

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin
II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

Die Rolle von NF- κ B in der entzündungsassoziierten Fibrogenese in der experimentellen chronischen Pankreatitis

Elisabeth Anna Maria Margarete Treiber

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. H. Algül
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 02.02.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	8
1.1. Chronische Pankreatitis.....	8
1.1.1. Definition, Klinik und Epidemiologie.....	8
1.1.2. Ätiologie.....	9
1.1.2.1. Alkoholische chronische Pankreatitis (ACP).....	10
1.1.2.2. Hereditäre chronische Pankreatitis (HCP).....	10
1.1.2.3. Idiopathische chronische Pankreatitis (ICP).....	11
1.1.2.4. Ätiologie der CP: Zusammenfassung und Ausblick.....	12
1.1.3. Pathogenese der chronischen Pankreatitis.....	12
1.1.3.1. Physiologische Aktivierung der Pankreasenzyme.....	12
1.1.3.2. Autodigestion als pathophysiologisches Modell.....	14
1.1.3.3. Pathophysiologie der ACP.....	15
1.1.3.4. Entwicklung des Gewebeschadens.....	16
1.1.4. Die pankreatische Sternzelle (PSC).....	17
1.1.5. Pathogenetisches Modell der CP: Nekrose-Fibrose-Sequenz.....	18
1.2. NF- κ B (nuclear factor kappa B).....	19
1.2.1. NF- κ B-Aktivierung und Signalwege.....	19
1.2.2. Genetische Studien zu NF- κ B: Knockout-Modelle.....	21
1.2.3. Untersuchungen zur Rolle von NF- κ B in der Pankreatitis.....	22
2. Fragestellung.....	25
3. Methoden.....	26
3.1. Versuchstiere.....	26
3.2. Tierhaltung.....	27
3.3. Induktion einer chronischen Pankreatitis.....	28
3.4. Präparation und Materialgewinnung.....	29
3.5. Histologie.....	29
3.5.1. Paraffin-Schnitte.....	29
3.5.1.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	29
3.5.1.2. Masson-Trichrom-Färbung.....	30
3.5.1.3. Perjodsäure-Schiff-Färbung.....	30
3.5.2. Gefrierschnitte.....	30
3.5.2.1. Oil-Red-O-Färbung.....	30
3.6. Immunhistochemie.....	31
3.6.1. Allgemeines Protokoll.....	31
3.6.2. Morphometrie.....	33

3.6.3. Fluoreszenzfärbungen	33
3.6.3.1. Paraffinschnitte	33
3.6.3.2. Gefrierschnitte	34
3.7. Genotypisierung.....	35
3.7.1. DNA-Extraktion	35
3.7.2. Polymerasekettenreaktion	36
3.7.3. Gelelektrophorese	36
3.8. Quantitative PCR.....	37
3.8.1. RNA-Extraktion	37
3.8.2. cDNA-Synthese	38
3.8.3. PCR	38
3.8.4. Gelelektrophorese	39
3.9. Westernblotting.....	39
3.9.1. Proteinlyse und Proteinbestimmung	39
3.9.2. Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine und Membrantransfer	39
3.9.3. Proteindetektion.....	40
3.10. Statistik	40
4. Materialien und Geräte	41
4.1. Induktion einer CP	41
4.2. Histologie und Immunhistochemie	41
4.2.1. Antikörper	42
4.3. DNA-Extraktion	43
4.4. PCR	43
4.5. RT-PCR	44
4.6. Westernblotting.....	44
5. Ergebnisse	46
5.1. Induktion einer chronischen Pankreatitis	46
5.2. Deletion von RelA/p65.....	46
5.3. Verlust von azinärem Gewebe nach repetitiver Stimulation mit Caerulein...	48
5.4. Infiltration von Makrophagen	52
5.5. Fibrogenese nach Langzeitstimulation mit Caerulein	54
5.6. Mechanismen der vermehrten Fibrogenese	58
5.7. Regeneration von Azinuszellen nach Caerulein-Langzeitstimulation.....	61
5.8. Transdifferenzierung von azinären Zellen nach repetitiver Caerulein-	
Stimulation.....	65

5.9. Zusätzliche Deletion von RelA/p65 in myeloischen Zellen.....	68
6. Diskussion	75
7. Zusammenfassung	83
8. Literaturverzeichnis.....	85
Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACP	Alkoholische chronische Pankreatitis
AP	Akute Pankreatitis
AP1	Activation peptide 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BAFF	B-cell activating factor
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholezystokinin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CD40L	CD40-Ligand
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CF	Zystische Fibrose
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CK19	Zytokeratin 19
cm	Zentimeter
CP	Chronische Pankreatitis
Cre	Cyclization recombination
CTRC	Chymotrypsin C
Cy	Cyanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DDC	Diethyldithiocarbamat
d. h.	Das heißt

dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enzymatische Chemilumineszenz
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Einw.	Einwohner
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
et al.	Et alii
FAEE	Fettsäureethylester
Fr	Freitag
fw	Forward
G	Guanin
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GP2	Glykoprotein 2
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure-Puffer
HCl	Hydrogenchlorid
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HCP	Hereditäre chronische Pankreatitis
HPF	High power field (Hauptgesichtsfeld)
H ₂ O	Wasser
ICP	Idiopathische chronische Pankreatitis
IKK $\alpha/\beta/\gamma$	I κ B-Kinase alpha/beta/gamma
IKK2-CA	I κ B-Kinase 2, constitutivley active
IKK2-DN	I κ B-Kinase 2, dominant negative
IL-1/6	Interleukin 1/6
I κ B	Inhibitor of kappa B
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo-Dalton
LK	Lymphknoten
loxP	Locus of X-over P1
LPS	Lipopolysaccharid
LT α/β	Lymphotoxin α/β

mA	Milliampere
min	Minute
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
M.T.	Masson-Trichrom
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	NF-Kappa-B essential modulator
NF-κB	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear localization sequence
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PAP1	Pancreatitis associated protein 1
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCT	Pyrrolidindithiocarbamat
PDGF	Platelet derived growth factor
PRSS1	Protease, serine, 1 (trypsin 1)
PSC	Pankreatische Sternzelle
Ptf1a	Pancreas transcription factor 1 subunit alpha
re	Reverse
RHD	Rel homology domaine
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
s	Sekunde
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPINK 1	Serinproteinaseinhibitor Kazal Typ 1
T	Thymin
T _m	Denaturierungstemperatur
TAE	Tris-acetate-EDTA

TCP	Tropisch-kalzifizierende chronische Pankreatitis
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIMPS	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF-A- α	Tumor necrosis factor alpha
TRIS-HCl	Trishydroxymethylhydrochlorid
TSA	Tyramide signal amplification
U	Unit
u. a.	Und andere
UV	Ultraviolett
V	Volt
α -SMA	α -smooth muscle actin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1. Chronische Pankreatitis

1.1.1. Definition, Klinik und Epidemiologie

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine kontinuierliche oder in Schüben verlaufende entzündliche Erkrankung, die mit irreversiblen morphologischen Veränderungen der Bauchspeicheldrüse einhergeht und im Verlauf zu fortschreitender Funktionseinschränkung, sowohl des exokrinen als auch des endokrinen Kompartiments führen kann.^{112,113}

Morphologisches Substrat ist vor allem eine zuerst meist fokal auftretende Fibrosierung des Organs, die sich diffus oder segmental ausbreitet und im Verlauf der Erkrankung zu einem Ersatz der Azinus- und Inselzellen durch narbige Bindegewebsstränge führt. Außerdem finden sich Zeichen der chronischen Entzündung mit leukozytärer Infiltration, sowie Veränderungen der Gänge, mit Obstruktionen, Konkrementbildung und Dilatation, vor allem des Hauptganges.^{43,71}

Das hervorstechende klinische Merkmal der CP sind starke, andauernde oder intermittierende epigastrische Schmerzen, welche oft gürtelförmig ausstrahlen. Die CP kann bei einigen Patienten jedoch auch als schmerzlose Erkrankung auftreten. Weitere Symptome sind, bedingt durch die exokrine Insuffizienz, Zeichen der Maldigestion wie Steathorrö und Gewichtsverlust. In den späteren Stadien der Erkrankung kann sich außerdem als Ausdruck des endokrinen Funktionsverlusts ein Diabetes mellitus entwickeln (pankreopriver Diabetes mellitus, Typ IIIc), der durch die gleichzeitige Zerstörung von Insulin- und Glukagon-produzierenden Zellen oft schwer einstellbar ist.

Häufige Komplikationen der CP sind Pseudozysten und Choledochusstenosen durch Steine oder narbige Strikturen. Außerdem ist das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken bei Patienten mit CP signifikant erhöht.^{44,78,82,141}

Die Inzidenz der chronischen Pankreatitis beläuft sich in den Industrienationen auf etwa 1-14,4/100.000 Einw. pro Jahr, wobei Männer deutlich häufiger erkranken.^{31,73,75,93}

1.1.2. Ätiologie

Es sind zahlreiche ätiologische Risikofaktoren für die Entwicklung einer CP bekannt, der bedeutendste ist der langjährige schwere Alkoholabusus, der für 60-90% der Erkrankungen verantwortlich sein soll.^{41,93}

Einen Überblick über wichtige Formen der CP und ihrer ätiologischen Risikofaktoren gibt Tabelle 1.

Toxisch-metabolisch	Autoimmun
Alkohol	Isolierte Autoimmun-CP
Rauchen	Syndromische Autoimmun-CP
Hyperkalziämie	(Sjögren-Syndrom-assoziiert,
Hypertriglyzeridämie	CED-assoziiert, PBC-assoziiert)
Chronische Niereninsuffizienz	Obstruktiv
Medikamente	Gangobstruktionen (Tumor,
Toxine	Steine, Parasiten, Trauma)
"Idiopathisch"	Pancreas divisum
SPINK1-Mutationen	Sphinkter Oddi Dysfunktion?
CFTR-Mutationen	Tropisch- kalzifizierend
CTRC-Mutationen	SPINK1-Mutationen
Weitere Mutationen?	CTRC-Mutationen
Hereditär	Ernährung?
PRSS1-Mutationen	
CTRC-Mutationen	
Weitere Mutationen?	

Tabelle 1: Einteilung der CP nach ätiologischen Risikofaktoren (modifiziert nach Etemad *et al.* 2001)⁴⁴

In den weiteren Abschnitten soll nun näher auf die häufigsten Formen der CP (alkoholische, idiopathische und hereditäre) eingegangen werden.

1.1.2.1. Alkoholische chronische Pankreatitis (ACP)

Wie bereits erwähnt stellt die alkoholische chronische Pankreatitis (ACP) die häufigste Form der CP in den Industrieländern dar. Die Inzidenz der Erkrankung korreliert dabei mit der zugeführten Alkoholmenge und mit der Dauer des Konsums, wobei es jedoch keinen festen toxischen Grenzwert zu geben scheint.⁴² Es fällt auf, dass nur etwa 10% der schweren Alkoholiker im Verlauf eine CP entwickeln, was auf zusätzliche Faktoren hinweist, die das Auftreten der Erkrankung begünstigen. Vermutet werden als Einfluss- oder Trigger-Faktoren zum Beispiel protein- und fettreiche Ernährung, Nikotinabusus^{57,80} und die Art des zugeführten Alkohols. Auffällig ist, dass Afroamerikaner häufiger betroffen sind als Kaukasier⁷⁹, was möglicherweise durch Ernährungsgewohnheiten oder auch durch Genpolymorphismen im Alkoholstoffwechsel bedingt ist.³⁸

1.1.2.2. Hereditäre chronische Pankreatitis (HCP)

Unter der Bezeichnung hereditäre chronische Pankreatitis (HCP) wird klassischerweise eine autosomal-dominant vererbte CP mit einer Penetranz von 70-80% und stark variabler Ausprägung verstanden.^{6,121,125} Die Erkrankung beginnt üblicherweise bereits im Kindesalter und verläuft in den meisten Fällen eher milde, mit einer relativ späten Entwicklung von exokriner und/oder endokriner Insuffizienz.⁶⁸ Das kumulative Risiko zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms bei Patienten mit HCP allerdings wird mit bis zu 40% angegeben.⁷⁷ 1996 konnten Whitcomb und Mitarbeiter zeigen, dass Mutationen im Gen des kationischen Trypsinogens (*PRSS1*) zu einer hereditären CP führen können.¹³⁵ Am häufigsten treten dabei die Mutation R122H¹³⁵ und N29I⁴⁵ auf, welche zu gesteigerter Autoaktivierung des Proenzym und verminderter Degradation führen. Da bei einem Teil der HCP-Patienten keine Mutationen im *PRSS1*-Gen gefunden wurden, müssen hier weitere Mutationen in bisher unbekanntem Genabschnitten angenommen werden,¹⁰⁶ so zum Beispiel im *CTRC*-Gen, das für Chymotrypsin C kodiert. In diesem Gen wurden ebenfalls Mutationen gefunden, die mit einer HCP assoziiert sind.¹⁰⁷

1.1.2.3. Idiopathische chronische Pankreatitis (ICP)

Bei etwa 10-30% der Patienten mit CP kann weder ein exogener Auslöser identifiziert, noch eine positive Familienanamnese erhoben werden. Diese Fälle werden als idiopathisch klassifiziert, eine Bezeichnung die durch die Identifizierung verschiedener, mit der idiopathischen chronischen Pankreatitis (ICP) assoziierter, Genmutationen zunehmend in Frage gestellt wird. So konnten in den letzten Jahren bei Patienten mit ICP gehäuft Mutationen in den Genen für *SPINK1*, *PRSS1* und *CFTR* nachgewiesen werden.

SPINK1 codiert die Sequenz des Serinproteinase-Inhibitors Kazal Typ 1. Dieses Protein ist eine starke Antiproteinase, welche aktiviertes Trypsin zeitlich begrenzt hemmen kann. Die Assoziation von *SPINK1*-Mutationen mit der CP wurde erstmals bei Patienten mit ICP¹³⁸ beschrieben, konnte später jedoch auch bei Patienten mit tropisch-kalzifizierender CP²⁶ und ACP¹⁴⁰ gefunden werden.

Mutationen im kationischen Trypsinogen-Gen (*PRSS1*) sind als Ursache der HCP bekannt, vor allem die R122H- und die N29I-Mutation. Die A16V-Mutation des *PRSS1*-Gens hingegen findet sich ausschließlich bei Patienten ohne Familienanamnese und scheint daher mit der ICP assoziiert zu sein.¹³⁹

Des Weiteren wurde bei Patienten mit ICP eine Häufung von Mutationen im Gen für *CFTR* (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) gefunden.^{40,118} *CFTR* kodiert für ein auf epithelialen Zellen vorkommendes Transmembranprotein, das als cAMP-abhängiger Chloridkanal dient. Einige Mutationen im *CFTR*-Gen, von denen heute weit über 1000 verschiedene bekannt sind, können eine zystische Fibrose (CF) verursachen.^{8,104,119} Bei einem Teil der Patienten mit CF liegt neben der pulmonalen Manifestation der Erkrankung auch eine exokrine und endokrine Pankreasinsuffizienz vor, 1-2% der Erkrankten leiden unter einer CP.^{15,40,118,120}

Bei der ICP wurde bei etwa 20-30% der Betroffenen mindestens eine *CFTR*-Mutationen gefunden, wobei das Risiko bei mehreren *CFTR*-Mutationen deutlich erhöht ist, noch stärker allerdings bei einer Kombination von Mutationen im *PRSS1*- und im *SPINK1*-Gen.^{16,90} Welche der Mutationen oder Kombinationen von *CFTR*-Mutationen allerdings entscheidende Bedeutung zur Auslösung einer CP haben, ist bislang noch unklar, da die Zahl der bekannten Mutationen sehr hoch ist und bisher nur kleine Kollektive untersucht wurden.

In einer neueren Studie wurde eine Assoziation von Mutationen in der genomischen Sequenz von Chymotrypsin C (*CTRC*) und der ICP nachgewiesen werden.¹⁰⁷ Bei Patienten mit HCP sind Mutationen im *CTRC*-Gen im Vergleich zu *SPINK*- oder *CFTR*-Mutationen jedoch seltener.

1.1.2.4. Ätiologie der CP: Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt kann man davon ausgehen, dass es sich bei der Ätiologie der CP meist um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei dem bestimmte prädisponierende Faktoren wie die erwähnten Genmutationen im Zusammenspiel mit Umwelteinflüssen wie Alkoholkonsum zur Krankheitsmanifestation führen. Daher ist die gebräuchliche Einteilung der CP in idiopathisch, hereditär oder alkoholisch nicht mehr als ganz korrekt anzusehen, da bei allen Formen der CP bestimmte Genmutationen gehäuft anzutreffen sind, auch bei den bisher als „idiopathisch“ klassifizierten chronischen Pankreatitiden. Sogar bei der ACP wurde eine Häufung der N34S-Mutation des oben bereits erwähnten *SPINK1*-Gens¹³⁸ gefunden.

Erst vor wenigen Jahren wurden Mutationen des für Chymotrypsin C kodierenden *CTRC*-Gens entdeckt, die sowohl mit der ACP, als auch mit HCP, ICP und TCP assoziiert sind und alle zu einer verminderten Aktivität oder Sekretion des Trypsin-degradierenden Enzyms führen. Bei der ACP steht vor allem die R254W-Mutation im Vordergrund, die wahrscheinlich eine verminderte Produktion des Enzyms verursacht.¹⁰⁷ Da die erwähnten Mutationen aber auch im Zusammenhang mit Alkoholabusus nicht obligat krankheitsauslösend sind, muss davon ausgegangen werden, dass es weitere bisher unbekannte Prädispositionsfaktoren gibt, die noch zu identifizieren sind.

1.1.3. Pathogenese der chronischen Pankreatitis

1.1.3.1. Physiologische Aktivierung der Pankreasenzyme

Physiologischerweise werden die meisten der pankreatischen Enzyme für die Proteinverdauung von den Azinuszellen in inaktiver Form sezerniert. Diese

Zymogene sind intrazellulär in Granula verpackt und werden dann mittels Exozytose in das Ganglumen ausgeschüttet. Erst wenn die inaktiven Proenzyme in das Duodenum gelangt sind, werden sie dort in ihre aktive Form umgewandelt. Dies geschieht über eine Enzymkaskade, wobei zuerst Trypsinogen durch die im Dünndarm gebildete Enteropeptidase (Synonym Enterokinase) zu Trypsin gespalten wird. Trypsin wandelt daraufhin alle pankreatischen Proenzyme in ihre aktive Form um (*Abbildung 1*). Dadurch wird im gesunden Pankreas verhindert, dass die Verdauungsenzyme bereits intrazellulär oder intrapankreatisch aktiviert werden.¹⁰²

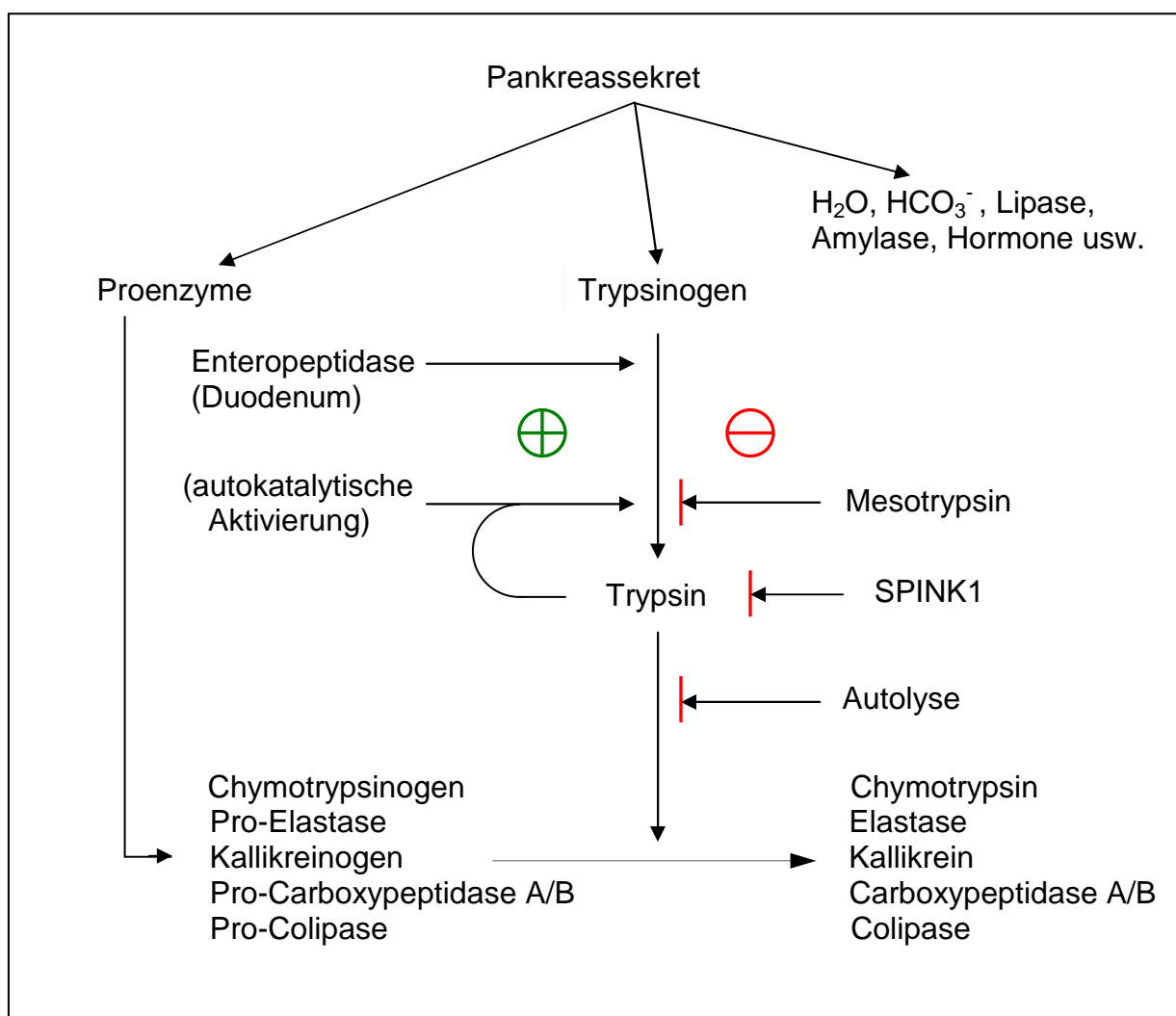


Abbildung 1: Physiologische Aktivierung der Pankreasenzyme (modifiziert nach Rinderknecht *et al.*-1986)¹⁰²

Zusätzlich existieren noch weitere Mechanismen, die die vorzeitige Aktivierung der Enzyme verhindern. So hemmen zum einen anionisches Trypsin und Mesotrypsin die

spontane, nicht-enzymatische Umwandlung von Trypsinogen in Trypsin, zum anderen kann der lösliche Trypsininhibitor SPINK1 durch Komplexbildung intrapankreatisch aktiviertes Trypsin temporär hemmen.^{20,67} Ein weiterer Sicherheitsmechanismus ist die autolytische Degradation von Trypsin, die die Trypsinaktivität zeitlich limitiert. Zusätzlich verhindern der durch die hohe Bicarbonatkonzentration des Pankreassekrets alkalische pH-Wert sowie die niedrige Kalziumkonzentration⁵⁰ eine nicht-enzymatische Aktivierung von Trypsinogen.¹⁰²

1.1.3.2. Autodigestion als pathophysiologisches Modell

Störungen der oben beschriebenen Schutzmechanismen können offensichtlich zu intrapankreatischer Enzymaktivierung und damit zu Schäden des Organs durch Autodigestion führen, die Hans Chiari schon 1896 als mögliches pathophysiologisches Konzept der Pankreatitis postulierte.³⁷ Diese These wird heute durch die verschiedenen Pankreatitis-assoziierten Genmutationen unterstützt. So führt zum Beispiel die bei der hereditären CP am häufigsten beobachtete Mutation R122H im kationischen Trypsinogen (*PRSS1*)¹³⁵ zu einer verstärkten Autoaktivierung von Trypsinogen zu Trypsin sowie zur erhöhten Stabilität des Enzyms bezüglich autolytischer Inaktivierung.¹¹⁰ Es ist anzunehmen, dass die mit der ICP assoziierten Mutationen des Trypsininhibitors *SPINK1* zu einer Funktionseinschränkung des Proteins führen, die zur Folge hat, dass intrapankreatisch aktiviertes Trypsin von *SPINK1* nicht mehr gehemmt werden kann,¹³⁸ funktionelle Daten liegen jedoch hierzu nicht vor.

Wie die *CFTR*-Mutationen zum klinischen Bild der CP führen, ist bisher nicht abschließend geklärt. Vermutet wird, dass es durch den verminderten Bicarbonatgehalt des Pankreassekrets und den dadurch erniedrigten pH-Wert, durch den die Autoaktivierung von Trypsinogen begünstigt wird, ebenfalls zu einer intrapankreatischen Enzymaktivierung kommt.⁴⁷

1.1.3.3. Pathophysiologie der ACP

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen der ACP sind trotz intensiver Bemühungen zu einem großen Teil noch immer unbekannt, da es bisher nicht gelungen ist, aussagekräftige Tiermodelle zu etablieren. Mit Alkohol gefütterte Tiere entwickeln spontan keine chronische Pankreatitis, was auf die unterschiedliche Suszeptibilität verschiedener Spezies hinweist. In einigen Tiermodellen konnten jedoch durch die Administration von Alkohol in Kombination mit anderen Substanzen, wie Cholezystokinin^{53,96} oder Lipopolysaccharid (LPS)¹³², CP-ähnliche Veränderungen erzeugt werden. Trotz des Fehlens eines umfassenden pathophysiologischen Konzepts der ACP sind durch zahlreiche *in-vitro* und *in-vivo*-Studien einige mögliche Mechanismen der alkoholbedingten Schädigung gezeigt worden. Eine in früheren Jahren favorisierte Theorie war die durch chronischen Alkoholkonsum ausgelöste Dysfunktion des Sphinkter Oddi, welche ähnlich wie bei der biliären akuten Pankreatitis durch die Abflussstörung des Pankreassekrets zu einer Entzündungsreaktion führt. Infolge der unklaren Datenlage jedoch wurde diese These durch die sogenannte "Ductal-Plug"-Theorie abgelöst. Diese geht von einer Formation von Protein-"plugs", aus, die die kleinen Gänge verstopfen und so zu Atrophie und Fibrose führen.¹¹¹ Diese Hypothese wird heute durch weitere Daten unterstützt, die eine erleichterte Bildung von Proteinpräzipitaten in den Ausführungsgängen durch erhöhte Enzymkonzentration des Pankreassekrets und der Zymogengranula,^{13,101} erhöhte Lithostatin synthese¹¹ und verminderten GP2 (Glykoprotein 2)-Gehalt⁹ bei chronischem Alkoholabusus belegen.

Als weitere für die Pathogenese der ACP wichtige Ursache wurde außerdem eine erhöhte Fragilität von Zymogengranula und Lysosomen festgestellt,^{54,55,136} die zusammen mit einem erhöhten Proteingehalt des Pankreassekrets^{103,109} zu einer intrazellulären Aktivierung der Verdauungsenzyme und damit zur Selbstverdauung führen könnten.

Ähnlich wie die Hepatozyten scheinen auch Azinuszellen in der Lage zu sein, Alkohol zu metabolisieren.¹³⁷ Dabei entstehen beim oxidativen Stoffwechsel freie Radikale, welche zu oxidativem Stress führen und auf diese Weise zytotoxisch sind.⁷⁴ Die beim nicht-oxidativen Alkoholstoffwechsel entstehenden Metaboliten wie Fettsäureethylester (FAEEs) und Acetaldehyd scheinen ebenso toxische Effekte auf die Azinuszelle zu haben.¹³⁴

1.1.3.4. Entwicklung des Gewebeschadens

Lange Zeit galt vor allem die ACP als eine primär chronische Erkrankung, die akut exazerbieren kann. Zum einen wurde diese Theorie unterstützt durch die Tatsache, dass manche Patienten schon bei der ersten Episode einer Pankreatitis radiologische und histologische Veränderungen im Sinne einer CP aufweisen,^{58,126} zum anderen wurden im Autopsiematerial von Patienten mit chronischem Alkoholabusus fibrotische Veränderungen der Bauchspeicheldrüse gefunden, auch ohne dass vorausgegangene akute Pankreatitiden bekannt waren.⁹⁸

Heute wird das sogenannte Nekrose-Fibrose-Konzept favorisiert. Dabei wird die CP als eine Folge von akuten Episoden von Entzündung und Nekrosen angesehen, die zu irreversiblen Schäden und zur Fibrose führen (*Abbildung 2*).^{71,141}

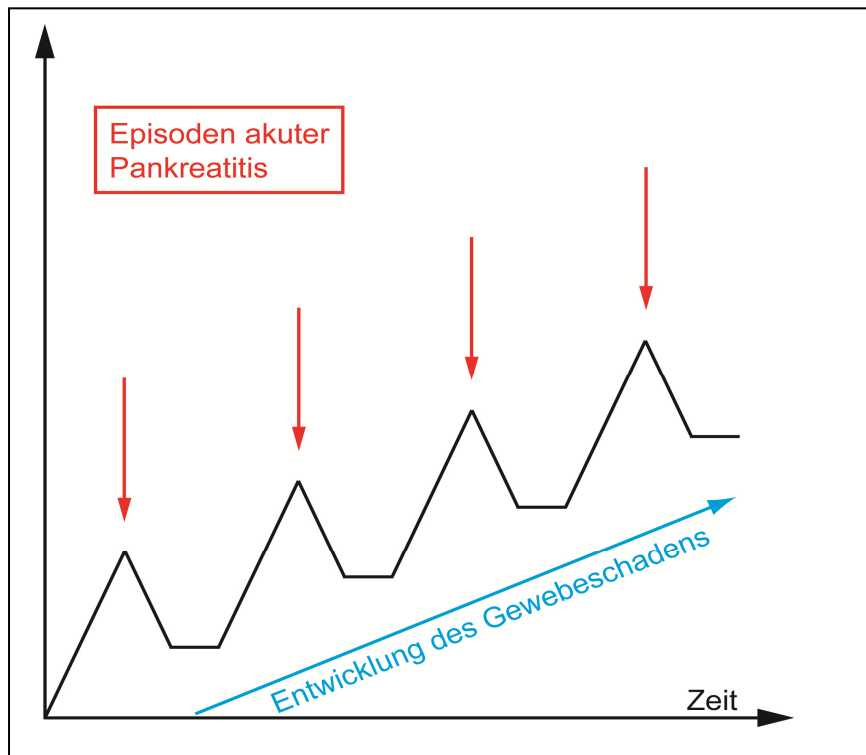


Abbildung 2: Entwicklung des Gewebeschadens (modifiziert nach Witt *et al.* 2007)¹⁴¹

Dieses Konzept wird von klinischen Langzeitstudien untermauert, in denen gezeigt wurde, dass die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer CP mit der Häufigkeit der akuten Episoden zunimmt^{7,85} und von neueren Tiermodellen, bei denen durch wiederholte Induktion von akuten Entzündungen eine pankreatische Fibrose ausgelöst werden konnte. So zum Beispiel durch wiederholte Gaben des

Superoxiddismutaseinhibitors Diethyldithiocarbamat (DDC)⁸³ oder supraphysiologischer Mengen von Cholezystokinin (CCK) alleine⁸⁸ oder in Kombination mit anderen Verfahren, wie Alkohol-^{53,96} oder LPS- Administration.¹³²

1.1.4. Die pankreatische Sternzelle (PSC)

Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der CP und der pankreatischen Fibrose, wird heute der pankreatischen Sternzelle (PSC) zugeschrieben. Ihren Namen erhielt die von Bachem *et al.* 1998 charakterisierte¹⁷ PSC in Anlehnung an die hepatische Sternzelle (HSC, auch Kupffersche Sternzelle genannt), mit der sie morphologisch wie biochemisch Ähnlichkeiten aufweist. Ruhende PSCs speichern, ebenso wie die HSCs, Fett und Retinoide, sind vor allem interlobulär oder interazinär lokalisiert und besitzen lange Zytoplasmaausläufer mit denen sie die Azini umgeben. In den PSCs können verschiedene Intermediärfilament-Proteine wie Desmin, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), Vimentin oder Nestin nachgewiesen werden. Verschiedene pathologische Umstände können zur Aktivierung von PSCs führen. Diese Aktivierung kann aber auch in isolierten PSCs in der Zellkultur erzeugt werden. Aktivierte PSCs sind vor allem charakterisiert durch die Expression von α -SMA (*alpha smooth muscle actin*) und ähneln Myofibroblasten. In aktiviertem Zustand beginnen die Zellen zu proliferieren und produzieren Extrazellulärmatrix (ECM)-Proteine wie Kollagen I und III, sowie Fibronectin.¹⁷

Über die Expression von ECM-degradierenden Metalloproteinasen (MMPs, *matrix metalloproteinase*) und ihren Inhibitoren, den TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinase*), regeln sie die Deposition von ECM. PSCs werden durch bei Entzündungen und Nekrose freigesetzte Zytokine wie Interleukin1 (IL-1), IL-6, TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), PDGF (*platelet derived growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor beta*),⁶¹ sowie Angiotensin II¹⁰⁰ und Endothelin-1⁷⁰ aktiviert. PSCs können diese Aktivierung durch autokrine Stimulation aufrechterhalten. Das Gleichgewicht zwischen MMPS und TIMPs wird durch aktivierte PSCs zugunsten der TIMPs verschoben, was zur erhöhten ECM-Deposition beiträgt.⁹⁷

1.1.5. Pathogenetisches Modell der CP: Nekrose-Fibrose-Sequenz

Das heute allgemein akzeptierte pathogenetische Modell der chronischen Pankreatitis stellt sich aufgrund klinischer und experimenteller Daten wie folgt dar: Verschiedene Faktoren wie die Autodigestion durch intrapankreatische Trypsinaktivierung oder die toxische Wirkung durch Ethanol und seine Stoffwechselmetaboliten führen zur Nekrose der Azinuszellen. Durch diese primär sterilen Nekrosen werden Entzündungszellen in das Pankreasparenchym rekrutiert. Die infiltrierenden Zellen, insbesondere Makrophagen, sezernieren dann Wachstumsfaktoren wie TGF- β , PDGF u.a. sowie proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6), welche in der Lage sind, ruhende PSCs in ihre aktive Form zu transformieren. Wiederholte Episoden von Nekrosebildung, mit den dabei freigesetzten Entzündungsmediatoren, führen zu einer fortdauernden Aktivierung der PSCs, die diese durch autokrine Stimulation aufrechterhalten können. Durch die dauerhaft aktivierten PSCs kommt es zu einem veränderten Gleichgewicht zwischen ECM-Synthese und Degradation mit Überwiegen der Produktion und damit zur Fibrose des Organs.⁷¹ (Abbildung 3)

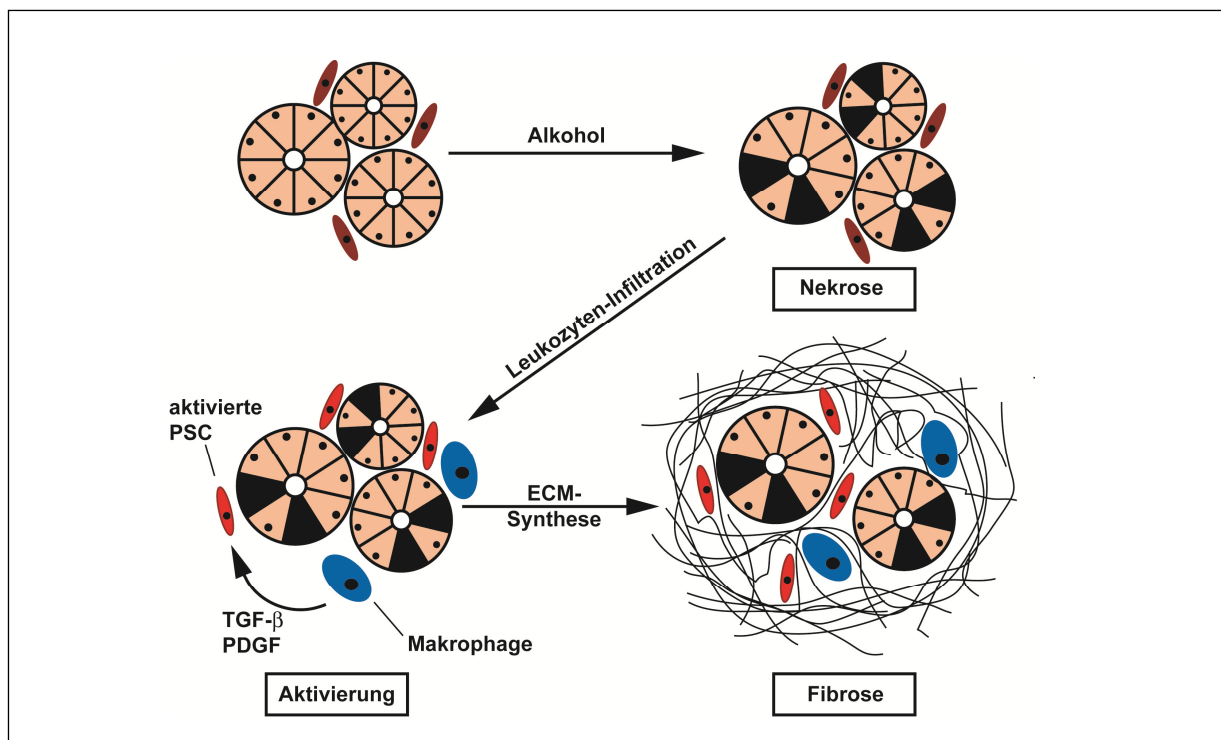


Abbildung 3: Nekrose-Fibrose-Sequenz (modifiziert nach Treiber *et al.* 2008)¹²⁸

1.2. NF-κB (nuclear factor kappa B)

Die Familie der NF-κB (*nuclear factor kappa B*)-Transkriptionsfaktoren wurden 1986 entdeckt¹¹⁷ und zuerst für spezifisch in B-Zellen exprimierte Proteine gehalten. Bald stellte man jedoch fest, dass sie im Zytoplasma fast jeder Art von Zellen vorkommen, wo sie physiologischerweise in inaktiver Form vorliegen und erst durch Stimulation in den Zellkern gelangen, um dort die Expression der entsprechenden Zielgene zu regulieren. Inzwischen kennt man eine Vielzahl an Zielgenen, bei deren Transkription Faktoren der NF-κB-Familie eine Rolle spielen. Dazu gehören Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren sowie andere Transkriptions- und Wachstumsfaktoren. Außerdem spielt NF-κB eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzykluses und scheint antiapoptotische Wirkung zu haben.³⁶ Damit sind die NF-κB-Proteine zu einer der am meisten beforschten Gruppen von Transkriptionsfaktoren, sowohl im Zusammenhang mit Entzündungs- und Immunprozessen als auch in der Onkologie geworden.

1.2.1. NF-κB-Aktivierung und Signalwege

Die Gruppe der NF-κB-Transkriptionsfaktoren setzt sich aus fünf verschiedenen Proteinen zusammen, die alle strukturelle Ähnlichkeit haben. Zur NF-κB-Familie gehören Rel (auch c-Rel genannt), RelA (auch p65 oder NF-κB3), RelB, NF-κB1 (auch p50) und NF-κB2 (auch p52). Alle Proteine besitzen eine sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD), die zur Dimerisierung, DNA-Bindung und Regulation dient. Am C-terminalen Ende verfügt die RHD über eine Kern-Translokationssequenz (NLS, *nuclear localization sequence*). Die NLS ist in unstimulierten Zellen durch die Bindung von IκB-Proteinen (*Inhibitor of NF-κB*) blockiert. Die IκB-Proteine enthalten alle sechs bis sieben Ankyrin-Wiederholungen, ein Helix-Turn-Helix-Strukturmotiv, die mit der RHD interagieren und die NLS maskieren können. Dies führt dazu, dass NF-κB nicht in den Zellkern translozieren kann und damit inaktiv bleibt.^{64,122}

Die verschiedenen Rel-Proteine kommen in dimerisierter Form in unterschiedlichen Kombinationen vor, das p65:p50-Dimer, das als erstes identifiziert wurde, ist das häufigste. p50 (NF-κB1) und p52 (NF-κB2) müssen erst aus ihren Vorläuferproteinen

p105 bzw. p100 abgespalten werden. Diese Vorläuferproteine enthalten wie alle NF- κ B-Proteine eine RHD mit NLS, die aber an ihrem C-terminalen Ende direkt in eine I κ B-Domäne übergeht. So können diese NF- κ B-Proteine durch intramolekulare Interaktion von ihrem I κ B-Ende inhibiert werden und verbleiben im Zytoplasma, wo sie allerdings trotzdem mit anderen Rel-Proteinen dimerisieren können. Wenn dann p105 konstitutiv (nicht-reguliert) oder p100 signal-abhängig (reguliert) gespalten wird, werden Dimere, die die p50 bzw. p52 Untereinheit enthalten, freigesetzt und können so in den Zellkern translozieren. p100 bzw. p52 dimerisiert bevorzugt mit RelB, während p105 bzw. p50 keine Bevorzugung eines speziellen Rel-Proteins zeigt.^{64,65,122}

Zur Aktivierung der meisten NF- κ B-Dimere wird das die NLS maskierende I κ B von der IKK (I κ B-Kinase) phosphoryliert, darauf folgt die Ubiquitinmarkierung und der Abbau von I κ B durch das 26S-Proteasom. Die NLS liegt nun frei und das Rel-Dimer kann in den Kern translozieren, wo es die Transkription verschiedener Zielgene reguliert. Die klassische (kanonische) Aktivierung erfolgt durch Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel TNF- α und IL-1, bakterielle Produkte wie LPS oder einer Vielzahl anderer Stoffe. I κ B wird dabei von einem aus den drei Untereinheiten IKK α , IKK β und IKK γ /NEMO bestehenden Komplex phosphoryliert und daraufhin degradiert. Der alternative (nicht-kanonische) Aktivierungsweg erfolgt über die Rezeptorbindung anderer Proteine, wie zum Beispiel LT α/β (Lymphotoxin α/β), CD40-Ligand oder BAFF (*B-cell activating factor*), woraufhin ein Homodimer aus IKK α selektiv p100/RelB Komplexe prozessiert und p52/RelB-Dimere entstehen, die in den Zellkern gelangen können. Während der klassische Aktivierungsweg vorwiegend der Regulation der angeborenen Immunabwehr sowie der Apoptose dient, ist der alternative Signalweg bei der Organentwicklung lymphoider Organe und der B-Zell Reifung (humorale Immunität) entscheidend. Ein dritter Aktivierungsweg ist IKK-unabhängig und kann zum Beispiel durch UV-Strahlung in Gang gesetzt werden.^{62,64,66}

Die in den Zellkern translozierten NF- κ B-Dimere binden an κ B-Sequenzen der DNA, die aus 9-10 Basenpaaren bestehen und Teil der Promotorregion der entsprechenden Zielgene sind. Die verschiedenen Dimere besitzen unterschiedliche Bindungsaffinitäten und können die Expression bestimmter Gene aktivieren. Die Transkription anderer Gene wird jedoch durch bestimmte NF- κ B-Dimere supprimiert, dabei scheint es sich vor allem um p50-Homodimere zu handeln. (*Abbildung 4*)

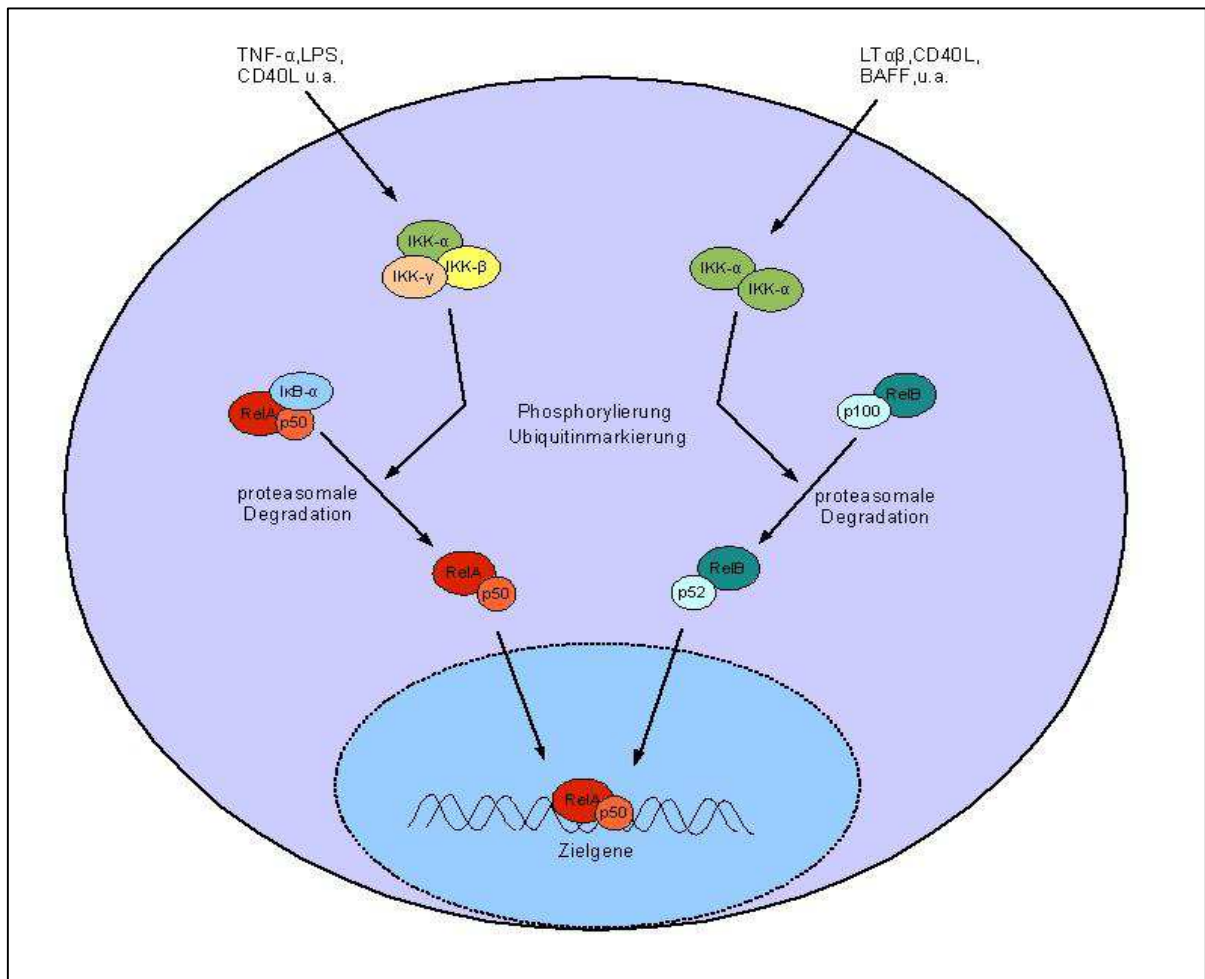


Abbildung 4: Schematische Darstellung der NF-κB Signalwege (modifiziert nach Karin *et al.* 2004)⁶⁴

Die Aktivierung von NF-κB ist ein zeitlich begrenzter Prozess, der in den meisten Zellen nur etwa 30-60min andauert. Um eine Daueraktivierung zu verhindern gibt es Rückkopplungsmechanismen, die eine Down-Regulierung von NF-κB bewirken. Da eines der NF-κB-Zielgene IκBα ist, kann das neusynthetisierte Inhibitor-Protein, nachdem es in den Zellkern gelangt ist, das Abdissoziieren von NF-κB von der DNA bewirken, worauf dieses in inaktiver Form wieder aus dem Zellkern ins Zytoplasma gelangt.^{22,49,56,64,65,84,122}

1.2.2. Genetische Studien zu NF-κB: Knockout-Modelle

Um die genaue Rolle der unterschiedlichen Rel-Proteine und ihrer Inhibitoren zu untersuchen, wurden Mausmodelle mit genetischen Knockouts der einzelnen

Proteine entwickelt. Die Defizienz eines der Proteine führt jeweils zu unterschiedlichen Phänotypen, wobei häufig Störungen des Immunsystems beobachtet wurden. Einige Phänotypen sind letal, so die Knockouts für IKK β und IKK γ /NEMO^{76,108}, ebenso wie der RelA-Knockout²⁴. Das Fehlen eines dieser Proteine führt zur Apoptose von Hepatozyten während der Embryonalentwicklung und zum intrauterinen Tod. Die Defizienzen anderer NF- κ B-Proteine haben weniger schwerwiegende Auswirkungen, die zumeist das Immunsystem betreffen. So hat die Deletion von c-Rel eine Störung der B- und T-Zellaktivierung zur Folge⁷², das Fehlen von RelB führt zu einer abnormalen B-Zell-Antwort und damit zu gestörter Immunität.³⁴ p52-defiziente Mäuse zeigen Veränderungen der T-Zellfunktion, sowie eine abnormale Milz- und Lymphknotenarchitektur³⁵. Bei Deletion von I κ B α ²³ wurde eine entzündliche Dermatitis beobachtet, die ebenso wie der Knockout von IKK α ⁵⁹, der Hautdefekte zur Folge hat, zum Tod der Versuchstiere in der frühen Neonatalphase führt.

Alle diese Studien weisen auf die wichtige Rolle von NF- κ B vor allem auch für eine intakte Immunfunktion hin. Klassische Knockout-Modelle mit kompletter Deletion eines Proteins sind jedoch in zweierlei Hinsicht problematisch. Zum einen können intrauterin letale Phänotypen nicht weiter untersucht werden. Andererseits können mit der kompletten Deletion eines Proteins kaum Aussagen über gewebs- und krankheitsspezifische Wirkungen des jeweiligen Proteins gemacht werden. Um letale Mausmodelle zu umgehen und um die gewebespezifische Funktion einzelner Proteine besser analysieren zu können wurden daher konditionale Knockout-Konstrukte entwickelt, welche weiter unten näher beschrieben werden.

1.2.3. Untersuchungen zur Rolle von NF- κ B in der Pankreatitis

Die Rolle der NF- κ B-Proteine wurde schon früh in verschiedenen Modellen akuter oder chronisch entzündlicher Erkrankungen untersucht. So gibt es auch eine Vielzahl von Arbeiten über die Rolle von NF- κ B in der akuten Pankreatitis. In verschiedenen Mausmodellen wurde eine NF- κ B-Aktivierung nach Induktion einer akuten Pankreatitis mit Caerulein,^{52,124} Taurocholat¹²⁹ oder Arginin⁹⁹ nachgewiesen. Die Aktivierung zeigt einen zweigipfligen Verlauf. Die frühe Phase hat ihren Höhepunkt bereits etwa 30 min nach Stimulation, der zweite Gipfel zeigt sich nach 3-6 Stunden.

Die Degradation von I κ B α setzt bereits kurz nach der Stimulation ein, nach ca. 6 Stunden ist der Proteingehalt wieder auf dem Ausgangsniveau. Nach gängigem Modell führt die Aktivierung von NF- κ B zu einer erhöhten Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, die die Migration von Entzündungszellen ins Gewebe bewirken. Diese Zellen scheinen durch die Ausschüttung von TNF- α für den zweiten Gipfel der NF- κ B-Aktivierung mitverantwortlich zu sein; es konnte gezeigt werden, dass die zweite Aktivierungswelle durch TNF- α -Inhibition unterbunden werden kann.⁵²

Die Frage ob die Aktivierung von NF- κ B bei der akuten Pankreatitis für das Pankreasgewebe eine protektive Rolle hat oder aber für die deletären Effekte im Verlauf der Entzündung ursächlich ist, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. In früheren Modellen wurde die Induktion einer akuten Pankreatitis in Kombination mit der Gabe von NF- κ B-Inhibitoren wie N-Acetylcystein (NAC) oder Pyrrolidindithiocarbamat (PDCT) durchgeführt. Steinle *et al.* zeigten in einem Modell Caerulein-induzierter akuter Pankreatitis einen schwereren Verlauf bei Mäusen, die mit PDCT oder NAC vorbehandelt waren.¹²⁴ Im Gegensatz dazu konnten Gukovsky *et al.*, ebenfalls in einem Modell Caerulein-induzierter Pankreatitis, eine Verbesserung der Serumparameter nach NAC-Behandlung nachweisen⁵². Satoh *et al.*, ebenso wie Rakonczay *et al.* beschrieben einen milderen Verlauf von Taurocholat- bzw. Arginin-induzierter Pankreatitis durch die Gabe von PDCT.^{99,114} Ursache dieser widersprüchlichen Ergebnisse sind möglicherweise die geringe Spezifität der pharmakologischen NF- κ B-Inhibitoren und deren zusätzliche Wirkung auf andere Signalwege.

Auch Studien, die mit klassischen, d.h. kompletten Knockouts arbeiteten, liegen vor. So beschrieb Altavilla *et al.* ein Mausmodell zur Caerulein-induzierten Pankreatitis an p105-Knockout-Mäusen. Hierbei wurde ebenfalls ein milderer Verlauf der Pankreatitis bei den Knockout-Tieren festgestellt⁵. Solche Modelle sind allerdings, aufgrund der teilweise letalen Phänotypen nicht bei allen Proteinen durchführbar, und auch nur begrenzt aussagekräftig, da NF- κ B im Verlauf der Pankreatitis in verschiedenen Gewebs- bzw. Zelltypen aktiviert wird und bei einem klassischen Knockout nicht zwischen lokalen und systemischen Auswirkungen der NF- κ B-Aktivierung unterschieden werden kann.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden neue genetische Ansätze entwickelt, die eine genauere, gewebespezifische Untersuchung der NF- κ B-Signalwege und Effekte

zulassen. In zwei neueren Modellen zur Wirkung von IKK, wurden transgene Mäuse generiert, die eine pankreasspezifische mit Doxycyclin induzierbare Suppression von IKK2 (IKK2-DN/*dominant negativ*) oder eine Daueraktivierung von IKK2 (IKK2-CA/*constitutively active*) aufwiesen. Bei den Tieren mit IKK2-CA wurde, nach Aktivierung mit Doxycyclin, eine sich spontan entwickelnde akute Pankreatitis beobachtet, die auch mit pankreatischer Fibrose einherging. Tiere mit IKK2-DN hingegen zeigten nach der Induktion einer akuten Pankreatitis mit Caerulein einen milderen Verlauf als die Kontrollen^{2,21}. Dieses Modell spricht zwar für die entzündungsverstärkende Rolle von NF-κB, weist aber einige Schwächen auf, da zum einen mit transgenen Tieren gearbeitet wurde, deren Phänotyp immer auch durch die Insertion des Konstrukts an einer unbekanntem Stelle im Genom beeinflusst sein kann. Zum anderen ist die Expression des transgenen Produkts innerhalb eines Organs sowie unter den einzelnen Versuchstieren nicht immer homogen.

Ein neueres Modell stellt der konditionale Knockout von RelA/p65 mit der *Cre/loxP*-Strategie dar³. Damit konnte RelA/p65 durch die, unter dem *ptf1a*-Promoter exprimierte, Cre-Rekombinase pankreasspezifisch deletiert werden. An diesem Mausmodell wurden die Auswirkungen einer Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis untersucht. Hierbei wurde eine protektive Rolle von azinär lokalisiertem RelA/p65 während der Pankreatitis nachgewiesen. Sowohl der pankreatische Schaden als auch die systemischen Komplikationen waren bei RelA/p65-defizienten Tieren wesentlich stärker ausgeprägt. Während die Wildtyp-Mäuse lediglich morphologische und biochemische Zeichen einer milden ödematösen akuten Pankreatitis aufwiesen, hatten RelA/p65-defiziente Mäuse eine schwere nekrotisierende Verlaufsform mit systemischer Beteiligung von Leber und Lunge. Diese Effekte wurden vor allem auf die Down-Regulierung von PAP1 (*pancreatitis associated protein 1*), einem akute Phase Protein, bei den Knockout-Mäusen zurückgeführt. PAP1 scheint dabei sowohl antiapoptotische als auch anti-nekrotische Wirkung zu haben. Durch die fehlende Induktion von PAP1 in RelA/p65-defizienten Mäusen bleibt NF-κB in Entzündungszellen länger aktiviert. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf die zellspezifische Wirkung von NF-κB. So könnte die Aktivierung in Entzündungszellen einen schädigenden Effekt, in Azinuszellen aber einen protektiven Effekt haben³.

2. Fragestellung

Die Rolle von NF- κ B in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündung ist in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen geworden. Zum Thema der NF- κ B-Aktivierung und Wirkung in der akuten Pankreatitis (AP) liegen inzwischen mehrere Studien vor.

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit über Caerulein-induzierte AP bei pankreasspezifischem RelA/p65-Knockout legt die pankreas-protective Rolle von NF- κ B nahe und spricht somit gegen eine pharmakologische Inhibition als möglichen therapeutischen Ansatz.³ Die Rolle von NF- κ B in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis (CP) ist bisher nicht bekannt.

In der vorliegenden Studie soll nun die Wirkung von NF- κ B in der CP untersucht werden. Die CP wurde durch repetitive Induktion von akuten Pankreatitiden mit Caerulein über 6 Wochen induziert, um dann die Auswirkungen an RelA/p65-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu analysieren. Ziel der Untersuchung war es, die Wirkung von RelA/p65 in verschiedenen bei der CP beteiligten Zelltypen zu definieren. In erster Linie sollte die Wirkung von RelA/p65 während der CP in Zellen des Pankreas untersucht werden. Hierzu wurden Mäuse mit einem konditionalen, pankreasspezifischen Knockout von RelA/p65 verwendet. In einem weiteren Ansatz sollte die Auswirkung der zusätzlichen Defizienz von RelA/p65 in myeloiden Zellen während der CP untersucht werden. Dazu wurde RelA/p65 auch in myeloiden Zellen funktionell inaktiviert. Im Mittelpunkt des Interesses standen morphologische und biochemische Veränderungen, welche typischerweise bei der CP beobachtet werden: Fibrose, Infiltration, Proliferation und Regeneration.

3. Methoden

3.1. Versuchstiere

Da der klassische homozygote RelA/p65-Knockout bei Versuchsmäusen durch Apoptose der Leber bereits in der Embryonalphase zum Tod führt²³ sind in diesem Modell keine Aussagen zur Rolle von RelA/p65 bei chronischer Pankreatitis möglich. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie ein konditionaler Knockout mittels Cre/loxP-Technologie verwendet. Hierbei werden vor und hinter die entscheidenden kodierenden Abschnitte des zu deletierenden Genes, mittels homologer Rekombination, loxP-sites eingebracht. loxP-sites kommen im eukaryoten Genom natürlicherweise nicht vor und haben per se keinen Einfluss auf die Genexpression. In einem weiteren Ansatz wird, ebenfalls mittels homologer Rekombination, eine knock-in Maus generiert, welche unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese erkennt spezifisch loxP-sites; bei Vorhandensein zweier loxP-sites sowie der Cre-Rekombinase kommt es zur Rekombination und somit zur Deletion des zwischen den loxP-sites liegenden Genabschnittes.

Dadurch wird das entsprechende Gen nur in Geweben mit Cre-Expression deletiert und somit Gewebespezifität erreicht²⁸.

Die Cre-Rekombinase wird im vorliegenden Modell unter dem *Ptf1a*-Promoter anstelle der kodierenden Sequenz von Exon1 exprimiert. PTF1 ist ein basisches Helix-Loop-Helix-Protein, das aus drei Untereinheiten besteht. Die p48-Untereinheit wird nur im Pankreas exprimiert und ist entscheidend für die Entwicklung vor allem des exokrinen Kompartiments. Da der homozygote Phänotyp von *Ptf1a*^{Cre(ex1)/Cre(ex1)} – Mäusen letal ist⁸⁷, wurden heterozygote Tiere (*Ptf1a*^{+Cre(ex1)}) verwendet.

Im RelA/p65-kodierenden Genabschnitt wurden in den Introns 6 und 10 loxP-Sites inseriert, so dass im rekombinierten Allel die Exons 7 bis 10 deletiert sind, die die funktionell entscheidenden Proteinstrukturen NLS (*nuclear localization site*) und RHD (*Rel homology domain*) enthalten. Dies führt dazu, dass RelA/p65 nicht in den Kern translozieren kann, sondern im Zytoplasma verbleibt und somit funktionell inaktiv ist³. Um Mäuse mit pankreasspezifischem Knockout für RelA/p65 (*rela*^{Δ/Δ}) zu erhalten wurden *Ptf1a*^{+Cre(ex1)}-Tiere mit *rela*^{lox/lox}-Tieren gekreuzt (Abbildung 5). Als Kontrollen wurden *rela*^{lox/lox}-Mäuse ohne Cre-Rekombinase verwendet.

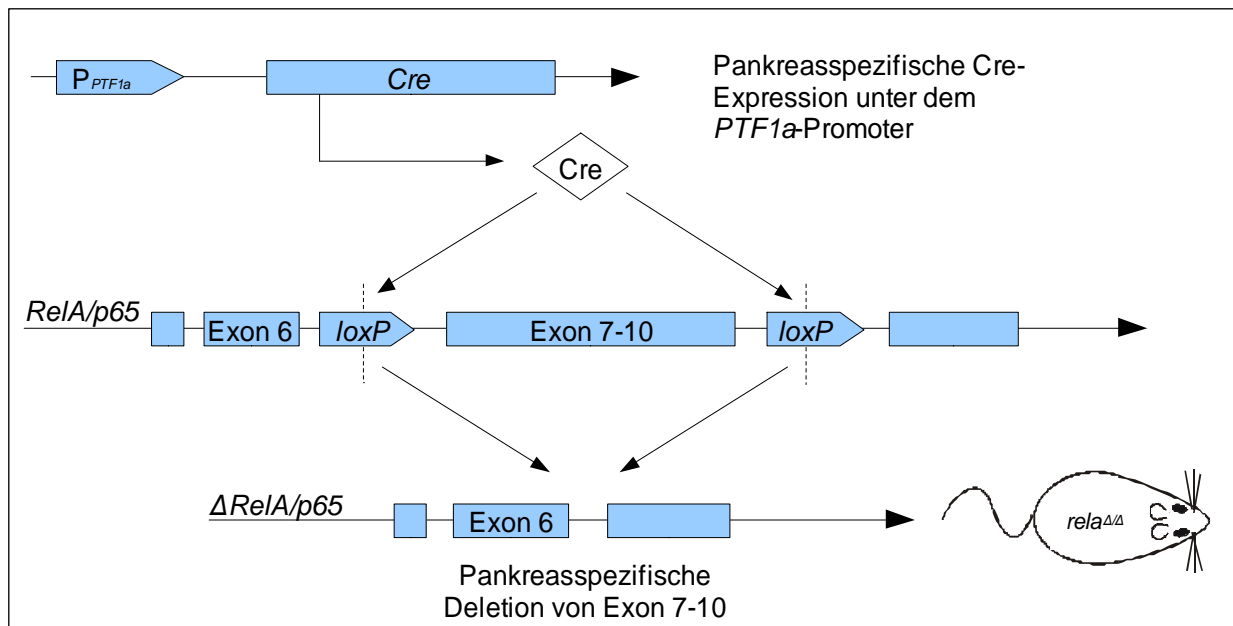


Abbildung 5: Schema zur Generierung von Versuchstieren mit pankreasspezifischem Knockout von *RelA/p65* mit der *Cre/loxP*-Strategie.

Um einen Knockout von *RelA/p65* auch in myeloiden Zellen zu erhalten wurde ein zusätzliches Allel eingekreuzt. Bei diesem Konstrukt wird die *Cre*-Rekombinase durch den *Lysozym M*-Promoter kontrolliert, was zu einer Expression (und damit Deletion von geflochten Genen) in Makrophagen und Granulozyten führt, außerdem zu einer partiellen Expression (bzw. Deletion von *RelA/p65*) in CD11c+ dendritischen Zellen der Milz, nicht jedoch in B- und T-Zellen (*rela $\Delta\Delta$ mye*).³⁹

Alle Mauslinien wurden mindestens sieben Generation bevor sie für die Experimente verwendet wurden auf einen C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt.

3.2. Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (Thoren-Caging-System). Bis zu 6 Mäuse wurden dabei in einem Mäusekäfig (US-Größe 9 (Höhe: 143 mm, Breite: 197 mm, Tiefe: 308 mm) für 6 Mäuse) und bis zu 10 Mäuse in einem Rattenkäfig (US-Größe 4 (Höhe: 184 mm, Breite: 308 mm, Tiefe: 308 mm) für 3 Ratten) gehalten. Futter (Autoklaviertes Mäusefutter Fa. Altromin) und Wasser (Trinkwasser bei Wechsel der Tränkflaschen 2 x pro Woche) erhielten die Tiere ad libidum. Spezielles Holzgranulat diente als

Einstreu bei einmaligem Wechsel pro Woche. Die Räume wurden speziell als Tierhaltungsräume konzipiert (personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase).

3.3. Induktion einer chronischen Pankreatitis

Für die Experimente wurden Geschwistertiere mit oder ohne Cre-Expression verwendet. Die Geschlechtsverteilung war in allen Gruppen gleich. Zu Beginn des Experiments waren die Tiere zwischen 2,5 und 3,5 Monate alt. Zur Induktion einer chronischen Pankreatitis wurden den Versuchstieren über einen Zeitraum von sechs Wochen supramaximale Dosen von Caerulein intraperitoneal injiziert. Innerhalb dieser 6 Wochen wurden den Versuchstiere dreimal wöchentlich jeweils 6 Injektionen a 50 mg/kg KG Caerulein (gelöst in NaCl 0,9%) appliziert, insgesamt also 108 Injektionen pro Maus (*Abbildung 6*).

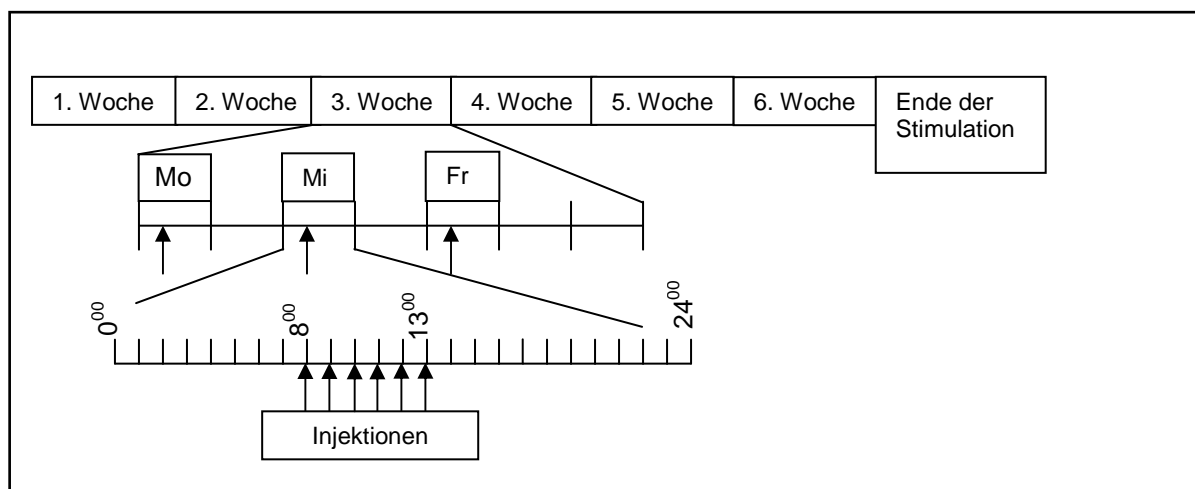


Abbildung 6: Spritzschema zur Induktion einer CP

Caerulein ist ein künstlich hergestelltes Cholezystokinin (CCK)-Analogon, das in physiologischen Dosen die Ausschüttung der pankreatischen Verdauungsenzyme bewirkt. In supramaximaler Dosis verursacht CCK durch Desintegration von zytoskelettalen Strukturen die Hemmung der Exozytose von Zymogengranula und bewirkt so eine intrazelluläre Aktivierung der Enzyme. Dies führt zur Autodigestion und zur Auslösung einer Pankreatitis. Als Mausmodell wurde die Induktion einer

akuten Pankreatitis mit Caerulein 1979 von Adler *et al.* erstmalig beschrieben.¹ Die Auslösung CP-ähnlicher Veränderungen bei Mäusen durch repetitive Stimulationen mit Caerulein über einen Zeitraum von mehreren Wochen wurde 2000 von Neuschwander-Tetri *et al.* Nachgewiesen.⁸⁸

3.4. Präparation und Materialgewinnung

Eine bzw. sechs Wochen nach der letzten Injektion wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran euthanasiert und das Körpergewicht bestimmt. Nach Freilegung der Bauch- und Thoraxhöhle erfolgte zuerst die Entnahme von Blut (V. cava inf.). Anschließend wurden Pankreas, Leber, Milz, Duodenum und Lunge entnommen. Nach Bestimmung des Pankreasgewichts wurden Teile des Organs zur Protein- und RNA-Gewinnung verwendet. Das restliche Pankreas und die anderen entnommenen Organe wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert oder für die Gefrierschnitte in Eindeckmedium (Cryo) schockgefroren. Zur Nachgenotypisierung der verwendeten Mäuse wurden die Schwanzspitzen abgetrennt.

3.5. Histologie

3.5.1. Paraffin-Schnitte

Nach der Fixierung der Organe in Paraformaldehyd (4%) für 24 Stunden wurden die Organe im Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar, nach einem Standardprotokoll entwässert und in Paraffin eingebettet.

Für die histologischen Färbungen wurde das in Paraffin eingebettete Gewebe mit dem Mikrotom in 3µm dicke Schichten geschnitten, auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet.

3.5.1.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur morphologischen Darstellung des Pankreas und der übrigen entnommenen Organe erfolgte die Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung nach einem Standardprotokoll.

3.5.1.2. Masson-Trichrom-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung zur verbesserten Darstellung fibrotischer Areale wurde nach den Angaben des Herstellers (Sigma Aldrich, Accustain ® Trichrome Stain (Masson)) durchgeführt. Bei dieser Färbung stellt sich Kollagen blau dar, Zytoplasma rot und Zellkerne schwarz.

3.5.1.3. Perjodsäure-Schiff-Färbung

Diese Färbung wird verwendet, um Muzine darzustellen. Folgendes Protokoll wurde angewendet:

1. Deparaffinisierung in Rotihistol-Lösung und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe
2. 5min 0,5% Perjodsäure-Lösung
3. Spülen in Aqua dest.
4. 20min Schiff-Reagens
5. Spülen in lauwarmem Leitungswasser
6. Gegenfärbung in Mayers-Hämatoxylin
7. Spülen unter fließendem Leitungswasser
8. Rehydrierung und Eindecken

3.5.2. Gefrierschnitte

Die in Eindeckmedium (Cryo) schockgefrorenen Gewebstücke wurden mit dem Cryotom in 8µm dicke Schichten geschnitten, auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und bei -80°C aufbewahrt. Vor dem Färben wurden die Schnitte 30min bei Raumluft getrocknet.

3.5.2.1. Oil-Red-O-Färbung

Mit der Oil-Red-O-Färbung wird Fett rot dargestellt. Sie wurde an Gefrierschnitten nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

1. Fixierung der Schnitte 5min in eiskaltem 10%igem Formalin
2. Spülen in Aqua dest.
3. 5min reines Propylenglykol
4. Bei 60°C 8min 0,5% Oil Red O Lösung (gelöst in 100% Propylenglycol)
5. Waschen mit 85%iger Propylenglykol-Lösung
6. Spülen in Aqua dest.
7. 30 Sekunden Gills Hämatoxylin-Lösung
8. Spülen mit fließendem Leitungswasser
9. 2x 3min Aqua dest.
10. Eindecken mit Glycerol

3.6. Immunhistochemie

3.6.1. Allgemeines Protokoll

1. Deparaffinisierung und Rehydratation der Gewebsschnitte
2. Antigendemaskierung: kurzes Aufkochen in Citrat-Lösung, anschließend 10min knapp unter dem Siedepunkt
3. Abkühlen für 15min bei Raumtemperatur
4. 3x5min Waschen in PBS
5. 15min 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung
6. 3x5min Waschen in PBS
7. Block mit 5% Serum (siehe Tab. 2) und 4 Tropfen Avidin-Lösung/ml in PBS (1 h)
8. 3x5min Waschen in PBS
9. Inkubation mit Erstantikörper: Erstantikörper in der jeweiligen Konzentration (siehe Tab. 2); Trägerlösung: 5% Serum und 4 Tropfen Biotin/ml (in PBS). Inkubation über Nacht bei 4°C
10. 3x5min Waschen in PBS
11. Inkubation mit Zweitantikörper: Zweitantikörper in der jeweiligen Konzentration (siehe Tab. 2); Trägerlösung: 5% Serum in PBS. Eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur.

12. 3x5min Waschen in PBS
13. Inkubation in AB-Lösung (30min vorher angesetzt): auf 2,5 ml PBS je 1 Tropfen Lösung A und B, Inkubation für 30min bei Raumtemperatur
14. 3x5min Waschen in PBS
15. Inkubation mit Diaminobenzidin-(DAB)-Lösung (1 Tropfen Buffer-Stock-Lösung, 1 Tropfen Hydrogen-Peroxid-Lösung und 2 Tropfen DAB auf 2,5ml Aqua dest.): ca. 2-3min Inkubation bis zum Einsetzen der Braunfärbung. Danach sofortiges Abwaschen in Aqua dest.
16. Gegenfärbung in Meyers Hämatoxylin
17. Spülen unter fließendem Leitungswasser
18. Rehydrierung und Eindecken der Gewebsschnitte

Erstantikörper	Blocklösung	Zweitantikörper	Besonderheiten
Anti-BrdU (Ratte) 1:250	Kaninchen-Serum	Anti-Ratte (Kaninchen) 1:500	Inkubation mit Erstantikörper für 1 Stunde
Anti-Amylase (Kaninchen) 1:1000	Ziegen-Serum	Anti-Kaninchen (Ziege) 1:300	
Anti-aktivierte Caspase 3 (Kaninchen) 1:400	Ziegen-Serum	Anti-Kaninchen (Ziege) 1:500	Waschen mit PBS und 0,1% Tween®
Anti-CK19 (Ratte) 1:250	Kaninchen-Serum	Anti-Ratte (Kaninchen) 1:500	
Anti-TGF-β1 (Ratte) 1:250	Kaninchen-Serum	Anti-Ratte (Kaninchen) 1:500	
Anti-α-SMA (Kaninchen) 1:250	Ziegen- Serum	Anti-Kaninchen (Ziege) 1:500	Waschen mit TBS
Anti-Gr1 (Ratte) 1:500	Kaninchen-Serum	Anti-Ratte (Kaninchen) 1:500	Antigen-demaskierung mit TBS+0,005% Tween
Anti-F4/80 (Ratte) 1:100	Kaninchen-Serum	Anti-Ratte (Kaninchen) 1:500	Antigen-demaskierung mit 20µg/ml Proteinase K in 10mMTris/HCl pH 8,0

Tabelle 2: Verwendete Erst- und Zweitantikörper für die Immunhistochemie

3.6.2. Morphometrie

Zur Quantifizierung von für einen bestimmten Antikörper positiven Zellen wurden für einige immunhistochemische Färbungen manuelle Auszählungen durchgeführt. Dabei wurden mit der AxioCAM abfotografierte Abschnitte in 100 oder 200-facher Vergrößerung (BrdU 100x, aktivierte Caspase3 200x, F4/80 200x, PAS 100x) verwendet. Von jeder Gewebeprobe wurden drei repräsentative Bildausschnitte (mindestens 4 Tiere pro Gruppe) fotografiert und verblindet ausgezählt, aus diesen jeweils drei Werten wurde ein Mittelwert gebildet.

Diese Methode wurde für die Quantifizierung von F4/80-, BrdU- PSA- und aktivierter Caspase3-positiven Zellen verwendet und nach Unterschieden zwischen den *rela*^{Δ/Δ} und *rela*^{F/F}-Tieren statistisch ausgewertet.

Bei der Färbung für Amylase wurde die Quantifizierung nach Festlegung eines bestimmten Farbspektrums (braun für Amylase-positive Zellen) in Prozent der abgebildeten Fläche mit Photoshop CS 8.0 software (Adobe) ausgewertet. Ebenso wurde bei der Masson-Trichrom-Färbung verfahren. Hier wurde das Farbspektrum auf blau gefärbte Flächen, die Kollagenfasern darstellen, zur Quantifizierung der Fibrose, begrenzt. Für beide Quantifizierungen wurden mit AxioCAM abfotografierte Abschnitte in 200-facher Vergrößerung verwendet.

3.6.3. Fluoreszenzfärbungen

3.6.3.1. Paraffinschnitte

Die Fluoreszenzfärbungen wurden im Allgemeinen nach dem oben genannten Protokoll durchgeführt, dabei entfiel jedoch das Blocken der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid (Schritt 5). Die Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern erfolgte sequentiell, wobei zur Demarkierung der gebundenen Erstantikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zweitantikörper verwendet wurden. (Erst- und Zweitantikörper siehe Tab. 3). Somit konnte beim Blocken auf die Zugabe von Avidin bzw. Biotin, sowie von AB und DAB-Lösung für den Farbumschlag verzichtet werden. Nach Schritt 12 des obigen Protokolls erfolgte das Eindecken der Schnitte mit Eindeckmedium, welchem 4',6-Diamidin-2'-

phenylindoldihydrochlorid (DAPI) oder Sytox®-Grün zur zusätzlichen Fluoreszenzdarstellung der Zellkerne (blau bzw. grün) zugesetzt war. Anschließend wurden die Deckgläser mit Nagellack abgedichtet.

1.Erst-AK	1.Zweit-AK	2.Erst-AK	2.Zweit-AK	Block	Besonderheiten
Anti-Maus-Amylase (Kaninchen) 1:1000	Anti-Kaninchen Cy3-markiert (Ziege) 1:500	Anti-CK19 (Ratte) 1:250	Anti-Ratte Alexa488-markiert (Ziege) 1:500	Ziegen-Serum	
Anti-Maus-Amylase (Kaninchen) 1:1000	Anti-Kaninchen Cy3-markiert (Ziege) 1:500	Anti-BrdU (Ratte) 1:250	Anti-Ratte Alexa488-markiert (Ziege) 1:500	Ziegen-Serum	
Anti-Maus-p65 (Kaninchen) 1:100	Anti-Kaninchen (Ziege) 1:500	-	-	Ziegen-Serum	Nach AB-Lösung Inkubation mit TSA-Kit (Alexa 568)

Tabelle 3: verwendete Erst- und Zweitantikörper für Fluoreszenzfärbungen

3.6.3.2. Gefrierschnitte

Für Fluoreszenzfärbungen, die an Paraffinschnitten schwierig oder nicht durchführbar waren, wurden Gefrierschnitte verwendet. Dazu wurde im Prinzip wie oben beschrieben vorgegangen, wobei Deparaffinisierung, Rehydratation, sowie die Antigendemaskierung mit Citrat entfielen und dafür lediglich eine Fixation der Schnitte für 10min in Paraformaldehyd bei 4°C erfolgte. Anschließend wurde mit Aqua dest. gewaschen und wie oben genannt weiter verfahren. (Erst- und Zweitantikörper siehe Tab.4)

1.Erst-AK	1.Zweit-AK	1.Block	2.Erst-AK	2.Zweit-AK	2.Block
Anti-Maus-TNF-A (Ziege) 1:75	Anti-Ziege Cy3-markiert (Esel) 1:500	Esel-Serum (+1%BSA)	Anti-Maus-F4/80 (Ratte) 1:250	Anti-Ratte Alexa488-markiert (Ziege) 1:500	Ziegen-Serum (+1%BSA)
Anti-Maus-TGF- β (Ratte) 1:250	Anti-Ratte Cy3-markiert (Esel)	Esel-Serum (+5%BSA)	Anti-Maus-F4/80 (Ratte) 1:250	Anti-Ratte Alexa488-markiert (Ziege) 1:500	Ziegen-Serum (+5%BSA)

Tabelle 4: verwendete Erst- und Zweitantikörper für Fluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten

3.7. Genotypisierung

3.7.1. DNA-Extraktion

Zur Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere erfolgte die Analyse des entsprechenden DNA-Abschnitts mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurde den zu untersuchenden Tieren ein ca. 0,5cm langes Stück der Schwanzspitze abgetrennt und daraus DNA nach dem folgenden Protokoll isoliert:

1. Verdauen der Schwanzspitze über Nacht bei 55°C in jeweils 750 μ l Lysepuffer (50mM Tris (pH 8), 100mM EDTA (pH 8); 100mM NaCl; 1%SDS; dH₂O; 0,5mg/ml Proteinase K)
2. Zugabe von 250 μ l 6M NaCl, vortexen
3. Zentrifugation 30min bei 10.000 rpm und 4°C
4. Überführen der wässrigen Phase in neue Gefäße
5. Ausfällung der DNA mit Isopropanol (1:1)
6. Zentrifugation 10min bei 13.000 rpm und 4°C
7. Verwerfen des Überstandes
8. Zweimaliges Waschen des Pellets mit eiskaltem Ethanol (75%) (15min bei 13.000 rpm)
9. Trocknen des Pellets für ca.15min, danach Aufnahme in TE-Puffer (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0)
10. Lösen ca. 2h bei RT

3.7.2. Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der zu untersuchenden Genabschnitte erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei sich der Ansatz pro Well wie folgt zusammensetzte: 2,8µl Puffer (100mM Tris-HCl (pH8,0), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,1% Gelatine), 400µM Desoxynukleotidtriphosphat (in äquimolaren Mengen jedes dNTPs), je 0,1µM Primer fw und re, 1,25U DNA-Polymerase und 1µl genomische DNA in einem Gesamtvolumen von 30µl. Die PCR wurde in einem automatischen Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initial erfolgte ein Denaturierung der DNA für 10min bei 95°C. Anschließend folgten 40 Zyklen Denaturierung der DNA für 20s bei 95°C, Anlagerung der Primer (Annealing) für 40s bei 58°C Elongation für 90s bei 72°C und eine abschließende Extension für 2min bei 72°C.

Dabei wurden folgende Primer verwendet:

RelA: Fw: 5'-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3', Re: 5'-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3';

ptf1aCre: Fw: 5'-GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA CCA A-3', Re: 5'-CCT CGA AGG CGT CGT TGA TGG ACT GCA-3';

LysMCre: Fw: 5'-CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC-3', Re: 5'-TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC-3'

3.7.3. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Die Gele wurden aus TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA; 40mM Tris-Acetat, 1mM Na-EDTA, pH 8,5) mit 1,5% Agarose und 0,1µg/ml Ethidiumbromid gegossen. Die PCR-Produkte, sowie eine Negativkontrolle (PCR-Ansatz mit Zugabe von dH₂O anstatt einer DNA-Probe) wurden mit je 6µl Laufpuffer (30% Saccharose, 0,05% Orange G) vermischt und jeweils 15µl der Mischung in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde in jeder Reihe eine Tasche mit einer DNA-Leiter beladen.

Die Gele wurden nun in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und eine Spannung von 120V angelegt. Nach ausreichender Auftrennung konnten die amplifizierten PCR-Produkte durch UV-Licht auf einem Durchleuchtungsgerät sichtbar gemacht und abfotografiert werden.

3.8. Quantitative PCR

Um Angaben über die Expression bestimmter Gene (Gehalt an mRNA) machen zu können, wurde das Verfahren der quantitativen *reverse-transcripton*-PCR verwendet. Dazu wurde aus den zu untersuchenden Gewebsstücken RNA isoliert, die dann mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Aus Proben mit demselben Gehalt an Gesamt-cDNA wurde dann, nach dem Prinzip einer klassischen PCR, die in cDNA umgeschriebene mRNA eines bestimmten Gens amplifiziert. Unter der Annahme der exponentiellen Vermehrung der gesuchten cDNA, kann so auf die Ausgangsmenge in verschiedenen Gewebeproben rückgeschlossen werden. Dazu muss die PCR allerdings noch in der exponentiellen Phase abgestoppt werden, was durch Anpassung der Zyklenzahl und der Denaturierungstemperatur (T_m) erreicht wurde. Als Ladekontrolle diente ein sog. Haushaltsgen (hier Cyclophilin), dessen Expression stets gleichbleibend hoch ist.

3.8.1. RNA-Extraktion

Die Gewebstücke für die Gewinnung von RNA wurden sofort nach Präparation des Organs, aus drei definierten Abschnitten des Pankreas (Kopf, Corpus und Schwanz) entnommen und in einer Lösung aus 100 Teilen RLT-Puffer und einem Teil Mercaptoethanol homogenisiert. Daraufhin wurden die Homogenisate sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Extraktion der RNA aus den Proben erfolgte mit dem RNeasy®-Kit nach Angaben des Herstellers (Quiagen). Der RNA-Gehalt der verschiedenen Proben wurde an einem Nanodrop-Photometer gemessen, direkt im Anschluss folgte die Transkription in cDNA.

3.8.2. cDNA-Synthese

Das Umschreiben von RNA in cDNA wurde mit SuperScript II-Reverser-Transkriptase® nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Dabei wurden jeweils 5µg RNA in cDNA umgeschrieben. Nach der Messung des cDNA-Gehalts der Proben erfolgte die Einstellung der Konzentration mit dH₂O auf 100ng/µl.

3.8.3. PCR

Die Amplifikation der cDNA erfolgte wie oben bei der klassischen PCR aufgeführt, wobei sich der PCR-Ansatz pro Well wie folgt zusammensetzte: 2,8µl Puffer (100mM Tris-HCl (pH8,0), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,1% Gelatine), 400µM Desoxynukleotidtriphosphat (in äquimolaren Mengen jedes dNTPs), je 0,1µM Primer fw und re, 1,25U DNA-Polymerase und 1µl cDNA in einem Gesamtvolumen von 30µl. Zyklenzahl und Temperatur des Denaturierungsschrittes (T_m) wurden für die Untersuchung der entsprechenden Proteine jeweils empirisch modifiziert (*Tabelle 5*).

Protein	Zyklenzahl	T _m (in °C)	Primer fw	Primer re
Cyclophilin	30	58	5'- ATG GTC AAC CCC ACC GTG T-3'	5'- TTC TGC TGT CTT TGG AAC TTT GTC-3'
Fibronektin	30	60	5'- TGT ACC ATT GCA AAT CGC TGC-3'	5'- CCA TTC CCC TTT TCC ATT TCC-3'
Kollagen αI	30	58	5'- GCC AAG AAG ACA TCC CTG AA-3'	5'- GCC ATT GTG GCA GAT ACA GA-3'
Kollagen αIII	30	58	5'- TAC ACC TGC TCC TGT GCT TC -3'	5'- GAG ACC TGG TTG TCC TGG AA-3'
PDGF	40	56	5'- ACT CCG TAG GGG CTG AGG AT-3'	5'- GCT TCT CGG GCA CAT GGT TA-3'
TGF-β	30	58	5'- TGG CTG AAC CAA GGA GAC GGA-3'	5'- TGT CAT GGA TGG TGC CCA GGT-3'
TNF-α	50	54	5'- ATG AGA AGT TCC CAA ATG GCC-3'	5'- ATG AGA AGT TCC CAA ATG GCC-3'

Tabelle 5: Für die quantitativen PCR-Analysen der verschiedenen Proteine verwendete Primer, sowie Zyklenzahl und Denaturierungstemperatur T_m

3.8.4. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte wie unter 3.7.3 beschrieben.

3.9. Westernblotting

3.9.1. Proteinlyse und Proteinbestimmung

Zur Analyse der Proteine mittels Westernblotting wurden repräsentative Gewebestücke aus den Pankreata der Versuchsmäuse entnommen. Diese wurden in IP-Puffer (50 mM HEPES pH 7,9; 150 mM NaCl; 1mM EDTA pH 8,0; 0.5% NP-40; 10% Glycerol) mit Proteinaseinhibitor im Verhältnis 1:200 homogenisiert und bei 1300rpm bei 4°C für 10min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand für die weiteren Analysen abpipettiert.

Der Proteingehalt der Lysate wurde mit dem BCA Protein-assay-kit (Thermo Fisher scientific) mittels photometrischer Analyse nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Proben wurden nun mit IP-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 1µg/µl eingestellt und mit 5x Lämmli-Puffer (10% SDS, 50% Glycerin, 300 mM Tris/HCl, 0,05% Bromphenolblau, 5% Mercaptoethanol in dH₂O) versetzt.

3.9.2. Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine und Membrantransfer

Die Polyacrylamid-Gele zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden aus 10%-Trenngel (380mM TrisHCl; pH8,8; 100mM Acrylamid; 1mM SDS; 0,5mM APS; 1,5mM TEMED in dH₂O in einem Gesamtvolumen von 5ml) und dem Sammelgel (125mM TrisHCl, pH6,8; 44mM Acrylamid; 1mM SDS; 0,5mM APS; 2mM TEMED in dH₂O in einem Gesamtvolumen von 2,5ml) gegossen, in denen mittels eines Kammes Taschen für das Beladen mit den Proteinproben ausgespart blieben. Vor dem Beladen der Polyacrylamid- Gele wurden die mit Lämmli-Puffer versetzten Proteinlysate bei 95°C in einem Thermoblock 5min lang denaturiert.

Pro Gelkammer wurden 10 µg Proteinlysate verwendet und mittels 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte in einer

Gelelektrophoresezelle mit Laufpuffer (3,5mM SDS, 25mM TRIS-A; 50mM Glycin in dH₂O) und einer angelegten Spannung von 100V.

Mittels Transferpuffer (25 mM Tris , 192 mM Glycin, 20% Methanol; pH8,3) wurden nun die Proteine in einer Blottingzelle bei 350mA für 120min auf eine mit Methanol und H₂O aktivierte Nitrocellulose-Membran übertragen.

3.9.3. Proteindetektion

Zunächst wurde die Membran mit 5% Trockenmilch in PBS für 1h bei RT geblockt und anschließend in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper über Nacht bei 4 °C. Nach nochmaligem Waschen mit PBS erfolgte nun die Inkubation mit dem Zweitantikörper, ebenfalls für 1h bei RT. Erst- und Zweitantikörper siehe Tab. 6) Die Detektion der AK-Komplexe erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dazu wurde ECL-Reagens und auf die Membran gegeben und die Signale auf Chemilumineszenz-Film übertragen und mit einem Filmentwickler sichtbar gemacht.

Erstantikörper	Zweitantikörper
Anti-p65 (Kaninchen) 1:500	Anti- Kaninchen 1:1000 mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt
Anti-ERK1/2 (Maus) 1:500	Anti-Maus 1:1000 mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt

Tabelle 6: Beim Westernblotting verwendete Erst- und Zweitantikörper

3.10. Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde der Students-T-Test verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Für die Analysen wurde das Programm Microsoft® Excel 2000 verwendet.

4. Materialien und Geräte

4.1. Induktion einer CP

Spritzen	Sterican® Gr.20	B.Braun, Melsungen
Nadeln	BD Microlance™ 3	BD, Franklin Lakes, USA
Caerulein	Caerulein C-9026	Sigma-Aldrich St.Louis,USA
NaCl	Isotonische Natriumchloridlösung (0,9%)	DeltaSelect, Pfullingen
Isofluran	Forene®	Abbott, Wiesbaden
Histologiekassetten	Bio-Cassettes 07-7130	Bio-Optica, Mailand,It.
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd, reinst	Merck, Darmstadt
Waage	BP 2100 S	Sartorius, Göttingen
Homogenisator	DIAX 900	Heidolph, Kehlheim
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	eppendorf, Hamburg
Tierfutter		Altromin, Lage
Käfige		Thoren-Caging-System – IVC, Hazelton, USA

4.2. Histologie und Immunhistochemie

Mikrotom	Microm HM355S	MICROM, Walldorf
Objektträger	Superfrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser	#1 H868; 24x60mm	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten	Reference	eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	SafeSeal- Tips® Professional	Biozym, Hess.Oldendorf
Falcons	Falcon®	BD, Franklin Lakes, USA
Parafilm	Parafilm® PM-992	Pechiney plastic packaging, Brampton,USA
Hämatoxylin nach Meyer		Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Hämalaun nach Meyer	Merck 1.09249.2500	Merck, Darmstadt
Hämatoxyllin modifiziert nach Gill III	Merck 1.05174.2500	Merck, Darmstadt
Eosin	2C140 Eosin	Waldeck, Münster
Masson-Trichrom- Reagenzien	Accustain® Trichrom Stain	Sigma aldrich, St.Louis,USA
Histolog. Lösungsmittel	Rotihistol	Carl Roth, Karlsruhe
Perjodsäurelösung		Carl Roth, Karlsruhe
Schiff-Reagens		
Ethanol		Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Eindeckmedium	pertex®	medite, Burgdorf
Eindeckmedium (Cryo)	Tissue Tek® O.C.T™ Compound	sakura Finetek, Himeppenheim
Cryotom	Microm H560	MICROM, Walldorf

Mikroskop/Kamera	AXIO Imager1.0 AxioCam HRC	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop/Kamera	ApoTome	Zeiss, Oberkochen
Propylenglycol		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
Oil Red O Lösung		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
Unmasking Solution	Antigen Unmasking-Solution, H-330	Vector Labs, Burlingame, USA
Glycerol		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxidlösung 30%	Merck, Darmstadt
Avidin/Biotin	Avidin/Biotin Blocking Kit SP 2002	Vector Labs Burlingame, USA
Seren		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
BSA 20%		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
DAB	DAB Substrate kit for Peroxidase SK-4100	Vector Labs Burlingame, USA
AB-Lösung	Vectastain® ABC Kit Elite Standard PK-6100	Vector Labs, Burlingame, USA
PBS	Instamed 9,55g/l PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Tween	Tween®20	C.Roth, Karlsruhe
Proteinase K		Invitrogen
Tris/Hcl	TRIS-hydrochlorid	C.Roth, Karlsruhe
Mikrowelle		Siemens. München
Mounting Medium mit DAPI	Vectashield®	Vector Labs, Burlingame, USA
TSA-Kit	TSA™ Kit #24 *with HRP—streptavidin and Alexa Fluor® 568 tyramide Cat. No. T-20934	Invitrogen, Karlsruhe
Sytox ® Green	S7020	Invitrogen, Karlsruhe

4.2.1.Antikörper

BrdU	2060	AbD Serotec Kiddlington, USA
p65	sc-109	Santa Cruz Biotechnology, Inc. , Santa Cruz, USA
Amylase	sc-46657	Santa Cruz Biotechnology, Inc. , Santa Cruz, USA
CK19	TROMA III	DSHB, Iowa City,USA
F4/80	MF-48000	Caltag Laboratories,

Aktivierete Caspase 3	9664		Hamburg Cell Signaling, Danvers, USA
α -SMA	5694-100		abcam, Cambridge, USA
TNF- α	1793		abcam, Cambridge, USA
TGF- β 1	A75-3		BD, Franklin Lakes, USA
F4/80 (Cryo)	6640-250		abcam Cambridge, USA
Zweitantikörper	Biotinylated IgG	Anti-Rabbit	Vector Laboratories
Fluoreszenz- Zweitantikörper			invitrogen, Karlsruhe
Gr1	550291		BD, Franklin Lakes, USA

4.3.DNA-Extraktion

Tris	TRIS Ultra Qualität		C.Roth, Karlsruhe Roth
EDTA			Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate		MP Biomedicals, Irvine, USA
TE-Puffer	Tris/EDTA pH 8,0		Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Ethanol			Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Isopropanol			Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Feinwaage	analytic		Sartorius, Göttingen
Vortexer	RELAX top		Heidolph, Kehlheim
Thermoblock/Schüttler	THERMOMIXER compact		eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R		eppendorf, Hamburg
Eppendorfgefäße			eppendorf, Hamburg
Pipetten	Reference		eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	SafeSeal- Tips®Professional		Biozym, Hess. Oldendorf

Reagenzien:

Lysepuffer: 50mM Tris (pH 8), 100mM EDTA (pH 8); 100mM NaCl; 1%SDS; dH2O;
0,5mg/ml Proteinase K
TE-Puffer: Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0

4.4.PCR

10XPCR-Puffer			Quiagen, Hilden
MgCl			Quiagen, Hilden
DNA-Polymerase	Taq DNA-Polymerase		Quiagen, Hilden
Desoxynukleotide			Peqlab, erlangen
Primer			MWG, Ebersberg
Thermocycler	Gen Amp® PCR Systems		Applied Biosystems, Foster

TAE-Puffer	9700 Tris-Acetat-EDTA	City, USA Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Agarose Ethidiumbromid	Biozym LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Orange G		Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Saccharose		Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DNA-Leiter Elektrophoresekammer Netzgerät	Wide Mini-Sub® Cell GT Electrophoresis Power Supply E844	peqlab, Erlangen Biorad, Hercules, USA consort, Turnhout, Belgien
Durchleuchtungsgerät/ Entwickler	GelDocXR	Biorad, Hercules, USA

Reagenzien:

PCR-Puffer: 100mM Tris-HCl (pH8,0), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,1% Gelatine

Laufpuffer: 30% Saccharose, 0,05% Orange G

4.5. RT-PCR

RLT-Puffer Mercaptoethanol	RLT lysis buffer	Quiagen, Hilden Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
RNAseZAP®	R-2020	Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
RNA-Kit Spektralphotometer Reverse Transkriptase	Rneasy®Mini Kit Nanodrop ND-1000 SuperScript II Reverse Transcriptase	Quiagen, Hilden peqlab, Erlangen Invitrogen, Carlsbad, USA
Aqua ad iniectabilia Primer		Delta Select, Pfullingen MWG, Ebersberg

Reagenzien:

Laufpuffer: 30% Saccharose, 0,05% Orange G

TAE-Puffer: Tris-Acetat-EDTA; 40mM Tris-Acetat, 1mM Na-EDTA, pH 8,5

4.6. Westernblotting

Kämme		Bio Rad, Hercules, USA
Platten		Bio Rad, Hercules, USA
Gelstände		Bio Rad, Hercules, USA
Filmentwickler		amersham /GE Healthcare Little Chalfont, UK
ECL-Reagens		amersham/ GE Healthcare Little Chalfont, UK

Chemilumineszenz-Film		amersham/ GE Healthcare Little Chalfont, UK
BCA Protein-assay-kit		Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Blottingzelle	Mini Trans- Blot Zelle	Bio Rad, Hercules, USA
Wathman-Papier		
Nitrozellulose-Membran		Millipore, Bedford, USA
Anti-Maus-p65 (Kaninchen) AK	Santa Cruz sc-372	Santa Cruz Biotechnology, Inc. , Santa Cruz, USA
Anti-Maus ERK1/2 (Maus) AK	Santa Cruz, sc-93, sc-154,	Santa Cruz Biotechnology, Inc. , Santa Cruz, USA
Anit-Kaninchen AK mit Meerrettichperoxidase		GE Healthcare Little Chalfont, UK
HEPES-Puffer		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
TEMED		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
APS		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
Acrylamid		Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris	TRIS Ultra Qualität	C.Roth, Karlsruhe Roth
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	MP Biomedicals, Irvine, USA
NP-40		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
Bromophenolblau		Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
Glycerin		Merck, Darmstadt
Tween 20		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
Trockenmilch-Pulver		Sigma-Aldrich, St.Louis,USA

Reagenzien:

TBST: 20mM Tris (pH 7,6) 137 mM NaCl, 1% Tween

IP-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 10% Glycerin; pH 7.5

TAE-Puffer: Tris-Acetat-EDTA; 40mM Tris-Acetat, 1mM Na-EDTA, pH 8,5

Lämmli-Puffer: 10% SDS, 50% Glycerin, 300 mM Tris/HCl, 0,05% Bromphenolblau, 5% Mercaptoethanol in dest.H₂O

Trenngel: 380mM TrisHCl; pH8,8; 100mM Acrylamid; 1mM SDS; 0,5mM APS; 1,5mM TEMED in dH₂O in einem Gesamtvolumen von 5ml

Sammelgel: 125mM TrisHCl, pH6,8; 44mM Acrylamid; 1mM SDS; 0,5mM APS; 2mM TEMED in dH₂O in einem Gesamtvolumen von 2,5ml

Laufpuffer: 3,5mM SDS, 25mM TRIS-A; 50mM Glycin in dH₂O) Transferpuffer (25 mM Tris , 192 mM Glycin, 20% Methanol; pH8,3

Transferpuffer: 25 mM Tris , 192 mM Glycin, 20% Methanol; pH8,3

5. Ergebnisse

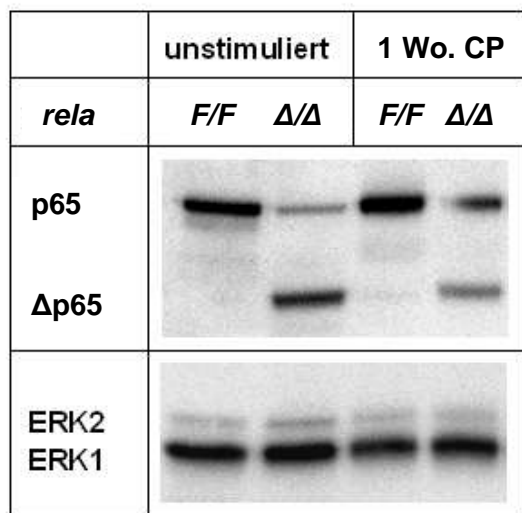
5.1. Induktion einer chronischen Pankreatitis

Die Induktion einer akuten Pankreatitis durch das synthetische Cholezystokinin-Analogon Caerulein wurde bereits 1979 durch Adler *et al.* erstmalig beschrieben.¹ In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, dass wie in neueren Modellen zur CP-Entwicklung angenommen, wiederholte Episoden einer AP zu dem Bild einer CP führen können.^{7,85} Den Mäusen wurden zur repetitiven Induktion einer AP über einen Zeitraum von insgesamt 6 Wochen dreimal pro Woche jeweils sechsmal pro Tag eine supraphysiologische Menge Caerulein intraperitoneal injiziert, um so nach dem Modell von Neuschwander-Tetri eine CP zu induzieren.⁸⁸ Die Tiere wurden entweder eine oder 6 Wochen nach Ende der Injektionen euthanasiert und untersucht. Keines der Tiere starb während der 6 Wochen Caerulein-Administration. (Siehe Abbildung 6/Methoden)

5.2. Deletion von RelA/p65

Um die Relevanz von RelA/p65 in der CP zu untersuchen, wurde die Aktivierung, d.h. die nukleäre Translokation, von RelA/p65 im Pankreas von *rela^{F/F}*- und *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen analysiert. Dabei wurde zunächst mittels Immunoblots von Pankreasproteinlysaten die Deletion von RelA/p65 bei den Versuchstieren überprüft. Hierbei wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch an ein Epitop des C-terminalen Endes von RelA/p65 bindet. Der Antikörper detektiert sowohl das verkürzte (inaktive) Protein (Δ RelA/p65, ca. 42kD) als auch das Wildtyp-Protein (RelA/p65, 65kD). In den Pankreasproteinlysaten von unstimulierten Mäusen erkennt man bei *rela^{F/F}*-Mäusen wie erwartet die Wildtypbande bei 65kD (Abbildung 7A). Die Proteinlysate von *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen zeigen eine starke Bande bei ungefähr 42kD und ein sehr schwaches Signal bei 65kD. Die 42kD-Bande stammt hierbei von den Pankreaszellen, bei denen durch die PTF1a-Cre-Rekombinase der gefloxt *rela*-Genabschnitt deletiert wurde, die schwache Wildtyp-Bande stammt dagegen von nicht-pankreatischen (mesenchymalen) Zellen. Nach Caerulein-Langzeitstimulation

A



B

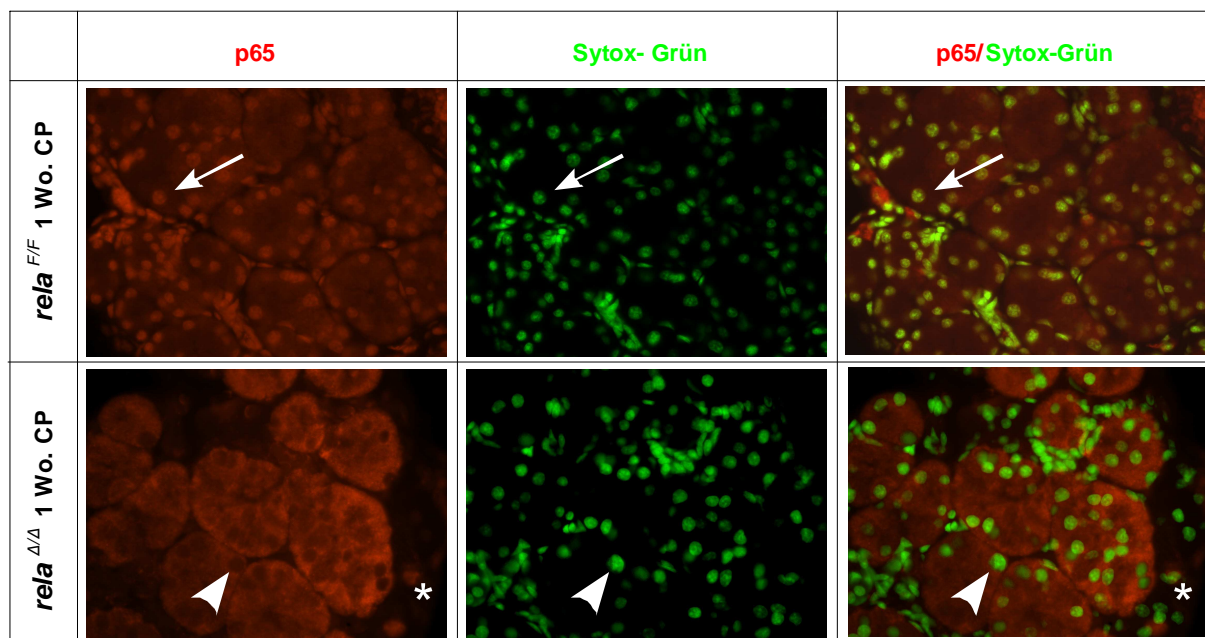


Abbildung 7

A: Westernblot-Analyse von Proteinlysaten aus Pankreasgewebe von *rela*^{F/F}- und *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen vor und nach Induktion einer CP zum Nachweis der Deletion von Exon 7-10 von *RelA*. (n=4, eine repräsentative Probe abgebildet. Ladekontrolle mit ERK1 und 2)

B: Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen das C-terminale Ende von RelA/p65, der sowohl das Wildtyp- als auch das inaktivierte Protein detektiert. Kernfärbung mit Sytox-Grün. Bei den *rela*^{F/F}-Tieren zeigt sich eine Woche nach Ende der Caerulein-Stimulationen in den Azinuszellen eine nukleäre Translokation des Proteins (Pfeil), während es bei *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen im Zytoplasma der Azinuszellen verbleibt (Pfeilspitze) und nur in infiltrierenden Zellen im Kern nachgewiesen werden kann (Stern).

nimmt bei den *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen das 42kD Signal ab, wohingegen die 65kD-Bande stärker wird. Dies deutet auf eine Verminderung der pankreatischen Zellen sowie eine vermehrte Infiltration von Zellen nicht-pankreatischen Ursprungs hin.

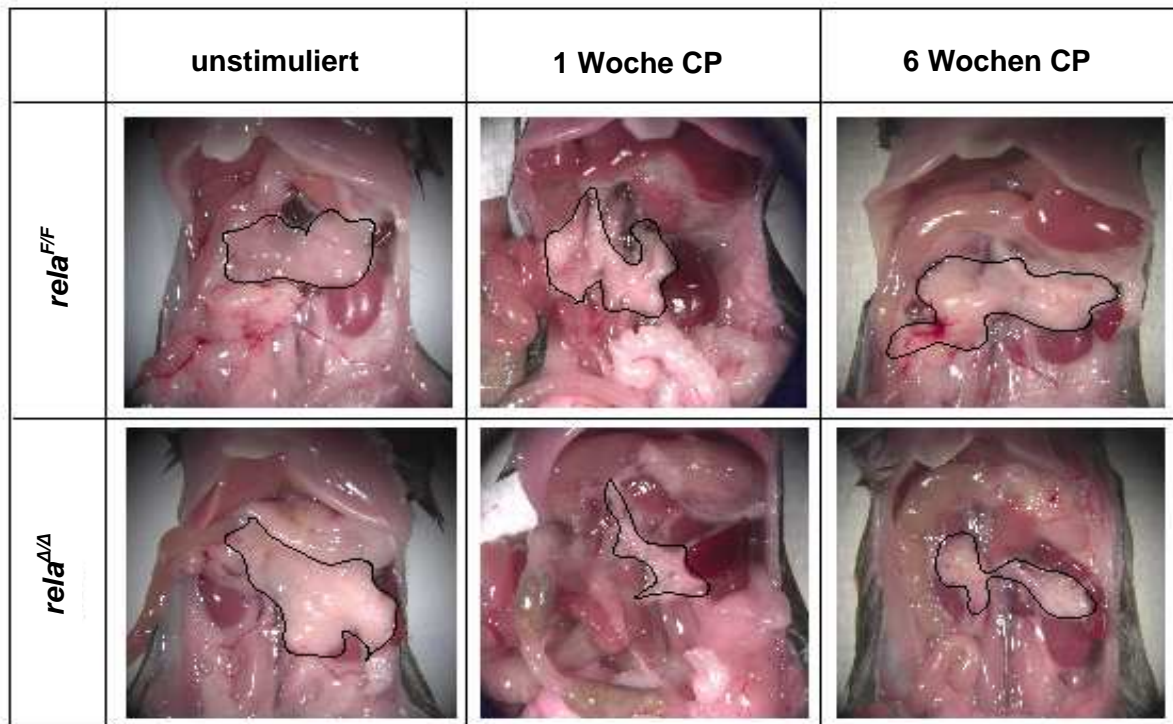
In der Fluoreszenzfärbung für RelA/p65 zeigte sich bei den unstimulierten Tieren beider Genotypen das Protein wie erwartet im Zytoplasma (*Abbildung 7B*). Nach Caeruleinstimulation konnte jedoch p65 bei den geflochten Tieren nun im Zellkern nachgewiesen werden (*Abbildung 7B, Pfeil*), wohingegen die Tiere mit funktionell inaktiviertem RelA/p65 erwartungsgemäß kein nukleär lokalisiertes RelA/p65 aufwiesen (*Abbildung 7B, Pfeilspitze*). In infiltrierenden Zellen zeigt sich jedoch auch bei den *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen RelA/p65 im Zellkern (*Abbildung 7B, Stern*). Dies zeigt einerseits, dass RelA/p65 während der Entstehung der CP aktiviert wird und damit höchstwahrscheinlich eine Rolle spielt. Zum anderen zeigen die Experimente, dass die Deletion der Exons 7-10 die Aktivierung bzw. die nukleäre Translokation von RelA/p65 effizient unterbinden kann.

5.3. Verlust von azinärem Gewebe nach repetitiver Stimulation mit Caerulein

In der makroskopischen Übersicht (*Abbildung 8A*) der Pankreata von *rela*^{Δ/Δ}- und *rela*^{F/F}-Mäusen, zeigte sich ein deutlicher Größenunterschied zwischen caeruleinstimulierten Mäusen und unstimulierten Kontrolltieren. Um diese Beobachtung zu verifizieren wurde das Pankreasgewicht von stimulierten und unstimulierten Tieren direkt nach der Isolation in Relation zum jeweiligen Körpergewicht der entsprechenden Maus gesetzt, um so das relative Pankreasgewicht zu ermitteln. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied, sowohl zwischen stimulierten und unstimulierten Tieren, als auch zwischen den stimulierten Mäusen der verschiedenen Genotypen (*Abbildung 8B*). Bei *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen nahm das relative Pankreasgewicht nach Stimulation signifikant stärker ab als bei den *rela*^{F/F}-Tieren. Ebenso zeigte sich, dass auch sechs Wochen nach Ende der Stimulation das relative Pankreasgewicht der *rela*^{Δ/Δ}-Mäuse deutlich vermindert blieb, während Pankreata von *rela*^{F/F}-Tieren das Ausgangsgewicht fast wieder erreicht hatten.

Um den Verlust an Pankreasgewebe auch mikroskopisch zu untersuchen, wurden mit Hämatoxylin/Eosin (H.E.) gefärbte Gewebeschnitte der Mäuse analysiert (*Abbildung 9A*).

A



B

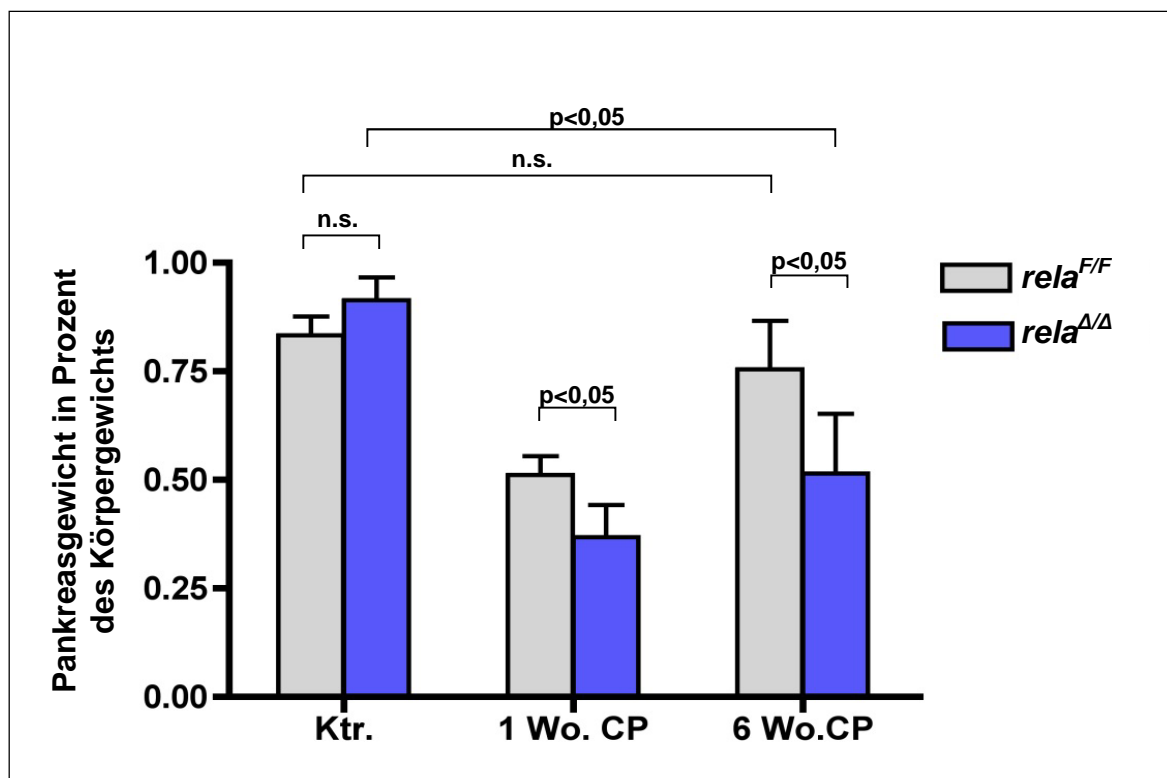
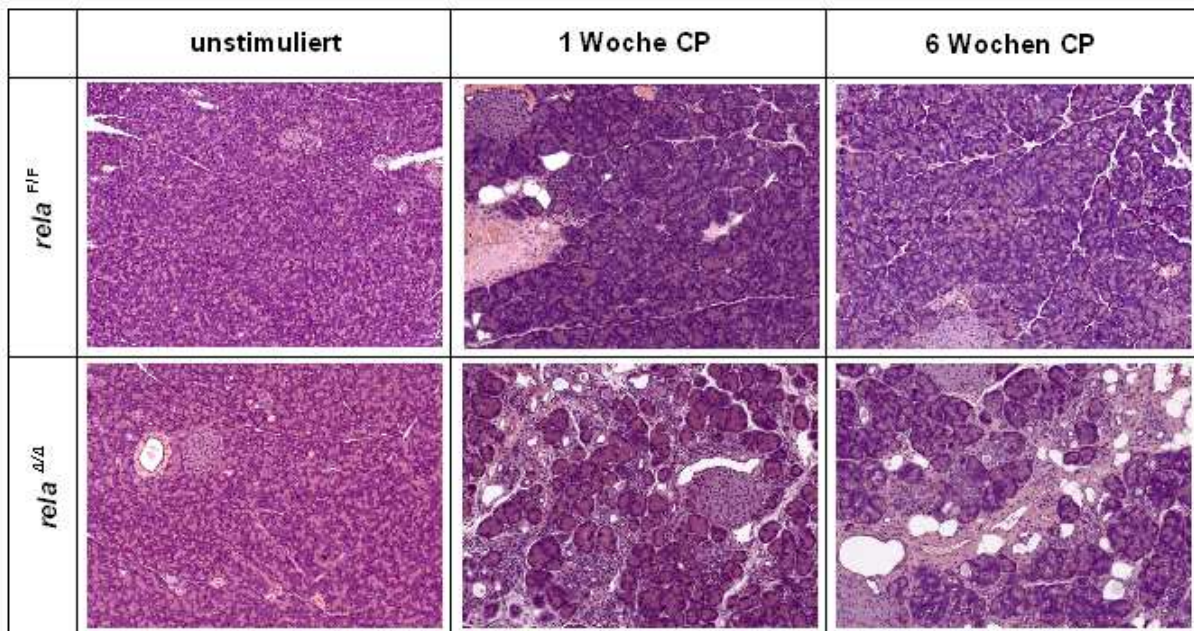
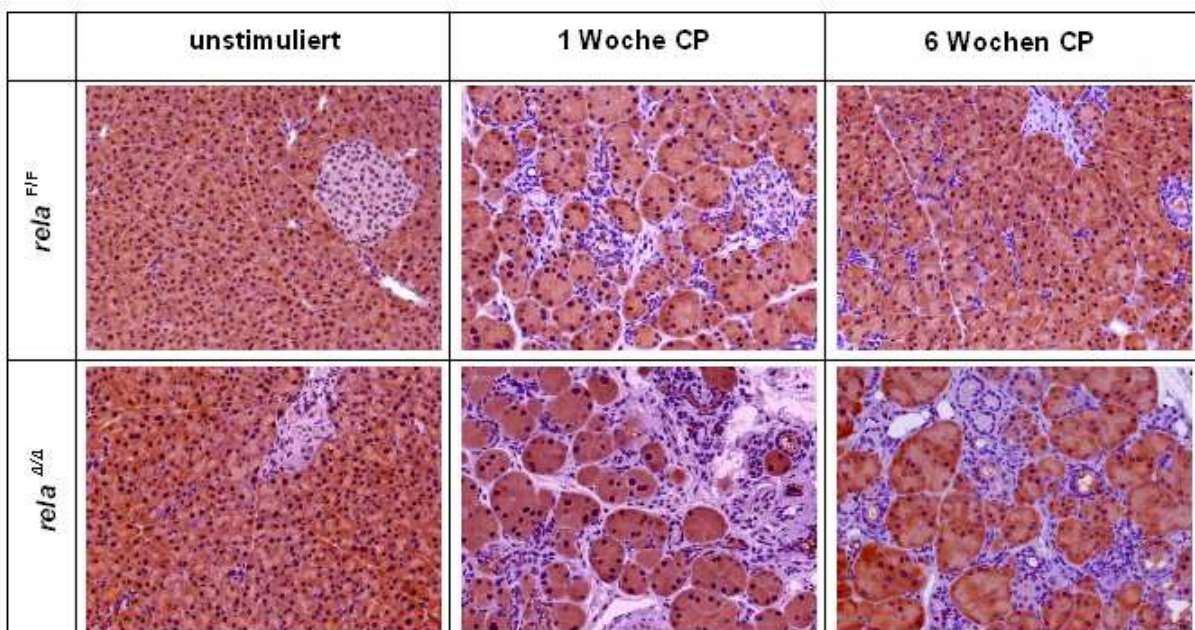


Abbildung 8

A: Makroskopische Übersichtsaufnahme der Pankreata von *rela^{F/F}*- und *rela^{ΔΔ}*- Mäusen mit sichtbarer Reduktion der Pankreasgröße eine Woche nach Ende der Caerulein-Stimulation. Bei den *rela^{ΔΔ}*-Tieren zeigt sich auch nach sechs Wochen keine sichtbare Erholung.

B: Relatives Pankreasgewicht von *rela^{F/F}*- und *rela^{ΔΔ}*-Mäusen, in Prozent des Körpergewichts (pro Gruppe n=5; n.s.: nicht signifikant; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an).

A**B**

C

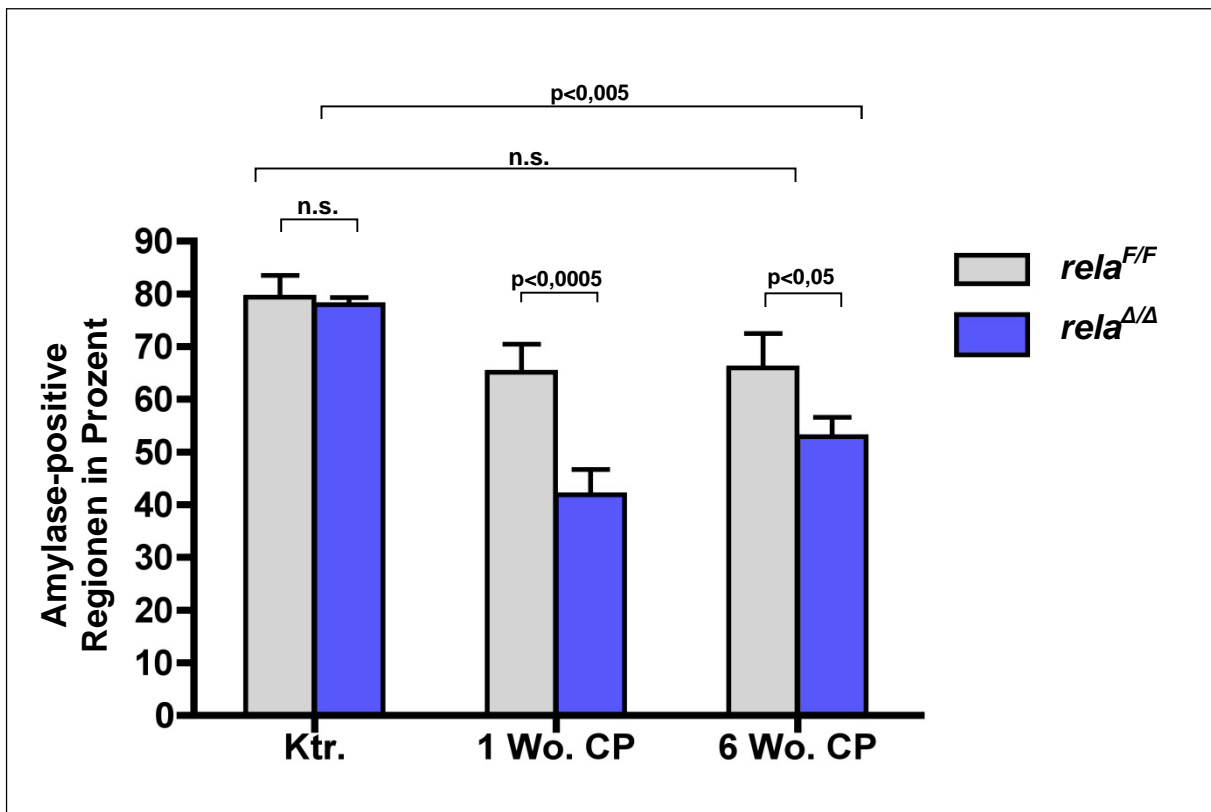


Abbildung 9

A: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Gewebeschnitte von *rela*^{F/F}- und *rela*^{Δ/Δ}-Tieren zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die *rela*^{Δ/Δ}-Mäuse zeigen eine Woche nach Ende der Caeruleinstimulation Merkmale einer chronischen Pankreatitis mit fehlender Rückbildungstendenz auch nach 6 Wochen.

B: Immunhistochemie von Pankreasgewebeschnitten mit einem Antikörper gegen Amylase zu den verschiedenen Zeitpunkten. Der Verlust von funktionellem Pankreasgewebe vor allem bei den *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen ist an der deutlichen Reduktion der Amylase-positiven Azinuszellen sichtbar.

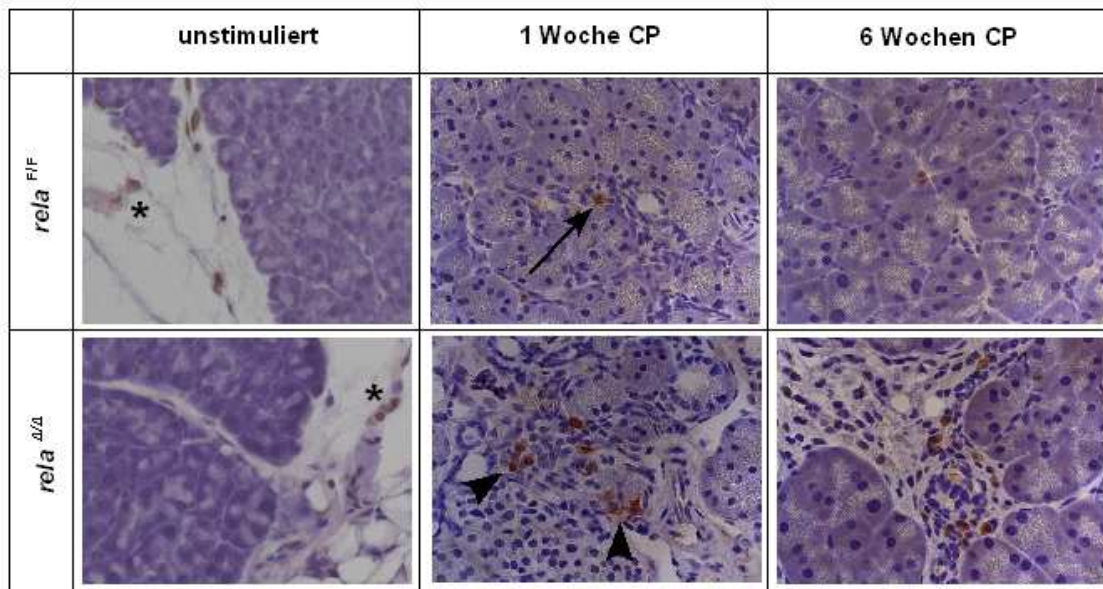
C: Morphometrische Analyse der Amylase-Immunhistochemie. Es wurden die Amylase-positiven Areale in Prozent der Pankreasgewebefläche berechnet. (pro Gruppe n=4).

Die Pankreata der unstimulierten Kontrolltiere beider Genotypen wiesen keine morphologischen Unterschiede auf, die Pankreasarchitektur war normal. Nach Langzeitstimulation mit Caerulein war jedoch bei den Tieren mit funktionell inaktiviertem pankreatischem RelA/p65 eine drastische Verminderung von Azinuszellen zu verzeichnen, die bei *rela^{F/F}*-Mäusen ebenso vorhanden, jedoch deutlich geringer ausgeprägt war. Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen Amylase durchgeführt, der spezifisch Azinuszellen anfärbt. Wie in *Abbildung 9B* ersichtlich, färbten sich bei den stimulierten *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen deutlich weniger Zellen Amylase-positiv an. In der morphometrischen Analyse zeigte sich ebenfalls eine statistisch signifikant stärkere Reduktion von Amylase-positivem Gewebe bei den *rela^{Δ/Δ}*-Tieren (*Abbildung 9C*). Auch nach sechs Wochen war das Azinuszellgewebe immer noch sichtbar reduziert. Dabei wurden die azinären Zellen durch andere Zelltypen ersetzt, die im Weiteren noch näher differenziert werden.

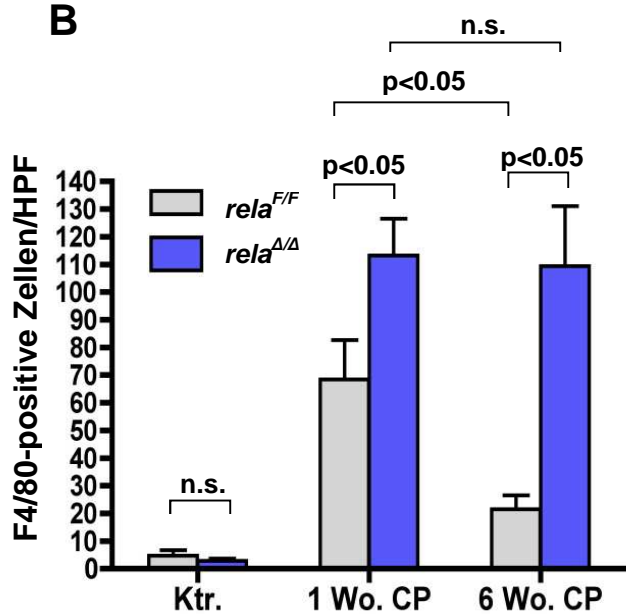
5.4. Infiltration von Makrophagen

Ein charakteristisches Merkmal der chronischen Pankreatitis stellt die Infiltration von Makrophagen in das Pankreasgewebe dar. Makrophagen spielen durch ihre Fähigkeit zur Aktivierung von pankreatischen Sternzellen¹¹⁵ eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der Erkrankung. Bezüglich der Infiltration durch Makrophagen wurden daher Pankreasgewebeschnitte mit einem Antikörper gegen F4/80, einem Oberflächenprotein von Makrophagen, untersucht. Bei unstimulierten Tieren beider Genotypen konnten nahezu keine F4/80-positiven Zellen im Pankreas nachgewiesen werden, nur in der angrenzenden Mesenterialwurzel färbten sich einige Zellen positiv an (*Abbildung 10A, Stern*). Bei den Caerulein-stimulierten *rela^{F/F}*-Tieren zeigten sich eine Woche nach Ende der Stimulation einige das Parenchym infiltrierende Makrophagen (*Abbildung 10A, Pfeil*). Diese waren jedoch 6 Wochen nach Ende der Stimulation nur noch vereinzelt zu beobachten. Die Pankreata von *rela^{Δ/Δ}*-Tieren zeigten eine deutlich stärkere Infiltration durch Makrophagen, die meist in Gruppen angeordnet waren (*Abbildung 10A, Pfeilspitze*). Nach 6 Wochen war bei den *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen keine substantielle Verminderung der F4/80-positiven Zellen zu verzeichnen.

A



B



C

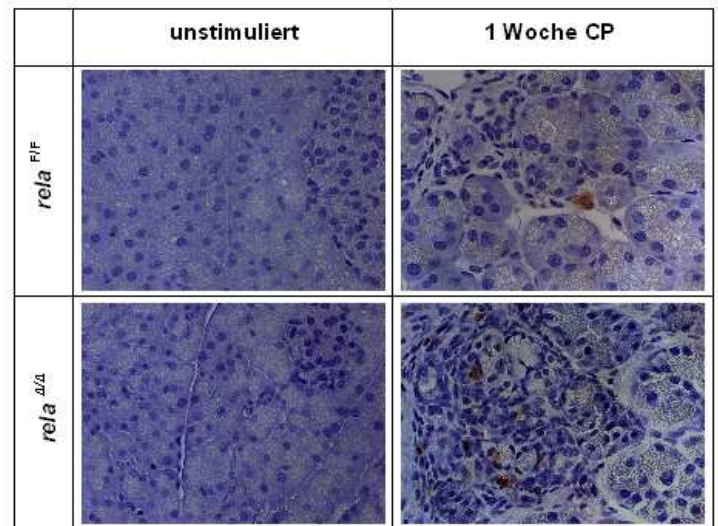


Abbildung 10:

A: Immunhistochemische Anfärbung von Makrophagen mit einem Antikörper gegen F4/80. In unstimulierten Tieren waren Makrophagen nur im angrenzenden Gewebe der Mesenterialwurzel nachzuweisen (Stern), aber nicht im Parenchym. Nach Caerulein-Stimulation zeigte sich vor allem bei *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen eine Infiltration des Pankreasgewebes durch Makrophagen, die häufig in Clustern periduktal oder perivaskulär angeordnet waren (Pfeilkopf). Bei *rela*^{F/F}-Tieren zeigten sich zu beiden Zeitpunkten nur vereinzelt positive Zellen im Parenchym (Pfeil).

B: Quantifizierung der Makrophagen-Infiltration bei *rela*^{F/F}- und *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen zu den verschiedenen Zeitpunkten anhand von repräsentativen Gewebeschnitten, die mit einem AK gegen F4/80 angefärbt wurden (n=5, n.s.: nicht signifikant; Fehlerbalken geben den Standardfehler an)

C: Immunhistochemische Darstellung der granulozytären Infiltration mit einem Antikörper gegen Gr-1 bei *rela*^{F/F}- und *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen.

Um die Infiltration durch Makrophagen zu quantifizieren, wurden die F4/80-positiven Zellen im Pankreasgewebe anhand von repräsentativen Schnitten in 200facher Vergrößerung ausgezählt. Die Unterschiede zwischen den stimulierten Tieren der beiden Genotypen waren zu beiden Zeitpunkten signifikant (*Abbildung 10B*).

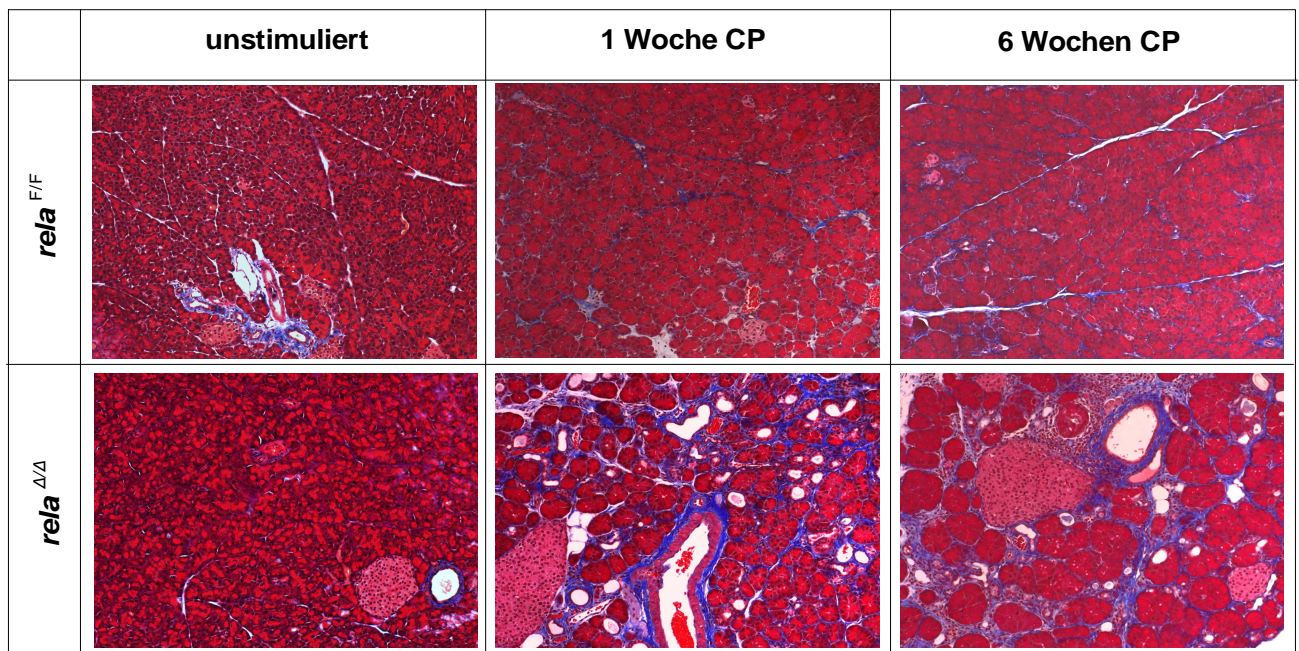
Neben Makrophagen erfolgte auch eine deutlich vermehrte Infiltration von Granulozyten in das Gewebe von stimulierten Tieren. Auch hier zeigten in der immunhistochemischen Färbung für den Granulozytenmarker Gr1 Caerulein-stimulierte *rela^{Δ/Δ}*-Mäuse sichtbar mehr positive Zellen im Vergleich zu den *rela^{F/F}*-Tieren. Insgesamt war die Infiltration durch Granulozyten gegenüber der durch Makrophagen deutlich geringer ausgeprägt (*Abbildung 10C*).

5.5. Fibrogenese nach Langzeitstimulation mit Caerulein

Bereits in den H.E.-gefärbten Gewebeschnitten war vor allem bei den stimulierten *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen eine beträchtliche Anhäufung fibrotischen Gewebes zu beobachten. Um eine genauere Vorstellung von der Fibroseentwicklung zu erhalten, wurden nun Pankreasgewebeschnitte mittels Masson-Trichrom-Färbung untersucht. In dieser Färbung stellen sich Kollagenfasern blau dar, während das Zytoplasma rot und Zellkerne schwarz angefärbt werden. Erwartungsgemäß färbte sich bei den unstimulierten Tieren nur das Bindegewebe um Blutgefäße oder die Mesenterialwurzel blau an (*Abbildung 11A*). Nach Langzeitstimulation mit Caerulein konnte eine deutliche Zunahme von kollagenen Fasern, vor allem bei den *rela^{Δ/Δ}*-Tieren, festgestellt werden. Auch bei den stimulierten *rela^{F/F}*-Mäusen war eine merkliche Fibrose zu erkennen, die vor allem interlobulär lokalisiert war und auch sechs Wochen nach Ende der Stimulation noch bestand. Auch zum späten Zeitpunkt waren die kollagenen Fasern nicht vermindert und erschienen noch dichter angeordnet. Bei den *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen war die Fibrosierung nicht nur weitaus stärker ausgeprägt, sondern auch inter- und intralobulär zu beobachten.

Als nächstes sollte nun das Ausmaß der Fibrose quantifiziert werden. Hierzu wurden zwei unabhängige Verfahren gewählt. Zunächst sollte das Ausmaß der Fibrosierung beider Mauslinien mittels morphometrischer Analyse von repräsentativen Masson-Trichrom-gefärbten Gewebeschnitten verifiziert werden. Eine statistisch signifikante Vermehrung des Bindegewebes bei den *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen konnte für die stimulierten

A



B

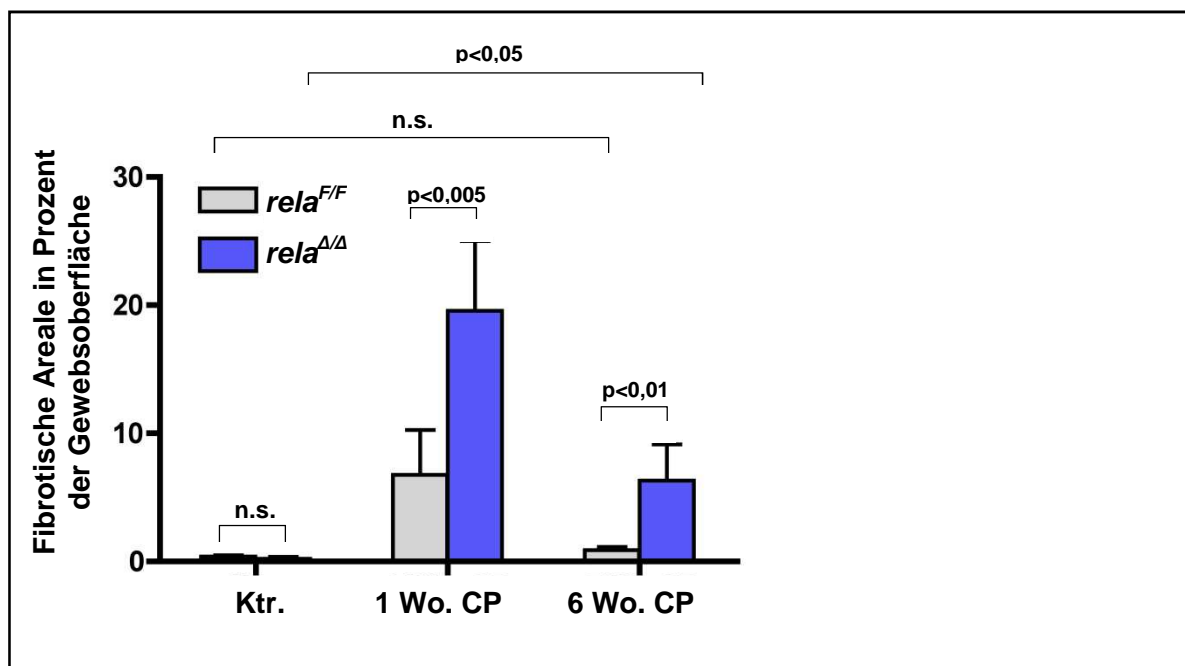


Abbildung 11:

A: Masson-Trichrom-Färbung von Pankreasgewebeschnitten von *rela*^{F/F}- und *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen zu den verschiedenen Zeitpunkten mit Blaufärbung von Kollagen-Fasern.

B: Morphometrische Analyse von fibrotischen (=blau angefärbten) Arealen im Pankreasgewebe von *rela*^{F/F}- im Vergleich zu *rela*^{Δ/Δ}-Tieren eine und sechs Wochen nach Ende der Caeruleinstimulation anhand von Masson-Trichrom-gefärbten Schnitten (n=4 pro Gruppe). Die *rela*^{Δ/Δ}-Mäuse weisen nach Caeruleinstimulation im Durchschnitt einen signifikant höheren Anteil an fibrotischem Gewebe auf.

Tiere, sowohl eine, als auch sechs Wochen nach Ende der Stimulation, nachgewiesen werden (*Abbildung 11B*). Des Weiteren wurde die Transkription der fibrogenetisch wirksamen Proteine Kollagen I und III, sowie Fibronectin, die bei der durch Pankreatitis verursachten Fibrose vorherrschend sind,⁶⁹ untersucht. Um die Transkription dieser Gene zu quantifizieren, wurde zunächst die aus den Pankreata isolierte mRNA, revers in cDNA transkribiert. Danach erfolgte die Amplifikation der cDNA mit spezifischen Primern für die zu untersuchenden Gene durch quantitative PCR-Analyse. Wie in *Abbildung 12A* zu erkennen, wurden bei den unstimulierten Tieren keine Transkripte dieser Gene detektiert. Nach Stimulation mit Caerulein war jedoch bei *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen die Transkription von Kollagen I, Kollagen III und Fibronectin zu beiden Untersuchungszeitpunkten deutlich hochreguliert. Bei den *rela*^{F/F}-Mäusen konnte nach Caerulein-Stimulation nur die Transkription von Kollagen I nachgewiesen werden, die aber geringer als die der *rela*^{Δ/Δ}-Tiere war.

Im nächsten Schritt wurden nun die Zellen näher untersucht, die für die gesteigerte Fibrogenese verantwortlich sein könnten, die pankreatischen Sternzellen (PSC). Wie schon in zahlreichen experimentellen und Beobachtungs-Studien gezeigt wurde, sind PSCs im normalen Pankreas in ihrer inaktiven Form vorhanden. Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren und verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen können PSCs in ihre aktive Form umgewandelt werden, in der sie Ähnlichkeit mit Myofibroblasten haben. Aktivierte PSCs exprimieren typischerweise α-SMA und sind in der Lage Extrazellulärmatrix-Proteine zu produzieren. In der chronischen Pankreatitis sowie beim Adenokarzinom des Pankreas stellen sie die Hauptquelle der Fibrose dar.^{10,14,18}

Um herauszufinden, ob auch im vorliegenden Modell nach Langzeitstimulation mit Caerulein eine Aktivierung von PSCs stattfindet, wurden Gewebeschnitte der Pankreata von *rela*^{F/F}- und *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen mit einem Antikörper gegen α-SMA gefärbt (*Abbildung 12B*). α-SMA wird physiologisch in den die Blutgefäßen umgebenden Myozyten exprimiert, die als Positivkontrolle dienen, und stellt wie bereits weiter oben erwähnt einen Marker für aktivierte PSCs dar. In den unstimulierten Kontrollen beider Genotypen zeigte sich erwartungsgemäß nur in den Gefäßwänden eine positive Färbung für α-SMA (*Abbildung 12B, Pfeil*). Bei den stimulierten Tieren jedoch konnte vor allem bei den *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen eine starke Zunahme an α-SMA-positiven Zellen beobachtet werden (*Abbildung 12B, Pfeilspitze*).

A

	unstim.	CP 1 Wo.	CP 6 Wo.
<i>rela</i>	<i>F/F</i> Δ/Δ	<i>F/F</i> Δ/Δ	<i>F/F</i> Δ/Δ
Kollagen I α 1			
Kollagen III α 1			
Fibronektin			
Cyclophilin			

B

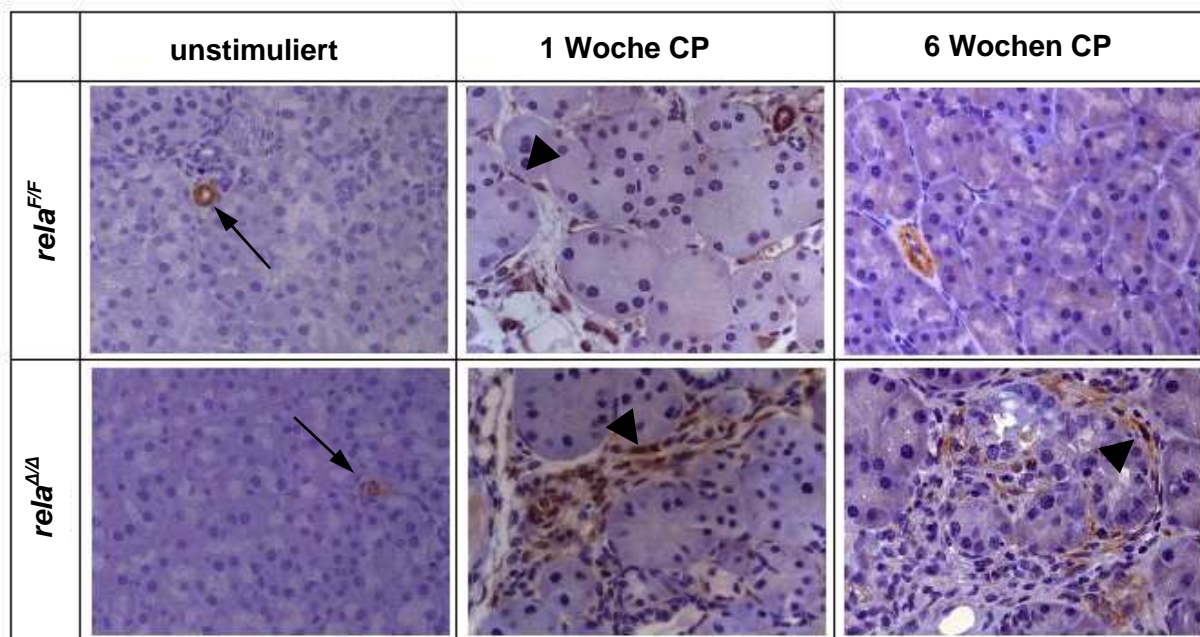


Abbildung 12

A: Vergleich der fibrotischen Reaktion bei *rela*^{F/F}- und *rela* ^{Δ/Δ} -Mäusen mittels quantitativer PCR von Kollagen I und III, sowie Fibronektin. Ladekontrolle mit Cyclophilin. (pro Gruppe n=4, jeweils eine repräsentative Probe abgebildet)

B: Immunhistochemische Analyse des Pankreasgewebes mit einem Antikörper gegen α -SMA als Marker für aktivierte PSCs. Während α -SMA bei unstimulierten Tieren nur in glatten Muskelzellen von Blutgefäßen (Pfeil) detektiert werden konnte, waren nach Stimulation mit Caerulein aktivierte PSCs (Pfeilspitze) erkennbar.




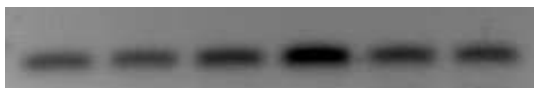


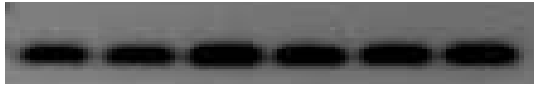


Zum späten Zeitpunkt nach Ende der Stimulation mit Caerulein, konnten bei den *rela^{F/F}*-Mäusen kaum noch positive Zellen nachgewiesen werden, wohingegen die *rela^{Δ/Δ}*-Tiere immer noch eine beträchtliche Zahl von aktivierten PSCs zeigten.

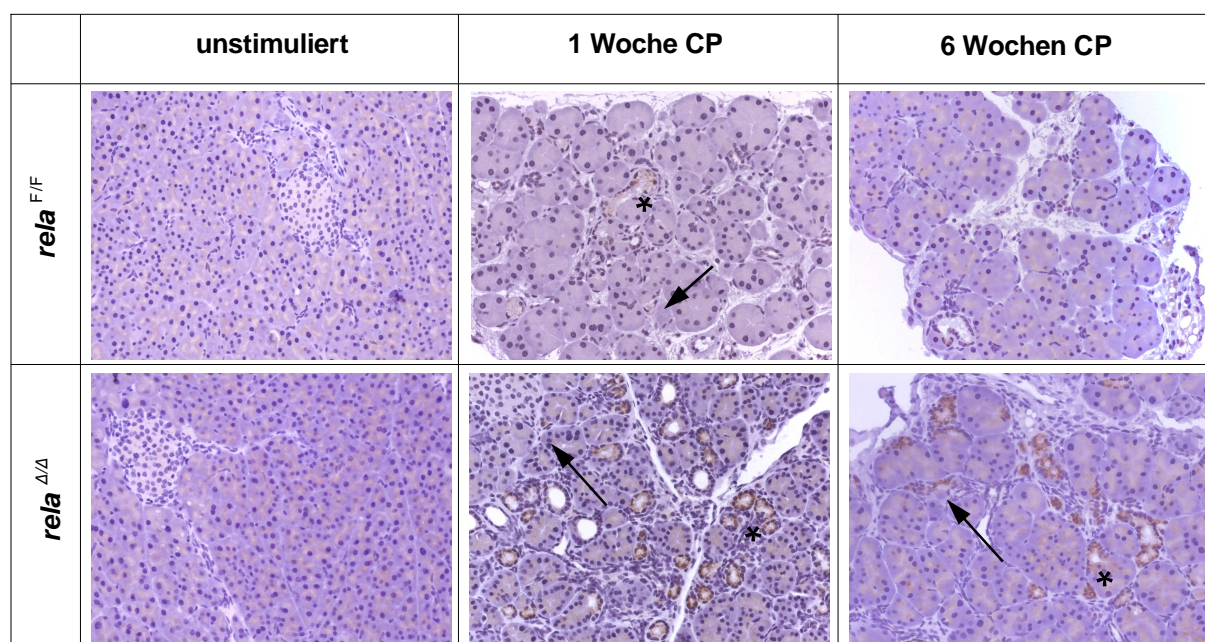
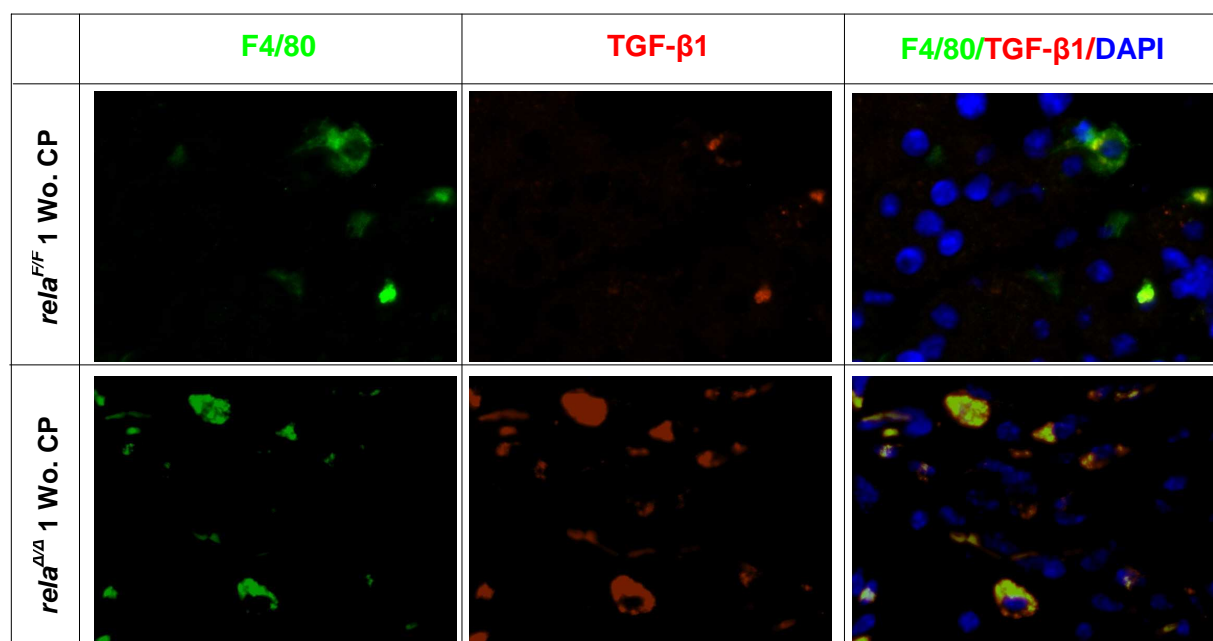
Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen eine gesteigerte Aktivierung von PSCs in den Mäusen mit funktionell inaktiviertem pankreatischem RelA/p65. Diese Aktivierung wird in *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen aufrechterhalten, was zu einer verstärkten Synthese von profibrotischen Proteinen führt.

5.6. Mechanismen der vermehrten Fibrogenese

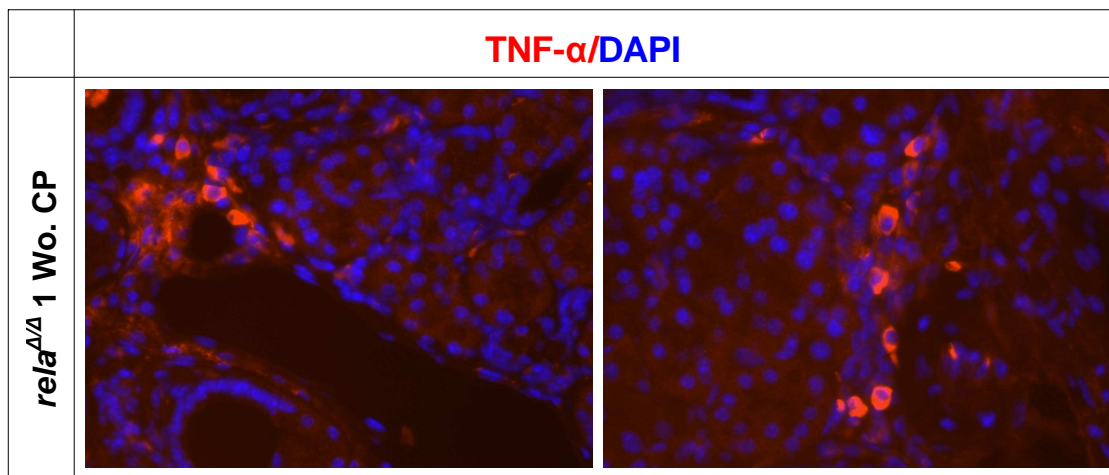
Nachdem eine gesteigerte Fibrosierung bei *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen nach wiederholter Stimulation mit Caerulein festgestellt wurde, sollte nun der zugrundeliegende Mechanismus der PSC-Aktivierung näher beleuchtet werden. PSCs können bekanntermaßen durch verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokine in ihre aktive Form transformiert werden.^{12,116} Um nun herauszufinden, ob die genannten Faktoren auch im vorliegenden Modell eine bedeutende Rolle für die Aktivierung der PSCs spielen, wurden die Expressionslevel mit quantitativer PCR-Analyse untersucht. Wie in *Abbildung 13A* gezeigt wird, ist die Expression von TGF-β bei den stimulierten *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen gegenüber den *rela^{F/F}*-Tieren deutlich erhöht, wohingegen PDGF nur leicht hochreguliert ist. IL-1 und IL-6 unterschieden sich bei den beiden Genotypen nicht wesentlich (Daten ohne *Abbildung*). In der immunhistochemischen Färbung für TGF-β, (*Abbildung 13B*) sowie in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für TGF-β und F4/80 (*Abbildung 13C*) erwiesen sich vor allem infiltrierende Makrophagen als die Quelle für die TGF-β-Expression. TNF-α ließ sich in der Immunfluoreszenz ebenfalls in infiltrierenden Zellen, wie auch in gangähnlichen Komplexen nachweisen (*Abbildung 13D*). Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass TGF-β, TNF-α und zu einem geringeren Ausmaß auch PDGF, die vor allem von infiltrierenden Zellen produziert werden, für die Aktivierung von PSCs und die daraus resultierende Fibroseentstehung bei den Caerulein-stimulierten *rela^{Δ/Δ}*-Mäusen verantwortlich sind.

A

	unstim.	CP 1 Wo.	CP 6 Wo.
<i>rela</i>	F/F Δ/Δ	F/F Δ/Δ	F/F Δ/Δ
TGF- β 1			
PDGF			
Cyclophilin			

B**C**

D

**Abbildung 13**

A: Quantitative PCR von TGF- β 1 und PDGF, Cyclophilin als Ladekontrolle. Es zeigte sich eine erhöhte Expression, vor allem von TGF- β 1, bei den mit Caerulein stimulierten *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Tieren. (pro Gruppe n=4, jeweils eine repräsentative Probe abgebildet)

B: Immunhistochemie von Pankreasgewebe mit einem Antikörper gegen TGF- β 1. Die TGF- β 1-Expression war nach Caerulein-Stimulation bei *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Mäusen deutlich verstärkt. Ein Teil der TGF- β 1-Expression wurde in infiltrierenden Zellen (Pfeil) verzeichnet, ein geringerer Anteil in den gangähnlichen Komplexen (Stern).

C: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für F4/80 (grün) und TGF- β 1 (rot) von *rela*^{F/F}- und *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Mäusen, die eine Woche nach der letzten Injektion eine Coexpression der beiden Proteine in den Pankreata von Caerulein-stimulierten Tieren zeigt.

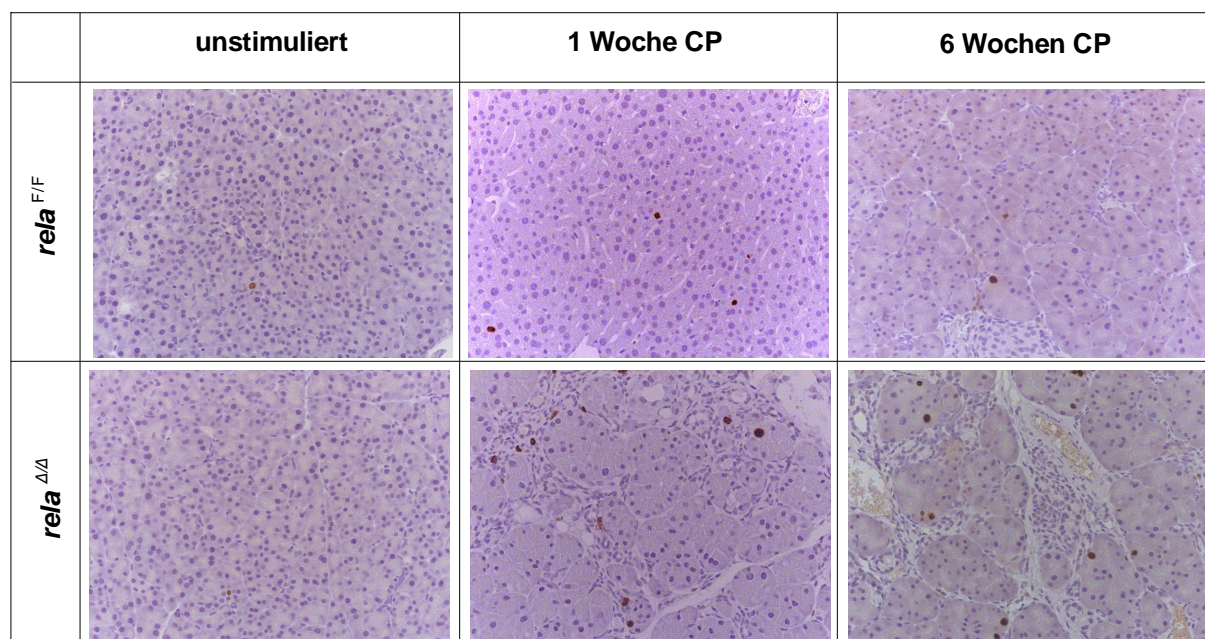
D: Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen TNF α (rot), Kernfärbung mit DAPI (blau) bei einer *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Maus eine Woche nach Ende der Caerulein-Stimulation. TNF- α lässt sich vermehrt sowohl in infiltrierenden Zellen (rechte Seite), als auch in gangähnlichen Komplexen nachweisen (linke Seite).

5.7. Regeneration von Azinuszellen nach Caerulein-Langzeitstimulation

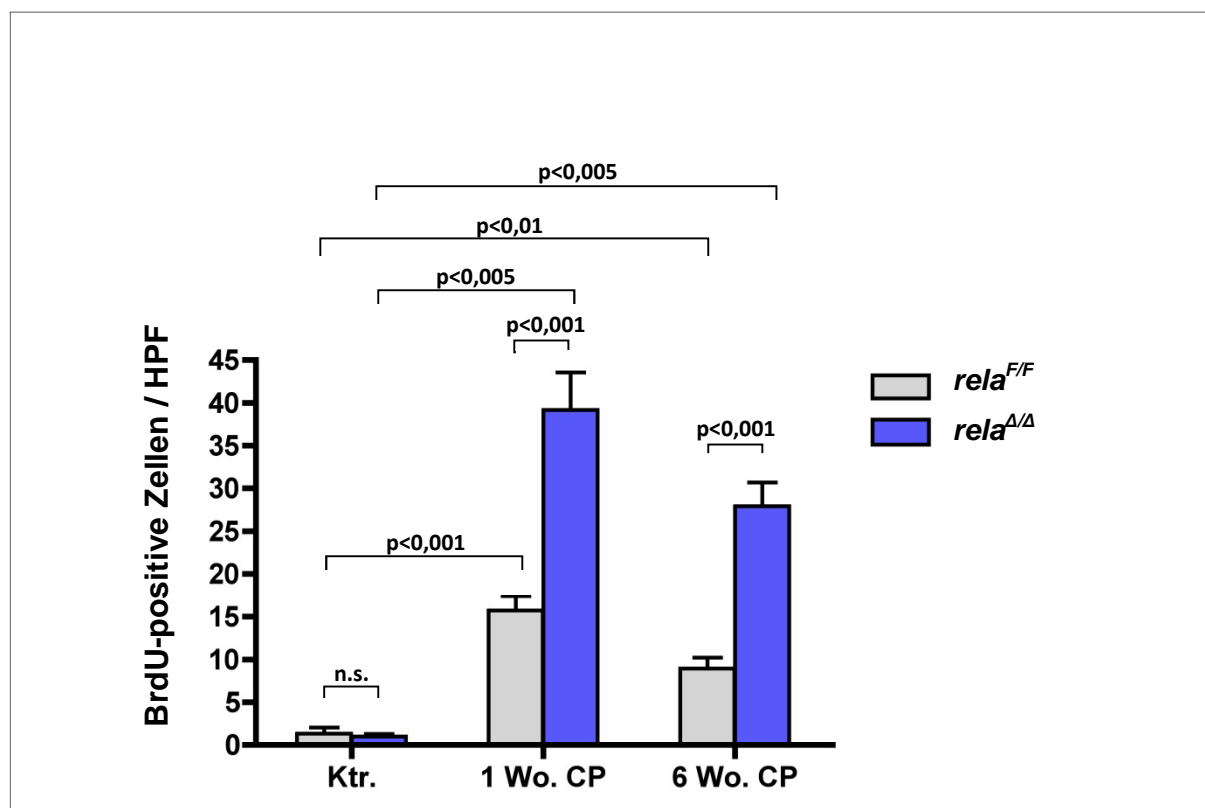
Die beim Menschen stark limitierte Regenerationsfähigkeit des Pankreas ist eines der fundamentalen Probleme beim Management von Erkrankungen wie der chronischen Pankreatitis oder dem Diabetes mellitus. Allerdings wurde in einigen Modellversuchen an Nagetieren eine Regeneration nach Schädigung von pankreatischem Gewebe beobachtet.^{89,95} Vor allem die Proliferation von endokrinem Pankreasgewebe wurde von vielen Autoren untersucht. In den meisten dieser Studien wurde eine Vorläuferzelle als Ursprung der Regeneration des endo- und exokrinen Pankreas vermutet. In einer genetischen Untersuchung wurden jedoch auch ausdifferenzierte exokrine Zellen als Ursprung der Regeneration des endokrinen Gewebes postuliert.³⁰

Nachdem im vorliegenden Modell Zeichen einer schweren Schädigung von Pankreasgewebe festgestellt werden konnte, war nun von Interesse, ob auch Regeneration stattfindet. Um die Proliferation der pankreatischen Zellen zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Bromodesoxyuridin (BrdU) angefärbt. BrdU, das den Versuchstieren jeweils zwei Stunden vor der Euthanasierung injiziert worden war, ist ein Thymidinanalogon, das in neu synthetisierte DNA eingebaut wird und somit Zellen, die gerade die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen, markiert. Wie auch bereits publiziert,³ konnten auch in den Analysen bei unstimulierten Tieren beider Genotypen kaum proliferierende Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 14A/B*). Nach dem durch Langzeitstimulation mit Caerulein verursachten Gewebeschaden konnte jedoch eine bemerkenswerte Zunahme von BrdU-positiven Zellen festgestellt werden. Erstaunlicherweise war die Proliferation zu beiden Zeitpunkten bei den *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen signifikant höher als bei den *rela*^{F/F}-Tieren. Diese Ergebnisse waren unerwartet, da zuvor eine reduzierte Regenerationsfähigkeit bei den *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen beobachtet wurde, wie das reduzierte Gewicht und die reduzierte Größe des Pankreas (*Abbildung 8*) sowie der Verlust von azinärem Gewebe (*Abbildung 9*) zeigen. Die Quantifizierung der Proliferation durch Auszählung der BrdU-positiven Zellen an repräsentativen immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten bestätigte diese Beobachtung (*Abbildung 14 B*). Obwohl einige proliferierende Gangzellen gefunden werden konnten, war der Großteil der BrdU-positiven Zellen

A



B



C

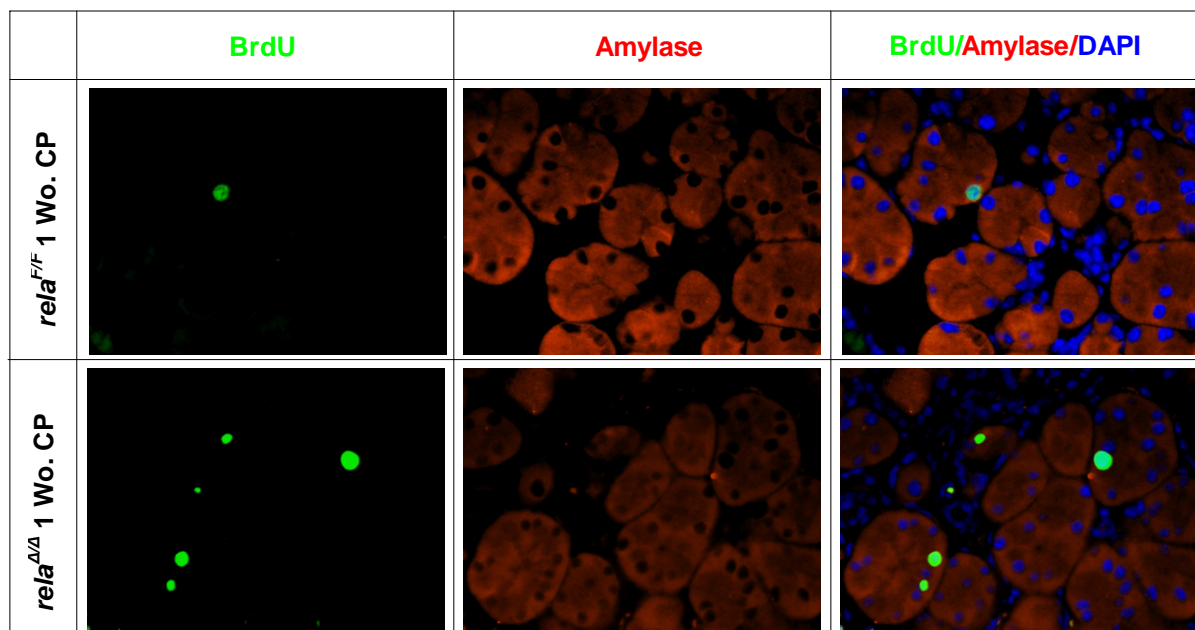


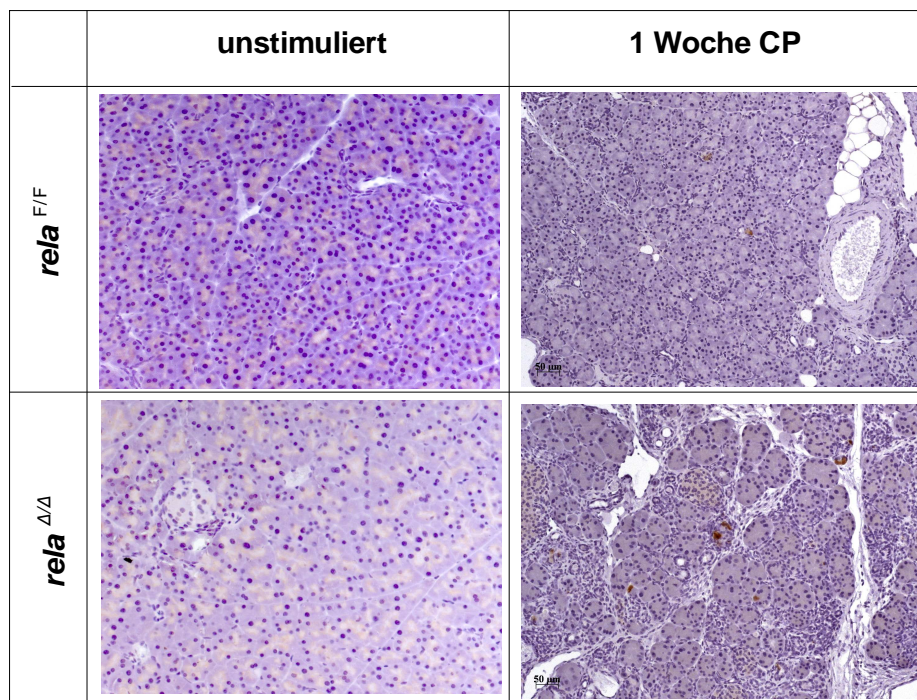
Abbildung 14

A: Immunhistochemische Färbung des Pankreasgewebes von *rela*^{F/F}- und *rela*^{Δ/Δ}- Mäusen mit einem Antikörper gegen Bromodesoxyuridin (BrdU), das den Tieren 2 Stunden vor der Euthanasierung intraperitoneal injiziert wurde. Vor allem bei den *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen zeigt sich eine deutliche Zunahme von proliferierenden (BrdU-positiven) Zellen.

B: Quantifizierung BrdU-positiver Zellen. Nach repetitiver Caerulein-Stimulation war die Zahl der positiven Zellen pro repräsentativem Bildausschnitt nach einer Woche bei *rela*^{F/F}-Mäusen und *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen erhöht. Bei stimulierten *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen zeigte sich eine signifikant höhere Zahl von BrdU-positiven-Zellen gegenüber den stimulierten *rela*^{F/F}-Mäusen.

C: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Amylase und BrdU. Die Coexpression von Amylase und BrdU zeigt, dass die proliferierenden Zellen azinären Ursprungs sind.

A



B

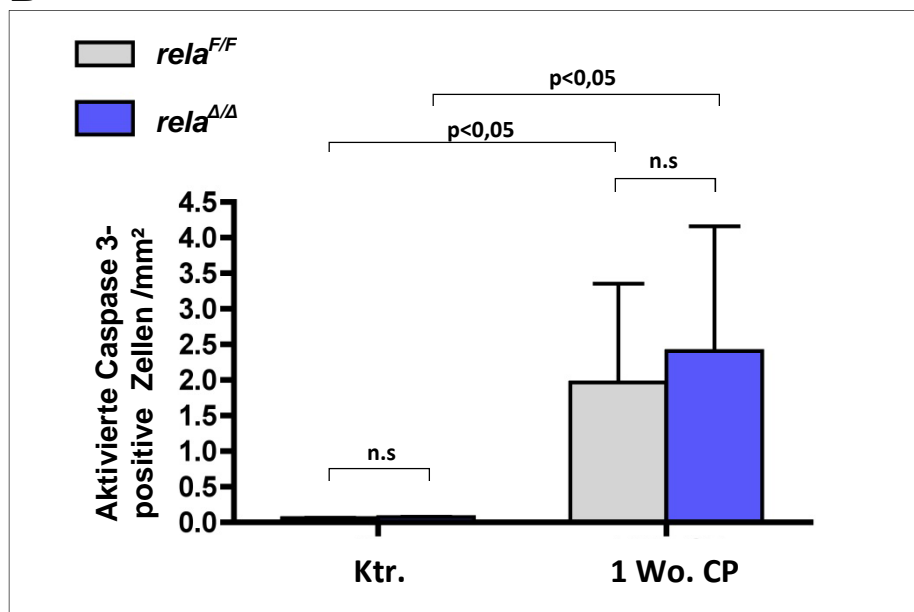


Abbildung 15

A: IHC mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3, einem Apoptosemarker. Im Gegensatz zu unstimulierten Tieren zeigten sich eine Woche nach Ende der Caerulein-Stimulation Apoptosen innerhalb der Azini, sowohl bei den *rela*^{F/F}-, als auch bei den *rela*^{Δ/Δ}-Tieren.

B: Quantifizierung Caspase 3-positiver Zellen anhand der Auszählung an repräsentativen Gewebeschnitten, die mit einem AK gegen aktivierte Caspase 3 gefärbt wurden. Bei unstimulierten Tieren ergaben sich keine Unterschiede. Nach repetitiver Caeruleinstimulation zeigte sich ein signifikanter Anstieg von positiven Zellen bei beiden Genotypen (pro Gruppe n=5). Der Unterschied zwischen den stimulierten *rela*^{F/F}- und *rela*^{Δ/Δ}-Tieren war jedoch statistisch nicht signifikant.

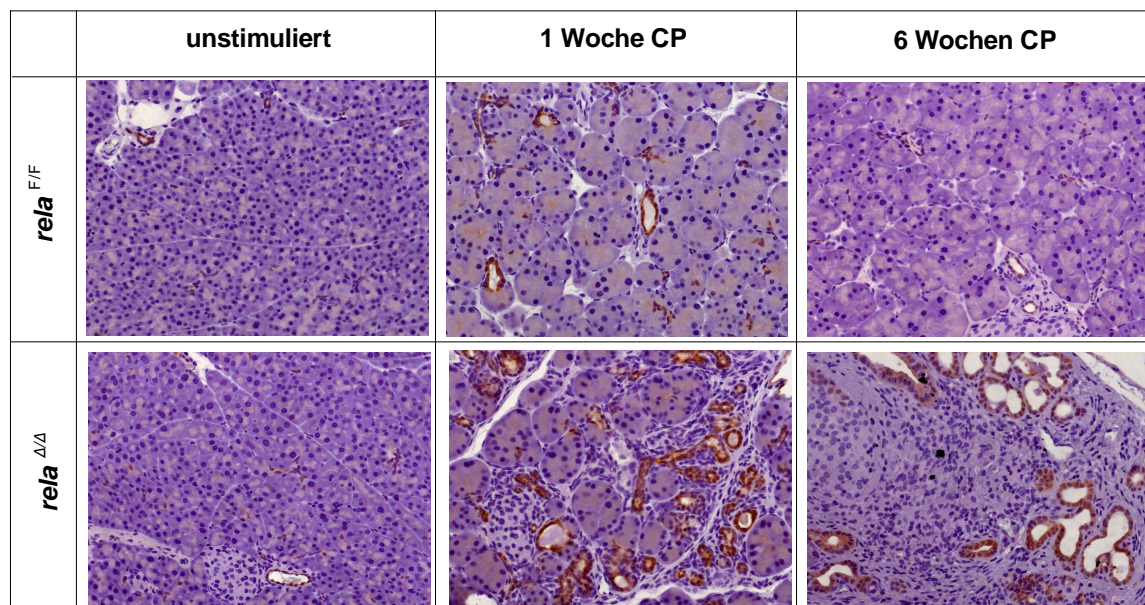
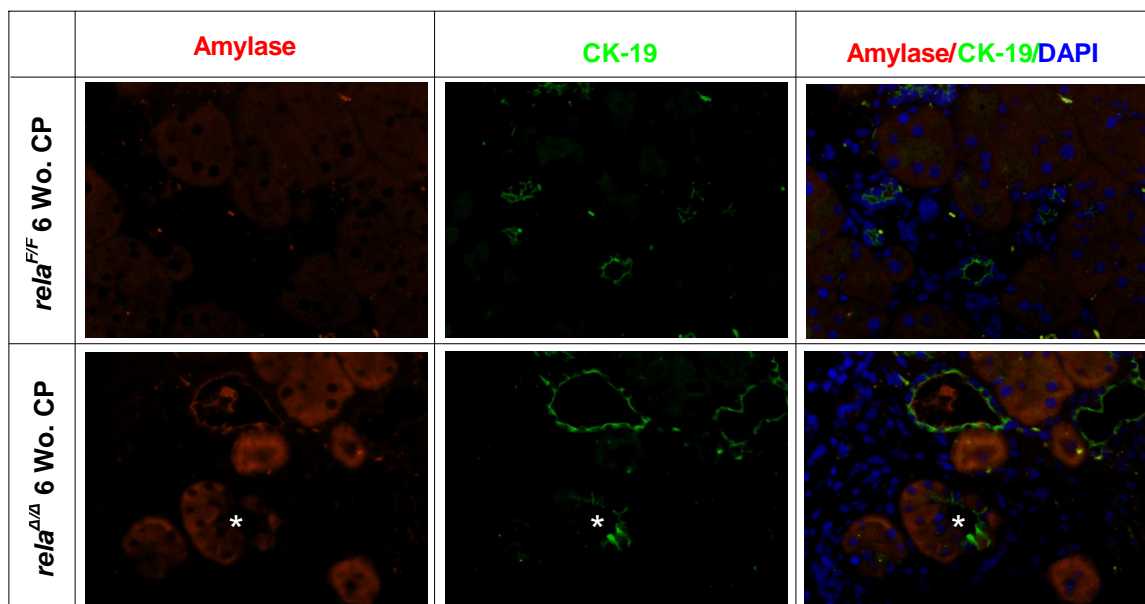
azinären Ursprungs, wie in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für BrdU und Amylase deutlich wird (*Abbildung 14C*).

Um die Ursache des trotz der gesteigerten Proliferationsrate deutlichen Verlusts an azinärem Gewebe zu eruieren, wurden zudem Pankreasgewebeschnitte mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 gefärbt, um die Zahl der in Apoptose gehenden Zellen zu bestimmen. Hier zeigte sich zwar bei den stimulierten *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen im Vergleich zu den *rela*^{F/F}-Tieren eine leicht erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen, der Unterschied bei der Auszählung war jedoch nicht statistisch signifikant (*Abbildung 15*), so dass eine erhöhte Apoptoserate nicht als Erklärung für den Zellverlust angenommen werden kann.

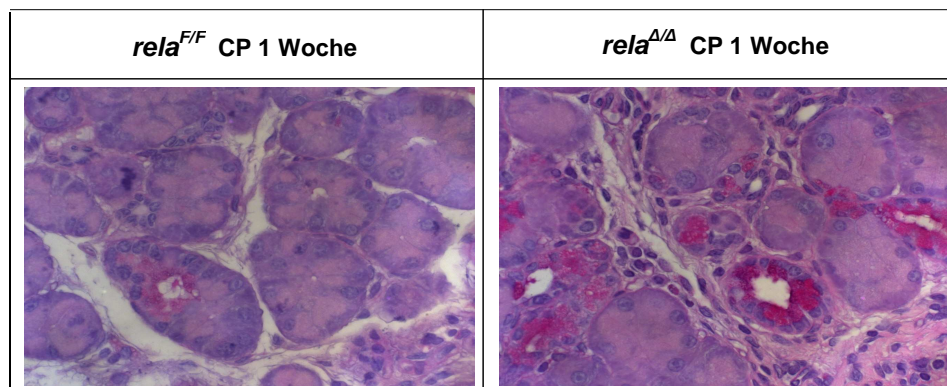
Diese Diskrepanz zwischen der erhöhten Proliferationsrate und der verminderten Effizienz der Regeneration von Azinuszellen könnte durch zwei Mechanismen erklärt werden: zum einen könnte die Zahl der Zellnekrosen die Regenerationskapazität übersteigen, was zu einem Nettoverlust an Zellen führen würde, zum anderen könnten die proliferierenden Zellen einen Defekt in der Differenzierung haben, möglicherweise als Folge der chronischen Entzündung, die ein ungünstiges zelluläres Milieu verursacht. In diesem Fall würde der Differenzierungsdefekt dazu führen, dass aus den proliferierenden Zellen keine funktionsfähigen Azinuszellen entstehen.

5.8. Transdifferenzierung von azinären Zellen nach repetitiver Caerulein-Stimulation

Ein häufig beschriebenes und bis jetzt nur unzureichend geklärtes histologisches Merkmal der chronischen Pankreatitis stellt die Formation von gangähnlichen Strukturen (*duct-like structures*) dar.²⁹ Auch im vorliegenden Modell zeigten sich, vor allem bei den *rela*^{Δ/Δ}-Tieren, nach Langzeitstimulation mit Caerulein, vermehrt gangähnliche Formationen im azinärem Gewebe. Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden Schnitte mit einem Antikörper gegen den Gangmarker Zytokeratin 19 (CK19), der duktales Zellen epithelialer Herkunft anzeigt, gefärbt. Hier zeigte sich eine deutliche Anfärbung der tubulären, gangähnlichen Komplexe (*Abbildung 16A*) die vor allem bei den stimulierten *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen in großer Zahl vorhanden waren, in sehr geringem Maß auch bei den stimulierten *rela*^{F/F}-Mäusen.

A**B**

C

**Abbildung 16**

A: IHC mit einem AK gegen den duktaalen Marker Zytokeratin 19 (CK19). Bei den *rela*^{Δ/Δ}-Tieren zeigt sich nach Caerulein-Stimulation eine große Zahl gangähnlicher Komplexe, die auch zum späten Zeitpunkt noch persistiert.

B: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Amylase und CK19. Die doppelt positiven Zellen in dem gangähnlichen Komplex (Stern) deuten auf eine Transdifferenzierung von Azinuszellen in duktaale Zellen hin.

C: Perjodsäure-Schiff-(PAS) Färbung von Wildtyp- und Knockout-Tieren jeweils eine Woche nach Ende der Stimulation. Die rötliche Färbung weist Muzin nach. Die *rela*^{Δ/Δ}-Tiere zeigen eine deutlich stärkere Anfärbung.

Um zu untersuchen, ob diese CK-19-positiven Gangzellen azinären Ursprungs sind und sich unter Caerulein-Stimulation transdifferenziert haben, wurde zusätzlich eine Doppelfärbung für CK-19 und Amylase durchgeführt. Hierbei konnten auch noch sechs Wochen nach der letzten Stimulation Zellen innerhalb der tubulären Komplexe identifiziert werden, die sowohl für CK-19, als auch für Amylase positiv waren (*Abbildung 16B*). Anhand dieser Untersuchungen kann man davon ausgehen, dass es sich um Zellen azinären Ursprungs handelt, die unter der Stressreaktion des Gewebes ihre azinäre Differenzierung und damit ihre Funktion als Amylase-produzierende Zellen verloren und sich in duktales Zellen umgewandelt haben.

Da die Formation von gangähnlichen Komplexen auch als ein Anfangsstadium auf dem Weg zur pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) angesehen wird, wurde außerdem eine Perjodsäure-Schiff(PAS)-Färbung durchgeführt. In dieser Färbung stellen sich muzinproduzierende Zellen positiv dar, diese Muzinproduktion ist auch ein frühes Merkmal der PanINs. In der PAS-Färbung zeigten die gangähnlichen Komplexe bei Caerulein-stimulierten Tieren eine positive Färbung für Muzine (*Abbildung 16C*).

Die Ergebnisse sowohl der CK-19- als auch der PAS-Färbung legen nahe, dass die Pankreaszellen der *rela*^{Δ/Δ}-Mäuse im Vergleich zu den der *rela*^{F/F}-Geschwistern unter Zellstress-Situationen ihre azinäre Differenzierung nicht in vollem Ausmaß aufrechterhalten können und vermehrt in duktales bzw. muzinproduzierende Zellen übergehen. Dies deutet im Umkehrschluss auf eine mögliche Schutzfunktion von RelA/p65 gegenüber Trans- und Dedifferenzierung während der CP hin.⁸⁶

5.9. Zusätzliche Deletion von RelA/p65 in myeloischen Zellen

Trotz der bekannten proinflammatorischen Rolle von RelA/p65 weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine protektive Rolle des Transkriptionsfaktors hin, da die funktionelle Inaktivierung in exokrinen Pankreaszellen zu einem aggravierten Phänotyp führt. Allerdings ist RelA/p65 in *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen nur in pankreatischen Zellen funktionell inaktiv, nicht jedoch in anderen Zelltypen, die bei der CP involviert sind. Myeloische Zellen, vor allem Makrophagen, spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der chronischen Entzündung des Pankreas, da sie in der Lage sind die Fibrogenese durch parakrin

sezernierte Zytokine, die die PSCs zur Produktion fibrotischer Fasern aktivieren, zu initiieren.¹¹⁵

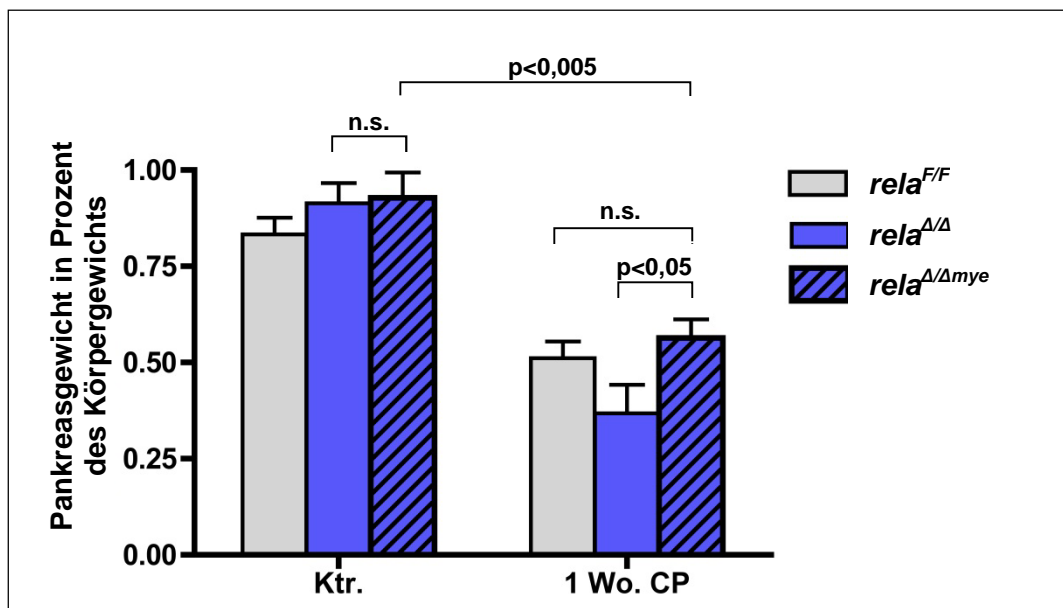
Die meisten dieser Zytokine werden unter der Kontrolle von NF- κ B exprimiert und besitzen eine Bindungsstelle für RelA/p65.⁹⁴ Daher sollten nun die Auswirkungen einer zusätzlichen Deletion von RelA/p65 in myeloischen Zellen in der experimentellen CP untersucht werden.

Wie bereits in (*Abbildung 7B*) gezeigt wurde, ist RelA/p65 im Pankreas stimulierter Wildtyp-Mäuse aktiviert und nukleär transloziert. Bei *rela* ^{Δ/Δ} -Mäusen wurde in azinären Zellen keine RelA/p65-Aktivierung festgestellt, jedoch in infiltrierenden Zellen (*Abbildung 7B, Stern*). Dies legt nahe, dass RelA/p65 in myeloischen Zellen eine Rolle bei der Pathogenese der CP spielt. Diese sollte in den folgenden Experimenten weiter charakterisiert werden.

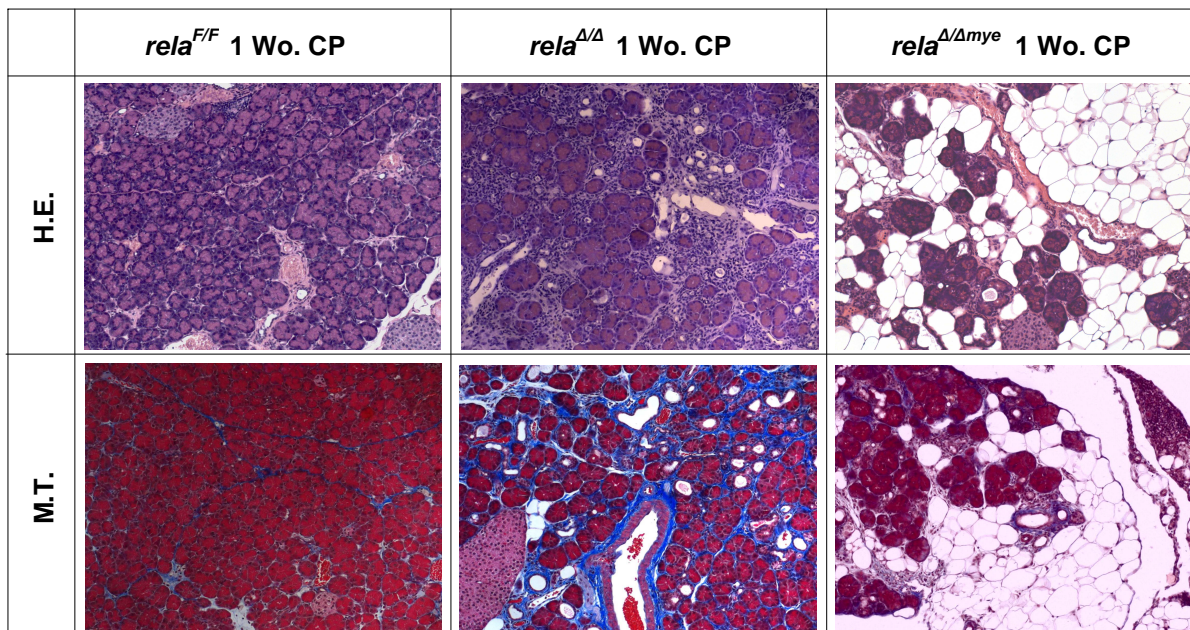
Um nun eine zusätzliche Deletion von RelA/p65 in myeloischen Zellen zu erreichen, wurden *rela* ^{Δ/Δ} -Tiere mit einer anderen Mauslinie verkreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Lysozym M-Promoters exprimiert. Bei diesen Mäusen (im folgenden *rela* ^{Δ/Δ *mye*} genannt), ist RelA/p65 also nicht nur in Zellen pankreatischen Ursprungs, sondern auch in Zellen myeloischer Herkunft (Makrophagen, Granulozyten, nicht jedoch B und T-Zellen) deletiert³⁹.

Nachdem auch an diesen Mäusen das o.g. Schema der Caeruleininjektionen durchgeführt worden war, wurden die Tiere ebenfalls eine Woche nach der letzten Injektion euthanasiert und das Pankreasgewebe analysiert. Makroskopisch erschienen die Pankreata der *rela* ^{Δ/Δ *mye*}-Mäuse nach der Langzeitstimulation mit Caerulein wie die Organe der stimulierten Wildtyp-Tiere, auch das relative Pankreasgewicht unterschied sich nicht signifikant (*Abbildung 17A*). Anhand der histologischen Untersuchungen konnte zunächst festgestellt werden, dass die Caerulein-Langzeitstimulation bei den *rela* ^{Δ/Δ *mye*}-Mäusen zu einem vergleichbaren Verlust an azinären Zellen geführt hatte wie bei den Mäusen, mit rein pankreasspezifischer Deletion von RelA/p65 (*rela* ^{Δ/Δ}). Die Abnahme an funktionellem exokrinem Pankreasgewebe war jedoch nicht in demselben Maße mit einer Fibrosierung des Organs vergesellschaftet, wie bei den *rela* ^{Δ/Δ} -Tieren (*Abbildung 17B*). Überraschenderweise erschienen bei den *rela* ^{Δ/Δ *mye*}-Tieren die Azinuszellen vielmehr durch fettspeichernde Zellen ersetzt worden zu sein, die die Morphologie von Adipozyten zeigten und sich positiv für den Fett-Marker Oil-Red-O anfärbten (*Abbildung 17C*).

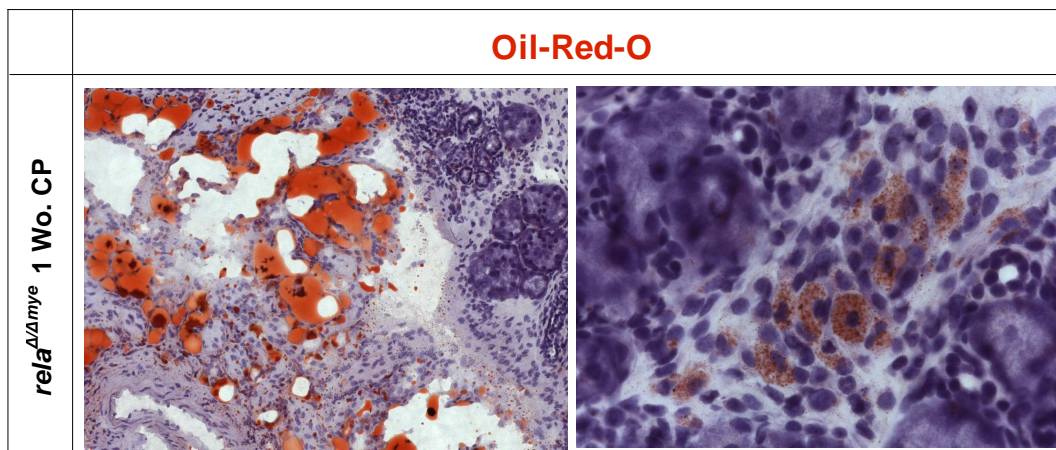
A



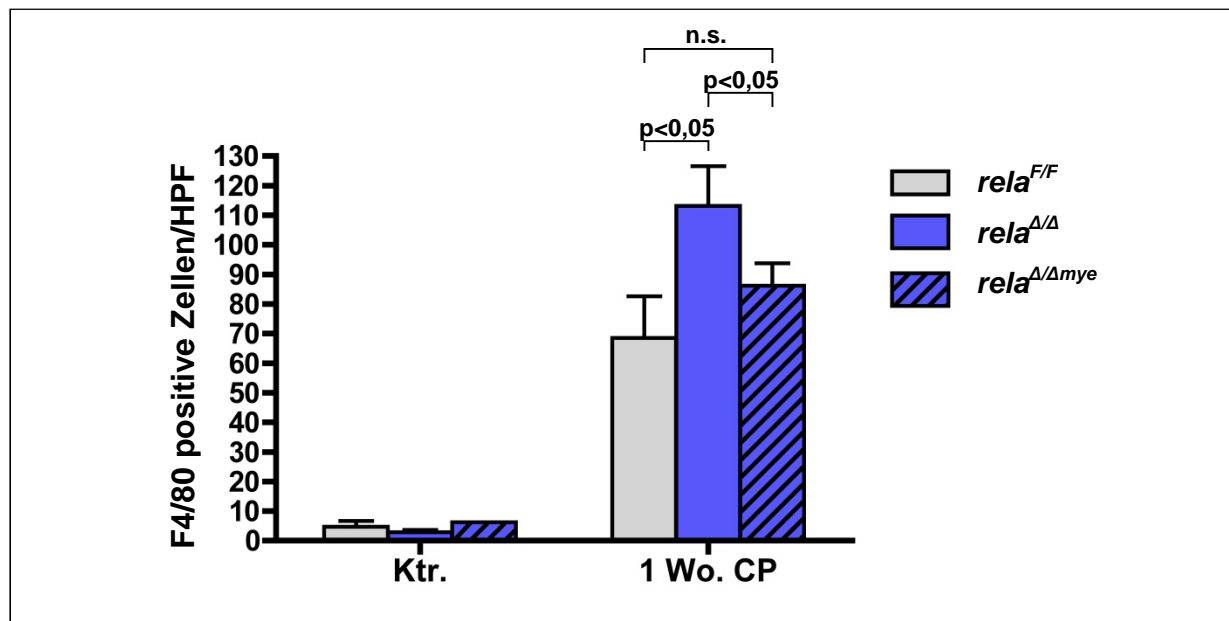
B



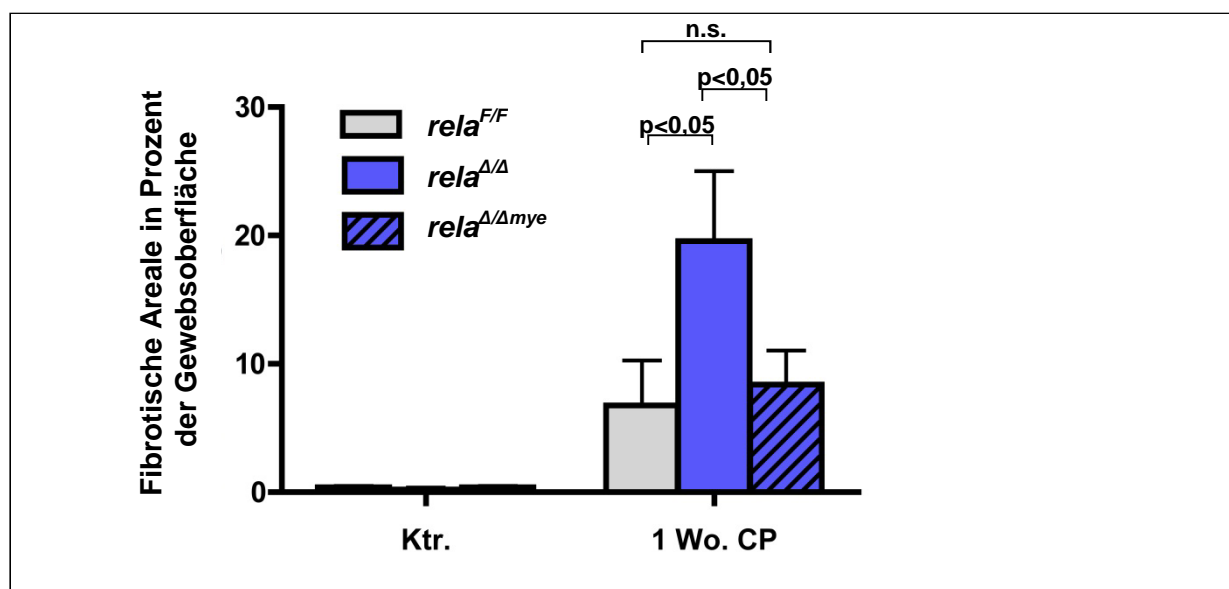
C



D



E



F

<i>rela</i>	unstim.		CP 1 Woche		
	<i>F/F</i>	Δ/Δ	<i>F/F</i>	Δ/Δ	Δ/Δ <i>mye</i>
TNF- α					
TGF- β					
Kollagen I α 1					
Kollagen III α 1					
Cyclophilin					

Abbildung 17

A: Relatives Pankreasgewicht von *rela*^{F/F}-, *rela* ^{Δ/Δ} - und *rela* ^{Δ/Δ *mye*}- Mäusen in Prozent des Körpergewichts. (n=5, n.s.: nicht signifikant; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an)

B: Histologische Eigenschaften von *rela*^{F/F}, *rela* ^{Δ/Δ} - und *rela* ^{Δ/Δ *mye*}- Mäusen eine Woche nach der letzten Caerulein-Injektion, jeweils in der Hämatoxylin-Eosin und der Masson-Trichrom Färbung. Die *rela* ^{Δ/Δ *mye*}-Tiere entwickelten im Vergleich zu den *rela* ^{Δ/Δ} -Tieren einen vergleichbaren Verlust von Azinuszellen, allerdings weniger Fibrose. Bei den *rela* ^{Δ/Δ *mye*}-Mäusen wurden die Azinuszellen durch fettspeichernde-Zellen ersetzt.

C: Oil-Red-O-gefärbte Pankreasgewebeschnitte von *rela* ^{Δ/Δ *mye*}- Mäusen eine Woche nach der letzten Caerulein-Injektion. Fett stellt sich in dieser Färbung rötlich-orange dar. Links Übersicht mit deutlicher fettiger Degeneration des Pankreasgewebes, rechts einzelne Zellen mit intrazytoplasmatischen Fetteinlagerungen.

D: Quantifizierung der Makrophagen-Infiltration bei *rela*^{F/F}, *rela* ^{Δ/Δ} - und *rela* ^{Δ/Δ *mye*}- Mäusen zu den verschiedenen Zeitpunkten anhand von repräsentativen Gewebeschnitten, die mit einem AK gegen F4/80 angefärbt wurden. Bei zusätzlicher Inaktivierung von RelA in myeloiden Zellen (*rela* ^{Δ/Δ *mye*}) war die Zahl der F4/80-positiven Zellen mit der der *rela*^{F/F}-Mäuse vergleichbar. (pro Gruppe n=5, n.s.: nicht signifikant; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an)

E: Morphometrische Analyse der Amylase-positiven Areale in Prozent im Pankreasgewebe von *rela*^{F/F}, *rela* ^{Δ/Δ} - und *rela* ^{Δ/Δ *mye*}- Mäusen anhand von immunhistochemisch mit einem AK gegen Amylase gefärbten Schnitten (pro Gruppe n=4).

F: Quantitative PCR von TNF α , TGF- β 1, Kollagen I und III von *rela*^{F/F}, *rela* ^{Δ/Δ} und *rela* ^{Δ/Δ *mye*}-Mäusen. Nach Langzeitstimulation mit Caerulein war die Expression aller Gene bei den *rela* ^{Δ/Δ} -Tieren deutlich erhöht. Das Expressionsniveau war in *rela* ^{Δ/Δ *mye*}-Mäusen verglichen mit den *rela*^{F/F}-Mäusen ebenfalls höher, jedoch niedriger als in *rela* ^{Δ/Δ} -Mäusen. (pro Gruppe=4, je eine repräsentative Probe abgebildet)

Die Vermutung war nun, dass nach der funktionellen Inaktivierung von RelA/p65 in myeloischen Zellen die Fähigkeit zur Gewebsinvasion reduziert war, da auch die Expression der meisten Zytokine NF- κ B abhängig reguliert wird. Daher wurden Pankreasgewebeschnitte von $rela^{\Delta/\Delta mye}$ -Mäusen nun ebenfalls mit einem Antikörper gegen den Makrophagenmarker F4/80 gefärbt. Wie in *Abbildung 10A und B* gezeigt, war die Zahl der infiltrierenden Makrophagen eine Woche nach Ende der Stimulation bei $rela^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen, signifikant erhöht im Vergleich zu $rela^{F/F}$ -Mäusen. Bei zusätzlicher funktioneller Inaktivierung von RelA/p65 in myeloischen Zellen ($rela^{\Delta/\Delta mye}$) zeigte sich wiederum eine deutlich geringer ausgeprägte Infiltration durch Makrophagen, die mit der von Wildtyp-Tieren vergleichbar war (*Abbildung 17D*). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Deletion von RelA/p65 in pankreatischen Zellen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber exogen induzierter Pankreatitis führt und demzufolge durch vermehrte Nekrosen auch in erhöhtem Maße myeloische Zellen angezogen werden. Die zusätzliche Deletion von RelA/p65 in myeloischen Zellen führt jedoch dazu, dass sich deren Fähigkeit zur Gewebsinvasion bei einem Entzündungsprozess vermindert.

Die Fibrosereaktion der $rela^{\Delta/\Delta mye}$ -Mäuse im Vergleich zu den $rela^{F/F}$ - und $rela^{\Delta/\Delta}$ -Tieren wurde ebenfalls mittels morphometrischer Analyse von M.T.-gefärbten Gewebeschnitten untersucht. Hier war das Ausmaß der Fibrose bei den $rela^{\Delta/\Delta mye}$ -Mäusen vergleichbar mit denen der $rela^{F/F}$ -Tiere. Im Vergleich zu den Mäusen mit nur pankreatisch inaktiviertem RelA/p65 ergab sich ein signifikant geringerer Anteil. (*Abbildung 17E*)

Nun wurde an Proben von stimulierten $rela^{F/F}$, $rela^{\Delta/\Delta}$, sowie $rela^{\Delta/\Delta mye}$ -Mäusen mittels quantitativer PCR die Expression von Zytokinen untersucht, die für eine PSC-Aktivierung verantwortlich sind (*Abbildung 17F*). Es konnte eine deutlich geringere Hochregulierung von TNF- α und TGF- β bei $rela^{\Delta/\Delta mye}$ -Tieren im Vergleich zu den $rela^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen beobachtet werden. Diese weniger stark ausgeprägte Expression von PSC-aktivierenden Faktoren resultierte in einem milderem Ausmaß von Fibrose bei den $rela^{\Delta/\Delta mye}$ -Tieren, wie morphologisch und biochemisch nachgewiesen wurde (*Abbildung 17 E/F*). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine funktionelle Inaktivierung von RelA/p65 im Pankreas und zusätzlich in myeloischen Zellen, den Phänotyp nicht vor dem massiven Verlust von Azinuszellen bewahrt, den man an $rela^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen feststellen konnte. Allerdings führt die verminderte Infiltration von weißen Blutzellen

auch zu einer geringeren entzündungsbedingten Aktivierung von PSCs und damit auch zu einer weniger stark ausgeprägten Fibrosierung.

6. Diskussion

NF- κ B gilt als bedeutender proinflammatorischer Faktor, der die Transkription verschiedener Proteine reguliert und in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündung eine kritische Rolle spielt. Die genaue Funktion und Bedeutung der verschiedenen Rel-Proteine sowie deren Wirkung in unterschiedlichen Geweben und einzelnen Erkrankungen sind in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung geworden.^{4,51,62,63}

Über die Rolle von NF- κ B in der chronischen Pankreatitis liegen keine Daten vor. Die Rolle von NF- κ B in der akuten Pankreatitis war zwar Gegenstand mehrerer Studien, diese kamen jedoch zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. So finden sich zum einen Studien, die einen protektiven Effekt von NF- κ B nahelegen, jedoch auch Arbeiten, die gegen diese Annahme sprechen.^{5,52,99,114,124}

Das vorliegende Modell stellt einen neuen Ansatz zur Untersuchung der Rolle von NF- κ B in der CP dar. Die Cre/*loxP* gesteuerte Inaktivierung (*Abbildung 5*) von RelA/p65 ermöglicht eine präzise gewebs- und krankheitsspezifische Untersuchung ohne unspezifische Effekte, wie beispielsweise bei der pharmakologischen Inhibition. Die repetitive supramaximale Stimulation der Mäuse mit dem Cholezystokinin-Analogon Caerulein imitiert den pathophysiologischen Ablauf der Erkrankung. (*Abbildung 6*)

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen eine zellspezifische Rolle von NF- κ B während der CP nahe. Während RelA/p65 in azinären Zellen protektive Effekte zeigt, welche Zelluntergang, Inflammation und Fibrose abmildern, hat RelA/p65 in myeloiden Zellen eine proinflammatorische Wirkung und ist in der Lage, die Fibrogenese zu initiieren.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei den *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Tieren ein erheblich stärkerer Untergang an azinärem Gewebe nach der Stimulation mit Caerulein, der sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch sichtbar war. Auch das relative Pankreasgewicht der *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Mäuse war gegenüber dem von *rela*^{F/F}-Tieren deutlich vermindert. (*Abbildung 8/9*)

Um die Ursache des gesteigerten Gewebsunterganges zu untersuchen, wurde zunächst die Apoptoserate untersucht. Obwohl NF- κ B als antiapoptotischer Transkriptionsfaktor gilt,³⁶ konnte in diesem experimentellen CP-Modell kein

signifikanter Unterschied zwischen *rela*^{ΔΔ} und *rela*^{F/F}-Mäusen gefunden werden (*Abbildung 15*). Andererseits war die Proliferationsrate bei *rela*^{ΔΔ}-Mäusen nach Caeruleinstimulation erhöht (*Abbildung 14*), so dass der vermehrte Gewebsuntergang in diesen Mäusen nicht durch einen Proliferationsdefekt erklärt werden kann.

Die Ursache des ausgeprägten Verlusts azinärer Zellen nach der 6-wöchigen Caerulein-Applikation scheint daher in dem unterschiedlichen Ausmaß der Nekrose zu liegen. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte in einem Modell der akuten Pankreatitis gezeigt werden, dass die akute Caeruleinstimulation bei *rela*^{ΔΔ}-Mäusen zu Nekrosen in erheblichem Ausmaß führten, während bei den *rela*^{F/F}-Tieren vergleichsweise geringe Nekroseareale entstanden.³ Aufgrund der immunologischen Abbaureaktionen sind die nekrotischen Zellen jedoch nur für kurze Zeit morphologisch erfassbar, so dass sich das Ausmaß der Nekrose bei der chronischen Pankreatitis nicht untersuchen ließ. Da in dem vorliegenden Modell der CP jedoch wiederholt akute Pankreatitiden aneinandergereiht wurden um so eine chronische Entzündungsreaktion zu induzieren, ist davon auszugehen, dass auch bei der repetitiven Caeruleinstimulation durch die Injektionen wiederholt Nekrosen verursacht wurden.

Offensichtlich kann auch die stärker ausgeprägte Proliferation der Pankreasparenchymzellen nicht den erhöhten Zelluntergang bei *rela*^{ΔΔ}-Mäusen kompensieren. Denkbar ist auch, dass die RelA/p65-defizienten proliferierenden Azinuszellen nicht zu funktionsfähigen Azinuszellen differenzieren, so dass die gesteigerte Proliferation nicht oder nur teilweise zur Gewebsregeneration beiträgt.

Bei den *rela*^{ΔΔ}-Tieren konnte eine starke Vermehrung der für die CP typischen, gangähnlichen Komplexe nachgewiesen werden.²⁹ Anhand der Ergebnisse von Doppelfärbungen für den Gangmarker CK-19 und den Azinuszellmarker Amylase, scheint es sich hier um eine Transdifferenzierung azinärer Zellen zu handeln, welche dadurch ihre azinäre Funktion verlieren (*Abbildung 16*). Während die gangähnlichen Komplexe in anderen Modellen eine hohe Proliferationsrate haben und als Ursprungszelle der pankreatischen (exokrinen und endokrinen) Regeneration diskutiert wurden,^{127,133} konnte im vorliegenden Modell keine vermehrte Proliferation in den gangähnlichen Komplexen beobachtet werden.

Diese zeigten jedoch eine positive Färbung für Muzine (PAS-Färbung). Muzine werden auch von PanIN-Läsionen (pankreatische intraepitheliale Neoplasien) und anderen Vorläufer-Läsionen des Pankreaskarzinoms exprimiert.⁸⁶ Da die gangähnlichen Strukturen jedoch keine nennenswerte Proliferation aufwiesen und keine weiteren präneoplastischen Veränderungen in den Gewebsschnitten festgestellt wurden, können diese nicht als histologisches Korrelat einer malignen Transformation interpretiert werden.

Nach Caerulein-Stimulation fiel bei den *rela*^{ΔΔ}-Mäusen auch eine signifikant erhöhte Infiltration von Entzündungszellen in das Pankreasgewebe auf. Dies widerspricht der Erwartung, dass RelA/p65 als proinflammatorisch wirksamer Transkriptionsfaktor vermehrt zur Migration myeloider Zellen beiträgt. In den Caerulein-stimulierten *rela*^{ΔΔ}-Mäusen war vorwiegend die, für die CP typische Infiltration von Makrophagen und, in geringerem Ausmaß, auch von Granulozyten zu beobachten (*Abbildung 10*). Die Ursache der gesteigerten Infiltration von Entzündungszellen in das Pankreas von *rela*^{ΔΔ}-Mäusen liegt vermutlich in der erhöhte Rate nekrotischer Zellen. Diese stellen einen proinflammatorischen Stimulus dar, welcher zur Migration myeloider Zellen in das Gewebe führt.²⁷

Bei den *rela*^{ΔΔ}-Mäusen wurde nach Caeruleinstimulation eine erhebliche Fibrosierung des Pankreas festgestellt. Die *rela*^{ΔΔ}-Mäuse zeigten weitaus mehr Kollagenfasern in der Masson-Trichrom-Färbung als *rela*^{F/F}-Kontrollmäuse (*Abbildung 11*). Auch das Transkriptionslevel von Kollagen I und III sowie Fibronectin war deutlich erhöht (*Abbildung 12A*). Diese Proteine sind typischerweise die Hauptbestandteile des fibrotischen Gewebes in der CP.^{17,19,60}

Passend hierzu konnten nach Caeruleinstimulation in *rela*^{ΔΔ}-Mäusen vermehrt aktivierte pankreatische Sternzellen gefunden werden (*Abbildung 12B*). Diese waren in den *rela*^{ΔΔ}-Mäusen auch 6 Wochen nach der letzten Caerulein Applikation noch nachweisbar, was für eine von dem ursprünglichen Stimulus unabhängige und dauerhafte Aktivierung spricht.

PSCs sind bereits als bedeutsame Zellen der Fibroseentstehung im Pankreas beschrieben worden, welche durch die von Makrophagen sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert werden und Extrazellulärmatrix-Proteine sezernieren können.^{69,115}

Die oben diskutierten Beobachtungen unterstützen das Konzept der Nekrose-Fibrose-Sequenz der chronischen Pankreatitis. Durch nekrotische Zellen werden vermehrt Leukozyten angelockt, die das Gewebe infiltrieren. Durch Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren können die infiltrierten Zellen dann die inaktiven PSCs zu myofibroblastenähnlichen Zellen aktivieren, die in diesem Zustand Extrazellulärmatrixproteine synthetisieren und so zur Fibrosierung des Pankreasgewebes führen. Das hier beschriebene Modell vollzieht alle Schritte der Nekrose-Fibrose-Sequenz.^{71,141} Durch die Kombination eines exogenen Schadens und eines endogen suszeptiblen Pankreas werden Azinuszellnekrosen ausgelöst. Diese lösen die Infiltration von Makrophagen und anderen myeloiden Zellen aus, welche Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine sezernieren (*Abbildung 13*). Die Zytokine aktivieren die PSCs, welche dann Extrazellulärmatrix-Proteine synthetisieren und so zur Fibrose des Organs führen (*Abbildung 12*). Die pankreatische Fibrosierung ist bei den Tieren mit pankreatischer RelA/p65-Inaktivierung auch nach 6 Wochen nicht reversibel (*Abbildung 11*). Somit kann dieses Modell als erstes Tiermodell der Nekrose-Fibrose-Sequenz gesehen werden, bei dem initiale azinäre Nekrosen zu morphologischen Zeichen einer CP führen.

Die Ursache des erheblich größeren Zellschadens der *rela*^{ΔΔ}-Mäuse nach repetitiver Caerulein-Applikation kann aus dem Modell der akuten Pankreatitis aus unserer Arbeitsgruppe gefolgert werden. In diesem Modell einer Caerulein-induzierten AP zeigte sich bei den *rela*^{ΔΔ}-Tieren ein weitaus schwererer Verlauf der Erkrankung, mit vermehrtem Untergang an Parenchym und erhöhten Serumamylasewerten, sowie schwerer Systembeteiligung mit Lungen- und Leberbeteiligung.³ Auch bei der AP hatte RelA/p65 in den Azinuszellen eine protektive Wirkung. Diese ist zumindest teilweise durch eine pankreasspezifische RelA/p65-abhängige Hochregulierung des Proteins PAP1 (*pancreatitis associated protein*) bedingt. PAP1 wird normalerweise während der Pankreatitis spezifisch im Pankreas exprimiert, dem Protein werden antiapoptotische, anti-nekrotische und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, es inhibiert die TNF α - und IL-6-Produktion und außerdem die TNF α -medierte Aktivierung von NF- κ B.^{3,46,81,92,92,130} Die eingeschränkte Expression von PAP1 in *rela*^{ΔΔ}-Mäusen führt dann zu einer verlängerten späten Aktivierung von NF- κ B in inflammatorischen Zellen³. Dies erklärt auch die im Modell der experimentellen

CP gemachten Beobachtung der persistierenden Infiltration von Makrophagen, welche die Aktivierung von PSCs auslöst.

An diesem Punkt scheint die Schwelle zu sein, an der die protektive Wirkung von RelA/p65 in eine nachteilige umschlägt. Während RelA/P65 die Azinuszelle vor exogenem Schaden schützt, kann derselbe Transkriptionsfaktor in infiltrierten myeloiden Zellen zur Expression von Zytokinen führen, welche die inflammatorische Reaktion der mesenchymalen Zellen auslöst.

Aufgrund dieser Überlegungen sollte in dem Modell der CP nun auch die Auswirkungen einer zusätzlichen RelA/p65-Inaktivierung in myeloiden Zellen untersucht werden. Diese, als $rela^{\Delta\Delta mye}$ bezeichneten Mäuse, wurden nach dem gleichen Schema mit Caerulein stimuliert wie die $rela^{F/F}$ - und $rela^{\Delta\Delta}$ -Tiere. In der makroskopischen Übersicht und beim relativen Pankreasgewicht der $rela^{\Delta\Delta mye}$ -Mäuse zeigte sich tatsächlich ein signifikanter Unterschied zu den $rela^{\Delta\Delta}$ -Mäusen; während $rela^{\Delta\Delta}$ -Mäuse ein atroph wirkendes Pankreas mit im Vergleich zu $rela^{F/F}$ -Mäusen reduziertem relativen Pankreasgewicht hatten, war dies bei $rela^{\Delta\Delta mye}$ -Mäusen nicht der Fall (*Abbildung 17A*). Die Übersichtshistologie zeigte jedoch, dass der Verlust an funktionellem aziniärem Gewebe der $rela^{\Delta\Delta mye}$ -Mäuse in etwa dem von $rela^{\Delta\Delta}$ -Mäusen entsprach (*Abbildung 17B*). Hier fiel jedoch eine deutlich andere Morphologie auf, die sich vor allem in einer fettigen Degeneration des Parenchyms darstellte, während die fibrotischen Veränderungen im Hintergrund standen. Diese Beobachtung wurde mittels der Fettfärbung mit Oil-Red-O verifiziert (*Abbildung 17C*). Wie diese Umwandlung von Pankreasgewebe in Fettgewebe bei den $rela^{\Delta\Delta mye}$ -Mäusen zu Stande kommt, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Ob die Zunahme an Fettgewebe durch eine Transdifferenzierung von Azinuszellen, oder aber durch eine Proliferation des umliegenden Fettgewebes entsteht, lässt sich methodisch mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht beantworten. Es fiel jedoch auf, dass die fettspeichernden Zellen nicht nur vom angrenzenden mesenterialen Fettgewebe ausgingen, sondern auch direkt zwischen und um einzelne Azini lokalisiert waren, was für eine Transdifferenzierung von Azinuszellen spricht.

Auffallend war bei den $rela^{\Delta\Delta mye}$ -Mäusen zusätzlich eine sichtbar geringer ausgeprägte Fibrose im Vergleich zu $rela^{\Delta\Delta}$ -Mäusen, was sowohl histologisch mit der Masson-Trichrom-Färbung (*Abbildung 17B/E*), als auch biochemisch mittels

quantitativer PCR-Analyse der profibrotischen Proteine nachgewiesen werden konnte (Abbildung 17F).

Auch die mit der F4/80-Färbung bestimmte Infiltration durch Makrophagen war in *rela*^{Δ/Δmye}-Mäusen wesentlich geringer ausgeprägt als bei *rela*^{Δ/Δ}-Mäusen (Abbildung 17D). Passend hierzu wurde eine geringer ausgeprägte Expression der proinflammatorischen Zytokine und Wachstumsfaktoren gefunden (Abbildung 17F), welche die Aktivierung von PSCs bewirken. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die NF-κB-Aktivierung in den myeloiden Zellen über eine Aktivierung der PSCs für die Fibrosereaktion entscheidend ist. Damit kommt RelA/p65 eine duale Rolle in der Pathogenese der CP zu. Während RelA/p65 für die Integrität der Azinuszelle wichtig ist und damit einen gegenüber Zellstress protektiven Effekt hat, hat dasselbe Protein in myeloiden Zellen eine proinflammatorische Wirkung und ist für die Fibrosierungsreaktion mitverantwortlich.

Die Rolle von NF-κB in verschiedenen Krankheitsbildern und die Wirkungen in unterschiedlichen Geweben und Zellpopulationen sind ein umstrittenes Thema. In früheren Arbeiten wurde die Rolle von NF-κB in der akuten Pankreatitis durch pharmakologische Inhibition (N-Acetyl-L-Cystein, Pyrrolidindithiocarbamat) untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeiten waren jedoch widersprüchlich,^{52,99,114,124} und konnten die Rolle von NF-κB in der AP nicht klären. Die Aussagekraft dieser Beobachtungen ist zusätzlich durch die unspezifischen Wirkungen der verwendeten pharmakologischen NF-κB-Inhibitoren deutlich eingeschränkt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in einem Modell der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis bereits einen protektiven Effekt von RelA/p65 in Azinuszellen nachweisen.³ In anderen genetischen Modellen zeigten sich jedoch ebenso scheinbar widersprüchliche Ergebnisse. So beschrieben Altavilla *et al.* einen milden Verlauf der Caerulein-induzierten AP bei p105 knock-out Mäusen (klassischer, nicht gewebespezifischer knock-out).⁵ Aleksic *et al.* und Baumann *et al.* beschrieben in einem transgenen Modell mit Deletion bzw. Überaktivierung von IKK2 eine entzündungsverstärkende Rolle von NF-κB.^{2,21}

Anhand dieser Studien wird klar, dass der klassischen NF-κB-Aktivierungskaskade in der Pathogenese der AP keine eindeutige protektive oder deletäre Rolle zugeschrieben werden kann. Vielmehr zeigt sich, dass den einzelnen NF-κB-Proteinen eine sehr spezifische Rolle zukommt. Ob diese Rolle protektiv oder

krankheitsverstärkend ist, scheint nicht nur davon abzuhängen, ob NF-κB gehemmt oder aktiviert wird.

Betrachtet man die Rolle von NF-κB bezüglich der Fibrosereaktion in anderen Geweben bzw. bei anderen Krankheitsbildern, so kommt man auch dort zu dem Schluss, dass die unterschiedlichen Komponenten des NF-κB-Systems bzw. deren Inhibitoren teilweise sehr unterschiedliche Effekte haben, welche sich auf den ersten Blick teilweise widersprechen.

Von Oakley *et al.* wurde ein protektiver und fibrosehemmender Effekt von p50 bei Carbotetrachlorid-induziertem Leberschaden nachgewiesen,⁹¹ ebenso zeigte sich in Untersuchungen zur chronischen Hepatitis C beim Menschen die RelA/p65-Expression im Gewebe als invers mit dem Ausmaß der Fibrose korreliert.³²

Andere Arbeiten wie von Beraza *et al.* ergaben jedoch einen antifibrotischen Effekt durch die pharmakologische Inhibition von IKK2,²⁵ Son *et al.* zeigten eine geringer ausgeprägte Leberschädigung und Fibrose bei spezifischer Inhibition von NF-κB in Lebermakrophagen, nicht jedoch bei spezifischer Inhibition in hepatischen Zellen selbst.¹²³ Transfektionsexperimente mit Fibroblasten und hepatischen Sternzellen wiederum konnten einen deutlichen antifibrotischen Effekt vor allem von RelA zeigen, welches die Expression der α1-Kollagen-Synthese hemmte.¹⁰⁵

Für das Lungengewebe ist die Datenlage übersichtlicher, hier konnte in verschiedenen Kompartimenten von Fujimoto *et al.* (T-Zellen)⁴⁸ und Broide *et al.* (Bronchialepithel)³³ eine profibrotische Wirkung von NF-κB gezeigt werden. Ebenso ist bekannt, dass bei der zystischen Fibrose das Fehlen von CFTR unter anderem auch zu einer erhöhten NF-κB Aktivierung führt.¹³¹

Ein Modell zur chronischen Kolitis von Wu *et al.* deutet auf eine im Darmgewebe ebenfalls Fibrose-fördernde Wirkung von NF-κB hin.¹⁴²

Diese Arbeiten scheinen zunächst verwirrend bzw. widersprüchlich zu sein. Man muss daher zu dem Schluss kommen, dass zum einen die einzelnen Proteine der NF-κB Familie eine sehr spezifische Wirkung haben und zum anderen deren Wirkung in unterschiedlichen Geweben, Zellpopulationen, Erkrankungen und möglicherweise auch Erkrankungsstadien mitunter konträr sein kann. Allgemeine Feststellungen wie „NF-κB ist proinflammatorisch“ oder „NF-κB ist profibrotisch“ scheinen dabei zu kurz zu greifen, eine generelle Aussage ist hier nicht möglich.

Mit den hier beschriebenen Daten konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit pankreatisch inaktiviertem RelA/p65 nach repetitiver Stimulation mit dem CCK-Analogen Caerulein Zeichen der chronischen Pankreatitis entwickeln. Diese sind im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren deutlich stärker ausgeprägt. Die Inflammations-induzierte Fibrose wird bei diesem Modell durch myeloide Zellen vermittelt. Zusätzliche Inaktivierung von RelA/p65 in myeloiden Zellen führte zu einem abgeschwächten Phänotyp.

Dieses genetische Modell, das mit repetitiven inflammatorischen Stimuli zum Untergang azinärer Zellen und Fibrose führt, ist das erste *in-vivo* Modell für die Nekrose-Fibrose Sequenz in der CP. In der vorliegende Studie konnte einerseits eine protektive Rolle von RelA/p65 in azinären Zellen und andererseits eine proinflammatorische und profibrotische Funktion in myeloiden Zellen in der CP gezeigt werden. Diese Beobachtungen lassen deutliche Zweifel an einer pharmakologischen NF- κ B-Inhibition als möglichem therapeutischem Konzept zur Behandlung der chronischen Pankreatitis aufkommen.

7. Zusammenfassung

Die chronische Pankreatitis ist eine wiederkehrende Entzündung des Pankreas, welche mit gürtelförmigen Oberbauchschmerzen einhergeht und nach langjährigem Verlauf oftmals zum exokrinen und/oder endokrinen Funktionsverlust des Organs führt. Welche Rolle die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie bei der Pathogenese der Erkrankung spielen, ist im Wesentlichen unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors RelA/p65, einem Mitglied der NF- κ B Familie, in verschiedenen Zellkompartimenten bei der chronischen Pankreatitis zu untersuchen.

Um die Funktion von RelA/p65 zu untersuchen, wurden unter Zuhilfenahme der Cre/*loxP*-Technologie Mäuse generiert, bei denen RelA/p65 entweder im Pankreas alleine (*rela* ^{$\Delta\Delta$}) oder im Pankreas und in myeloiden Zellen (*rela* ^{$\Delta\Delta$ mye}) funktionell inaktiviert war. Als Kontrollen dienten gefloxe Tiere, welche die Cre-Rekombinase nicht exprimierten (*rela*^{F/F}). An diesem genetischen Modell mit inaktiviertem RelA/p65 wurde dann durch repetitive supraphysiologische Stimulation mit dem Cholezystokinin-Analog Caerulein über 6 Wochen eine chronische Pankreatitis induziert. Die Pankreata der Versuchstiere wurden eine oder 6 Wochen nach der letzten Stimulation histologisch, immunhistologisch und biochemisch untersucht.

Nach der Caeruleinstimulation hatten die *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Tiere einen ausgeprägten Phänotyp mit typischen Zeichen der chronischen Pankreatitis, wohingegen die *rela*^{F/F}-Mäuse nur milde Veränderungen aufwiesen. Die Veränderungen waren größtenteils nicht reversibel und auch 6 Wochen nach der letzten Caeruleinstimulation noch festzustellen. Während unstimulierte Tiere mit inaktiviertem RelA/p65 ein normales Pankreas mit typischer histologischer Architektur aufwiesen, war das Pankreas der mit Caerulein stimulierten *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Mäuse von Makrophagen infiltriert, welche Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine sezernierten. Durch die Sekretion dieser Faktoren wurden ruhende pankreatische Sternzellen aktiviert, was die Expression fibrotischer Extrazellulärmatrixproteine nach sich zog und schließlich zur Fibrose des Organs führte. Die *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Mäuse rekapitulierten die verschiedenen Schritte der Nekrose-Fibrose-Sequenz, welche bei der humanen chronischen Pankreatitis als Modell der Pathogenese allgemein akzeptiert ist. Die zusätzliche Inaktivierung von RelA/p65 in myeloiden Zellen (*rela* ^{$\Delta\Delta$ mye}) führte zu einem im Vergleich zu den *rela* ^{$\Delta\Delta$} -Mäusen abgeschwächten Phänotyp, bei dem es zwar auch

zum Untergang azinärer Zellen kam, wobei jedoch die entzündliche und fibrotische Reaktion auf die Caerulein-Stimulationen deutlich geringer ausgeprägt war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine zellspezifische Rolle von RelA/p65 während der chronischen Pankreatitis nahe. Während RelA/p65 in azinären Zellen einen protektiven Effekt ausübt, erfüllt RelA/p65 in myeloiden Zellen eine pro-inflammatorische Rolle und ist in der Lage, die Fibrogenese des Pankreas zu initiieren. Angesichts dieser Ergebnisse muss eine pharmakologische RelA/p65-Inhibition als möglicher Therapie-Ansatz mit Skepsis betrachtet werden.

8. Literaturverzeichnis

1. **Adler G, Hupp T, Kern HF:** Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 382 (1979) 31–47.
2. **Aleksic T, Baumann B, Wagner M, Adler G, Wirth T, Weber CK:** Cellular immune reaction in the pancreas is induced by constitutively active I κ B kinase-2. *Gut*, 56 (2007) 227–236.
3. **Algül H, Treiber M, Lesina M, Nakhai H, Saur D, Geisler F, Pfeifer A, Paxian S, Schmid RM:** Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J Clin Invest*, 117 (2007) 1490–1501.
4. **Algül H, Adler G, Schmid RM:** NF- κ B/Rel transcriptional pathway: implications in pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer*, 31 (2002) 71–78.
5. **Altavilla D, Famulari C, Passaniti M, Galeano M, Macrì A, Seminara P, Minutoli L, Marini H, Calò M, Venuti FS, Esposito M, Squadrito F:** Attenuated cerulein-induced pancreatitis in nuclear factor- κ B-deficient mice. *Lab Invest*, 83 (2003) 1723–1732.
6. **Amann ST, Gates LK, Aston CE, Pandya A, Whitcomb DC:** Expression and penetrance of the hereditary pancreatitis phenotype in monozygotic twins. *Gut*, 48 (2001) 542–547.
7. **Ammann RW, Muellhaupt B:** Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. *Gut*, 35 (1994) 552–556.
8. **Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ:** Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science*, 251 (1991) 679–682.
9. **Apte MV, Norton ID, Haber PS, Korsten MA, McCaughan GW, Pirola RC, Wilson JS:** Chronic ethanol administration decreases rat pancreatic GP2 content. *Biochim. Biophys. Acta*, 1336 (1997) 89–98.
10. **Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS:** Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*, 29 (2004) 179–187.
11. **Apte MV, Norton ID, Haber PS, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS:** Both ethanol and protein deficiency increase messenger RNA levels for pancreatic lithostathine. *Life Sci*, 58 (1996) 485–492.
12. **Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS:** Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*, 44 (1999) 534–541.
13. **Apte MV, Wilson JS, McCaughan GW, Korsten MA, Haber PS, Norton ID, Pirola RC:** Ethanol-induced alterations in messenger RNA levels correlate with glandular content of pancreatic enzymes. *J. Lab. Clin. Med*, 125 (1995) 634–640.
14. **Apte MV, Pirola RC, Wilson JS:** Battle-scarred pancreas: role of alcohol and pancreatic stellate cells in pancreatic fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol*, 21 Suppl 3 (2006) S97-S101.

15. **Atlas AB, Orenstein SR, Orenstein DM:** Pancreatitis in young children with cystic fibrosis. *J. Pediatr*, 120 (1992) 756–759.
16. **Audrézet M, Chen J, Le Maréchal C, Ruszniewski P, Robaszkiewicz M, Raguénès O, Quéré I, Scotet V, Férec C:** Determination of the relative contribution of three genes-the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene-to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. *Eur. J. Hum. Genet*, 10 (2002) 100–106.
17. **Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G:** Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*, 115 (1998) 421–432.
18. **Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G:** Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*, 128 (2005) 907–921.
19. **Bachem MG, Zhou Z, Zhou S, Siech M:** Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol*, 21 Suppl 3 (2006) S92-6.
20. **Bartelt DC, Shapanka R, Greene LJ:** The primary structure of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor. Amino acid sequence of the reduced S-aminoethylated protein. *Arch. Biochem. Biophys*, 179 (1977) 189–199.
21. **Baumann B, Wagner M, Aleksic T, Wichert G von, Weber CK, Adler G, Wirth T:** Constitutive IKK2 activation in acinar cells is sufficient to induce pancreatitis in vivo. *J Clin Invest*, 117 (2007) 1502–1513.
22. **Beg AA, Baldwin AS, JR.:** The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev*, 7 (1993) 2064–2070.
23. **Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D:** Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*, 9 (1995) 2736–2746.
24. **Beg AA, Baltimore D:** An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 274 (1996) 782–784.
25. **Beraza N, Malato Y, Vander Borght S, Liedtke C, Wasmuth HE, Dreano M, Vos R de, Roskams T, Trautwein C:** Pharmacological IKK2 inhibition blocks liver steatosis and initiation of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 57 (2008) 655–663.
26. **Bhatia E, Choudhuri G, Sikora SS, Landt O, Kage A, Becker M, Witt H:** Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology*, 123 (2002) 1020–1025.
27. **Bianchi ME:** DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol*, 81 (2007) 1–5.
28. **Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B:** Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics*, 11 (2002) 115–132.

29. **Bockman DE, Boydston WR, Anderson MC:** Origin of tubular complexes in human chronic pancreatitis. *Am J Surg*, 144 (1982) 243–249.
30. **Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC, Aye T, Toschi E, Sharma A:** Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans*, 36 (2008) 353–356.
31. **Bornman PC, Beckingham IJ:** ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. Chronic pancreatitis. *Bmj*, 322 (2001) 660–663.
32. **Boya P, Larrea E, Sola I, Majano PL, Jimenez C, Civeira MP, Prieto J:** Nuclear factor-kappa B in the liver of patients with chronic hepatitis C: decreased RelA expression is associated with enhanced fibrosis progression. *Hepatology*, 34 (2001) 1041–1048.
33. **Broide DH, Lawrence T, Doherty T, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Karin M:** Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by IkappaB kinase beta-dependent genes in airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 17723–17728.
34. **Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D:** Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*, 373 (1995) 531–536.
35. **Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventos-Suarez C, Snapper CM, Bravo R:** Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med*, 187 (1998) 185–196.
36. **Chen F, Castranova V, Shi X:** New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am. J. Pathol*, 159 (2001) 387–397.
37. **Chiari Hans:** Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde*, 17 (1896) 69–96.
38. **Chowdhury P, Gupta P:** Pathophysiology of alcoholic pancreatitis: an overview. *World J Gastroenterol*, 12 (2006) 7421–7427.
39. **Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I:** Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*, 8 (1999) 265–277.
40. **Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS:** Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med*, 339 (1998) 653–658.
41. **Dufour MC, Adamson MD:** The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*, 27 (2003) 286–290.
42. **Durbec JP, Sarles H:** Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein and lipid consumption. *Digestion*, 18 (1978) 337–350.
43. **Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Löhr M, Liebe S:** Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion*, 59 (1998) 192–198.

44. **Etemad B, Whitcomb DC:** Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*, 120 (2001) 682–707.
45. **Ferec C, Ragueneas O, Salomon R, Roche C, Bernard JP, Guillot M, Quere I, Faure C, Mercier B, Audrezet MP, Guillausseau PJ, Dupont C, Munnich A, Bignon JD, Le Bodic L:** Mutations in the cationic trypsinogen gene and evidence for genetic heterogeneity in hereditary pancreatitis. *J Med Genet*, 36 (1999) 228–232.
46. **Folch-Puy E, Granell S, Dagorn JC, Iovanna JL, Closa D:** Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. *J Immunol*, 176 (2006) 3774–3779.
47. **Freedman SD, Blanco P, Shea JC, Alvarez JG:** Mechanisms to explain pancreatic dysfunction in cystic fibrosis. *Med Clin North Am*, 84 (2000) 657-64, x.
48. **Fujimoto H, D'Alessandro-Gabazza CN, Palanki MS, Erdman PE, Takagi T, Gabazza EC, Bruno NE, Yano Y, Hayashi T, Tamaki S, Sumida Y, Adachi Y, Suzuki K, Taguchi O:** Inhibition of nuclear factor-kappaB in T cells suppresses lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 176 (2007) 1251–1260.
49. **Ghosh S:** Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunol Res*, 19 (1999) 183–189.
50. **Goebell H:** The role of calcium in pancreatic secretion and disease. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)*, 23 (1976) 151–161.
51. **Greten FR, Karin M:** The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*, 206 (2004) 193–199.
52. **Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ:** Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol*, 275 (1998) G1402-14.
53. **Gukovsky I, Lugea A, Shahsahebi M, Cheng JH, Hong PP, Jung YJ, Deng Q, French BA, Lungo W, French SW, Tsukamoto H, Pandol SJ:** A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 294 (2008) G68-79.
54. **Haber PS, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC:** Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility. *J Lab Clin Med*, 121 (1993) 759–764.
55. **Haber PS, Wilson JS, Apte MV, Korsten MA, Pirola RC:** Chronic ethanol consumption increases the fragility of rat pancreatic zymogen granules. *Gut*, 35 (1994) 1474–1478.
56. **Hacker H, Karin M:** Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*, 2006 (2006) re13.
57. **Hartwig W, Werner J, Ryschich E, Mayer H, Schmidt J, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E:** Cigarette smoke enhances ethanol-induced pancreatic injury. *Pancreas*, 21 (2000) 272–278.
58. **Howard JM, Ehrlich EW:** The etiology of pancreatitis: a review of clinical experience. *Ann Surg*, 152 (1960) 135–146.
59. **Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M:** Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science*, 284 (1999) 316–320.

60. **Imamura T, Iguchi H, Manabe T, Ohshio G, Yoshimura T, Wang ZH, Suwa H, Ishigami S, Imamura M:** Quantitative analysis of collagen and collagen subtypes I, III, and V in human pancreatic cancer, tumor-associated chronic pancreatitis, and alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreas*, 11 (1995) 357–364.
61. **Jaster R:** Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol Cancer*, 3 (2004) 26.
62. **Karin M:** NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog*, 45 (2006) 355–361.
63. **Karin M, Greten FR:** NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5 (2005) 749–759.
64. **Karin M, Yamamoto Y, Wang QM:** The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 3 (2004) 17–26.
65. **Karin M, Ben-Neriah Y:** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, 18 (2000) 621–663.
66. **Kato T, JR., Delhase M, Hoffmann A, Karin M:** CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Mol Cell*, 12 (2003) 829–839.
67. **Kazal LA, Spicer DS, Brahinsky RA:** Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J Am Chem Soc*, 70 (1948) 3034–3040.
68. **Keim V, Bauer N, Teich N, Simon P, Lerch MM, Mössner J:** Clinical characterization of patients with hereditary pancreatitis and mutations in the cationic trypsinogen gene. *Am. J. Med*, 111 (2001) 622–626.
69. **Kennedy RH, Bockman DE, Uscanga L, Choux R, Grimaud JA, Sarles H:** Pancreatic extracellular matrix alterations in chronic pancreatitis. *Pancreas*, 2 (1987) 61–72.
70. **Klonowski-Stumpe H, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Luthen R, Haussinger D:** Production and effects of endothelin-1 in rat pancreatic stellate cells. *Pancreas*, 27 (2003) 67–74.
71. **Kloppel G, Detlefsen S, Feyerabend B:** Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Arch*, 445 (2004) 1–8.
72. **Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, Gerondakis S:** Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev*, 9 (1995) 1965–1977.
73. **Lankisch PG, Assmus C, Maisonneuve P, Lowenfels AB:** Epidemiology of pancreatic diseases in Luneburg County. A study in a defined german population. *Pancreatology*, 2 (2002) 469–477.
74. **Laposata EA, Lange LG:** Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science*, 231 (1986) 497–499.
75. **Levy P, Barthet M, Mollard BR, Amouretti M, Marion-Audibert AM, Dyard F:** Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications. *Gastroenterol Clin Biol*, 30 (2006) 838–844.

76. **Li Q, van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM:** Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science*, 284 (1999) 321–325.
77. **Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK, JR., Perrault J, Whitcomb DC:** Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 89 (1997) 442–446.
78. **Lowenfels AB, Maisonneuve P:** Risk factors for pancreatic cancer. *J Cell Biochem*, 95 (2005) 649–656.
79. **Lowenfels AB, Maisonneuve P, Grover H, Gerber E, Korsten MA, Antunes MT, Marques A, Pitchumoni CS:** Racial factors and the risk of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 94 (1999) 790–794.
80. **Maisonneuve P, Lowenfels AB, Mullhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, DiMagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L, Frulloni L, Ammann RW:** Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut*, 54 (2005) 510–514.
81. **Malka D, Vasseur S, Bodeker H, Ortiz EM, Dusetti NJ, Verrando P, Dagorn JC, Iovanna JL:** Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation. *Gastroenterology*, 119 (2000) 816–828.
82. **Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Levy P, Ruszniewski P:** Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*, 51 (2002) 849–852.
83. **Matsumura N, Ochi K, Ichimura M, Mizushima T, Harada H, Harada M:** Study on free radicals and pancreatic fibrosis--pancreatic fibrosis induced by repeated injections of superoxide dismutase inhibitor. *Pancreas*, 22 (2001) 53–57.
84. **Miyamoto S, Verma IM:** Rel/NF- κ B/I κ B story. *Adv Cancer Res*, 66 (1995) 255–292.
85. **Müllhaupt B, Truninger K, Ammann R:** Impact of etiology on the painful early stage of chronic pancreatitis: a long-term prospective study. *Z Gastroenterol*, 43 (2005) 1293–1301.
86. **Nagata K, Horinouchi M, Saitou M, Higashi M, Nomoto M, Goto M, Yonezawa S:** Mucin expression profile in pancreatic cancer and the precursor lesions. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 14 (2007) 243–254.
87. **Nakhai H, Sel S, Favor J, Mendoza-Torres L, Paulsen F, Duncker GIW, Schmid RM:** Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development*, 134 (2007) 1151–1160.
88. **Neuschwander-Tetri BA, Burton FR, Presti ME, Britton RS, Janney CG, Garvin PR, Brunt EM, Galvin NJ, Poulos JE:** Repetitive self-limited acute pancreatitis induces pancreatic fibrogenesis in the mouse. *Dig. Dis. Sci*, 45 (2000) 665–674.
89. **Nir T, Melton DA, Dor Y:** Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J. Clin. Invest*, 117 (2007) 2553–2561.

90. **Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA:** Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology*, 121 (2001) 1310–1319.
91. **Oakley F, Mann J, Nailard S, Smart DE, Mungalsingh N, Constandinou C, Ali S, Wilson SJ, Millward-Sadler H, Iredale JP, Mann DA:** Nuclear factor-kappaB1 (p50) limits the inflammatory and fibrogenic responses to chronic injury. *Am J Pathol*, 166 (2005) 695–708.
92. **Ortiz EM, Duseti NJ, Vasseur S, Malka D, Bodeker H, Dagorn JC, Iovanna JL:** The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology*, 114 (1998) 808–816.
93. **Otsuki M, Tashiro M:** 4. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer, lifestyle-related diseases. *Intern Med*, 46 (2007) 109–113.
94. **Pahl HL:** Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18 (1999) 6853–6866.
95. **Parekh D, Townsend CM, JR., Rajaraman S, Ishizuka J, Thompson JC:** Pancreatic regeneration after partial pancreatectomy. *Am J Surg*, 161 (1991) 84-8; discussion 88-9.
96. **Perides G, Tao X, West N, Sharma A, Steer ML:** A mouse model of ethanol dependent pancreatic fibrosis. *Gut*, 54 (2005) 1461–1467.
97. **Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV:** Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*, 52 (2003) 275–282.
98. **Pitchumoni CS, Glasser M, Saran RM, Panchacharam P, Thelmo W:** Pancreatic fibrosis in chronic alcoholics and nonalcoholics without clinical pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 79 (1984) 382–388.
99. **Rakonczay Z, JR., Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T:** NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med*, 34 (2003) 696–709.
100. **Reinehr R, Zoller S, Klonowski-Stumpe H, Kordes C, Haussinger D:** Effects of angiotensin II on rat pancreatic stellate cells. *Pancreas*, 28 (2004) 129–137.
101. **Renner IG, Rinderknecht H, Valenzuela JE, Douglas AP:** Studies of pure pancreatic secretions in chronic alcoholic subjects without pancreatic insufficiency. *Scand J Gastroenterol*, 15 (1980) 241–244.
102. **Rinderknecht H:** Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci*, 31 (1986) 314–321.
103. **Rinderknecht H, Stace NH, Renner IG:** Effects of chronic alcohol abuse on exocrine pancreatic secretion in man. *Dig Dis Sci*, 30 (1985) 65–71.
104. **Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al.:** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245 (1989) 1066–1073.

105. Rippe RA, Schrum LW, Stefanovic B, Solis-Herruzo JA, Brenner DA: NF-kappaB inhibits expression of the alpha1(I) collagen gene. *DNA Cell Biol*, 18 (1999) 751–761.
106. Rosendahl J, Bodeker H, Mossner J, Teich N: Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet J Rare Dis*, 2 (2007) 1.
107. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ozsvári B, Landt O, Schulz H, Gress TM, Pfützer R, Löhr M, Kovacs P, Blüher M, Stumvoll M, Choudhuri G, Hegyi P, te Morsche RHM, Drenth JPH, Truninger K, Macek M, Puhl G, Witt U, Schmidt H, Büning C, Ockenga J, Kage A, Groneberg DA, Nickel R, Berg T, Wiedenmann B, Bödeker H, Keim V, Mössner J, Teich N, Sahin-Tóth M: Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat. Genet*, 40 (2008) 78–82.
108. Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, Elia AJ, Mak TW: Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev*, 14 (2000) 854–862.
109. Sahel J, Sarles H: Modifications of pure human pancreatic juice induced by chronic alcohol consumption. *Dig. Dis. Sci*, 24 (1979) 897–905.
110. Sahin-Tóth M, Tóth M: Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 278 (2000) 286–289.
111. Sarles H: Alcoholism and pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol*, 6 (1971) 193–198.
112. Sarles H, Adler G, Dani R, Frey C, Gullo L, Harada H, Martin E, Norohna M, Scuro LA: Classifications of pancreatitis and definition of pancreatic diseases. *Digestion*, 43 (1989) 234–236.
113. Sarner M, Cotton PB: Definitions of acute and chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol*, 13 (1984) 865–870.
114. Satoh A, Shimosegawa T, Fujita M, Kimura K, Masamune A, Koizumi M, Toyota T: Inhibition of nuclear factor-kappaB activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis. *Gut*, 44 (1999) 253–258.
115. Schmid-Kotsas A, Gross HJ, Menke A, Weidenbach H, Adler G, Siech M, Beger H, Grünert A, Bachem MG: Lipopolysaccharide-activated macrophages stimulate the synthesis of collagen type I and C-fibronectin in cultured pancreatic stellate cells. *Am. J. Pathol*, 155 (1999) 1749–1758.
116. Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grunert A, Bachem MG: Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281 (2001) C532-43.
117. Sen R, Baltimore D: Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47 (1986) 921–928.
118. Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J: Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med*, 339 (1998) 645–652.

- 119. Sheppard DN, Welsh MJ:** Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*, 79 (1999) S23-45.
- 120. Shwachman H, Lebenthal E, Khaw KT:** Recurrent acute pancreatitis in patients with cystic fibrosis with normal pancreatic enzymes. *Pediatrics*, 55 (1975) 86–95.
- 121. Sibert JR:** Hereditary pancreatitis in England and Wales. *J. Med. Genet*, 15 (1978) 189–201.
- 122. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K:** Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol*, 10 (1994) 405–455.
- 123. Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J:** Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293 (2007) G631-9.
- 124. Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM:** NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology*, 116 (1999) 420–430.
- 125. Stoll C, Bigel R, Levy JM:** [Hereditary chronic pancreatitis: an autosomal dominant disease (author's transl)]. *Sem Hop*, 55 (1979) 1016–1020.
- 126. Strum WB, Spiro HM:** Chronic pancreatitis. *Ann Intern Med*, 74 (1971) 264–277.
- 127. Tokoro T, Tezel E, Nagasaka T, Kaneko T, Nakao A:** Differentiation of acinar cells into acinoductular cells in regenerating rat pancreas. *Pancreatology*, 3 (2003) 487–496.
- 128. Treiber M, Schlag C, Schmid RM:** Genetics of pancreatitis: a guide for clinicians. *Curr Gastroenterol Rep*, 10 (2008) 122–127.
- 129. Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ:** Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 280 (2001) G1197-208.
- 130. Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, Garcia S, Fiedler F, Lerch MM, Dagorn JC, Closa D, Iovanna JL:** p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. *J Biol Chem*, 279 (2004) 7199–7207.
- 131. Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, Oury C, Bours V:** Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochem Pharmacol*, 73 (2007) 1982–1994.
- 132. Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, Kumar RK, Pirola R, Wilson J, Apte MV:** Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology*, 133 (2007) 1293–1303.
- 133. Wang G, Rosenberg L, Scott FW:** Tubular complexes as a source for islet neogenesis in the pancreas of diabetes-prone BB rats. *Lab. Invest*, 85 (2005) 675–688.

134. **Werner J, Laposata M, Fernández-del Castillo C, Saghir M, Iozzo RV, Lewandrowski KB, Warshaw AL:** Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol. *Gastroenterology*, 113 (1997) 286–294.
135. **Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD:** Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat. Genet*, 14 (1996) 141–145.
136. **Wilson JS, Korsten MA, Apte MV, Thomas MC, Haber PS, Pirola RC:** Both ethanol consumption and protein deficiency increase the fragility of pancreatic lysosomes. *J. Lab. Clin. Med*, 115 (1990) 749–755.
137. **Wilson JS, Apte MV:** Role of alcohol metabolism in alcoholic pancreatitis. *Pancreas*, 27 (2003) 311–315.
138. **Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M:** Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat. Genet*, 25 (2000) 213–216.
139. **Witt H, Luck W, Becker M:** A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 117 (1999) 7–10.
140. **Witt H, Luck W, Becker M, Böhmig M, Kage A, Truninger K, Ammann RW, O'Reilly D, Kingsnorth A, Schulz HU, Halangk W, Kielstein V, Knoefel WT, Teich N, Keim V:** Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis. *JAMA*, 285 (2001) 2716–2717.
141. **Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS:** Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*, 132 (2007) 1557–1573.
142. **Wu F, Chakravarti S:** Differential expression of inflammatory and fibrogenic genes and their regulation by NF-kappaB inhibition in a mouse model of chronic colitis. *J Immunol*, 179 (2007) 6988–7000.

Danksagung

Diese Arbeit möchte ich meinen Eltern Fritz und Rita Anetsberger widmen, die mich während meines Studiums und auch bei der Durchführung dieser Arbeit immer unterstützt haben. Ganz herzlich Danken möchte ich auch meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Hana Algül und meinem Betreuer Dr. Matthias Treiber für Ihre Hilfe und Anleitung.