

2. **Abgeschlossenes Teilprojekt A6**

Abschlußbericht

Thema des Projekts: **Proteaseninduzierte Zytokinaktivierung im Pathomechanismus lokaler und systemischer Komplikationen bei akuter Pankreatitis**

Projektleiterin: PD Dr. Bettina Rau
Abt. für Allgemeine und Viszeralchirurgie
Universitätsklinikum Ulm

2.1 **Stand der Forschung zum Zeitpunkt der Antragsstellung**

Die Aktivierung inflammatorischer Zytokine stellt einen zentralen Schritt im Pathomechanismus entzündlicher Erkrankungen dar. Bei akuter Pankreatitis bestimmt das Ausmaß der intrapankreatischen Schädigung den systemischen Schweregrad (Beger et al., 1986, Isenmann et al., 1999), welcher signifikant mit der Freisetzung bzw. Aktivierung verschiedener Zytokine korreliert (Norman et al., 1998, Mayer et al., 2000). Die posttranslationelle Prozessierung durch spezifische Proteasen ist hierbei ein wesentlicher Schritt zur Aktivierung verschiedener Zytokine, die über deren biologische Funktion entscheidet.

Ein klassisches Beispiel hierfür ist die intrazelluläre Spaltung der inaktiven IL-1 β Proform durch die Cystein-Protease Caspase-1, auch Interleukin-1 β Converting Enzym (ICE) genannt, in das biologisch aktive IL-1 β (Thornberry et al., 1992). Initial wurde der Caspase-1 eine tragende Rolle im Pathomechanismus des apoptotischen Zelltodes zugeschrieben, die jedoch gegenüber deren Bedeutung in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen zurückgetreten ist (Thornberry NA, 1998, Zeuner et al., 1999), was auch für die akute Pankreatitis eindrücklich gezeigt werden konnte (Norman et al., 1997, Rau et al., 2001a, Paszkowski et al., 2002). Dieser Effekt wurde im wesentlichen der Hauptfunktion dieses Enzyms, der proteolytischen Aktivierung des IL-1 β , zugeschrieben. Interleukin-18 (IL-18), initial als interferon-gamma (IFN- γ) inducing factor bezeichnet (Ghayur et al., 1997), ist ein kürzlich charakterisiertes Zytokin, welches dem IL-1 β sowohl in Struktur und biologischer Wirkung verwandt und ebenfalls Caspase-1 abhängig aktiviert wird (Fantuzzi et al. 1999). Ersten klinischen Untersuchungen bei akuter Pankreatitis zufolge fanden wir eine hochsignifikante

Korrelation zwischen lokalen und systemischen IL-18 Konzentrationen und schweren Krankheitsverläufen (Rau et al., 2001). Zudem weisen tierexperimentelle Studien bei LPS-induziertem Schock (Netea et al. 2000) auf eine ähnlich tragende Rolle dieses Zytokins im Pathomechanismus inflammatorischer Erkrankungen hin und könnten somit den beobachteten Wirkmechanismus der Caspase-1 Inhibition erklären.

Neben der Caspase-1 werden zunehmend alternative Wege für IL-18, IL-1 β sowie ein weiteres, „zentrales“ Zytokin, das TNF- α , beschrieben. So kommt für die Aktivierung des IL-18 eine in neutrophilen Granulozyten und Monozyten synthetisierte Serin Protease, die Proteinase-3, in Frage, die auch hinsichtlich der IL-1 β und TNF- α Aktivierung eine Rolle zu spielen scheint (Coeshott et al. 1999). Auch Mitglieder der Familie der Matrix-Metalloproteinasen, einer Gruppe zinkabhängiger, am Abbau extrazellulärer Matrix beteiligter Enzyme, wie Stromelysin (MMP-3), Gelatinase A (MMP-2) und insbesondere Gelatinase B (MMP-9) werden als alternative Aktivierungsmechanismen des IL-1 β , bislang jedoch nicht für das IL-18, beschrieben (Schönbeck et al. 1998). Da bei akuter Pankreatitis gezeigt werden konnte, daß die intrapankreatische MMP-2, -3, und -9 Aktivität stark gesteigert ist (Müller-Pillasch et al. 1997) könnte auch dieser Weg als alternativer Aktivierungsmechanismen beider Zytokine in Frage kommen.

Unser Projekt zielte schwerpunktmässig auf die Analyse der Rolle des IL-18 als weiteres, Caspase-1 abhängig aktiviertes Zytokin im Pathomechanismus der akuten Pankreatitis. Durch Vorbehandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-18 und IL-1 β sollte ein direkter Vergleich der hieraus resultierenden Effekte auf den Verlauf der Pankreatitis gewonnen werden. Über die Applikation eines Proteinase-3/Neutrophilen-Elastase-Inhibitors (P3/NE-I) wurde der Einfluss der Caspase-1 unabhängigen Aktivierung beider Zytokine untersucht.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimenteller Versuchsaufbau

Zur Induktion der als „nekrotisierend“ bezeichneten Pankreatitis wurde einerseits das durch retrograde Injektion von Na-Taurocholat-Lösung provozierbare Refluxmodell an männlichen Wistar-Ratten (250 - 300 g), andererseits das durch wiederholte intraperitoneale (i.p.) Caeruleininjektion induzierte Hyperstimulationsmodell an männlichen Mäusen (C57BL6, 20 - 25g) gewählt. Zur Analyse der frühen Veränderungen diente vorwiegend das Caeruleinmodell der Maus mit Beobachtungsintervallen von 3h, 6h, 12h und 24h nach Pankreatitisinduktion. Das Na-Taurocholat-Modell wurde zur Analyse der späteren

Veränderungen sowie der Letalität mit Beobachtungsintervallen von 6h, 12h, 24h und 3 Tagen nach Pankreatitisinduktion verwendet. In allen Versuchsgruppen wurde die Behandlung 30 Minuten vor bzw. zum Zeitpunkt der Pankreatitisinduktion begonnen und bis zum Versuchs-ende fortgesetzt. Nach Dosisfindungsstudien mittels dreier verschiedener Konzentrationen der neutralisierenden Antikörper bzw. des P3/NE-I wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

A: Caeruleinpankreatitis der Maus:

Gruppe 1A: CE-Pankreatitis + 100µl PBS i.p. alle 12h.

Gruppe 2A: CE-Pankreatitis + 100µl irrelevantes IgG i.p. alle 12h

Gruppe 3A: CE-Pankreatitis + 100µl neutralisierender IL-1 β AK i.p. alle 12h

Gruppe 4A: CE-Pankreatitis + 100µl neutralisierender IL-18 AK i.p. alle 12h

B: Caeruleinpankreatitis der Maus:

Gruppe 1B: CE-Pankreatitis + 100µl PBS i.p. alle 6h

Gruppe 2B: CE-Pankreatitis + 100µl P3/EL-I i.p. alle 6h

C: Na-Taurocholat-Pankreatitis der Ratte:

Gruppe 1C: TC-Pankreatitis + 100µl PBS i.v. alle 6h

Gruppe 2C: TC-Pankreatitis + 100µl P3/EL-I i.v. alle 6h

Zielparameter:

Histomorphologie und Ausmaß des inflammatorischen Infiltrates wurden an Paraffin- bzw. Kryoschnitten, ultrastrukturelle Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

Im Serum bzw. Plasma der Tiere wurden die Parameter IL-1 β und IL-18, MCP-1 und MIP-1 α mittels kommerzieller Sandwich-type ELISAs bestimmt. Es wurde ferner eine quantitative RT-PCR zur Analyse des intrapankreatischen Expressionsprofils für IL-1 β , IL-18, TNF- α und Caspase-1 etabliert und anschließend in den Pankreata des Versuchsteils A bestimmt. Die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α wurden im Gewebe mittels molekularbiologischer Techniken auf mRNA (semiquantitative PCR) und Proteinebene (Westernblot, Immunhistochemie) nachgewiesen.

2.2.2 Pankreatitis beim Menschen

Bei Patienten mit laborchemisch und morphologisch gesicherter, akuter Pankreatitis wurde nach deren Einwilligung über einen Zeitraum von 14 Tagen Serum / Plasma bzw. Aszites asserviert, aliquotiert und bei – 70°C gelagert. Ein Serumpool an 71 Patienten stand für

unsere Zytokin- (IL-1 β , IL-18, IFN- γ) und Chemokin- (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) Studien zur Verfügung.

2.3 Ergebnisse und deren Bedeutung

Bei Caerulein-induzierter experimenteller Pankreatitis der Maus konnten wir zeigen, dass sowohl die Neutralisation des IL-1 β als auch diejenige des IL-18 den intrapankreatischen Parenchymschaden durch Nekrose sowie das inflammatorische Infiltrat signifikant vermindert (Rau et al., Pancreas 2003). Bei unbehandelten Tieren kam es zu einer frühen intra- pankreatischen Überexpression von IL-1 β , IL-18 und Caspase-1 auf mRNA Ebene, die für IL-1 β am ausgeprägtesten war. Die Behandlung mit neutralisierendem IL-1 β und IL-18 AK führte zu einer signifikant geringeren IL-18 und Caspase-1 mRNA Expression, das IL-1 β mRNA Expressionsprofil wurde hingegen nicht beeinflusst. In der mit anti IL-18 AK behandelten Gruppe kam es erwartungsgemäß zu einer Reduktion der systemischen IL-18 Freisetzung in den Bereich gesunder Kontrolltiere. Im Gegensatz hierzu verblieb die systemische IL-1 β Konzentration in sämtlichen Versuchsgruppen unterhalb der Nachweisgrenze. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass IL-18 eine wesentliche Rolle im Pathomechanismus der akuten Pankreatitis besitzt. Der sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch äußerst wirksame Effekt der Caspase-1 Inhibition bei schwerer akuter Pankreatitis erklärt sich somit nicht, wie bisher angenommen, über das IL-1 β alleine, sondern ebenso über die Wirkung des IL-18. Interessanterweise decken sich die tierexperimentellen Ergebnisse hierbei vollständig mit den Beobachtungen bei humaner akuter Pankreatitis (Rau et al., Crit Care Med 2001). Einerseits wird IL-18 bei akuter Pankreatitis in quantitativ signifikant höherer Konzentration als IL-1 β freigesetzt, andererseits erreicht das IL-1 β nur bei klinisch sehr schwer verlaufender Pankreatitis systemisch detektierbare Bereiche. Das von uns eingesetzte Caerulein-induzierte Pankreatitismodell der Maus geht außer der Entwicklung von limitierten intrapankreatischen Nekrosen ohne relevante Organkomplikation und Letalität einher. Demnach entsprechen die bei unseren Tierexperimenten unter der Nachweisgrenze befindlichen systemischen IL-1 β Konzentrationen unseren bisherigen Beobachtungen.

Der Einfluss der Caspase-1 unabhängigen IL-1 β bzw. IL-18 Aktivierung über die Proteinase-3, einer von aktivierten PMN-Leukozyten freigesetzten Serin-Protease, wurde am Caeruleinmodell der Maus und am klinisch schwer verlaufenden Taurocholatmodell der Ratte untersucht. Der Einsatz eines kombinierten Proteinase-3/Neutrophilen-Elastase-

Inhibitors führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des intrapancreatischen Parenchymschadens und der leukozytären Infiltration. Am Taurocholatmodell konnte zudem gezeigt werden, dass hierbei vornehmlich die Infiltration durch neutrophile Granulozyten, gemessen an der Myeloperoxidase-Aktivität, deutlich inhibiert war. Neben der Verminderung des intra-pancreatischen Schädigungsausmaßes führte die Behandlung darüber hinaus zu einer Reduktion systemischer Veränderungen im Sinne einer deutlich geringeren pulmonalen PMN-Infiltration und einer geringer ausgeprägten Hämokonzentration. Von besonderem Interesse ist hierbei die hochsignifikante Verbesserung ($p < 0,009$) des Überlebens in der behandelten Gruppe (Tabelle 1). Die Ergebnisse stehen somit im Einklang mit unseren Beobachtungen der ersten Förderphase und könnten neben der Inhibition der Caspase-1 ein weiteres potentiell therapeutisches Target bei schwerer akuter Pankreatitis darstellen.

Tabelle 1: Versuchsgruppen-Letalität P3/EL-Inhibition bei TC-Pankreatitis.

		n	†	%
SAP + PBS	6 h	10	0	
	12 h	10	0	
	24 h	13	3	23,1
	3 d	22	13	59,1*
SAP + P3/EL-I	6 h	10	0	
	12 h	10	0	
	24 h	10	1	10,0
	3 d	12	1	8,3*

* $p = 0,009$

Weitere Ergebnisse unserer Untersuchungen legen nahe, dass zwischen der Caspase-1 und der Familie der Chemokine gegenseitige Regulationsmechanismen bestehen. Sowohl bei humaner als auch experimenteller Pankreatitis konnten wir lokal und systemisch einen hochsignifikanten Anstieg des CC-Chemokins MCP-1 verzeichnen (Rau et al., Intensive Care Med 2003; Krüger et al., Pancreas 2001, 23:447), welches unter den Mitgliedern der CC-Chemokin-Familie eine dominierende Rolle zu spielen scheint. Die Inhibition der Caspase-1 führte bei experimenteller Pankreatitis vor allem zu einer Reduktion der systemischen MCP-1 Freisetzung, welche wiederum mit dem deutlich geringeren Gesamtschweregrad und der geringeren Letalität korrelierte. Inwieweit hierbei die Caspase-1

selbst oder deren Substrate IL-1 β bzw. IL-18 die Synthese bzw. Freisetzung der CC-Chemokine beeinflussen, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

2.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereiches

Die Arbeitsgruppe um Prof. Singer in Mannheim beobachtete signifikant erhöhte systemische IL-18 Konzentrationen auch bei Patienten mit chronischer Pankreatitis (Schneider et al., *Pancreas* 2001, 23: 459). In jüngster Zeit konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß IL-18 bei weiteren inflammatorischen Krankheitsbildern wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Sepsis eine pathogenetisch wichtige Rolle zu spielen scheint. Hierbei trägt dieses Zytokin im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse zur Persistenz des lokalen Entzündungsprozesses bei (Lochner et al., *Pathobiology* 2002, 70:164-169). Bei Infektionen und Sepsis konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass IL-18 eine dem IL-1 β deutlich übergeordnete pathophysiologische Funktion besitzt. Die bei Caspase-1 defizienten Mäusen beobachtete signifikant geringere Letalität an gram-negativer Sepsis ist nicht durch die Abwesenheit von aktivem IL-1 β begründet, sondern ist vielmehr dem Fehlen von IFN-gamma zuschreiben. Interessanterweise ist jedoch der letalitätssenkende Effekt ebenfalls nicht durch IFN-gamma bedingt, sondern wird letztendlich durch die Anwesenheit von aktiviertem IL-18 bestimmt (Dinarello et al: *JID* 2003, 187: 370). Unseren bisherigen Ergebnissen bei Caerulein-induzierter Pankreatitis zufolge scheint das IL-18 ebenfalls einen potenteren Einfluss auf die Ausprägung des lokalen Schädigungsmusters zu besitzen als dies für das IL-1 β der Fall ist.

Hinsichtlich der Rolle der MMP-9 bei akuter Pankreatitis wurden kürzlich interessante Ergebnisse publiziert. Sowohl bei humaner als auch bei experimenteller Pankreatitis konnte die MMP-9 als bedeutender Faktor in der Pathogenese pulmonaler Komplikationen identifiziert werden (Keck et al., *Gastroenterol* 2002, 122: 188; Werner et al., *Pancreas* 2003, 27: 417). Die durch den Einsatz eines MMP-9 Inhibitors beobachteten protektiven Effekte auf die Entwicklung der pulmonalen Schädigung wurden jedoch nicht hinsichtlich des beschriebenen IL-1 β aktivierenden Potentials der MMP-9 analysiert.

2.5 Offene Fragen

Durch den Arbeitsplatzwechsel der Projektleiterin von Ulm in die Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, und Gefäßchirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar kann-

ten nicht alle der geplanten Fragestellungen im verbleibenden Bewilligungszeitraum bis 31.08.2003 bearbeitet werden. Die noch zu bearbeitenden Punkte sind folgende:

1. Analyse der intrapankreatischen IL-1 β und IL-18 Expression auf Proteinebene (Western-Blot, Immunhistochemie) zum Beweis der bereits auf mRNA-Ebene gewonnenen Erkenntnisse. Durchführung eines analogen Versuchsansatzes (siehe Versuchsaufbau A) am Caerulein-induzierten Modell der akuten Pankreatitis an genetisch veränderten, IL-1 β , IL-18 und Caspase-1 defizienten Mäusen zum Ausschluss möglicher, durch den Einsatz der neutralisierenden Antikörper bedingten Einflüsse.
2. Analyse der intrapankreatischen, pulmonalen und systemischen IL-1 β und IL-18 Expression bei den mit P3-/EL-I behandelten Tieren mit Caerulein- und Taurocholat-induzierter Pankreatitis.
 1. Stellenwert alternativer, Caspase-1 unabhängiger Aktivierungsmechanismen des IL-18 bzw. des IL-1 β : Der Projektteil zum Thema der Matrix Metalloproteinasen (MMP-2, -3, -9) steht noch zur Bearbeitung an.

2.6 Im Antragszeitraum erschienene Publikationen

Originalarbeiten:

- Paszkowski AS*, **Rau B***, Mayer JM, Möller P, Beger HG. Therapeutic application of caspase-1/interleukin-1 β -converting enzyme inhibitor decreases the death rate of severe acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 2002; 235: 68- 76 (* joined first authorship)
- Ittner L, Born W, **Rau B**, Steinbach G, Fischer JA. Circulating procalcitonin and cleavage products in septicaemia compared with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 727-731
- Rau B**, Baumgart K, Krüger CM, Schilling M, Beger HG. CC-Chemokine activation in acute pancreatitis: Enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003; 29: 622-629
- Rau B**, Steinbach G, Krüger CM, Baumgart K, Schilling M, Beger HG. Prognostic value of Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in acute pancreatitis. *Langenbeck's Arch Surg* 2003; 388: 181-188
- Hasel C, Dürr S, **Rau B**, Sträter J, Schmid RM, Walczak H, Bachem MG, Möller P. In chronic pancreatitis, widespread emergence of TRAIL receptors in epithelia coincides

with neoexpression of TRAIL by pancreatic stellate cells of early fibrotic areas. *Lab Invest* 2003; 83: 825-836

Übersichtsarbeiten/Bücher:

Beger HG, **Rau B**, Rünzi M, Isenmann R. Therapie mit Antibiotika bei schwerer akuter Pankreatitis. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 99: 116-122

Beger HG, **Rau B**, Isenmann R. Natural history of necrotizing pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 93-101

Rau B, Beger HG, Schilling MK. Biochemical severity stratification of acute pancreatitis: pathophysiological aspects and clinical implications. In: *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Eds.: JL Vincent, Springer Verlag, Berlin 2004, in press

2.7 Zitierte Literatur

Beger HG et al. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. *Gastroenterol* 1986; 49: 433.

Isenmann R et al. Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg* 1999; 86: 1020

Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76

Mayer J, Rau B et al. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 2000; 47: 546

Thornberry NA et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768

Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312

Zeuner A et al. Caspase activation without death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1075

Norman J et al. Severity and mortality of experimental pancreatitis are dependent on interleukin-1 converting enzyme. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 113

Rau B et al. Differential effects of caspase-1/interleukin-1 β -converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis. *Lab Invest* 2001; 81: 1001. (a)

Paszkowski AS, Rau B et al. Therapeutic application of caspase-1/interleukin-1 β -converting enzyme inhibitor decreases the death rate of severe acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 2002; 235: 68

- Ghayur T et al. Caspase-1 processes IFN- γ inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production. *Nature* 1997; 386: 619
- Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 β : two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *Clin Immunol* 1999; 19: 1
- Rau B et al. Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: High correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications. *Crit Care Med* 2001; 29: 1556
- Netea MG et al. Neutralization of IL-18 reduces neutrophil tissue accumulation and protects mice against lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia. *J Immunol* 2000; 164: 2644
- Coeshott C et al. Converting-enzyme independent release of tumor necrosis factor- α and IL-1 β from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase3. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 6261
- Schoenbeck U et al. Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: A novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing. *J Immunol* 1998; 161: 3340-3346
- Müller-Pillasch F et al. The influence of transforming growth factor beta 1 on the expression of genes coding for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during regeneration from caerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 1997; 15: 168