



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Der Einfluss der Neuropeptid-Rezeptoruntereinheit RAMP1 auf das angeborene Immunsystem im Rahmen der akuten Pankreatitis

Georgios Odysseos

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines *Doktors der Medizin* genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Weber

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Guido von Figura
2. apl. Prof. Dr. Peter B. Lippa

Die Dissertation wurde am 02.12.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.06.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>III</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>IV</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>V</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 AKUTE PANKREATITIS	1
1.1.1 DEFINITION UND DIAGNOSE	1
1.1.2 PATHOPHYSIOLOGIE	2
1.1.3 ÄTIOLOGIE	3
1.1.4 SCHWEREGRADE	3
1.1.5 THERAPIE	4
1.1.6 ROLLE DES IMMUNSYSTEMS	5
1.1.7 MURINES PANKREATITISMODELL	6
1.2 CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (CGRP)	7
1.2.1 STRUKTUR	7
1.2.2 REGULIERUNG DER SYNTHESE UND FREISETZUNG	7
1.2.3 VERTEILUNG UND DISTRIBUTION	7
1.2.4 CGRP-REZEPTOR	8
1.2.5 FUNKTIONEN DES CGRP-RAMP SIGNALWEGS	8
1.2.6 MOLEKULARE MECHANISMEN UND MODULATION DER IMMUNANTWORT	9
1.3 ZIELSETZUNG	11
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>12</u>
2.1 MATERIAL UND BEZUGSQUELLENNACHWEIS	12
2.1.1 GERÄTE	12
2.1.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	13
2.1.3 ALLGEMEINE MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	14
2.1.4 BIOCHEMISCHE KITS	14
2.1.5 VERBRAUCHSMATERIAL	15
2.1.6 PRIMER	15
2.1.7 VERSUCHSTIERE	16
2.1.8 ANTIKÖRPER	16
2.1.9 PUFFER, LÖSUNGEN, GELE UND ANSÄTZE	17
2.2 INDUKTION DER AKUTEN PANKREATITIS DURCH CAERULEIN	19
2.3 HISTOLOGISCHE METHODEN	20
2.3.1 AUFBEREITUNG DES GEWEBES FÜR PARAFFINSCHNITTE	20
2.3.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	20
2.3.3 IMMUNHISTOCHEMIE	20
2.3.3.1 <i>Methodische Grundlagen</i>	20
2.3.3.2 <i>Entparaffinierung und Rehydrierung</i>	21
2.3.3.3 <i>Antigendemaskierung</i>	21
2.3.3.4 <i>Blockierung unspezifischer Bindungen</i>	21
2.3.3.5 <i>Spezifische Färbung mithilfe der ABC-Methode und Detektion</i>	22
2.3.3.6 <i>Gegenfärbung und Einbettung</i>	23
2.3.3.7 <i>Auswertung der Immunhistochemie</i>	23
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
2.4.1 QUANTITATIVE REALTIME REVERSE-TRANSKRIPTASE-PCR	24
2.4.1.1 <i>Methodische Grundlagen</i>	24
2.4.1.2 <i>RNA-Isolierung</i>	24

2.4.1.3	<i>Reverse Transkription: Umwandlung von RNA in cDNA</i>	25
2.4.1.4	<i>Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)</i>	26
2.4.1.5	<i>Auswertung der qRT-PCR</i>	27
2.5	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	28
2.5.1	WESTERN BLOT	28
2.5.1.1	<i>Methodische Grundlagen</i>	28
2.5.1.2	<i>Proteinextraktion</i>	28
2.5.1.3	<i>Messung der Proteinkonzentration</i>	29
2.5.1.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	29
2.5.1.5	<i>Blotting</i>	30
2.5.1.6	<i>Proteinmarkierung mit Antikörper und Immundetektion</i>	30
2.5.1.7	<i>Quantifizierung des Western Blots</i>	31
2.6	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	31
2.6.1	ZELLKULTUR	31
2.6.2	ISOLATION UND ZÜCHTUNG PRIMÄRER AZINUSZELLEN	31
2.7	STATISTIK	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	RAMP1-EINFLUSS AUF DIE PANKREASORGANOGENESE	34
3.2	DIE MURINE CAERULEININDUZIERTE AKUTE PANKREATITIS	35
3.2.1	MAKROSKOPISCHE UND HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN BEI RAMP1-DEFIZIT	35
3.2.2	CHARAKTERISIERUNG DES IMMUNZELLINFILTRATS	36
3.2.2.1	<i>Histologische Quantifizierung der F4/80⁺-Zellen</i>	36
3.2.2.2	<i>Histologische Quantifizierung der MPO⁺-Zellen</i>	37
3.2.2.3	<i>Histologische Quantifizierung der CD4⁺-Zellen</i>	38
3.2.2.4	<i>Histologische Quantifizierung der CD8⁺-Zellen</i>	39
3.2.2.5	<i>Überblick über die Inflammation und Analyse des CD4/CD8-Verhältnisses</i>	40
3.2.3	EINFLUSS VON RAMP1 AUF DIE AZINUSZELLEN NACH AKUTER PANKREATITIS	41
3.2.3.1	<i>Histologische Quantifizierung der Ki-67⁺-Zellen</i>	41
3.2.3.2	<i>Histologische Quantifizierung der Cleaved Caspase-3⁺-Zellen</i>	42
3.2.4	REGENERATION DES PANKREAS NACH AKUTER PANKREATITIS	43
3.2.5	MECHANISMEN DER VERMEHRTEN INFLAMMATION	44
3.3	ANALYSE DER ISOLIERTEN PANKREATISCHEN AZINUSZELLEN	47
3.3.1	DETEKTION DER RAMP1-EXPRESSION DURCH REALTIME PCR	47
3.3.2	CGRP-EINFLUSS AUF ISOLIERTE PANKREATISCHE AZINUSZELLEN	48
4	DISKUSSION	50
4.1.1	RAMP1 ^{-/-} -MÄUSE SIND PHÄNOTYPISCH NORMAL	50
4.1.2	VERSTÄRKTE INFLAMMATION BEI DEN RAMP1-KO-MÄUSEN	50
4.1.3	RAMP1-MANGEL BEEINTRÄCHTIGT DIE REGENERATION UND INDUZIERT DIE APOPTOSE DER AZINUSZELLEN	55
4.1.4	VOLLSTÄNDIGE REGENERATION DES PANKREAS POST CAERULEIN- BEHANDLUNG	57
4.1.5	EINFLUSS DER CGRP-BEHANDLUNG BEI ISOLIERTEN PANKREATISCHEN AZINUSZELLEN	57
4.2	AUSBLICK	58
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	LITERATURVERZEICHNIS	61
7	PUBLIKATIONEN	78
8	DANKSAGUNG	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Modell der inhibitorischen Wirkungen von CGRP.....	11
Abbildung 2:	Schematischer Versuchsaufbau der regenerativen akuten Pankreatitis.....	19
Abbildung 3:	Prinzip der ABC-Methode.....	21
Abbildung 4:	Grundprinzip der qRT-PCR.....	24
Abbildung 5:	Schematisch zeitlicher Verlauf der cDNA-Synthese.....	26
Abbildung 6:	ECL-Prinzip.....	28
Abbildung 7:	Schematischer Versuchsaufbau der Isolierung, Behandlung und Kultivierung von Azinuszellen.....	32
Abbildung 8:	Histologische Gewebeanalysen unbehandelter WT- und RAMP1 ^{-/-} -Mäuse.....	35
Abbildung 9:	Erhöhtes PG/KG und verstärkte Inflammation bei RAMP1 ^{-/-} -Mäusen 8 und 24 h nach Caerulein-Behandlung.....	36
Abbildung 10:	Erhöhte Anzahl F4/80 ⁺ -Zellen 8 h nach Caerulein-Behandlung bei RAMP1 ^{-/-} -Mäusen.....	37
Abbildung 11:	Erhöhte Anzahl MPO ⁺ -Zellen 24 h nach Caerulein-Behandlung bei RAMP1 ^{-/-} -Mäusen.....	38
Abbildung 12:	Immunhistochemische Analyse und Auswertung CD4 ⁺ -Zellen.....	39
Abbildung 13:	Immunhistochemische Analyse und Auswertung CD8 ⁺ -Zellen.....	40
Abbildung 14:	Zusammenfassung der Inflammationszellen 8 und 24 h post Behandlung sowie Analyse der CD4:CD8-Ratio.....	41
Abbildung 15:	Reduzierte Proliferation 8 h nach Caerulein-Behandlung bei RAMP1 ^{-/-} -Mäusen.....	42
Abbildung 16:	Gesteigerte Apoptose 24 h nach Caerulein-Behandlung bei RAMP1 ^{-/-} -Mäuse.....	43
Abbildung 17:	Histologische HE-Gewebeanalysen an WT- und RAMP1 ^{-/-} -Mäusen 7 d Post Caerulein-Behandlung.....	44
Abbildung 18:	mRNA-Expression während der frühen Phase der akuten Pankreatitis.....	45
Abbildung 19:	CREB-Western-Blot-Analyse und immunhistochemische p65-Analyse 8 h nach Behandlungsende.....	46
Abbildung 20:	Analyse der RAMP1-Expression an isolierten Azinuszellen.....	48
Abbildung 21:	Isolierung, Kultivierung und CGRP-Behandlung der Azinuszellen.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ätiologische Faktoren der akuten Pankreatitis.....	3
Tabelle 2:	Schwergrade einer akuten Pankreatitis.....	4
Tabelle 3:	Geräte.....	12
Tabelle 4:	Chemikalien und Reagenzien.....	13
Tabelle 5:	Zellkultur.....	14
Tabelle 6:	Biochemische Kits.....	14
Tabelle 7:	Verbrauchsmaterial.....	15
Tabelle 8:	Primer.....	15
Tabelle 9:	Mauslinien.....	16
Tabelle 10:	Antikörper.....	16
Tabelle 11:	Puffer, Lösungen, Gele und Ansätze.....	17
Tabelle 12:	Histologische Auswertung der Inflammation, Ödembildung und Nekrose.....	23
Tabelle 13:	Ansätze für die cDNA Synthese.....	25
Tabelle 14:	Angewendete Mischung für qRT-PCR.....	26
Tabelle 15:	LightCycler-Programmeinstellung.....	27
Tabelle 16:	Berechnung der Proteinkonzentrationen für den Western Blot.....	29

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF2	Activating Transcription Factor 2
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BCA	Bicinchoninic Acid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Albumin Fraktion V
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL3	CC-Chemokin-Ligand-3
CCL4	CC-Chemokin-Ligand-4
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
cdNA	komplementäre DNA
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CK19	Cytokeratin 19
CLR	Calcitonin Receptor-like Receptor
CP-Wert	Crossing Point
CPA1	Carboxypeptidase A1
CREB	cAMP Response Element-binding Protein
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dH₂O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Chemolumineszenzreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERC	Endoskopisch retrograde Cholangiographie
FBS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICER	Inducible cAMP Early Repressor
IL-10	Interleukin-10
IL-1β	Interleukin-1 β
kDa	Kilodalton
KO	Knock-out
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa Light Chain Enhancer' of Activated B-cells
nM	Nanomolar
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBS-T	Phosphate-Buffered Saline-Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pCREB	Phosphoryliertes-CREB
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin Mixture
PG/KG	Pankreas- zu Körpergewicht
PKA	Proteinkinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion
RAMP1	Receptor Activity-modifying Protein 1
RAMP1^{-/-}	RAMP1-Knock-out-Maus
RCP	Receptor Component Protein
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	Tris-Buffered Saline-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRPV1	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
YAP/TAZ	Yes-Associated Protein/Transcriptional Co-activator with PDZ-binding motif
IκBα	Nuclear factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells Inhibitor, alpha
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

Die akute Pankreatitis ist eine der häufigsten Erkrankungen in der Gastroenterologie und geht mit einer hohen Rate an Hospitalisierungen sowie mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (Crockett et al. 2018). Derzeit gibt es noch keine verfügbare spezifische Therapie (Garber et al. 2018), sodass es erforderlich ist die Regulation der Entzündungsmechanismen besser zu verstehen, um gezielte Therapien entwickeln zu können.

Das Immun- und Nervensystem kommunizieren über ein ausgedehntes Netzwerk miteinander (Steinman 2004). Das Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) ist ein Neuropeptid mit weit verbreiteter Expression im zentralen und peripheren Nervensystem (Poyner et al. 2002). Frühere Untersuchungen deuten auf eine wichtige Rolle des CGRP-Signalwegs als antiinflammatorischer Modulator der angeborenen Immunantwort hin (Holzmann 2013). Der CGRP-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten: dem Receptor Activity Modifying Protein 1, RAMP1 und dem Calcitonin Receptor-like Receptor, CLR (McLatchie et al. 1998). In früheren Studien wurde eine CGRP-Immunreaktivität in Nervenfasern nachgewiesen, die das Pankreas innervieren (Sternini, De Giorgio, and Furness 1992). Der Einfluss von CGRP im Rahmen der akuten Pankreatitis ist noch nicht abschließend geklärt. Durch die Verwendung eines RAMP1-Knock-out-Mausmodells (RAMP1-KO-Mausmodell) wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle und Funktion des CGRP-Rezeptors in der akuten Phase der Caerulein-induzierten Pankreatitis untersucht.

1.1 Akute Pankreatitis

1.1.1 Definition und Diagnose

Eine akute Pankreatitis ist eine akut einsetzende Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Durch die Entzündung werden sowohl die endokrinen als auch die exokrinen Funktionen des Pankreas für eine variable Dauer beeinträchtigt. Häufig ist die akute Pankreatitis mit einer systemischen Inflammation verbunden, wodurch es zu einer Funktionseinschränkung anderer Organsysteme kommen kann.

Die Diagnose einer akuten Pankreatitis erfordert zwei der drei folgenden Kriterien (Banks et al. 2013) (Uhl et al. 2002) (Arvanitakis et al. 2004) (Bollen et al. 2007):

- (1) abdominelle Schmerzen: akuter Beginn eines anhaltenden, schweren, epigastrischen Schmerzes, der oft in den Rücken strahlt
- (2) Erhöhte Serum-Lipase-Aktivität (mindestens 3x höher als die obere Normgrenze)
- (3) charakteristische Befunde einer akuten Pankreatitis bei der kontrastverstärkten Computertomografie, seltener bei der Magnetresonanztomografie oder der transabdominalen Sonografie.

1.1.2 Pathophysiologie

Pathophysiologisch lässt sich die akute Pankreatitis in vier Phasen unterteilen (Felderbauer et al. 2005):

1. Zellschädigung
2. lokale Inflammation
3. systemische Inflammation
4. Infektion der Pankreasnekrose

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die inaktiven Verdauungsenzyme, die sogenannten Zymogene in den Azinuszellen. Bei Eintritt in das Darmlumen werden sie durch die Enterokinase oder durch Trypsin in ihre aktive Form überführt (Logsdon and Ji 2013). Trypsin ist dabei das entscheidende Enzym, denn es fördert nicht nur seine eigene Aktivierung, sondern auch die Aktivierung anderer Verdauungsenzyme wie z. B. Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidase und Proelastase.

Die akute Pankreatitis wird durch eine pathologische Aktivierung von Trypsin in den Azinuszellen des Pankreas verursacht, welche zu einer Autodigestion des Pankreasgewebes führt. Eine Co-Lokalisierung lysosomaler Hydrolasen, wie Cathepsin B, mit Verdauungsenzyme spielt eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Aktivierung der Verdauungsenzymen (van Acker, Perides, and Steer 2006). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass potenzielle Schlüsselmodulatoren wie z. B. Calcium (Kruger, Albrecht, and Lerch 2000) und mäßig niedrige pH-Werte (Leach et al. 1991) ebenfalls eine wichtige Rolle bei der vorzeitigen Trypsinogenaktivierung spielen.

Die Phase der lokalen pankreatischen Inflammation ist vor allem durch die Expression von Zyto- und Chemokinen gekennzeichnet (Felderbauer et al. 2005). Die Zytokine sind unter anderem für das Anlocken und für die Aktivierung von Entzündungszellen verantwortlich. Die Aktivierung des Immunsystems führt unter anderem zu einer antiinflammatorischen Reaktion, die das Fortschreiten der systemischen Komplikationen beeinflusst (Leliefeld et al. 2016).

In der dritten Phase kommt es zu einer extrapancreatischen Entzündungsreaktion (Weber and Adler 2001) (Bhatia et al. 2005) (Norman 1999). Ein systemisches Entzündungsreaktionssyndrom spiegelt den Einfluss der Zyto- und Chemokinen auf dem gesamten Organismus wider. Durch die Vielzahl verschiedenen Faktoren kann sich dieser systemischen Entzündungsreaktion in Form einer respiratorischen Insuffizienz (Zhou et al. 2010), einem prärenalen Nierenversagen aufgrund eines Volumenmangels (Petejova and Martinek 2013) oder Sepsis aufgrund einer bakteriellen Translokation (Schieltroma et al. 2016) manifestieren.

Eine nekrotisierende Pankreatitis tritt auf, wenn das Pankreasgewebe aufgrund der Entzündung zugrunde geht und ist die wichtigste lokale Komplikation im Verlauf einer akuten Pankreatitis. Über

welchen Mechanismus die interstitielle, ödematöse Form einer akuten Pankreatitis in die nekrotisierende Form übergeht, ist bisher unklar (Felderbauer et al. 2005). Das diffuse oder lokale Gebiet des nekrotisierenden Parenchyms ist initial steril, kann aber durch Bakterien aus dem Darm (Fritz et al. 2010), durch Reflux von infizierter Gallenflüssigkeit, hämatogen oder durch direkte transperitoneale Ausbreitung infiziert werden. Die Infektion einer Pankreasnekrose beinhaltet die vierte und letzte pathophysiologische Phase der akuten Inflammation des Pankreas und ist die Haupttodesursache, die mit einer schlechten Prognose einhergeht (Felderbauer et al. 2005). Die Mortalität bei Patienten mit nekrotisierender Pankreatitis liegt bei ca. 15 % und bei Patienten mit infizierter Nekrose (die zu einem bestimmten Zeitpunkt im klinischen Verlauf bei ca. einem Drittel der Patienten mit Nekrose auftritt) bei bis zu 30–39 % (Petrov et al. 2010) (Banks, Freeman, and Practice Parameters Committee of the American College of 2006) (Frossard, Steer, and Pastor 2008).

1.1.3 Ätiologie

Um eine optimale symptomatische Therapie initiieren zu können, ist eine Klärung der Ätiologie erforderlich. Zu den Hauptursachen, auf die ca. 60–80 % aller Fälle zurück zu führen sind, zählen Gallensteine und Alkoholmissbrauch (Roberts et al. 2017). Weitere seltenere Ursachen einer akuten Pankreatitis werden in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ätiologische Faktoren der akuten Pankreatitis, in Anlehnung an (Harper and Cheslyn-Curtis 2011)

Hyperlipidämie
Hypercalcämie
Post-ERCP
Posttraumatisch / Postoperativ
Medikamente (z. B. Azathioprin, Valproinsäure, Virostatika)
Virale Infektion (Ebstein-Barr, Coxsackie, Cytomegalovirus)
Bakterielle Infektion (Mykoplasmen, Salmonellen)
Ausschlussdiagnose / Idiopathisch

1.1.4 Schweregrade

Die Schweregrade einer akuten Pankreatitis können in mild, moderat und schwer unterteilt werden (Banks et al. 2013) (siehe Tabelle 2). Diese Einteilung ermöglicht es Patienten mit potenziell schweren Verläufen frühzeitig zu identifizieren und einer fachärztlichen Behandlung zuzuführen (Banks et al. 2013). In der Frühphase sollte täglich eine Reevaluation des Schweregrades erfolgen. Die Mortalität einer mittelschweren akuten Pankreatitis ist deutlich geringer als die einer schweren akuten Pankreatitis (Vege et al. 2009).

Tabelle 2: Schweregrade einer akuten Pankreatitis nach (Banks et al. 2013)

Milde akute Pankreatitis:	kein Organversagen keine lokalen oder systemischen Komplikationen
Moderate akute Pankreatitis:	lokale oder systemische Komplikationen ohne anhaltendes Organversagen und/oder vorübergehender Organausfall (Organversagen \leq 48 h)
Schwere akute Pankreatitis:	anhaltendes Organversagen (> 48 h) - Einzelorganversagen - multiples Organversagen

1.1.5 Therapie

Die Therapie der akuten Pankreatitis besteht hauptsächlich aus supportiven Maßnahmen. Einen wichtigen Stellenwert hat hierbei die Volumenersatztherapie sowie eine ausreichende Analgesie und die Vorbeugung von Komplikationen. Durch die Sequestration von Volumen kommt es sehr früh zu einer intravaskulären Hypovolämie. Um eine ausreichende Gewebepfusion aufrecht zu erhalten sollte ein adäquater Volumenersatz vor allem mit kristalloiden Lösungen erfolgen (Leppaniemi et al. 2019). Im Rahmen von Studien konnte gezeigt werden, dass eine Volumensubstitution in den Anfangsstadien einer akuten Pankreatitis die Morbidität und Mortalität reduziert (Talukdar and Swaroop Vege 2011).

Schmerz ist das Leitsymptom der akuten Pankreatitis und seine Linderung hat klinische Priorität. Opioide sind sicher, wirksam und können den Bedarf an zusätzlicher analgetischen Medikation verringern (Basurto Ona, Rigau Comas, and Urrutia 2013). Randomisierte kontrollierte Studien, in denen verschiedene Analgetika verglichen wurden, sprachen nicht eindeutig für ein bestimmtes Analgetikum zur Schmerzlinderung aus (Meng et al. 2013). In den meisten Krankenhäusern wird Hydromorphon gegenüber Morphin oder Fentanyl bevorzugt (Leppaniemi et al. 2019). Patienten mit starken Schmerzen benötigen eine intravenöse Analgesie und eine patientengesteuerte Analgesie sollte in Betracht gezogen werden (Stigliano et al. 2017).

Neben der symptomatischen Therapie sollten die auslösenden Faktoren behoben werden. Bei V.a. eine ethyltoxische Genese der Pankreatitis sollte z. B. eine absolute Alkoholkarenz eingehalten werden. Eine Metaanalyse von Tse und Yuan zum optimalen Zeitpunkt einer endoskopisch retrograden Cholangiographie (ERC) (< 24 vs. < 72 h) bei biliärer Pankreatitis ohne Cholangitis zeigte kein Unterschied in der Letalität (Tse and Yuan 2012). Daher sollte bei schwerer Pankreatitis mit Steinnachweis im Gallengang ohne Cholangitis die ERC mit endoskopischer Papillotomie < 72 h nach Symptombeginn erfolgen (Gutt et al. 2018). Bei Patienten mit akuter Pankreatitis, bei denen eine Cholangitis oder eine Cholestase mit Ikterus vorliegt, soll primär eine endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie mit therapeutischer Zielstellung innerhalb von 24 Stunden nach der

Aufnahme erfolgen (Tenner et al. 2013) sowie unverzüglich eine Antibiotikatherapie beginnen werden.

Derzeit gibt es keine Empfehlungen zur routinemäßigen Verwendung von Antibiotika bei Patienten mit akuter Pankreatitis (Tenner et al. 2013). Insgesamt scheint es, dass der Einsatz von prophylaktischer Antibiotika zur keinen Verringerung der Häufigkeit von Komplikationen, chirurgischen Eingriffen und Mortalität führt (Stigliano et al. 2017). Antibiotika werden bei einer infizierten akuten Pankreatitis empfohlen und Serummessungen von Procalcitonin können hilfreich sein, um das Risiko einer infizierten Pankreasnekrose vorherzusagen (Leppaniemi et al. 2019).

Nach Möglichkeit sollte eine enterale Ernährung erfolgen. In Studien konnte gezeigt werden, dass die enterale Ernährung mit weniger Infektionen und Organversagen sowie mit einer geringeren Mortalität assoziiert ist (Yi et al. 2012). Die Verabreichung der Nahrung kann dabei sowohl über eine Magen- als auch eine über eine Jejunalsonde erfolgen. Eine randomisierte Studie von Eatock et. al zeigte keinen Vorteil einer jejunalen Ernährung gegenüber einer Ernährung über die Magensonde (Eatock et al. 2005).

Die intravenöse Anwendung von Proteasehemmern bei Patienten mit akuter Pankreatitis ist umstritten. Eine 2014 durchgeführte Metaanalyse von Seta et al. zeigte keine Mortalitätsreduktion nach prophylaktischer intravenöser Anwendung von Proteaseinhibitoren (Seta et al. 2014).

Ist eine dieser Therapiestrategien nicht erfolgreich oder treten Komplikationen auf, sollten chirurgische Maßnahmen in Betracht gezogen werden (Leppaniemi et al. 2019). Eine klinische Verschlechterung mit Anzeichen oder starkem Verdacht auf eine infizierte narkotisierende Pankreatitis kann durch das Durchführen einer Intervention mit einer perkutanen oder endoskopischen Drainage behandelt werden (Leppaniemi et al. 2019). Wenn perkutane oder endoskopische Strategien nicht helfen können, sollten weitere chirurgische Strategien berücksichtigt werden.

Aufgrund der Komplexität der akuten Pankreatitis ist ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie wichtig, um geeignete Therapiestrategien für diese Patienten zu entwickeln.

1.1.6 Rolle des Immunsystems

Immunzellen sind entscheidende Mediatoren und ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenese einer akuten Pankreatitis. Als Reaktion auf die Inflammation und Schädigung des Pankreas werden durch Azinuszellen Entzündungsmediatoren freigesetzt, die Immunzellen an den Ort der Entzündung bringen. Das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren ist der Schlüssel für die Schwere der Erkrankung (Habtezion 2015). Zunächst werden Neutrophile Granulozyten und Monozyten rekrutiert, gefolgt von T-Zellen und dendritischen Zellen. Eine Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin reguliert die Infiltration von Neutrophilen in das Pankreas (Hartwig et al. 1999). Die Migration von Immunzellen ist ein Prozess, an dem verschiedene Adhäsionsmoleküle

beteiligt sind. Das sogenannte Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), ein Protein, welches für die Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten erforderlich ist, wird bei geschädigten Azinuszellen in größerer Menge produziert, was zu einer erhöhten Neutrophilenadhäsion führt. Leukozyten spielen bei der Bestimmung der Schwere einer akuten Pankreatitis eine große Rolle (Mayerle 2009). Es wird vermutet, dass Neutrophile in der frühen Phase der Krankheitsentwicklung entscheidend sind, da sie zur Aktivierung von Trypsinogen und zur Progression der schweren Inflammation beitragen (Abdulla et al. 2011). Makrophagen sind neben den Neutrophilen einer der Hauptentzündungsmediatoren im Rahmen der akuten Pankreatitis. Makrophagen werden durch Rekrutierungssignale, wie z. B. durch den CC-Chemokin-Ligand-3 (CCL3) beeinflusst. Die proinflammatorischen Zytokine werden primär von den beschädigten Azinuszellen freigesetzt. Die Makrophagen multiplizieren dann diese Signale (Bhatia et al. 2000). Diese Signalverstärkung kann in einer systemischen Entzündungsreaktion resultieren. Bei einer schweren akuten Pankreatitis werden Peritonealmakrophagen aufgrund der übermäßigen Produktion von Zytokinen und Pankreasenzymen aktiviert und können zu schwerwiegenden Komplikationen führen (Takeyama et al. 1999). Neutrophile Granulozyten stimulieren nicht nur die Reparatur des Pankreas, sondern eine anhaltende Entzündung kann die Neutrophilen zu einer verstärkten Freisetzung von verschiedenen Zytokinen induzieren, welche zur Rekrutierung von pro-inflammatorischen Makrophagen führen, die die Regeneration des Pankreas beeinträchtigen (Folias et al. 2014). T-Zellen werden, basierend auf ihrer Funktion, in CD4 und CD8 unterteilt. T-Zellen sind auch in geringerer Anzahl an Entzündungsstellen vorhanden und scheinen für die Progression einer akuten Pankreatitis notwendig zu sein (Demols et al. 2000).

1.1.7 Murines Pankreatitismodell

Bei der Cerluein-induzierten Pankreatitis handelt es sich um ein etabliertes Tiermodell (Niederau, Ferrell, and Grendell 1985) (Watanabe et al. 1984), mit einem dem Menschen ähnlichen histopathologischen Befund. Dieses Modell gilt als repräsentatives Modell einer milden akuten Pankreatitis und wird häufig zur Erforschung der Pathogenese der akuten Pankreatitis im Hinblick auf eine intrazelluläre, enzymatische Aktivierung und Infiltrationsmechanismen der Entzündungszellen eingesetzt (Hyun and Lee 2014). Die stündlichen intraperitonealen Injektionen des Cholezystokinin-Analogons in supramaximaler Dosierung induzieren intrazelluläre, ultrastrukturelle Veränderungen, die in einer Hemmung der Sekretion der Azinuszellen resultieren (Saluja et al. 2007). Hierdurch kommt es zu einer Akkumulation von Trypsinogen sowie zu einer Exposition von akkumuliertem Trypsinogen mit Faktoren, die zu einer frühzeitigen Trypsinogenaktivierung führen z. B. zu einer Co-Lokalisierung von Zymogengranulaten mit aktivierendem Cathepsin B (Saluja et al. 2007).

1.2 Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)

1.2.1 Struktur

Das Neuropeptid CGRP besteht aus 37 Aminosäuren und ist eng mit Hormonen wie z. B. Calcitonin, Adrenomedullin oder Amylin verwandt. Es ist hauptsächlich an sensorischen Fasern lokalisiert und somit an der Schmerzweiterleitung beteiligt. Derzeit sind zwei Isoformen bekannt: α -CGRP und β -CGRP (Amara et al. 1985). Beide Isoformen unterscheiden sich beim Menschen durch drei Aminosäuren. Die Gene für beide Isoformen befinden sich auf dem Chromosom 11 (Alevizaki et al. 1986). α -CGRP befindet sich hauptsächlich an sensorischen Neuronen, während β -CGRP im enterischen Nervensystem und in der Hypophyse zu finden ist (Mulder et al. 1988) (Wimalawansa 1996). Die genauen funktionellen Unterschiede zwischen α CGRP und β CGRP sind derzeit noch nicht bekannt (Tsujikawa et al. 2007).

1.2.2 Regulierung der Synthese und Freisetzung

Es ist bekannt, dass die CGRP-Synthese in Modellen von Nervenschädigungen hochreguliert ist (Fu et al. 2013). Es wird angenommen, dass die Synthese des Peptids in Geweben mit einer bereits durchgemachten Entzündungsreaktion verstärkt wird (Donnerer and Stein 1992). Eine Aktivierung des transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanals der Unterfamilie V (für Vanilloid), Subtyp 1 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1, TRPV1) vermittelt ebenfalls die Freisetzung von CGRP (Meng et al. 2009). Eine Pankreasentzündung erhöht signifikant die Expression und die funktionellen Eigenschaften von TRPV1 sowie die Erregbarkeit der sensorischen Neuronen des Pankreas (Schwartz et al. 2011). CGRP wird nach der Synthese in Vesikeln innerhalb des sensorischen Nervenendstücks gespeichert und nach neuronaler Depolarisation der Nervenenden über calciumabhängige Exozytose freigesetzt (Meng et al. 2007).

1.2.3 Verteilung und Distribution

CGRP ist im zentralen und peripheren Nervensystems weit verbreitet und wird von trigeminalen Ganglienzellen und dem Spinalganglion freigesetzt (Gibson et al. 1984). CGRP kann ebenfalls in perivaskulären Endigungen von capsaicinsensiblen Nervenfasern gefunden werden (Sams-Nielsen, Orskov, and Jansen-Olesen 2001). Während die Nerven als primäre Quelle von CGRP angenommen werden (Hoffmann et al. 2012), haben Studien gezeigt, dass CGRP auch in nicht neuronalen Zellen, wie z. B. Endothelzellen, exprimiert wird (Ozaka et al. 1997). Immunzellen, wie z. B. Makrophagen, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes und aktivierte B-Lymphozyten, sind ebenfalls in der Lage, CGRP zu produzieren (Linscheid et al. 2004) (Wang et al. 2002) (Bracci-Laudiero et al. 2002).

1.2.4 CGRP-Rezeptor

Der CGRP-Rezeptor besteht aus zwei Komponenten: dem Calcitonin Receptor-like Receptor (CLR) und dem Receptor Activity-modifying Protein 1 (RAMP1) (McLatchie et al. 1998). Der CLR, der aus sieben Transmembrandomänen besteht, kann entweder als CGRP-Rezeptor oder als Adrenomedullinrezeptor agieren, je nachdem, mit welchem Mitglied der Single-Transmembrandomänen-Proteine der RAMP-Familie er exprimiert wird (McLatchie et al. 1998). Der CLR gehört zur Klasse B der sekretinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die auch als Rezeptoren für Calcitonin, vasoaktives, intestinales Polypeptid, hypophysäres adenylatcyclaseaktivierendes Polypeptid und Parathormon fungieren (Russell et al. 2014). Die RAMP-Proteinfamilie besteht aus drei Mitgliedern: RAMP1, RAMP2 und RAMP3, jeweils mit einer Sequenzhomologie von < 30 %, die jedoch eine ähnliche Struktur aufweisen (Russell et al. 2014). Sie sind kleine Membranproteine, die einen großen extrazellulären NH₂-Terminus, eine einzelne Transmembrandomäne und eine kurze intrazelluläre Domäne von 10 Aminosäuren besitzen (Russell et al. 2014). RAMPs haben die Aufgabe, CLR zu binden und zur Plasmamembran zu transportieren (McLatchie et al. 1998). Ihre Bindung induziert den Transport des Rezeptors zur Zellmembran sowie moduliert die Funktion des Rezeptors selbst. Die Kombination von CLR mit RAMP2 und -3 ergibt die Adrenomedullin-Rezeptoren: den AM1-Rezeptor mit RAMP2 (CLR/RAMP2) und den AM2-Rezeptor mit RAMP3 (CLR/RAMP3) (Hay et al. 2003). Der CLR/RAMP1-Rezeptorkomplex bildet den CGRP-Rezeptor (Barwell et al. 2012). Das Receptor Component Protein, RCP, ist ein zusätzliches Protein, welches für einen optimal funktionierenden CGRP-Rezeptor erforderlich ist (Dickerson 2013). Obwohl eine Unterbrechung der RCP-Synthese keine Auswirkung auf die Fähigkeit von CGRP hat, an seinen Rezeptor zu binden, konnten Evans et al. zeigen, dass das RCP mit dem CLR-Protein co-immunopräzipitiert, was bestätigt, dass die Assoziation von RCP mit dem CGRP-Rezeptor für eine optimale Signalübertragung wichtig ist (Evans et al. 2000). Die Bindung des CGRP-Liganden an den CLR/RAMP1-Rezeptorkomplex kann die Aktivierung mehrerer Signalwege und die anschließende Rekrutierung vieler weiterer nachgeschalteter Effektoren bewirken.

CGRP-Rezeptorkomponenten werden in verschiedenen Organen exprimiert. RAMP1 wird in vielen Geweben, einschließlich Herz, Uterus, Blase, Gehirn, Pankreas, Skelettmuskel und Magen-Darm-Trakt exprimiert (McLatchie et al. 1998). Die Expressionen beider Rezeptorkomponenten, CLR und RAMP1, wurden bei Langerhans-Zellen (Ding et al. 2008) und Makrophagen (Fernandez et al. 2001) nachgewiesen. Beide Rezeptoren wurden auch in humanen CD34⁺-hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen, fehlen jedoch in reifen Neutrophilen des peripheren Blutes (Harzenetter et al. 2002).

1.2.5 Funktionen des CGRP-RAMP Signalwegs

Zahlreiche Organe und Organkomplexe werden durch die Freisetzung von CGRP durch unterschiedliche Signalwege beeinflusst. CGRP hat eine gefäßerweiternde Wirkung und zählt zu den

derzeit wirksamsten mikrovaskulären Vasodilatoren (Brain et al. 1985). Zunehmend deuten Studien darauf hin, dass die CGRP-Aktivität wichtig ist, um dem Auftreten von Bluthochdruck und vaskulärer Dysfunktion entgegenzuwirken (Gangula et al. 2000). Es wird vermutet, dass CGRP eine Rolle beim Schutz gegen Herzinsuffizienz spielen kann (Brain and Grant 2004). Takami et al. konnten zeigen, dass diese Neuropeptide an der Modulation von Herzmuskelkontraktionen beteiligt sind (Takami et al. 1985). Die Aufrechterhaltung der Schleimhautintegrität im Magen-Darm-Trakt wird unter anderem durch CGRP gefördert (Szolcsanyi and Bartho 2001). Im Magen stimuliert Magensäure die Freisetzung von CGRP durch Aktivierung von lokalen afferenten Neuronen. CGRP selbst orchestriert die Sekretion von chemischen Faktoren, die die Magensäuresekretion hemmen und die Muskelreparatur induzieren (Aihara et al. 2005). CGRP spielt zudem eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathophysiologie der Migräne. Eine intravenöse Infusion von CGRP kann z. B. migräneähnliche Attacken bei Migränapatienten induzieren (Lassen et al. 2002). Des Weiteren konnten Studien zeigen, dass CGRP die Wundheilung und Angiogenese fördern kann (Toda et al. 2008). CGRP kann zusätzlich die Makrophagenpolarisation regulieren und Entzündungen in murinen Makrophagen hemmen (Duan et al. 2017). In einer von Joyce et al. publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass der CGRP-Plasmaspiegel bei Patienten mit Sepsis erhöht ist (Joyce et al. 1990).

Darüber hinaus ist CGRP ein negativer Regulator der angeborenen Immunantwort, der im Rahmen einer Inflammation zur Begrenzung der Gewebeschädigung beiträgt (Holzmann 2013), z. B. wird die Hochregulierung von proinflammatorischen Mediatoren durch eine Vorbehandlung mit CGRP-Antagonisten verhindert (Massaad et al. 2004). Im gesamten Gastrointestinaltrakt konnten signifikante CGRP-Konzentrationen gemessen werden (Mulderry et al. 1985). Der Einfluss von CGRP im Rahmen der akuten Pankreatitis wurde aber bisher noch nicht geklärt.

1.2.6 Molekulare Mechanismen und Modulation der Immunantwort

CGRP vermittelt eine Vielzahl von Immunregulationsmechanismen, die für die Abwehr des Wirts relevant sind. Es wird angenommen, dass der Mechanismus der CGRP-Bindung an seinen Rezeptor sich durch das von Hoare entworfene Zwei-Domänen-Modell erklären lässt (Hoare 2005). Der C-Terminus von CGRP bindet zuerst mit hoher Affinität an die N-terminalen Regionen des CLR und RAMP1, wodurch eine Affinitätsstelle gebildet wird. Aufgrund der erhöhten lokalen Konzentration von CGRP ist der N-Terminus des Peptids in der Lage, mit der Juxtamembran-Region von CLR zu interagieren, die den Rezeptor aktiviert (Hoare 2005). RAMP1 dient als Chaperon und bringt CLR an die Oberfläche (McLatchie et al. 1998), was auch für die Bindung von CGRP an den Rezeptor wichtig ist. Die Bindung von RAMP1 an CLR erfolgt im Verhältnis 1:1. Nach Aktivierung des CLR/RAMP1-Rezeptorkomplexes steigt nach G-Protein-abhängiger Stimulation der Adenylatcyclase die Konzentration des Cyclisches Adenosinmonophosphats (cAMP) (Anderson and Seybold 2004). Dies führt unter anderem zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche über verschiedene

Signalwege die Gentranskription beeinflussen kann und zur Phosphorylierung mehrerer stromabwärtiger Targets führt (Anderson and Seybold 2004). PKA kann in den Nukleus translozieren, den Transkriptionsfaktor cAMP Response Element-binding Protein (CREB) phosphorylieren und somit aktivieren (Mayr and Montminy 2001). Aktiviertes CREB kann wiederum die Gentranskription von Inducible cAMP Early Repressor (ICER) und Interleukin-10 (IL-10) induzieren. ICER konkurriert mit dem Activating Transcription Factor 2 (ATF2) um die Bindung an den Promotor von verschiedenen Zytokinen wie z. B. dem Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und inhibiert dadurch direkt die Promotoraktivität (Altmayr, Jusek, and Holzmann 2010). Durch Inhibition des Promotors kommt es zu einer Suppression der Expression von TNF- α . TNF- α ist ein starkes proinflammatorisches Zytokin und gilt als zentraler Regulator der proinflammatorischen Zytokinproduktion (Maini et al. 1995). IL-10 ist ein entzündungshemmendes Zytokin, dass die Entzündung eindämmt und unerwünschte Gewebeschäden verhindert, wodurch es eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Immunantworten spielt (Saraiva and O'Garra 2010). Ein anderer Signalweg, mit der PKA die Inflammation herunterreguliert, ist über den Nuclear Factor 'Kappa Light Chain Enhancer' of Activated B-cells (NF- κ B)-Transkriptionsfaktor. Unter Ruhebedingungen bindet das Inhibitormolekül Nuclear factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells Inhibitor, alpha (I κ B α) den NF- κ B-Transkriptionsfaktor als inaktiven Komplex im Zytoplasma (Jacobs and Harrison 1998). PKA kann darüber hinaus die NF- κ B-Aktivität hemmen, indem es die Phosphorylierung und den Abbau von I κ B α beeinflusst und NF- κ B-p50-Proteine phosphoryliert (Guan, Hou, and Ricciardi 2005). Wenn NF- κ B aktiviert wird, tritt eine Kaskade von Signalereignissen auf, was die Freisetzung von NF- κ B ermöglicht und die Translokation von NF- κ B in den Zellkern erleichtert, wo es die Transkription von Genen fördert, die an entzündungsfördernden Prozessen beteiligt sind (Medzhitov and Horng 2009). In Abbildung 1 ist der inhibitorische Signalweg des CGRPs schematisch dargestellt.

Während der Inflammation nehmen sowohl der lokale als auch der systemische CGRP-Spiegel rasch zu (Holzmann 2013). Dadurch hat CGRP gravierende entzündungshemmende Wirkungen auf das angeborene Immunzellensystem. Diese entzündungshemmenden Aktivitäten von CGRP können auf der einen Seite vorteilhafte Konsequenzen haben, wie z. B. die Abschwächung übermäßiger Entzündungen und Organschäden. Auf der anderen Seite können sie aber auch zu einer Beeinträchtigung der Pathogenabwehr und zu einer Immunsuppression führen. Ein besseres Verständnis der immunologischen Interaktion und des Signalweges von CGRP ist von entscheidender Bedeutung, um Schlüsselwege für neue Behandlungsstrategien der akuten Pankreatitis aufzudecken.

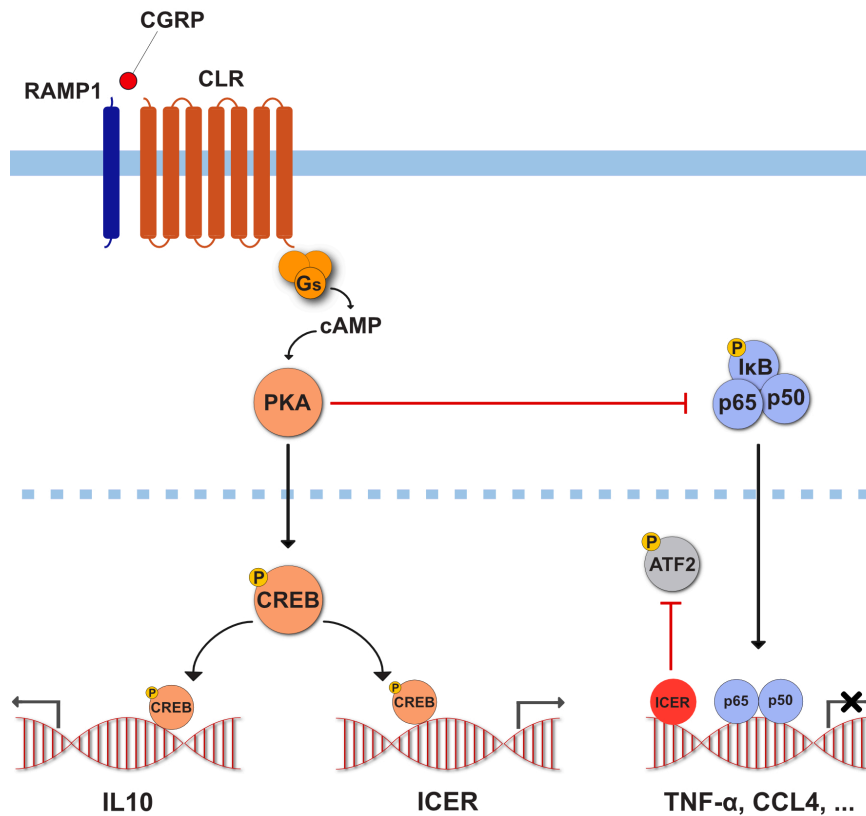


Abbildung 1: Modell der inhibitorischen Wirkungen von CGRP. Der CGRP/cAMP/PKA Signalweg vermittelt die Transkription von IL10 und ICER und inhibiert die NF-κB-Bindungsaktivität, in Anlehnung an (Holzmann 2013).

1.3 Zielsetzung

Bisher veröffentlichte Studien unterstreichen die Bedeutung des CGRP-Signalweges bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen. Trotzdem ist die genaue Bedeutung des CGRP-Signalweges in der frühen Phase der akuten Pankreatitis noch unbekannt. Daraus ergibt sich die Fragestellung, welche Rolle die Neuropeptid-Rezeptoruntereinheit RAMP1 auf das angeborene Immunsystem im Rahmen der akuten Pankreatitis spielt.

Zur Klärung der Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich die Intensität der Inflammation zwischen RAMP1-Knock-out ($RAMP1^{-/-}$)- und Wildtyp (WT)-Mäuse nach Caerulein-Behandlung unterscheidet und welcher zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismus dazu beiträgt. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein caeruleininduziertes Pankreatitis-Modell mit $RAMP1^{-/-}$ und WT-Mäusen verwendet. Um die Rolle der pankreatischen Azinuszellen zu untersuchen, wurden isolierte Azinuszellen aus WT-Mäusen verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Bezugsquellennachweis

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Aperio AT2	Leica Biosystems
BOND RX	Leica Biosystems
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG
Denver Instrument TP-214	Denver Instrument Company
Duomax 1030	Heidolph Instruments
Folienschweißgerät Futura Junior	Audion Elektro GmbH
Heidolph 3001	Heidolph Instruments
Heidolph reax top	Heidolph Instruments
HM 355S Mikrotome	Thermo Fisher Scientific
Hyper Processor	Amersham Biosciences
Kern 440-43N	Kern & Sohn GmbH
Labtherm® von Liebisch	Liebisch Labortechnik
Leica ASP300 S	Leica Biosystems
Leica EG1150 H	Leica Biosystems
LightCycler® 480	Roche Diagnostics
Maxwell 16	Promega Corporation
Multiskan™ FC	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific
pH Basic Meter PB-11	Sartorius AG
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
Zeiss AX10, Imager A1	Carl Zeiss AG
Zeiss Axistar Plus	Carl Zeiss AG

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

<u>Chemikalien & Reagenzien</u>	<u>Hersteller</u>
0.1 M DTT	Invitrogen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
5X First Strand Buffer	Invitrogen
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories
Caerulein	American Peptide Company
dNTP Deoxynucleotide Mix 10mM	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Life Technologies
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol 70 %, 96 %, 100 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG
Ethanolische Eosinlösung	Klinikum rechts der Isar
Glycine	Sigma-Aldrich
Hydrogen Peroxidase 30 %	Merck Millipore
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics
Lysis Buffer RA1	Macherey Nagel
Mayers Hämalaun Lösung	Merck Millipore
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Nonidet P 40 Substitute	Sigma-Aldrich
nukleasefreies Wasser	Promega Corporation
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500µg/ml)	Promega Corporation
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd Solution 4 % PBS	Santa Cruz Biotechnology
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺	Biochrom AG
Pertex	Medite Medical GmbH
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Sigma-Aldrich
RNAlater Stabilization Reagent	Qiagen
RNasel ZAP	Sigma-Aldrich
Roti-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG
Salzsäure	Merck Millipore
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich

Sodium Deoxycholate	Sigma-Aldrich
SuperScript II RT	Invitrogen
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris-Hydrochloride	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ziegenserum	Sigma-Aldrich

2.1.3 Allgemeine Materialien für die Zellkultur

Tabelle 5: Zellkultur

<u>Zellkultur</u>	<u>Hersteller</u>
CGRP	Bachem Holding
Collagenase P	Roche Diagnostics
Dexamethason 100mg	Sigma-Aldrich
FBS Serum	Life Technologies
Hank's Balanced Salt Solution	Sigma-Aldrich
Penicillin Streptomycin SOL 100ml	Life Technologies
Trypsin Inhibitor from Glycinemas (Soybean) 100mg	Sigma-Aldrich
Waymouth MB 752/1 Medium 10x	Sigma-Aldrich

2.1.4 Biochemische Kits

Tabelle 6: Biochemische Kits

<u>Biochemische Kits</u>	<u>Hersteller</u>
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories
Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kit	Promega Corporation
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit	Vector Laboratories
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
CL-XPosure Film	Thermo Fisher Scientific
Dako Pen	Agilent Technologies
Deckgläser (Menzel Gläser)	Thermo Fisher Scientific
Filterpapier	GE Healthcare Life Sciences
Filtertips Safeseal professional	Biozym Scientific GmbH
ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen	Vector Laboratories
Immobilon-FL PVDF Membran	Merck Millipore
LightCycler 480 Multiwell Platte	Roche Diagnostics
Rotilabo®-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH + Co. KG
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG
Zellkulturplatte	Corning Incorporated

2.1.6 Primer

Tabelle 8: Primer

<u>Protein</u>	<u>Primer Sequenz</u>
CCL3	fwd: CAAGTCTTCTCAGCGCCATA rev: GGAATCTTCCGGCTGTAGG
CCL4	fwd: CCTCTCTCTCCTCTTGCTCGT rev: GGAGGGTCAGAGCCCATT
ICER	fwd: ATGGCTGTAAGTGGAGATGAAACT rev: CTAATCTGTTTTGGGAGAGCAAATGTC
IL-1 β	fwd: TGTAATGAAAGACGGCACACC rev: TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
MIST1	fwd: GCGCGTACGGCCTCG rev: GGGCCGGTTTTTGGTCTTCAT
SOX9	fwd: CCACGTGTGGATGTCGAAG rev: CTCAGCTGCTCCGTCTTGAT

2.1.7 Versuchstiere

Tabelle 9: Mauslinien

<u>Versuchstiere</u>	<u>Hersteller</u>
C57BL/6N Wildtyp	Charles River Laboratories
RAMP1 ^{-/-} Mäuse	(Tsujikawa et al. 2007)

2.1.8 Antikörper

Tabelle 10: Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verwendung (Verdünnung)</u>
Anti-CD4(MS) aus Ratte (KLON:GHH4)	Dianova GmbH	IHC (1:100)
Anti-CD8(MS) aus Ratte (KLON:GHH8)	Dianova GmbH	IHC (1:100)
Anti-Cytokeratin 19	Abcam	IHC (1:1000)
Anti-F4/80 Antibody	Abcam	IHC (1:300)
Cleaved Caspase-3	Cell Signaling Technology	IHC (1:200)
CREB	Cell Signaling Technology	WB (1:1000)
HSP90	Cell Signaling Technology	WB (1:1000)
Mouse Carboxypeptidase A1	R&D Systems	IHC (1:300)
MPO light Chain	Santa Cruz Biotechnology	IHC (1:350)
NFκB p65 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	IHC (1:200)
pCREB	Cell Signaling Technology	WB (1:1000)
Purified Mouse Anti Human Ki-67	BD Biosciences	IHC (1:400)
<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Hersteller</u>	
Biotinylated anti-goat IgG	Vector Laboratories	IHC (1:1000)
Biotinylated anti-mouse IgG	Vector Laboratories	IHC (1:1000)
Biotinylated anti-rabbit IgG	Vector Laboratories	IHC (1:1000)
Goat anti-rabbit IgG HRP	Abcam	WB (1:10.000)

2.1.9 Puffer, Lösungen, Gele und Ansätze

Tabelle 11: Puffer, Lösungen, Gele und Ansätze

Immunhistochemie (IHC)

TBS-T

0,1 % (v/v) Tween
in 1x TBS

PBS

9,55 g PBS Dulbecco
in 1 L dH₂O

Unmasking Solution

1:100 Antigen Unmasking Solution, low pH,
Citrat Based in dH₂O lösen

3 % H₂O₂

30 % H₂O₂ in Solution 1:10 in dH₂O verdünnen

EDTA Puffer

0,39 g EDTA in 800 ml dH₂O auflösen
pH-Wert mit NaOH auf 8.0 einstellen
Volumen auf 1 L bringen

VECTASTAIN Elite ABC-Reagent

2 % (v/v) Reagenz A
2 % (v/v) Reagenz B
in 1x PBS

DAB-Lösung

1,6 % (v/v) Buffer pH 7,5
2,0 % (v/v) DAB
1,6 % (v/v) H₂O₂
in dH₂O

TBS

24,2 g Tris HCL
80 g Na-Cl
8,5 ml HCl, pH 7.6
in 1 L dH₂O

Western Blot (WB)

1M Tris pH 8,8 / 6,8

121,1 g Tris-Base in 800 ml dH₂O auflösen
pH-Wert mit HCl auf den gewünschten Wert einstellen
Volumen auf 1 L bringen

10X TBS

24,2 g Tris + 80g Na-Cl in 800 ml dH₂O auflösen
pH-Wert mit HCl auf 7,6 einstellen
Volumen auf 1 L bringen

Ripa-Buffer

3,02 g Tris-HCl
4,38 g NaCl
5 ml Np-40
2,5 g NaDeoxycholate
0,5 g SDS
in 500 ml dH₂O

10X Laufpuffer

30,3 g Tris
10,0 g SDS
144,2 g Glycin
in 1 L dH₂O

10X Transferpuffer

288 g Glycine
60,3 g Tris
in 2 L dH₂O

1X Transferpuffer

100 ml von 10X Transferpuffer
200 ml von Methanol
700 ml von dH₂O

10 % SDS

10 g SDS
in 100 ml dH₂O auflösen

10 % APS

0,2 g APS
in 2 ml dH₂O auflösen

Trenngel 12 %

2,05 ml dH₂O
4,0 ml 30 % Acrylamide Mix
3,75 ml 1.0M Tris (pH 8.8)
0,1 ml 10 % SDS
0,1 ml 10 % Ammonium Persulphate
0,004 ml TEMED

Sammelgel 5 %

3,4 ml dH₂O
0,83 ml 30 % Acrylamide Mix
0,63 ml 1.0M Tris (pH 8.8)
0,05 ml 10 % SDS
0,05 ml 10 % Ammonium Persulphate
0,005 ml TEMED

5X Auftragspuffer

5 g SDS
1,8 g Tris Base
0,025 g Bromphenolblau
25 ml Glycerin
in 20ml dH₂O auflösen und pH auf 7,4 einstellen
Aliquoten mit 5 % Mercaptoethanol versetzen

Azinuszellen-Kultur

Kulturmedia

Waymouth's media
10 % FBS
1 % Pen/Strep
100 µg/ml Trypsin-Inhibitor
1 µg/ml Dexamethason

Kollagenase P

2mg/5ml HBSS / Maus

2.2 Induktion der akuten Pankreatitis durch Caerulein

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach dem Tierschutzgesetz durchgeführt und von der Regierung von Bayern und der Technischen Universität München genehmigt. Die RAMP1^{-/-}-Mäuse wurden für 10 Generationen mit C57BL/6N-Mäusen rückgekreuzt und in einer spezifisch pathogenfreien Anlage gehalten. Als WT-Mäuse wurden C57BL/6N-WT-Mäuse (Charles River) eingesetzt. Die verwendeten Versuchstiere waren zwischen acht und zehn Wochen alt. Das mittlere Körpergewicht lag bei den RAMP1^{-/-} Mäusen bei 19.8 g und bei den WT Mäusen bei 19.5 g.

Die Pankreatitisinduktion erfolgte durch die wiederholte intraperitoneale Injektion des Cholezystokinin-Analogons Caerulein. Zur Induktion einer akuten Pankreatitis wurde Caerulein verwendet, verdünnt in phosphatgepufferter Salzlösung (0,2 µg pro Injektion). Die intraperitonealen Injektionen erfolgten dann stündlich in den linken oder rechten Unterbauch über einen Zeitraum von acht Stunden (modifiziert nach (Jensen et al. 2005)).

Die Versuchstiere wurden 8 und 24 Stunden sowie 2 und 7 Tagen nach der ersten Caeruleininjektion mit einer Überdosis Isofluran euthanasiert (siehe Abbildung 2). Als interne Kontrolle (Kontrollmäuse) erhielten RAMP1^{-/-}- und WT-Mäuse intraperitoneale Injektionen mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate-Buffered Saline, PBS) und wurden 7 Tage nach der ersten Injektion euthanasiert.

Nach der Euthanasie mit Isofluran wurden die Mäuse auf einem Sektionsbrett fixiert. Der Korpus wurde anschließend eröffnet. Danach erfolgte eine Exsanguination durch Punktion der V. cava inferior. Das Blut wurde für die weiteren Serumanalysen asserviert.

Im nächsten Schritt wurde das Pankreas mit einer Präzisionsschere freipräpariert und ohne umliegendes Gewebe entnommen. Das Pankreas wurde anschließend auf einer Feinwaage gewogen. Ein Teil des Pankreas wurde dann für proteinbiochemische Analysen bei minus 80 °C aufbewahrt. Ein weiterer Teil wurde für die Ribonukleinsäure-Isolierung (RNA-Isolierung) in 200 µl RNAlater (Qiagen) zur Stabilisierung der RNA überführt und ebenfalls bei minus 80 °C gelagert. Das restliche Pankreasgewebe wurde für die histologischen Analysen verwendet.

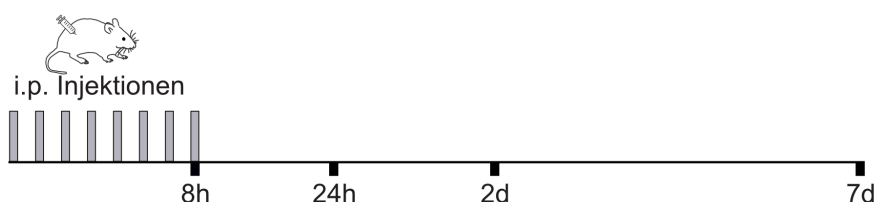


Abbildung 2: Schematischer Versuchsaufbau der regenerativen akuten Pankreatitis. Die Induktion der akuten Pankreatitis erfolgte durch acht intraperitoneale Injektionen von Caerulein (0,2 µg pro Injektion). Die Analyse erfolgte 8 h, 24 h, 2 d und 7 d nach der ersten Caeruleininjektion. Quelle: eigene Darstellung.

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Aufbereitung des Gewebes für Paraffinschnitte

Nach der Entnahme des Pankreas wurde das Gewebe in Einbettkassetten gelegt und über Nacht in 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe (von 70 % über 96 % in 100 %), Durchtränkung in Roti®-Histol und Einbettung in Paraffin. Anschließend wurde das heiße Paraffin für 30 Minuten erkaltet. Mit einem Mikrotom wurden dann 2,5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die histologischen Analysen wurden die Schnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt. Die getrockneten Schnitte wurden zuerst entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Roti®-Histol I & II für 5 Minuten gefolgt von dreimaliger Inkubation in 100%igem Ethanol für jeweils 1 Minute).

Um die sauren Zellstrukturen anzufärben wurden die Gewebeschnitte für 3 Minuten in Mayers Hämalaunlösung getaucht. Im Anschluss wurden die Schnitte in destilliertem Wasser (dH₂O) und Ammoniak gewaschen und mit Salzsäure gespült. Als nächstes erfolgte eine Gegenfärbung mit Eosin für 1 Minute. Eosin färbt die basischen Zellstrukturen rot. Zuletzt erfolgte eine Inkubation in 100%igem Ethanol und in Roti®-Histol sowie die Eindeckung der Schnitte.

2.3.3 Immunhistochemie

2.3.3.1 Methodische Grundlagen

Die Immunhistochemie ermöglicht die Lokalisierung von Antigenen in Geweben mithilfe markierter Antikörper (Brandtzaeg 1998). Der Primärantikörper erkennt die Epitope des zu detektierenden Proteins und bindet spezifisch daran. Ein Sekundärantikörper, der mit Biotin kovalent gebunden ist, detektiert den Primärantikörper. Bei der Avidin-Biotin-Methode kommt es zur Bildung von Komplexen aus biotinmarkierten Sekundärantikörpern mit Meerrettichperoxidase-markierten (Horseradish peroxidase, HRP) Avidin-Biotin-Komplexen (Avidin Biotin Complex, ABC) (siehe Abbildung 3). Die Bindung dieses Komplexes an die Biotin-Einheiten führt zu einer hohen Färbeintensität (Hsu, Raine, and Fanger 1981). Als letzter Schritt wird dann das Peroxidasesubstrat 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) durch die HRP oxidiert und zu einem chromogenen Produkt umgewandelt, das das Zielantigen markiert.

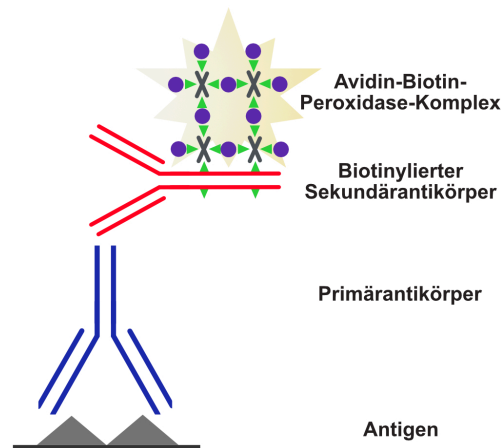


Abbildung 3: Prinzip der ABC-Methode. Die Reihenfolge der Reaktion ist folgende: Primärantikörper → biotinmarkierter Sekundärantikörper → Bildung von Avidin-Biotin-Enzymkomplex → Substrat-Reaktion durch DAB. Quelle: eigene Darstellung.

2.3.3.2 Entparaffinierung und Rehydrierung

Die getrockneten Schnitte wurden zuerst in Roti®-Histol I für 3 Minuten und in Roti®-Histol II für 5 Minuten inkubiert, dadurch entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (jeweils 3 Minuten in 2 x 100 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol und 2 x 70 % Ethanol). Es folgte eine zweimalige Spülung von jeweils 3 Minuten mit dH₂O.

2.3.3.3 Antigendemaskierung

Mit dem hitzeinduzierten Epitopdemaskierungsverfahren mithilfe von Mikrowellen, werden vernetzte Proteinepitope entfaltet (Taylor et al. 1996), während Pufferlösungen bei der Aufrechterhaltung der Konformation eines entfalteten Proteins helfen. Für die Färbungen mit den Antikörpern anti-Ki-67, anti-Cleaved Caspase-3, anti-Carboxypeptidase A1 (CPA1), anti-Cytokeratin 19 (CK19), anti-p65 und anti-Myeloperoxidase (MPO) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine sogenannte *unmasking Solution* als Puffer verwendet, die Schnitte wurden für 5 Minuten bei 700 Watt gekocht und anschließend für 15 Minuten bei 120 Watt erhitzt. Bei der Verwendung von anti-F4/80 wurden die Gewebeschnitte mit Ethylendiamintetraacetat-Puffer (EDTA-Puffer, pH-Wert 8.0) für 10 Minuten bei 700 Watt demaskiert. Die Schnitte wurden nach der Erhitzung für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und danach mit dH₂O gespült.

2.3.3.4 Blockierung unspezifischer Bindungen

Nach der Demaskierung der Gewebeschnitte folgte eine Inkubation in 3%igem Wasserstoffperoxid für 10 Minuten (bei der Verwendung von anti-p65 erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten). Die Gewebeproben wurden für 2 Minuten in dH₂O gespült und danach für 3 Minuten mit 0,3%igem sogenannten Triton X in PBS inkubiert (bei der Verwendung von Anti-p65 erfolgte eine zweimalige Inkubation für jeweils 3 Minuten). Triton X ist ein nicht ionisches Tensid, das die Penetration des

Antikörpers verbessert. Die Schnitte wurden danach für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer blockiert. Das sogenannte *blocking* verbessert die Empfindlichkeit der Proben, indem es die Hintergrundinterferenz verringert und das Signal verbessert. Für die Färbungen mit den Antikörpern anti-Ki-67, anti-Cleaved Caspase-3, anti-CPA1, anti-CK19 wurde 5%ige Albumin Fraktion V (BSA) als Blockierungspuffer verwendet, für den Antikörper anti-MPO 10%ige BSA und für den Antikörper anti-F4/80 10%iges Ziegen Serum. Für die Schnitte mit dem gegen p65-gerichteten Antikörper wurde folgende Blockierungslösung verwendet: Tris-Buffered Saline-Tween (TBS-T) mit 5%igem Ziegen Serum und 25%iger BSA.

2.3.3.5 Spezifische Färbung mithilfe der ABC-Methode und Detektion

Die Gewebeschnitte wurden mit PBS für 3 Minuten gewaschen und mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert (bei dem Antikörper p65 wurde TBS-T als Waschlösung verwendet). Der Primärantikörper bindet dabei an die darzustellenden Proteine. Alle Primärantikörper wurden in der Blockierungslösung verdünnt. Wegen des verstärkten Hintergrundes bei den Antikörpern F4/80 und p65 wurde das Avidin-Biotin-Blocking-Kit verwendet (8 Tropfen Avidin auf 1 ml Blockierungslösung, sowie 8 Tropfen Biotin pro 1 ml Lösung der Primärantikörper). Das Avidin-Biotin-Blocking-Kit dient der Reduktion von Hintergrundsignalen. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten aufgewärmt und in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem biotinmarkierten Sekundärantikörper. Die Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper wird detailliert in Tabelle 10 dargestellt. Die Sekundärantikörper für die Färbungen mit den Antikörpern gegen Ki-67, Cleaved Caspase-3, CPA1 und CK19 wurden in 5%iger BSA verdünnt. Für die MPO-Färbung wurde der Sekundärantikörper in 10%iger BSA verdünnt, für die F4/80- und p65-Färbungen in 10%igem Ziegen Serum. Das VECTASTAIN Elite ABC-Reagent (Vector Laboratories) wurde bereitgestellt und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden in PBS gewaschen und danach mit dem VECTASTAIN Elite ABC-Reagent für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der 45-minütigen Inkubationszeit wurden die Gewebeschnitte in PBS gewaschen (bei dem anti-p65 AK wurde Phosphate-Buffered Saline-Tween (PBS-T) verwendet) und anschließend mit der DAB-Lösung unter dem Mikroskop inkubiert und die exakte Zeit bis zur Reaktion gemessen. Für jeden der zu analysierenden Zeitpunkte (8 h, 24 h, 2 d und 7 d) wurden pro Antikörper die gleiche DAB-Inkubationszeit verwendet. Somit waren die Schnitte vergleichbar und somit für eine statistische Auswertung geeignet. Nach der gewünschten Zeit wurden die Schnitte in dH₂O getaucht, um die Reaktion zu stoppen und danach in dH₂O gewaschen.

2.3.3.6 Gegenfärbung und Einbettung

Nach der spezifischen Färbung erfolgte eine Gegenfärbung des Gewebes mit Hämatoxylin für 5 Sekunden. Das Gegenfärben hilft, die genaue Position der positiven Zellen zu lokalisieren und liefert darüber hinaus einen Kontrast, sodass die antikörpergefärbten Zellen optisch hervorstechen. Nachfolgend wurden die Schnitte mit dH₂O gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Alkohol 70 %, 96 %, 100 % jeweils zweimal für 2 Minuten, Roti®-Histol I und II für jeweils 5 Minuten). Abschließend erfolgte die Eindeckung der Schnitte.

2.3.3.7 Auswertung der Immunhistochemie

Die so hergestellten Objektträger wurden eingescannt und mittels Aperio ImageScope ausgewertet (Version 12.3.2.8013, Leica Biosystems Pathology Imaging). Die Auswertung von zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern (HPF = high power fields) erfolgte in 20-facher Vergrößerung. Für die Färbungen mit den Antikörpern anti-Ki-67 und anti-Cleaved Caspase-3 wurden jeweils 862 Pixels für die Quantifizierung verwendet, für die Antikörper anti-MPO, anti-F4/80, anti-CD4 und anti-CD8 wurden je 1190 Pixels verwendet. Die Erhebung des Ödem-, Nekrose- und Inflammations-Scores erfolgte an HE gefärbten Schnitten (modifiziert nach (Rongione et al. 1997) und (Folias et al. 2014)) (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Histologische Auswertung der Inflammation, Ödembildung und Nekrose, modifiziert nach (Rongione et al. 1997)

Score	Inflammation	Ödem	Nekrose
0	Abwesend	Abwesend	Abwesend
1	Um den Duktusrand	Diffuse Expansion der interlobulären Septen	1 –4 nekrotische Zellen /HPF
2	Im Parenchym (< 50 % der Lobuli)	1+ diffuse Ausdehnung der interlobulären Septen	5 –10 nekrotische Zellen /HPF
3	Im Parenchym (51 % - 75 % der Lobuli)	2+ diffuse Ausdehnung der interlobulären Septen	11 –15 nekrotische Zellen /HPF
4	Im Parenchym (> 75 % der Lobuli)	3+ diffuse Ausdehnung der interlobulären Septen	>16 nekrotische Zellen /HPF

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Quantitative Realtime Reverse-Transkriptase-PCR

2.4.1.1 Methodische Grundlagen

Durch Isolierung der RNA besteht die Möglichkeit, die Funktion der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erhalten. Bei dieser Methode wird RNA zuerst durch eine reverse Transkriptase aus der Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wird dann als Matrix für eine quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet (siehe Abbildung 4). Die qRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren durch enzymatische Amplifikation bestimmter Nucleinsäureabschnitte (Saiki et al. 1988). Bei der Amplifikation verlängern DNA-Polymerasen das freie 3'-OH-Ende der Primer und ermöglicht es so, den gezielten DNA-Abschnitt zu vervielfachen. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe von Fluoreszenzmessungen. Diese Messungen können in Echtzeit (Realtime, RT) erfasst werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zu der Menge der PCR-Produkte (Livak et al. 1995).

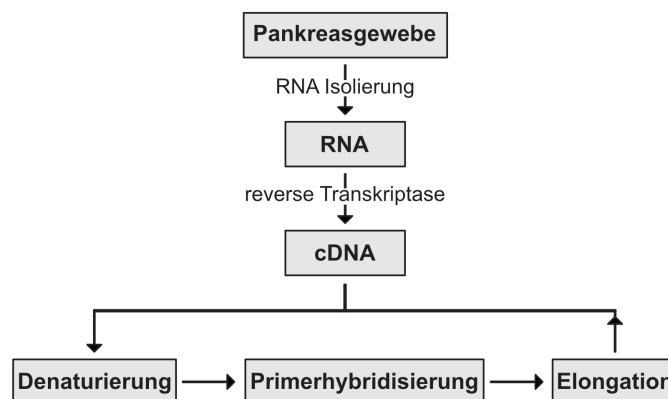


Abbildung 4: Grundprinzip der qRT-PCR. Die aus dem Pankreasgewebe isolierte RNA dient der reversen Transkriptase als Substrat für die cDNA-Synthese. Die cDNA wird anschließend mittels PCR amplifiziert, in Anlehnung an (Santos et al. 2004).

2.4.1.2 RNA-Isolierung

Die RNA Extraktion erfolgte mit Hilfe von Maxwell[®] 16. Zunächst wurde das Pankreasgewebes mit 600 µl Lysis-Buffer und 6 µl Mercaptoethanol vermengt und homogenisiert. Für die Spaltung von DNA wurde die DNase-I-Solution wie folgt hergestellt: den Injektionsfläschchen mit lyophilisierter DNase-I wurde 275 µl nukleasefreies Wasser hinzugeführt und sanft gewirbelt. Anschließend wurden dieser Lösung 5 µl Blue Dye zugeführt. Die Patronen wurden in dem Patronengestell der Maxwell-Maschine platziert, wobei den 0,5 µl-Patronen in der Stelle vor jeder Patrone 50 µl nukleasefreies Wasser hinzugeführt wurde. Das mit RNAlater-vorbehandelte Pankreasgewebe wurde mit 200 µl Lysis-Buffer für 15 Sekunden am Vortex gemischt. Anschließend wurde das gesamte Volumen an die

erste Stelle der Patrone pipettiert. An der vierten Stelle jeder Patrone wurden 10 µl der DNase-I-Solution hinzugeführt. Das Patronengestell wurde schließlich in die Maxwell-Maschine gestellt und die Maschine gemäß den Herstelleranweisungen programmiert. Das so gereinigte RNA-Gemisch wurde nach Ende des Prozesses auf Eis gestellt und die RNA-Konzentration gemessen.

2.4.1.3 Reverse Transkription: Umwandlung von RNA in cDNA

Um die Genexpressionsanalyse durchzuführen zu können, wurde die gereinigte RNA (2 µg) mithilfe der SuperScript™ II-Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mittels PCR-Methode vervielfältigt. Der Ansatz A (siehe Tabelle 13) wurde in einem nukleasefreien Mikrozentrifugenröhrchen zusammen pipettiert. Um die Hybridisierung der Primer an die RNA zu ermöglichen, erfolgte nach kurzer Zentrifugierung eine 5-minütige Inkubation bei 65 °C. Danach wurden die Proben kurz auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz B hinzugefügt (siehe Tabelle 13). Nach kurzer Zentrifugierung erfolgte eine 2-minütige Inkubation bei 42 °C. Pro Probe wurde danach 1 µl (200 Units) SuperScript™ II-Reverse-Transkriptase hinzugeführt. Die Proben wurden danach bei 42 °C für 50 Minuten inkubiert und anschließend für die Inaktivierung der reversen Transkriptase für 15 Minuten auf 70 °C erhitzt.

Die so entstandene cDNA wurde im Verhältnis 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und die Proben bei minus 20 °C gelagert. Das genutzte Programm für die cDNA-Synthese wird in Abbildung 5 dargestellt.

Tabelle 13: Ansätze für die cDNA Synthese

Ansatz A:	1 µl Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500µg/ml) 10 µl total RNA 1 µl dNTP Mix
Ansatz B:	4 µl 5X First Strand Buffer 2 µl 0.1 M DTT

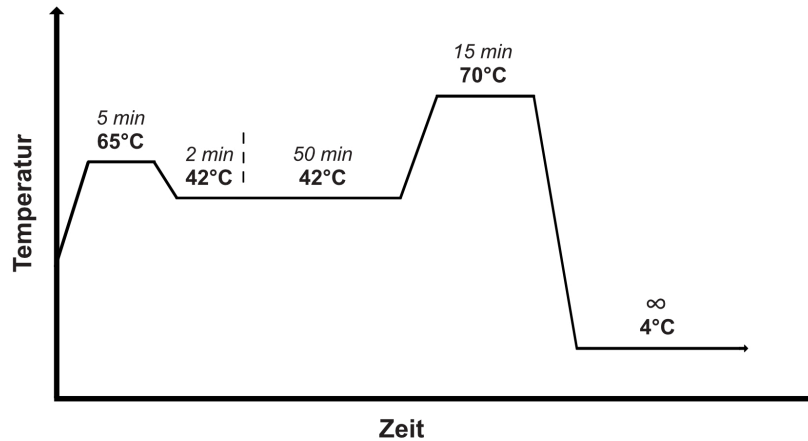


Abbildung 5: Schematisch zeitlicher Verlauf der cDNA-Synthese. Quelle: eigene Darstellung.

2.4.1.4 Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)

Um gezielte DNA-Moleküle zu quantifizieren, wurde eine quantitative PCR in Echtzeit (quantitative Realtime PCR, qRT-PCR) durchgeführt.

Pro Well wurde der folgende Ansatz hergestellt:

Tabelle 14: Angewendete Mischung für qRT-PCR

Primer-Gemisch	2 μ l
nukleasefreies Wasser	3 μ l
Mastermix	10 μ l
cDNA	5 μ l

Das Primer-Gemisch bestand aus den Primern 5' → 3' und 3' → 5'. Beide Primer wurden im Verhältnis 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Der Mastermix enthält eine FastStart-Taq-DNA-Polymerase und einen DNA-Doppelstrang-spezifischen SYBR-Green-I-Farbstoff. Jede Probe wurde als Duplikat angesetzt. Nach dem pipettieren der Proben wurde die Platte kurz bei 4 °C bei 1000 rpm zentrifugiert und in den LightCycler[®] eingebracht. Die Programmeinstellung von LightCycler[®] ist in der Tabelle 15 abgebildet.

Tabelle 15: LightCycler-Programmeinstellung

	<u>Zeit (mm:ss)</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zyklus</u>
Pre-Inkubation	5:00	95 °C	1x
Amplifikation	0:20	95 °C	45x
	0:20	60 °C	
	0:20	72 °C	
Schmelzkurve	0:05	95 °C	1x
	1:00	65 °C	
Kühlung	0:30	37 °C	1x

2.4.1.5 Auswertung der qRT-PCR

Die Bestimmung der Konzentration der PCR-Produkte erfolgte mithilfe von Kreuzungspunkten (Crossing Point, CP-Wert). Der CP-Wert beschreibt den Teil der Kurve, in dem das Signal erstmals über den Hintergrundwert ansteigt. Am CP-Wert erhalten alle Proben die gleiche Menge an neusynthetisierter DNA. Für die Auswertung wurde Microsoft Excel 2017 für Mac (Version 15.27, Microsoft) benutzt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der relativen Quantifizierung. Die Expression des untersuchten Gens wurde auf ein zweites, ubiquitär exprimiertes Gen bezogen. Das hier beschriebene Protokoll lieferte eine gute RNA-Qualität. Abgebaute Proben mit schlechter RNA-Qualität können jedoch auftreten und wurden durch höhere CP-Werte des sogenannten Haushaltsgens (Housekeeping Gene) XS13 identifiziert. Wenn die Proben keine realistischen CP-Werte für das Haushaltsgen ergaben, wurden sie ausgeschlossen.

In einem ersten Schritt wurde der CP-Wert des Zielgens von dem zu untersuchenden Gen subtrahiert:

$$\Delta Cp_1 = CP_{Zielgen1} - CP_{Referenzgen1} \quad (1)$$

$$\Delta Cp_2 = CP_{Zielgen2} - CP_{Referenzgen2} \quad (2)$$

Um den Fehler bei den Messungen zu minimieren, wurden immer Duplikate verwendet.

Von den beiden Differenzen ΔCp_1 und ΔCp_2 wurde danach der Mittelwert berechnet:

$$\text{Mittelwert} = (\Delta Cp_1 + \Delta Cp_2) / 2$$

Schließlich wurde von dem Mittelwert die Ratio wie folgt berechnet:

$$\text{Ratio} = 2^{-\text{Mittelwert}}$$

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Western Blot

2.5.1.1 Methodische Grundlagen

Die Western-Blot-Methode ermöglicht den Nachweis der Proteinexpression. Bei dieser Technik wird das Proteingemisch aufgrund des Molekulargewichts durch Gelelektrophorese getrennt (Laemmli 1970). Diese Ergebnisse werden dann auf eine Membran übertragen (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979). Die Membran wird daraufhin mit einem für das gesuchte Protein spezifischen Primärantikörper inkubiert. Ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Die HRP katalysiert durch die sogenannte Chemolumineszenzreaktion (ECL) die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form (siehe Abbildung 6), wodurch Lumineszenz entsteht. Durch das Entwickeln auf einen Film werden die gebundenen Antikörper in Form eines Bands abgebildet. Die Dicke des Bandes entspricht der vorhandenen Proteinmenge. Ladekontrollen (Haushaltsgene) werden verwendet, um zu bestätigen, dass die Proteinbeladung über das Gel gleich ist. Ladekontrollen sind Proteine, die eine hochrangige Expression in der Probe haben. Die zu untersuchende Proteinmenge wird nach Normalisierung mit den Ladekontrollen bestimmt.

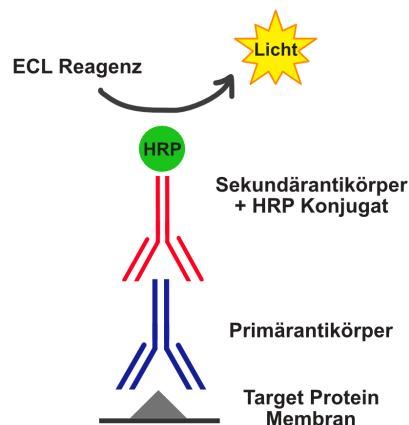


Abbildung 6: ECL-Prinzip. Der Primärantikörper bindet selektiv an das Target-Protein. Ein mit dem Enzym HRP konjugierter Sekundärantikörper, bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Dieses Enzym wird durch Wasserstoffperoxid aktiviert, Luminol wird oxidiert und emittiert Licht, welches auf dem Film nachgewiesen werden kann. Quelle: eigene Darstellung.

2.5.1.2 Proteinextraktion

Um eine Proteindegradierung zu verhindern, wurden die Proben bis zur Zellyse in gefrorenem Zustand in flüssigem Stickstoffmonoxid gelagert. Eine Lösung mit 10 µl Ripa-Buffer, einer Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail und einer Tablette Phosphatase-Inhibitor-Cocktail wurden bereitgestellt. Dies ermöglicht eine geeignete Zellyse. Das Gewebe wurde im Anschluss mit 300 µl der oben genannten Lösung für 20 Sekunden homogenisiert und auf Eis gestellt. Das Produkt wurde dann für

10 Sekunden auf Eis im Ultraschallbad behandelt und danach für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Proben bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und das Protein-Lysat ohne den Zelldegradierungsüberschuss mit einer Pipette aufgenommen.

2.5.1.3 Messung der Proteinkonzentration

Um sicherzustellen, dass die gleichen Proteinmengen für die Westernblot-Analyse aufgetragen werden, ist es entscheidend die Proteinmenge der zu untersuchenden Proben zu kennen. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe eines Bicinchoninic Acid Assay (BCA-Assays) bestimmt (Smith et al. 1985). Dabei wird die Gesamtproteinkonzentration durch eine Farbenänderung der Probenlösung im Verhältnis zur Proteinkonzentration angezeigt, die dann unter Verwendung kalorimetrischer Techniken gemessen werden kann.

Zuerst wurden jeweils 100 µl der BSA-Lösung wie folgt hergestellt:

Tabelle 16: Berechnung der Proteinkonzentrationen für den Western Blot

	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
BSA	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl
Ripa-Buffer	90 µl	80 µl	60 µl	40 µl	20 µl	0 µl

Das Arbeitsreagenz wurde vorbereitet, indem ein Gemisch aus Reagenz A und Reagenz B aus dem Pierce™ BCA-Protein-Assay-Kit bereitgestellt wurde (50:1, Reagenz A:B). Für die BSA-Kurve wurden pro Well 10 µl der bekannten BSA-Solution und 190 µl der Arbeitsreagenz pipettiert. Für die Proben wurden pro Well 2 µl der Proteinprobe und 198 µl des Arbeitsreagenzes pipettiert. Für alle Proben sowie für die BSA-Kurve wurden Triplets angesetzt. Die Platte wurde dann für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration fotometrisch gemessen.

2.5.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse der Proteinmischungen wurde eine Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) verwendet (Smith 1984). Zunächst erfolgte das Gießen eines 12%igen Trenngels, welches mit 70%igem Alkohol überschichtet wurde. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol entfernt. Anschließend wurde ein 5%iges Sammelgel gegossen. Hier wurde ein Kunststoffkamm zur Ausformung der Ladetaschen eingesetzt. Proben mit einer Gesamtproteinkonzentration von 40 µg wurden vorbereitet. Die zu analysierenden Proben wurden mit dH₂O verdünnt. Das Gesamtvolumen aus Probe und dH₂O betrug 22,5 µl. Pro Probe wurde 7,5 µl 5X Auftragspuffer hinzupipettiert (Gesamtvolumen 30 µl) und dann wurden die Proben für die

Proteindenaturierung für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, kurz auf Eis gestellt und für eine Minute zentrifugiert.

Das Gel mit den Glasplatten wurde nach dem Auspolymerisieren in die Kammer eingesetzt. Zudem wurde die Kammer mit 10X Laufpuffer befüllt. Nach Entfernung des Kunststoffkamms wurden die Geltaschen kurz mit Laufpuffer gespült und anschließend mit den vorbereiteten Proben befüllt. Die erste Tasche wurde mit 7,5 µl eines definierten Proteingrößen-Standards beladen. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung für eine Stunde bei 35 mA.

2.5.1.5 Blotting

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Transfer der Proteine auf einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran), die zuerst für 1 Minute in Methanol inkubiert und somit aktiviert wurde. Das Sammelgel wurde entfernt, PVDF-Membran und Filterpapier wurden auf die Gelgröße zugeschnitten und auf ein Gel-Membran-Filter-Sandwich luftblasenfrei zusammengefügt. Anschließend wurde das Gel-Membran-Filter-Sandwich in den Transfertank vertikal gelegt und der Transfertank mit dem 1X Transferpuffer befüllt. Vom Gel zu der Membran wurden die Proteine unter der Kontrolle eines elektrischen Feldes transferiert, welches durch eine parallel zum Gel-Membran-Filter-Sandwich verlaufende Elektrodenplatte erzeugt wurde. Der Proteintransfer wurde auf Eis bei konstanter Spannung von 100 V für 90 Minuten durchgeführt.

2.5.1.6 Proteinmarkierung mit Antikörper und Immundetektion

Die Membran wurde anhand des Proteingrößen-Standards so geschnitten, dass die zu untersuchenden Proteine detektierbar waren und anschließend in TBS-T gewaschen. Es folgte das Blocking mit 5%igem Skim Milk Powder (Sigma-Aldrich) in TPS-T für 30 Minuten. Nachdem die Membran nochmal in TBS-T gewaschen wurde, wurde jeder Membranteil mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper wurden in 5%iger BSA-Lösung in TBS-T verdünnt. Die Verdünnung der Antikörper ist der Tabelle 10 zu entnehmen. Am nächsten Tag wurde die Membran für 4 x 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 45 Minuten inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde in 5%igem Skim Milk Powder (Sigma-Aldrich) verdünnt. Es folgte das Waschen für 4 x 5 Minuten mit PBS-T und ein 5-minütiges Waschen mit Tris-Buffered Saline (TBS). Das ECL-Detektionsreagenz (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) wurde bereitgestellt (Volumen des ECL und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1) und damit die Membran für 5 Minuten inkubiert. Abschließend wurde ein Bild der Membran mithilfe eines Röntgenfilms aufgenommen.

Die Detektion von phosphoryliertem-CREB (pCREB) und CREB fand auf der derselben Membran statt. Es wurde zuerst das pCREB detektiert. Die Membran wurde nach der Inkubation und Detektion von dem pCREB-Antigen gestrippt. Stripping bezeichnet die Entfernung der Primär- und

Sekundärantikörper aus einer Western-Blot-Membran. Nach der Röntgenfilmaufnahme wurde die Membran in PBS gewaschen und dieser Teil der Membran in dH₂O weiter gewaschen. Das Stripping erfolgte mit 1 M NaOH für 5 Minuten. Anschließend wurde die Membran in dH₂O und PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Nachdem die Membran mit 5%igem Skim Milk Powder (Sigma-Aldrich) für 30 Minuten geblockt wurde, erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem CREB-Antikörper. Der Antikörper gegen CREB wurde wie oben bereits beschrieben detektiert.

2.5.1.7 Quantifizierung des Western Blots

Die in Abschnitt 2.5.1.6 beschriebenen Filme wurden eingescannt. Die Auswertung und Quantifizierung der Bänder erfolgte mit ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA). Zuerst wurde das Bild invertiert, da die hochauflösenden Bänder, die auf dem Film dunkel erscheinen, hohe numerische Werte haben, wenn sie gemessen werden. Im Anschluss wurde der mittlere Grauwert jedes Bandes dreimal bestimmt und ein Mittelwert errechnet. Der mittlere Grauwert ist die Summe der Grauwerte aller Pixel dividiert durch die Anzahl der Pixel. Alle Bänder wurden so dreimal unter den gleichen Bedingungen gemessen. Das Ergebnis wurde nach Normalisierung mit der Ladekontrolle bestimmt.

2.6 Zellbiologische Methoden

Für die Azinuszellkulturen wurden die zuvor von Means et al., Pinho et al. und Figura et al. beschriebenen Protokolle in modifizierter Form verwendet (Means et al. 2005), (Pinho et al. 2011) (von Figura et al. 2014).

2.6.1 Zellkultur

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten fanden an einer Sterilbank statt. Die Arbeitsfläche wurde vor Gebrauch mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Alle verwendeten Lösungen und Medien waren sterilfiltriert. Die eingesetzten Materialien waren autoklaviert bzw. sterilisiert.

2.6.2 Isolation und Züchtung primärer Azinuszellen

In diesem Teil der Arbeit wurden unbehandelte WT-Mäuse verwendet. Die WT-Mäuse wurden im Rahmen einer tierschutzkonformen Tötung durch eine Überdosis Isofluran euthanasiert. Anschließend wurden die Mäuse durch eine mediane Laparoskopie eröffnet und das Pankreas entnommen. Es folgte das Waschen des Pankreas mit kaltem Hanks' Balanced Salt solution (HBSS). Danach wurde das

Pankreasgewebe mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Nach der Zentrifugierung bei 720 G für 2 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand verworfen. Das so entstandene Pellet wurde in 5 ml Kollagenase P resuspendiert und bei 37 °C und 5%igem CO₂ für 10 Minuten inkubiert. Dies ermöglicht eine Verdauung des Pankreasgewebes. Die Solution wurde danach auf Eis gestellt und ein Gemisch aus 10 ml HBSS und 5%igem Fötalen Kälberserum (FBS) zugeführt. Es folgte eine Zentrifugierung bei 720 G für 2 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde auch hier verworfen und das Pellet mit 10 ml HBSS und 5%igem FBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach erfolgte eine abschließende Zentrifugierung bei 400 G für 2 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde im Anschluss erneut verworfen.

Das Pellet wurde in 10 ml HBSS und 5%igem FBS resuspendiert und das Gesamtvolumen durch einen 100 µM-Filter filtriert. Der Filter wurde mit 10 ml HBSS und 5%igem FBS gewaschen, sodass am Ende ein Gesamtvolumen von 20 ml entstanden ist. Das Gesamtvolumen wurde sorgfältig auf 20 ml HBSS und 30%igem FBS pipettiert und bei 180 G für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in je nach Volumen des Pellets in Kulturmedium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen gleichmäßig auf einer Zellenplatte in Wells verteilt.

In einem weiteren Experiment wurden die Azinuszellen von einer WT-Maus isoliert, mit CGRP-behandelt und kultiviert. Für die Behandlung der Zellen wurden neun Wells gebildet und die Zellen in drei Gruppen mit jeweils drei Wells pro Gruppe geteilt. Bei der einen Gruppe wurden die Zellen nicht behandelt, bei der anderen wurden sie mit CGRP in einer Konzentration von 100 nM behandelt und bei der dritten Gruppe wurden sie mit CGRP in einer Konzentration von 500 nM inkubiert (siehe Abbildung 7). Die behandelnde Substanz (CGRP) wurde in Kulturmedia in der jeweiligen Konzentration (100 nM und 500 nM) verdünnt und 100 µl davon in jedes Well pipettiert. Bei den nicht behandelten Zellen wurden 100 µl Kulturmedium dazugegeben, sodass alle Proben letztendlich das gleiche Volumen erhielten. Die Zellenplatte wurde bei 37 °C und 5%igem CO₂ inkubiert und die Zellen nach 24 Stunden gesammelt. Von den gesammelten Zellen wurde nach der Zentrifugierung der Überstand verworfen und einem Gemisch aus Lysis Buffer RA1 (Macherey Nagel) und Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 zugeführt (Gesamtvolumen 200 µl).



Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau der Isolierung, Behandlung und Kultivierung von Azinuszellen. Quelle: eigene Darstellung.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Graphen erfolgte mittels der Prism Software (Version 6.0, GraphPad). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Tests. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Alle Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Affinity Designer 1.8 erstellt.

3 Ergebnisse

Mithilfe von RAMP1^{-/-}- und WT-Mäusen wurde der Einfluss des RAMP1-Proteins in einem caeruleininduzierten Pankreatitismodel untersucht. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Injektion einer supramaximalen Caerulein-Dosis zu einer entzündlichen Infiltration, einer exokrinen Atrophie sowie zu einem interstitiellen Ödem des Pankreas führt (Jensen et al. 2005). Die Analysen nach 8 und 24 Stunden sowie nach 2 Tagen ermöglichen die Beurteilung der akuten Pankreasschädigung. Zur Bewertung der Regenerationskapazität erfolgte eine zusätzliche Analyse 7 Tage nach der Caerulein-Behandlung. In WT Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass das Pankreasgewebe nach 7 Tagen komplett regeneriert ist (Kopp et al. 2012) (von Figura et al. 2014). Als interne Kontrolle erhielten RAMP1- und WT-Mäuse (Kontrollmäuse) intraperitoneale Injektionen mit PBS und wurden 7 Tage nach der ersten Injektion euthanasiert.

3.1 RAMP1-Einfluss auf die Pankreasorganogenese

In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass der RAMP1^{-/-} *knock out* keinen Einfluss auf die Pankreasorganogenese hat. In den HE-gefärbten Schnitten zeigte sich sowohl bei den RAMP1^{-/-} Mäusen als auch bei den WT Mäusen eine normale Pankreashistologie mit intakten Pankreasazini. Darüber hinaus fanden sich histologisch keine Hinweise auf eine Inflammation, auf ein Ödem oder eine Vakuolisierung (Abbildung 8, A und B).

Immunhistochemisch zeigten sich ebenfalls normale Expressionsmuster der Marker CK19 und CPA1 in RAMP1^{-/-} und WT Mäusen. Die Untersuchung beider Epitope erfolgte an unbehandelten Versuchstieren. CK19 wird von den duktalem Epithelzellen der Pankreasgänge und in der Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts exprimiert (Chu and Weiss 2002). Die Carboxypeptidase A1 wird vom exokrinen Pankreasgewebe sezerniert und spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Verdauung. Bei der Färbung mit dem anti-CPA1-Antikörper wurde untersucht, ob die Azini sowohl bei den WT- als auch bei den RAMP1^{-/-}-Mäusen in der Lage sind, dieses Enzym zu sezernieren und somit ihrer physiologischen Funktion nachzugehen. In beiden Mauslinien waren die Marker CPA1 und CK19 in gleichem Ausmaß nachzuweisen (Abbildung 8, B). Dies weist darauf hin, dass ein *knock out* von RAMP1 keinen Einfluss auf die Pankreashomöostase hat.

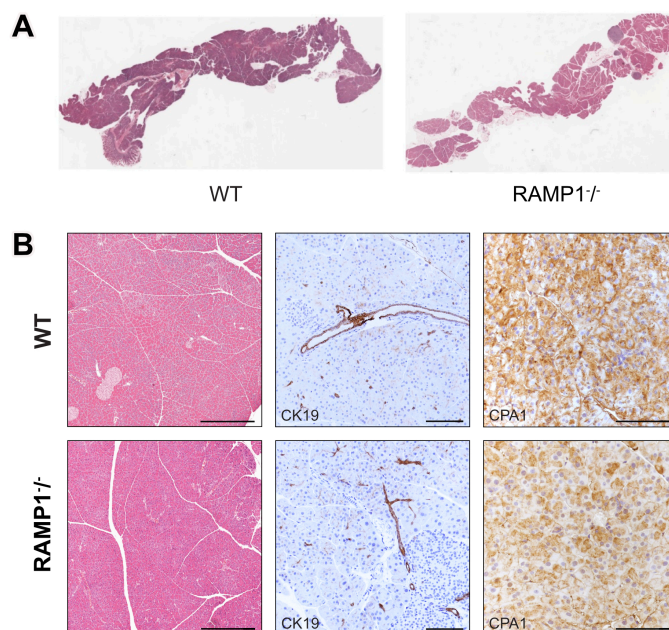


Abbildung 8: Histologische Gewebeanalysen un behandelter WT- und RAMP1^{-/-}-Mäuse. (A) Histologische HE-Übersichtsaufnahme des Pankreas. (B) Histologische HE- und immunhistochemische Färbungen mit einem CK19- und einem CPA1-Antikörper bei WT- und RAMP1^{-/-}-Mäusen (Maßstabskala HE-Färbung: 500 µm; Immunhistochemie: 100 µm).

3.2 Die murine caeruleininduzierte akute Pankreatitis

3.2.1 Makroskopische und histologische Veränderungen bei RAMP1-Defizit

In der akuten Phase der Pankreatitis 8 und 24 h post-Caeruleininjektion war das Verhältnis zwischen Pankreas- und Körpergewicht (PG/KW) bei den RAMP1^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht (8 h: $p = 0.01$; 24 h: $p = 0.03$, Abbildung 9, B).

Parallel zu meinen Untersuchungen wurde zu Beginn dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Leonie S. Jochheim die histologische Untersuchung von Nekrose, Ödem und Inflammation analysiert. Die histologischen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen wurden mit Hilfe eines Nekrose-, Ödem-, und Pankreatitisscores quantifiziert. RAMP1^{-/-} Mäuse wiesen histologisch in der akuten Phase der Pankreatitis (8 und 24 h) eine signifikant höhere Infiltration von Immunzellen (8 h: $p = 0.04$; 24 h: $p < 0.0001$, Abbildung 9, E) sowie eine signifikant höhere Ödembildung bei 8 h ($p = 0.03$, Abbildung 9, D) auf. Das Nekrose-Score ergab zwischen RAMP1^{-/-} und WT-Mäusen bei 8 und 24 h keinen signifikanten Unterschied (8 h: $p = 1.00$; 24 h: $p = 0.60$, Abbildung 9, C).

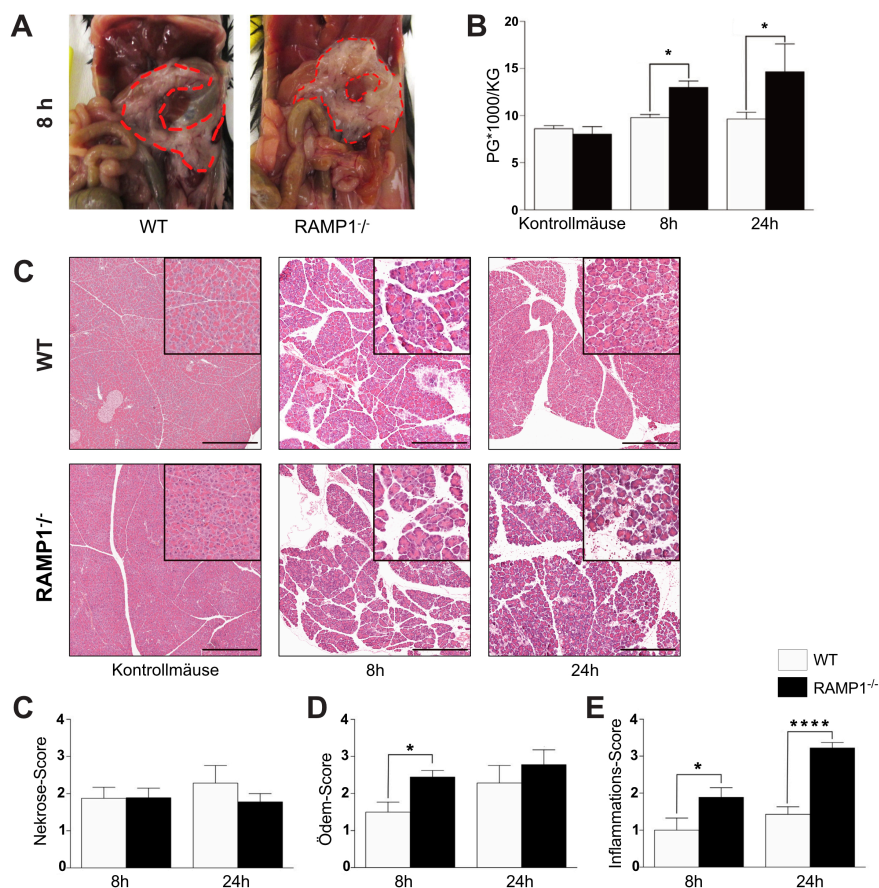


Abbildung 9: Erhöhtes PG/KG und verstärkte Inflammation bei RAMP1^{-/-}-Mäusen 8 und 24 h nach Caerulein-Behandlung. (A) Makroskopische Veränderungen und (B) PG*1000/KG der Pankreata von WT und RAMP1^{-/-}. (B) Repräsentative HE-gefärbte, formalinfixierte Paraffinschnitte (Maßstabskala: 500 µm). (C) Nekrose-Score, (D) Ödem-Score und (E) Inflammations-Score von WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen. Daten repräsentieren Mittelwert ± SEM, *p < 0.05, ****p < 0.0001. Der Nekrose-, Ödem- und Inflammations-Score wurde in dieser Arbeit von Frau Dr. med. Leonie S. Jochheim zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Charakterisierung des Immunzellinfiltrats

In der frühen Phase der akuten Pankreatitis (8 und 24 h) zeigte sich bereits in den HE Färbungen eine signifikant stärkere Immunzellinfiltration in das Pankreas bei den RAMP1^{-/-} im Vergleich zu den WT- Mäusen (Abbildung 9, B und E). Zur genauen Differenzierung des Immunzellinfiltrats erfolgten immunhistochemische Färbungen.

3.2.2.1 Histologische Quantifizierung der F4/80⁺-Zellen

Um in der hier beschriebenen Studie die Makrophagen sichtbar zu machen, wurde ein Antikörper gegen F4/80 verwendet. Der Antikörper gegen F4/80 bindet an alle Makrophagen und stellt deswegen einen gut definierten Marker für die Makrophagen in Mausmodellen dar (Austyn and Gordon 1981). Makrophagen spielen eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem und können zu einer Verstärkung der entzündlichen Reaktion führen (Eming, Krieg, and Davidson 2007). In der frühen

Phase der akuten Pankreatitis (8 h post Cerulein Injektion) zeigten sich bei den RAMP1^{-/-} Mäusen signifikant mehr Makrophagen als bei den WT-Mäusen (8 h: $p = 0.05$, Abbildung 10). Die maximale Anzahl an Makrophagen wurde am zweiten Tag nach der Induktion der akuten Pankreatitis sowohl bei RAMP1-defizienten Mäusen (Median: 40.4) als auch bei WT-Mäusen (Median: 31.0) gemessen. Bei 24 h sowie bei 2 und 7 d zeigte sich kein signifikanter Unterschied (24 h: $p = 0.92$; 2 d: $p = 0.73$; 7 d: $p = 0.79$).

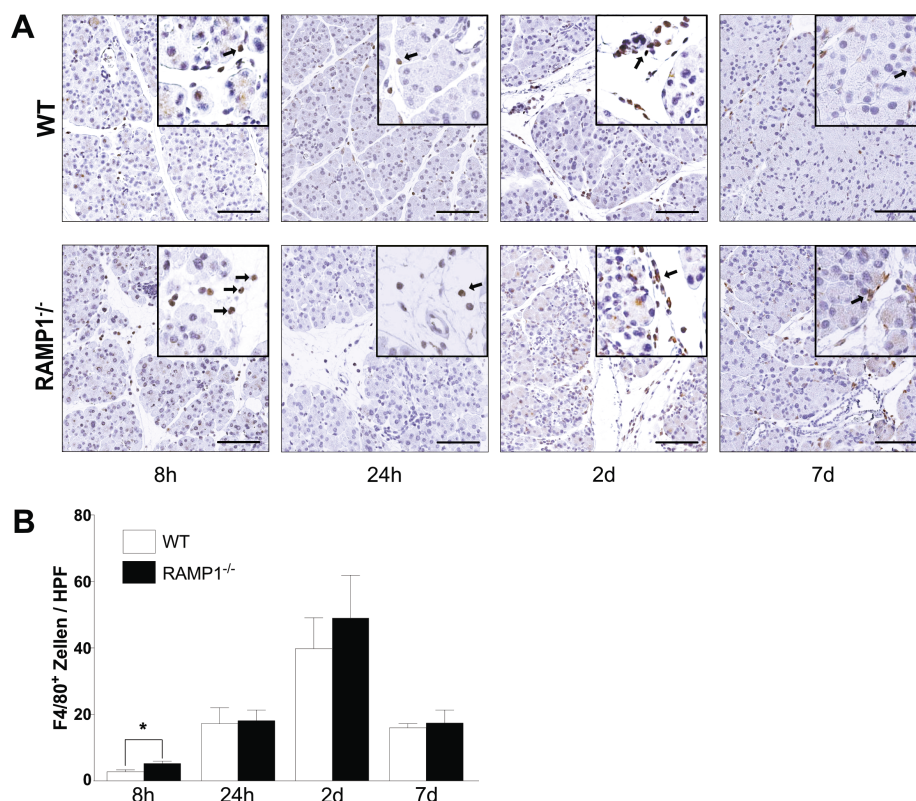


Abbildung 10: Erhöhte Anzahl F4/80⁺-Zellen 8 h nach Caerulein-Behandlung bei RAMP1^{-/-}-Mäusen. (A) Repräsentative immunhistochemische Abbildungen mit einem F4/80-Antikörper (Maßstabskala: 100 μ m). (B) Quantifizierung der F4/80⁺-Zellen in Pankreas von WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen. Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM, * $p < 0.05$, $n \geq 6$ Tiere pro Gruppe.

3.2.2.2 Histologische Quantifizierung der MPO⁺-Zellen

Neutrophile Granulozyten spielen bei der frühen Phase einer Inflammation eine sehr wichtige Rolle. Die Myeloperoxidase ist ein Enzym in neutrophilen Granulozyten, welches zur Beseitigung von Bakterien und anderen Pathogenen benutzt wird. Es ist ein lysosomales Protein, das während der Degranulation in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (Kinkade et al. 1983). Die Myeloperoxidase kann als Marker für die Anzahl der Neutrophilen im Gewebe eingesetzt werden (Bradley et al. 1982). Im vorliegenden Modell wurden die neutrophilen Granulozyten bei der frühen Phase der Inflammation, bei 8 und 24 h, quantifiziert. Bei 24 h war die Anzahl der Neutrophilen bei den RAMP1-KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant erhöht (8 h: $p = 0.60$;

24 h: $p = 0.0002$, Abbildung 11). Bei der Färbung sind auch apikale Bereiche von Azinuszellen, vor allem der KO-Mäuse, positiv gefärbt. Dies könnte durch eine unspezifische Reaktion der Antikörper mit dem Gewebe zustande gekommen sein, was durch die vermehrte Nekrose und die pH-Veränderung während der Entzündung zu erklären ist.

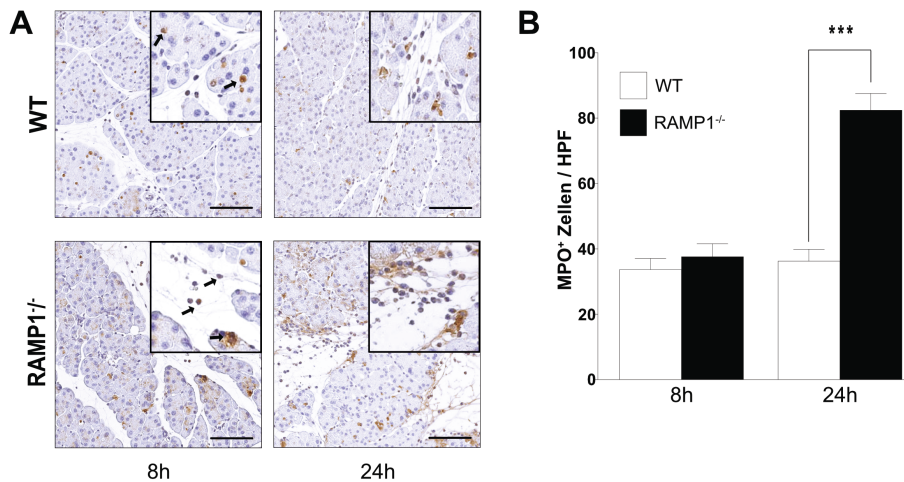


Abbildung 11: Erhöhte Anzahl MPO⁺-Zellen 24 h nach Caerulein-Behandlung bei RAMP1^{-/-}-Mäusen. (A) Repräsentative immunhistochemische Abbildungen mit einem MPO-Antikörper (Maßstabskala: 100 μ m). (B) Quantifizierung der MPO⁺-Zellen in Pankreas von WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen. Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM, *** $p < 0.001$, $n \geq 7$ Tiere pro Gruppe.

3.2.2.3 Histologische Quantifizierung der CD4⁺-Zellen

CD4⁺-Lymphozyten helfen, Immunantworten zu unterdrücken oder zu regulieren und unterstützen durch die Freisetzung von T-Zell-Zytokine die Aktivität anderer Immunzellen. Nach einer Wechselwirkung mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex werden die CD4⁺-Lymphozyten aktiviert und können in spezifischen Subtypen unterteilt werden, welche hauptsächlich vom Zytokin-Milieu der Umgebung abhängen (Luckheeram et al. 2012). Während die maximale Anzahl an CD4⁺-Zellen bei den WT-Mäusen nach 24 h beobachtet wurde (Median: 4.20), wurde bei den KO-Mäusen ein maximaler Anstieg am siebten Tag post-Ceruleininjektion gemessen (Median: 6.00). Die Anzahl der CD4⁺-Zellen 7 d post Behandlung war bei den RAMP1 KO Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant erhöht (7 d: $p = 0.005$, Abbildung 12). Im beiden Gruppen fand sich 8 h, 24 h sowie 2 d post Behandlung keinen signifikanten Unterschied (8 h: $p = 0.16$; 24 h: $p = 0.26$; 2 d: $p = 0.13$).

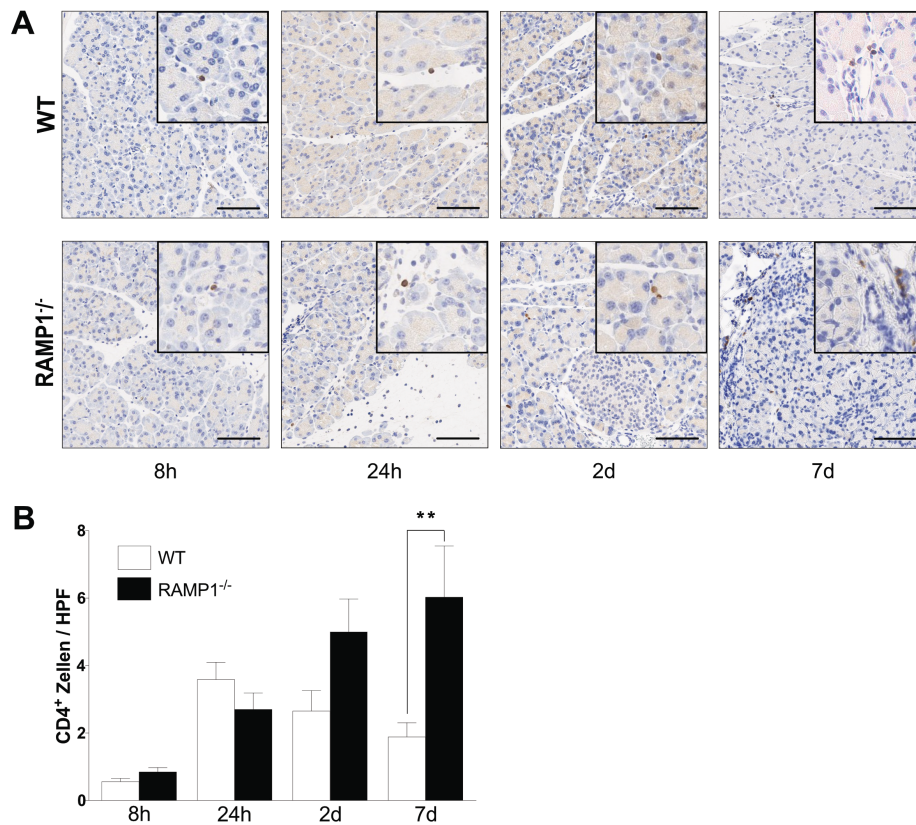


Abbildung 12: Immunhistochemische Analyse und Auswertung CD4⁺-Zellen. (A) Repräsentative immunhistochemische Abbildungen mit einem CD4-Antikörper (Maßstabskala: 100 µm). (B) Quantifizierung der CD4⁺-Zellen in Pankreas von WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen. Daten repräsentieren Mittelwert ± SEM, **p < 0.01, n ≥ 6 Tiere pro Gruppe.

3.2.2.4 Histologische Quantifizierung der CD8⁺-Zellen

Die CD8⁺-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene, einschließlich Viren und Bakterien, und bei der Tumorerüberwachung. Sobald eine CD8⁺-T-Zelle ihr Antigen erkennt und aktiviert wird, kann sie Zielzelle durch verschiedene Mechanismen zerstören, wie z. B. durch die Zytokinsekretion, durch die Freisetzung von zytotoxischen Granulaten oder durch die Fas/FasL-Interaktion mit anschließender Caspasen-Aktivierung (Andersen et al. 2006). Die CD8⁺-Zellen verhielten sich bei beiden Genotypen ähnlich. Die Anzahl der Zellen nahm mit späteren Zeitpunkten post Injektion weiter zu. Es wurden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede gemessen (8 h: p = 0.31; 24 h: p = 0.18; 2 d: p = 0.28; 7 d: p = 0.10, Abbildung 13).

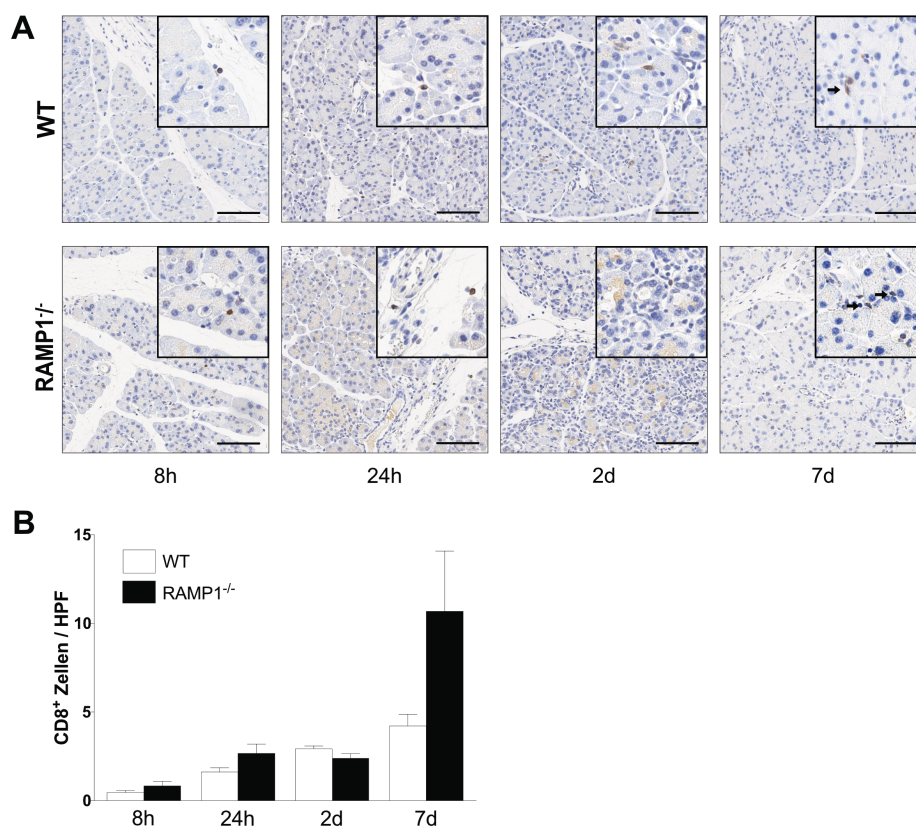


Abbildung 13: Immunhistochemische Analyse und Auswertung CD8⁺-Zellen. (A) Repräsentative immunhistochemische Abbildungen mit einem CD8-Antikörper (Maßstabskala: 100 µm). (B) Quantifizierung von CD8⁺-Zellen in Pankreas von WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen. Daten repräsentieren Mittelwert ± SEM, n ≥ 5 Tiere pro Gruppe.

3.2.2.5 Überblick über die Inflammation und Analyse des CD4/CD8-Verhältnisses

In der Abbildung 14 (A und B) wurden die quantifizierten Immunzellen in den frühen Phasen der Inflammation (8 und 24h) zum jeweiligen Zeitpunkt abgebildet. Es ist zu sehen, dass im hier beschriebenen Modell in den frühen Phasen der akuten Pankreatitis F4/80⁺- und MPO⁺-Zellen zahlenmäßig die größte Rolle bei der Entzündung spielen.

Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse und um besser verstehen zu können, wie sich die T-Zellen immunologisch im vorliegenden Modell verhalten, wurden die Ergebnisse der Quantifizierung der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in einem Graphen mit einer CD4⁺:CD8⁺-Ratio dargestellt, die das Verhältnis von T-Helferzellen zu zytotoxischen T-Zellen darstellt (Abbildung 14, C). Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikanten Unterschiede zwischen WT- und RAMP1-KO-Mäusen festgestellt werden (8 h: p = 0.77; 24 h: p = 0.21; 2 d: p = 0.09; 7 d: p = 0.10, Abbildung 14, C).

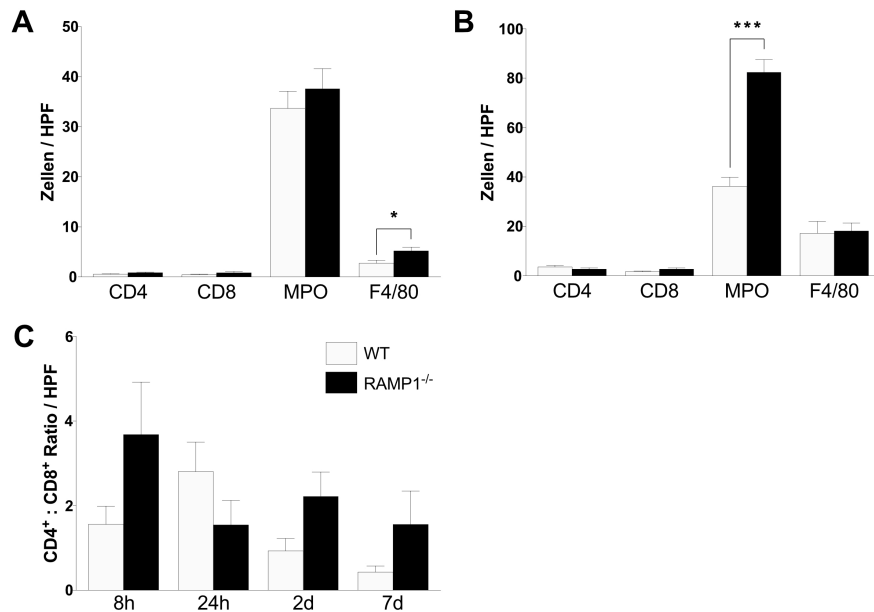


Abbildung 14: Zusammenfassung der Inflammationszellen 8 und 24 h post Behandlung sowie Analyse der CD4:CD8-Ratio. Anzahl der Inflammationszellen pro HPF bei 8 h (A) und 24 h (B). (C) Statistische Analyse der CD4:CD8-Ratio. Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

3.2.3 Einfluss von RAMP1 auf die Azinuszellen nach akuter Pankreatitis

3.2.3.1 Histologische Quantifizierung der Ki-67⁺-Zellen

Um den Einfluss von RAMP1^{-/-} auf die Proliferationsrate zu untersuchen, führten wir immunhistochemische Analysen durch. Das Ki-67-Antigen befindet sich im Zellkern und kann als Tumorproliferationsmarker verwendet werden (Menon et al. 2019).

Als *baseline* wurden aus beiden Gruppen Schnitte von Kontrollmäusen mit dem Antikörper Anti-Ki67 gefärbt. In beiden Gruppen zeigten sich bei den Kontrollmäusen wenige Ki-67 positive Zellen (Median: WT: 0.40; RAMP1^{-/-}: 0.85) ohne einen signifikanten Unterschied zwischen WT und RAMP1^{-/-} Mäusen ($p = 0.08$, Abbildung 15). Acht Stunden post-caerulein Injektion wiesen RAMP1^{-/-} Mäuse signifikant weniger Ki-67 positive Zellen auf als die WT-Mäuse (8 h: $p = 0.004$; Abbildung 15). Insgesamt zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg der Proliferationsrate im Vergleich zur *baseline* (WT: $p < 0.0001$ und RAMP1^{-/-}: $p = 0.0002$). Zu den späteren Zeitpunkten 24 h und 2 d ergaben sich keine Unterschiede zwischen den WT und RAMP1^{-/-} Mäusen (24 h: $p = 0.15$; 2 d: $p = 0.37$). Die maximale Zellproliferationsrate wurde in beiden Gruppen am zweiten Tag post-Ceruleininjektion beobachtet (Median: WT: 49.7; RAMP1^{-/-}: 44.0).

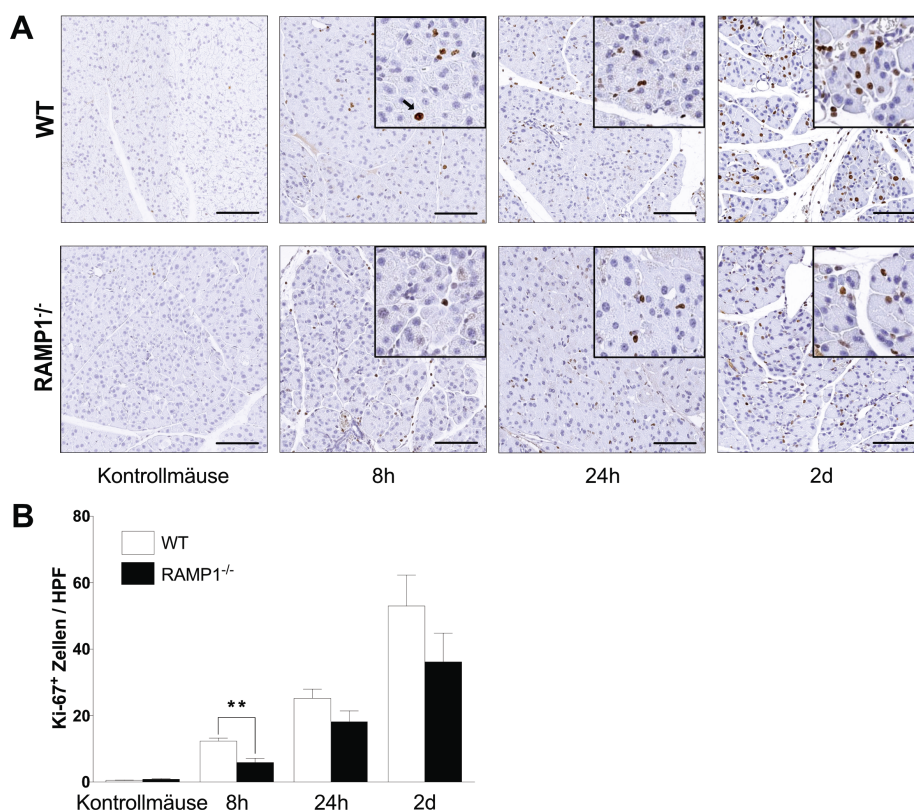


Abbildung 15: Reduzierte Proliferation 8 h nach Caerulein-Behandlung bei RAMP1^{-/-}-Mäusen. (**A**) Repräsentative immunhistochemische Abbildungen mit dem Ki-67-Antikörper (Maßstabskala: 100 µm). (**B**) Quantifizierung der Ki-67⁺-Zellen am Pankreas von WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen. Bei allen Messungen wurden nur Ki-67⁺-Azinuszellen als positiv ausgewertet. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM, **p < 0.01, n ≥ 6 Tiere pro Gruppe.

3.2.3.2 Histologische Quantifizierung der Cleaved Caspase-3⁺-Zellen

Analog zur Analyse der Proliferationsrate wurde mit Hilfe Immunhistochemischer Färbungen mit dem Antikörper Anti-Cleave-Caspase 3, der Einfluss von RAMP1^{-/-} auf die Apoptose untersucht. Die Caspase-3 spielt bei der Apoptose eine tragende Rolle und ist für die apoptotische Chromatinkondensation und die DNA-Fragmentierung erforderlich (Porter and Janicke 1999).

Bei der Quantifizierung der WT- und RAMP1^{-/-}-Kontrollmäusen sowie bei 8 h zeigten sich in beiden Gruppen wenige Cleaved Caspase-3 positiven Zellen ohne signifikante Unterschiede (Kontrollmäuse: p = 0.47; 8 h: p = 0.21, Abbildung 16). In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell erfolgte eine Caspase-Aktivierung erst nach 24 h (Median: WT: 7.60; RAMP1^{-/-}: 19.9) mit einer signifikant höheren Anzahl Cleaved Caspase-3 positiver Zellen bei den RAMP1^{-/-} im Vergleich zu den WT Mäusen (24 h: p = 0.002; Abbildung 16). An Tag 2 nahm die Expression der Cleaved Caspase-3 in beiden Gruppen ab (Median: WT: 2.45; RAMP1^{-/-}: 1.30). RAMP1^{-/-} Mäuse wiesen an Tag 2 eine signifikant verminderte Anzahl an Cleaved Caspase-3 positiven Zellen im Vergleich zu den WT Mäusen auf (2 d: p = 0.035; Abbildung 16).

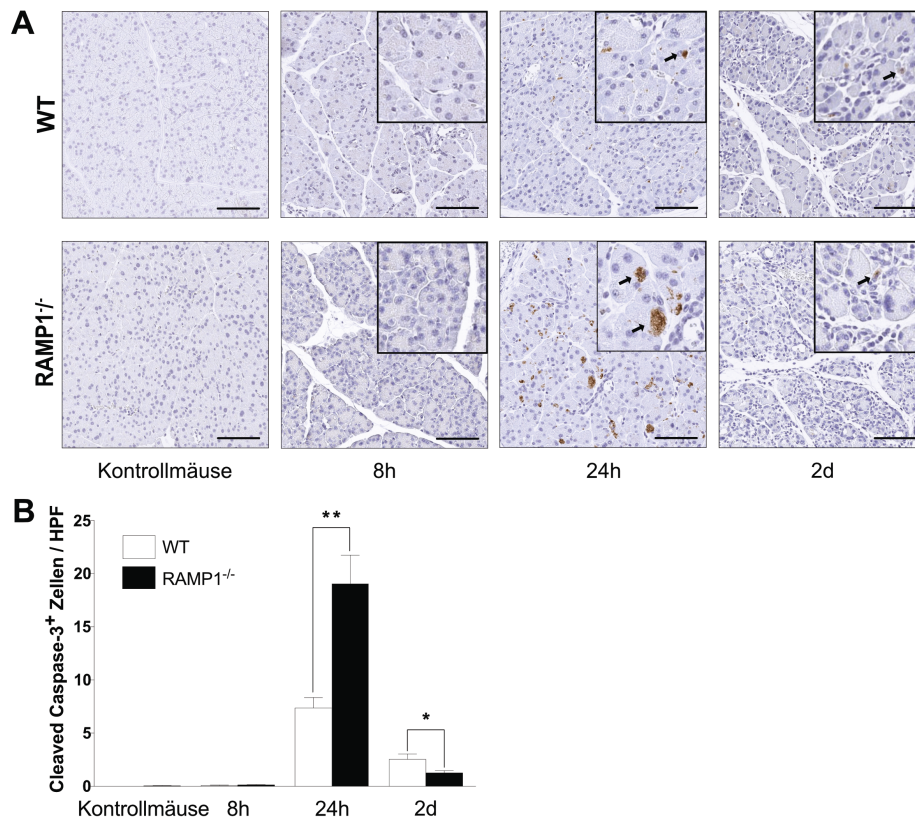


Abbildung 16: Gesteigerte Apoptose 24 h nach Caerulein-Behandlung bei RAMP1^{-/-}-Mäusen. (A) Repräsentative immunohistochemische Abbildungen mit dem Cleaved-Caspase-3-Antikörper (Maßstabskala: 100 µm). (B) Quantifizierung der Cleaved-Caspase-3⁺-Zellen in Pankreas von WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen. Daten repräsentieren Mittelwert ± SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, n ≥ 4 Tiere pro Gruppe.

3.2.4 Regeneration des Pankreas nach akuter Pankreatitis

Um die Regenerationskapazität des Pankreas zu beurteilen, erfolgte eine histologische Analyse der HE gefärbten Schnitte 7 d post-Ceruleininjektion. Sowohl bei den RAMP1^{-/-} als auch bei den WT Mäusen war das Pankreasgewebe nach 7 d vollständig regeneriert. Exemplarische Schnitte sind in Abbildung 17 dargestellt.

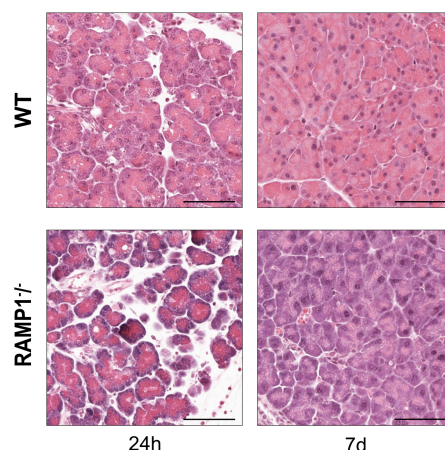


Abbildung 17: Histologische HE-Gewebeanalysen an WT- und RAMP1^{-/-}-Mäusen 7 d post-Caerulein-Behandlung. Repräsentative HE-Färbungen der angegebenen Genotypen 7 d nach Induktion einer akuten Pankreatitis (Maßstabskala: 100 µm).

3.2.5 Mechanismen der vermehrten Inflammation

Um den zugrundeliegenden Mechanismus für den Phänotyp und die signifikant erhöhte Anzahl von Makrophagen bei 8 h und Granulozyten bei 24 h post Behandlung näher zu charakterisieren, wurde die Expression einiger relevanter Gene gemessen.

In dem durch RAMP1 untersuchten Signalweg spielen einige Chemokine eine große Rolle. Es wurde deswegen die Expression von zwei Chemokinen gemessen, die zur Migration von Immunzellen beitragen. CCL3 wirkt als Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten (Johnston et al. 1999) (Lee et al. 2000). Zum Zeitpunkt 24 h wurde eine signifikant erhöhte Expression von CCL3 bei den RAMP1^{-/-}-Mäusen (24 h: $p = 0.008$) im Vergleich zu den WT-Mäusen gemessen (Abbildung 18, A). CCL4 (CC-Chemokin-Ligand-4) ist ein weiteres Chemokin, welches mit CCL3 interagiert (Guan, Wang, and Norcross 2001). CCL4 wirkt ebenfalls als Chemoattraktant für Monozyten, natürliche Killerzellen und verschiedene andere Immunzellen. Bei den Messungen der Expression dieses Chemokins zeigte sich bei 24 h zusätzlich eine höhere Expression von CCL4 in RAMP1-defizienten Mäusen, die jedoch statistisch nicht signifikant war (24 h: $p = 0.20$, Abbildung 18, C).

Das Interleukin-1 β (IL-1 β) ist eines der wichtigsten Zytokine im Rahmen der angeborenen Immunantwort auf sterile Verletzungen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass IL-1 β eine Rolle bei der Initiierung einer sterilen Entzündungsreaktion nach einer Pankreasverletzung spielt (Hoque et al. 2011). In dem hier verwendeten Modell zeigte der IL-1 β -mRNA-Spiegel einen signifikanten Anstieg nach 24 h post Injektion bei den RAMP1-KO-Mäusen (24 h: $p = 0.01$) im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abbildung 18, B).

Nach Bindung des Liganden CGRP an den RAMP1-CLR-Komplexrezeptor kommt es zu einer gesteigerten Konzentration von cAMP mit einer konsekutiven Aktivierung der PKA. Nach

Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch die PKA kann CREB die Transkription von ICER fördern, welches die Expression verschiedener inflammatorischer Gene supprimiert (Holzmann 2013). Nach 8 h konnte eine leicht erniedrigte, aber nicht statistisch signifikante Expression von ICER in den RAMP1-KO-Mäusen gemessen werden (8 h: $p = 0.81$, Abbildung 18, D).

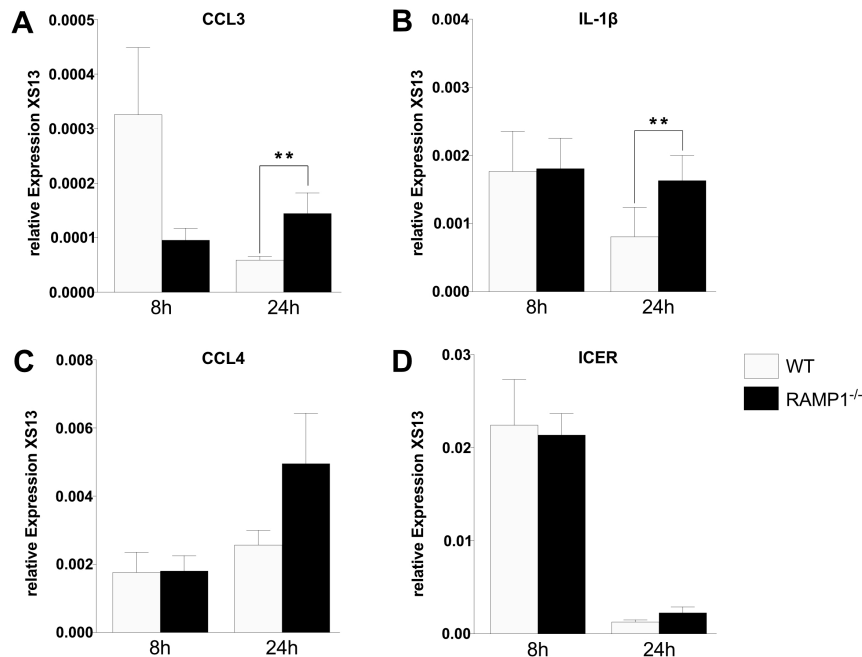


Abbildung 18: mRNA-Expression während der frühen Phase der akuten Pankreatitis. qRT-PCR-Analysen der Chemokinexpression CCL3 (A), IL-1 β (B), CCL4 (C) sowie des Transkriptionsfaktors ICER (D) bei WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen 8 h und 24 h post Behandlung. Alle untersuchten Gene wurden mit XS13 normiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, ** $p < 0.01$, $n \geq 7$ Tiere pro Gruppe.

Eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges wird als zentrales Ereignis beim Fortschreiten der Entzündung der akuten Pankreatitis betrachtet. Die NF- κ B-Aktivierung innerhalb der früheren Phase der akuten Pankreatitis wurde immunhistochemisch durch die Detektion von p65, einer Untereinheit des NF- κ B-Transkriptionskomplexes, untersucht. Mit Caerulein-behandelten Mäusen wiesen bereits nach 8 h eine Lokalisation von aktiviertem NF- κ B im Zellkern der Azinuszellen (Abbildung 19, E). Bei betrachten der p65-Färbung konnte kein Unterschied zwischen WT- und RAMP1-defizienten Mäusen festgestellt werden (Abbildung 19, E).

Zur Untersuchung des CREB-Transkriptionsfaktors wurde mittels Western Blot die Konzentration des phosphorylierten und gesamten CREB analysiert. Um die Ergebnisse bei den unterschiedlichen Proben vergleichen zu können, wurden die verschiedenen Proben durch die jeweilige HSP90-Expression dividiert und dadurch normiert. HSP90 gilt als ein sehr stabiles Haushaltsgen unter Stressbedingungen (Sinha et al. 2015). Es wurden 7 WT- und 6 RAMP1^{-/-}-Mäuse zum 8 h Zeitpunkt analysiert. Der gegen pCREB gerichtete Antikörper wurde bei 43 kDa detektiert. Nach dem Waschen der Membran wurde

auf derselben Membran der gegen CREB gerichtete Antikörper ebenfalls bei 43 kDa detektiert. Der Transkriptionsfaktor CREB regelt verschiedene Reaktionen in der Zelle, wie z. B. Proliferation und Differenzierung. Sobald CREB phosphoryliert ist, kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen CREB mit seinem Co-Aktivatorprotein, dem CREB-bindendem Protein, um die Transkription von CREB-responsiven Genen zu initiieren (Shaywitz and Greenberg 1999). Es wurden im Rahmen dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet, weder bei der pCREB- ($p = 0.18$) noch bei der gesamten CREB-Proteinexpression ($p = 0.10$) (Abbildung 19, B und C). Um das pCREB:CREB-Verhältnis zu messen, wurde die pCREB-Expression durch die CREB-Expression dividiert. Dabei zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im pCREB:CREB-Verhältnis im Vergleich zu WT- und RAMP1-defizienten Mäusen ($p = 0.63$, Abbildung 19, D).

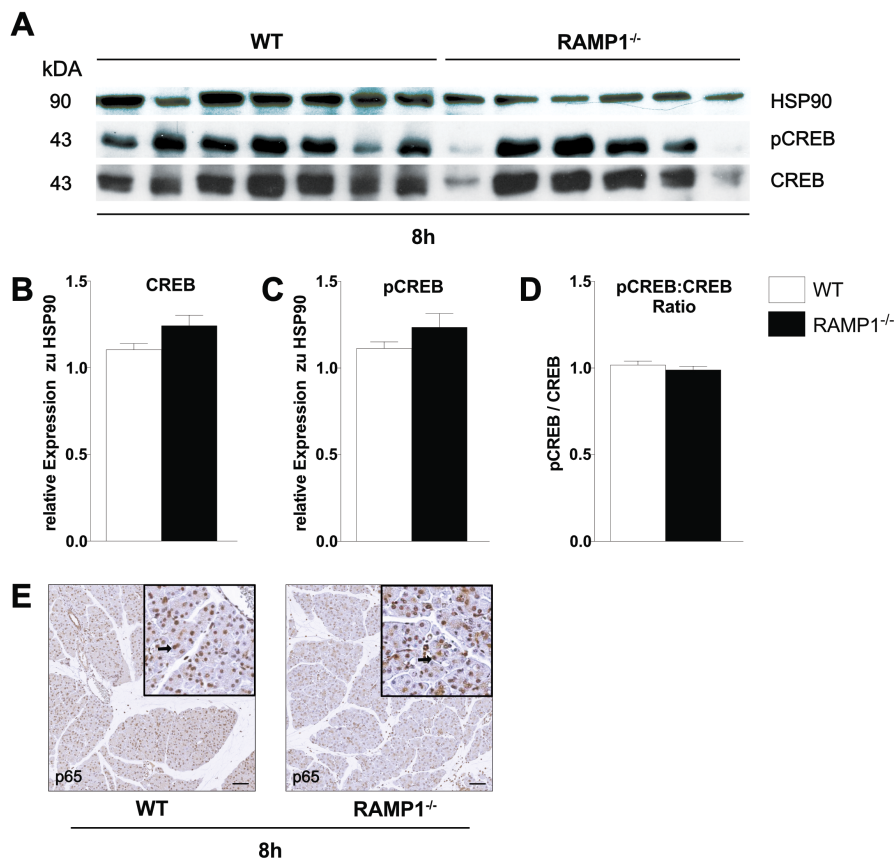


Abbildung 19: CREB-Western-Blot-Analyse und immunhistochemische p65-Analyse 8 h nach Behandlungsende. (A) Western-Blot-Analyse wurde mit Antikörpern gegen pCREB und CREB durchgeführt. HSP90 wurde als Haushaltsgen verwendet. (B, C und D) Quantifizierung des Western Blots. Die CREB (B) und pCREB (C) Proteinexpression wurde durch die HSP90-Proteinexpression normiert. Für das pCREB:CREB-Verhältnis (D) wurde die pCREB durch die CREB-Proteinexpression geteilt. (E) Immunhistochemische p65-Färbung nach 8 h bei WT- vs. RAMP1^{-/-}-Mäusen. Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM, $n = 7$ bei WT Mäuse, $n = 6$ bei RAMP1-defizienten Mäusen.

3.3 Analyse der isolierten pankreatischen Azinuszellen

3.3.1 Detektion der RAMP1-Expression durch Realtime PCR

Da bei den bereits dargestellten Ergebnissen systemische RAMP1 *knock out* Mäusen verwendet wurden, war es nicht unterscheidbar, ob zellextrinsische oder zellintrinsische Mechanismen, den Phänotyp verursacht haben. Daher wurde zunächst durch die Isolierung von Azinuszellen untersucht, inwieweit die pankreatischen Azini RAMP1 exprimieren als Voraussetzung für eine weitere experimentelle Untersuchung mit Isolierung, CGRP-Behandlung und Kultivierung der Azinuszellen.

Direkt nach der Isolierung wurden die isolierten Azini unter dem Mikroskop analysiert (Abbildung 20, A). Frühere Veröffentlichungen zeigten MIST1 als entsprechenden Marker für die Azinuszellen (Pinho et al. 2011), sowie SOX9 als korrespondierenden Marker für die duktaalen Zellen (Houbracken et al. 2011). Basierend auf diesen Grundlagen, wurde eine MIST1-Expression bei isolierten duktaalen Zellen als Negativkontrolle und eine SOX9-Expression bei diesen Zellen als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 20, C und D). Für diese Analyse wurden frisch isolierte duktaale Zellen verwendet, die von Frau Dr. Ana Hidalgo-Sastre zur Verfügung gestellt wurden.

Anschließend wurde sichergestellt, dass die Azini das RAMP1-Protein als Teil des CGRP-Rezeptors exprimieren (Abbildung 20, B). Als Positivkontrolle wurde Hirngewebe verwendet. Aus der Literatur ist bekannt, dass Hirngewebe RAMP1 in hohem Maße exprimiert (Ueda et al. 2001). Als Negativkontrolle wurde RAMP1^{-/-}-Pankreasgewebe verwendet. In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass RAMP1 in den isolierten Azinuszellen zur Expression kommt.

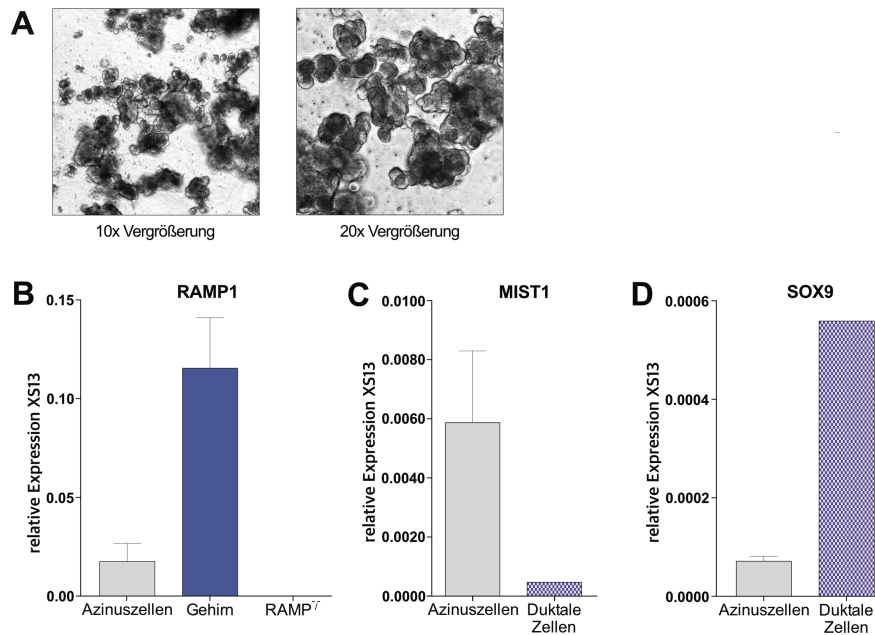


Abbildung 20: Analyse der RAMP1-Expression an isolierten Azinuszellen. (A) Mikroskopische Abbildung von frisch isolierten Azinuszellen (10-fache und 20-fache Vergrößerung). (B) mRNA-Expressionsanalyse von RAMP1 bei isolierten Azinuszellen, Hirngewebe von WT-Mäusen und RAMP1-KO-Pankreasgewebe. (C, D) Expressionslevel von MIST1 und SOX9 in isolierten Azinuszellen und duktalem Zellen. Alle zu untersuchenden Gene wurden mit XS13 normiert. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM, isolierte Azinuszellen: n = 3 Tiere, Hirngewebe: n = 2 Tiere, duktalem Zellen: n = 1 Tier.

3.3.2 CGRP-Einfluss auf isolierte pankreatische Azinuszellen

Nachdem die Expression von RAMP1 als Teil des CGRP-Rezeptors bei den isolierten Azini gezeigt werden konnte, wurden die Zellen mit einem CGRP-Liganden behandelt und untersucht, inwieweit sich die Expression von CCL3 und ICER post CGRP-Behandlung verändert. Bei diesem Teil des Experiments wurden die Azinuszellen von einer WT-Maus isoliert, behandelt und kultiviert. Die Azini wurden direkt nach der Isolierung und nach 24 h mikroskopisch untersucht. Es konnten bei den drei Gruppen jedoch keine mikroskopischen Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 21, A). Bei 24 h waren einige pankreatische Azinuszellen zu finden, die sich zu mehrzelligen Clustern reaggregiert hatten. Anhand der Expression von MIST1 und SOX9 bei den Azini in Vergleich zu duktalem Zellen, begleitet von den mikroskopischen Abbildungen der Zellen 24 h nach Kultivierung, wurde von einer erfolgreichen Isolierung und Kultivierung ausgegangen. Eine MIST1-Expression wurde bei isolierten duktalem Zellen als Negativkontrolle, eine SOX9-Expression bei den duktalem Zellen als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 21, B und C).

Die Expression von ICER und CCL3 wurde durch eine qRT-PCR 24 h nach der Behandlung und Kultivierung gemessen. Die Expression der gesuchten Gene war zwischen nicht behandelten und mit 100 nM-CGRP behandelten Zellen vergleichbar (ICER: $p = 0.70$; CCL3: $p > 0.99$, Abbildung 21, D und E). In einer statistischen Analyse zwischen nicht behandelten und mit 500 nM-CGRP behandelten

Zellen zeigte sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (ICER: $p = 0.40$; CCL3: $p > 0.99$, Abbildung 21, D und E). Diese Ergebnisse können demnach nicht bestätigen, dass die Expression von ICER und CCL3 bei isolierten Azinuszellen 24 h post Behandlung durch CGRP beeinflusst werden kann.

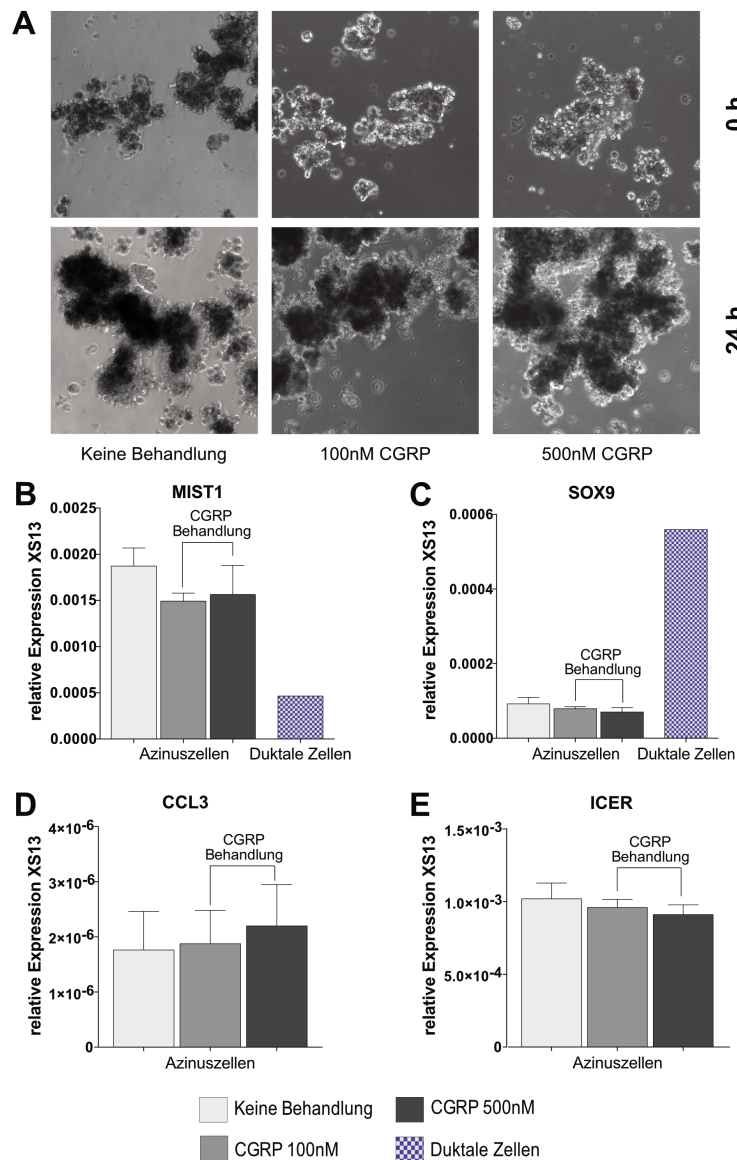


Abbildung 21: Isolierung, Kultivierung und CGRP-Behandlung der Azinuszellen. (A) Mikroskopische Abbildungen der Azinuszellen direkt nach der Isolierung sowie nach 24-stündiger Kultivierung (10-fache Vergrößerung). (B, C) Expressionslevel von MIST1 und SOX9 nach 24-stündiger Kultivierung der Azinuszellen sowie isolierten nicht kultivierten duktaalen Zellen. (D, E) qRT-PCR-Analyse für CCL3 und ICER bei kultivierten Azinuszellen ohne Behandlung sowie bei behandelten Zellen mit 100 nM und 500 nM CGRP. Alle zu untersuchenden Gene wurden mit XS13 normiert. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM.

4 Diskussion

Das Pankreas wird von parasymphatischen und sympathischen Neuronen innerviert, die sowohl die endokrine als auch die exokrine Funktion modulieren (Niebergall-Roth and Singer 2001). Zusätzlich wird das Pankreas mit sensorischen Neuronen versorgt, die Neuropeptide wie CGRP enthalten (Seifert et al. 1985) (Larsson 1979). Diese Nerven sind verantwortlich für die Signalweiterleitung schmerzhafter Reize, die ihren Ursprung im Pankreas haben. Immunsystem und Nervensystem kommunizieren über ein ausgedehntes Netzwerk von festen Verbindungen miteinander (Steinman 2004). In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit das Ausmaß der Entzündungsreaktion im Pankreas nach einer Caerulein-Behandlung durch den Neurotransmitter CGRP beeinflusst werden kann. Da RAMP1 der Schlüsselrezeptor zur Unterstützung der CGRP-Aktivität ist, ist das RAMP1-KO-Mausmodell ein gutes Hilfsmittel, um die Rollen von CGRP durch das KO von RAMP1 *in vivo* zu untersuchen. Im Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss von RAMP1-Verlust auf die murine experimentelle Pankreatitis untersucht.

4.1.1 RAMP1^{-/-}-Mäuse sind phänotypisch normal

Durch HE- und immunhistochemische Färbungen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von RAMP1 bei den in dieser Studie verwendeten KO-Mäusen keinen Einfluss auf die Pankreasorganogenese hat (Abbildung 8). Die duktaalen und azinären Strukturen des Organs bei beiden Genotypen erschienen intakt. Es wurden keine Anomalien im Aufbau des Pankreas festgestellt. Dieser Umstand könnte dadurch erklärt werden, dass diese Färbungen an unbehandelten Versuchstieren erfolgten und die CGRP Freisetzung insbesondere durch die Stimulation peripherer Nozizeptoren durch Schmerzreize hervorgerufen wird (Russell et al. 2014) und bei der normalen Pankreasentwicklung keine Rolle spielt.

4.1.2 Verstärkte Inflammation bei den RAMP1-KO-Mäusen

Durch Caerulein kommt es zu einer Pankreassekretion, welche zu einer Pankreasfehlfunktion führt und in einer akuten Pankreatitis resultiert (Willemer, Elsasser, and Adler 1992). Eine Caerulein-induzierte akute Pankreatitis erhöht signifikant die Expression von TRPV1 (Schwartz et al. 2011). Eine Aktivierung von TRPV1 führt zur Freisetzung von CGRP (Assas, Pennock, and Miyan 2014). Publikationen deuten darauf hin, dass CGRP durch den RAMP1-Signalweg als negativer Regulator der angeborenen Immunantworten wirkt und zur Begrenzung von Gewebeschäden bei einer Inflammation beiträgt (Holzmann 2013). Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass eine Caerulein-Behandlung bei den RAMP1-KO Mäusen zu

einem signifikant erhöhten PG/KG-Verhältnis mit einer verstärkten Inflammationsreaktion nach 8 und 24 h sowie Ödembildung nach 8 h führte (Abbildung 9). Das erhöhte PG/KG-Verhältnis ist durch ein verstärktes intra- und peripankreatisches interstitielles Ödem mit entsprechender Organomegalie zu erklären. Unsere Ergebnisse stimmen mit früheren Ergebnisse von Kawashima-Takeda et al überein, die bei einem dextrannatriumsulfatinduzierten Kolitis-Modell gezeigt haben, dass RAMP1^{-/-}-Mäusen eine verstärkte Inflammation im Vergleich zu WT-Mäusen aufwiesen (Kawashima-Takeda et al. 2017).

Diverse Untersuchungen zeigten, dass RAMP1 durch T-Zellen (Kawashima-Takeda et al. 2017) und Makrophagen (Mishima et al. 2017) exprimiert wird. Der entzündungshemmerde Effekt von CGRP/RAMP1 Signalweg auf Immunzellen, einschließlich Makrophagen (Inoue et al. 2018), Neutrophilen (Jusek et al. 2012) und T-Zellen (Mikami et al. 2011) ist bereits bekannt. An dieser Stelle stellte sich die Frage, wie sich die Infiltration der verschiedenen Immunzellen in der frühen Phase der akuten Pankreatitis durch den *knock out* von RAMP1 verändert. Die Charakterisierung der infiltrierenden Entzündungszellen erfolgte mithilfe der Immunhistochemie. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl von Makrophagen bei 8 h und neutrophilen Granulozyten bei 24 h bei den KO-Mäusen (Abbildung 10 und 11). Bei einem septischen Peritonitis-Modell von Jusek et al. führte das Fehlen von RAMP1 in der frühen Phase der Inflammation ebenso zu einer erhöhten Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Jusek et al. 2012). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigte eine Studie von Kawashima-Takeda et al. bei einem dextrannatriumsulfatinduzierten Kolitis-Modell ebenfalls eine erhöhte Anzahl der Makrophageninfiltration bei RAMP1-KO-Mäusen (Kawashima-Takeda et al. 2017). Bei einer weiteren Studie wurden die Makrophageninfiltrate innerhalb der choroidalen Neovaskularisationsläsionen in CGRP^{-/-}-Mäusen ebenfalls verstärkt (Toriyama et al. 2015).

Um hierfür Erklärungen zu finden und basierend auf der Kenntnis, dass die Rekrutierung von Entzündungszellen durch Chemokine induziert wird, wurde die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, einschließlich CCL3, CCL4 und IL-1 β , im Pankreasgewebe unter Verwendung der qRT-PCR bestimmt. CCL3 vermittelt eine feste Adhärenz und Transmigration von Neutrophilen (Reichel et al. 2009). CCL4 kann als Chemoattraktant für Monozyten, natürliche Killerzellen und eine Vielzahl von anderen Immunzellen wirken (Bystry et al. 2001). IL-1 β ist ein potentes, proinflammatorisches Zytokin, das vorwiegend von Makrophagen abgeleitet wird (Scholmerich 1996) und spielt eine Rolle bei der Einleitung einer sterilen Entzündungsreaktion nach Pankreasverletzung (Hoque et al. 2011). In der Veröffentlichung von Kawamura et al wurde bereits gezeigt, dass Neuropeptide die Zytokinproduktion beeinflussen können (Kawamura et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der Zytokine CCL3 und IL-1 β sowie eine etwas höhere Expression von CCL4 bei den RAMP1-KO-Mäusen 24 h post Behandlung (Abbildung 18, A, B und C). Diese Ergebnisse liefern Hinweise, dass die hochregulierte Expression dieser Zytokinen bei den RAMP1^{-/-}-Mäusen die übermäßige Rekrutierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten

verursachen kann. Unsere Daten stimmen mit einer Publikation von Kawashima-Takeda et al. bei, die bei einem Kolitis-Maus-Modell ebenfalls eine erhöhte Expression der entzündungsfördernden Zytokine CCL3 und IL-1 β bei RAMP1-KO-Mäusen zeigte (Kawashima-Takeda et al. 2017). In den letzten Jahren konnte in Studien gezeigt werden, dass CGRP sowohl CCL3 (Baliu-Pique, Jusek, and Holzmann 2014) als auch CCL4 (Harzenetter et al. 2007) herunterregulieren kann.

Trotz zahlreicher Hinweise auf die negative Regulation der Immunantwort durch CGRP, bleiben die molekularen Mechanismen der CGRP Wirkung auf Immunzellen weitgehend unklar. Arbeiten von Fox et al. und Torii et al. konnten demonstrieren, dass CGRP bestimmte immunsuppressive Aktivitäten durch die Hochregulierung der IL-10-Produktion in Zielzellen vermitteln kann (Fox et al. 1997) (Torii et al. 1997). Alternativ haben Harzenetter et al. 2007 einen IL-10-unabhängigen entzündungshemmenden Weg von CGRP beschrieben, der eine verringerte Sekretion von Zytokinen verursacht und mit der schnellen und cAMP-abhängigen Induktion der ICER-Expression verbunden ist (Harzenetter et al. 2007). Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von ICER als möglicher Modulator der akuten pankreatischen Inflammation untersucht. Es zeigte sich bei 8 h eine leicht erniedrigte, aber nicht statistisch signifikante Expression von ICER in den RAMP1-KO-Mäusen (Abbildung 18, D). Daher unterscheiden sich unsere Ergebnisse von denen früheren Berichten, die gezeigt haben, dass die Behandlung von Mäusen mit CGRP die Expression des Transkriptionsrepressors ICER induzieren kann (Kroeger et al. 2009). Es sollte jedoch beachtet werden, dass in der von Kroeger et al. Studie ein Lipopolysaccharide-induziertes Hepatitismodell mit IL-10 *knock out* Mäusen verwendet wurde (Kroeger et al. 2009). Einschränkend ist auch darauf hinzuweisen, dass hier Gesamtpankreasgewebe für die Expressionsanalyse verwendet wurde und damit auch z. B. Expressionsunterschiede, die nur in Zellsubpopulationen stattfinden, nicht detektiert werden könnten.

Um Erklärungen für die erhöhte Expression von CCL3 und IL-1 β zu finden, wurde der NF- κ B Signalweg als möglicher Regulator dieser Zytokine untersucht. NF- κ B ist ein Proteinkomplex, der unter anderem für die Expressionskontrolle verschiedener Signalwege bei der Inflammation verantwortlich ist (Brasier 2006) (Gilmore 2006). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass supramaximale Dosen von Caerulein zu einer NF- κ B Aktivierung im Pankreas führen (Hietaranta et al. 2001). Zudem gibt es Hinweise, wonach NF- κ B sehr früh in der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis aktiviert wird (Gukovsky et al. 1998). Wenn NF- κ B aktiviert wird, tritt eine Kaskade von Signalereignissen auf, die schließlich zum I κ B α -Abbau führt, der die Freisetzung von NF- κ B ermöglicht und die Translokation von NF- κ B in den Zellkern erleichtert, wo es die Transkription von proinflammatorischen Genen fördert (Ghosh and Hayden 2008) (Medzhitov and Horng 2009). Caerulein induziert NF- κ B und Trypsinogen-Aktivierung zeitgleich, beide Ereignisse sind aber in Azinuszellen unabhängig voneinander (Dawra et al. 2011). Der NF- κ B-Signalweg wurde in dieser Studie durch Immunhistochemie mithilfe eines gegen p65 gerichteten Antikörpers analysiert. Die p65-Färbung zeigte 8 h nach Behandlung eine Lokalisation des p65-Antikörpers im Zellkern der

Azinuszellen (Abbildung 19, E). Flandez et al. zeigten immunhistochemisch ebenfalls eine gesteigerte p65-Detektion bereits 8 h post Caerulein-Administration (Flandez et al. 2014). In der Literatur wurde beschrieben, dass die Verabreichung von Caerulein in Dosen, die Pankreatitis verursachen, zur Aktivierung von NF- κ B in der Bauchspeicheldrüse führt, und diese Aktivierung mit einer nuklearen Translokation von p65 und p50 einhergeht (Steinle et al. 1999) (Rakonczay et al. 2008). Ein Unterschied der Anzahl von p65⁺-Azinuszellen bei den beiden Genotypen konnte in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden (Abbildung 19, E). Altmayer et al. berichteten ebenfalls, dass CGRP keinen Einfluss auf die Rekrutierung von NF- κ B-p65 hatte (Altmayr, Jusek, and Holzmann 2010). Stattdessen beruht die hemmende Funktion von CGRP nach Altmayr et. al. auf der Inhibition des Promotors von ATF2 durch ICER und zufolge Hemmung der Produktion von verschiedenen Zytokinen (Altmayr, Jusek, and Holzmann 2010). Es ist ebenfalls bekannt, dass die NF- κ B-Aktivierung an sich für die Entwicklung einer frühen azinären Zellverletzung durch supramaximale Stimulation von Caerulein nicht erforderlich ist (Hietaranta et al. 2001).

CREB ist ein Transkriptionsfaktor, der verschiedene zelluläre Reaktionen reguliert, einschließlich Überleben, Differenzierung und Proliferation (Shaywitz and Greenberg 1999) (Mayr and Montminy 2001) (Sakamoto and Frank 2009). CGRP aktiviert durch die Bindung an den RAMP1-CLR-Rezeptorkomplex die Adenylatcyclase, die das intrazelluläre cAMP erhöht und die PKA aktiviert, was zur Phosphorylierung von CREBs führen kann (Russell et al. 2014). Somit könnte CREB ein Modulator der Immunantwort unseres Modells sein. Aus diesem Grund war es interessant zu untersuchen, ob es in der vorliegenden Arbeit zu einer verminderten Phosphorylierung von CREB bei den RAMP1-KO-Mäusen gekommen ist. Mithilfe des Western Blots wurde die Proteinmenge von pCREB und gesamtem CREB bei dem frühen Zeitpunkt 8 h nach Behandlung analysiert. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und RAMP1^{-/-}-Mäusen gemessen (Abbildung 19, B und C). Das Verhältnis von pCREB zur Gesamt-CREB zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei den beiden Genotypen (Abbildung 19, D). Übereinstimmend konnte in einer weiteren Studie von Altmayer et al nachgewiesen werden, dass eine Behandlung von dendritischen Zelle mit CGRP die Toll-like-Rezeptor 2-induzierte Rekrutierung von ATF2, jedoch nicht von CREB, an den TNF α -Promotor verhindert (Altmayr, Jusek, and Holzmann 2010). Hingegen wurden bei einigen Publikationen eine Phosphorylierung des CREBs durch CGRP in einem Modell von Primärkulturen dissoziierter Ratten-Rückenmarkszellen (Seybold et al. 2003) und bei einem zerebralen Ischämie-Reperfusionmodell (Zhang et al. 2010) beobachtet, was einen Hinweis auf die Beteiligung des Transkriptionsfaktors CREB geben kann. Einschränkend ist zu unseren Daten auch hier darauf hinzuweisen, dass Gesamtpankreasgewebe für die Proteinexpression verwendet wurde.

Warum keine verminderte CREB-Phosphorylierung durch das RAMP1 *knock out* beobachtet werden konnte, kann mehrere Gründe haben. Zunächst sollte berücksichtigt werden, dass bei den durchgeführten Western Blots Pankreasgewebe von Mäusen eingesetzt wurde, was die Detektion von Unterschieden in kleineren Zellpopulationen unwahrscheinlich macht. Es sollte in Betracht gezogen

werden, dass bei isolierten Azinuszellen eine Caerulein-Behandlung nicht nur zu einer cAMP-abhängigen Aktivierung der PKA führen kann, sondern cAMP kann zusätzlich über das cAMP-bindende Protein Epac wirken (Chaudhuri et al. 2007). Die Aktivierung beider cAMP-abhängiger Wege oder die selektive Aktivierung von Epac kann Einfluss auf die CREB Phosphorylierung haben. Es kann aber auch sein, dass die CREB Phosphorylierung in einem früheren oder späteren Zeitpunkt stattgefunden hat.

CGRP moduliert die Adhäsion und Migration von T-Zellen (Levite et al. 1998). T-Lymphozyten, insbesondere CD4⁺-T-Zellen, spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer akuten experimentellen Pankreatitis (Demols et al. 2000). Basierend auf der Erkenntnis, dass CGRP die T-Zellen-Migration stimuliert (Talme, Liu, and Sundqvist 2008), wurde in dieser Arbeit die Anzahl von CD4- und CD8-positiven Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten gemessen. Ein signifikanter Anstieg der Anzahl von T-Zellen, und zwar CD4⁺-Zellen, wurde 7 d post Caerulein-Injektionen bei den RAMP1-KO-Mäusen beobachtet (Abbildung 12). Die Anzahl von CD8⁺-Zellen war zwar am siebten Tag nach Behandlung bei den RAMP1^{-/-}-Mäusen ebenfalls höher, es hat sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den WT-Mäusen ergeben (Abbildung 13). Beim Kolitis-Modell von Kawashima-Takeda et al. war die Anzahl der CD3⁺-Zellen, welche den T-Zellen entsprechen, in RAMP1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu denen in WT-Mäusen erhöht (Kawashima-Takeda et al. 2017). Interessanterweise zeigt eine Studie von Inoue et al., dass das Fehlen von RAMP1 ebenfalls zu einem Anstieg der CD4⁺-Zellen führt, ohne einen Einfluss auf CD8⁺-Zellen zu haben (Inoue et al. 2018). Betrachtet man die Veröffentlichung von Inoue et. al, wird als Ursache dafür die Herunterregulierung der Expression von TNF- α und Interferon- γ in T-Zellen durch die RAMP1-Signalübertragung diskutiert. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Ergebnissen überein, die darauf hinweisen, dass CGRP die Interferon- γ Produktion *in vitro* (Tokoyoda et al. 2004) und *in vivo* (Mikami et al. 2011) unterdrückt. Des Weiteren hemmt der RAMP1-Signalweg die Produktion von IL-17 (Kawashima-Takeda et al. 2017), das eine Rolle bei der Vermittlung der CD4-intrinsischen Immunresistenz spielt (Crawford et al. 2020).

Zusammenfassend gibt die vorliegende Studie Hinweise darauf, dass die RAMP1-Signalübertragung in der akuten Pankreatitis an der Rekrutierung von Neutrophilen, Makrophagen und T-Zellen beteiligt ist. Bei den RAMP1^{-/-}-Mäusen ergab sich eine signifikant erhöhte Anzahl von Makrophagen 8 h, von Neutrophilen 24 h und von CD4⁺-Zellen 7 d nach Pankreatitisinduktion. Die vorliegenden Ergebnissen schließen sich früheren Publikationen an, die gezeigt haben, dass CGRP unter anderem durch die Hemmung von CCL3 und IL-1 β (Kawamura et al. 1998) die Funktion von T-Zellen (Miyachi et al. 2002), und zwar CD4⁺-Zellen (Inoue et al. 2018), neutrophilen Granulozyten (Jusek et al. 2012) und Makrophagen (Kawashima-Takeda et al. 2017) während einer Entzündung reguliert.

4.1.3 RAMP1-Mangel beeinträchtigt die Regeneration und induziert die Apoptose der Azinuszellen

Neben der Inflammation wurde in einem weiteren Teil dieser Studie die Regeneration und Apoptose der Azinuszellen analysiert. Die Proliferation von Azinuszellen ist ein kritischer Prozess in der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis, da eine begrenzte oder fehlerhafte Proliferation mit einer Störung der Organregeneration verbunden ist. Die Zahl der proliferierenden Azinuszellen war bei den Kontrollmäusen, die mit intraperitonealen Injektionen mit phosphatgepufferter Salzlösung behandelt wurden, zwischen den KO- und WT-Gruppen ohne signifikanten Unterschied (Abbildung 15). Kiraly et al. haben 2015 bereits gezeigt, dass die Proliferation der Azini ohne Inflammation minimal ist und erst bei der akuten Phase bzw. regenerativen Phase ansteigt (Kiraly et al. 2015). Eine mögliche Erklärung dafür wurde in der DNA Schädigung durch die Pankreasentzündung gefunden (Kiraly et al. 2015). Diese kann einerseits durch Veränderungen des Zytokinsspiegels und andererseits durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Verbindungen durch die Immunzellen verursacht werden (Kiraly et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Reduktion der Proliferation nach 8 h bei den RAMP1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen gezeigt werden (Abbildung 15). In Bezug auf die proliferativen Wirkungen von CGRP auf verschiedene Epithel- und Endothelzellen wurde berichtet, dass CGRP die Proliferation von humanen Endothelzellen (Haegerstrand et al. 1990), Atemwegsepithelzellen (White et al. 1993) und Alveolarepithelzellen (Kawanami et al. 2009) induziert. So konnten Haegerstrand et al. eine Verstärkung der Proliferation durch CGRP durch die cAMP-Bindung zeigen (Haegerstrand et al. 1990), diskutierten Kawanami et al. eine dosis- und zeitabhängige proliferierende Wirkung von CGRP über den CGRP-Rezeptor und den ERK-Signalweg (Kawanami et al. 2009). Andere Studien zu diesem Thema zeigten, dass CGRP die Yes-Associated Protein/Transcriptional Co-activator with PDZ-binding motif (YAP/TAZ)-vermittelte Hepatozytenproliferation über den CGRP-RAMP1-Signalweg steuern kann (Laschinger et al. 2020).

Eine leichte akute Pankreatitis ist hauptsächlich mit Apoptose und weniger mit Nekrose verbunden (Kaiser et al. 1995). Daher ist das Verständnis der Regulation von Apoptose bei Untersuchungen zur Pathogenese von Pankreatitis von außerordentlicher Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose durch ein gegen Caspase-3 gerichteten Antikörper erfasst (Bressenot et al. 2009). Es zeigte sich in unserer Arbeit ein Anstieg der Apoptose 24 h nach Induktion der akuten Pankreatitis, der signifikant höher bei den RAMP1^{-/-}-Mäusen war (Abbildung 16). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die signifikant erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten zu diesem Zeitpunkt sein. Diese Erklärung basiert auf einer Studie von Rau et al., die zeigte, dass Neutrophile über einen TNF- α -abhängigen Mechanismus an dem apoptotischen Azinuszelltod beteiligt sein können (Rau et al. 2001). Pankreatische Azinuszellen sind ebenfalls in der Lage, TNF- α zu produzieren und freizusetzen

(Gukovskaya et al. 1997). Das von Azinuszellen freigesetztes TNF- α könnte somit genauso an der Azinuszellapoptose beteiligt sein (Gukovskaya et al. 1997).

Die Apoptose nahm bei 2 d in beiden Gruppen ab und RAMP1^{-/-} Mäuse wiesen nun eine signifikant verminderte Anzahl an Cleaved Caspase-3 positiven Zellen im Vergleich zu den WT Mäusen auf (Abbildung 16). Eine Hypothese dafür ist, dass das Pankreasgewebe von RAMP1^{-/-} Mäusen verstärkt bzw. schneller abgebaut wurde. Die Ursache dafür kann aber auch in einer verstärkten Phagozytose der apoptotischen Zellen durch die Makrophagen liegen, die bei den RAMP1-KO-Mäusen in Überzahl zu finden sind. Dieser Hypothese entsprechen auch die Daten aus Miyanishi et al., die zeigten, dass apoptotische Zellen von Makrophagen schnell über einen Mechanismus entfernt werden, der von der Exposition von Phosphatidylserin auf der Zellmembran abhängt (Miyanishi et al. 2007).

Die Neuropeptid-Rezeptoruntereinheit RAMP1 scheint eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Apoptose zu spielen. In Studien wurde eine noradrenalininduzierte Apoptose durch CGRP gehemmt (Ma, Guo, and Sun 2013). Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte die Arbeitsgruppe von Luo et al, die bei einem intestinalen Ischämie-Reperfusionverletzungs-Modell eine CGRP-Vorbehandlung zu signifikant niedrigerer Expression von Caspase-3-Proteinen führte (Luo et al. 2016). Außerdem wurde durch CGRP die Apoptose in menschlichen Osteoblasten gehemmt (Mrak et al. 2010). Aus den ermittelten Ergebnissen der Arbeit von Mrak et al. geht hervor, dass CGRP den WNT-Signalweg aktiviert, indem es Glycogen Synthase Kinase 3 Beta durch die PKA-Signalübertragung hemmt, was zur nukleären Translokation von β -Catenin führt (Mrak et al. 2010). In einer von Wu et al. publizierter Studie wird eine Förderung der Proliferation und Hemmung der Apoptose in endothelialen Progenitorzellen durch Hemmung der MAPK-Signalübertragung gezeigt (Wu et al. 2018). Wu et al. fanden heraus, dass eine Behandlung mit CGRP zu einer Erhöhung des Spiegels des anti-apoptotischen Moleküls B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) und einer Abnahme des Spiegels des pro-apoptotischen Moleküls Bcl-2-assoziiertes X Protein (Bax) führte, was zu einem signifikant erhöhten Bcl-2/Bax-Verhältnis resultierte (Wu et al. 2018), welches einen schützenden Effekt bei der Zellapoptose hat (Cakir et al. 2011). Als Ursache für die Induktion der Proliferation durch CGRP diskutierten Wu et al. die Hochregulierung des Genexpressionsniveaus von Cyclin D1 und Cyclin E (Wu et al. 2018).

Die oben genannten Publikationen machen sichtbar, dass CGRP über verschiedenen (patho)physiologischen Signalwege Proliferation und Apoptose modulieren kann und zeigen, dass die molekulare Aktivierungswege durch CGRP sehr komplex und vielfältig sind. Die hier präsentierte Ergebnisse stimmen mit zuvor veröffentlichten Daten überein, die die Auswirkungen von CGRP auf die Proliferation und Apoptose unterstreichen (Wu et al. 2018), jedoch blieb in dieser Arbeit der genaue Mechanismus für diese Veränderungen weitgehend unklar.

4.1.4 Vollständige Regeneration des Pankreas post Caerulein-Behandlung

Sobald die Inflammation nach der Caerulein Behandlung abgeklungen ist, können sich Azinuszellen durch Selbstreplikation und mögliche Redifferenzierung schnell wieder in einen normalen und funktionellen Azinuszustand regenerieren (Zhou and Melton 2018). Das durchgeführte Caerulein-Protokoll führte sowohl bei den KO- als auch bei den WT-Mäusen am siebten Tag histologisch zu einer vollständigen Regeneration des Pankreasgewebes (Abbildung 17). Die Veränderungen im hier beschriebenen Mausmodell schienen, trotz der deutlichen Entzündungsreaktion und Gewebeerstörung, keinen Einfluss auf die langfristige Organregeneration zu haben. Diese rasche Regeneration nach Caeruleinpankreatitis innerhalb einer Woche ist in der Literatur vorbeschrieben und zeigt, dass RAMP1 Verlust keinen Einfluss auf die spätere Regenerationsphase nach akuter Schädigung hat (Quan et al. 2018) (Lampel and Kern 1977) (Eisses et al. 2014).

4.1.5 Einfluss der CGRP-Behandlung bei isolierten pankreatischen Azinuszellen

Die bereits diskutierten Experimente wurden mit systemischen RAMP1 *knock out* Mäusen durchgeführt. Somit war nicht unterscheidbar, ob die beobachteten Ergebnisse auf die Entzündungszellen oder aber auf die Azinuszellen (also zellextrinsisch oder zellintrinsisch) zurückzuführen sind. Daher wurde in diesem Teil der Arbeit ein möglicher Einfluss von CGRP/RAMP1 auf die Azinuszellen untersucht. Azinuszellen haben die Fähigkeit, verschiedene Arten von Entzündungsmediatoren als Reaktion auf schädliche Reize zu produzieren (Brady et al. 2002). Azini, die Verletzungen erfahren, setzen Zymogene frei, insbesondere Trypsin, die wiederum Makrophagen zur Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen induzieren (Raraty et al. 2005) (Lundberg et al. 2000). Eine Schädigung der Azinuszellen führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Die Entzündungsmediatoren gelangen jedoch auch in den allgemeinen Kreislauf und bestimmen dementsprechend die Schwere der akuten Pankreatitis (Bhatia et al. 2000).

Im Experiment konnte mithilfe qRT-PCR bei isolierten pankreatischen Azinuszellen die Expression von RAMP1 gezeigt werden (Abbildung 20, B), was zumindest die Voraussetzung schafft, dass der CGRP-Signalweg in diesen Zellpopulationen für die Regulation der beobachteten Inflammation mitverantwortlich sein kann. Frühere Studien haben bereits die Expression von RAMP1 in vielen Geweben einschließlich Pankreas, Herz, Gebärmutter, Blase, Gehirn, Skelettmuskel und Magen-Darm-Trakt gezeigt (McLatchie et al. 1998). Inwieweit CGRP die Expression von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren in Azinuszellen beeinflusst, wurde in einem weiteren Teil dieser Arbeit detaillierter untersucht, indem isolierte Azinuszellen mit CGRP-behandelt und kultiviert

wurden. Eine CGRP-Behandlung zeigte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf den Spiegel der ICER- oder CCL3-Expression bei isolierten Azinuszellen nach 24-stündiger Kultivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 21, D und E).

In einer Veröffentlichung von Holzmann wurde der direkte Effekt von CGRP auf Makrophagen und dendritischen Zellen untersucht (Holzmann 2013), der Einfluss von CGRP in Azinuszellen ist jedoch noch nicht weiter erforscht. Frühere Studien zeigten, dass eine CGRP-Behandlung zur Herunterregulierung der Expression von CCL3 bei Knochenmark stammende Makrophagen (Baliu-Pique, Jusek, and Holzmann 2014) und Mikroglia/Astrozyten-Co-Kulturen (Consonni et al. 2011) führen kann. Außerdem konnten Kroeger et al. zeigen, dass eine Vorbehandlung mit α -CGRP Mäuse vor Leberschädigung durch Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokinreaktion in Verbindung mit der Induktion von ICER schützen kann (Kroeger et al. 2009).

Die RAMP1 Expression bei isolierten pankreatischen Azinuszellen weist darauf hin, dass die Wirkung von CGRP auf diese Zellpopulationen zur beobachteten Pathologie in dem caeruleininduzierten Pankreatitis-Modell beitragen kann. Dennoch führte eine CGRP-Behandlung auf isolierten Azinuszellen zu keinem signifikanten Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene CCL3 und ICER. Um hierfür Erklärungen zu finden, sollen die Isolierungsanordnungen näher betrachtet werden. Da CGRP aus Peptiden entsteht, ist ein möglicher Abbau von CGRP nicht auszuschließen. Bei der Isolierung der Azinuszellen wurde für die Disaggregation von Geweben und Isolierung der Zellen Kollagenase P verwendet. Diese wurde durch das Waschen mit kaltem HBSS und FBS wieder inaktiviert. Es kann trotzdem sein, dass eine geringe Menge der Kollagenase P als aktivierte Form in der Suspension geblieben ist. Dieses Enzym ist für das Aufbrechen der Peptidbindungen im Kollagen verantwortlich. Da diese Enzymmischung eine zusätzliche Protease-Aktivität aufweist, könnte es zu einer Interaktion und Abbau des CGRPs führen. Ein kritischer Schritt der Isolierung ist die enzymatische Verdauung durch Kollagenase P. Möglicherweise könnte eine verstärkte enzymatische Dissoziation der Zellen durch Kollagenase zu einer Störung der Integrität der Zellmembran oder zu einer erhöhten Zelltodrate der Azinuszellen geführt haben. Ebenfalls kann es sein, dass die applizierte CGRP-Dosis zu gering oder die Behandlungsdauer der Azinuszellen zu kurz war, um eine relevante Stimulation des RAMP1-Rezeptors zu erreichen.

4.2 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen, im Einklang mit früheren Studien, die Bedeutung des CGRP-Signalweges für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren bei akuter Pankreatitis. Diese vorliegende Studie gibt experimentelle Hinweise, die belegen, dass CGRP die Funktion und Entwicklung von Entzündungs- und Immunzellen in der akuten Pankreatitis beeinflussen kann. Angesichts der kürzlichen Veröffentlichung eines vollständig humanen

monoklonalen Antikörpers gegen den CGRP-Rezeptor zur Behandlung von Migräne (Goadsby et al. 2017), ist es wichtig, die aus Mausmodellen gewonnenen Erkenntnisse zu berücksichtigen, einschließlich der hier dargestellten Ergebnisse, in Bezug auf mögliche entzündungsverstärkte Nebenwirkungen bei Störungen des CGRP-Signalweges. Anhand dieses Mausmodells unterstreicht diese Studie die essenzielle Rolle des CGRP-Weges als zentralen Modulator der angeborenen Immunantwort während der Akutphase einer Pankreatitis.

5 Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis ist durch eine sterile Inflammation im Pankreas nach Organschädigung gekennzeichnet. Die Bedeutung des Calcitonin-Gene-related-Peptide-Signalweges (CGRP) in diesem Prozess ist bislang unbekannt. CGRP wirkt als neuronaler Modulator der angeborenen Immunantwort. Der CGRP-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten: dem Receptor Activity-modifying Protein 1 (RAMP1) und dem Calcitonin Receptor-like Receptor (CLR). CGRP kann Immunzellen und ihre Fähigkeit zur Produktion entzündlicher Zytokine beeinflussen. In dieser Studie wurde unter Verwendung einer RAMP1-Knock-out-Maus (RAMP1^{-/-}) die Rolle des CGRP/RAMP1-Signalwegs in der Akutphase der durch Caerulein induzierten akuten Pankreatitis untersucht.

Es wurden stündliche Caerulein-Injektionen über einen Zeitraum von acht Stunden in RAMP1^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen (WT) durchgeführt. Die Analyse erfolgte 8 h, 24 h, 2 d und 7 d post Caerulein-Behandlung. Um den Schweregrad und das Ausmaß der Inflammation in RAMP1^{-/-}- und WT-Mäusen zu vergleichen, wurden histologische und immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die Zytokinexpression wurde unter Verwendung der quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) gemessen und die Proteinmenge durch einen Western Blot quantifiziert. Isolierte Azinuszellen von WT-Mäusen wurden zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps verwendet.

Färbungen des Pankreasgewebes bei RAMP1^{-/-}- und WT-Mäusen zeigten, dass das Fehlen von RAMP1 keinen Einfluss auf die Pankreasorganogenese hat. Außerdem konnte eine komplette Regeneration des Pankreasgewebes 7 d nach Behandlungsende sowohl bei den RAMP1^{-/-}- als auch bei den WT-Mäusen beobachtet werden. RAMP1^{-/-}-Mäuse zeigten 8 h nach Behandlung ein erhöhtes Pankreasfeuchtgewicht, eine reduzierte Proliferation und eine verstärkte Infiltration der Immunzellen mit einer Vermehrung F4/80-positiver Zellen im Vergleich zu WT-Mäusen. Weiterhin kam es 24 h post Behandlung zu einer verstärkten Apoptose und zu einer erhöhten Anzahl MPO-positiver Zellen bei den RAMP1^{-/-}-Mäusen, ohne Unterschiede in der Anzahl der CD8⁺- und CD4⁺-Zellen. Darüber hinaus wurde eine signifikant erhöhte Expression der Zytokine CCL3 und IL-1 β bei den RAMP1-Knock-out-Mäusen 24 h post Injektionen gemessen. Bei der Analyse der isolierten pankreatischen Azinuszellen wurde gezeigt, dass Azinuszellen RAMP1 exprimieren, eine CGRP-Behandlung beeinflusste jedoch die Expression von ICER und CCL3 bei isolierten Azinuszellen nicht.

Schlussfolgernd führt RAMP1 Verlust vor allem in der frühen Phase der akuten Pankreatitis zu einer verstärkten Inflammation im Pankreas. Die vorliegende Studie unterstreicht die wichtige Rolle von CGRP zur Inhibierung der angeborenen Immunantwort im Rahmen einer akuten Pankreatitis.

6 Literaturverzeichnis

- Abdulla, A., D. Awla, H. Thorlacius, and S. Regner. 2011. 'Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis', *J Leukoc Biol*, 90: 975-82.
- Aihara, E., M. Hayashi, Y. Sasaki, A. Kobata, and K. Takeuchi. 2005. 'Mechanisms underlying capsaicin-stimulated secretion in the stomach: comparison with mucosal acidification', *J Pharmacol Exp Ther*, 315: 423-32.
- Alevizaki, M., A. Shiraishi, F. V. Rassool, G. J. Ferrier, I. MacIntyre, and S. Legon. 1986. 'The calcitonin-like sequence of the beta CGRP gene', *FEBS Lett*, 206: 47-52.
- Altmayr, F., G. Jusek, and B. Holzmann. 2010. 'The neuropeptide calcitonin gene-related peptide causes repression of tumor necrosis factor-alpha transcription and suppression of ATF-2 promoter recruitment in Toll-like receptor-stimulated dendritic cells', *J Biol Chem*, 285: 3525-31.
- Amara, S. G., J. L. Arriza, S. E. Leff, L. W. Swanson, R. M. Evans, and M. G. Rosenfeld. 1985. 'Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide', *Science*, 229: 1094-7.
- Andersen, M. H., D. Schrama, P. Thor Straten, and J. C. Becker. 2006. 'Cytotoxic T cells', *J Invest Dermatol*, 126: 32-41.
- Anderson, L. E., and V. S. Seybold. 2004. 'Calcitonin gene-related peptide regulates gene transcription in primary afferent neurons', *J Neurochem*, 91: 1417-29.
- Arvanitakis, M., M. Delhay, V. De Maertelaere, M. Bali, C. Winant, E. Coppens, J. Jeanmart, M. Zalcman, D. Van Gansbeke, J. Deviere, and C. Matos. 2004. 'Computed tomography and magnetic resonance imaging in the assessment of acute pancreatitis', *Gastroenterology*, 126: 715-23.
- Assas, B. M., J. I. Pennock, and J. A. Miyan. 2014. 'Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis', *Front Neurosci*, 8: 23.
- Austyn, J. M., and S. Gordon. 1981. 'F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage', *Eur J Immunol*, 11: 805-15.
- Baliu-Pique, M., G. Jusek, and B. Holzmann. 2014. 'Neuroimmunological communication via CGRP promotes the development of a regulatory phenotype in TLR4-stimulated macrophages', *Eur J Immunol*, 44: 3708-16.
- Banks, P. A., T. L. Bollen, C. Dervenis, H. G. Gooszen, C. D. Johnson, M. G. Sarr, G. G. Tsiotos, S. S. Vege, and Group Acute Pancreatitis Classification Working. 2013.

- 'Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus', *Gut*, 62: 102-11.
- Banks, P. A., M. L. Freeman, and Gastroenterology Practice Parameters Committee of the American College of. 2006. 'Practice guidelines in acute pancreatitis', *Am J Gastroenterol*, 101: 2379-400.
- Barwell, J., D. Wootten, J. Simms, D. L. Hay, and D. R. Poyner. 2012. 'RAMPs and CGRP receptors', *Adv Exp Med Biol*, 744: 13-24.
- Basurto Ona, X., D. Rigau Comas, and G. Urrutia. 2013. 'Opioids for acute pancreatitis pain', *Cochrane Database Syst Rev*: CD009179.
- Bhatia, M., M. Brady, S. Shokuhi, S. Christmas, J. P. Neoptolemos, and J. Slavin. 2000. 'Inflammatory mediators in acute pancreatitis', *J Pathol*, 190: 117-25.
- Bhatia, M., F. L. Wong, Y. Cao, H. Y. Lau, J. Huang, P. Puneet, and L. Chevali. 2005. 'Pathophysiology of acute pancreatitis', *Pancreatology*, 5: 132-44.
- Bollen, T. L., H. C. van Santvoort, M. G. Besselink, W. H. van Es, H. G. Gooszen, and M. S. van Leeuwen. 2007. 'Update on acute pancreatitis: ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging features', *Semin Ultrasound CT MR*, 28: 371-83.
- Bracci-Laudiero, L., L. Aloe, P. Buanne, A. Finn, C. Stenfors, E. Vigneti, E. Theodorsson, and T. Lundeberg. 2002. 'NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF?', *J Neuroimmunol*, 123: 58-65.
- Bradley, P. P., D. A. Priebat, R. D. Christensen, and G. Rothstein. 1982. 'Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker', *J Invest Dermatol*, 78: 206-9.
- Brady, M., M. Bhatia, S. Christmas, M. T. Boyd, J. P. Neoptolemos, and J. Slavin. 2002. 'Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis', *Pancreas*, 25: 260-9.
- Brain, S. D., and A. D. Grant. 2004. 'Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin', *Physiol Rev*, 84: 903-34.
- Brain, S. D., T. J. Williams, J. R. Tippins, H. R. Morris, and I. MacIntyre. 1985. 'Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator', *Nature*, 313: 54-6.
- Brandtzaeg, P. 1998. 'The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry', *J Immunol Methods*, 216: 49-67.
- Brasier, A. R. 2006. 'The NF-kappaB regulatory network', *Cardiovasc Toxicol*, 6: 111-30.
- Bressenot, A., S. Marchal, L. Bezdetnaya, J. Garrier, F. Guillemin, and F. Plenat. 2009. 'Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active

- caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma', *J Histochem Cytochem*, 57: 289-300.
- Bystry, R. S., V. Aluvihare, K. A. Welch, M. Kallikourdis, and A. G. Betz. 2001. 'B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4', *Nat Immunol*, 2: 1126-32.
- Cakir, E., A. Yilmaz, F. Demirag, S. Oguztuzun, S. Sahin, U. E. Yazici, and M. Aydin. 2011. 'Prognostic significance of micropapillary pattern in lung adenocarcinoma and expression of apoptosis-related markers: caspase-3, bcl-2, and p53', *APMIS*, 119: 574-80.
- Chaudhuri, A., S. Z. Husain, T. R. Kolodecik, W. M. Grant, and F. S. Gorelick. 2007. 'Cyclic AMP-dependent protein kinase and Epac mediate cyclic AMP responses in pancreatic acini', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292: G1403-10.
- Chu, P. G., and L. M. Weiss. 2002. 'Keratin expression in human tissues and neoplasms', *Histopathology*, 40: 403-39.
- Consonni, A., S. Morara, F. Codazzi, F. Grohovaz, and D. Zacchetti. 2011. 'Inhibition of lipopolysaccharide-induced microglia activation by calcitonin gene related peptide and adrenomedullin', *Mol Cell Neurosci*, 48: 151-60.
- Crawford, M. P., S. Sinha, P. S. Renavikar, N. Borcharding, and N. J. Karandikar. 2020. 'CD4 T cell-intrinsic role for the T helper 17 signature cytokine IL-17: Effector resistance to immune suppression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 19408-14.
- Crockett, S. D., S. Wani, T. B. Gardner, Y. Falck-Ytter, A. N. Barkun, and Committee American Gastroenterological Association Institute Clinical Guidelines. 2018. 'American Gastroenterological Association Institute Guideline on Initial Management of Acute Pancreatitis', *Gastroenterology*, 154: 1096-101.
- Dawra, R., R. P. Sah, V. Dudeja, L. Rishi, R. Talukdar, P. Garg, and A. K. Saluja. 2011. 'Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis', *Gastroenterology*, 141: 2210-17 e2.
- Demols, A., O. Le Moine, F. Desalle, E. Quertinmont, J. L. Van Laethem, and J. Deviere. 2000. 'CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice', *Gastroenterology*, 118: 582-90.
- Dickerson, I. M. 2013. 'Role of CGRP-receptor component protein (RCP) in CLR/RAMP function', *Curr Protein Pept Sci*, 14: 407-15.
- Ding, W., L. L. Stohl, J. A. Wagner, and R. D. Granstein. 2008. 'Calcitonin gene-related peptide biases Langerhans cells toward Th2-type immunity', *J Immunol*, 181: 6020-6.

- Donnerer, J., and C. Stein. 1992. 'Evidence for an increase in the release of CGRP from sensory nerves during inflammation', *Ann N Y Acad Sci*, 657: 505-6.
- Duan, J. X., Y. Zhou, A. Y. Zhou, X. X. Guan, T. Liu, H. H. Yang, H. Xie, and P. Chen. 2017. 'Calcitonin gene-related peptide exerts anti-inflammatory property through regulating murine macrophages polarization in vitro', *Mol Immunol*, 91: 105-13.
- Eatock, F. C., P. Chong, N. Menezes, L. Murray, C. J. McKay, C. R. Carter, and C. W. Imrie. 2005. 'A randomized study of early nasogastric versus nasojejunal feeding in severe acute pancreatitis', *Am J Gastroenterol*, 100: 432-9.
- Eisses, J. F., A. W. Davis, A. B. Tosun, Z. R. Dionise, C. Chen, J. A. Ozolek, G. K. Rohde, and S. Z. Husain. 2014. 'A computer-based automated algorithm for assessing acinar cell loss after experimental pancreatitis', *PLoS One*, 9: e110220.
- Eming, S. A., T. Krieg, and J. M. Davidson. 2007. 'Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms', *J Invest Dermatol*, 127: 514-25.
- Evans, B. N., M. I. Rosenblatt, L. O. Mnayer, K. R. Oliver, and I. M. Dickerson. 2000. 'CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors', *J Biol Chem*, 275: 31438-43.
- Felderbauer, P., C. Muller, K. Bulut, O. Belyaev, F. Schmitz, W. Uhl, and W. E. Schmidt. 2005. 'Pathophysiology and treatment of acute pancreatitis: new therapeutic targets--a ray of hope?', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 97: 342-50.
- Fernandez, S., M. A. Knopf, S. K. Bjork, and J. P. McGillis. 2001. 'Bone marrow-derived macrophages express functional CGRP receptors and respond to CGRP by increasing transcription of c-fos and IL-6 mRNA', *Cell Immunol*, 209: 140-8.
- Flandez, M., J. Cendrowski, M. Canamero, A. Salas, N. del Pozo, K. Schoonjans, and F. X. Real. 2014. 'Nr5a2 heterozygosity sensitises to, and cooperates with, inflammation in KRas(G12V)-driven pancreatic tumourigenesis', *Gut*, 63: 647-55.
- Folias, A. E., C. Penaranda, A. L. Su, J. A. Bluestone, and M. Hebrok. 2014. 'Aberrant innate immune activation following tissue injury impairs pancreatic regeneration', *PLoS One*, 9: e102125.
- Fox, F. E., M. Kubin, M. Cassin, Z. Niu, J. Hosoi, H. Torii, R. D. Granstein, G. Trinchieri, and A. H. Rook. 1997. 'Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12', *J Invest Dermatol*, 108: 43-8.
- Fritz, S., T. Hackert, W. Hartwig, F. Rossmannith, O. Strobel, L. Schneider, K. Will-Schweiger, M. Kommerell, M. W. Buchler, and J. Werner. 2010. 'Bacterial

- translocation and infected pancreatic necrosis in acute necrotizing pancreatitis derives from small bowel rather than from colon', *Am J Surg*, 200: 111-7.
- Frossard, J. L., M. L. Steer, and C. M. Pastor. 2008. 'Acute pancreatitis', *Lancet*, 371: 143-52.
- Fu, C., Z. Yin, D. Yu, and Z. Yang. 2013. 'Substance P and calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglia in sciatic nerve injury rats', *Neural Regen Res*, 8: 3124-30.
- Gangula, P. R., H. Zhao, S. C. Supowit, S. J. Wimalawansa, D. J. Dipette, K. N. Westlund, R. F. Gagel, and C. Yallampalli. 2000. 'Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice', *Hypertension*, 35: 470-5.
- Ghosh, S., and M. S. Hayden. 2008. 'New regulators of NF-kappaB in inflammation', *Nat Rev Immunol*, 8: 837-48.
- Gibson, S. J., J. M. Polak, S. R. Bloom, I. M. Sabate, P. M. Mulderry, M. A. Ghatei, G. P. McGregor, J. F. Morrison, J. S. Kelly, R. M. Evans, and et al. 1984. 'Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species', *J Neurosci*, 4: 3101-11.
- Gilmore, T. D. 2006. 'Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives', *Oncogene*, 25: 6680-4.
- Goadsby, P. J., U. Reuter, Y. Hallstrom, G. Broessner, J. H. Bonner, F. Zhang, S. Sapra, H. Picard, D. D. Mikol, and R. A. Lenz. 2017. 'A Controlled Trial of Erenumab for Episodic Migraine', *N Engl J Med*, 377: 2123-32.
- Guan, E., J. Wang, and M. A. Norcross. 2001. 'Identification of human macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta as a native secreted heterodimer', *J Biol Chem*, 276: 12404-9.
- Guan, H., S. Hou, and R. P. Ricciardi. 2005. 'DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit', *J Biol Chem*, 280: 9957-62.
- Gukovskaya, A. S., I. Gukovsky, V. Zaninovic, M. Song, D. Sandoval, S. Gukovsky, and S. J. Pandol. 1997. 'Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis', *J Clin Invest*, 100: 1853-62.
- Gukovsky, I., A. S. Gukovskaya, T. A. Blinman, V. Zaninovic, and S. J. Pandol. 1998. 'Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis', *Am J Physiol*, 275: G1402-14.

- Gutt, C., C. Janssen, A. P. Barreiros, T. O. Gotze, C. S. Stokes, P. L. Jansen, M. Neubrand, F. Lammert, Konsensuskonferenz für die Teilnehmer der, V. Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e, Hepatologie Österreichische Gesellschaft für Gastroenterologie und, Gastroenterologie Schweizer Gesellschaft für, Humangenetik Gesellschaft für, Medizin Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der, Chirurgie Deutsche Gesellschaft für, Gesundheitswesen Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im, Leber Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der, Röntgengesellschaft Deutsche, and V. Deutsche Leberhilfe e. 2018. '[Updated S3-Guideline for Prophylaxis, Diagnosis and Treatment of Gallstones. German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) and German Society for Surgery of the Alimentary Tract (DGAV) - AWMF Registry 021/008]', *Z Gastroenterol*, 56: 912-66.
- Habtezion, A. 2015. 'Inflammation in acute and chronic pancreatitis', *Curr Opin Gastroenterol*, 31: 395-9.
- Haegerstrand, A., C. J. Dalsgaard, B. Jonzon, O. Larsson, and J. Nilsson. 1990. 'Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 3299-303.
- Harper, S. J., and S. Cheslyn-Curtis. 2011. 'Acute pancreatitis', *Ann Clin Biochem*, 48: 23-37.
- Hartwig, W., R. E. Jimenez, J. Werner, K. B. Lewandrowski, A. L. Warshaw, and C. Fernandez-del Castillo. 1999. 'Interstitial trypsinogen release and its relevance to the transformation of mild into necrotizing pancreatitis in rats', *Gastroenterology*, 117: 717-25.
- Harzenetter, M. D., U. Keller, S. Beer, C. Riedl, C. Peschel, and B. Holzmann. 2002. 'Regulation and function of the CGRP receptor complex in human granulopoiesis', *Exp Hematol*, 30: 306-12.
- Harzenetter, M. D., A. R. Novotny, P. Gais, C. A. Molina, F. Altmayr, and B. Holzmann. 2007. 'Negative regulation of TLR responses by the neuropeptide CGRP is mediated by the transcriptional repressor ICER', *J Immunol*, 179: 607-15.
- Hay, D. L., S. G. Howitt, A. C. Conner, M. Schindler, D. M. Smith, and D. R. Poyner. 2003. 'CL/RAMP2 and CL/RAMP3 produce pharmacologically distinct adrenomedullin receptors: a comparison of effects of adrenomedullin22-52, CGRP8-37 and BIBN4096BS', *Br J Pharmacol*, 140: 477-86.
- Hietaranta, A. J., A. K. Saluja, L. Bhagat, V. P. Singh, A. M. Song, and M. L. Steer. 2001. 'Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation', *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 388-95.

- Hoare, S. R. 2005. 'Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors', *Drug Discov Today*, 10: 417-27.
- Hoffmann, J., S. Wecker, L. Neeb, U. Dirnagl, and U. Reuter. 2012. 'Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF', *Cephalalgia*, 32: 659-67.
- Holzmann, B. 2013. 'Antiinflammatory activities of CGRP modulating innate immune responses in health and disease', *Curr Protein Pept Sci*, 14: 268-74.
- Hoque, R., M. Sohail, A. Malik, S. Sarwar, Y. Luo, A. Shah, F. Barrat, R. Flavell, F. Gorelick, S. Husain, and W. Mehal. 2011. 'TLR9 and the NLRP3 inflammasome link acinar cell death with inflammation in acute pancreatitis', *Gastroenterology*, 141: 358-69.
- Houbracken, I., E. de Waele, J. Lardon, Z. Ling, H. Heimberg, I. Rooman, and L. Bouwens. 2011. 'Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas', *Gastroenterology*, 141: 731-41, 41 e1-4.
- Hsu, S. M., L. Raine, and H. Fanger. 1981. 'Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures', *J Histochem Cytochem*, 29: 577-80.
- Hyun, J. J., and H. S. Lee. 2014. 'Experimental models of pancreatitis', *Clin Endosc*, 47: 212-6.
- Inoue, T., Y. Ito, N. Nishizawa, K. Eshima, K. Kojo, F. Otaka, T. Betto, S. Yamane, K. Tsujikawa, W. Koizumi, and M. Majima. 2018. 'RAMP1 in Kupffer cells is a critical regulator in immune-mediated hepatitis', *PLoS One*, 13: e0200432.
- Jacobs, M. D., and S. C. Harrison. 1998. 'Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex', *Cell*, 95: 749-58.
- Jensen, J. N., E. Cameron, M. V. Garay, T. W. Starkey, R. Gianani, and J. Jensen. 2005. 'Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration', *Gastroenterology*, 128: 728-41.
- Johnston, B., A. R. Burns, M. Suematsu, T. B. Issekutz, R. C. Woodman, and P. Kubes. 1999. 'Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1', *J Clin Invest*, 103: 1269-76.
- Joyce, C. D., R. R. Fiscus, X. Wang, D. J. Dries, R. C. Morris, and R. A. Prinz. 1990. 'Calcitonin gene-related peptide levels are elevated in patients with sepsis', *Surgery*, 108: 1097-101.

- Jusek, G., D. Reim, K. Tsujikawa, and B. Holzmann. 2012. 'Deficiency of the CGRP receptor component RAMP1 attenuates immunosuppression during the early phase of septic peritonitis', *Immunobiology*, 217: 761-7.
- Kaiser, A. M., A. K. Saluja, A. Sengupta, M. Saluja, and M. L. Steer. 1995. 'Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis', *Am J Physiol*, 269: C1295-304.
- Kawamura, N., H. Tamura, S. Obana, M. Wenner, T. Ishikawa, A. Nakata, and H. Yamamoto. 1998. 'Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse helper T cell subsets', *Neuroimmunomodulation*, 5: 9-15.
- Kawanami, Y., Y. Morimoto, H. Kim, T. Nakamura, K. Machida, T. Kido, E. Asonuma, K. Yatera, C. Yoshii, and M. Kido. 2009. 'Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of alveolar epithelial cells', *Respir Res*, 10: 8.
- Kawashima-Takeda, N., Y. Ito, N. Nishizawa, R. Kawashima, K. Tanaka, K. Tsujikawa, M. Watanabe, and M. Majima. 2017. 'RAMP1 suppresses mucosal injury from dextran sodium sulfate-induced colitis in mice', *J Gastroenterol Hepatol*, 32: 809-18.
- Kinkade, J. M., Jr., S. O. Pember, K. C. Barnes, R. Shapira, J. K. Spitznagel, and L. E. Martin. 1983. 'Differential distribution of distinct forms of myeloperoxidase in different azurophilic granule subpopulations from human neutrophils', *Biochem Biophys Res Commun*, 114: 296-303.
- Kiraly, O., G. Gong, W. Olipitz, S. Muthupalani, and B. P. Engelward. 2015. 'Inflammation-induced cell proliferation potentiates DNA damage-induced mutations in vivo', *PLoS Genet*, 11: e1004901.
- Kopp, J. L., G. von Figura, E. Mayes, F. F. Liu, C. L. Dubois, J. P. th Morris, F. C. Pan, H. Akiyama, C. V. Wright, K. Jensen, M. Hebrok, and M. Sander. 2012. 'Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 22: 737-50.
- Kroeger, I., A. Erhardt, D. Abt, M. Fischer, M. Biburger, T. Rau, W. L. Neuhuber, and G. Tiegs. 2009. 'The neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) prevents inflammatory liver injury in mice', *J Hepatol*, 51: 342-53.
- Kruger, B., E. Albrecht, and M. M. Lerch. 2000. 'The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis', *Am J Pathol*, 157: 43-50.
- Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227: 680-5.

- Lampel, M., and H. F. Kern. 1977. 'Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue', *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 373: 97-117.
- Larsson, L. I. 1979. 'Innervation of the pancreas by substance P, enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin/CCK immunoreactive nerves', *J Histochem Cytochem*, 27: 1283-4.
- Laschinger, M., Y. Wang, G. Holzmann, B. Wang, C. Stoss, M. Lu, M. Brugger, A. Schneider, P. Knolle, D. Wohlleber, S. Schulze, K. Steiger, K. Tsujikawa, F. Altmayr, H. Friess, D. Hartmann, N. Huser, and B. Holzmann. 2020. 'The CGRP receptor component RAMP1 links sensory innervation with YAP activity in the regenerating liver', *FASEB J*, 34: 8125-38.
- Lassen, L. H., P. A. Haderslev, V. B. Jacobsen, H. K. Iversen, B. Sperling, and J. Olesen. 2002. 'CGRP may play a causative role in migraine', *Cephalalgia*, 22: 54-61.
- Leach, S. D., I. M. Modlin, G. A. Scheele, and F. S. Gorelick. 1991. 'Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin', *J Clin Invest*, 87: 362-6.
- Lee, S. C., M. E. Brummet, S. Shahabuddin, T. G. Woodworth, S. N. Georas, K. M. Leiferman, S. C. Gilman, C. Stellato, R. P. Gladue, R. P. Schleimer, and L. A. Beck. 2000. 'Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes', *J Immunol*, 164: 3392-401.
- Liefeld, P. H., C. M. Wessels, L. P. Leenen, L. Koenderman, and J. Pillay. 2016. 'The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation', *Crit Care*, 20: 73.
- Leppaniemi, A., M. Tolonen, A. Tarasconi, H. Segovia-Lohse, E. Gamberini, A. W. Kirkpatrick, C. G. Ball, N. Parry, M. Sartelli, D. Wolbrink, H. van Goor, G. Baiocchi, L. Ansaloni, W. Biffl, F. Coccolini, S. Di Saverio, Y. Kluger, E. Moore, and F. Catena. 2019. '2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis', *World J Emerg Surg*, 14: 27.
- Levite, M., L. Cahalon, R. Hershkovich, L. Steinman, and O. Lider. 1998. 'Neuropeptides, via specific receptors, regulate T cell adhesion to fibronectin', *J Immunol*, 160: 993-1000.
- Linscheid, P., D. Seboek, D. J. Schaer, H. Zulewski, U. Keller, and B. Muller. 2004. 'Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes', *Crit Care Med*, 32: 1715-21.

- Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz. 1995. 'Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization', *PCR Methods Appl*, 4: 357-62.
- Logsdon, C. D., and B. Ji. 2013. 'The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 362-70.
- Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma, and B. Xia. 2012. 'CD4(+)T cells: differentiation and functions', *Clin Dev Immunol*, 2012: 925135.
- Lundberg, A. H., J. W. Eubanks, 3rd, J. Henry, O. Sabek, M. Kotb, L. Gaber, A. Norby-Teglund, and A. O. Gaber. 2000. 'Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo', *Pancreas*, 21: 41-51.
- Luo, C. C., C. S. Huang, Y. C. Ming, S. M. Chu, and H. C. Chao. 2016. 'Calcitonin Gene-Related Peptide Downregulates Expression of Inducible Nitride Oxide Synthase and Caspase-3 after Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats', *Pediatr Neonatol*, 57: 474-79.
- Ma, Y. X., Z. Guo, and T. Sun. 2013. 'CGRP inhibits norepinephrine induced apoptosis with restoration of Bcl-2/Bax in cultured cardiomyocytes of rat', *Neurosci Lett*, 549: 130-4.
- Maini, R. N., M. J. Elliott, F. M. Brennan, and M. Feldmann. 1995. 'Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA)', *Clin Exp Immunol*, 101: 207-12.
- Massaad, C. A., B. Safieh-Garabedian, S. Poole, S. F. Atweh, S. J. Jabbur, and N. E. Saade. 2004. 'Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats', *J Neuroimmunol*, 153: 171-82.
- Mayerle, J. 2009. 'A novel role for leucocytes in determining the severity of acute pancreatitis', *Gut*, 58: 1440-1.
- Mayr, B., and M. Montminy. 2001. 'Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 599-609.
- McLatchie, L. M., N. J. Fraser, M. J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M. G. Lee, and S. M. Foord. 1998. 'RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor', *Nature*, 393: 333-9.
- Means, A. L., I. M. Meszoely, K. Suzuki, Y. Miyamoto, A. K. Rustgi, R. J. Coffey, Jr., C. V. Wright, D. A. Stoffers, and S. D. Leach. 2005. 'Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates', *Development*, 132: 3767-76.

- Medzhitov, R., and T. Horng. 2009. 'Transcriptional control of the inflammatory response', *Nat Rev Immunol*, 9: 692-703.
- Meng, J., S. V. Ovsepian, J. Wang, M. Pickering, A. Sasse, K. R. Aoki, G. W. Lawrence, and J. O. Dolly. 2009. 'Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential', *J Neurosci*, 29: 4981-92.
- Meng, J., J. Wang, G. Lawrence, and J. O. Dolly. 2007. 'Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential', *J Cell Sci*, 120: 2864-74.
- Meng, W., J. Yuan, C. Zhang, Z. Bai, W. Zhou, J. Yan, and X. Li. 2013. 'Parenteral analgesics for pain relief in acute pancreatitis: a systematic review', *Pancreatology*, 13: 201-6.
- Menon, S. S., C. Guruvayoorappan, K. M. Sakthivel, and R. R. Rasmi. 2019. 'Ki-67 protein as a tumour proliferation marker', *Clin Chim Acta*, 491: 39-45.
- Mikami, N., H. Matsushita, T. Kato, R. Kawasaki, T. Sawazaki, T. Kishimoto, Y. Ogitani, K. Watanabe, Y. Miyagi, K. Sueda, S. Fukada, H. Yamamoto, and K. Tsujikawa. 2011. 'Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell functions', *J Immunol*, 186: 6886-93.
- Mishima, T., Y. Ito, N. Nishizawa, H. Amano, K. Tsujikawa, K. Miyaji, M. Watanabe, and M. Majima. 2017. 'RAMP1 signaling improves lymphedema and promotes lymphangiogenesis in mice', *J Surg Res*, 219: 50-60.
- Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, and S. Nagata. 2007. 'Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor', *Nature*, 450: 435-9.
- Miyauchi, K., N. Tadotsu, T. Hayashi, Y. Ono, K. Tokoyoda, K. Tsujikawa, and H. Yamamoto. 2002. 'Molecular cloning and characterization of mouse calcitonin gene-related peptide receptor', *Neuropeptides*, 36: 22-33.
- Mrak, E., F. Guidobono, G. Moro, G. Fraschini, A. Rubinacci, and I. Villa. 2010. 'Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits apoptosis in human osteoblasts by beta-catenin stabilization', *J Cell Physiol*, 225: 701-8.
- Mulderry, P. K., M. A. Ghatei, A. E. Bishop, Y. S. Allen, J. M. Polak, and S. R. Bloom. 1985. 'Distribution and chromatographic characterisation of CGRP-like immunoreactivity in the brain and gut of the rat', *Regul Pept*, 12: 133-43.
- Mulderry, P. K., M. A. Ghatei, R. A. Spokes, P. M. Jones, A. M. Pierson, Q. A. Hamid, S. Kanse, S. G. Amara, J. M. Burrin, S. Legon, and et al. 1988. 'Differential expression

- of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat', *Neuroscience*, 25: 195-205.
- Niebergall-Roth, E., and M. V. Singer. 2001. 'Central and peripheral neural control of pancreatic exocrine secretion', *J Physiol Pharmacol*, 52: 523-38.
- Niederau, C., L. D. Ferrell, and J. H. Grendell. 1985. 'Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin', *Gastroenterology*, 88: 1192-204.
- Norman, J. G. 1999. 'New approaches to acute pancreatitis: role of inflammatory mediators', *Digestion*, 60 Suppl 1: 57-60.
- Ozaka, T., Y. Doi, K. Kayashima, and S. Fujimoto. 1997. 'Weibel-Palade bodies as a storage site of calcitonin gene-related peptide and endothelin-1 in blood vessels of the rat carotid body', *Anat Rec*, 247: 388-94.
- Petejova, N., and A. Martinek. 2013. 'Acute kidney injury following acute pancreatitis: A review', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 157: 105-13.
- Petrov, M. S., S. Shanbhag, M. Chakraborty, A. R. Phillips, and J. A. Windsor. 2010. 'Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis', *Gastroenterology*, 139: 813-20.
- Pinho, A. V., I. Rooman, M. Reichert, N. De Medts, L. Bouwens, A. K. Rustgi, and F. X. Real. 2011. 'Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis', *Gut*, 60: 958-66.
- Porter, A. G., and R. U. Janicke. 1999. 'Emerging roles of caspase-3 in apoptosis', *Cell Death Differ*, 6: 99-104.
- Poyner, D. R., P. M. Sexton, I. Marshall, D. M. Smith, R. Quirion, W. Born, R. Muff, J. A. Fischer, and S. M. Foord. 2002. 'International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors', *Pharmacol Rev*, 54: 233-46.
- Quan, S., D. R. Principe, A. E. Dean, S. H. Park, P. J. Grippo, D. Gius, and N. Horikoshi. 2018. 'Loss of Sirt2 increases and prolongs a caerulein-induced pancreatitis permissive phenotype and induces spontaneous oncogenic Kras mutations in mice', *Sci Rep*, 8: 16501.
- Rakonczay, Z., Jr., P. Hegyi, T. Takacs, J. McCarroll, and A. K. Saluja. 2008. 'The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis', *Gut*, 57: 259-67.

- Raraty, M. G., J. A. Murphy, E. McLoughlin, D. Smith, D. Criddle, and R. Sutton. 2005. 'Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis', *Scand J Surg*, 94: 89-96.
- Rau, B., A. Paszkowski, S. Esber, F. Gansauge, B. Poch, H. G. Beger, and P. Moller. 2001. 'Anti-ICAM-1 antibody modulates late onset of acinar cell apoptosis and early necrosis in taurocholate-induced experimental acute pancreatitis', *Pancreas*, 23: 80-8.
- Reichel, C. A., M. Rehberg, M. Lerchenberger, N. Berberich, P. Bihari, A. G. Khandoga, S. Zahler, and F. Krombach. 2009. 'Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 1787-93.
- Roberts, S. E., S. Morrison-Rees, A. John, J. G. Williams, T. H. Brown, and D. G. Samuel. 2017. 'The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe', *Pancreatology*, 17: 155-65.
- Rongione, A. J., A. M. Kusske, K. Kwan, S. W. Ashley, H. A. Reber, and D. W. McFadden. 1997. 'Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats', *Gastroenterology*, 112: 960-7.
- Russell, F. A., R. King, S. J. Smillie, X. Kodji, and S. D. Brain. 2014. 'Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology', *Physiol Rev*, 94: 1099-142.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, 239: 487-91.
- Sakamoto, K. M., and D. A. Frank. 2009. 'CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy', *Clin Cancer Res*, 15: 2583-7.
- Saluja, A. K., M. M. Lerch, P. A. Phillips, and V. Dudeja. 2007. 'Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis?', *Annu Rev Physiol*, 69: 249-69.
- Sams-Nielsen, A., C. Orskov, and I. Jansen-Olesen. 2001. 'Pharmacological evidence for CGRP uptake into perivascular capsaicin sensitive nerve terminals', *Br J Pharmacol*, 132: 1145-53.
- Santos, C. F., V. T. Sakai, M. A. Machado, D. N. Schippers, and A. S. Greene. 2004. 'Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry', *J Appl Oral Sci*, 12: 1-11.
- Saraiva, M., and A. O'Garra. 2010. 'The regulation of IL-10 production by immune cells', *Nat Rev Immunol*, 10: 170-81.

- Schietroma, M., B. Pessia, F. Carlei, P. Mariani, F. Sista, and G. Amicucci. 2016. 'Intestinal permeability and systemic endotoxemia in patients with acute pancreatitis', *Ann Ital Chir*, 87: 138-44.
- Scholmerich, J. 1996. 'Interleukins in acute pancreatitis', *Scand J Gastroenterol Suppl*, 219: 37-42.
- Schwartz, E. S., J. A. Christianson, X. Chen, J. H. La, B. M. Davis, K. M. Albers, and G. F. Gebhart. 2011. 'Synergistic role of TRPV1 and TRPA1 in pancreatic pain and inflammation', *Gastroenterology*, 140: 1283-91 e1-2.
- Seifert, H., P. Sawchenko, J. Chesnut, J. Rivier, W. Vale, and S. J. Pandol. 1985. 'Receptor for calcitonin gene-related peptide: binding to exocrine pancreas mediates biological actions', *Am J Physiol*, 249: G147-51.
- Seta, T., Y. Noguchi, S. Shikata, and T. Nakayama. 2014. 'Treatment of acute pancreatitis with protease inhibitors administered through intravenous infusion: an updated systematic review and meta-analysis', *BMC Gastroenterol*, 14: 102.
- Seybold, V. S., K. E. McCarson, P. G. Mermelstein, R. D. Groth, and L. G. Abrahams. 2003. 'Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons', *J Neurosci*, 23: 1816-24.
- Shaywitz, A. J., and M. E. Greenberg. 1999. 'CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals', *Annu Rev Biochem*, 68: 821-61.
- Sinha, P., V. K. Singh, V. Suryanarayana, L. Krishnamurthy, R. K. Saxena, and R. K. Varshney. 2015. 'Evaluation and validation of housekeeping genes as reference for gene expression studies in pigeonpea (*Cajanus cajan*) under drought stress conditions', *PLoS One*, 10: e0122847.
- Smith, B. J. 1984. 'SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins', *Methods Mol Biol*, 1: 41-55.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. 'Measurement of protein using bicinchoninic acid', *Anal Biochem*, 150: 76-85.
- Steinle, A. U., H. Weidenbach, M. Wagner, G. Adler, and R. M. Schmid. 1999. 'NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis', *Gastroenterology*, 116: 420-30.
- Steinman, L. 2004. 'Elaborate interactions between the immune and nervous systems', *Nat Immunol*, 5: 575-81.
- Sternini, C., R. De Giorgio, and J. B. Furness. 1992. 'Calcitonin gene-related peptide neurons innervating the canine digestive system', *Regul Pept*, 42: 15-26.

- Stigliano, S., H. Sternby, E. de Madaria, G. Capurso, and M. S. Petrov. 2017. 'Early management of acute pancreatitis: A review of the best evidence', *Dig Liver Dis*, 49: 585-94.
- Szolcsanyi, J., and L. Bartho. 2001. 'Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update', *J Physiol Paris*, 95: 181-8.
- Takami, K., Y. Kawai, S. Uchida, M. Tohyama, Y. Shiotani, H. Yoshida, P. C. Emson, S. Girgis, C. J. Hillyard, and I. MacIntyre. 1985. 'Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse', *Neurosci Lett*, 60: 227-30.
- Takeyama, Y., J. Nishikawa, T. Ueda, Y. Hori, M. Yamamoto, and Y. Kuroda. 1999. 'Involvement of peritoneal macrophage in the induction of cytotoxicity due to apoptosis in ascitic fluid associated with severe acute pancreatitis', *J Surg Res*, 82: 163-71.
- Talme, T., Z. Liu, and K. G. Sundqvist. 2008. 'The neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) stimulates T cell migration into collagen matrices', *J Neuroimmunol*, 196: 60-6.
- Talukdar, R., and S. Swaroop Vege. 2011. 'Early management of severe acute pancreatitis', *Curr Gastroenterol Rep*, 13: 123-30.
- Taylor, C. R., S. R. Shi, C. Chen, L. Young, C. Yang, and R. J. Cote. 1996. 'Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer', *Biotech Histochem*, 71: 263-70.
- Tenner, S., J. Baillie, J. DeWitt, S. S. Vege, and Gastroenterology American College of. 2013. 'American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis', *Am J Gastroenterol*, 108: 1400-15; 16.
- Toda, M., T. Suzuki, K. Hosono, Y. Kurihara, H. Kurihara, I. Hayashi, H. Kitasato, S. Hoka, and M. Majima. 2008. 'Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis', *Biomed Pharmacother*, 62: 352-9.
- Tokoyoda, K., K. Tsujikawa, H. Matsushita, Y. Ono, T. Hayashi, Y. Harada, R. Abe, M. Kubo, and H. Yamamoto. 2004. 'Up-regulation of IL-4 production by the activated cAMP/cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A) pathway in CD3/CD28-stimulated naive T cells', *Int Immunol*, 16: 643-53.
- Torii, H., J. Hosoi, S. Beissert, S. Xu, F. E. Fox, A. Asahina, A. Takashima, A. H. Rook, and R. D. Granstein. 1997. 'Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide', *J Leukoc Biol*, 61: 216-23.

- Toriyama, Y., Y. Iesato, A. Imai, T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, A. Yamauchi, K. Igarashi, M. Tanaka, T. Liu, X. Xian, L. Zhai, S. Owa, T. Murata, and T. Shindo. 2015. 'Pathophysiological function of endogenous calcitonin gene-related peptide in ocular vascular diseases', *Am J Pathol*, 185: 1783-94.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 4350-4.
- Tse, F., and Y. Yuan. 2012. 'Early routine endoscopic retrograde cholangiopancreatography strategy versus early conservative management strategy in acute gallstone pancreatitis', *Cochrane Database Syst Rev*: CD009779.
- Tsujikawa, K., K. Yayama, T. Hayashi, H. Matsushita, T. Yamaguchi, T. Shigeno, Y. Ogitani, M. Hirayama, T. Kato, S. Fukada, S. Takatori, H. Kawasaki, H. Okamoto, M. Ikawa, M. Okabe, and H. Yamamoto. 2007. 'Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 16702-7.
- Ueda, T., S. Ugawa, Y. Saishin, and S. Shimada. 2001. 'Expression of receptor-activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain', *Brain Res Mol Brain Res*, 93: 36-45.
- Uhl, W., A. Warshaw, C. Imrie, C. Bassi, C. J. McKay, P. G. Lankisch, R. Carter, E. Di Magno, P. A. Banks, D. C. Whitcomb, C. Dervenis, C. D. Ulrich, K. Satake, P. Ghaneh, W. Hartwig, J. Werner, G. McEntee, J. P. Neoptolemos, M. W. Buchler, and Pancreatology International Association of. 2002. 'IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis', *Pancreatology*, 2: 565-73.
- van Acker, G. J., G. Perides, and M. L. Steer. 2006. 'Co-localization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis', *World J Gastroenterol*, 12: 1985-90.
- Vege, S. S., T. B. Gardner, S. T. Chari, P. Munukuti, R. K. Pearson, J. E. Clain, B. T. Petersen, T. H. Baron, M. B. Farnell, and M. G. Sarr. 2009. 'Low mortality and high morbidity in severe acute pancreatitis without organ failure: a case for revising the Atlanta classification to include "moderately severe acute pancreatitis"', *Am J Gastroenterol*, 104: 710-5.
- von Figura, G., J. P. th Morris, C. V. Wright, and M. Hebrok. 2014. 'Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation', *Gut*, 63: 656-64.

- Wang, H., L. Xing, W. Li, L. Hou, J. Guo, and X. Wang. 2002. 'Production and secretion of calcitonin gene-related peptide from human lymphocytes', *J Neuroimmunol*, 130: 155-62.
- Watanabe, O., F. M. Baccino, M. L. Steer, and J. Meldolesi. 1984. 'Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis', *Am J Physiol*, 246: G457-67.
- Weber, C. K., and G. Adler. 2001. 'From acinar cell damage to systemic inflammatory response: current concepts in pancreatitis', *Pancreatology*, 1: 356-62.
- White, S. R., M. B. Hershenson, K. S. Sigrist, A. Zimmermann, and J. Solway. 1993. 'Proliferation of guinea pig tracheal epithelial cells induced by calcitonin gene-related peptide', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 8: 592-6.
- Willemer, S., H. P. Elsasser, and G. Adler. 1992. 'Hormone-induced pancreatitis', *Eur Surg Res*, 24 Suppl 1: 29-39.
- Wimalawansa, S. J. 1996. 'Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials', *Endocr Rev*, 17: 533-85.
- Wu, J., S. Liu, Z. Wang, S. Ma, H. Meng, and J. Hu. 2018. 'Calcitonin gene-related peptide promotes proliferation and inhibits apoptosis in endothelial progenitor cells via inhibiting MAPK signaling', *Proteome Sci*, 16: 18.
- Yi, F., L. Ge, J. Zhao, Y. Lei, F. Zhou, Z. Chen, Y. Zhu, and B. Xia. 2012. 'Meta-analysis: total parenteral nutrition versus total enteral nutrition in predicted severe acute pancreatitis', *Intern Med*, 51: 523-30.
- Zhang, Z. H., X. B. Fang, G. M. Xi, W. C. Li, H. Y. Ling, and P. Qu. 2010. 'Calcitonin gene-related peptide enhances CREB phosphorylation and attenuates tau protein phosphorylation in rat brain during focal cerebral ischemia/reperfusion', *Biomed Pharmacother*, 64: 430-6.
- Zhou, M. T., C. S. Chen, B. C. Chen, Q. Y. Zhang, and R. Andersson. 2010. 'Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention', *World J Gastroenterol*, 16: 2094-9.
- Zhou, Q., and D. A. Melton. 2018. 'Pancreas regeneration', *Nature*, 557: 351-58.

7 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Jochheim, L. S., G. Odysseos, A. Hidalgo-Sastre, S. Zhong, L. M. Staufer, M. Kroiss, D. Kabacaoglu, S. Lange, T. Engleitner, D. Hartmann, N. Huser, K. Steiger, R. M. Schmid, B. Holzmann and G. von Figura (2019). "The neuropeptide receptor subunit RAMP1 constrains the innate immune response during acute pancreatitis in mice." *Pancreatology* 19(4): 541-547.

Posterpräsentation:

G. Odysseos, L. Fahrenkrog-Petersen, A. Hidalgo-Sastre, S. Zhong, A. Dannemann, N. Hüser, D. Hartmann, B. Holzmann, K. Steiger, R.M. Schmid, G. von Figura (2018) Influence and role of RAMP1 on the innate immune response during acute pancreatitis. 26th United European Gastroenterology Week, Wien, Österreich.

8 Danksagung

Herrn PD Dr. Guido von Figura danke ich herzlich für die Überlassung dieses vielseitigen Themas, die Betreuung dieser Arbeit und Unterstützung auch über die Grenzen der Dissertation hinaus. Sie waren jederzeit für mich erreichbar, und durch die konstruktiven Gespräche und die zahlreichen Ratschläge habe ich viel von Ihnen gelernt. Ich freue mich sehr, Sie meinen Doktorvater nennen zu dürfen. Herzlichen Dank!

Frau Dr. med. Leonie S. Jochheim gilt mein herzlicher Dank für die sehr enge und gute Zusammenarbeit sowie jahrelange Betreuung.

Frau Dr. Ana Hidalgo-Sastre danke ich sehr für die intensive Zeit, das Betreuen und das Erlernen der verschiedenen Methoden. Ihr wertvolles Fachwissen in allen labortechnischen Belangen sowie Ihre experimentelle Unterstützung halfen mir sehr.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Norbert Hüser und PD Dr. Dr. Daniel Hartmann meinem Dank äußern, die meine Arbeit durch Ihre Gedanken geprägt haben.

Allen Mitarbeitern der II. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Dank an Suyang, Annett und Lina. Ich habe sehr gerne mit euch gearbeitet!

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie und Freunden, die mich während der ganzen Arbeit und des Studiums unterstützt und begleitet haben.