktiviert werden. Durch eine frühzeitige und starke Antikörperproduktion wird eine Infektion in den meisten Fällen gänzlich verhindert. Auf diesem Mechanismus beruht auch die Wirkungsweise von Schutzimpfungen. Das adaptive Immunsystem wird dabei mit Erregerantigenen konfrontiert, bevor es zum natürlichen Kontakt mit den Erregern kommt. So kann sich eine schützende Immunitätslage aufbauen (Murphy et al. 2009).

1.3.3.2. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten (T-Zellen) entwickeln sich im Knochenmark und wandern zur Reifung in den Thymus. Ihre wichtigsten Aufgaben sind die Stimulation von B-Zellen und die Abtötung infizierter Körperzellen. Wie die B-Zelle verfügt jede T-Zelle über einen individuellen T-Zell-Rezeptor, der sich durch genetische Umlagerungen entwickelt. Im Gegensatz zum B-Zell-Rezeptor bindet der T-Zell-Rezeptor jedoch keine großen räumlichen Strukturen, sondern nur kurze Proteinfragmente von etwa 8 - 10 Aminosäuren Länge, die über MHC-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden. Im Thymus werden diejenigen T-Lymphozyten aussortiert, deren T-Zell-Rezeptor an körpereigene

Strukturen bindet. Dies stellt einen wichtigen Schutz vor autoimmunen Reaktionen dar. Sie verlassen den Thymus als naive T-Zellen und zirkulieren zwischen Blut und lymphatischen Organen. Dabei kommen sie ständig mit antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt. Die Interaktion mit dendritischen Zellen ist hierbei von größter Bedeutung. Präsentieren diese einen Komplex von MHC-Molekül und passendem Antigen an ihrer Oberfläche, entwickeln sich die naiven T-Zellen zu aktivierten T-Effektor-Lymphozyten. Nach Abschluss einer Infektion bleiben auch einige T-Zellen als Gedächtniszellen zurück. Analog den B-Zellen dient dies dem Aufbau des immunologischen Gedächtnisses (Murphy et al. 2009).

Man unterscheidet verschiedene Populationen von T-Lymphozyten (siehe Abbildung 2). T-Zellen, die CD4-Oberflächenmoleküle (cluster of differentiation) besitzen bezeichnet man als CD4-positive T-Zellen; T-Zellen mit CD8-Oberflächenmolekülen entsprechend als CD8-positive T-Zellen. Diese Unterscheidung ist mit funktionell unterschiedlichen Aufgaben verknüpft. Aktivierte CD4-positive T-Zellen stimulieren B-Zellen und werden daher auch als T-Helferzellen bezeichnet. Dazu binden sie an die MHC-II Moleküle der B-Zelle und induzieren die Reifung zur Plasmazelle. Außerdem fördern sie die Abwehrfähigkeiten von Makrophagen. CD8-positive T-Zellen hingegen binden an Körperzellen über MHC-I Moleküle. An diesen werden ständig intrazellulär gebildete Proteinfragmente präsentiert. Ist eine Zelle entartet oder von einem Virus infiziert, erkennen aktivierte CD8-positive T-Zellen körperfremde Antigene und induzieren die Apoptose. Dies führte zur Bezeichnung als zytotoxische T-Zelle (Wiesel and Oxenius 2012; Murphy et al. 2009).

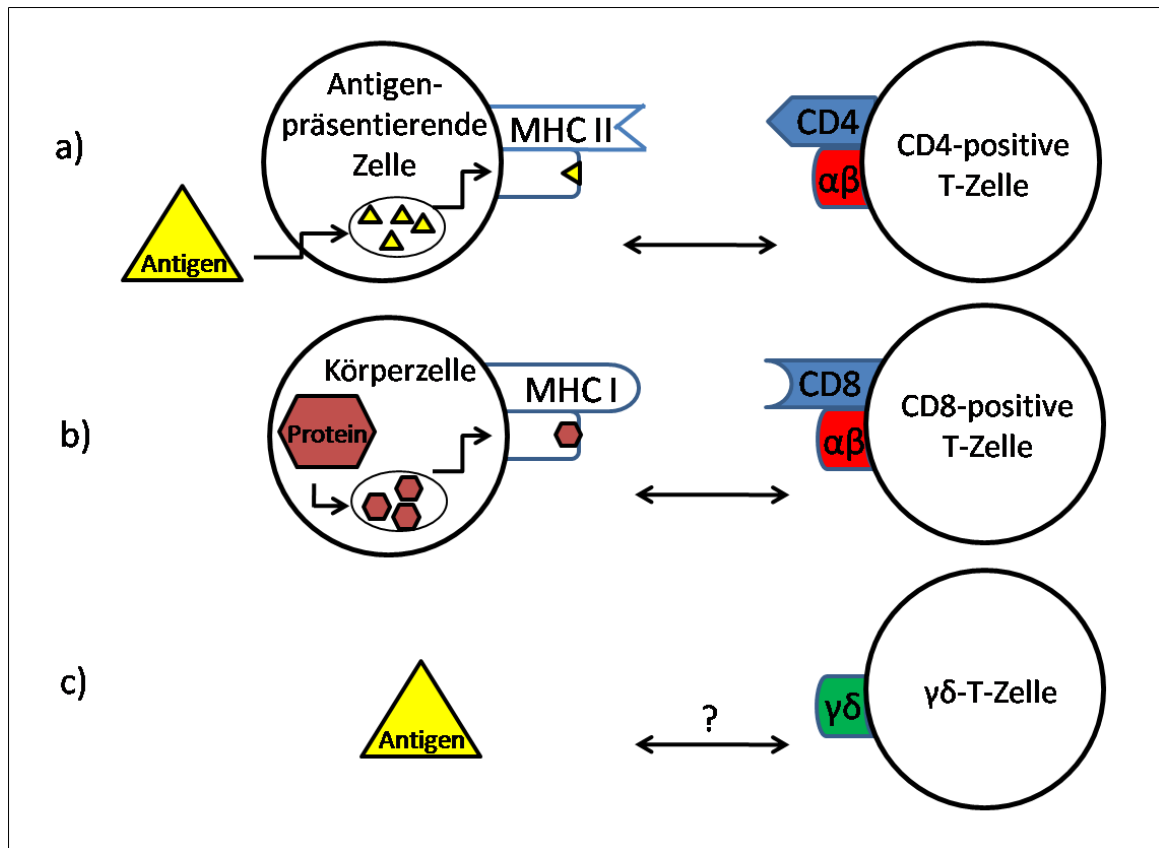


Abbildung 2
Übersicht über die T-Zellpopulationen

Verschiedene T-Zelltypen interagieren mit unterschiedlichen Zellen. **a)** Antigenpräsentierende Zellen nehmen extrazelluläre Antigene auf, prozessieren sie in den Lysosomen und präsentieren sie über MHC-II Moleküle. Der T-Zell-Rezeptor von CD4-positiven T-Zellen besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit. Sie gehen eine Bindung mit dem MHC-II-Antigen-Komplex ein. Dadurch können sie aktiviert werden oder die antigenpräsentierende Zelle stimulieren. **b)** Körperzellen präsentieren stetig Fragmente von intrazellulär produzierten Proteinen über MHC-I Moleküle. CD8-positive T-Zellen können körperfremde Proteinfragmente infizierter oder entarteter Zellen mit Hilfe des $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors erkennen und die Apoptose induzieren. **c)** $\gamma\delta$ -T-Zellen zeichnen sich durch ihren speziellen T-Zell-Rezeptor aus, der aus einer γ - und einer δ -Untereinheit besteht. Sie tragen keine CD4- oder CD8-Oberflächenmoleküle. Ihre genaue Funktionsweise ist noch unklar. Möglicherweise können sie direkt extrazelluläre Antigene binden.

Daneben existiert auch noch eine kleine Gruppe von T-Zellen, die weder CD4- noch CD8-Oberflächenmoleküle besitzen. Sie zeichnen sich durch einen spezifischen T-Zell-Rezeptor aus, der sich im Gegensatz zu CD4- und CD8-positiven T-Zellen nicht aus einer α - und einer β -Untereinheit, sondern aus einer γ - und δ -Untereinheit zusammensetzt. Sie wurden daher $\gamma\delta$ -T-Zellen genannt. Vermutlich können sie mit Hilfe dieses Rezeptors unabhängig von MHC-Molekülen an Antigene binden. Ihre Aufgaben und genaue Wirkungsweisen sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass sie eine unterstützende Rolle bei der Funktion der natürlichen Barrieren spielen (Girardi et al. 2006; Girardi 2006; Murphy et al. 2009).

Naive CD4-positive T-Zellen können zu unterschiedlichen Zelltypen reifen (siehe Abbildung 3). In welche Richtung sie sich entwickeln hängt wesentlich von der Stimulation durch dendritische Zellen und von dem umgebenden Zytokinmilieu ab. Es existieren mindestens vier Subpopulationen von CD4-positiven Zellen: Th1-Zellen, Th2-Zellen, Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen (T-reg). Jeder Subtyp zeichnet sich durch spezifische Transkriptionsfaktoren und ein bestimmtes Repertoire von Zytokinen aus. Th1- und Th2-Zellen inhibieren die Entwicklung der jeweils anderen Population. Während einer akuten Entzündung sind jedoch vermutlich meist beide Subpopulationen beteiligt. Im Rahmen von chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen oder Allergien findet man oft ein Überwiegen von entweder Th1- oder Th2-Zellen (Murphy et al. 2009).

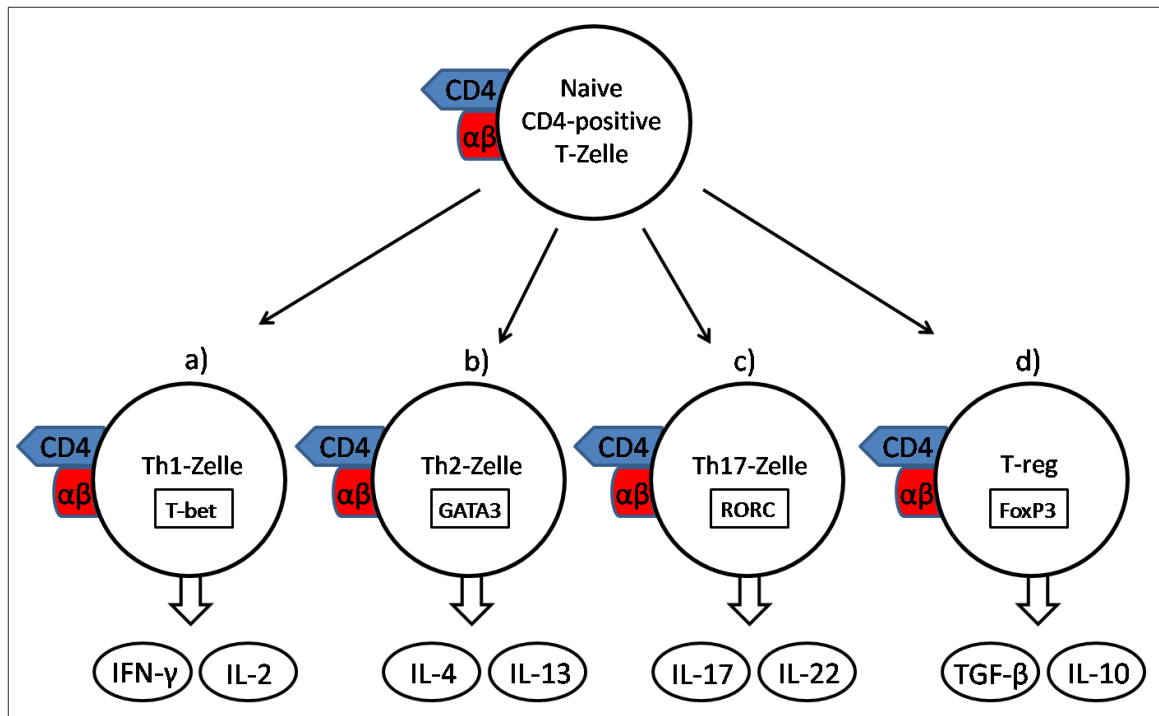


Abbildung 3
Übersicht über die Subpopulationen CD4-positiver T-Zellen

a) Th1-Zellen zeichnen sich durch den Transkriptionsfaktor T-bet aus. Sie produzieren die Zytokine Interferon- γ und Interleukin-2. Sie stimulieren die B-Zellreifung, die Funktion von Makrophagen und die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen. **b)** Für Th2-Zellen ist der Transkriptionsfaktor GATA3 charakteristisch. Sie fördern durch die Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-13 vor allem die Plasmazellreifung und die Antikörperproduktion. **c)** Bei Th17-Zellen ist der Transkriptionsfaktor RORC hochreguliert. Sie fördern durch die Zytokine Interleukin-17 und Interleukin-22 die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und die allgemeine Entzündungsreaktion im Gewebe. **d)** Regulatorische FoxP3-positive T-Zellen (T-reg) produzieren inhibitorische Zytokine (transforming growth factor- β , Interleukin-10). Dadurch können überschießende Immunantworten und autoimmune Reaktionen verhindert werden.

Th1-Zellen werden durch den Transkriptionsfaktor T-bet (T-box expressed in T cells) charakterisiert und produzieren die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2). Sie induzieren die Plasmazellreifung, stimulieren Makrophagen und fördern die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen. Bei Th2-Zellen findet sich der typische Transkriptionsfaktor GATA3. Sie fördern vor allem die humorale Immunantwort, indem sie über Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) Plasmazellen zur Proliferation anregen und den Immunglobulin-Switch zu IgG und IgE induzieren. Man nimmt an, dass

ein Überwiegen der Th2-Zellantwort und die damit verbundene Produktion von IgE allergische Erkrankungen begünstigen (Murphy et al. 2009).

Die Rolle von Th17-Zellen ist noch nicht vollständig erforscht. Besonderes wissenschaftliches Interesse erlangten sie durch ihre mögliche Beteiligung bei mehreren Autoimmunkrankheiten. Physiologisch scheinen sie eine Rolle bei der frühen Immunantwort zu spielen. Ihre Reifung unterliegt der Kontrolle des Transkriptionsfaktors RORC. Sie produzieren die Zytokine Interleukin-17A (IL-17A), Interleukin-17E (IL-17E), Interleukin-21 (IL-21) und Interleukin-22 (IL-22). Dadurch stimulieren sie Epithelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten vermehrt Defensine auszuschütten und Botenstoffe (CXCL8, CXCL2, Interleukin-6) zu produzieren, die die lokale Entzündungsreaktion verstärken und neutrophile Granulozyten anlocken (McGeachy and Cua 2008).

Gegenspieler von entzündungsfördernden T-Zellen sind regulatorische T-Zellen (T-reg). Ihre Entwicklung wird durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 gesteuert. Sie produzieren Zytokine, die aktivierte Immunzellen hemmen (Interleukin-10, transforming growth factor- β). Man unterscheidet wiederum zwei verschiedene Subpopulationen. Natural T-regs entwickeln sich bereits im Thymus. Sie erkennen mit ihrem Rezeptor körpereigene Antigene und hemmen somit Entzündungszellen, die sich im Rahmen einer autoimmunen Entzündungsreaktion entwickeln. Induced T-regs entstehen aus naiven T-Zellen und inhibieren eine überschießende Immunreaktion gegen körperfremde Erreger. Durch die dynamische Balance zwischen entzündungsfördernden und regulatorischen T-Zellen wird eine adäquate Immunreaktion entwickelt und die rechtzeitige Beendigung der Entzündungsvorgänge sichergestellt (Hori et al. 2003; Heiber and Geiger 2012).

II. Ziel der Untersuchung

Autoimmunpankreatitis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, deren Ursache bisher größtenteils unbekannt ist. Es gibt allerdings zahlreiche Hinweise darauf, dass autoimmune Entzündungsvorgänge an der Pathogenese beteiligt sind. T-Lymphozyten wurden bei vielen Autoimmunerkrankungen als wichtige Effektorzellen der fehlgeleiteten Immunreaktion beschrieben. Nahm man früher vor allem Th1-vermittelte Entzündungsreaktionen als Ursache autoimmuner Prozesse an, so rückte in den letzten Jahren die Balance zwischen Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen in den Fokus der Wissenschaft.

In dieser Arbeit wird die T-Zellantwort bei der Autoimmunpankreatitis genauer untersucht. Die Beteiligung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen wird dafür anhand einer Genexpressionsanalyse charakterisiert. Das T-Zellmuster der AIP wird dabei mit der chronischen Pankreatitis und normalem Pankreasgewebe verglichen. Ebenso werden Unterschiede zwischen den beiden Subtypen der AIP dargestellt. Ein besonderes Augenmerk wird auf die Beteiligung von Th17-Zellen gelegt, über deren Rolle es bei der AIP bisher noch keine Beschreibungen gibt.

In einem zweiten Schritt werden Th17-Zellen auf Proteinebene direkt im entzündlichen Gewebe der AIP nachgewiesen. Durch die Quantifizierung der Th17-Zellzahl und eine vergleichende Analyse ihrer Lokalisation in histopathologisch charakteristischen Bereichen wird der Frage einer möglichen Beteiligung von Th17-Zellen nachgegangen und relevante Unterschiede zwischen den AIP Subtypen dargestellt.

III. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Elektrophorese	Invitrogen	Carlsbad, CA, U.S.A.
Heizblock	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Light Cycler 480	Roche	Basel, Schweiz
Mikroskop	LEICA Mikrosystems	Nußloch, Deutschland
Mikrotom	LEICA Mikrosystems	Nußloch, Deutschland
Mikrowelle	Siemens	München, Deutschland
pH-Meter	Beckman Coulter	Brea, CA, U.S.A.
Zentrifuge	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Geräte

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Firmensitz
Deckblätter	MENZEL	Braunschweig, Deutschland
Light Cycler Multiwell Plate 96, white	Roche	Basel, Schweiz
Sterile Nadeln	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, U.S.A.
Superfrost Ultra Plus Objektträger	MENZEL	Braunschweig, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.3. Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Firmensitz
Agarose	Invitrogen	Carlsbad, CA, U.S.A.
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Dako Antibody Diluent, Background Reducing	Dako	Glostrup, Dänemark
Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen	Dako	Glostrup, Dänemark
Ethanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Gene Ruler 100 bp Ladder Ready to Use	Fermentas	Sankt Leon-Rot, Deutschland
Hämatoxylin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
3-N-Morpholino- Propansulfonsäure (MOPS)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Mouse IgG1 Negative Control X0931	Dako	Glostrup, Dänemark
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Roticlear	Roth	Karlsruhe, Deutschland
TRIS Base	Merck	Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Merck	Darmstadt, Deutschland
Universal Probe	Roche	Basel, Schweiz
VectaMount Mounting Medium	Vector Laboratories	Burlingame, CA, U.S.A.

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien

3.1.4. Antikörper

Antikörper	Hersteller	Firmensitz
Anti-human IL-17A Antikörper (H-132)	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, CA, U.S.A
Anti-human CD4 Antikörper MONX10329	MONOSAN Sanbio B.V.	Am Uden, Niederlande
Dako EnVision+ System HRP Anti-Mouse Antikörper	Dako	Glostrup, Dänemark
Dako EnVision+ System HRP Anti-Rabbit Antikörper	Dako	Glostrup, Dänemark

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

3.1.5. Kits

Kit	Hersteller	Firmensitz
Light Cycler 480 Probes Master Kit	Roche	Basel, Schweiz
QuantiTect Reverse Transcription Kit 205311	Qiagen	Hilden, Deutschland
SV Total RNA Isolation System Z3100	Promega	Madison, WI, U.S.A.

Tabelle 5: Verwendete Kits

3.1.6. Lösungen und Puffer

10x TRIS buffered saline (TBS)

TRIS Base	12,1g
NaCl	85g
Aqua dest.	800ml

pH 7,4 mit 5M HCl

Aqua dest.	ad 1000ml
------------	-----------

TRIS/EDTA Puffer (pH 9)

TRIS Base	1,21g
EDTA	0,37g
Aqua dest.	ad 1000ml

RNA Elektrophorese Gel

DEPC Wasser	85ml
Agarose	1g
MOPS	10ml
Formaldehyd (38%)	5ml

DNA Elektrophorese Gel

DEPC Wasser	100ml
Agarose	2g

3.2. Methoden

3.2.1. Gewebesammlung und Patientencharakteristika

Die Gewebeproben der AIP und der chronischen Pankreatitis wurden im Rahmen von Operationen der chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg und der Technischen Universität München in den Jahren 2002 - 2010 entnommen. Die Proben des normalen Pankreas stammen von Organspenden gesunder Patienten, für die kein passender Empfänger gefunden werden konnte. Alle Patienten wurden ärztlich über die Studie aufgeklärt und haben schriftlich ihre Zustimmung zur wissenschaftlichen Untersuchung gegeben. Die Proben wurden ausschließlich anonymisiert verwendet. Es erfolgte keine Verknüpfung mit den persönlichen Daten der Patienten.

Die Gewebeproben für die RNA-Analyse wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Zur weiteren Untersuchung wurden die Proben geschnitten und mit einer sterilen Spritze in RNase freiem Wasser verflüssigt.

Die Gewebeproben für die immunhistochemischen Färbungen wurden direkt nach der Entnahme 24 Stunden in Formaldehyd-Lösung eingelegt und anschließend in 70% Ethanol gelagert. Danach wurden die Proben blasenfrei in flüssigem Paraffin eingebettet. Serielle Schnitte wurden angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Diagnostik erfolgte durch erfahrene Pathologen des Instituts für Pathologie der Universität Heidelberg und der Technischen Universität München.

Die Patientencharakteristika der in der quantitativen real-time Polymerase-Chain-Reaction (q-RT-PCR) verwendeten Gewebeproben sind in Tabelle 6 dargestellt.

Histologische Diagnose		AIP	CP	NP
Anzahl		9	9	13
Geschlecht	männlich	8	6	7
	weiblich	1	3	6
Mittleres Alter bei Diagnosestellung \pm SA		50 \pm 13,7	50,9 \pm 14,9	50,7 \pm 17,9
Altersspanne		33 - 70	32 - 70	17 - 75

Tabelle 6: Patientencharakteristika der quantitativen real-time PCR Untersuchung
 Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreas, SA: Standardabweichung, Alter angegeben in Jahren

Die Gewebeproben der AIP, die mit Hilfe der q-RT-PCR untersucht wurden, können unterteilt werden in 7 AIP Typ I und 2 AIP Typ II. Tabelle 7 zeigt die Patientencharakteristika der AIP Subtypen.

Histologische Diagnose		AIP Typ I	AIP Typ II
Anzahl		7	2
Geschlecht	männlich	6	2
	weiblich	1	0
Mittleres Alter bei Diagnosestellung \pm SA		49,6 \pm 11,6	51,5 \pm 26,1
Altersspanne		34 - 66	33 - 70

Tabelle 7: Patientencharakteristika der AIP Subtypen in der quantitativen real-time PCR Untersuchung
 Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, SA: Standardabweichung, Alter angegeben in Jahren

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbung wurden 18 Gewebeproben der AIP untersucht. Dabei handelt es sich um jeweils 9 AIP Typ I und 9 AIP Typ II. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 8 dargestellt.

Histologische Diagnose		AIP Typ I	AIP Typ II
Anzahl		9	9
Geschlecht	männlich	8	8
	weiblich	1	1
Mittleres Alter bei Diagnosestellung \pm SA		66,4 \pm 8,5	37,8 \pm 18,1
Altersspanne		54 – 79	16 – 64

Tabelle 8: Patientencharakteristika der AIP Subtypen in der immunhistochemischen Färbung
 Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, SA: Standardabweichung, Alter angegeben in Jahren

3.2.2. Quantitative real-time Polymerase-Chain-Reaction

Mit der Methode der q-RT-PCR kann man die Genexpression einer Zelle anhand der messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) bestimmen. Die Genexpression bestimmt das Proteinrepertoire und somit Art und Funktion der Zelle.

Die RNA wurde mit Hilfe des Promega SV Total RNA Isolation System isoliert. Zur Testung der RNA-Qualität wurden 5µl RNA mit 1µl 1:10 verdünntem Ethidiumbromid auf das RNA-Testgel aufgetragen und per Elektrophorese bei 50mV in MOPS-Lösung langsam laufen gelassen. Der größte Anteil der in der Zelle enthaltenen RNA ist ribosomale-RNA (rRNA), welche aus zwei Untereinheiten besteht. Man unterscheidet anhand des Sedimentationskoeffizienten eine 40S (Svedberg) und eine 60S Untereinheit. Zeigen sich unter ultraviolettem Licht (UV-Licht) zwei deutliche Banden (siehe Abbildung 4), die den beiden Untereinheiten der rRNA entsprechen, kann man davon ausgehen, dass die gesamte RNA während der Probenentnahme, Lagerung und Isolierung intakt geblieben ist.

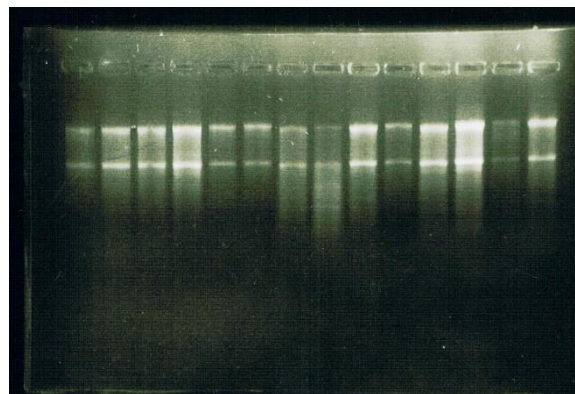


Abbildung 4
RNA-Testgel

Die RNA-Qualität wurde in der Gelelektrophorese überprüft. Es zeigen sich in dem Beispielbild bei allen Proben zwei deutliche Banden, die den zwei Untereinheiten der rRNA entsprechen.

Im Anschluss wurden die RNA-Proben mit Hilfe des Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit in die stabilere complementary DNA (cDNA) überschrieben.

Die q-RT-PCR wurde mit dem Light Cycler 480 System unter Verwendung des Light Cycler 480 Probes Master Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR besteht aus mehreren Zyklen der Erhitzung und Abkühlung. Bei jeder Erhitzung trennt sich die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge. Durch die thermostabile Taq-Polymerase werden die gesuchten Abschnitte der DNA-Stränge in jedem Zyklus kopiert. Start- und Endpunkt für die Vervielfältigung werden durch Primer festgelegt, spezifische Oligonukleotide, die an eine bestimmte Gensequenz der DNA binden. Beim Abkühlen lagern sich die neu synthetisierten DNA-Stränge erneut an die Primer an, wodurch im nächsten Zyklus die Menge der gesuchten DNA-Abschnitte verdoppelt wird. Dadurch ergibt sich im Laufe der Wiederholungen eine exponentielle Vervielfältigung der DNA.

Bei der konventionellen PCR werden die Proben danach unter Zugabe von Ethidiumbromid auf ein Agarosegel aufgetragen. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNA-Stränge anlagert. Unter UV-Licht zeigt es eine orangefarbene Farbe, wodurch die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode. Die im Gel enthaltene Agarose sorgt für eine Auftrennung der DNA nach ihrer Größe, sodass kleine Fragmente weiter wandern als große. Diese Methode wurde verwendet um die Bindungseigenschaft der Primer zu überprüfen. Dafür wurde von jedem Primer eine PCR mit Milz- und Darmgewebe durchgeführt. Die Länge der entstandenen DNA-Fragmente wurde anhand der Fermentas Gene Ruler 100 bp Ladder auf dem Agarosegel abgelesen und mit der Länge der gesuchten Amplikons verglichen. So wurde gewährleistet, dass die Bindungseigenschaften der Primer im gegebenen Versuchsaufbau regelrecht sind.

Die Länge der Amplikons und die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Primer	Amplikonlänge	Sequenz 5' → 3'
CD4	70 nt	for: ggc agt gtc tgc tga gtg ac
		rev: gac cat gtg ggc aga acc
CD8	106 nt	for: tca tgg cct tac cag tga cc
		rev: agg ttc cag gtc cga tcc
FoxP3	65 nt	for: acc tac gcc acg ctc atc
		rev: tca ttg agt gtc cgc tgc t
GATA3	68 nt	for: ctc att aag ccc aag cga ag
		rev: gtc tga cag ttc gca cag ga
ICOS	73 nt	for: gga tgc ata ctt att tgt tgg ctt a
		rev: tgt att cac cgt tag ggt cgt
IL-10	105 nt	for: gat gcc ttc agc aga gtg aa
		rev: gca acc cag gta acc ctt aaa
IL-17A	84 nt	for: tgg gaa gac ctc att ggt gt
		rev: gga ttt cgt ggg att gtg at
IL-21	68 nt	for: agg aaa cca cct tcc aca aa
		rev: gaa tca cat gaa ggg cat gtt
RORC	73 nt	for: aga agg aca ggg agc caa g
		rev: tgc aag gga tca ctt caa ttt
RPL13A	124 nt	for: ctg gac cgt ctc aag gtg tt
		rev: gcc cca gat agg caa act t
TBx21	77 nt	for: tgt ggt cca agt tta atc agc a
		rev: tga cag gaa tgg gaa cat cc

Tabelle 9: Primersequenzen

Legende: nt: Nukleotid, for: Forward Primer (left), rev: Reverse Primer (right)

Bei der q-RT-PCR wird die relative DNA-Menge bestimmt. Dafür werden die Primer mit Flourochromen (Universal Probes) markiert, die immer dann ein Signal abgeben, wenn die Taq-Polymerase an den Primer bindet. Jede neu synthetisierte Kopie des DNA-Stranges erzeugt ein Fluoreszenzsignal. Die exponentielle Phase der DNA-Vervielfältigung beginnt bei einer großen Menge gesuchter DNA-Abschnitte früher als bei einer kleinen. Der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz erstmalig exponentiell ansteigt, wird als Crossing Point (CP) angegeben. Dieser Wert wird mit dem des Referenz Gens RPL13A, das sich in

vorherigen Testungen als konstant exprimiert bei allen untersuchten Gewebetypen gezeigt hat, in Relation gesetzt. Daraus wird die relative Expression des gesuchten Gens berechnet.

Jede Messung wurde inklusive einer Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Milzgewebe. Als Negativkontrolle wurde analytisch reines Wasser verwendet. Alle Proben wurden zweimal untersucht und der Mittelwert bestimmt. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der GraphPad-Software. Statistische Signifikanz zwischen den untersuchten Gruppen wurde mit dem ungepaarten t-Test (Student's Test) ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ definiert.

3.2.3. Immunhistochemische Färbung

Durch immunhistochemische Färbungen werden Proteine in Gewebeschnitten spezifisch angefärbt und können anschließend unter dem Mikroskop beurteilt werden.

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde dazu 3µm dünn geschnitten auf Objektträger aufgebracht. Zur besseren Haftung wurden die Schnitte bei 60° C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Deparaffinisierung in Roticlear für dreimal 10 Minuten. Zur Rehydrierung des Gewebes wurde eine absteigende Alkoholreihe mit jeweils dreimal 100% Ethanol sowie darauffolgend 96%, 70% und 50% Ethanolverdünnungen sowie destilliertem Wasser durchgeführt.

Da sich durch die Einbettung des Gewebes in Paraffin Querbrücken zwischen den gesuchten Antigenen ergeben können, folgte zur Demaskierung der Strukturen eine hitzeinduzierte Antigenvorbehandlung in TRIS/EDTA Puffer (pH 9) für zweimal 10 Minuten bei 600W in der Mikrowelle. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte ein Waschschrift in destilliertem Wasser und TBS/0,1%BSA.

Da die endogene Peroxidase unspezifische Reaktionen hervorrufen kann, erfolgte ein 10-minütiger Peroxidaseblock mit Methanol/3% Wasserstoffperoxid. Nach einem weiteren Waschschrift in TBS/0,1% BSA wurde ein Proteinblock mit 3% BSA in TBS-Lösung zur Minimierung der unspezifischen Aktivität des Zweitantikörpers durchgeführt.

Anschließend wurde der CD4-Antikörper aufgetragen und in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurde stets IgG-Serum der gleichen Spezies verwendet, aus der der Erstantikörper stammt.

Es wurden die in Tabelle 10 angegebenen Verdünnungen in Dako Antibody Diluent verwendet.

Antikörper	Verdünnung
IL-17A	1:200
CD4	1:60

Tabelle 10: Verdünnung der verwendeten Antikörper

Am folgenden Tag wurden die Schnitte 10 Minuten in TBS/0,1% BSA/0,05% Tween20 und anschließend 10 Minuten in TBS/0,1% BSA gewaschen, um den überschüssigen, nicht gebundenen Erstantikörper zu entfernen. Dann wurde der anti-mouse Zweitantikörper (Dako EnVision+ System HRP) aufgetragen, der sich gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers richtet, und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift in TBS/0,1% BSA/0,05% Tween20 und TBS/0,1% BSA wurde die Farbreaktion mit Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen erzielt.

Die Reaktionszeit wurde in vorhergehenden Testfärbungen auf die in Tabelle 11 angegebenen Zeiten festgelegt.

Antikörper	Farbreaktionszeit
IL-17A	25
CD4	60

Tabelle 11: Farbreaktionszeit der verwendeten Antikörper
Zeit angegeben in Sekunden

Die Reaktion wurde in destilliertem Wasser gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit TBS/0,01%BSA gewaschen und der IL-17A-Antikörper aufgetragen. Daraufhin wiederholten sich die Färbungsschritte unter Verwendung eines roten Chromogens. Danach wurden die Schnitte in Hämatoxylinlösung nach Mayer für 3 Sekunden gefärbt und anschließend 10 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen.

Um die Schnitte zu konservieren durchwanderten sie eine aufsteigende Alkoholreihe sowie eine dreimalige Inkubation in Roticlear für jeweils 10 Minuten. Die Abdeckung der Schnitte mit Coverslips wurde mit VectaMount Mounting Medium durchgeführt.

Doppelt positiv angefärbte Zellen wurden bei jedem Gewebeschnitt in je fünf HPFs der Bereiche „Periduktal“, „Periazinär“ und „Lymphozytäres Infiltrat“ gezählt und die Mittelwerte berechnet. Die graphische Darstellung erfolgte mit der GraphPad-Software. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test (Student's Test) bestimmt. Als Signifikanzlevel wurde $p < 0,05$ definiert.

IV. Ergebnisse

4.1. Genexpressionsanalyse

4.1.1. Vergleich der T-Zellpopulationen zwischen der Autoimmunpankreatitis, chronischer Pankreatitis und normalem Pankreasgewebe anhand charakteristischer Transkriptionsfaktoren und Zytokine

Die relative mRNA-Expression spezifischer T-Zellmarker wurde durch die q-RT-PCR untersucht. Es wurden 9 Gewebeprobe der AIP, 9 Gewebeprobe chronischer Pankreatitis (CP) und 13 Proben von normalem Pankreasgewebe (NP) miteinander verglichen.

4.1.1.1. T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

CD4-Oberflächenmoleküle sind charakteristisch für T-Helferzellen. Die CD4-Expression ist bei der AIP im Vergleich zur chronischen Pankreatitis und zum normalen Pankreasgewebe signifikant erhöht.

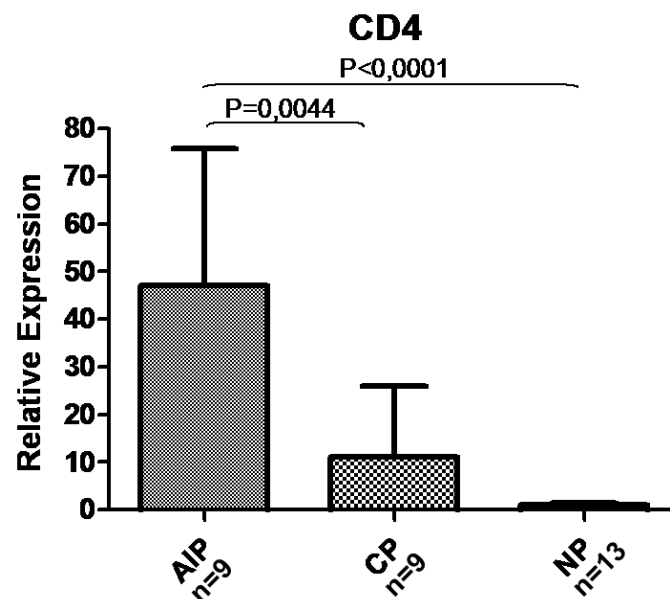


Abbildung 5
Relative Expression der CD4-mRNA

Die relative Expression von CD4 ist im Gewebe der AIP im Vergleich zur chronischen Pankreatitis und zum normalen Pankreasgewebe signifikant erhöht. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

CD8 ist das charakteristische Oberflächenmolekül zytotoxischer T-Zellen. Die relative Expression von CD8-mRNA unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der AIP und der chronischen Pankreatitis. Im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe zeigt sich bei der AIP jedoch eine signifikant erhöhte Expression von CD8-mRNA.

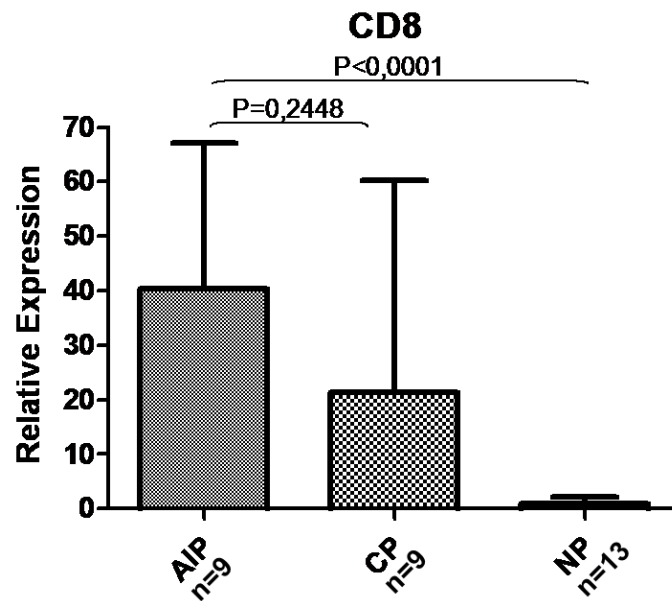


Abbildung 6
Relative Expression der CD8-mRNA

Die relative Expression der CD8-mRNA unterscheidet sich nicht zwischen der AIP und der chronischen Pankreatitis. Es zeigt sich bei der AIP jedoch eine signifikant erhöhte CD8-Expression im Vergleich zum Normalgewebe. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

4.1.1.2. Th1- und Th2-Zellen

Der Transkriptionsfaktor TBx21 (auch T-bet) ist charakteristisch für Th1-Zellen und kontrolliert die Produktion des Zytokins IFN- γ (Szabo et al. 2000). Die Expression von TBx21-mRNA ist bei der AIP und der chronischen Pankreatitis im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe erhöht. Zwischen der AIP und der chronischen Pankreatitis besteht kein signifikanter Unterschied.

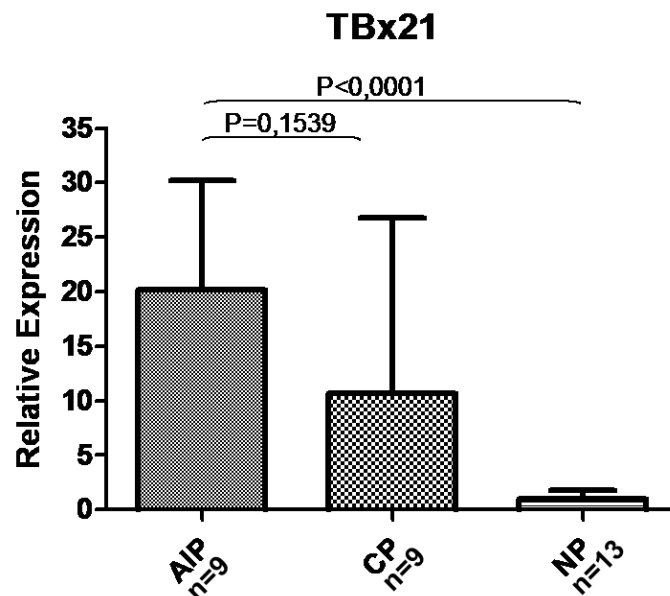


Abbildung 7

Relative Expression der TBx21-mRNA

Die relative Expression der TBx21-mRNA ist bei der AIP und der chronischen Pankreatitis im Vergleich zum Normalgewebe erhöht. Kein Unterschied zeigt sich zwischen der AIP und der chronischen Pankreatitis. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

Th2-Zellen werden durch den Transkriptionsfaktor GATA3 und die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert. Sie fördern die Plasmazellreifung und die humorale Immunantwort (Murphy et al. 2009). Die relative Expression der GATA3-mRNA ist bei der AIP signifikant höher als bei der chronischen Pankreatitis und dem normalem Pankreasgewebe.

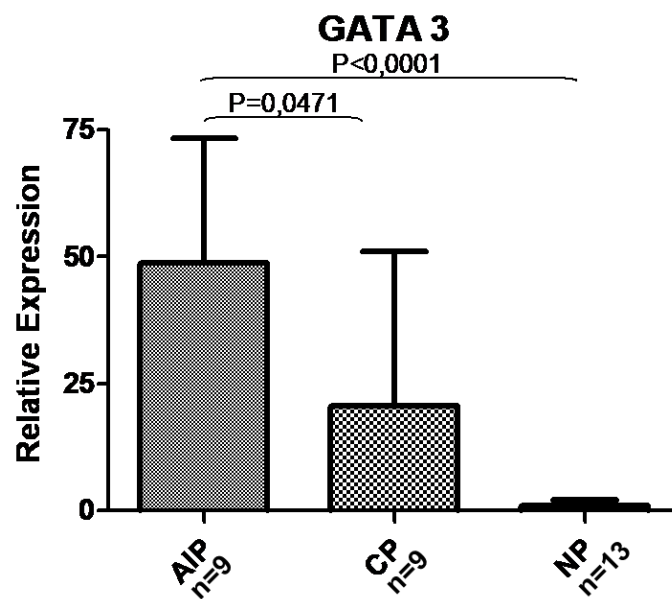


Abbildung 8
Relative Expression der GATA3-mRNA

Die relative Expression der GATA3-mRNA ist bei der AIP im Vergleich zur chronischen Pankreatitis und zum normalen Pankreasgewebe signifikant erhöht. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

4.1.1.3. Th17-Zellen

Für Th17-Zellen ist die vermehrte Expression der RORC-mRNA charakteristisch. Sie kodiert für den „retinoid orphan nuclear receptor“ ROR- γ t, der die Produktion der Zytokine IL-17A, IL-17F und des IL-23 Rezeptors steuert (McGeachy and Cua 2008; Ivanov et al. 2006). Es ließ sich sowohl bei der AIP, als auch bei der chronischen Pankreatitis eine erhöhte Expression von RORC-mRNA im Vergleich zum Normalgewebe nachweisen.

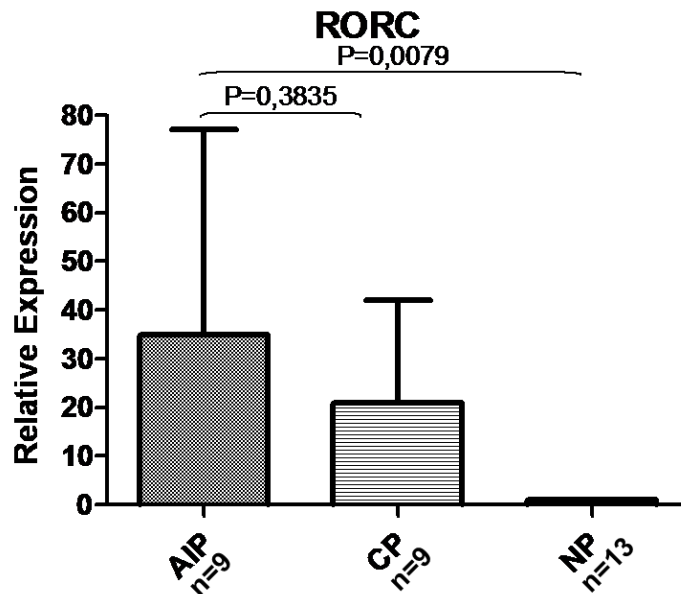


Abbildung 9
Relative Expression der RORC-mRNA

Die relative Expression von RORC-mRNA ist bei der AIP und der chronischen Pankreatitis im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe signifikant erhöht. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

Das Zytokin IL-17A wird nahezu ausschließlich von Th17-Zellen produziert und wirkt proinflammatorisch. Rezeptoren für IL-17A befinden sich auf zahlreichen Immun-, Endothel- und Epithelzellen, sowie Fibroblasten und Keratinozyten (Murphy et al. 2009). Die relative Expression von IL-17A-mRNA ist bei der AIP und der chronischen Pankreatitis im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe signifikant erhöht.

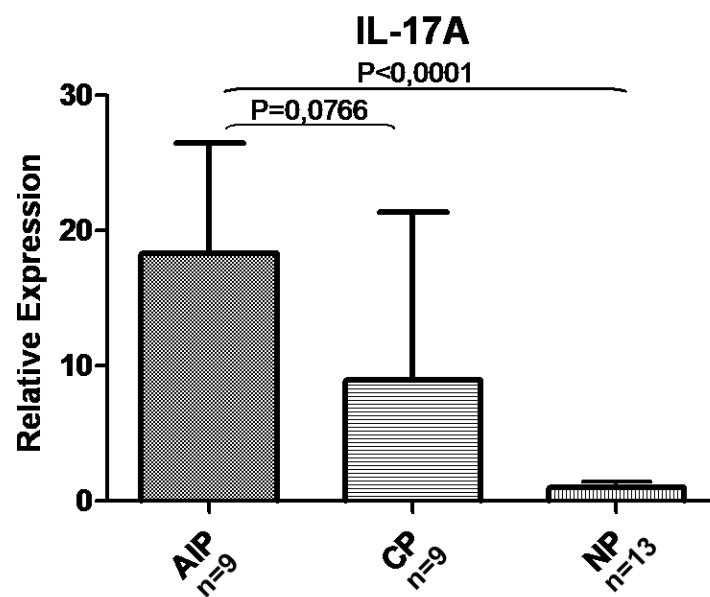


Abbildung 10
Relative Expression der IL-17A-mRNA

Die relative Expression der IL-17A-mRNA ist bei der AIP und der chronischen Pankreatitis im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erhöht. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

IL-21 spielt für die Entwicklung von Th17-Zellen eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass IL-21 in Kombination mit TGF- β bei naiven CD4-positiven T-Zellen die Expression aller Charakteristika von Th17-Zellen induziert. Dazu zählen das Zytokin IL-17A, der Transkriptionsfaktor RORC und der IL-23-Rezeptor. Aktivierte Th17-Zellen sezernieren große Mengen von IL-21 und stimulieren so autokrin die Th17-Zellreifung und -aufrechterhaltung (Korn et al. 2007a; Zhou et al. 2007). Bei der AIP ist die relative Expression von IL-21-mRNA signifikant höher als bei der chronischen Pankreatitis und im normalen Pankreasgewebe.

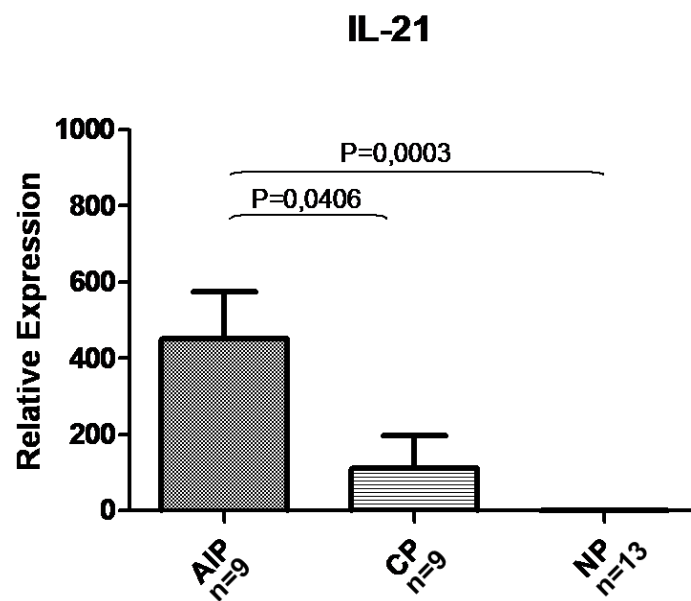


Abbildung 11
Relative Expression von IL-21-mRNA

Die relative Expression von IL-21-mRNA ist bei der AIP signifikant erhöht im Vergleich zur chronischen Pankreatitis und zum Normalgewebe. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

Das kostimulatorische Molekül ICOS (inducible T-cell costimulator) wird von aktivierten CD4-positiven T-Zellen gebildet (Hutloff et al. 1999). Neue Erkenntnisse deuten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und/oder Aufrechterhaltung einer Th17-Immunantwort an. So wurde gezeigt, dass ICOS bei naiven T-Zellen den charakteristischen Transkriptionsfaktor RORC aktivieren kann (Paulos et al. 2010). Außerdem scheint ICOS für die Produktion des Zytokins IL-21 und somit für die Aufrechterhaltung von Th17-Zellen notwendig zu sein (Bauquet et al. 2009). Es lässt sich bei der AIP und der chronischen Pankreatitis eine erhöhte Expression von ICOS-mRNA im Vergleich zum Normalgewebe nachweisen.

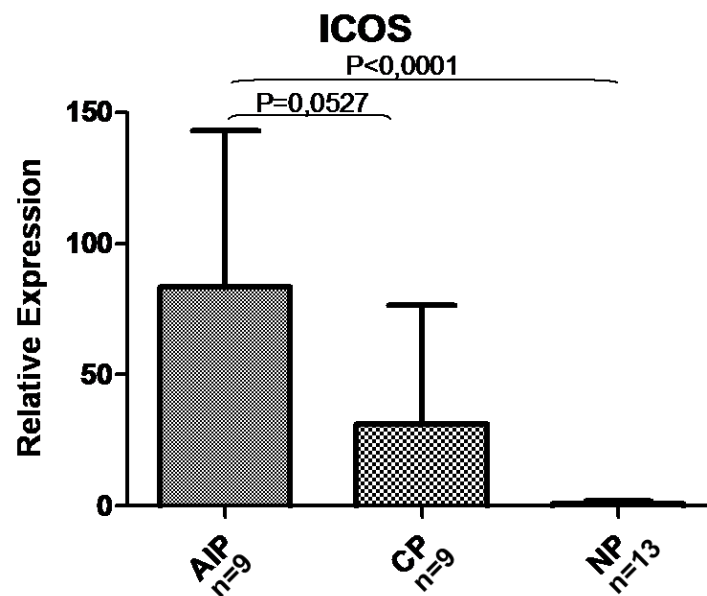


Abbildung 12

Relative Expression von ICOS-mRNA

Die relative Expression von ICOS-mRNA ist bei der AIP und der chronischen Pankreatitis im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe signifikant erhöht. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

4.1.1.4. Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen begrenzen Entzündungsreaktionen und verhindern überschießende Immunreaktionen durch die inhibitorischen Zytokine TGF- β und IL-10. Sie bieten so einen Schutz vor der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen. Ihre Entwicklung wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 gesteuert (Hori et al. 2003). Es zeigt sich bei der AIP eine sehr starke Expression der FoxP3-mRNA, die bei der gegebenen Fallzahl jedoch nicht signifikant höher ist als bei der chronischen Pankreatitis. Im Vergleich zum Normalgewebe ist die FoxP3-Expression bei der AIP signifikant erhöht.

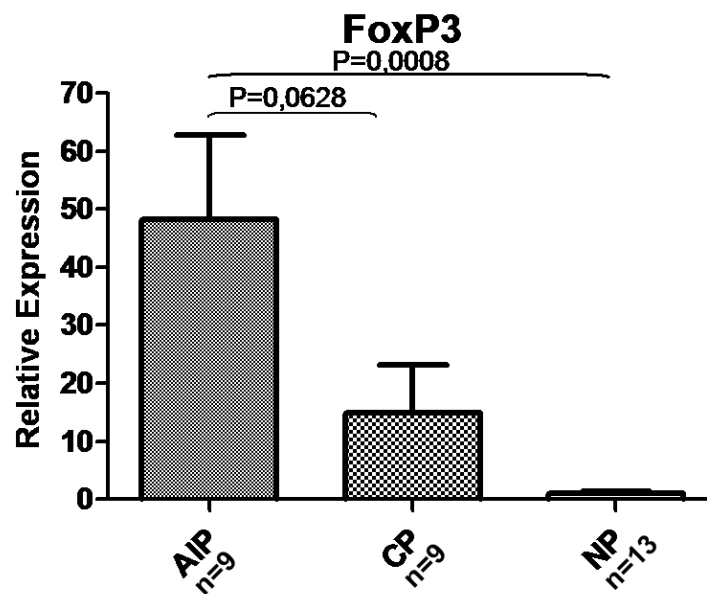


Abbildung 13
Relative Expression der FoxP3-mRNA

Die relative Expression der FoxP3-mRNA ist bei der AIP und der chronischen Pankreatitis im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe signifikant erhöht. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

IL-10 zählt zu den inhibitorischen Zytokinen. Es wird angenommen, dass IL-10 die antigenpräsentierende Aktivität von dendritischen Zellen und Makrophagen hemmen und so negativ auf die Aktivierung von T-Zellen wirken kann. Von daher wird IL-10 eine zentrale Rolle bei der Eindämmung überschießender oder fehlgeleiteter Immunreaktionen zugeschrieben. IL-10 wird unter anderem von Monozyten, Th2-Zellen und regulatorischen T-Zellen produziert (Grutz 2005). Bei der AIP und der chronischen Pankreatitis ist die relative Expression der IL-10-mRNA im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe signifikant erhöht. Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der AIP und der chronischen Pankreatitis.

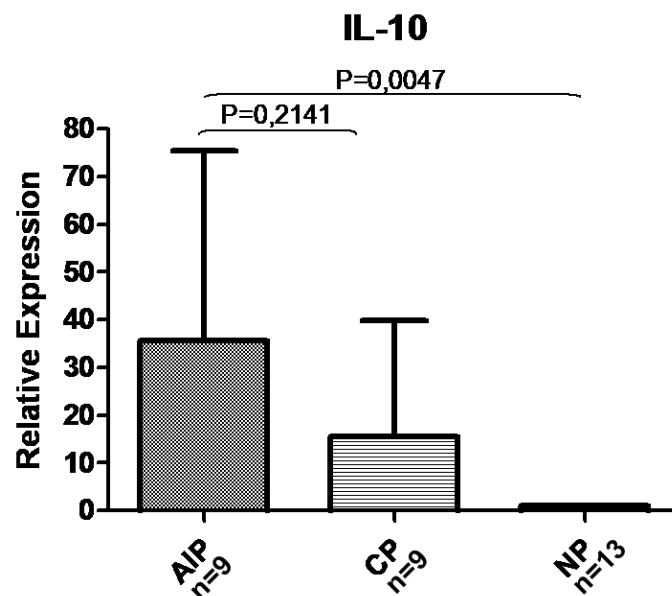


Abbildung 14

Relative Expression der IL-10-mRNA

Die relative Expression der IL-10-mRNA ist bei der AIP und der chronischen Pankreatitis im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe signifikant erhöht. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

4.1.1.5. Zusammenfassung

Es zeigt sich sowohl bei der AIP als auch bei der chronischen Pankreatitis eine deutliche Aktivierung des Immunsystems. Bei beiden Entzündungsformen lässt sich eine Aktivierung aller T-Zellreihen nachweisen. Dabei ist die Ausprägung der Immunantwort bei der AIP stärker als bei der chronischen Pankreatitis. Insbesondere die Expression von CD4-, Th2- und Th17-Markern ist bei der AIP im Vergleich zur chronischen Pankreatitis signifikant erhöht. Im normalen Pankreasgewebe zeigt sich nahezu keine Expression von T-Zellmarkern.

Relative Expression der charakteristischen T-Zellmarker			
	AIP vs. NP	CP vs. NP	AIP vs. CP
T-Helferzellen	↑	↑	↑
Zytotoxische T-Zellen	↑	↑	↔
Th1-Zellen	↑	↑	↔
Th2-Zellen	↑	↑	↑
Th17-Zellen	↑	↑	↑
T-reg	↑	↑	↔

Abbildung 15

Zusammenfassung der T-Zellmarker bei der Autoimmunpankreatitis und der chronischen Pankreatitis

Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe, vs.: versus, senkrechte Pfeile: erhöhte Expression, waagerechte Doppelpfeile: kein signifikanter Unterschied

4.1.2. Vergleich der T-Zellpopulationen zwischen der Autoimmunpankreatitis Typ I und II

Nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen kann man zwei verschiedene Arten der AIP unterscheiden: Die AIP Typ I, die sich durch die starke Invasion von IgG4-positiven Plasmazellen auszeichnet, und die AIP Typ II, bei der charakteristischerweise granulozytäre epitheliale Läsionen (GEL) der kleinen und mittelgroßen Pankreasgänge nachgewiesen werden können (Chari et al. 2010a). Um einen etwaigen Unterschied der Immunreaktion zwischen der AIP Typ I und II zu untersuchen, wurde die Expression der T-Zellmarker bei beiden Subtypen einzeln analysiert. Es handelte sich bei den 9 untersuchten Gewebeproben der AIP um 7 AIP Typ I und 2 AIP Typ II Fälle.

4.1.2.1. T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

Die relative Expression der CD4-mRNA ist bei der AIP Typ I und II gleich stark.

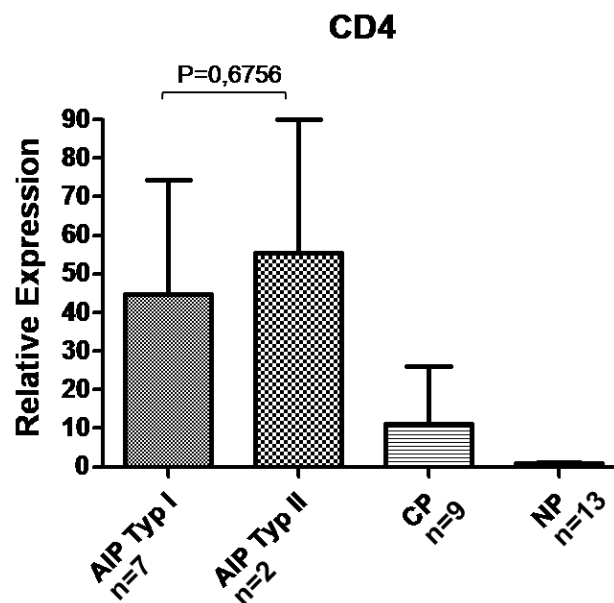


Abbildung 16

Vergleich der relativen CD4-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von CD4-mRNA ist bei beiden Subtypen der AIP gleichermaßen erhöht. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

Bezüglich der relative Expression der CD8-mRNA zytotoxischer T-Zellen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der AIP Typ I und II.

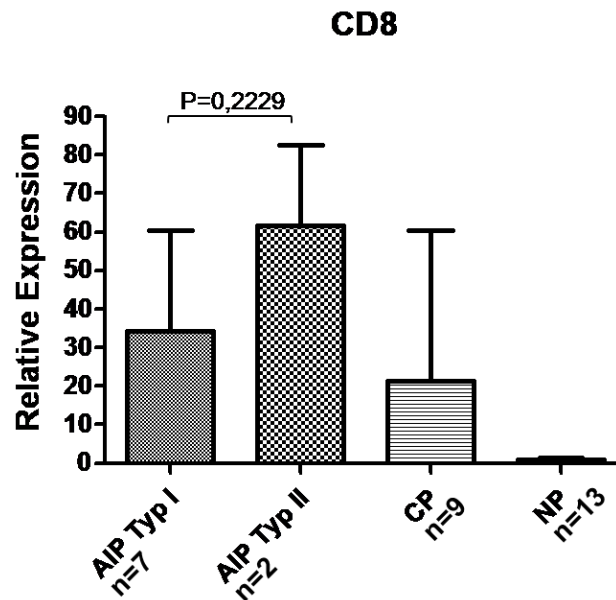


Abbildung 17

Vergleich der relativen CD8-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von CD8-mRNA ist bei beiden Subtypen der AIP erhöht. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Subtypen vor. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

4.1.2.2. Th1- und Th2-Zellen

Die relative Expression der Th1-spezifischen TBx21-mRNA unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der AIP Typ I und II.

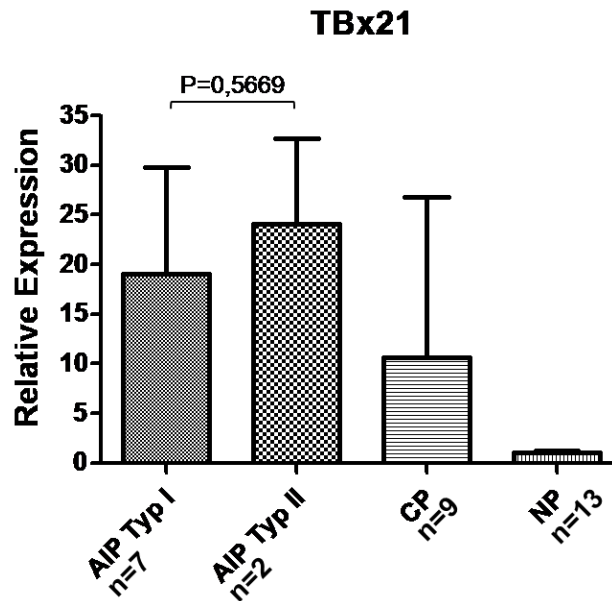


Abbildung 18

Vergleich der relativen TBx21-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von TBx21-mRNA ist bei beiden Subtypen der AIP erhöht und unterscheidet sich nicht signifikant. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

Ebenso lässt sich bei der relativen Expression der Th2-spezifischen GATA3-mRNA kein signifikanter Unterschied zwischen AIP Typ I und II nachweisen

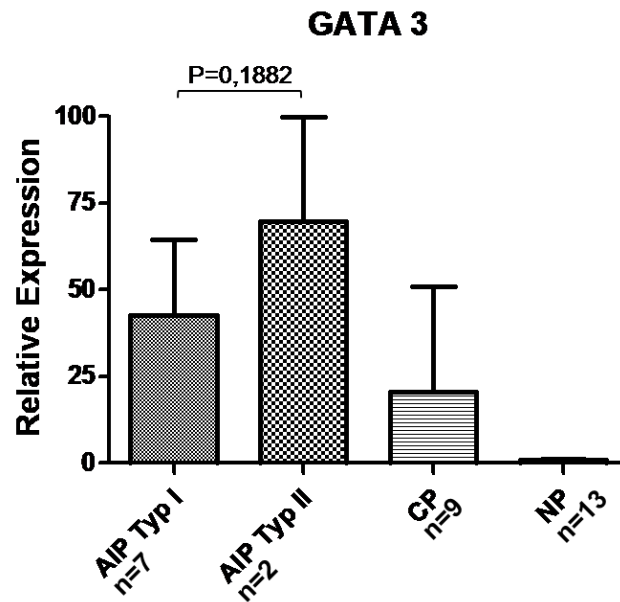


Abbildung 19

Vergleich der relativen GATA3-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von GATA3-mRNA ist bei beiden Subtypen der AIP erhöht. Es liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

4.1.2.3. Th17-Zellen

Die relative Expression der IL-17A-mRNA ist bei der AIP Typ II signifikant höher als bei der AIP Typ I. Auch die relative Expression von RORC-mRNA ist bei der AIP Typ II deutlich erhöht. Die relative Expression von IL-21- und ICOS-mRNA unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der AIP Typ I und II.

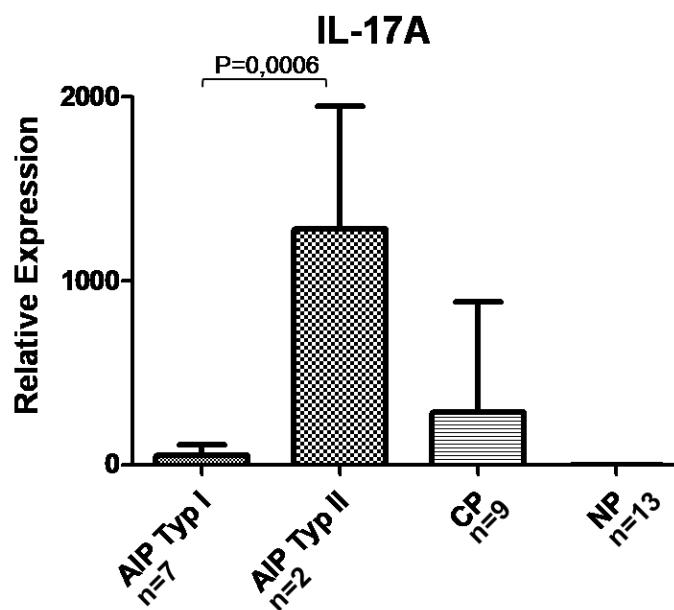


Abbildung 20

Vergleich der relativen IL-17A-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von IL-17A-mRNA ist bei der AIP Typ II deutlich höher als bei der AIP Typ I. Trotz der sehr niedrigen Fallzahl ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

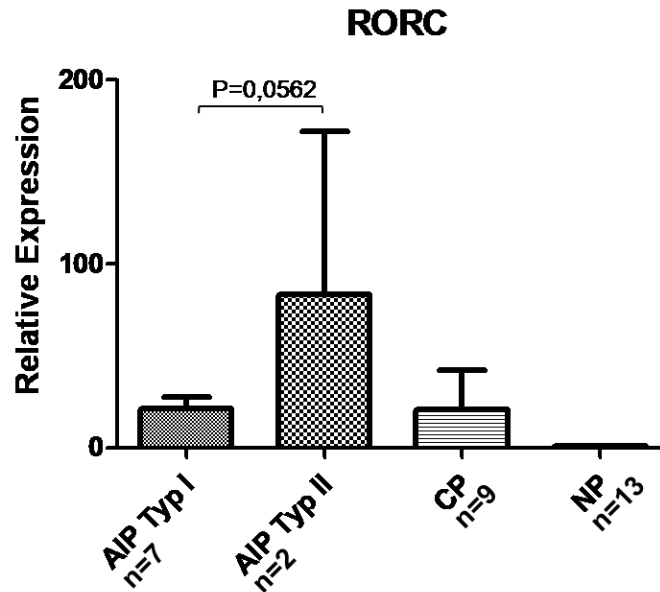


Abbildung 21

Vergleich der relativen RORC-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von RORC-mRNA ist bei der AIP Typ II höher als bei der AIP Typ I, jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

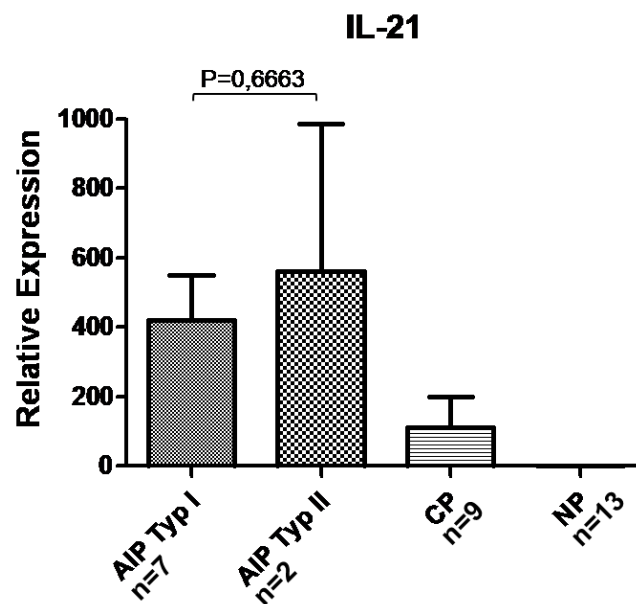


Abbildung 22

Vergleich der relativen IL-21-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von IL-21-mRNA ist bei beiden Subtypen der AIP erhöht. Es liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

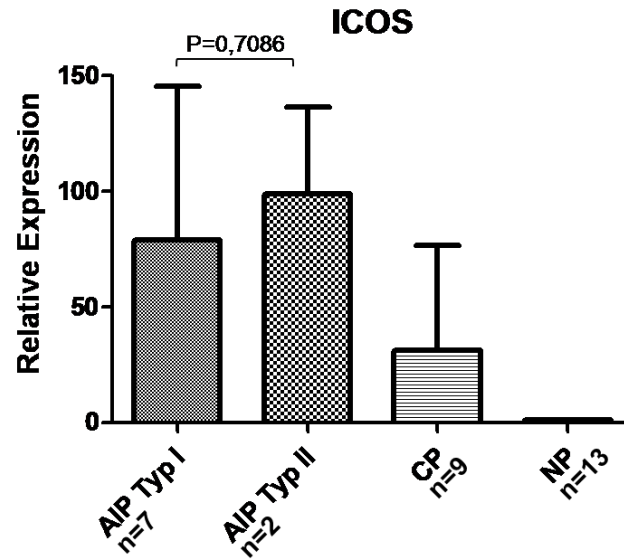


Abbildung 23

Vergleich der relativen ICOS-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von ICOS-mRNA ist bei beiden Subtypen der AIP erhöht. Es liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

4.1.2.4. Regulatorische T-Zellen

Die relative Expression von FoxP3-mRNA unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der AIP Typ I und II.

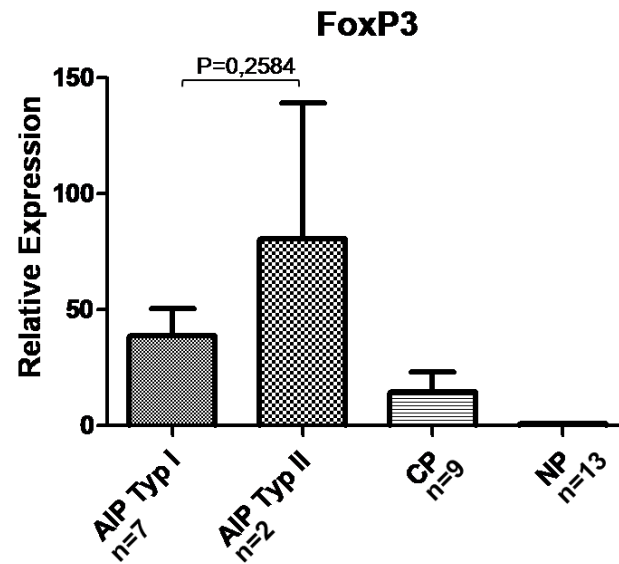


Abbildung 24

Vergleich der relativen FoxP3-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von FoxP3-mRNA unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der AIP Typ I und II. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

Die relative Expression von IL-10-mRNA zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der AIP Typ I und II.

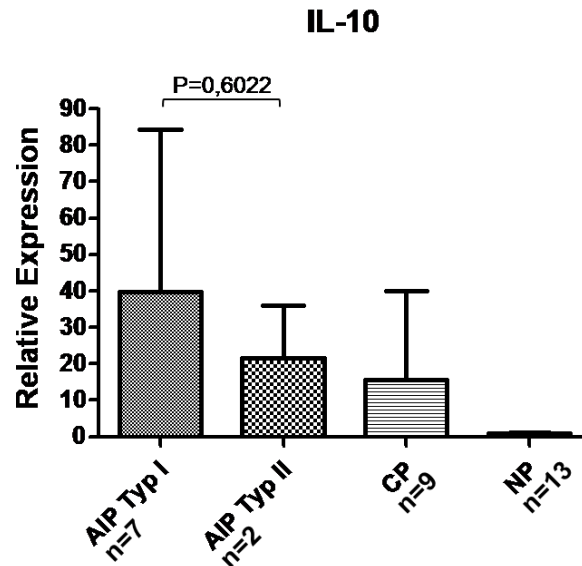


Abbildung 25

Vergleich der relativen IL-10-mRNA Expression zwischen der AIP Typ I und II

Die relative Expression von IL-10-mRNA ist bei der AIP Typ I und II im Vergleich zum Normalgewebe erhöht. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den AIP Subtypen. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, CP: Chronische Pankreatitis, NP: Normales Pankreasgewebe

4.1.2.5. Zusammenfassung

Die relative Expression der Th17-Zellmarker ist bei der AIP Typ II im Vergleich zur AIP Typ I deutlich erhöht. Bei den anderen T-Zellpopulationen lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der AIP Typ I und II nachweisen.

<u>Relative Expression der charakteristischen T-Zellmarker</u>	
	AIP Typ I vs. Typ II
T-Helferzellen	↔
Zytotoxische T-Zellen	↔
Th1-Zellen	↔
Th2-Zellen	↔
Th17-Zellen	↑
T-reg	↔

Abbildung 26

Zusammenfassung der T-Zellmarker bei der Autoimmunpankreatitis Typ I und II

Die Th17-Zellmarker unterscheiden sich signifikant zwischen der AIP Typ I und II. So wurde bei der AIP Typ II eine stärkere Expression von IL-17A-mRNA nachgewiesen. Die Marker der anderen T-Zellpopulationen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen der AIP Typ I und II. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, vs.: versus, senkrechte Pfeile: signifikant unterschiedlich starke Expression, waagerechte Doppelpfeile: kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression

4.2. Proteinnachweis

4.2.1. Immunhistochemische IL-17A/CD4 Färbung

Die Ergebnisse der q-RT-PCR Untersuchung deuten eine stärkere Beteiligung von Th17-Zellen bei der AIP Typ II an. Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine IL-17A/CD4 Doppelfärbung von 9 AIP Typ I und 9 AIP Typ II Gewebeproben angefertigt. Dabei wurden IL-17A-Antigene rot und CD4-Antigene braun angefärbt. Doppelt gefärbte Zellen erscheinen rot-braun angefärbt.

4.2.1.1. Nachweis IL-17A/CD4-positiver Zellen

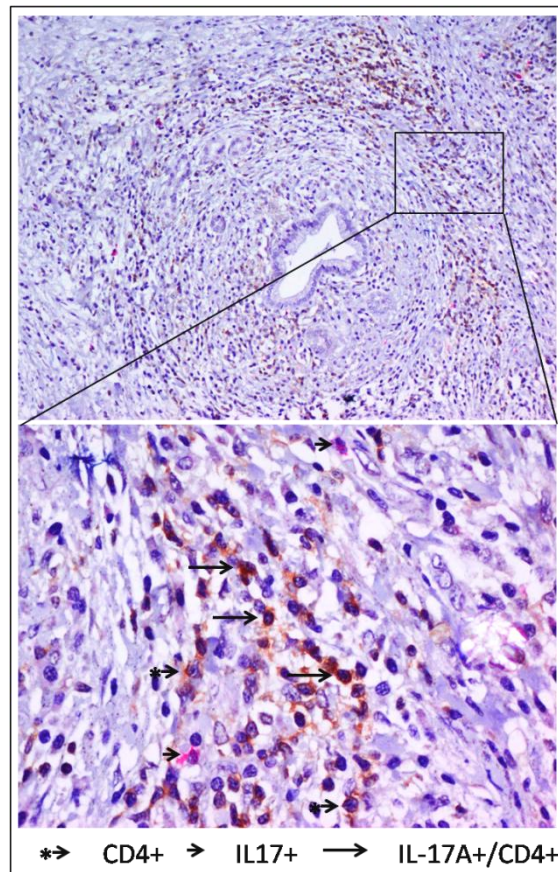


Abbildung 27
AIP Typ I
IL-17A/CD4 Doppelfärbung

Es lassen sich im periduktalen Bereich der AIP Typ I IL-17A/CD4-positive Zellen nachweisen. Daneben färben sich auch einzeln CD4-positive und einzeln IL-17A-positive Zellen an. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, Färbung: IL-17A: rot, CD4: braun, IL-17A/CD4: rot-braun

In der immunhistochemischen Doppelfärbung lassen sich IL-17A-positive, CD4-positive und IL-17A/CD4-positive Zellen nachweisen. CD4-positive und IL-17A/CD4-positive Zellen weisen mit einem großen runden Zellkern typische Merkmale von Lymphozyten auf. Einzeln IL-17A-positive Zellen haben oft einen segmentierten Kern und können somit morphologisch als neutrophile Granulozyten identifiziert werden.

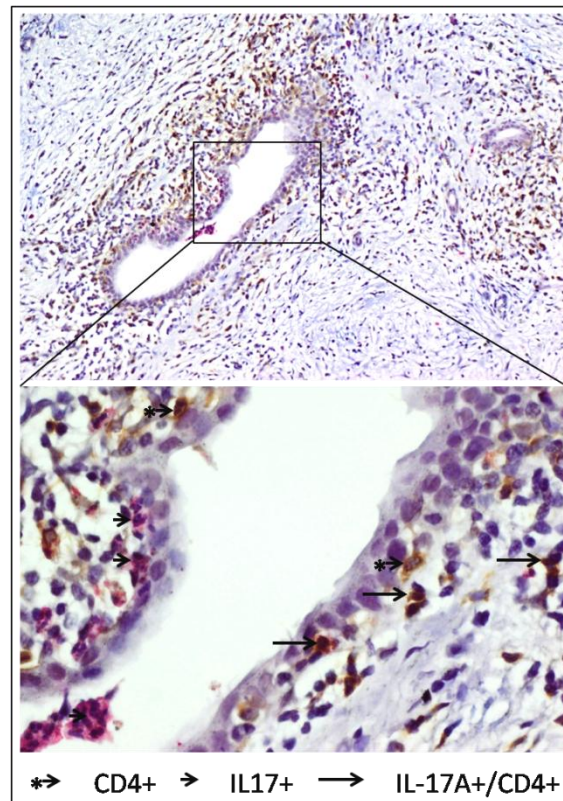


Abbildung 28
AIP Typ II
IL-17A/CD4 Doppelfärbung

Es lassen sich im periduktalen Bereich der AIP Typ II IL-17A/CD4-positive Zellen nachweisen. Daneben färben sich auch einzeln CD4-positive und einzeln IL-17A-positive Zellen an. Zudem fallen reichlich neutrophile Granulozyten auf. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis, Färbung: IL-17A: rot, CD4: braun, IL-17A/CD4: rot-braun

4.2.1.2. Vergleich der IL-17A/CD4-positiven Zellen zwischen der Autoimmunpankreatitis Typ I und II

Die Anzahl der doppelt positiv gefärbten Zellen wurde im Bereich der kleinen und mittelgroßen Pankreasgänge (periduktal), im Bereich der entzündeten Drüsenepithelien (periazinär) und im Bereich von lymphozytären Infiltraten ausgezählt. Pro Schnitt wurden von jedem definierten Bereich fünf HPFs ausgezählt und die Mittelwerte graphisch dargestellt. Es zeigt sich, dass sich die Anzahl der IL-17A/CD4-positiven Zellen im periduktalen Bereich signifikant unterscheidet. So wurden bei der AIP Typ II mehr IL-17A/CD4-positive Zellen nachgewiesen als bei der AIP Typ I. Im Bereich der Drüsenepithelien und der lymphozytären Infiltrate zeigten sich keine Unterschiede.

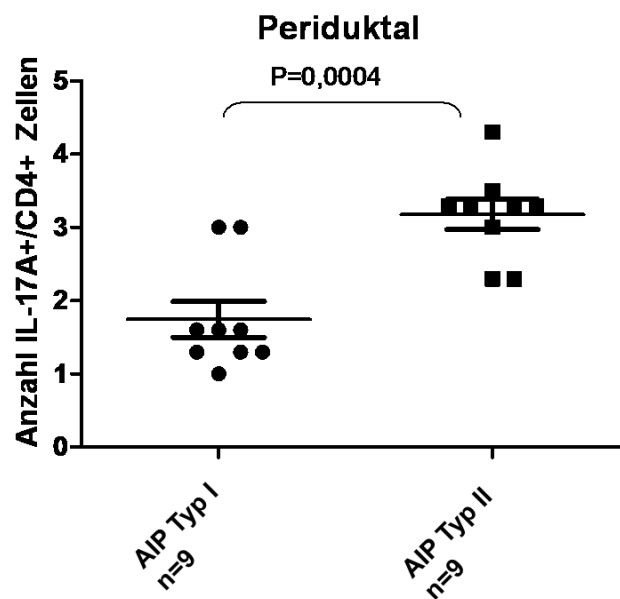


Abbildung 29

Vergleich der Anzahl IL-17A/CD4-positiver Zellen im periduktalen Bereich

Die Anzahl doppelt positiv gefärbter Zellen ist im Bereich der entzündeten Pankreasgangstrukturen (periduktal) der AIP Typ II signifikant höher als bei der AIP Typ I. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis

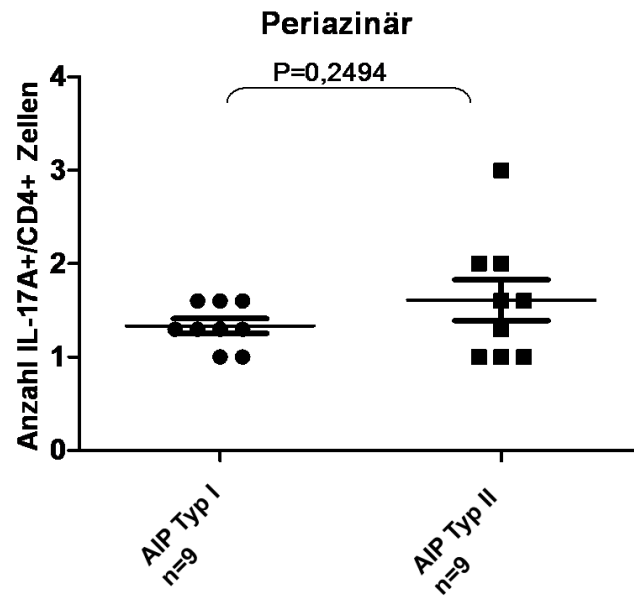


Abbildung 30

Vergleich der Anzahl IL-17A/CD4-positiver Zellen im periazinären Bereich

Die Anzahl doppelt positiv gefärbter Zellen unterscheidet sich im Bereich der entzündeten Drüsenzellen (periazinär) nicht zwischen der AIP Typ I und II. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis

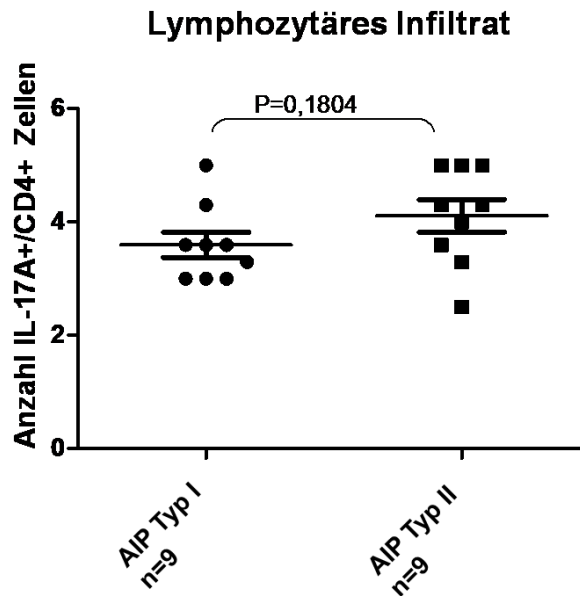


Abbildung 31

Vergleich der Anzahl IL-17A/CD4-positiver Zellen im lymphozytärem Infiltrat

Die Anzahl doppelt positiv gefärbter Zellen unterscheidet sich im lymphozytärem Infiltrat nicht zwischen der AIP Typ I und II. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis

4.2.1.3. Vergleich der neutrophilen Granulozyten zwischen der Autoimmunpankreatitis Typ I und II

In einem weiteren Schritt wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im periduktalen Bereich der AIP Typ I und II miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bei der AIP Typ II signifikant höher ist als bei der AIP Typ I.

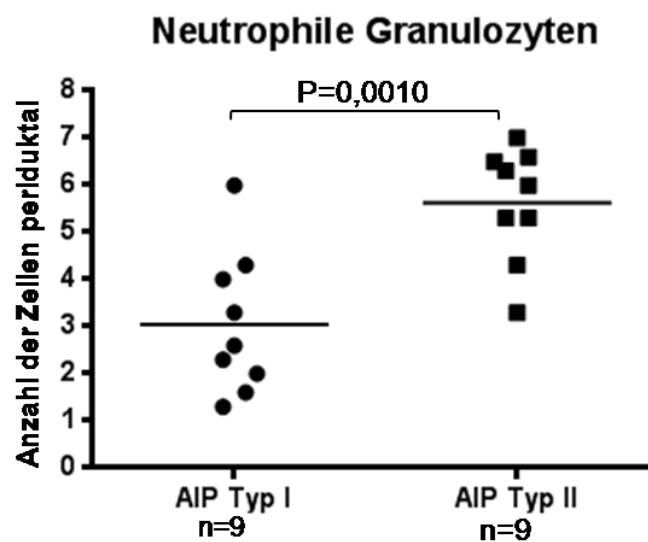


Abbildung 32
Vergleich der Anzahl neutrophiler Granulozyten im periduktalen Bereich

Die Anzahl neutrophiler Granulozyten ist im Bereich der entzündeten Pankreasgangstrukturen (periduktal) der AIP Typ II signifikant höher als bei der AIP Typ I. Legende: AIP: Autoimmunpankreatitis

4.2.1.4. Zusammenfassung

Es zeigte sich bei der AIP Typ II im periduktalen Bereich eine signifikant höhere Anzahl IL17A/CD4-positiver Zellen als bei der AIP Typ I. Ebenso konnte bei der AIP Typ II eine signifikant höhere Zahl neutrophiler Granulozyten im Bereich der Pankreasgänge nachgewiesen werden.

V. Diskussion

Bei der Autoimmunpankreatitis handelt es sich um eine seltene Form der Bauchspeicheldrüsenentzündung, deren Pathogenese bis heute noch nicht abschließend verstanden ist. Im Gegensatz zu den meisten Formen der chronischen Pankreatitis und zum Pankreaskarzinom existiert für die AIP eine wirkungsvolle medikamentöse Behandlung mit oralen Steroiden. Aus diesem Grund ist die sichere Abgrenzung gegenüber dem Pankreaskarzinom essentiell, da beim Pankreaskarzinom nur die komplette Tumorsektion einen kurativen Therapieansatz bietet. Die Differenzierung zwischen der AIP und dem Pankreaskarzinom stellt allerdings immer noch eine große klinische Herausforderung dar. Ein besseres Verständnis der Krankheitsentstehung ist daher wichtig, um betroffene Patienten sicher zu identifizieren und sie einer effektiven Therapie zuführen zu können.

Der eindrucksvolle therapeutische Effekt einer immunsuppressiven Therapie mit Kortikosteroiden zeigt, dass das Immunsystem bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der AIP eine Schlüsselrolle spielen muss. Um die Pathogenese besser verstehen zu können, ist es folglich unabdingbar die unterschiedlichen Aspekte der Immunreaktion näher zu charakterisieren. Die Forschung auf dem Gebiet der AIP wird jedoch durch verschiedene Faktoren erschwert.

So ist die Verfügbarkeit von Gewebeproben zum Zwecke wissenschaftlicher Untersuchungen auf Grund der Seltenheit der Erkrankung stark eingeschränkt. Die niedrige Inzidenz der AIP ist auch ein Grund, weswegen die klinische Expertise in der Diagnostik und Behandlung der AIP außerhalb von spezialisierten Zentren oft limitiert ist. Dies birgt die Gefahr von verspäteter Diagnostik und Fehldiagnosen. Dadurch wird den Betroffenen eine adäquate Therapie vorenthalten und die Wissenschaft verliert den Zugriff

auf klinische Daten und histologisches Untersuchungsmaterial. Doch selbst in Schwerpunktzentren werden oftmals keine Gewebeproben mehr gewonnen, da es verbesserte bildgebende Verfahren und diagnostische Klassifikationssysteme heutzutage erlauben auch ohne invasive Eingriffe die Diagnose AIP zu stellen. In unklaren Fällen werden meist endoskopische Feinnadelpunktionen oder Core-Biopsien durchgeführt, wobei nur verhältnismäßig kleine Gewebeproben entnommen werden. Operative Eingriffe im Rahmen von chirurgischen Resektionen, durch die größere Gewebeproben gewonnen werden können, sollten heutzutage wegen ihrer Morbidität, Mortalität und möglicher Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten unterlassen werden. All dies bedingt, dass sich detaillierte Analysen der AIP oft auf eine verhältnismäßig kleine Fallzahl von Gewebeproben stützen.

Ein weiteres Problem ist, dass es bis heute kein anerkanntes Tiermodell der AIP gibt. Anders als beispielsweise bei der multiplen Sklerose (Batouli et al. 2011) stützt sich der Großteil der Erkenntnisse über die AIP auf deskriptive in-vitro Untersuchungen. Die dadurch gewonnenen Daten sind Experimenten an lebenden Zellen meist unterlegen. Annahmen über Immunzellinteraktionen beispielsweise können hierbei nicht demonstriert werden, sondern müssen sich auf spekulative Schlussfolgerungen stützen.

Trotz dieser Schwierigkeiten gibt es auf Grund der heutigen Datenlage den weitgehenden wissenschaftlichen Konsens, dass es sich bei der AIP um eine Autoimmunkrankheit handelt. Hierunter versteht man eine fehlgeleitete Immunreaktion, bei der Antikörper und Abwehrzellen körpereigene Strukturen als pathologisch erkennen, angreifen und zerstören. Bei der AIP stützt sich die Annahme einer Autoimmunerkrankung unter anderem auf den Nachweis von Autoantikörpern gegen pankreatische Strukturen, die häufige Koinzidenz

von AIP und weiteren Autoimmunerkrankungen und den starken therapeutischen Effekt einer immunsuppressiven Therapie mit Kortikosteroiden (Okazaki et al. 2011).

Es ist allgemein anerkannt, dass T-Zellen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle spielen. Nicht umsonst werden T-Zellen während ihrer Reifung im Thymus positiv und negativ selektioniert und unterliegen so einer außergewöhnlich starken Kontrolle auf Autoreaktivität. Es gibt im Wesentlichen zwei Möglichkeiten, wie T-Lymphozyten autoimmune Reaktionen begünstigen können. Einerseits können sie pathologische proinflammatorische Effekte vermitteln, indem T-Helferzellen die Antikörperproduktion anstoßen oder zytotoxische T-Zellen direkt Körperzellen angreifen. Andererseits kann auch ein Versagen der Kontrollmechanismen durch regulatorische T-Zellen zu einer verminderten Kontrolle autoimmuner Entzündungsreaktionen führen.

Es zeigte sich in den letzten Jahren immer mehr, dass bei pathologischen Immunreaktionen die Balance der einzelnen CD4-Subpopulationen von besonderer Bedeutung ist. Ein Überwiegen einer Th1- oder Th2-Zellimmunantwort kann zu einer Autoimmunerkrankung oder einer allergischen Reaktion führen, wie beispielsweise zur Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale (Th2-dominant) (Tan et al. 2007) oder Psoriasis vulgaris (Th1-dominant) (Zhu et al. 2010).

Die Rolle von Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen rückte in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Th17-Zellen wurden erst vor wenigen Jahren als eigene Subpopulation CD4-positiver T-Zellen entdeckt. Sie zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie über die Produktion von IL-17A, IL-21 und IL-22 proinflammatorische Effekte auf Entzündungsvorgänge entfalten können (Korn et al. 2009). Nach ihrer Entdeckung zeigte sich, dass eine gestörte Wechselwirkung zwischen

Th17-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen bei mehreren Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen könnte. Dazu zählen unter anderem multiple Sklerose (Fletcher et al. 2009; Korn et al. 2007b), rheumatoide Arthritis (Niu et al. 2012) und systemischer Lupus erythematodes (Perry et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Beteiligung der unterschiedlichen T-Zellpopulationen bei der AIP charakterisiert. Die Methode der q-RT-PCR bietet dafür die Möglichkeit mRNA-Level von typischen Transkriptionsfaktoren und charakteristischen Zytokinen zu quantifizieren. Die Transkription von bestimmten Genen bestimmt das Proteinrepertoire einer Zelle und legt somit ihre Form und Funktion fest. Allerdings können posttranskriptionelle Veränderungen der mRNA, wie zum Beispiel Splicing, in der q-RT-PCR Messung nicht berücksichtigt werden. Auch wenn die q-RT-PCR in vielen wissenschaftlichen Untersuchungen verwendet wird und ihre Aussagekraft allgemein anerkannt ist, gilt es also zu bedenken, dass sich mRNA-Spiegel und Zelltyp nicht zwingend entsprechen müssen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die T-Zellpopulationen in zwei entzündlichen Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse und im normalen Pankreasgewebe untersucht. Im intakten Pankreasgewebe konnten nahezu keine T-Zellmarker nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Erwartungen für Normalgewebe, in dem physiologischerweise nur wenige Immunzellen zirkulieren, und spricht für die Validität der q-RT-PCR Messungen. Im Gewebe der AIP und im Gewebe der chronischen Pankreatitis wurde erwartungsgemäß eine erhöhte entzündliche Aktivität nachgewiesen. So zeigte sich bei beiden Erkrankungen eine erhöhte Expression aller T-Zellpopulationen. Im Vergleich zur chronischen Pankreatitis fiel die Expression der T-Zellmarker allerdings bei der AIP meist höher aus. Dieser Unterschied erklärt sich anhand der verschiedenen Krankheitsverläufe. Bei der

Gruppe der chronischen Pankreatitis handelt es sich um ein heterogenes Patientenkollektiv, bei dem sich, durch unterschiedlichste Noxen verursacht, eine chronische Entzündung der Bauchspeicheldrüse entwickelt hat. Die chirurgische Resektion erfolgt bei dieser Erkrankung meist auf Grund von therapieresistenten Schmerzen, Pseudozysten oder Gangstenosen. Oft weist dieses Gewebe dann bereits große Fibroseareale, Verkalkungen und ausgebrannte Entzündungsherde auf (Pandol et al. 2011). Im Gegensatz dazu führt die entzündliche Reaktion bei der AIP schon deutlich früher zu einer Schwellung des Pankreas und der damit verbundenen Symptomatik. Da die AIP eine Erkrankung ist, die erst seit wenigen Jahren weltweit bekannt ist, wurde die chirurgische Resektion bei diesen Patienten oft sehr früh wegen des Verdachts auf ein Pankreaskarzinom durchgeführt. Es ist also davon auszugehen, dass die Gewebeproben der AIP in einem vergleichsweise floriden Stadium der Entzündung entnommen wurden. Insofern entspricht es den Erwartungen, dass die entzündliche Aktivität bei AIP durchgehend höher gemessen werden konnte als bei der chronischen Pankreatitis.

Die Ergebnisse der q-RT-PCR Untersuchung zeigten bei der AIP erhöhte mRNA-Level der CD4- und CD8-Oberflächenmoleküle. Diese Beobachtung deckt sich mit bisherigen Untersuchungen, die eine Invasion von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen in das entzündete Gewebe der AIP beschrieben haben (Kloppel et al. 2010). Auch im peripheren Blut wurde bei Patienten mit AIP eine Erhöhung der T-Zellzahlen nachgewiesen (Kloppel et al. 2010; Okazaki et al. 2000). Die Expression der CD8-mRNA unterschied sich in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen der chronischen Pankreatitis und der AIP. Es zeigte sich jedoch bei der AIP eine signifikant stärkere Expression von CD4-Zellmarkern.

Interessant sind daher die Beobachtungen über die Beteiligung der einzelnen CD4-positiven T-Zellpopulationen. In der Literatur gibt es dazu kontroverse Untersuchungen. In einer Arbeit wurde im Blut von Patienten mit AIP eine erhöhte Anzahl IFN- γ -produzierender Th1-Zellen beschrieben. Im Gegensatz dazu wurden keine erhöhten IL-4-Spiegel, dem Schlüsselzytokin von Th2-Zellen, nachgewiesen. Von daher wurde auf eine Th1-dominante Entzündungsreaktion geschlossen (Okazaki et al. 2000). In einer anderen Studie wurden im entzündeten Gewebe der IgG4-related-sclerosing-disease, zu der von vielen Autoren auch die AIP gezählt wird, vermehrt IL-4-produzierende T-Zellen im Verhältnis zu IFN- γ -produzierenden T-Zellen nachgewiesen. Dies wurde als Anhaltspunkt für einen Th2-dominanten Pathomechanismus gedeutet (Zen et al. 2007).

Ob man bei der AIP jedoch überhaupt von einer einseitigen Th1- oder Th2-dominanten Entzündung ausgehen kann, ist umstritten. Es gibt nämlich auch Autoren, die von einer Beteiligung beider T-Zellpopulationen ausgehen. Park et al. postulieren ein Modell zur Pathogenese der AIP, nach dem sich ein Th1-dominantes Initialstadium von einem fortgeschrittenen Th2-dominanten Progressionsstadium unterscheiden lässt (Park et al. 2009). Dies bedeutet, dass bei der Bewertung der Beteiligung einzelner T-Zellpopulationen auch das Stadium der Erkrankung beachtet werden muss.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich im Gewebe der AIP eine im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte Expression von Th1- und Th2-Zell-mRNA (TBx21 und GATA3) nachweisen. Im Vergleich zur chronischen Pankreatitis war die Expression der Th2-typischen GATA3-mRNA bei der AIP signifikant erhöht. Dies erscheint auch in Anbetracht der bisherigen Kenntnisse der AIP logisch. Wichtige Charakteristika der AIP lassen sich mit einer starken Th2-Zellbeteiligung vereinbaren. Dazu zählen unter anderem die Invasion von IgG4-positiven Plasmazellen und die Produktion von Autoantikörpern.

Auch die Koinzidenz von AIP und allergischen Erkrankungen (Kamisawa et al. 2009), erhöhte IgE-Serumspiegel und die Invasion eosinophiler Granulozyten (Sah et al. 2010b) könnten im Zusammenhang mit einer Th2-vermittelten Entzündungsreaktion stehen.

Normalerweise hemmen jedoch Th1- und Th2-Zellen die Entwicklung der jeweils anderen Zellpopulation. Es stellt sich also die Frage, warum trotz der deutlichen Erhöhung der Th2-Zellmarker die Th1-Zellmarker nicht supprimiert sind. Einerseits muss man dazu bedenken, dass man in den letzten Jahren bei vielen Krankheiten, deren Pathogenese man früher einer einzelnen T-Zellpopulation zugeordnet hat, auf Grund von neuen Erkenntnissen den Glauben an eine einseitig vermittelte Entzündungsreaktion revidieren musste. Ging man beispielsweise bei der multiplen Sklerose früher von einer hauptsächlich Th1-dominanten Entzündungsreaktion aus, weiß man heute, dass auch Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle spielen müssen (Fletcher et al. 2010). Andererseits ist es bekannt, dass gerade am Anfang einer Entzündungsreaktion meist alle T-Zellpopulationen aktiviert werden. Es ist also denkbar, dass auch bei der AIP in einem heterogenen Entzündungsmilieu verschiedene Immunreaktionen parallel ablaufen. Insofern ist eine völlige Abwesenheit der Th1-Zellmarker bzw. eine einseitige Dominanz der Th2-Zellmarker nicht zwingend zu erwarten.

Neben den Erkenntnissen zur Rolle von Th1- und Th2-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine mögliche Beteiligung von Th17-Zellen bei der AIP untersucht. Es zeigte sich, dass es bei der AIP im Gegensatz zu normalem Pankreasgewebe eine starke Expression der IL-17A- und RORC-mRNA gibt. Die ebenfalls erhöhte Expression der IL-21- und ICOS-mRNA können auch als Hinweise für die Beteiligung von Th17-Zellen angesehen werden. Es konnte folglich erstmalig nachgewiesen werden, dass Th17-Zellen in die Entzündungsreaktion der AIP involviert sind. Über die Rolle von Th17-Zellen bei

der AIP gibt es in der Literatur bisher keine Untersuchungen. Ihre Bedeutung wurde allerdings bei anderen Autoimmunerkrankungen bereits genauer untersucht.

Bei der multiplen Sklerose konnte gezeigt werden, dass die Anzahl CD4/IL-17A-positiver Zellen in den Gehirnläsionen mit der Krankheitsschwere korreliert (Fletcher et al. 2010). Außerdem ließ sich im experimentellen multiple Sklerose Modell demonstrieren (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), dass IL-17A knock-out Mäuse weniger stark erkrankten als Kontrollgruppen (Komiyama et al. 2006).

Bei der rheumatoiden Arthritis spielen Th17-Zellen ebenfalls eine zentrale Rolle. So wurden im Blut betroffener Patienten erhöhte Th17-Zellzahlen und erhöhte IL-17A- und IL-23-Serumspiegel nachgewiesen. Nähere Untersuchungen des entzündeten Gewebes zeigten dabei, dass Th17-Zellen über die Stimulation von Synovialzellen die Aktivität von Osteoklasten fördern können und so wesentlich zur Destruktion knöcherner Strukturen beitragen können (Niu et al. 2012; Appel et al. 2011).

Weitere Krankheiten, bei denen eine Beteiligung von Th17-Zellen angenommen wird, sind unter anderem atopische Dermatitis (Souwer et al. 2010), allergisches Asthma bronchiale (Bullens et al. 2006), Diabetes mellitus Typ I (Ankathatti Munegowda et al. 2011), systemischer Lupus erythematoses (Perry et al. 2011) und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Duerr et al. 2006) .

Die q-RT-PCR Messungen wurden auch nach den neuesten Erkenntnissen hinsichtlich der Subtypen AIP Typ I und II ausgewertet. Die Fallzahlen sind hier mit 7 AIP Typ I und nur 2 AIP Typ II Gewebeproben sehr niedrig, allerdings ließ sich die Tendenz feststellen, dass die Expression der IL-17A-mRNA bei der AIP Typ II deutlich höher ist als bei der AIP Typ I. Um diese These zu überprüfen wurde eine immunhistochemische IL-17A/CD4

Doppelfärbung von insgesamt 18 AIP Fällen durchgeführt. Die Vorteile dieser Methode sind der direkte Zelnachweis anhand der charakteristischen Proteine im entzündeten Gewebe und die größere Verfügbarkeit von paraffin-fixiertem Gewebe.

Hierbei bestätigten sich die Ergebnisse der q-RT-PCR Untersuchung. So wurden signifikant mehr IL-17A/CD4-positive Zellen im periduktalen Bereich der AIP Typ II nachgewiesen als bei der AIP Typ I. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass eine stärkere Beteiligung von Th17-Zellen bei der AIP Typ II vorliegt. Dieser Unterschied zwischen den beiden AIP Subtypen wurde bisher noch nicht beschrieben und könnte ein neues, interessantes Charakteristikum der AIP Typ II darstellen.

Laut den bisherigen Klassifikationen zeichnet sich die AIP Typ II vor allem durch die Destruktion von kleinen Pankreasgängen durch neutrophile Granulozyten (granulozytäre epitheliale Läsionen, GEL) aus. Bislang ist der Grund für die starke Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten noch nicht bekannt. In der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass sich bei der AIP Typ II nicht nur signifikant mehr Th17-Zellen, sondern auch signifikant mehr neutrophile Granulozyten im periduktalen Bereich befinden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Invasion neutrophiler Granulozyten bei der AIP Typ II in einem kausalen Zusammenhang mit dem vermehrten Vorkommen von Th17-Zellen stehen könnte. Es sind in der Literatur bereits mehrfach Interaktionen zwischen Th17-Zellen und neutrophilen Granulozyten beschrieben worden. Im Anfangsstadium einer Entzündung werden Epithelzellen durch IL-17A stimuliert Chemokine (zum Beispiel CXCL2, CXCL8) auszuschütten, die die Produktion granulozytärer Wachstumsfaktoren steigern und eine chemotaktische Wirkung auf neutrophilen Granulozyten ausüben (Laan et al. 1999). Die Bedeutung dieser Interaktion wurde im Mausmodell demonstriert. So

wurde bei Mäusen, die kein IL-17A bilden können, ein massiver Defekt der Granulopoese nachgewiesen. IL-17A knock-out Mäuse wiesen dabei eine mehr als 90-prozentige Abnahme der granulozytären Wachstumsfaktoren auf (Ye et al. 2001). Dass Th17-Zellen tatsächlich zu einer Invasion von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe führen können, wurde in einem weiteren Mausmodell demonstriert. So entwickelten Mäuse, die mit einem Vakzin gegen *Helicobacter pylori* geimpft wurden, als erste Immunreaktion eine massive Th17-Immunantwort, die mit einer starken Invasion von neutrophilen Granulozyten in die Magenschleimhaut einherging (DeLyria et al. 2009).

Auch beim Menschen wurden Zusammenhänge zwischen Th17-Zellen und neutrophilen Granulozyten beschrieben. Mehrere Studien zeigen, dass bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale und bei Patienten mit exazerbierter zystischer Fibrose die Anzahl von neutrophilen Granulozyten mit der Anzahl der Th17-Zellen im Sputum korreliert (Bullens et al. 2006; McAllister et al. 2005). Es wurde demonstriert, dass die Invasion neutrophiler Granulozyten bei diesen Erkrankungen wahrscheinlich wesentlich durch IL-17A und CXCL8 gesteuert wird (Laan et al. 1999). Ein Zusammenhang zwischen Th17-Zellen und neutrophilen Granulozyten ließ sich auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Pelletier et al. 2010) und der rheumatoiden Arthritis nachweisen (Cascao et al. 2010; Stamp et al. 2004). Außerdem konnte in einer Zellkulturuntersuchung gezeigt werden, dass es auch eine umgekehrte Stimulation zwischen diesen beiden Zelltypen geben könnte. So entdeckte man, dass nicht nur Th17-Zellen neutrophile Granulozyten über CXCL8 anlocken, sondern, dass auch neutrophile Granulozyten über die Sekretion spezifischer Botenstoffe (CCL2, CCL20) chemotaktisch auf Th17-Zellen wirken können (Pelletier et al. 2010).

All diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen neuen, interessanten Ansatzpunkt für das Verständnis der Pathogenese der AIP Typ II ergeben könnten. Ob es hierbei wirklich einen kausalen Zusammenhang zwischen Th17-Zellen und der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten gibt, ist Grundlage für künftige Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Arbeit wichtige Erkenntnisse über die Rolle von T-Zellen bei der AIP gewonnen werden konnten. Erstmals wurden Th17-Zellen bei der AIP nachgewiesen. Dabei stellt die stärkere Beteiligung von Th17-Zellen bei der AIP Typ II möglicherweise ein neues Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden AIP Subtypen dar. Die ebenfalls erhöhte Invasion neutrophiler Granulozyten in den periduktalen Bereich der AIP Typ II ist Grundlage für einen neuen Forschungsansatz, der sich der Frage widmet, ob bei der AIP Typ II ein kausaler Zusammenhang zwischen Th17-Zellen und neutrophilen Granulozyten besteht. Diese Erkenntnisse können möglicherweise auch zur Entwicklung eines Tiermodells der AIP beitragen. Sollte sich eine Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Th17-Zellen künftig bewahrheiten, bietet dies auch zahlreiche neue Möglichkeiten in der Diagnostik und Therapie der AIP.

VI. Zusammenfassung

Die Autoimmunpankreatitis ist eine seltene entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, die sich klinisch häufig durch Schmerzen, Ikterus und Pankreasinsuffizienz äußert und durch eine immunsuppressive Therapie erfolgreich behandelt werden kann. Autoimmune Entzündungsvorgänge werden als Ursache der Erkrankung angenommen. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass zwei unterschiedliche Formen der AIP existieren, die histologisch klar voneinander abgegrenzt werden können. Die AIP Typ I geht mit einer Invasion von IgG4-positiven Plasmazellen einher, wohingegen sich die AIP Typ II durch granulozytäre Läsionen der Gangepithelien auszeichnet.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand einer Genexpressionsanalyse eine erhöhte T-Zellentzündungsaktivität bei der AIP demonstriert werden. Erstmals wurden Th17-Zellen bei der AIP nachgewiesen. Dabei zeigte sich die Th17-Zellantwort bei der AIP Typ II deutlich stärker ausgeprägt als bei der AIP Typ I. Immunhistochemische Färbungen bestätigten eine signifikant stärkere Invasion IL-17A/CD4-positiver Zellen und neutrophiler Granulozyten in die entzündeten periduktalen Bereiche der AIP Typ II im Vergleich zur AIP Typ I.

Die vermehrte Invasion von Th17-Zellen und die gleichzeitige, starke Infiltration neutrophiler Granulozyten in die periduktalen Bereiche der AIP Typ II könnten in einem kausalen Zusammenhang stehen. Entsprechende Interaktionen sind bei mehreren Autoimmunerkrankungen beschrieben worden. Diese Ergebnisse erweitern das Verständnis über die Pathogenese der AIP, stellen ein neues Unterscheidungsmerkmal zwischen den AIP Subtypen dar und bilden die Grundlage für künftige Forschungs-, Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten der AIP.

VII. Quellenverzeichnis

- Ankathatti Munegowda, M., Y. Deng, R. Chibbar, Q. Xu, A. Freywald, S. J. Mulligan, S. van Drunen Littel-van den Hurk, D. Sun, S. Xiong, and J. Xiang. 2011. A Distinct Role of CD4(+) Th17- and Th17-Stimulated CD8(+) CTL in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Clin Immunol* 31 (5):811-826.
- Appel, H., R. Maier, P. Wu, R. Scheer, A. Hempfing, R. Kayser, A. Thiel, A. Radbruch, C. Lodenkemper, and J. Sieper. 2011. Analysis of IL-17+ cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res Ther* 13 (3):R95.
- Asada, M., A. Nishio, K. Uchida, M. Kido, S. Ueno, N. Uza, K. Kiriya, S. Inoue, H. Kitamura, S. Ohashi, H. Tamaki, T. Fukui, M. Matsuura, K. Kawasaki, T. Nishi, N. Watanabe, H. Nakase, T. Chiba, and K. Okazaki. 2006. Identification of a novel autoantibody against pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 33 (1):20-26.
- Batoulis, H., M. S. Recks, K. Addicks, and S. Kuerten. 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *APMIS* 119 (12):819-830.
- Bauquet, A. T., H. Jin, A. M. Paterson, M. Mitsdoerffer, I. C. Ho, A. H. Sharpe, and V. K. Kuchroo. 2009. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 10 (2):167-175.
- Bullens, D. M., E. Truyen, L. Coteur, E. Dilissen, P. W. Hellings, L. J. Dupont, and J. L. Ceuppens. 2006. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* 7:135.
- Cascao, R., R. A. Moura, I. Perpetuo, H. Canhao, E. Vieira-Sousa, A. F. Mourao, A. M. Rodrigues, J. Polido-Pereira, M. V. Queiroz, H. S. Rosario, M. M. Souto-Carneiro, L. Graca, and J. E. Fonseca. 2010. Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12 (5):R196.
- Chari, S. T. 2007. Diagnosis of autoimmune pancreatitis using its five cardinal features: introducing the Mayo Clinic's HISORT criteria. *J Gastroenterol* 42 Suppl 18:39-41.
- Chari, S. T., G. Kloepfel, L. Zhang, K. Notohara, M. M. Lerch, and T. Shimosegawa. 2010a. Histopathologic and clinical subtypes of autoimmune pancreatitis: the Honolulu consensus document. *Pancreatology* 10 (6):664-672.
- Chari, S. T., G. Kloepfel, L. Zhang, K. Notohara, M. M. Lerch, T. Shimosegawa, and G. Autoimmune Pancreatitis International Cooperative Study. 2010b. Histopathologic and clinical subtypes of autoimmune pancreatitis: the Honolulu consensus document. *Pancreas* 39 (5):549-554.
- De Lisi, S., E. Buscarini, P. G. Arcidiacono, M. Petrone, F. Menozzi, P. A. Testoni, and A. Zambelli. 2010. Endoscopic ultrasonography findings in autoimmune pancreatitis: be aware of the ambiguous features and look for the pivotal ones. *JOP* 11 (1):78-84.

- DeLyria, E. S., R. W. Redline, and T. G. Blanchard. 2009. Vaccination of mice against *H pylori* induces a strong Th-17 response and immunity that is neutrophil dependent. *Gastroenterology* 136 (1):247-256.
- Detlefsen, S., A. Mohr Drewes, M. Vyberg, and G. Kloppel. 2009. Diagnosis of autoimmune pancreatitis by core needle biopsy: application of six microscopic criteria. *Virchows Arch* 454 (5):531-539.
- Duerr, R. H., K. D. Taylor, S. R. Brant, J. D. Rioux, M. S. Silverberg, M. J. Daly, A. H. Steinhart, C. Abraham, M. Regueiro, A. Griffiths, T. Dassopoulos, A. Bitton, H. Yang, S. Targan, L. W. Datta, E. O. Kistner, L. P. Schumm, A. T. Lee, P. K. Gregersen, M. M. Barmada, J. I. Rotter, D. L. Nicolae, and J. H. Cho. 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314 (5804):1461-1463.
- Fletcher, J. M., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, N. Tubridy, and K. H. Mills. 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162 (1):1-11.
- Fletcher, J. M., R. Lonergan, L. Costelloe, K. Kinsella, B. Moran, C. O'Farrelly, N. Tubridy, and K. H. Mills. 2009. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 183 (11):7602-7610.
- Frulloni, L., A. Amodio, A. M. Katsotourchi, and I. Vantini. 2011. A practical approach to the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *World J Gastroenterol* 17 (16):2076-2079.
- Frulloni, L., C. Lunardi, R. Simone, M. Dolcino, C. Scattolini, M. Falconi, L. Benini, I. Vantini, R. Corrocher, and A. Puccetti. 2009. Identification of a novel antibody associated with autoimmune pancreatitis. *N Engl J Med* 361 (22):2135-2142.
- Girardi, M. 2006. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol* 126 (1):25-31.
- Girardi, M., J. M. Lewis, R. B. Filler, A. C. Hayday, and R. E. Tigelaar. 2006. Environmentally responsive and reversible regulation of epidermal barrier function by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol* 126 (4):808-814.
- Grutz, G. 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 77 (1):3-15.
- Guarneri, F., C. Guarneri, and S. Benvenga. 2005. Helicobacter pylori and autoimmune pancreatitis: role of carbonic anhydrase via molecular mimicry? *J Cell Mol Med* 9 (3):741-744.
- Heiber, J. F., and T. L. Geiger. 2012. Context and location dependence of adaptive Foxp3(+) regulatory T cell formation during immunopathological conditions. *Cell Immunol* 279 (1):60-65.
- Hocke, M., A. Ignee, and C. F. Dietrich. 2011. Contrast-enhanced endoscopic ultrasound in the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Endoscopy* 43 (2):163-165.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 (5609):1057-1061.

- Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Krocsek. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397 (6716):263-266.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126 (6):1121-1133.
- Kamisawa, T., H. Anjiki, N. Egawa, and N. Kubota. 2009. Allergic manifestations in autoimmune pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21 (10):1136-1139.
- Kang, S. J. 2012. The bloodline of CD8 α (+) dendritic cells. *Mol Cells* 34 (3):219-229.
- Kloppel, G., S. Detlefsen, S. T. Chari, D. S. Longnecker, and G. Zamboni. 2010. Autoimmune pancreatitis: the clinicopathological characteristics of the subtype with granulocytic epithelial lesions. *J Gastroenterol* 45 (8):787-793.
- Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177 (1):566-573.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007a. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448 (7152):484-487.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T. R. Petersen, B. T. Backstrom, R. A. Sobel, K. W. Wucherpfennig, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007b. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* 13 (4):423-431.
- Kountouras, J., C. Zavos, and D. Chatzopoulos. 2005. A concept on the role of Helicobacter pylori infection in autoimmune pancreatitis. *J Cell Mol Med* 9 (1):196-207.
- Kountouras, J., C. Zavos, E. Gavalas, and D. Tzilves. 2007. Challenge in the pathogenesis of autoimmune pancreatitis: potential role of helicobacter pylori infection via molecular mimicry. *Gastroenterology* 133 (1):368-369.
- Kubota, K., S. Watanabe, T. Uchiyama, S. Kato, Y. Sekino, K. Suzuki, H. Mawatari, H. Iida, H. Endo, K. Fujita, M. Yoneda, H. Takahashi, H. Kirikoshi, N. Kobayashi, S. Saito, K. Sugimori, K. Hisatomi, N. Matsuhashi, H. Sato, E. Tanida, T. Sakaguchi, N. Fujisawa, and A. Nakajima. 2011. Factors predictive of relapse and spontaneous remission of autoimmune pancreatitis patients treated/not treated with corticosteroids. *J Gastroenterol* 46 (6):834-842.
- Laan, M., Z. H. Cui, H. Hoshino, J. Lotvall, M. Sjostrand, D. C. Gruenert, B. E. Skoogh, and A. Linden. 1999. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 162 (4):2347-2352.
- Levy, M. J., T. C. Smyrk, N. Takahashi, L. Zhang, and S. T. Chari. 2011. Idiopathic duct-centric pancreatitis: disease description and endoscopic ultrasonography-guided trucut biopsy diagnosis. *Pancreatology* 11 (1):76-80.

- Lohr, J. M., R. Faissner, D. Koczan, P. Bewerunge, C. Bassi, B. Brors, R. Eils, L. Frulloni, A. Funk, W. Halangk, R. Jesenofsky, L. Kaderali, J. Kleeff, B. Kruger, M. M. Lerch, R. Losel, M. Magnani, M. Neumaier, S. Nittka, M. Sahin-Toth, J. Sanger, S. Serafini, M. Schnolzer, H. J. Thierse, S. Wandschneider, G. Zamboni, and G. Kloppel. 2010. Autoantibodies against the exocrine pancreas in autoimmune pancreatitis: gene and protein expression profiling and immunoassays identify pancreatic enzymes as a major target of the inflammatory process. *Am J Gastroenterol* 105 (9):2060-2071.
- Maire, F., Y. Le Baleur, V. Rebours, M. P. Vullierme, A. Couvelard, H. Voitot, A. Sauvanet, O. Hentic, P. Levy, P. Ruszniewski, and P. Hammel. 2011. Outcome of patients with type 1 or 2 autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 106 (1):151-156.
- McAllister, F., A. Henry, J. L. Kreindler, P. J. Dubin, L. Ulrich, C. Steele, J. D. Finder, J. M. Pilewski, B. M. Carreno, S. J. Goldman, J. Pirhonen, and J. K. Kolls. 2005. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol* 175 (1):404-412.
- McGeachy, M. J., and D. J. Cua. 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28 (4):445-453.
- Muhi, A., T. Ichikawa, U. Motosugi, H. Sou, K. Sano, T. Tsukamoto, Z. Fatima, and T. Araki. 2011. Mass-forming autoimmune pancreatitis and pancreatic carcinoma: Differential diagnosis on the basis of computed tomography and magnetic resonance cholangiopancreatography, and diffusion-weighted imaging findings. *J Magn Reson Imaging*.
- Murphy, K. P., P. Travers, M. Walport, C. Janeway, L. Seidler, and M. Ehrenstein. 2009. *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Narula, N., M. Vasudev, and J. K. Marshall. 2010. IgG(4)-related sclerosing disease: a novel mimic of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 55 (11):3047-3051.
- Nishimori, I., A. Tamakoshi, M. Otsuki, M. o. H. L. Research Committee on Intractable Diseases of the Pancreas, and J. Welfare of. 2007. Prevalence of autoimmune pancreatitis in Japan from a nationwide survey in 2002. *J Gastroenterol* 42 Suppl 18:6-8.
- Niu, Q., B. Cai, Z. C. Huang, Y. Y. Shi, and L. L. Wang. 2012. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 32 (9):2731-2736.
- Novotny, I., P. Dite, J. Lata, H. Nechutova, and B. Kianicka. 2010. Autoimmune pancreatitis--recent advances. *Dig Dis* 28 (2):334-338.
- Okazaki, K., K. Uchida, and T. Fukui. 2008. Recent advances in autoimmune pancreatitis: concept, diagnosis, and pathogenesis. *J Gastroenterol* 43 (6):409-418.
- Okazaki, K., K. Uchida, M. Koyabu, H. Miyoshi, and M. Takaoka. 2011. Recent advances in the concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. *J Gastroenterol* 46 (3):277-288.
- Okazaki, K., K. Uchida, M. Ohana, H. Nakase, S. Uose, M. Inai, Y. Matsushima, K. Katamura, K. Ohmori, and T. Chiba. 2000. Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology* 118 (3):573-581.

- Pandol, S. J., A. Lugea, O. A. Mareninova, D. Smoot, F. S. Gorelick, A. S. Gukovskaya, and I. Gukovsky. 2011. Investigating the pathobiology of alcoholic pancreatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 35 (5):830-837.
- Park, D. H., M. H. Kim, and S. T. Chari. 2009. Recent advances in autoimmune pancreatitis. *Gut* 58 (12):1680-1689.
- Paulos, C. M., C. Carpenito, G. Plesa, M. M. Suhoski, A. Varela-Rohena, T. N. Golovina, R. G. Carroll, J. L. Riley, and C. H. June. 2010. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med* 2 (55):55ra78.
- Pelletier, M., L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani, and M. A. Cassatella. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115 (2):335-343.
- Perry, D., A. B. Peck, W. C. Carcamo, L. Morel, and C. Q. Nguyen. 2011. The current concept of T (h) 17 cells and their expanding role in systemic lupus erythematosus. *Arthritis* 2011:810649.
- Rehnitz, C., M. Klauss, R. Singer, R. Eehalt, J. Werner, M. W. Buchler, H. U. Kauczor, and L. Grenacher. 2011. Morphologic patterns of autoimmune pancreatitis in CT and MRI. *Pancreatology* 11 (2):240-251.
- Sah, R. P., S. T. Chari, R. Pannala, A. Sugumar, J. E. Clain, M. J. Levy, R. K. Pearson, T. C. Smyrk, B. T. Petersen, M. D. Topazian, N. Takahashi, M. B. Farnell, and S. S. Vege. 2010a. Differences in clinical profile and relapse rate of type 1 versus type 2 autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology* 139 (1):140-148; quiz e112-143.
- Sah, R. P., R. Pannala, L. Zhang, R. P. Graham, A. Sugumar, and S. T. Chari. 2010b. Eosinophilia and allergic disorders in autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 105 (11):2485-2491.
- Sarles, H., J. C. Sarles, R. Muratore, and C. Guien. 1961. Chronic inflammatory sclerosis of the pancreas--an autonomous pancreatic disease? *Am J Dig Dis* 6:688-698.
- Souwer, Y., K. Szegedi, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2010. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Curr Opin Immunol* 22 (6):821-826.
- Stamp, L. K., M. J. James, and L. G. Cleland. 2004. Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis? *Immunol Cell Biol* 82 (1):1-9.
- Sugumar, A., and S. T. Chari. 2011. Autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 26 (9):1368-1373.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100 (6):655-669.
- Tan, W. P., X. D. Mai, B. Q. Wu, X. Y. Li, J. Li, J. Wei, H. R. Huang, and S. L. Huang. 2007. [Expression of transcription factors T-bet/GATA-3 mRNA and its effect on Tc1/Tc2 balance in asthmatic children]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 45 (4):284-287.
- Tomiyama, T., K. Uchida, M. Matsushita, T. Ikeura, T. Fukui, M. Takaoka, A. Nishio, and K. Okazaki. 2011. Comparison of steroid pulse therapy and conventional oral steroid therapy as initial treatment for autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol* 46 (5):696-704.

- Uchida, K., S. Yazumi, A. Nishio, T. Kusuda, M. Koyabu, M. Fukata, H. Miyoshi, Y. Sakaguchi, T. Fukui, M. Matsushita, M. Takaoka, and K. Okazaki. 2009. Long-term outcome of autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol* 44 (7):726-732.
- Uomo, G. 2011. When pathology marries clinics: the Honolulu consensus document and the guidelines of the International Association of Pancreatology on Autoimmune Pancreatitis. *JOP* 12 (4):431-432.
- Wiesel, M., and A. Oxenius. 2012. From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help. *Eur J Immunol* 42 (5):1080-1088.
- Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon, and J. K. Kolls. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194 (4):519-527.
- Yoshida, K., F. Toki, T. Takeuchi, S. Watanabe, K. Shiratori, and N. Hayashi. 1995. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 40 (7):1561-1568.
- Zen, Y., T. Fujii, K. Harada, M. Kawano, K. Yamada, M. Takahira, and Y. Nakanuma. 2007. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology* 45 (6):1538-1546.
- Zhang, L., K. Notohara, M. J. Levy, S. T. Chari, and T. C. Smyrk. 2007. IgG4-positive plasma cell infiltration in the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Mod Pathol* 20 (1):23-28.
- Zhang, L., and T. C. Smyrk. 2010. Autoimmune pancreatitis and IgG4-related systemic diseases. *Int J Clin Exp Pathol* 3 (5):491-504.
- Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard, and D. R. Littman. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8 (9):967-974.
- Zhu, K., J. Ye, M. Wu, and H. Cheng. 2010. Expression of Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors, T-bet and GATA-3, in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res* 302 (7):517-523.

Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Jörg Kleeff für die kompetente und gewissenhafte Betreuung, die stets prompte Hilfe und die rasche Korrektur meiner Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Martin Loos für sein außergewöhnlich hohes Engagement, seinen stetigen fachlichen Input und die freundschaftliche Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit.

Frau Professor Dr. Irene Esposito und Frau Dr. Melissa Schlitter danke ich für die Hilfe bei der Weiterentwicklung der Färbemethoden, die Bereitstellung der exzellenten Kamera und die kompetente Unterstützung bei der Auswertung.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Pankreasforschungslabors der chirurgischen Klinik der TU München für die Einarbeitung, Unterstützung und Hilfe bei zahlreichen Fragen, insbesondere Herrn Dr. Simon Rieder, Herrn Dr. Thiago DeOliveira, Herrn Dr. Timo Kehl, Frau Manja Thorwirth und Frau Carmen Marthen.

Ich danke Frau Verena Thiel für stetige Hilfe, inspirierende Diskussionen und das außergewöhnliche Engagement beim kritischen Korrekturlesen.

Außerdem gilt mein besonderer Dank meiner Familie für die riesige Unterstützung während meines gesamten Studiums.